



UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

ECOLE DOCTORALE ED SV62

LABORATOIRE D'ADHESION ET INFLAMMATION/U1067

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Biologie

Spécialité : Immunologie

Anaïs SADOUN

Adhésion et mécanique standardisées de lymphocytes T : rôles dans l'activation par anticorps et cellules présentatrices d'antigène, sous force

Soutenance le 05/12/2018 devant le jury :

Loïc DUPRE	Inserm	Rapporteur
Claire HIVROZ	Institut Curie	Rapporteur
Hélène DELANOE-AYARI	CNRS	Examineur
Kheya SENGUPTA	CNRS	Examineur
Yannick HAMON	Inserm	Co-Directeur de thèse
Pierre-Henri PUECH	INSERM	Directeur de thèse

2018AIXM0478/001ED62

Résumé :

Les événements biochimiques de l'activation T ont été décrits depuis longtemps et sont bien connus. A l'échelle moléculaire la liaison du Récepteur des Cellules T (TCR) présent à la surface du lymphocyte T avec un peptide (du soi ou non soi), ce dernier étant chargé sur le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (MHC), présent à la surface des Cellules Présentatrices d'Antigène (CPA) conduit à l'initiation de la réponse immunitaire. La réponse des lymphocytes T est extrêmement spécifique, sensible, robuste et semble présenter des caractéristiques de mécano-transduction. En effet, il a été démontré récemment que le TCR agirait comme un mécanosenseur alors que le lymphocyte T peut sentir la mécanique de son environnement à une échelle cellulaire. Cependant, la majorité de ces études ont été réalisées en opposant un lymphocyte T à un substrat inerte limitant la compréhension sur la contribution éventuelle de chaque partenaire cellulaire car la présence de l'APC peut induire des changements dans l'organisation du lymphocyte T.

Le but de cette thèse a été de mettre en place un suivi de l'activation des lymphocytes T par une APC modèle, sous force grâce à l'utilisation de la microscopie à force atomique. Il a mené à plusieurs développements méthodologiques originaux validés de manière expérimentale avec un système cellulaire modèle (hybridomes murins vs. Cellules COS modifiées pour être des APC pouvant être modifiées à souhait grâce à l'expression d'une grande variété de molécules impliquées dans la réponse immunitaire).

Dans un premier temps, nous avons mis en place une méthodologie permettant d'utiliser simultanément mesures de forces par microscopie à force atomique (AFM) et microscopie de fluorescence afin de pouvoir effectuer le suivi de flux calciques dans des cellules immunitaires ou bien, à l'inverse, d'effectuer des expériences de force avec activation optogénétique de cellules modifiées. Nous avons mis en évidence et quantifier la présence de signaux parasites résultant du couplage des deux types de microscopie.

Dans un second temps, nous avons ensuite cherché à standardiser les expériences de suivi de l'activation de cellules T en contrôlant l'adhésion cellulaire et les propriétés mécaniques. Pour cela nous avons optimisé l'utilisation de l'impression protéique en utilisant le « Micro-Contact Printing ». Un des challenges a été de trouver quelles molécules permettraient l'adhésion des lymphocytes T sans provoquer d'activation ni d'anergie ce qui a pu être réalisé par l'utilisation d'un anticorps anti-CD4. Nous avons mis en évidence que nous pouvons contrôler l'adhésion, la forme, la mécanique et l'activation des cellules T.

Dans un troisième temps, nous avons, pour lever les ambiguïtés liées à l'utilisation de CD45 comme ancrage, exprimé de manière ectopique une molécule d'adhésion non lymphoïde (MEGF10) dans les lymphocytes T permettant à nos cellules d'adhérer sans perturber leur capacité activatrice.

Dans un quatrième temps, nous avons utilisé l'AFM dans un mode force nommé « Single Cell Force Spectroscopy » (SCFS) permettant de mesurer les forces entre une APC modèle, portée par le levier, et un lymphocyte T adhérent. Nous avons effectué des expériences sous force, (i) entre cellules, où l'activation est suivie au cours du temps grâce à une sonde calcique fluorescente et (ii) lorsque l'on bloque les flux calciques. Nous avons observé des modifications des réponses mécaniques de manière très précoce et dépendante du peptide.

Enfin, nous décrivons des expériences menées en parallèle et portant sur les APC modèles, en particulier l'imagerie et la caractérisation de leur lamellipode en vue de l'utiliser comme surface présentatrice pour le suivi des interactions avec des cellules T par des méthodes optiques de surface.

Abstract:

The biochemical events of T activation have been described for a long time and are well known. At the molecular level, the binding of the T-cell receptor (TCR) present on the surface of the T-cell with a peptide (self or non-self) loaded on the Major Histocompatibility Complex (MHC), present on the surface of the Antigen Presenting Cells (APC), leads to the initiation of the immune response. In addition, the T cell response is extremely specific, sensitive, robust and appears to have mechano-transduction characteristics. Indeed, it has recently been demonstrated that the TCR would act as a mechanosensor while the T lymphocyte can feel the mechanics of its environment on a cellular scale. However, the majority of these studies were performed by opposing/facing a T cell to an inert substrate (e.g., bead, functionalized glass slides molecularly decorated or not), limiting the understanding of the possible contribution of each cell partner because the presence of APC can induce changes in the organization of the T cell.

The aim of this thesis was to set up a follow-up of the activation, under force, between a model APC and a T lymphocyte. It has led to several original methodological developments experimentally validated with a model cell system (mouse hybridomas vs. COS cells modified to be complexifiable APCs).

As a first step, we have implemented a methodology that allows us to simultaneously use force measurements by atomic force microscopy (AFM) and fluorescence microscopy to monitor calcium fluxes in immune cells or, conversely, to perform force experiments with optogenetic activation of modified cells. We showed and quantified the presence of parasite signals due to the coupling between the two microscopic techniques.

In a second step, we then sought to standardize experiments to monitor T cell activation by controlling cell adhesion and mechanical properties. For this reason, we have optimized the use of protein printing using "Micro-Contact Printing". One of the challenges was to find out which molecules allowed T lymphocytes to adhere without causing activation or energy which has been performed by using anti-CD45 antibodies. We then studied the T cell mechanics by AFM and the activation of the shaped cells by following the calcium fluxes mentioned above. We showed that we can control the adhesion, the shape, mechanics and T cell activation.

In a third step, to remove the ambiguities related to the use of CD45 as an anchor, we introduced into our cells a non lymphoid adhesion molecule (MEGF10) allowing our cells to adhere without perturbing their activation properties.

Fourth, we used AFM in a force mode called Single Cell Force Spectroscopy (SCFS) to measure the forces between a model APC, carried by the lever, and an adherent T cell. We have carried out experiments under force (i) between cells, where activation is monitored over time using a fluorescent calcium probe and (ii) when calcium fluxes are blocked. It allows us to observe changes in mechanical responses very early and dependent on the peptide.

Finally, we describe parallel experiments on model APCs, in particular the imaging and characterization of their lamellipodia for use as a presenting surface for monitoring interactions with T cells by surface optical methods.

Remerciements

Je souhaite remercier les membres de mon jury : M. Loïc Dupré, Mme Claire Hivroz, Mme Delanoë-Ayari et Mme Kheya Sengupta d'avoir accepté d'évaluer ce travail et pour tous leurs bons conseils afin de faire évoluer positivement ce manuscrit.

Je remercie le Labex Inform et les membres qui le composent pour avoir financé ma thèse durant ces quatre années.

Merci aux membres de mon comité de thèse M. Felix Rico, M. Pierre Recouvreux et M. Romain Roncagalli pour leurs conseils afin d'avancer dans mon projet.

Je remercie également M. Pierre Bongrand, précédent directeur et fondateur du LAI, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, mais aussi pour avoir partagé ses connaissances sur la littérature scientifique ainsi que ses questions lors des réunions qui nous obligeaient à avoir une vue globale et plus détachée de notre sujet de recherche.

Merci à M. Olivier Theodoly, actuel directeur du LAI, pour avoir permis aux étudiants d'être plus impliqués dans la vie du laboratoire mais aussi pour son dynamisme afin qu'on partage nos connaissances et compétences. Merci également pour l'aide et les conseils lors des expériences de chimie de surface et micropatterning.

Je remercie M. Hai Tao He et M. Didier Marguet pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire, un grand merci à tous les membres de l'équipe, Anthony Formisano pour ton aide en culture cellulaire, Remi Lasserre pour les discussions sur le calcium et les surfaces, Sébastien Mailfert pour la formation en microscopie (merci à toute la plateforme Imagimm Mathieu Fallet et Roxane Fabre) et ton aide sur Matlab, Tom Borianne pour les conversations.

Je tiens à remercier chaleureusement mes deux directeurs de thèse M. Pierre-Henri Puech et M. Yannick Hamon qui m'ont permis de réaliser ces quatre années de thèse dans de très bonnes conditions. Il n'a pas été facile au départ d'être confrontée à la vision d'un physicien et d'un immunologiste dont l'angle d'attaque d'un problème peut énormément varier mais qui finalement sont convergentes. Cette diversité m'a permis d'apprendre plusieurs techniques différentes et aussi m'a apporté une certaine autonomie dans mon travail. J'ai beaucoup aimé (une fois que cela marchait) ces parties de développement où il fallait « mettre les mains dans le cambouis », le collage de billes sur les cantilevers qui a mis ma patience à rude épreuve, ainsi que la formation de bulles lors de l'utilisation de la microscopie à force atomique. Merci à tous les deux pour la rigueur scientifique dont vous avez fait preuve. Avec Pierre-Henri j'ai pu faire des essais d'expériences que même les plus grands labs du monde n'oseraient jamais essayer nous amenant doucement et sûrement sur la route de « Pipettas de Plata ». Avec Yannick, j'ai pu faire revivre mon imaginaire d'enfant où au lieu d'imaginer des formes dans les nuages je le faisais avec les lymphocytes T pendant les expériences de calcium. Merci à vous les deux pour les qualités humaines dont vous avez fait preuve, en partageant avec moi la sagesse que l'on acquiert avec l'expérience (l'âge) et en étant là pour moi outre que dans le domaine professionnel.

Merci à tous mes collègues pour leur bonne humeur et leurs conseils durant ces années : Mme Marie-Pierre Valignat pour la RICM, les traitements de surface et le bon fonctionnement de la machine à café, M. Laurent Limozin pour les molécules répulsives ainsi que ces conseils

permettant de recentrer mon travail, M. Philippe Buddy Robert pour la science des avions , BD pour m'avoir fait bien rire et toutes ces belles images du vendredi soir qui vont me manquer, un grand merci pour ton support dans les moments difficiles, M. Cyrille Mionnet pour avoir amené plus d'immunologie mais surtout pour avoir partagé ton expérience dans la recherche et pour les conseils donnés pour la partie post-thèse. Merci à Mme Claire Forestier pour les conseils en biologie. Merci à Mme Martine Biarnes-Pelicot pour ton aide en cytométrie, l'approvisionnement en shokobons et tous les efforts que tu fais pour que le labo tourne correctement (un jour tout fonctionnera). Merci à Mme Christine Erismann pour ta gentillesse quotidienne, tous tes bons conseils et la bienveillance que tu m'as apportée. Merci à Mme Adeline Querdray, tu as été une des premières à m'accueillir au sein du laboratoire et m'a permis de déconnecter quand il le fallait, merci pour tous tes conseils et ta gentillesse. Je tiens à remercier les étudiants et post-docs présents et passés du laboratoire. Merci à M. Thomas Sbarrato pour avoir été si gentil, attentionné et de m'avoir aidé quand je te l'ai demandé, à Laurène Aoun pour toujours avoir la pêche, les séances fashionistas et l'aide pour les masques. Merci à Mme Nassima Chouaki, M. Alexandre Brodovitch, M. Kamel Khelloufi et M. Alexander Hornung pour vos conseils d'« anciens » et pour me rassurer dans les moments de doute qui font partie de la thèse et sont communs à tous les étudiants. Merci à Xuan Luo, Paulin Nègre, Geoffrey Delhaye, Nicolas Garcia Seyda pour avoir partagé leur quotidien de thésard au milieu des rires et des questions sur l'avenir. Merci à Cristina Speedy Gonzalez pour ton énergie sans fin, d'avoir guéri le cancer de Mme Dupont et d'avoir été ma colocataire de bureau ce qui nous a permis de partager beaucoup de moments et plus particulièrement dernièrement lors de l'écriture de nos thèses respectives où ton soutien m'a beaucoup aidé. Merci à Laurence Borge pour son aide sur la plateforme de culture cellulaire et les bons gâteaux amenés au labo, à Fred Bedu, de la plateforme Planète du Cinam, pour m'avoir gentiment accueilli et pris de son temps pour me former en salle blanche et de m'avoir aidé à faire les masques. Merci à toutes les étudiantes et tous les étudiants qui sont passés au labo avec qui j'ai pu partager mes connaissances mais aussi apprécier leur travail qui m'a aidé dans mon projet de recherche. Merci aux copains du Cinam qui ont égayé mes repas et certaines soirées Arnaud Hemmerle et Camille, Etienne Loiseau, Alexis Moreau, Emmanuelle Benard, Sébastien Lamant et Aya Nassereddine pour votre gentillesse.

Je tiens à remercier tous les enseignants, professeurs qui ont pris le temps de répondre à toutes mes questions et m'ont permis de cultiver ma curiosité. Merci à Sylvie Degenève qui a eu la patience au lycée de m'apprendre la méthodologie en biologie et de m'avoir fait aimer cette matière, les petits pois de Mendel et les génotypes des drosophiles ne m'ont pas traumatisé! Merci à Annick et Robert Basseur pour tous leurs précieux conseils durant mes années universitaires et d'avoir toujours plaisir à parler science ensemble.

Un grand merci à mes amies lotoises de toujours, depuis les tours dans le collège Gambetta à l'arrivée de la nouvelle génération. Merci Camille, Claire, Marine, Léa et Edith pour votre soutien et votre amitié constante. Les moments de rencontre se font de plus en plus rares mais sont toujours géniaux et sont emplis de bonheur. Merci d'avoir porté de l'intérêt à ma thèse même si je parlais chinois pour vous. J'ai hâte de voir ce que l'avenir nous réserve.

Merci aux amis marseillais, Florian Lankar et Marine Graux ça a toujours été un plaisir de passer du temps avec vous. On vous attend en Autriche !

Oide Nina, Gert, Victor und Johanna, Ich danke Euch für Eure Unterstützung und Freundschaft. Ich kann es kaum erwarten Eure Nachbarin zu sein!

Renate und Andreas Hornung, merci beaucoup pour votre gentillesse et m'avoir si bien accueillie dans votre famille et de m'avoir fait découvrir le monde extraordinaire des Knödeln.

Un grand merci à Alexander Eu Hornung, pour m'avoir fait découvrir ce beau pays d'Europe centrale (de l'est) qu'est l'Autriche et d'en faire notre maison. Je n'aurais pas parié sur mon expatriation dans ce pays il y a quelques années. Tu as toujours été là dans les moments difficiles, les moments de doute et m'apportes beaucoup de bonheur quotidiennement. L'aventure d'une vie nous attend prochainement et je n'aurais pas pu souhaiter meilleur partenaire (Koala) pour la partager.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, ma petite sœur Cloé qui m'a demandé pendant 2 ans après le début de ma thèse comment se portaient mes drosophiles alors que je travaillais sur des cellules. Merci Coco pour tout ton amour et support et m'avoir fait « déconnecter » lors de soirées toulousaines. Merci à mes parents, qui ont toujours tout fait pour notre éducation, me permettant de découvrir une partie du monde en pouvant étudier à l'étranger et de m'avoir toujours supporté et encouragé quand je commençais à douter. Je pense qu'après ma soutenance j'aurai honorée la lettre écrite et signée il y a 20 ans. Je tiens également à remercier mes grands-parents qui se sont toujours intéressés à savoir si tout se passait bien à l'école et si je travaillais bien ! Je dédie ce travail à mon grand-père M. André Graniou qui n'aura pas eu le temps de voir ce jour important pour moi.

"I Will Survive"

At first I was afraid, I was petrified
Kept thinking I could never live without you by my side
But then I spent so many nights thinking how you did me wrong
And I grew strong, and I learned how to get along

And so you're back from outer space
I just walked in to find you here with that sad look upon your face
I should have changed that stupid lock
I should have made you leave your key
If I had known for just one second you'd be back to bother me

Go on now, go. Walk out the door
Just turn around now 'cause you're not welcome anymore
Weren't you the one who tried to hurt me with goodbye?
Did you think I'd crumble?
Did you think I'd lay down and die?

Oh, no, not I
I will survive
Oh, as long as I know how to love I know I'll stay alive
I've got all my life to live
I've got all my love to give
And I'll survive
I will survive, hey, hey

It took all the strength I had not to fall apart
Kept trying hard to mend the pieces of my broken heart
And I spent, oh, so many nights just feeling sorry for myself
I used to cry but now I hold my head up high

And you see me somebody new
I'm not that chained-up little person still in love with you
And so you felt like dropping in
And just expect me to be free
And now I'm saving all my loving for someone who's loving me

Go on now, go. Walk out the door
Just turn around now 'cause you're not welcome anymore
Weren't you the one who tried to break me with goodbye?
Did you think I'd crumble?
Did you think I'd lay down and die?

Oh, no, not I
I will survive
Oh, as long as I know how to love I know I'll stay alive
I've got all my life to live
I've got all my love to give
And I'll survive
I will survive

Gloria Gaynor, 1978, qui a dû faire une thèse dans une autre vie.

I. Introduction	1
1. Origine et développement des lymphocytes T : de la cellule souche à un lymphocyte T fonctionnel	4
2. Les acteurs majeurs de la réponse immunitaire T CD4+	6
2.1. Le Récepteur des Cellules T ou TCR.....	6
2.2. Le complexe majeur d'histocompatibilité MHC.	9
2.3. Les clusters de différenciation CD4 et CD8	11
2.4. La protéine tyrosine kinase Lck.....	11
2.5. Le récepteur de costimulation CD28	13
2.6. Les intégrines, le rôle de LFA.....	14
2.7. La phosphotyrosine phosphatase CD45	15
3. Activation du lymphocyte T	16
3.1. La voie calcique classique	18
3.2. Les voies de signalisation	19
4. Le cytosquelette	21
4.1. Le cytosquelette d'actine.....	22
4.2. Les protéines de la famille ERM : Ezrine, Radixine et Moésine	25
4.3. Les myosines	26
4.4. Les microtubules.....	27
5. Organisation et dynamique de la membrane plasmique	27
5.1. La structure de la membrane plasmique.....	27
5.2. La synapse immunologique	28
6. Engagement du TCR	30
6.1. La spécificité	31
6.2. La vitesse	31
6.3. La sensibilité	32
7. Les modèles d'engagement du TCR	32
7.1. Modèle de kinetic proofreading et son évolution	34
7.2. Modèle d'engagement en série	36
8. Les modèles d'initiation du signal	38
8.1. Agrégation moléculaire	38
8.2. Modèle de déformation conformationnelle	40
8.3. Modèle de ségrégation cinétique	41
9. Rôles des forces dans l'activation T	42
9.1. L'activation T est un moment clef où les forces physiques sont en jeu : une cellule T rencontre et scanne l'APC.	43

9.2.	A l'échelle moléculaire, le TCR est une molécule mécanosensible	44
9.3.	A l'échelle mésoscopique, la cellule T intègre des paramètres physiques de son environnement	44
9.4.	La cellule T activée produit des forces en retour, voire adapte sa mécanique.....	46
9.5.	La forme même de la cellule peut être déterminante	47
9.6.	Est-ce physiologique ?	49
10.	Les approches actuelles de la mécanotransduction de l'activation T sont cependant limitées.....	50
II.	Questions ouvertes.....	53
III.	Objectifs et positionnement de notre étude.....	55
IV.	Matériel et Méthode.....	59
1.	Lignées cellulaires et culture cellulaire.....	59
1.1.	Présentation des lignées cellulaires	59
1.2.	Culture cellulaire	63
1.2.1.	3A9m, et lignées dérivées	63
1.2.2.	COS7 APC et dérivées.....	64
1.2.3.	Congélation	65
1.2.4.	Décongélation.....	65
1.2.5.	Protocoles de fixation et marquage.....	65
1.2.6.	Charge calcique	66
2.	Constructions moléculaires	73
2.1.	Protocoles de nucléofection AMAXA	73
2.2.	Obtention de clones stables.....	74
3.	Cytométrie en flux	79
3.1.	Principe.....	79
3.2.	Application à nos échantillons cellulaires.....	80
3.3.	Analyse en cytométrie en flux.....	84
4.	Protocole de production d'Ac monoclonaux.....	84
5.	Tri des cellules	84
6.	Couplage de fluorochromes	89
7.	Microscopie à Force atomique	89
7.1.	Principe.....	89
7.2.	Calibration	92
7.3.	Paramètres expérimentaux des mesures du module de Young cellulaires.....	93
7.4.	Traitement des données	96
8.	Microscopie optique de surface : microscopie de réflexion par Contraste Interférentiel.	99

8.1.	Principe.....	99
8.2.	Paramètres expérimentaux appliqués aux cellules 3A9m, et Meg	101
8.3.	Traitement des données	102
9.	Microscopie confocale	102
9.1.	Principe.....	102
9.2.	Applications de la microscopie confocale à notre projet.....	103
9.3.	Traitement des données	104
10.	Photolithographie	104
10.1.	Principe.....	104
10.2.	Caractéristiques des galettes de silicium utilisées.....	105
11.	Impression protéique par Micro-Contact Printing	106
12.	Construction des sets de données et traitement statistique.....	107
13.	Tableau des références des anticorps et produits utilisés	109
V.	Résultats	113
1.	Couplage de la microscopie à force atomique et la microscopie à fluorescence	113
1.	Réponse du système Colibri (% demandé vs. Puissance obtenue) ; choix des objectifs 114	
2.	Choix des leviers ; rôle de l'or	117
3.	Modification des sondes de force ; réalisation à bas coût de sonde colloïdales.....	117
2.	La mise en forme des cellules T par micropatterning permet de contrôler la forme, la mécanique et l'activation	123
1.	Contexte de l'étude.....	123
2.	Résultats	124
2.1.	Optimisation de l'adhésion / non adhésion (répulsion) des cellules T avec contrôle de leur activabilité	125
2.2.	Transfert de motifs adhésifs / répulsifs adaptés aux cellules T	134
2.3.	Caractérisation mécanique des cellules mises en forme ou non	139
2.4.	Les cellules mises en forme sont réactivables par aCD3 soluble	143
3.	Conclusions and perspectives	146
3.	L'expression ectopique du récepteur non lymphoïde MEGF10 comme molécule d'adhésion de lymphocytes T ne me modifie pas les propriétés mécaniques et l'activation.	149
1.	Contexte de l'étude.....	149
2.	Résultats	150
2.1.	Expression à la membrane de MEGF10.....	150
2.2.	Caractérisation au microscope confocal de MEGF10.....	153
2.3.	Mesures mécaniques des cellules 3A9m Meg	154
2.4.	Evaluation de l'impact fonctionnel de MEGF10 sur la réponse calcique	155

2.5.	Micropatterning des cellules 3A9m MEGF10::EYFP	158
2.6.	Mise en place du contact de la cellule COS APC et cellule Meg par AFM	160
3.	Conclusions et perspectives	162
4.	Observation d'une signature mécanique précoce de la reconnaissance de peptide entre cellule T et APC sous force.	163
1.	Contexte de l'étude.....	163
2.1.	Des flux calciques, sous force, sont observés.....	164
2.2.	L'interaction 3A9m / COS 7 APC dépend du peptide, en présence de PP2.....	167
2.3.	La relaxation mécanique du couple cellulaire 3A9m / COS APC sur 1 min dépend du peptide, en présence de PP2.....	171
2.4.	Des ondulations de force sont observées a des temps > 10 sec et < 1 min, en présence de PP2 et elles dépendent du peptide présent.	174
3.	Conclusion et perspectives.....	182
3.1.	Des oscillations relativement lentes, peptides dépendants	182
3.2.	Discussion et perspectives	182
5.	Etude sur l'autre partenaire cellulaire les COS APC	185
1.	Caractérisation des COS APC	185
1.1.	Micropatterning des cellules COS APC	186
1.2.	Mesures d'indentation par AFM des COS APC afin de déterminer leur module de Young 188	
1.3.	Microscopie confocales des cellules COS APC	189
2.	Essais de mise en contact d'une cellule T 3A9m et COS APC	190
6	. Méthodologie : Mesures mécaniques en AFM, Module de Young et tension membranaire.....	195
	Article: Quantifying CD95/cl-CD95L implications in cell mechanics & membrane tension by atomic force microscopy based force measurements	196
VI.	Perspectives et conclusions.....	197
	Bibliographie	205
	Glossaire.....	223

Index des figures

Fig. 1.1 : Développement et maturation des Lymphocytes T

Fig. 1.2 : la recombinaison des exons des gènes V(D)J

Fig. 1.3 : Structure du complexe TCD/CD3

Fig. 1.4 : Structure du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

Fig. 1.5 : Voie de présentation de l'antigène au MHC II.

Fig. 1.6 : Structure des clusters de différenciation CD4 et CD8

Fig. 1.7 : Structure de la protéine tyrosine kinase Lck

Fig. 1.8 : Schéma décrivant la structure de CD28

Fig. 1.9 : Structure de deux isoformes de CD45 : CD45ABC et CD45R0

Fig. 1.10 : Voies de signalisation permettant l'augmentation de calcium intracellulaire dans le lymphocyte T

Fig. 1.11 : Résumé de l'action des différentes voies de signalisation conduisant à une augmentation du calcium intracellulaire pendant l'activation lymphocytaire T

Fig. 1.12 : Polymérisation des filaments d'actine

Fig. 1.13 : Différentes structure de l'actine.

Fig. 1.14 : Structure des protéines ERM

Fig. 1.15 : Organisation de la synapse immunologique monocentrique

Fig. 1.16 : Modèle initial de kinetic proofreading

Fig. 1.17 : Modifications du modèle de kinetic proofreading

Fig. 1.18 : Modèle d'engagement en série des TCR

Fig. 1.19 : Le modèle de pseudo dimère

Fig. 1.20 : Modèle de déformation conformationnelle

Fig. 1.21 : Modèle de ségrégation cinétique

Fig. 1.22 : Mise en évidence d'élasticité ou module de Young variable de différentes APC

Fig. 1.23 : Expérience de micropipettes permettant de mettre en contact une cellule T et une bille activatrice, mettant en évidence que la cellule T exerce des forces lors de son activation

Fig. 1.24 : Mise en évidence d'une réponse calcique différente lors du contact entre une cellule B et une cellule T en fonction du point de contact sur la cellule T

Fig. 3.1 : Schéma du système expérimental couplant microscopie à force atomique et microscopie à fluorescence

Fig. 4.1 : Illustration de la protéine Lck₁₋₁₂ ::EGFPm ::HRAS-Cterm à la membrane

Fig. 4.2 : Illustration de la protéine tronquée de Lck fusionnée à la séquence de mCherry et de la 5-phosphatase INP54

Fig. 4.3 : Modèles cellulaires du système biologique

Fig. 4.4 : Observations des lymphocytes T et COS APC en lumière blanche

Fig. 4.5 : Résumé des différentes étapes du suivi cellulaire et du traitement du signal en post-analyse

Fig. 4.6 : Interface du logiciel MAACS post-analyse

Fig. 4.7 : Production et expression de la protéine MEGF10

Fig. 4.8 : A : Cytogramme des COS APC

Fig. 4.9 : Dérive de l'expression du TCR

Fig. 4.10 : Exemple de résultats d'un générateur de spectre des fluorochromes d'intérêt utilisés pour le marquage des lymphocyte T

Fig. 4.11 : Principe simplifié de la microscopie à force atomique

Fig. 4.12 : Exemple du mouvement du ressort en mode spectroscopie de force

Fig. 4.13 : notre système expérimental couplant la microscopie à fluorescence et l'AFM

Fig. 4.14 : Spectre de la fréquence de résonance d'un cantilever triangulaire

Fig. 4.15 : système des micropipettes

Fig. 4.16 : Comparaison des spectres de fréquences de deux cantilevers

Fig. 4.17 : Courbe de force obtenue avec le logiciel JPK Data Processing

Fig. 4.18 : Principe de la microscopie réflective à contraste interférentiel

Fig. 4.19 : Mesure de l'aire des lymphocytes T

Fig. 4.20 : principe de la photolithographie

Fig. 4.21 : Tampon de PDMS

Fig. 4.22 : pattern de bBSA révélée avec de la streptavidine fluorescente

Fig. 4.23 : Plots des valeurs de module de Young en fonction de l'acquisition temporelle de la courbe de force

Fig. 5.S1 : Puissance moyenne des diodes à une longueur d'onde donnée et un pourcentage donné

Fig. 5.S2 : Collage d'une bille de 5 μ m de diamètre sur un cantilever

Fig. 5.1 : Schéma d'une expérience de MAAACS

Fig. 5.2 : Images de l'étalement de 3A9 sur une surface continue au cours du temps

Fig. 5.3 : Caractérisation de la morphologie d'adhésion des cellules T 3A9m

Fig. 5.4 : Mesures des propriétés d'adhésion des cellules 3A9m sur aCD45 ou aMHC I

Fig. 5.5 : Conversion de l'intensité de fluorescence en densité de molécules

Fig. 5.6 : Impression protéique sur une surface de verre

Fig. 5.7 : Imagerie confocale des patterns

Fig. 5.8 : Caractérisation des propriétés mécaniques des cellules T 3A9m

Fig. 5.9 : Observation et mesures de l'activation T par stimulation avec un aCD3 soluble à 20µg/ml.

Fig. 5.10 : Imagerie en AFM des surfaces micropatternées

Fig. 5.11 : Représentation schématique de la protéine MEGF10

Fig. 5.12 : Tri cellulaire des cellules 3A9m exprimant la construction MEGF10 ::YFP

Fig. 5.13 : MEGF10 ségrége au niveau de la zone d'adhésion à l'interface verre et membrane basale.

Fig. 5.14: MEGF10 présente des propriétés mécaniques similaires aux 3A9m et peuvent être modulées par la concentration de Poly-L-Lysine

Fig. 5.15 : Morphologie des cellules 3A9m Meg adhérees sur différents substrats

Fig. 5.16 : Réponse calcique des cellules 3A9m MEGF10::EYFP

Fig. 5.17 : Mesure de l'activation des cellules 3A9m MEGF10::EYFP

Fig. 5.18 : Exemples de micropatterns où les cellules adhèrent non spécifiquement

Fig. 5.19 : Deux exemples d'expériences d'impression de PLL fluorescente

Fig. 5.20 : Images et mesures de l'aire des COS APC en RICM après sédimentation sur du verre

Fig. 5.21 : Interaction d'une cellule T et COS APC lors du couplage de la microscopie AFM et en fluorescence

Fig. 5.22 : Mesures des propriétés mécaniques du couple T/COS APC.

Fig. 5.23 : Phase de relaxation

Fig. 5.24 : La relaxation mécanique du couple 3A9m / COS APC est influencée par la présence de peptide

Fig. 5.25 : Résultats de la méthode 1

Fig. 5.26 : Résultats pour la méthode 3

Fig. 5.27 : Résultats pour la méthode 4. Etude de l'amplitude du signal > 10sec.

Fig. 5.28 : Résultats pour la méthode 4. Etude des transformées de Fourier

Fig. 5.29 : Résultats pour la méthode 3 réalisée sur la ligne de base des différentes expériences

Fig. 5.30: Impression protéique pour l'immobilisation de COS APC.

Fig. 5.31 : Mesures des propriétés mécaniques des COS APC

Fig. 5.32 : Imagerie confocale de cellules COS APC fixées

Fig. 5.33 : Observation des premiers essais de mise en contact entre APCs patternées et lymphocyte T

I. Introduction

La défense contre des pathogènes est un mécanisme clé pour maintenir l'homéostasie d'un être vivant. Cette défense est basée sur l'immunité qui correspond à une action de l'organisme contre une agression de pathogène extracellulaire ou intracellulaire (bactéries, virus, parasites). On peut diviser l'immunité en deux groupes : l'immunité innée présente chez les plantes, invertébrés et vertébrés et l'immunité adaptative présente en plus de l'innée, chez les Vertébrés.

1.1. L'immunité innée

Elle est la première à s'activer quand l'organisme est attaqué, elle est rapide et principalement non spécifique. Les premières barrières de défense de l'organisme sont physiques et externes, il s'agit de la peau et des muqueuses. D'autres barrières physiques existent aussi dans l'organisme comme par exemple le mucus qui recouvre les cellules pulmonaires et permet un drainage des pathogènes, ou le péristaltisme de l'intestin.

Une fois que ces barrières sont passées plusieurs types cellulaires vont prendre le relai afin d'éliminer l'attaque, c'est le rôle des cellules phagocytaires, qui comprennent les macrophages et les cellules dendritiques. Le système immunitaire inné n'est pas totalement non spécifique comme cela a été pendant longtemps décrit. En effet, il est capable de discriminer ce qui vient du soi et une certaine variété de pathogènes. Cette reconnaissance de différents microorganismes se fait via des récepteurs génériques les Pattern Recognition Receptors (PRRs) qui identifient des composants microbiens, connus sous le nom de Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), qui sont essentiels à la survie du microorganisme et qui sont donc difficiles à modifier par le microorganisme lui-même (1).

Le système immunitaire innée est composé des cellules lymphoïdes innées (ILC pour innate lymphoid cells) et sont responsables d'une réponse immunitaire rapide suite à des agressions de diverses origines : virale, bactérienne, parasitaire ou cancéreuse, auxquelles l'organisme doit faire face. Les ILC sont composées des cellules natural killer (NK), des lymphoid tissue inducer cells (LTi), des ILC1, des ILC2 et des ILC3 (2)

Les cellules natural killer (NK) sont les premières cellules découvertes du système immunitaire inné en 1975 par R. Kiessling, R.B. Herberman et leurs collaborateurs (3), (4). Ce n'est qu'en 1997 qu'une deuxième population de cellules lymphocytaires innées est découverte, les lymphoid tissue inducer cells (Lti) par R.E. Mebius et ses collaborateurs (5). Pendant de longues années Les cellules NK et LTi sont restées les seuls types de lymphocytes

Introduction

innés connus jusqu'à la découverte il y a une dizaine d'années de l'existence d'autres types cellulaires immunitaires appartenant au système inné telle que : les cellules NK22, ROR(retinoic acid receptor related orphan receptor) γ ⁺ NKp46⁺, NK-LTi, nuocytes ou encore natural helper cells (6), (7). Ces cellules nouvellement identifiées ont été classées en trois catégories : les ILC de type 1 (dont font partie les cellules NK), les ILC de type 2 et les ILC de type 3 (dont font partie les LTi) (8) en fonction de fortes similarités avec les lymphocytes T activées en ce qui concerne les facteurs de transcription et cytokines produites.

1.2. L'immunité adaptative : les lymphocytes T

Les vertébrés présentent, en supplément à l'immunité innée, l'immunité adaptative qui est hautement spécifique, sensible, rapide et robuste. Elle repose sur la présence d'un très grand répertoire de reconnaissance spécifique de récepteurs uniques et pouvant identifier des éléments issus de pathogènes d'origine variée : parasites, virus ou bactéries. En outre, l'immunité adaptative possède une mémoire d'une première reconnaissance ayant conduit à une réponse immunitaire. C'est cette mémoire, qui perdure plusieurs années, qui permet lors d'une nouvelle attaque par le même pathogène d'avoir une réponse immunitaire plus rapide et plus forte.

Les lymphocytes T (LT) sont une des pierres angulaires du système immunitaire adaptatif. Ils permettent la reconnaissance spécifique des antigènes. Les LT ne sont pas capables de reconnaître un pathogène dans leur forme native mais ils sont capables de reconnaître un peptide d'une longueur de 10 à 12 acides aminés issus de la digestion du dit pathogène par des cellules de l'immunité innée. Les LT peuvent reconnaître une très grande variété de peptide grâce à leur récepteur T (TCR). Ils sont également capables de discriminer les peptides issus du soi, et dans ce cas précis ne doivent pas s'activer, et les peptides provenant du non-soi. Cette capacité de distinction très fine mais aussi très rapide fait des LT un type cellulaire d'une extrême spécificité. En effet, des dysfonctions de cette détermination peuvent entraîner des conséquences très graves qui vont se manifester, par exemple, par des pathologies de type auto-immunes, notamment dans le cas d'une auto-réactivité trop forte contre le soi.

La grande variabilité des TCR (on estime à 10^{12} TCR différents chez un être humain) est nécessaire et suffisante pour reconnaître des millions de déterminants antigéniques car un

Introduction

TCR n'est capable de reconnaître qu'un petit nombre de combinaisons MHC-peptide ce qui explique le fait que nous possédons qu'un faible nombre de clones portant le même TCR (environ 10 cellules par type de clone en absence de stimulation). C'est lors de la rencontre et de la reconnaissance avec le peptide agoniste que va avoir lieu l'activation de ces LT qui conduira à la sélection d'un clone précis puis à l'expansion clonale et enfin à la différenciation des LT. Ces étapes sont rapides car elles doivent permettre d'empêcher la prolifération du pathogène. Deux types de réponse peuvent se mettre en place et dépendent de la nature du pathogène : la réponse humorale pour des microorganismes extracellulaires (par exemple une bactérie) et la réponse cellulaire pour les microorganismes intracellulaires (virus).

La reconnaissance du pathogène, ainsi que son origine, par un LT se fait via la liaison à un peptide dérivant de la digestion du pathogène par les cellules de l'immunité innée au niveau du site infectieux. Ce peptide est porté par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) telles que les cellules dendritiques (Dendritic Cell DC). Les APC vont alors aller à la rencontre des LT dans les ganglions périphériques et la rate afin de présenter le peptide qu'elles portent aux LT afin que ces derniers testent s'ils possèdent le TCR correspondant. Ces derniers sont alors dits naïfs car ils ont quitté le thymus et ils ont migré jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires via les voies sanguines sans avoir rencontré leur antigène spécifique. Le peptide qui leur est présenté est porté par l'APC via le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (Major Histocompatibility Complex MHC).

Dans les organes lymphoïdes secondaires, les LT vont scanner un grand nombre de pMHC sur des cellules présentatrices jusqu'à trouver, s'il est présent, leur antigène spécifique. Dans l'éventualité où aucune reconnaissance spécifique n'a lieu entre le LT et un pMHC, les LT vont migrer hors des ganglions lymphatiques et rejoindre la circulation sanguine pour aller patrouiller dans l'organisme et revenir dans les ganglions jusqu'au moment où une reconnaissance opère (plusieurs tours de recirculation sont possibles). C'est alors que le LT va s'arrêter de migrer et commencer sa prolifération (expansion clonale) afin d'être en nombre suffisant pour combattre l'agent infectieux. Le LT dit naïf/primé après son activation sera différencié en deux groupes de LT : (i) les LT mémoires qui pourront être activés lors d'une infection ultérieure par le même pathogène, (ii) les LT effecteurs spécifiques à un petit nombre de peptides antigéniques et dont le rôle est l'élimination du pathogène. Les LT effecteurs vont alors se rendre directement sur les foyers infectieux.

Les lymphocytes T pour être fonctionnels doivent d'abord se développer et mûrir. Ils subissent différentes étapes de sélection, on pourrait même dire une « éducation » qui a pour but de produire des lymphocytes T capables de reconnaître le plus grand nombre de peptides possibles mais qui ne réagissent pas aux antigènes du soi (tolérance). On parle alors de LT matures quand ceux-ci présentent à leur surface le TCR associé au CD3 et les corécepteurs CD4 ou CD8.

Dans les paragraphes qui suivent nous allons décrire la genèse d'un lymphocyte T, en partant de la cellule souche pour arriver à un lymphocyte T fonctionnel CD4 ou CD8 présentant à sa surface les acteurs majeurs de la réponse immunitaire. Ainsi nous décrivons : (i) complexe majeur d'TCR/CD3, (ii) le MHC II, (iii) les clusters de différenciation CD4 et CD8, (iv) la protéine tyrosine kinase Lck, (v) la structure et fonction de la molécule de costimulation CD28, (vi) le rôle des intégrines et plus précisément LFA1. Enfin, (vii) nous décrivons CD45, qui nous a permis dans ce travail de thèse d'immobiliser les lymphocytes T, cette partie sera discutée dans les sections 2 et 3 des résultats.

1. Origine et développement des lymphocytes T : de la cellule souche à un lymphocyte T fonctionnel.

Les Lymphocytes T dérivent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui trouvent leur origine dans la moelle osseuse. Les CSH sont pluripotentes c'est-à-dire qu'elles possèdent la capacité de s'auto-renouveler mais aussi de donner de nouvelles cellules appelées progéniteurs ou pro-thymocytes qui est la première étape de différenciation. Les pro-thymocytes vont alors quitter la moelle osseuse et vont en empruntant la circulation sanguine rejoindre le thymus pour continuer leur développement. A cette étape du développement le destin cellulaire n'est pas figé, en effet tous les pro-thymocytes peuvent générer des lymphocytes, B, T ou Natural Killer (NK). C'est dans le thymus que ces cellules vont être orientées vers un lignage particulier, dans le cas des LT on parle de thymocytes. Les thymocytes expriment uniquement le CD2 qui est un marqueur de lignée lymphocytaire et

Introduction

sont caractérisés par l'absence d'autres marqueurs tels que le TCR, CD3, CD8, et CD4. Ces cellules sont définies comme Double-Négatives (DN).

Ensuite, c'est un réarrangement de gène qui va orienter la cellule vers une sous lignée donnée : les LT- $\alpha\beta$ ou LT- $\gamma\delta$ ou en cellule NK. Dans cette population de DN nous allons nous intéresser uniquement aux LT- $\alpha\beta$ qui exprimeront un TCR de type 2 qui sera associé au CD3 et aux clusters de différenciation CD4 et CD8 et deviendront des cellules Double Positives (DP). La transition de DN à DP se fait un réarrangement de gènes codant pour les chaînes α et β du TCR. La chaîne β va d'abord être exprimée à la surface associée avec à une portion de la chaîne α constante, on parle alors de TCR incomplet ou pré-TCR. Si ce réarrangement est correct les différentes chaînes de CD3 sont alors exprimées. Les cellules vont alors proliférer et subir un autre réarrangement de gènes codant pour la chaîne α du TCR qui va se lier à la chaîne β déjà existante. Le TCR- $\alpha\beta$ est alors complet, et il est associé à CD3, CD4 et CD8 : les cellules sont alors des DP.

Les cellules DP ont la capacité de reconnaître tous types de peptide provenant du soi ou du non-soi, portés par un MHC. C'est la sélection positive qui permet à ces cellules de continuer leur développement. Les thymocytes ayant fini cette étape vont alors subir une seconde sélection, dite négative. Cette étape permet de trier les cellules qui reconnaîtront trop fortement les pMHC du soi. En effet si des cellules réagissent trop fortement avec des antigènes du soi peuvent être à l'origine de maladies auto-immunes en conséquence ces cellules seront supprimées. Les thymocytes DP restant doivent désormais devenir des simples positifs (SP) et n'exprimeront que l'un des deux corécepteurs CD4 ou CD8. Le choix du cluster de différenciation (CD) dépend de la reconnaissance du TCR avec le type de MHC reconnu. Lorsque le TCR reconnaît le MHC I alors il va diminuer l'expression de CD4 et augmenter celle de CD8 pour aboutir à un LT CD8+. Au contraire si le TCR reconnaît le MHC II, il diminuera l'expression du CD8 et augmentera celle de CD4 pour aboutir à un LT CD4+. Ainsi, les SP (CD4+ ou CD8+) vont quitter le thymus et se diriger vers les organes lymphoïdes secondaires où ils pourront débiter leur rôle (9) .

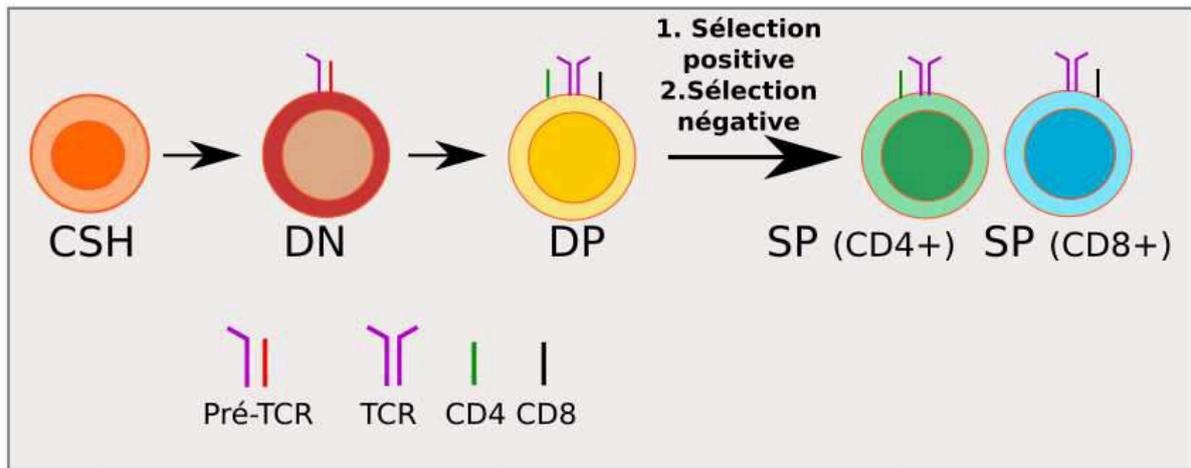


Fig. 1.1 : Développement et maturation des Lymphocytes T

En fonction du marqueur porté (CD4 ou CD8) on a donc deux sous-groupes de LT : les LT cytotoxiques CD8+ qui reconnaissent le MHC I, porté par toute cellule, et les LT helper qui reconnaissent le MHC II, porté par les cellules de présentation d'antigène (APC) professionnelles. Ces CD lient directement le MHC, en parallèle du TCR mais de manière peptide indépendante, et vont permettre de stabiliser spatialement et temporellement l'interaction TCR/pMHC lors de la rencontre d'un LT avec son peptide antigénique, tout en organisant les protéines impliquées dans les voies de signalisation.

2. Les acteurs majeurs de la réponse immunitaire T CD4+

Dans cette partie nous nous intéresserons à la structure et fonction de différentes molécules impliquées dans l'activation T. D'abord le complexe TCR/CD3, indispensable à l'activation, en détaillant sa génération, structure et fonction, et Lck pour l'initiation de l'activation. Puis les clusters de différenciation CD4 et CD8. Ensuite, nous décrivons le MHC II. Enfin, nous finirons avec une description de la molécule de costimulation CD28, l'intégrine LFA1 et les caractéristiques de CD45 qui est une tyrosine phosphatase.

2.1. Le Récepteur des Cellules T ou TCR

Les premières descriptions du TCR date d'une 30^{aine} d'années (10) (11). Le TCR est un hétérodimère associant une chaîne α et une chaîne β dans 95 % des cellules T, et une chaîne γ et une chaîne δ pour les 5% restant. La liaison du TCR avec le complexe MHC-peptide, avec l'intervention d'une molécule de costimulation, va entraîner l'activation du LT

Introduction

avec la coopération des corécepteurs et des molécules impliquées dans la cascade de signalisation en aval.

Dans cette partie nous nous concentrerons uniquement sur le TCR- $\alpha\beta$. Chaque chaîne du TCR possède une courte queue intracytoplasmique, un domaine transmembranaire et deux domaines extracellulaires de type immunoglobuline. Chacun des domaines de type immunoglobuline sont distincts par deux domaines : une partie constante et une partie variable. Les domaines les plus distaux sont variables et nommés $v\alpha$ et $v\beta$. C'est grâce à cette variabilité qu'il existe un répertoire si grand de reconnaissance aux peptides antigéniques issus du non soi, c'est ce qui donne la spécificité d'un LT (9).

Les domaines variables $V\alpha$ et $V\beta$ présentes 3 régions hypervariables ou Complementarity determining regions (CDR) générés par la recombinaison de segments géniques. Ils se projettent sur la face externe du TCR et constituent le site de reconnaissance de l'antigène présenté par le MHC (12).

La variabilité des domaines distaux $v\alpha$ et $v\beta$ du TCR est générée grâce à une recombinaison de gènes ayant lieu dans le thymus lors du développement des LT. Les gènes codant les protéines du récepteur des cellules T sont structurellement semblables à ceux des immunoglobulines. Ils sont constitués de plusieurs domaines V (variable), D (diversity) et J (joining) pour la chaîne bêta, et seulement V et J pour la chaîne alpha.

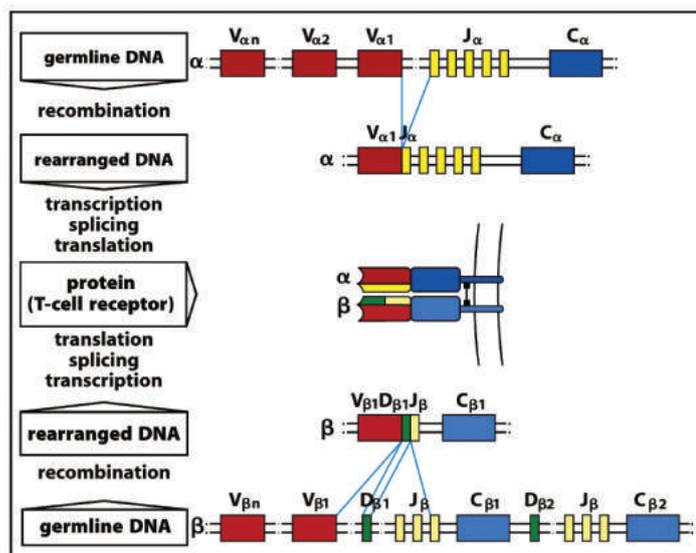


Fig.1.2 : Schéma montrant la recombinaison des exons V(D)J pour les segments variables et constants de la chaîne α et la chaîne β du TCR, permettant ainsi la création d'un grand répertoire de TCR très spécifique. (9)

Introduction

La liaison aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité est réalisée par les régions CDR1 et CDR2. La liaison au peptide antigénique est quant à elle réalisée par le CDR3. Les courts domaines intracytoplasmiques des chaînes α et β ne permettent pas la transduction du signal lors de la liaison avec le pMHC, pour cela le TCR est associé au complexe CD3. Ce dernier est constitué de 6 chaînes polypeptidiques de 3 dimères : $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ et $\zeta\zeta$. Les chaînes δ , γ et ϵ du CD3 portent sur une partie de leur segment transmembranaire des acides aminés polarisés (acides aspartique et glutamique) ce qui leur confère une charge négative. Le TCR quant à lui possède des acides aminés chargés positivement (lysine et arginine). C'est donc un effet de charges électrostatiques qui permet l'association du TCR/CD3 et finalement stabilise le complexe. L'assemblage du complexe TCR/CD3 se décompose en plusieurs étapes se déroulant dans le RE. D'abord la chaîne α du TCR s'associe avec l'hétérodimère CD3 $\delta\epsilon$. Ensuite, la chaîne β du TCR va se lier avec CD3 $\gamma\epsilon$. Enfin l'hexamère TCR $\alpha\beta$ /CD3 $\delta\epsilon$ /CD3 $\gamma\epsilon$ peut s'associer avec l'homodimère CD3 $\zeta\zeta$. Le complexe TCR/CD3 est alors complet et fonctionnel et sera exprimé à la surface du LT.

Les chaînes γ , ϵ et δ ont de plus sur leur chaîne cytoplasmique deux sites de phosphorylation dit ITAM, les chaînes ζ en possédant trois (Fig. 1.3). La phosphorylation de ces domaines ITAM est nécessaire à la transduction du signal.

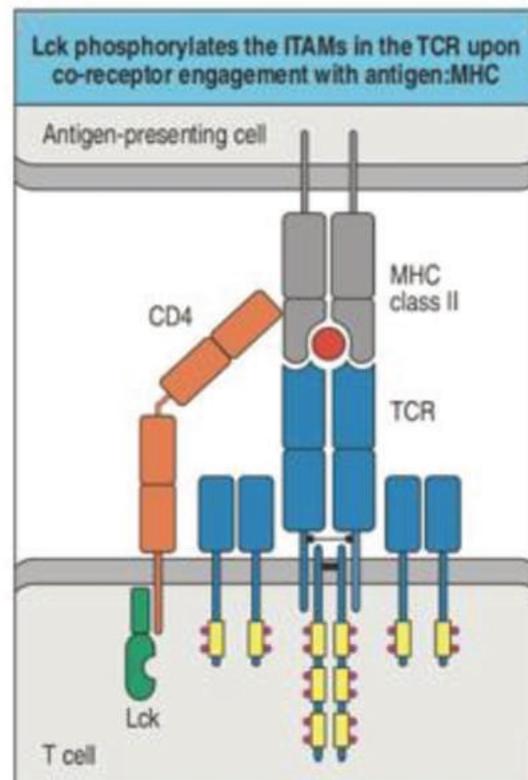


Fig. 1.3 : Structure du complexe TCD/CD3 composé de la zone de reconnaissance au peptide antigénique formé par les chaînes α et β du TCR et le complexe CD3 permettant la transduction du signal intracellulaire grâce à la présence de motifs ITAM (ici en jaune) présents sous les sous unités dimériques $\delta\epsilon$, $\gamma\epsilon$ et $\zeta\zeta$. (9).

2.2. Le complexe majeur d'histocompatibilité MHC.

Le TCR- $\alpha\beta$ reconnaît uniquement un peptide antigénique d'une dizaine d'acide aminé qui est présenté par le MHC. Dans cette partie nous allons décrire uniquement le MHC II car notre travail porte sur des LT CD4+. Le MHC I diffère du MHC II par sa composition : une chaîne peptidique α , transmembranaire, dont la partie extracellulaire est composée de 3 domaines globulaires α_1 , α_2 et α_3 . Le domaine α_3 s'associe au corécepteur CD8 du lymphocyte T. La chaîne α est associée de manière non covalente à la β_2 microglobuline (13).

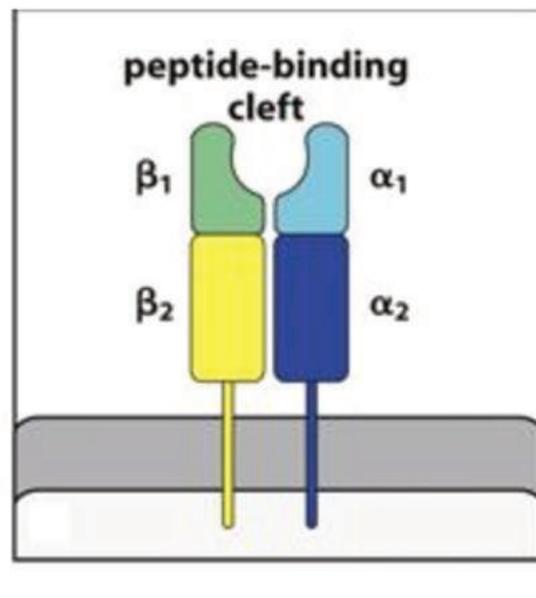


Fig. 1.4 : Structure du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II composé d'une chaîne α et β (9).

Le MHC II est composé de deux chaînes polypeptidiques α et β qui présentent toutes deux des domaines de type immunoglobuline, ces deux chaînes sont associées de manière non covalente. Les domaines α_1 et β_1 forment une poche où le peptide antigénique ira se lier. Les domaines α_2 et β_2 dont de type immunoglobuline vont permettre au CD4 de venir se fixer lors du contact LT/pMHC. Les chaînes α et β possèdent chacune un domaine transmembranaire et une région intracellulaire.

Introduction

Le MHC II est assemblé dans le réticulum endoplasmique et il est couplé à la chaîne invariante Ii (Fig. 1.5). Cette molécule est liée au MHC par sa séquence protéique nommée CLIP qui va se fixer à la poche polypeptidique du complexe et bloque la fixation de peptide dans cette cavité. La chaîne invariante Ii est responsable du transport vers les endosomes tardifs et le domaine luminal de cette protéine pourra alors être dégradé ne laissant que le segment CLIP dans la cavité du MHC. Une fois libre, le MHC va alors s'associer avec la protéine chaperonne HLA-DM (ou H-2M chez la souris). Cette protéine permet le remplacement du fragment CLIP par un fragment antigénique. Une fois le peptide exogène chargé, le complexe sera transporté vers la membrane plasmique.

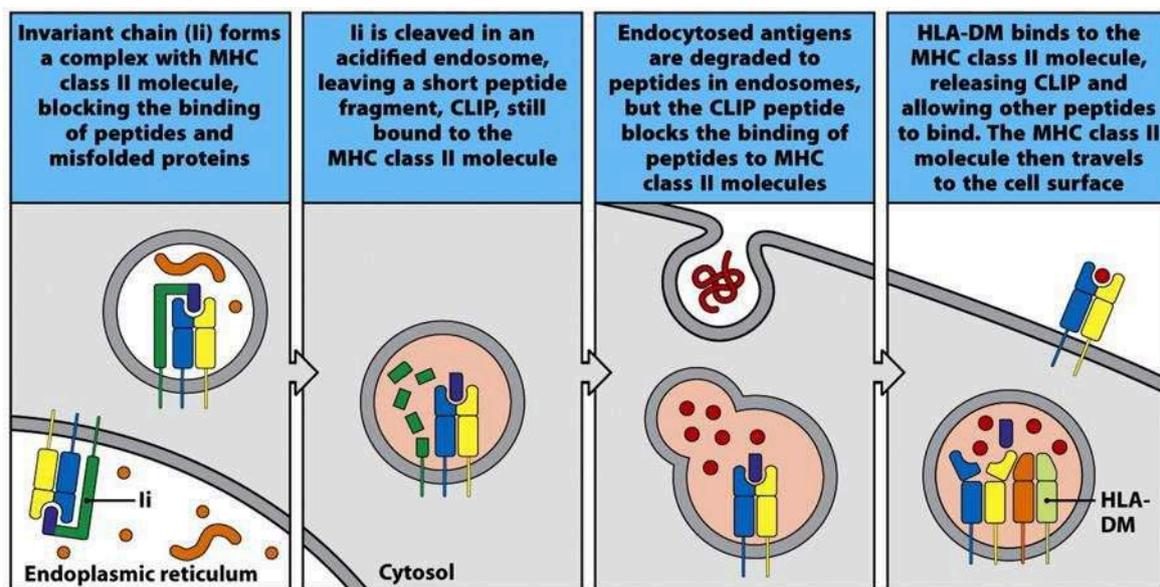


Fig. 1.5 : Voie de présentation de l'antigène au MHC II. Le MHC II et la chaîne invariante Ii quitte le RE pour rejoindre les endosomes précoces où le MHC va subir différentes modifications qui vont conduire à une cavité prête à recevoir un peptide antigénique qui pourra ensuite être présenté à la surface de la APC (9).

2.3. Les clusters de différenciation CD4 et CD8

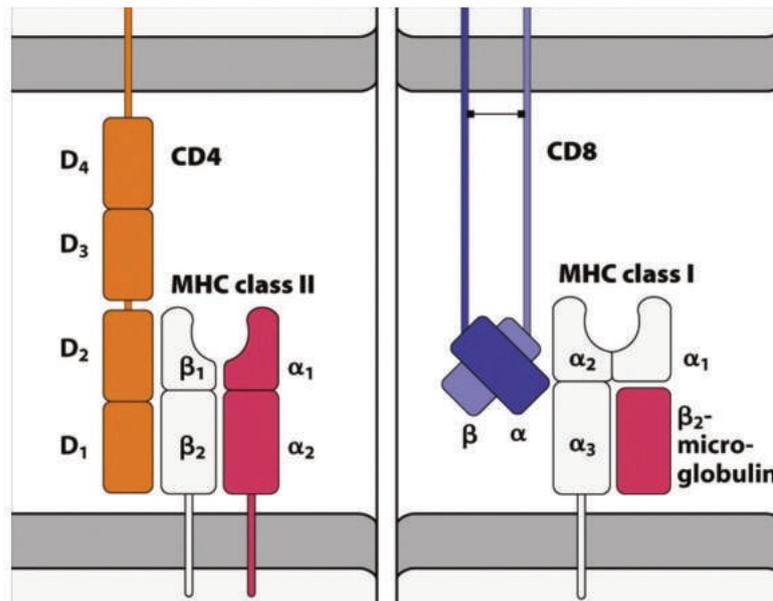


Fig. 1.6 : Structure des clusters de différenciation CD4 et CD8. (9)

CD8 est un hétérodimère formé de deux chaînes transmembranaires α et β . Les deux chaînes sont reliées par un pont disulfure. L'extrémité du CD8 est un domaine de type immunoglobuline.

CD4 est une protéine transmembranaire composé de quatre domaines de type immunoglobuline.

CD4 et CD8 se lient respectivement à des domaines particuliers du MHC I ou MHC II et vont permettre de stabiliser l'interaction TCR-pMHC et vont jouer un rôle important dans la sensibilité de la reconnaissance. En effet, CD4 et CD8 sont capables de se lier au MHC même en absence de TCR ce qui a suggéré son rôle de corécepteur dans la reconnaissance TCR/pMHC. Il a été montré que ces corécepteurs augmentaient la production de cytokines et plus particulièrement Il-2. De plus, la partie intracellulaire de CD4 est liée à Lck qui est une protéine importante lors des événements précoces d'activation du LT (14).

2.4. La protéine tyrosine kinase Lck

Les membres de la famille des protéines tyrosine kinases Src modulent la transduction du signal en aval des récepteurs transmembranaires dans la grande majorité des types de cellules, le lymphocyte T possède la protéine Lck (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase).

Introduction

L'engagement du complexe TCR/CD3 avec un pMHC déclenche la phosphorylation des tyrosines ITAM par Lck et deviennent alors un site d'accueil pour ZAP-70, qui est en retour activé par Lck lors de la liaison aux ITAM (15), (16). Ensuite, ZAP-70, conjointement avec Lck, phosphorylent les molécules de signalisation en aval afin d'activer les cascades de signalisation contrôlées par le complexe TCR/CD3.

Lck contient une région N-terminale (Domaine SH4) permettant l'ancrage de la membrane, un domaine unique, un domaine Src-homology 3 (SH3), un domaine SH2, un domaine catalytique de kinase et une courte queue C-terminale (Fig. 1.7). Le domaine SH4 est modifié post-traductionnellement par l'addition de lipides, (dont compris la myristoylation et la palmitoylation), permettant ainsi la fixation de Lck à la membrane plasmique.

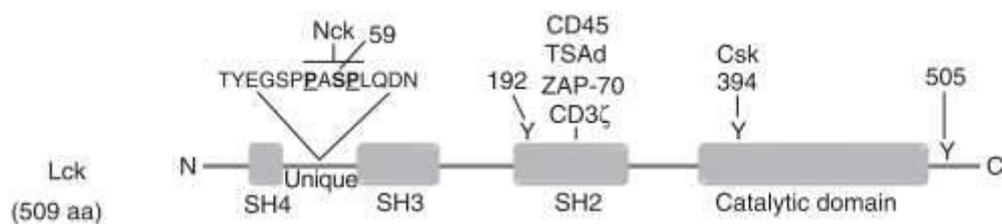


Fig. 1.7 : Structure de la protéine tyrosine kinase Lck qui se compose d'un domaine Src homology 4 (SH4), d'un domaine unique, d'un domaine SH3 et SH2, du domaine catalytique et d'une région C-terminale. La sérine (S) et les tyrosines (Y) représentées peuvent être phosphorylées par l'engagement du complexe TCR/CD3 (17).

De plus, l'activité de Lck est étroitement régulée par sa conformation qui dépend de la phosphorylation et de la déphosphorylation de deux résidus de tyrosine (Y394 et Y505) sur son domaine catalytique et sa queue C-terminale (18). La phosphorylation de Y505 induit une interaction intramoléculaire avec le domaine SH2, résultant en une conformation inactive ou fermée de Lck. Lorsque Y505 est déphosphorylée par la phosphatase CD45 ou SHP-1, le domaine SH2 se détache de Y505, favorisant ainsi une conformation ouverte. La conformation ouverte permet la phosphorylation de Y394 par trans-autophosphorylation de Lck (19). Différents pools de Lck ont été identifiés, comprenant Lck dans le cytoplasme, Lck ancré à la membrane plasmique et Lck associé aux co-récepteurs CD4 et CD8 (20). Le lymphocyte T au repos présente environ 40% de Lck déjà activés (phosphorylés sur Y394) (21), (22).

2.5. Le récepteur de costimulation CD28

Les lymphocytes T physiologiques ont besoin de deux signaux de costimulation pour s'activer : le complexe TCR/CD3 qui sera décrit par la suite, et qui constitue le tout premier signal indispensable. Le second est constitué par l'engagement du CD28, qui est dit créer une costimulation. Le modèle cellulaire que nous utilisons, dérivé de la lignée 3A9m n'a pas besoin de molécule de costimulation pour s'activer, comme cela a été montré dans différentes études (23), (24).

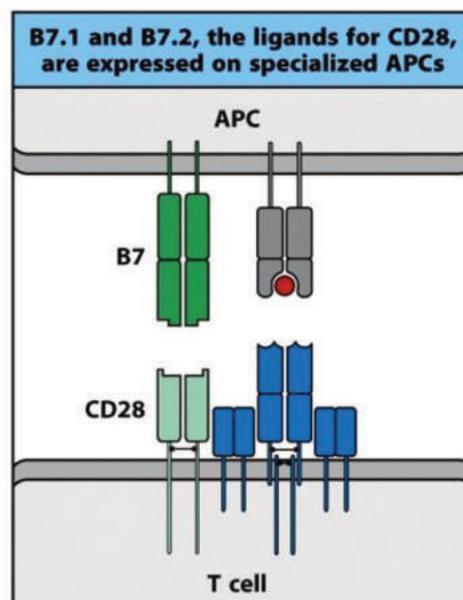


Fig. 1.8 : Schéma décrivant la structure de CD28. Lorsque le LT est stimulé mais que la reconnaissance n'est pas spécifique CD28 est inactif. Après la liaison TCR/pMHC, CD28 change de conformation, le signal provenant du TCR permet une amplification, CD28 est fonctionnel et participe à l'activation du LT (9).

Lorsque les LT sont au repos, CD28 est exprimé dans les lymphocytes dans des vésicules intracellulaires. Après stimulation du TCR, CD28 est exprimé à la membrane plasmique, toutefois sa conformation change (réorientation des queues cytosoliques de CD28 observée par des mesures de FRET) lorsqu'il y a une liaison TCR/pMHC agoniste uniquement (25). Les APC professionnelles et matures possèdent les molécules B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) qui sont les ligands de CD28. L'interaction de CD28 avec son ligand déclenche un signal nécessaire à l'activation complète des lymphocytes T CD4⁺ naïfs mais n'est pas suffisant seul. En effet, l'activation du LT n'a pas lieu s'il n'y a pas de reconnaissance avec un peptide antigénique agoniste. L'engagement de CD28 stimule notamment la production d'IL-2 et de son récepteur et induit la prolifération des lymphocytes T (26), (27).

Avant de finir la description des acteurs majeurs du lymphocyte T par le MHC II, nous ouvrirons une parenthèse afin de décrire la molécule CD45 qui est une phosphotyrosine phosphatase.

Un des défis dans ce travail de thèse a été de déterminer expérimentalement comment immobiliser fortement et rapidement les lymphocytes sans les activer ou au contraire les anergiser. Dans notre étude, nous définissons l'anergie par l'absence de signaux calciques suite à une stimulation du lymphocyte T par un anticorps anti-CD3 soluble ou un peptide antigénique porté par une cellule présentatrice de l'antigène. Les stratégies mises en place dans ce but seront détaillées dans la première section des résultats. Cependant, nous décrirons ici la structure de CD45 ainsi que sa fonction car de nombreuses études utilisent des anticorps contre CD45 pour immobiliser les cellules T.

2.6. Les intégrines, le rôle de LFA

Un des attributs fondamentaux des lymphocytes est leur capacité à patrouiller dans l'organisme afin de maintenir l'intégrité de l'organisme. Leur capacité de migration à une vitesse assez élevée (de 10 à 30 $\mu\text{m}/\text{min}$ selon l'environnement (28) est probablement un élément clé afin de fournir une réponse immunitaire optimale lorsque cela est nécessaire. Le mouvement bidimensionnel des lymphocytes sur un substrat est dû à la polymérisation du cytosquelette d'actine. Les intégrines sont des protéines transmembranaires exprimées par toutes les cellules (sauf les érythrocytes) et sont constituées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Elles permettent l'adhésion cellulaire en se liant à des ligands présents sur la matrice extracellulaire ou sur la surface d'autres cellules. De ce fait, le répertoire d'expression des intégrines qu'une cellule T présente (jouant le rôle de récepteur) détermine avec quel type de substrat la cellule peut interagir. Les fonctions des leucocytes dépendent fortement, mais non exclusivement, de la classe d'intégrines $\beta 2$ (CD18, ITB2). Cette classe de quatre hétérodimères $\alpha\beta$ comprend : l'antigène 1 associé aux fonctions leucocytaires (LFA-1 ; CD11a / CD18, $\alpha\text{L}\beta 2$ intégrine, antigène ITAL), Mac-1 (CD11b / CD18, $\alpha\text{M}\beta 2$ intégrine, ITAM antigène), p150,95 (CD11c / CD18, intégrine $\alpha\text{X}\beta 2$, CR4, antigène ITAX), $\alpha\text{d}\beta 2$ (antigène CD11d / CD18, ITAD). Les leucocytes expriment également les intégrines $\beta 1$ (CD29), et $\alpha 4\beta 1$ (antigène CD49d / CD29, ITA4) est particulièrement important dans les réponses immunitaires (29). Une des fonctions principales des intégrines est d'agir comme « embrayage »

Introduction

(clutch en anglais) afin de transmettre des forces permettant ainsi la friction avec la surface et donc le déplacement de la cellule par rapport à celle-ci.

En plus de son rôle mécanique dans la transduction de force, les intégrines présentes différentes caractéristiques agissant sur la signalisation cellulaire. Les intégrines des leucocytes ne sont pas constitutivement actives, mais leur activité est contrôlée par la signalisation via d'autres récepteurs membranaires actifs dans la réponse immunitaire. Cela se traduit par une activation « sur place » des intégrines, précisément là où leur fonction est nécessaire. Cette signalisation « interne-externe » (inside-out en anglais) qui convertit les intégrines d'une conformation active en inactive, et de la signalisation « externe-interne » (outside-in en anglais) qui décrit la signalisation dirigée par les intégrines elles-mêmes une fois qu'elles sont actives. LFA-1 est également un participant clé de la synapse immunologique qui se forme entre un lymphocyte et l'APC car elle permet de maintenir l'interaction entre la cellule T et l'APC (30) mais aussi son engagement agirait sur la formation de microcluster de TCR (31).

2.7. La phosphotyrosine phosphatase CD45

Toutefois, la fonction exacte de CD45 n'est pas à l'heure actuelle formellement établie. En effet, CD45 est une phosphotyrosine phosphatase (PTPase) qui est une glycoprotéine transmembranaire très abondante exprimée à la surface de toutes les cellules hématopoïétiques possédant un noyau. CD45 est également connu sous les noms T200 ou leucocyte common antigen. Cette protéine possède un long domaine extracellulaire (de 391 à 552 acides aminés) et intracellulaire (700 acides aminés) contenant des séquences répétées connues sous les noms Domain 1 et Domain 2. Ces deux domaines ont des fonctions différentes le Domain 1 contrôle l'activité PTPase et le Domain 2 a un rôle dans la régulation (Fig. 1.9). La fonction principale de CD45 est de moduler les seuils de signalisation de certains récepteurs exprimés par les cellules immunitaires (32). Il existe différentes isoformes dû à un épissage alternatif de l'ARN (exon 4 à 6, noté A B et C). Ces différents assemblages d'exons conduisent à la production de 8 isoformes différentes, mais en réalité seulement 5 de ces isoformes sont exprimées à des niveaux élevés dans des lymphocytes humains et murins. Il s'agit de : CD45RABC, CD45RAB, CD45RBC, CD45RB et CD45R0, leur poids moléculaire variant de 180kDa à 240kDa. L'expression des différentes isoformes est régulée lors du développement des lymphocytes T et également dans certains sous-groupes de lymphocytes T matures lors de leur activation.

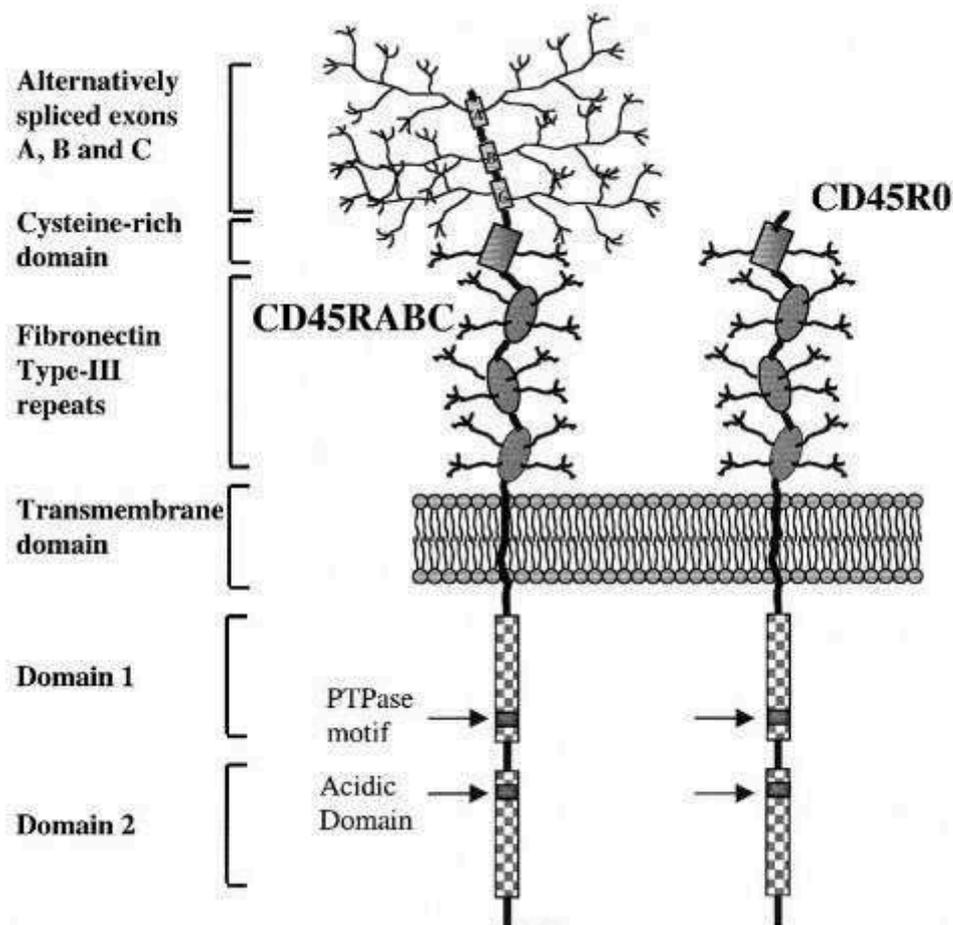


Fig. 1.9 : issu de L. Mc Neill et al. Immunology Letters (2004) Structure de deux isoformes de CD45 : CD45ABC et CD45R0 avec la présence des exons A B et C en extrémité du domaine extracellulaire pour CD45ABC et l'absence de ces exons pour l'isoforme CD45R0. Les deux domaines PTPase et régulateur sont situés dans la partie intracellulaire et sont notés respectivement Domain 1 et Domain 2.

3. Activation du lymphocyte T

Le TCR reconnaît un peptide porté par une cellule présentatrice de l'antigène : ceci initie une cascade de transduction du signal qui mène à l'activation du LT. Les événements précoces sont l'activation par phosphorylation des protéines tyrosines kinases (SFKs) faisant parties de la famille des protéines Src : Lck et Fyn.

Les SFKs phosphorylent les motifs ITAMs présents sur les différentes sous-unités du complexe CD3 ζ principalement et CD ϵ , δ , et γ de manière plus variable. Ceci permet le recrutement de ZAP-70, protéine tyrosine kinase de la famille SYK, qui a son tour phosphoryle la protéine LAT pour (Linker for the activation of T cell), qui constitue un

Introduction

véritable « hub » de signalisation où vont se docker de nombreux effecteurs cytosoliques, comme SLP76 (SH2 containing Leucocyte Phosphoprotein of 76kDa), lui-même phosphorylé par ZAP-70. LAT constitue un complexe multiprotéique d'où sont initiées l'activation des voies de signalisation Ras/MAPK, la réponse calcique intracellulaire, et la réorganisation du cytosquelette.

Un effecteur central de cette diversification des voies de signalisation est la Phospholipase C Gamma 1 (PLC- γ 1). La PLC- γ 1 est liée à LAT via son domaine SH2. Itk va phosphoryler la PLC- γ 1 qui sera alors activée. Cette activation est dépendante de l'interaction de la PLC- γ 1 avec LAT, Vav1 et SLP-76. Une fois activée, la PLC- γ 1 hydrolyse le lipide membranaire phosphatidyl-inositol 4,5 biphosphate (PIP₂) pour produire les seconds messagers inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). (33), (12).

Par la suite, nous allons décrire plus précisément les événements en aval de l'engagement du TCR avec les différentes voies de signalisation conduisant à une augmentation du calcium intracellulaire et nous allons nous intéresser aux changements auquel le cytosquelette est soumis. Enfin, nous fournirons une description des modèles d'engagement et d'intégration du signal du TCR décrits dans la littérature.

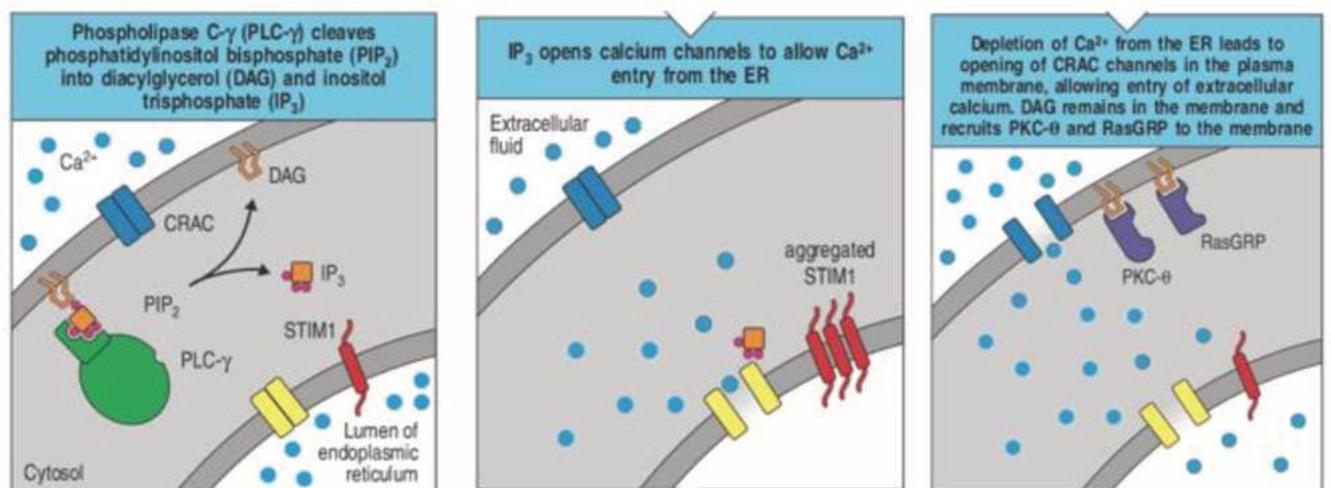


Fig. 1.10 : Voies de signalisation permettant l'augmentation de calcium intracellulaire dans le lymphocyte T à la suite du contact TCR/pMHC. Les différentes voies de signalisation du lymphocyte T. Nous nous concentrerons sur la voie classique et les voies dépendantes du DAG (9).

3.1. La voie calcique classique

Les ions calcium sont un messager important de l'information d'activation. Ils interviennent comme un interrupteur fort permettant d'accéder aux étapes suivantes.

La signalisation calcique est initiée par l'activation de la PLC γ 1 et la production d'IP3. Elle peut être divisée en deux étapes : les premiers événements vont conduire à la libération de calcium intracellulaire [Ca²⁺_{IC}] provenant des réservoirs du RE, dans un deuxième temps l'entrée massive de calcium extracellulaire par les canaux CRAC (Ca²⁺ Release Activated Channel). L'hydrolyse des PI4,5P2 libère de l'IP3, agissant comme second messenger et se lie à son récepteur, IP3R, à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). IP3R est alors activé et va induire un relargage du calcium dans le cytoplasme ce qui a pour conséquence d'induire un changement de conformation des protéines STIM1 présentes à la surface de la membrane du RE. STIM1 va se localiser près de la membrane plasmique ce qui va permettre un influx de calcium extracellulaire par activation des canaux ORAI1-3 (suivant les types cellulaires T) formant un canal CRAC fonctionnel. L'augmentation massive de calcium a été observée après l'activation du TCR, entre quelques secondes à 1 minute, suivant le type de stimulation (34), (23). A ce titre, mesurer l'augmentation du calcium intracellulaire constitue une lecture fonctionnelle des événements précoces de transduction du signal, facilitée par l'existence de nombreuses sondes fluorescentes (chimique ou protéiques) depuis le milieu des années 80 (35). La calmoduline fixe le calcium modifiant sa conformation pour se lier à la calcineurine et l'activer. La calcineurine peut ainsi déphosphoryler le facteur de transcription Nuclear Factor of Activated T cell (NFAT), qui migre dans le noyau interagissant avec le facteur de transcription AP1 ce qui va permettre la transcription de gènes et la production de cytokines, telles que l'Interleukine-2 (IL-2). La sécrétion d'IL-2 est un marqueur tardif de l'activation T (plusieurs heures après le contact initial TCR/pMHC), qui permet cependant de quantifier l'efficacité de l'activation et a permis entre autres ainsi de mettre en évidence le rôle des molécules de COStimulation comme CD28 (36).

Une augmentation du calcium intracellulaire et une activation de la voie Vav1/Jun vont se produire (9). LAT va alors permettre le recrutement de la protéine centrale dans l'activation des lymphocytes T. Cela va induire une nouvelle transcription de gène, une réorganisation du cytosquelette, la production de cytokines et enfin la prolifération (33), (12).

3.2. Les voies de signalisation

3.2.1. Le Diacylglycérol et la voie Ras

La présence de diacylglycérol (DAG) va permettre l'activation des voies de signalisation Ras et PKC θ qui sont indispensables à une activation du LT optimale. (Fig. 1.10).

La production de diacylglycérol (DAG) par l'hydrolyse de PI4,5P2 par la PLC γ 1 active de signalisation Ras et PKC θ (Fig. 1.8). L'augmentation de DAG permet le recrutement de la protéine RasGRP à la membrane. Toutefois, l'activation de Ras ne dépend pas uniquement de RasGRP, en effet Ras peut être également activé par le facteur d'échange Son of sevenless (Sos). Sos est lié constitutivement à la protéine adaptatrice Grb2 qui va s'ancrer aux phosphotyrosines de LAT via son domaine SH2. Lorsque Sos est phosphorylée par la PKC elle peut réguler l'activation de Ras qui est une protéine de la famille des petites protéines G. Ras initie la cascade de phosphorylation des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAP Kinase) aboutissant à la phosphorylation de Erk (ExtraSignal Related Kinase (Erk) (Fig. 1.7) puis à la formation du complexe de transcription AP-1 (c-fos/c-jun) nécessaire à la transcription du gène entre autres de l'IL-2, à la différenciation et à la prolifération des lymphocytes T activés (12), (37). Par ailleurs, la Protéine Kinase C- θ (PKC θ) est également recrutée à la membrane plasmique suite à l'augmentation de DAG, et phosphoryle les protéines CARMA1, BCL10 et MALT1. La formation de ce complexe déclenche la voie NF- κ B qui régule l'expression de gènes impliqués dans la survie et le rôle des LT (26).

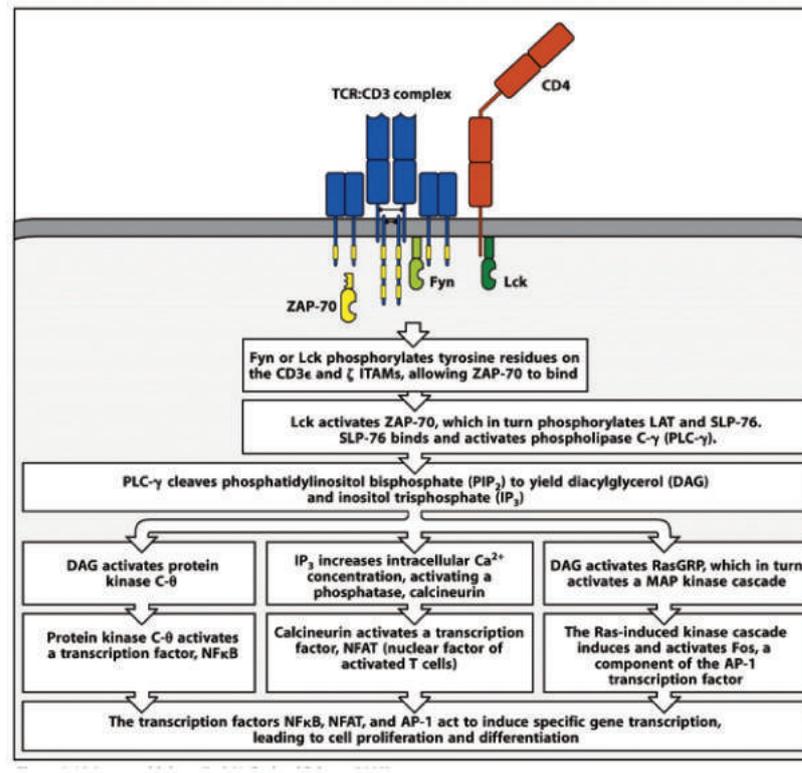


Fig. 1.11 : Résumé de l'action des différentes voies de signalisation conduisant à une augmentation du calcium intracellulaire pendant l'activation lymphocytaire T (9).

En parallèle de ces voies, le contact TCR/pMHC déclenche également l'activation des petites GTPases de la famille Rho/Rac/Cdc42 (38). Brièvement, ces protéines vont d'une part participer à la réorganisation du cytosquelette d'actine (via l'activation du complexe WASP family verprolin homologous (Wave-2) protein-2, Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) (38) et Arp2/3), mais également à la phosphorylation de c-Jun qui forme avec c-fos le complexe AP-1.

3.2.2. Vav-1

Simultanément avec les voies dépendantes du DAG et la voie calcique classique lors du contact TCR/pMHC il va y avoir un recrutement par SLP-76 de Vav-1 via son domaine

Introduction

SH2. Les protéines Vav sont composées de domaines structuraux homologues impliqués dans la stabilisation des interactions protéine-protéine et protéine-lipide, associés à un domaine enzymatique Dbl homology (DH) catalysant l'échange du nucléotide sur les petites GTPases de la famille Rho/Rac/Cdc42 et leur activation (38).

Vav-1 phosphorylée va activer la RhoGTPase Rac-1. Par l'intermédiaire de la kinase JNK, Rac-1 participe à la phosphorylation de c-Jun. La protéine phosphorylée c-Jun et c-Fos forment le complexe AP-1. Les facteurs de transcription AP-1 et NFAT s'associent pour réguler la transcription du gène codant pour l'IL-2 (39).

L'action de Vav-1 dans différentes voies de signalisation en aval du TCR montre la variété de signaux permettant l'activation des LT. En plus de la voie Rac-1, Vav-1 va induire l'activation de la RhoGTPase Cdc42. Rac-1 et Cdc42 vont participer au réarrangement du cytosquelette d'actine en activant les protéines WASP family verprolin homologous (Wave-2) protein-2 et Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) (38). Wave-2 et WASP et le complexe Arp2/3 induisent la polymérisation de la F-actine.

La F-actine est un composant majeur du cytosquelette. Cette structure couplée avec la membrane plasmique permet à une cellule d'avoir une forme et taille particulière mais aussi de s'adapter aux contraintes diverses auxquelles elle est soumise par son environnement : osmotiques, chimiques et mécaniques.

Le cytosquelette et la membrane plasmique ne sont pas des acteurs cellulaires passifs. Ils permettent de générer des forces qui sont nécessaires à beaucoup de mécanismes cellulaires tels que la prolifération, la migration et dans notre cas particulier à l'activation du lymphocyte T.

C'est pourquoi nous allons décrire la structure et la fonction des acteurs du cytosquelette : l'actine, la myosine, la famille ezrine, moesine et radixine ainsi que les microtubules, dans l'activation T. De plus, nous montrerons que la membrane plasmique n'est pas une enveloppe inerte mais que son organisation et sa dynamique sont des paramètres cruciaux dans les phénomènes reliés à l'engagement du TCR.

4. Le cytosquelette

Toutes les cellules animales possèdent un cytosquelette, un réseau de filaments hautement organisé qui fournit une structure et une forme cellulaire dont la complexité dépend de la

ramification et de la réticulation des fibres déjà existantes. La forme de ce réseau tridimensionnel dépend de la zone de la cellule où il se trouve (lamellipode, uropode entre autres).

4.1. Le cytosquelette d'actine

Il existe une autre structure sous-jacente appelée actine corticale. Elle recouvre la partie interne de la membrane plasmique et joue un rôle dans le maintien et la modification de la forme des cellules. La structure de l'actine corticale est formée de deux types de protéines d'actine dépendant de leur état de polymérisation : l'actine globulaire (G-actine) et l'actine filamenteuse (F-actine). Si une concentration critique de G-actine liée à l'ATP est atteinte, la polarisation d'un filament en forme de double-hélice débute et ainsi génère la F-actine. L'intégration dans le filament va entraîner l'hydrolyse d'ATP en ADP qui permettra l'accès au filament de F-actine par des protéines de dépolymérisation, participant ainsi à l'équilibre polymérisation/dépolymérisation de la F-actine. Un stock de G-actine lié à l'ATP est disponible sous formes de monomères afin de pouvoir polymériser rapidement un brin de F-actine. La disponibilité de G-actine est possible grâce à la profiline car cette dernière peut séquestrer la G-actine en se liant à celle-ci ou au contraire favoriser l'échange ADP/ATP en ouvrant le site de liaison à l'ADP. La polarité du brin d'actine est caractérisée par une extrémité barbée (plus), qui est plus dynamique que la partie opposée, l'extrémité pointue (moins) se polymérisant dix fois plus lentement. Différentes protéines sont associées à l'actine et participent au contrôle de la dynamique du filament par l'assemblage et le désassemblage de l'actine :

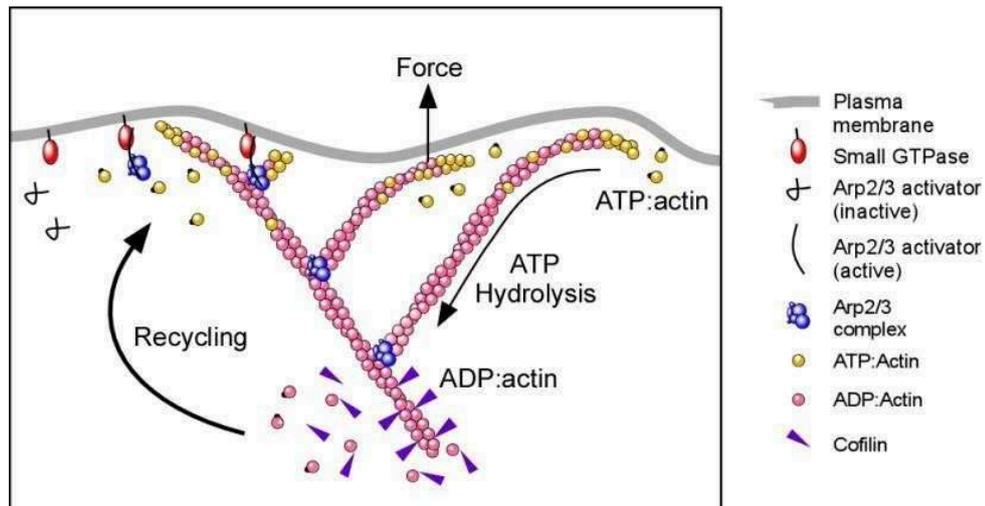


Fig. 1.12 : Polymérisation des monomères de G-actine (rose) grâce à Arp 2/3 (bleu) en filament de F-actine, avec création de nouvelles structures branchées ajoutées au filament initial, et dépolymérisation des filaments grâce à la cofiline (40).

Parmi toutes les molécules influant sur la structure du cytosquelette, le complexe Arp 2/3 est probablement majeur. C'est un facteur de nucléation de l'extrémité barbée de la F-actine et est activé par WASP et les protéines de la famille WAVE comme WAVE 1 et 2. Des maladies génétiques telles que le syndrome de Wiskott-Aldrich créant un déficit immunitaire constitutionnel sont caractérisées par des mutations du gène codant pour WASP. Une fois activé, le complexe Arp2/3 va fixer un monomère d'actine et initier la nucléation de l'actine. Ainsi, un nouveau filament de F-actine est généré par l'assemblage successif de G-actine à l'extrémité barbée du filament. De plus, Arp 2/3 peut également permettre le branchement d'un nouveau filament d'actine à un filament préexistant avec un angle de 70°, ce qui permet de créer des structures en branchement. Ces réseaux enchevêtrés d'actine se retrouvent à l'avant du lymphocyte T dans les lamellipodes et permettent la mise en place d'une polarité avant/arrière (Fig. 1.13).

La formation de faisceaux parallèles de filaments d'actine est permise grâce aux formines. Ces protéines se lient à l'extrémité barbée de l'actine via leur domaine FH2 et vont permettre l'élongation du filament en recrutant la profiline associée à un monomère de G-actine. Les faisceaux parallèles d'actine sont retrouvés dans différentes structures telles que dans les fibres de stress et dans les filopodes (41). Certains facteurs de nucléation de l'actine de la famille des formines, tels que Dia-1, FMNL-1 (formin-like protein 1) et INF-2 (inverted formin-2) jouent un rôle dans la régulation de l'organisation du réseau microtubulaire à la synapse immunologique (42), (43).

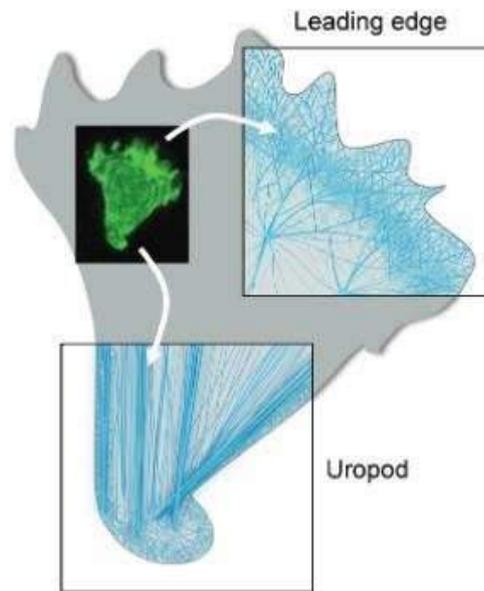


Fig. 1.13 : Différentes structure de l'actine. Un réseau important d'actine présentant une structure avec de nombreux branchements est présente à l'avant de la cellule au niveau du lamellipode (leading edge). On peut également retrouver ce type d'arrangement à l'extrémité opposée dans l'uropode (44), (45).

On peut également citer la profiline, qui inhibe l'accumulation d'oligomères et empêche une auto-nucléation ultérieure de l'actine globulaire, les protéines de coiffe qui recouvrent les extrémités barbées des brins pour empêcher toute polymérisation ou dépolymérisation ultérieure, la cofiline, qui favorise la dépolymérisation de l'actine liée à l'ADP à l'extrémité pointue. Ou bien la kinase Lim, qui est activée par phosphorylation par la protéine kinase associée à Rho (Rock) (45) et contrôle cette dépolymérisation.

Lors du contact T/APC, les deux partenaires cellulaires vont subir des changements morphologiques. Les lymphocytes T émettent des petites microvillosités au départ puis au cours du temps toute la zone de contact entre l'APC et le LT va changer. Le LT va s'étaler sur la APC et va ainsi pouvoir augmenter la zone de contact entre les deux surfaces, créant ainsi une interaction plus stable et permettant une meilleure activation. La réorganisation des protéines membranaires est ensuite nécessaire à l'activation T. La déformation de la membrane plasmique du lymphocyte T lors de l'interaction avec la APC est une conséquence de la dynamique du cytosquelette d'actine et de sa régulation.

Introduction

Le cytosquelette d'actine est capital pour l'activation des cellules car lorsqu'on le perturbe on inhibe l'activation (46). De plus le cytosquelette d'actine est nécessaire à l'établissement de la synapse immunologique.

La F-actine corticale est attachée à la membrane plasmique par des protéines d'association à l'actine, incluant les protéines ezrin-radixin-moesin (ERM) et la protéine motrice myosin-1 (47), (48).

4.2. Les protéines de la famille ERM : Ezrine, Radixine et Moésine

Ces trois protéines font le lien entre le cytosquelette d'actine et la membrane plasmique. Elles ont une structure similaire : un domaine globulaire N-terminal qui leur permet d'avoir deux sites de liaison aux PIP2 grâce à leur domaine Four.1 Ezrin Radixin Moesin (FERM) (49). Ensuite un domaine en hélice α permet de faire la transition entre le domaine N-terminal et le domaine C-terminal appelé Carboxy-terminal ERM-associated Domain (C-ERMAD) qui permet l'interaction avec le cytosquelette d'actine via son Actin Binding Domain (ABD) (50), (49). Les protéines ERM régulent la rigidité et la morphologie cellulaire en faisant le lien entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine.

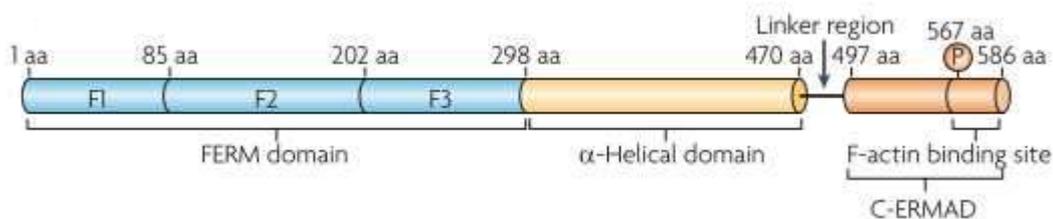


Fig. 1.14 : Structure des protéines ERM. Le domaine N-terminal en bleu est composé de 3 sous unités F1, F2, F3. Un domaine central comportant une hélice α et qui permettra le repliement de la protéine (jaune) et enfin un domaine C-terminal C-ERMAD (orange) contenant un site de liaison à la F-actine (51).

Les protéines ERM existent sous deux conformations. A l'état inactif, la protéine est repliée, le domaine FERM interagit avec le domaine C-terminal empêchant ainsi toute liaison au cytosquelette d'actine. A l'état actif, la protéine est dépliée, conséquence de l'interaction du domaine FERM avec les PIP2 membranaires et la phosphorylation d'un résidu thréonine du domaine C-terminal.

Introduction

Les lymphocytes T expriment l'ezrine et la moésine mais pas la radixine (52). Lors de la formation de la synapse immunologique un peptide antigénique est reconnu par le TCR ce qui crée en l'espace de quelques secondes une interaction forte qui permet de rapprocher les deux membranes de l'APC et LT. Cette interaction va durer plusieurs heures et va entraîner divers changements.

Lorsque le lymphocyte T n'est pas stimulé il apparaît sphérique et présente à sa surface un grand nombre de microvilli. Afin de former la synapse les microvilli doivent être désassemblés localement au niveau du site de contact entre les deux cellules (51). De plus, ce processus a également été observé en microscopie électronique sur des surfaces activatrices (53). Cette étape est possible grâce à la déphosphorylation des ERM permettant ainsi l'exclusion de grandes glycoprotéines comme CD43 (54) le recrutement des TCR au niveau de la synapse et le déplacement des molécules d'adhésion maintenant l'interaction entre les 2 cellules.

4.3. Les myosines

Le cytosquelette d'actine peut être attaché à la myosine afin de pouvoir générer les forces de contraction nécessaires à la migration cellulaire. L'action de la myosine sur l'actine est le fruit de la libération d'énergie lorsque ces protéines hydrolysent de l'ATP. Cette énergie aura une conséquence mécanique et les deux filaments peuvent glisser l'un par rapport à l'autre. Les lymphocytes T, expriment deux classes de myosines : la myosine de classe II (myosine IIA) et les myosines de classe I (myosine Ic et myosine Ig).

La structure est semblable pour la myosine II et les myosines de classe I. Il s'agit d'un hexamère composé d'une ou deux chaînes lourdes, deux chaînes légères régulatrices et deux chaînes légères essentielles. La myosine non musculaire-2 s'assemble en mini filaments bipolaires qui exercent des forces contractiles au niveau du cortex (55). Les trois isoformes de la chaîne lourde de la myosine-2 sont MYH9 (myosine-IIa retrouvé dans les LT), MYH10 (myosine-IIb) et MYH14 (myosine-IIc).

Les chaînes lourdes sont organisées en trois différents domaines : les extrémités C-terminales en hélice α sont surenroulées, ce qui confère à la myosine la forme rigide d'un bâtonnet, les têtes N-terminales de 190 acides aminés constituent les domaines moteurs. Sont associées à ces deux chaînes lourdes deux paires de chaînes légères : une paire de chaînes légères dites essentielles (ELC), et une paire de chaînes légères dites régulatrices (RLC) qui stabilisent la

longue hélice près du domaine N-terminal (tête), dans la région qui forme le bras de levier. La myosine s'associe à une autre protéine, l'actine, au niveau des têtes de chaînes légères. L'activité de la myosine est dépendante du calcium et des protéines qui y sont associées telles que la calmoduline (56).

4.4. Les microtubules

L'activation de la cellule T en réponse à un pMHC porté par APC entraîne également la polarisation du lymphocyte T, auquel cas le centre d'organisation microtubulaire microtubular organizing center (MTOC) se déplace vers le site de contact entre le lymphocyte T et l'APC (57). Bien que la polarisation du MTOC ait été observée depuis longtemps comme un marqueur spécifique de l'interaction de cellules T/APC. Les mécanismes de signalisation responsables de ce mouvement demeurent incompris. Cependant, des données récentes suggèrent que la protéine adaptatrice ADAP (composant du complexe SLP-76) peut jouer un rôle par son interaction avec la dynéine qui est une protéine motrice des microtubules (58). Le mouvement du MTOC semble essentiel pour la formation de la synapse immunologique ou immunological synapse (IS) mais demeure encore incompris. Toutefois, il a été montré que les microtubules sont essentiels pour les LT CD8+ afin de guider la dégranulation ce qui a conduit à l'établissement du concept de synapse polarisée (59).

5. Organisation et dynamique de la membrane plasmique

5.1. La structure de la membrane plasmique

La structure de la membrane plasmique est extrêmement complexe, elle est organisée latéralement par des interactions moléculaires entre des lipides et des protéines. Le cytosquelette d'actine, impliqué dans la morphologie cellulaire, peut également participer à son agencement par des protéines qui interagissent avec ces deux structures.

La structure des lipides joue un rôle majeur dans l'organisation latérale de la membrane. Il existe une très grande variété de lipides constituant la membrane plasmique d'après des mesures par spectrométrie de masse (60). Les lipides structurants peuvent être

Introduction

classés en trois grandes familles : les glycérophospholipides, les sphingolipides et le cholestérol (61).

Tous les lipides membranaires sont composés d'une partie hydrophile, polaire et d'une partie hydrophobe. Cette caractéristique commune impose aux lipides de s'organiser au sein des membranes en deux feuillets (lipidiques) avec la partie hydrophile orientée vers le milieu extracellulaire ou vers le cytoplasme. La microscopie électronique a permis de déterminer l'épaisseur de la membrane plasmique et mesurerait ~environ 4-6nm.

Par sa structure hétérogène, la répartition des lipides dans les membranes forme une matrice au sein de laquelle les protéines s'intègrent et interagissent. Ces événements d'interactions moléculaires qui se déroulent perpétuellement dans la cellule sont extrêmement dynamiques. La membrane plasmique est l'objet d'interactions protéines/protéines, protéines/lipides au sein d'une matrice lipidique organisée.

De nombreux processus biologiques dans les cellules immunitaires utilisent et réorganisent la membrane plasmique. La plupart des cellules immunitaires sont activées via les récepteurs de surface cellulaire, qui dans certains cas sont accompagnées par les réorganisations de la membrane plasmique, une des plus étudiée et observée est notamment dans la formation de la synapse immunologique (62).

5.2. La synapse immunologique

L'Immune Synapse ou synapse immunologique (IS) est une structure organisée qui se développe au niveau du site de contact entre le lymphocyte T et l'APC. Elle est composée de deux régions concentriques définies par leur composition moléculaire : une zone centrale, riche en TCR, dite central supramolecular activation cluster (cSMAC), entourée par une région périphérique, riche en intégrine LFA1, dite (pSMAC) (63) (**Fig.** 15). Bien que l'IS ait été décrite il y a presque 20 ans son rôle précis dans l'activation T n'est pas formellement établi. Au départ il a été proposé que cette structure avec la cSMAC permettait une augmentation de l'engagement du TCR et permettrait de prolonger la signalisation grâce à une grande concentration de récepteurs dans une zone spatialement réduite.

Introduction

L'organisation spatiale de l'IS est corrélée avec sa fonction et permet d'assurer une régulation fine de l'activation du lymphocyte T. En effet, l'intégration de différents signaux ayant lieu dans l'IS permet de maintenir la spécificité et la sensibilité de la réponse du LT (64).

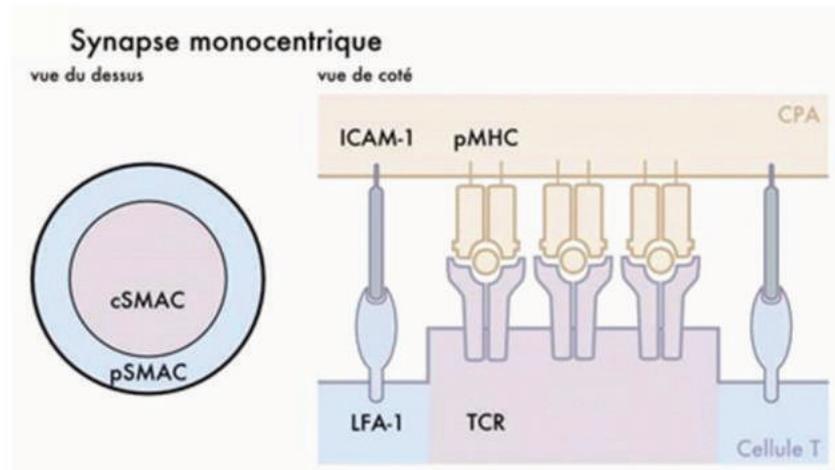


Fig. 1.15 : Organisation de la synapse immunologique monocentrique, la région centrale enrichie en microclusters de TCR est la c-SMAC (rose clair) et la région périphérique enrichie en intégrines est la p-SMAC (bleu clair) (53).

La dynamique de l'actine et la signalisation des lymphocytes T sont très étroitement liées. Non seulement la liaison du TCR/pMHC amorce une polymérisation robuste de l'actine, mais la dynamique de l'actine est également requise pour une signalisation optimale du TCR. Il a été montré que l'utilisation d'inhibiteurs de la polymérisation de l'actine perturbe l'activation des LT (65). On pense que cela est dû au fait que l'actine joue un rôle dans la formation des clusters de signalisation TCR. La signalisation TCR débute dans de nombreux microclusters à la périphérie de la synapse (66) qui migrent vers le centre où ils se fusionnent pour former le cSMAC. Il a été décrit que le flux rétrograde de l'actine (les filaments d'actine sont polymérisés au niveau du lamellipode et refluent vers le corps cellulaire) favorise le mouvement centripète des microclusters de TCR vers le cSMAC. Lorsque les cellules sont traitées avec de la latrunculine, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, le transport des microclusters de TCR vers le cSMAC est perturbée et empêche la formation d'une IS (66). Toutefois, le mécanisme requis pour ce flux rétrograde de l'actine n'est pas bien compris. La protéine WASP pourrait être impliquée dans ce mécanisme. L'implication des protéines associées à l'actine et la myosine II-A n'est pas formellement établie. En effet de nombreuses études montrent des résultats opposés comme au sujet du rôle de la myosine II-A. Dans un cas, elle serait essentielle au regroupement des microclusters de TCR dans la c-SMAC. Dans d'autres

Introduction

cas, il a été montré que la formation de l'IS n'est pas perturbée après un traitement à la blebbistatine (inhibiteur de la myosine) (67). Ces disparités dans les conclusions de ces études peuvent être dues au fait que le modèle cellulaire varie (Jurkat, T primaires), que les traitements pour activer le LT sont différents (anticorps anti-CD3, utilisation ou non d'anticorps anti-corécepteurs). Enfin, le type de substrat utilisé est le plus souvent inerte. Il a été montré que la mobilité des ligands dans une bicouche lipidique module l'activation T différemment que sur un substrat inerte, en absence de diffusion (68). C'est pourquoi, il est important de se rapprocher de conditions physiologiques en étudiant la formation de la synapse lors du contact d'un lymphocyte T avec une APC.

Nous allons décrire ensuite les propriétés physico-chimiques du TCR et les différents modèles proposés à l'heure actuelle pour essayer de comprendre l'engagement du récepteur et les modèles pouvant générer un signal intracellulaire aboutissant à une activation du lymphocyte T.

6. Engagement du TCR

L'activation du lymphocyte T dépend au niveau moléculaire de l'interaction de son récepteur le TCR avec un peptide antigénique lié au MHC présent à la surface de la cellule présentatrice de l'antigène.

Le lymphocyte T présente l'intéressante capacité d'identifier peu de peptides antigéniques dérivant de pathogènes spécifiquement, rapidement et avec une grande sensibilité. Cette reconnaissance a lieu dans un environnement très bruyant car le lymphocyte T est aussi confronté à des peptides venant du soi. La compréhension des étapes précoces de l'activation du lymphocyte T est un défi depuis une 30^{aine} d'années. Ce mécanisme si robuste au cours du temps soulève différentes questions à savoir comment un lymphocyte T prend la décision de s'activer et combien de peptides sont nécessaires à cette activation notamment quand on pense à la probabilité qu'il a de trouver son peptide antigénique dans un paysage moléculaire « surpeuplé ». Bien qu'il y ait beaucoup d'études réalisées afin de comprendre ce mécanisme, à différentes échelles, de la structure du TCR en passant par l'organisation nanoscopique lors de la signalisation à des échelles plus macroscopique au niveau de la

cellule, aucun modèle d'activation ne fait l'unanimité et ce processus reste partiellement incompris.

6.1. La spécificité

La structure même du TCR permet une grande variabilité, en effet la partie distale du récepteur avec les domaines $v\alpha$ et $v\beta$ offre une certaine flexibilité qui en réalité permet à un TCR d'interagir avec un petit nombre de pMHC avec une affinité variant de 1 à 200 μ M (69). Lors de l'interaction avec ces peptides, différentes réponses biologiques vont alors pouvoir se mettre en place : aucune activation, premières étapes d'activation qui n'aboutiront pas et une activation complète du lymphocyte T. Cette spécificité est si grande que le changement d'un seul acide aminé sur un peptide conduit à l'activation ou non du lymphocyte T (70), (71). Un seul TCR est donc capable de distinguer des variations d'affinité très subtiles et réagir de façon très précise. C'est sur cette capacité que repose la discrimination des peptides venant du soi ou du non soi par le lymphocyte T, mais aussi de faire la différence entre deux peptides issus du non soi.

6.2. La vitesse

La réponse immunitaire adaptative débute dans les ganglions lymphatiques où les lymphocytes T naïfs vont rencontrer et tester des peptides antigéniques. Les lymphocytes T CD4+ vont demeurer 1 à 2 jours dans le ganglion et vont scanner un grand nombre de cellules dendritiques pour détecter un pMHC agoniste parmi une vaste majorité de peptides non-spécifiques. La vitesse de discrimination doit donc être très importante car il y a 1000 à 10000 fois plus de pMHC du soi que du non soi d'où la nécessité de scanner très rapidement les peptides. Des études réalisées avec la microscopie biphotonique (72), (73) ont révélé que le contact initial entre lymphocytes T et APC dans les ganglions lymphatiques se produit principalement sur les cellules dendritiques et dure moins de 10 minutes. De plus il a été montré que la génération du signal dans des LT CD4+ était très rapide. Après l'engagement du TCR/pMHC (34) ont observé une phosphorylation de LAT dans les 4 secondes qui suivent le contact, une production de diacylglycérol et des flux calciques dans les 6–7 secondes, et enfin une polarisation du cytosquelette dans les 2 minutes suivant l'interaction TCR/pMHC, montrant ainsi une initiation de l'activation très rapide (34), (74), (75).

6.3. La sensibilité

Un lymphocyte T activé peut détecter quelques peptides, voire un seul, présenté à la surface d'une APC (76), (77). Cette grande sensibilité est nécessaire pour permettre aux cellules T de reconnaître toutes les cellules infectées ultérieurement. Les APC présentent à leur surface 10^5 et 10^6 pMHC dont une dizaine est spécifique d'un TCR donné. Malgré la faible probabilité d'interaction entre le TCR et son ligand, un lymphocyte T est extrêmement sensible puisqu'il peut reconnaître et être activé par un nombre réduit de pMHC spécifiques. En effet, Il a été montré dans l'étude (77) que la détection par un lymphocyte T CD4⁺ d'un complexe pMHC unique peut induire une augmentation de la concentration calcique.

Les lymphocytes T reconnaissent donc spécifiquement, rapidement et avec une grande sensibilité un antigène peptidique présenté par une APC grâce au TCR, et cela dans un environnement confiné (dans les ganglions lymphatiques) et très bruyé. En effet, le LT doit distinguer les peptides provenant du soi, qui représentent la majorité des peptides, des peptides d'origine pathogénique. Différents modèles décrivent l'engagement initial et l'activation du TCR.

7. Les modèles d'engagement du TCR

Nous allons tout d'abord nous intéresser aux paramètres physico-chimiques de l'interaction TCR/pMHC en tant que réaction biochimique et comment diverses études permettent de comprendre ce mécanisme si compliqué.

Des études se sont intéressées à comprendre la liaison TCR/pMHC d'un point de vue biochimique. Comme toute réaction on peut alors définir une constante d'association cinétique k_{on} et une constante de dissociation cinétique k_{off} . L'affinité du pMHC pour le TCR peut être établie grâce à la valeur de demi vie $t_{1/2}=(\ln 2)/k_{off}$ et la valeur de la constante de dissociation $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Les mesures des constantes biochimiques ont été réalisées en utilisant différentes techniques permettant d'étudier les paramètres cinétiques en conditions tridimensionnelles (3D) ou bidimensionnelles (2D). Nous ne décrivons ici que les études basées en 2D car l'interaction

Introduction

TCR/pMHC n'a pas lieu en solution mais est restreintes en 2D par le contact entre les deux membranes plasmiques, respectivement celle du LT et celle de l'APC.

Les études de (78), (79), (80) ont permis de mesurer des constantes biochimiques du couple TCR/pMHC. Le TCR présenterait une affinité faible pour son ligand (K_D entre 10^{-7} et 10^{-4} M) avec un taux d'association (k_{on}) lent et un taux de dissociation (k_{off}) rapide.

Différents paramètres vont donc définir la cinétique d'interaction TCR/pMHC : la distance entre les molécules du couple TCR/pMHC, leur diffusion dans la membrane plasmique et les mouvements actifs des membranes du lymphocyte T et de la cellule présentatrice d'antigène (modifications ERM, cytosquelette). Afin de mesurer les paramètres cinétiques en conditions bidimensionnelles différentes techniques ont été utilisées (81):

Le couplage de la microscopie Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) avec du Fluorescent Resonance Energy Transfert (FRET) a permis de visualiser les interactions entre les lymphocytes T et des pMHC portés sur un substrat inerte, une bicouche lipidique. Les TCR et pMHC sont tous deux fluorescents et ont permis de déterminer une vitesse de dissociation du complexe TCR/pMHC plus rapide en 2D que celle mesurée en solution (82). La perturbation de la polymérisation de l'actine inhibe ces différences ce qui est une preuve supplémentaire du rôle indispensable du cytosquelette et donc de la mécanique cellulaire dans la cinétique d'interactions entre TCR et pMHC (82).

(83) ont utilisé des micropipettes (Biomembrane Force Probe) afin de mettre en contact un lymphocyte T avec un érythrocyte ou une bille, décorés avec des pMHC. La déformation du globule rouge, due au détachement du LT, permet de mesurer une fréquence d'adhésion et d'en déterminer les paramètres cinétiques grâce à l'utilisation de modèle mathématique. La vitesse de dissociation mesurée en 2D est 8300 fois plus rapide que celle en 3D.

La chambre à flux laminaire a permis de mesurer la formation des liaisons et la dissociation TCR/pMHC en utilisant une surface décorée avec différents pMHC et des billes porteuses de TCR en imposant un flux contrôlé (84), cela permettant de s'abstenir de l'influence cellulaire. La fréquence et la durée des arrêts des billes sur la surface permettent de définir la constante de dissociation 2D du couple TCR/pMHC. Les valeurs de constantes de dissociation 2D mesurées ainsi corréleront avec celles mesurées en 3D (84). Les phénomènes cellulaires actifs sont alors la cause de l'augmentation de la vitesse de dissociation observée en 2D.

(85) ont utilisé la microscopie à force atomique, (cette technique sera détaillée dans la prochaine section) pour étudier l'interaction entre un TCR murin et un pMHC agoniste ou non relevant. La reconnaissance TCR/pMHC est liée à un taux d'association plus élevé mais

Introduction

aucune différence n'a été notée entre les forces de dissociations, reliées à la durée de vie du complexe. Ces résultats vont dans le même sens que le modèle d'engagement en série (65) montrant l'importance d'un engagement multiple du TCR.

Les lymphocytes T scannent la surface des cellules présentant des antigènes avec leurs TCR afin de trouver et de répondre à des complexes pMHC. Une APC présente sur sa surface des peptides issus du soi en très grande quantité et quelques peptides étrangers, les lymphocyte T doivent utiliser des mécanismes sensibles afin de discriminer rapidement l'origine des peptides. Un éventail de modèles différents a été proposé pour tenir compte de ce processus. Le grand nombre d'études réalisées avec des modèles cellulaires et des techniques différentes ont généré un très grand nombre de données qui n'ont pas permis de définir un seul modèle d'engagement du TCR. Nous allons désormais décrire les différents modèles existants pouvant expliquer l'interaction TCR/pMHC.

7.1. Modèle de kinetic proofreading et son évolution

Ce modèle a été proposé par McKeithan en 1995 (86) afin d'expliquer comment un lymphocyte T fait la discrimination entre un peptide du soi et un peptide du non soi. Depuis ce modèle a subi différentes modifications tenant en compte de nouvelles données expérimentales concernant les paramètres cinétiques TCR/pMHC, que nous détaillerons ultérieurement. Le modèle de kinetic proofreading (KP) initialement proposé stipule que le TCR doit se lier au pMHC pour une durée de temps assez longue afin de procéder à une série de modifications biochimiques aboutissant à l'activation du lymphocyte T.

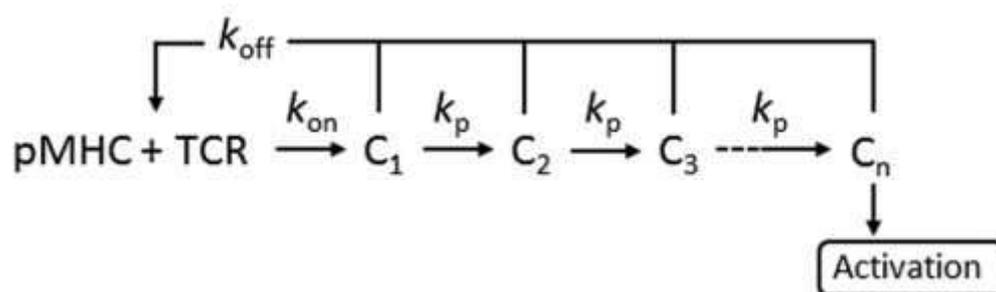


Fig. 1.16 : Modèle initial de kinetic proofreading proposé par McKeithan, se référer au texte pour les explications (87).

Introduction

Cette série de modification peut être imaginée comme étant les étapes de phosphorylation successives (des motifs ITAMs par exemple) initiées par l'engagement du TCR, qui seront rapidement déphosphorylées si l'interaction entre le TCR et le pMHC n'est pas maintenue. Ainsi seules la demi-vie et la constante de dissociation du complexe TCR/pMHC déterminent si un lymphocyte T s'activera. Le TCR et pMHC se lient (**Fig.** 16) selon la constante d'association k_{on} et forme le complexe C_1 . Ce complexe doit subir n étapes de modification k_p afin d'aboutir à l'initiation de la signalisation C_n permettant l'activation du LT. A chaque étape il est possible que le complexe se dissocie avec une constante k_{off} ne permettant pas au lymphocyte T de s'activer.

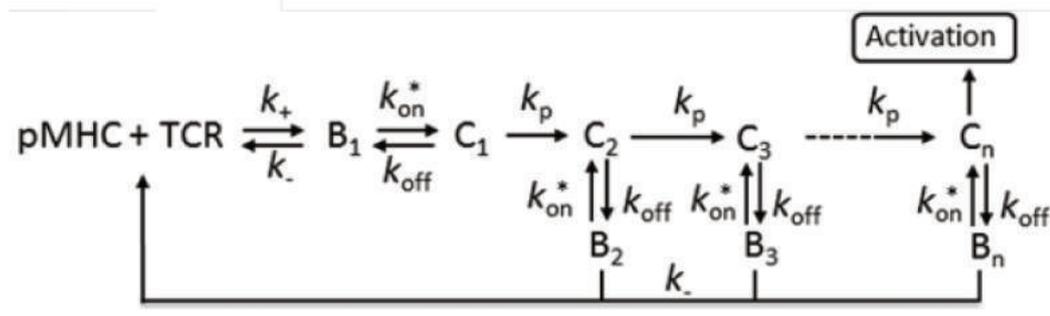


Fig. 1.17 : Modifications du modèle de kinetic proofreading tenant en compte l'éventuel réattachement (rebinding) rapide du pMHC au TCR permettant ainsi une activation rapide du LT. (87)

Le modèle KP en entier a été affiné et étendu pour inclure des mécanismes de rétroaction au cours des événements de signalisation intracellulaire, tenant compte ainsi de la spécificité et sensibilité de l'interaction TCR/pMHC. Une des modifications du modèle initial se base sur la reliaison (rebinding) du TCR/pMHC ayant subi antérieurement une dissociation. Le TCR reste à proximité et peut alors se lier à nouveau au même pMHC suffisamment rapidement pour passer au stade d'activation suivant avant retour à un état inactif. En implémentant le modèle initial avec la reliaison (rebinding) (dissociation/reliaison rapide) cela augmente la probabilité d'une activation rapide du lymphocyte T par un nombre réduit de pMHC agonistes (88), (87).

L'observation de l'engagement du TCR a mis en évidence la formation de regroupements, ou clusters, de plusieurs TCR (89) et entraîne alors une série de modifications du complexe TCR/pMHC. Une dissociation du complexe est possible, à chaque étape, le pMHC pouvant alors se lier à nouveau avec un TCR du cluster. A chaque association TCR/pMHC le cluster

augmente en taille et permet ainsi, à chaque association, la possibilité de liaison. A chaque dissociation, les modifications sur les TCR du cluster se poursuivent. Le signal final est uniquement transmis par le cluster de TCR. Cette implémentation au modèle initial permet d'augmenter la sensibilité de la liaison TCR/pMHC sans perte de spécificité juste en augmentant le nombre de TCR recrutés dans des clusters (90).

7.2. Modèle d'engagement en série

Lorsque le modèle d'engagement en série a été proposé, l'activation du lymphocyte T était considérée comme un paradoxe. Il a été montré dans les études de (91), (92) qu'un lymphocyte T pouvait proliférer et produire des cytokines en réponse à 10-100 pMHC spécifiques présents parmi un grand non nombre de pMHC non stimulateurs.

(S. Valitutti et al., 1995) ont montré qu'une APC avec une faible densité d'antigènes (~100 pMHC par APC) entraîne le recrutement d'un grand nombre de TCR (~18000) sur la cellule T ce qui a conduit au postulat du modèle d'engagement en série. Celui-ci décrit qu'un seul pMHC peut engager et déclencher en série plusieurs TCR, conduisant à une régulation négative du TCR de sorte qu'une cellule T puisse détecter de manière sensible un petit nombre de pMHC antigéniques grâce à une occupation élevée du TCR et permettant ainsi une signalisation prolongée (S. Valitutti et al., 1995), (93).

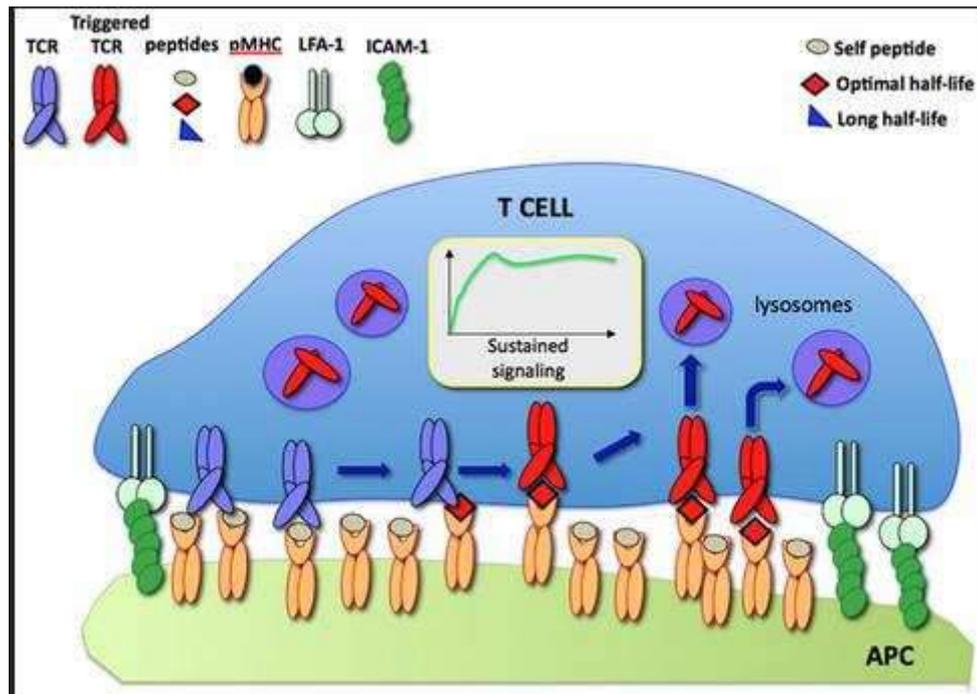


Fig. 1.18 : Modèle d'engagement en série des TCR, un faible nombre de pMHC agonistes (rouge) engage le TCR et permettent de maintenir le signal d'activation, une fois liés ils se dissocient et sont internalisés dans les lysosomes ce qui permet à des TCR libres (bleus) de s'associer au pMHC et ainsi activer séquentiellement plusieurs TCR (94).

Après association du TCR avec un pMHC agoniste celui-ci se dissocie et sera internalisé dans des compartiments de recyclage et sera dégradé dans les lysosomes ou recyclé à la membrane plasmique où il pourra de nouveau interagir avec son ligand. (93) ont montré que l'internalisation des complexes TCR/CD3 était dépendante de la concentration en peptides spécifiques présentés à la surface de la APC.

De plus, (95) ont montré que l'accumulation de signaux courts et de faible intensité étaient suffisants pour atteindre un palier d'activation et ainsi maintenir l'activation du lymphocyte T.

Le modèle d'engagement en série prédit un temps d'interaction optimal entre TCR et pMHC reposant sur un taux de dissociation élevé entre le TCR et son ligand permet au pMHC d'engager séquentiellement plusieurs TCR. Cependant, une interaction trop courte empêcherait d'initier l'activation du lymphocyte T et une interaction trop longue ne permettrait pas un engagement en série. La demi-vie du complexe TCR/pMHC doit donc être optimale (96), (97).

Ce modèle d'engagement en série basé sur une cinétique rapide peut également expliquer comment les TCR distinguent les ligands de pMHC avec des cinétiques très différentes. Ce modèle concilie le paradoxe de la sensibilité et de la spécificité élevées de la reconnaissance de l'antigène des cellules T et permet de mesurer à la fois la qualité et la quantité de pMHC par la fréquence de la formation des liaisons. Il permet de compléter le modèle de kinetic proofreading.

8. Les modèles d'initiation du signal

8.1. Agrégation moléculaire

Différentes expériences ont montré que l'agrégation de complexes TCR/CD3 permet l'activation du TCR. L'utilisation de pMHC multimériques solubles entraîne l'activation des lymphocytes T par agrégation, ou cross-linking, des TCR alors que les formes monomériques n'ont pas d'effet (98). Toutefois étant donnée la faible concentration en pMHC spécifiques à la surface des APC, une dimérisation de ces complexes paraît peu probable.

Le corécepteur CD4 joue un rôle critique dans l'activation des cellules T. En fonction de comment le corécepteur se lie au pMHC avec le TCR, deux modèles de dimères ont été proposés.

Le modèle hétérodimère classique postule que le corécepteur CD4 se lie à un pMHC qui est engagé en même temps qu'un TCR. Plusieurs études ont montré que le TCR et le corécepteur doivent se lier au même pMHC afin d'initier pleinement l'activation des lymphocytes T (99). (100) ont montré en 2D et en utilisant des micropipettes que le CD8 se lie au même pMHC avec le TCR pour amplifier la réponse des cellules T. Le TCR et la liaison du corécepteur au même pMHC peuvent favoriser la signalisation entre le Lck associé au récepteur et le module de signalisation CD3 intracellulaire du TCR. Toutefois, (82) ont montré en utilisant des mesures 2D de FRET que le CD4 ne stabilise pas les interactions TCR-pMHC.

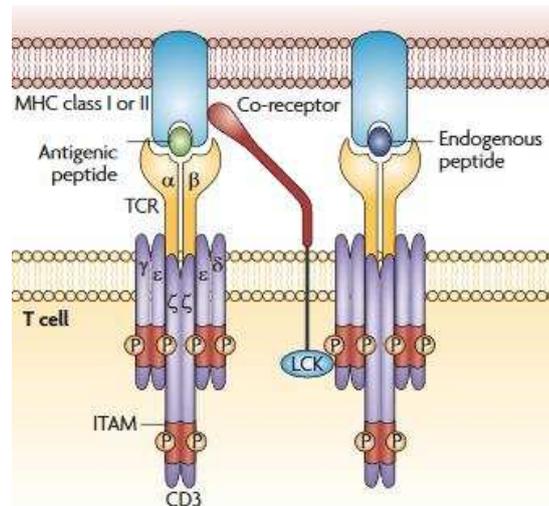


Fig. 1.19 : Le modèle de pseudo dimère : le TCR est lié au corécepteur CD4 qui va s'associer au MHC qui présente un peptide antigénique mais le corécepteur lui-même provient d'un autre TCR/CD3 qui reconnaît un peptide endogène, ce qui permettra à Lck de phosphoryler les deux TCR qui sont à une distance très proche l'un de l'autre (101).

(102) ont proposé un modèle de pseudodimère alternatif en mettant en évidence le rôle du pMHC endogène dans un système de cellules T CD4 +. Sur la base des données de pMHC dimériques solubles (103), (104), ce modèle suggère que l'interaction d'un TCR avec un agoniste pMHC peut recruter un second TCR via une molécule CD4 associée. Ce TCR recruté peut se lier à un pMHC endogène, formant ainsi un pseudodimère stable pour déclencher l'activation à l'aide de la tyrosine kinase Lck (105).

Cependant, (106) ont affirmé que les pMHC endogènes avaient un rôle négligeable dans le déclenchement de l'activation des cellules T. Néanmoins, le modèle pseudo dimère est intéressant car il permettait aux cellules T d'utiliser les pMHC endogènes qui sont en excès à la surface cellulaire comparés aux pMHC agonistes (Davis et al., 2007), (101), (107).

8.2. Modèle de déformation conformationnelle

Différents modèles de déformation conformationnelle stipulent que les chaînes du complexe TCR/CD3 ne sont pas accessibles par Lck ou CD45 en absence de pMHC. La liaison TCR/pMHC induirait un changement conformationnel rendant ainsi les ITAMs accessibles, à Lck et CD45, qui pourront ainsi être phosphorylés par Lck (108).

L'engagement du complexe TCR/CD3 avec son ligand pourrait créer un mouvement de piston du complexe perpendiculairement à la membrane (109). Ce mouvement permettrait le dépliement des domaines cytoplasmiques de CD3, exposant ainsi les sites de phosphorylations.

Certaines études (106), (110) tiennent compte du rôle actif du cytosquelette d'actine de la cellule T dans la déformation du complexe TCR/pMHC. En effet, le cytosquelette d'actine va générer des mouvements des membranes du LT et de l'APC pouvant ainsi générer des forces de traction sur le TCR. Ces forces vont induire une déformation du TCR transférée à CD3 (108), (111) et permettront de rendre accessibles les ITAM à Lck.

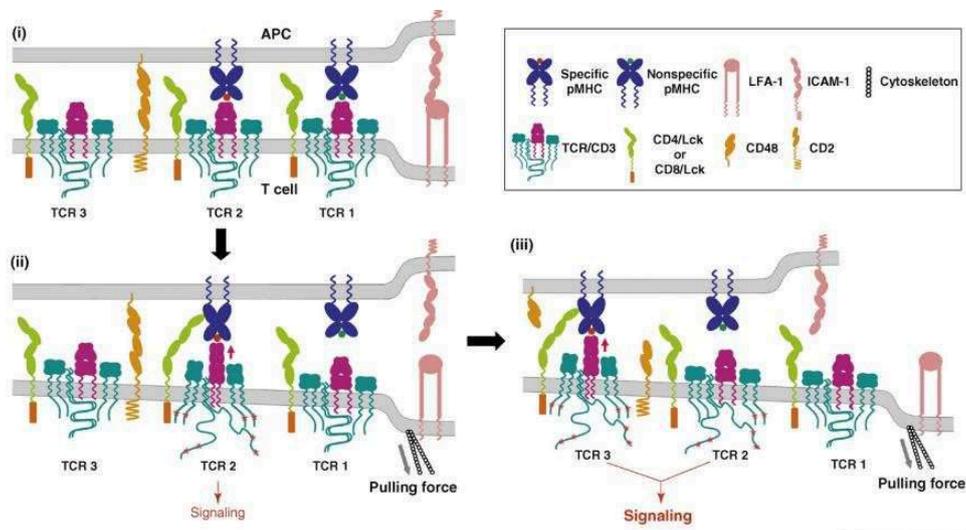


Fig. 1.20 : Modèle de déformation conformationnelle proposé par Ma et Finkel. i) les molécules d'adhésion (CD2, CD48, ICAM-1 and LFA-1) permettent le rapprochement des membranes du LT et APC sans initier toutefois l'engagement du TCR. (ii) une force de traction est exercée au niveau de l'interaction. La liaison faible entre TCR1 et un pMHC non spécifique se dissocie sans induire de changement conformationnel ou de signalisation. La liaison TCR2 est un pMHC antigénique est suffisamment forte pour induire un changement de conformation et une signalisation. (iii) Le mouvement du LT changes sa position relative par rapport à l'APC. Le même pMHC antigénique peut alors se lier et déformer le TCR3 (110).

8.3. Modèle de ségrégation cinétique

D'après le modèle de ségrégation cinétique, lorsque le lymphocyte T ne reçoit aucune stimulation la distribution du complexe TCR/CD3 est aléatoire dans la membrane plasmique, il est toutefois à proximité de molécules impliquées dans la régulation de l'activation, positivement avec Lck et négativement avec la phosphatase CD45. Ce paysage moléculaire empêcherait ainsi une activation du complexe TCR/CD3. (Imbert et al., 1994) ont montré que l'inhibition des tyrosines phosphatases même en absence de ligand favoriserait la phosphorylation des ITAM des chaînes CD3 et ainsi promouvoir l'activation du LT.

(112) ont proposé que lors de l'interaction entre le TCR et le pMHC une fine zone de contact serait créée et permettrait ainsi le rapprochement des pMHC avec le TCR/CD3 et le corécepteur CD4 (ayant une taille ~14nm correspondant au TCR/pMHC), liés à Lck. Cette zone étroite entraînerait ainsi l'exclusion de longues phosphatases inhibitrices comme CD45 et CD148 qui possèdent un long domaine extracellulaire (~45-50nm). Ainsi, les ITAM des chaînes CD3 pourront être phosphorylés par Lck et activer le LT.

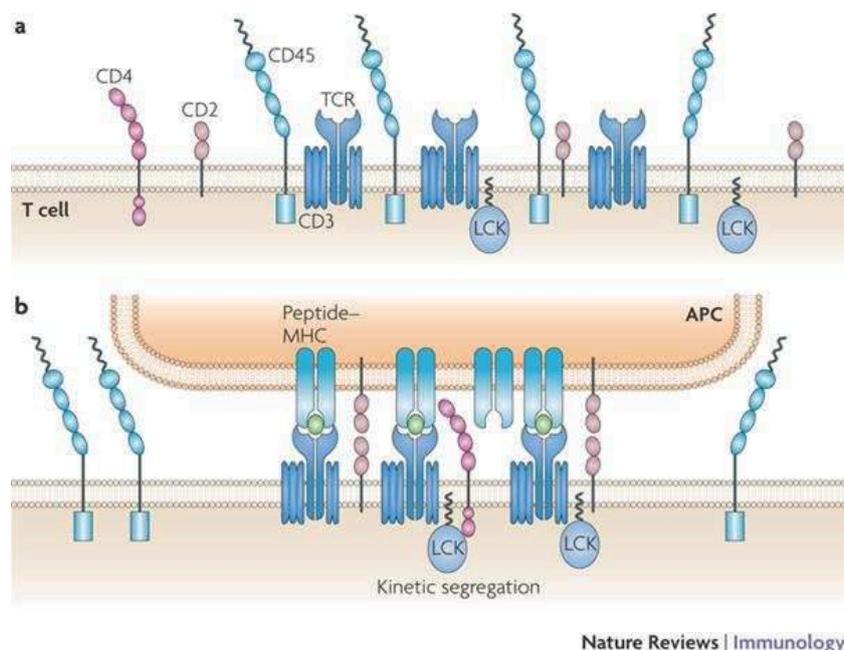


Fig. 1.21 : Modèle de ségrégation cinétique. a) au repos la disposition du complexe TCR/CD3 est aléatoire et est à proximité de Lck et CD45 maintenant un équilibre de non activation. b) lors du contact TCR/pMHC CD45 est exclu de la zone de contact permettant ainsi la phosphorylation des ITAM des chaînes CD3 par Lck.

Introduction

De plus, la membrane plasmique possède des domaines riches en sphingolipides et cholestérol appelés radeaux lipidiques ou « lipid rafts ». Un modèle basé sur la présence de ces domaines membranaires postule que l'association entre le TCR et le pMHC entraîne une redistribution des complexes TCR/pMHC au niveau des radeaux lipidiques. On retrouve de manière constitutive les protéines LAT comme les tyrosines kinases Lck au niveau des lipid rafts. En revanche, ces domaines sont dépourvus de phosphatase comme CD45. Le recrutement des TCR au niveau des lipid rafts et de CD28 dans ces microdomaines favoriseraient la phosphorylation des motifs ITAM de CD3 (Janes et al., 2000), (Sadra et al., 2004). Le rôle exact des lipid rafts dans l'activation du TCR reste une question ouverte, en effet (Hashimoto-Tane et al., 2010) ont montré que la formation de microclusters de TCR actifs est indépendante des lipid rafts.

A l'heure actuelle, aucun modèle d'activation ne fait consensus dans la communauté scientifique, il se pourrait que l'activation du TCR résulte d'une combinaison de changements conformationnels et d'agrégation des TCR (Minguet et al., 2007), couplés à une réorganisation globale des protéines membranaires (Choudhuri and van der Merwe, 2007).

9. Rôles des forces dans l'activation T

La cellule T comme toute cellule composant un organisme est soumise aux lois de la physique et peut être définie par ses caractéristiques biophysiques telles que la forme et morphologie de la cellule qui permettent de déterminer s'il y a une polarité, un gradient avant/arrière, ou si la cellule est circulaire. La tension de la membrane plasmique et la diffusion des molécules à sa surface peuvent également décrire une cellule. On peut également mesurer la rhéologie d'une cellule. Celle-ci est une branche de la mécanique qui étudie les rapports entre la viscosité (relaxation de contrainte par exemple), la plasticité et l'élasticité de la matière, ainsi que le comportement de celle-ci sous l'influence des pressions. L'élasticité apparente ou module de Young permettant ainsi de déterminer si une cellule est rigide ou non.

9.1. L'activation T est un moment clef où les forces physiques sont en jeu : une cellule T rencontre et scanne l'APC.

Les protéines responsables des cascades de signalisation menant à l'activation d'une cellule T ont été identifiées et très étudiées. Le fait d'être portées par des membranes cellulaires font que la reconnaissance est une reconnaissance de surface, dont les propriétés physiques sont relativement différentes de ce qui peut se passer entre molécules en solution (113). En effet, les surfaces doivent être à une distance telle que les molécules puissent interagir, mais aussi que les molécules diffusent pour pouvoir se trouver, à l'instant nécessaire et pour la durée nécessaire, présente au lieu de contact.

De plus, une cellule T est mobile et va migrer et va ainsi scanner les APC qu'elle rencontre les unes après les autres pour éventuellement reconnaître un pMHC via son TCR et s'activera. Ce faisant, des forces sont créées, au niveau du contact T/APC, à la fois de manière perpendiculaire à la membrane à cause des oscillations de celle-ci ou de la présence de protrusions actives, et à la fois de manière parallèle à la membrane, à cause du mouvement relatif des deux cellules. Les liaisons qui ont lieu dans la zone de contact sont donc soumises à des forces, ce qui rajoute aux complexités de la reconnaissance de molécules portées par des surfaces des déformations du paysage énergétique de la ou des liaisons (114), (115).

Depuis une dizaine d'années, le fait que les molécules et les cellules sont soumises à des forces a été étudié, et on a maintenant tout un ensemble de données montrant que ces forces peuvent, dans certains cas de figure, constituer un signal supplémentaire, se rajoutant aux interactions biochimiques, utilisé par la cellule pour sonder son environnement de manière plus efficace encore. Molécules et cellules sentent les forces qui leur sont appliquées, et peuvent y réagir, biochimiquement ou par des contraintes mécaniques : ceci a été nommé mécanosensation. La pertinence de ce concept est maintenant acceptée et depuis quelques années il est activement étudié dans la reconnaissance et l'activation des cellules T (116), (117), (118).

9.2. A l'échelle moléculaire, le TCR est une molécule mécanosensible

Dire que le TCR est une molécule mécanosensible signifie que sa capacité à reconnaître un couple pMHC porté par une surface dépend des forces qui sont appliquées sur la liaison formée. Plusieurs évidences sont venues, à l'instar de ce qui avait été observé pour les intégrines (119), (120) auparavant, étayer cette vision.

Les études en molécules uniques, complexes par définition, ont été riches en enseignement. A l'aide de protéines isolées et couplées à des billes et des surfaces, on a pu montrer que le TCR répondait bien de façon modulée par les forces qu'on lui applique, à l'aide de la technique de chambre à flux (84). Une seule mesure directe de la force de rupture des liaisons pMHC/TCR sur cellules vivantes a été reportée, et n'a montré, pour la technique utilisée (AFM), aucune différence de celle-ci en fonction du peptide présenté (85).

De plus, il a été montré que l'activation T, à la surface de cellules, via une stimulation du TCR, répondait aux forces, avec une forte préférence pour les forces tangentielles, ie. parallèles à la membrane qui correspondent à un mouvement relatif T/APC (expériences de pinces optiques ou de micropipettes : (121), (122)). Dans un second temps, il a aussi été proposé que le TCR agisse comme une liaison accrocheuse (ou catch bond, c'est à dire une liaison qui a un régime de force dans lequel son temps de vie augmente, ce qui n'est pas très intuitif) et que l'accumulation de liaisons TCR/pMHC répétées, et non pas un contact continu, puisse générer une activation, suivie à travers des flux calciques. Ces dernières liaisons sont supposées être testées perpendiculairement à la membrane (expériences de biomembrane force probe ou de micropipettes : (123)). Un effet additionnel des corécepteurs CD8 a aussi été mis en évidence (100).

9.3. A l'échelle mésoscopique, la cellule T intègre des paramètres physiques de son environnement

De manière commune à d'autres types cellulaires, la cellule T est capable de tester la chimie d'une surface rencontrée, et elle le fait d'une manière dynamique de façon à, d'abord, évaluer le peptide ou la protéine présenté(e) et ensuite, déterminer son action, comme par exemple si elle va s'étaler sur la surface ou non (74), (75).

Introduction

En supplément à la composition de la surface, la cellule T a été montrée récemment comme étant sensible aussi à la structure fine de la surface, comme par exemple la répartition, à l'échelle submicrométrique, des protéines d'adhésion ou activant le TCR. Ces études ont été possibles grâce au design de surfaces transparentes texturées par autoassemblage de particules (124), (125), et présentant les molécules d'activation (des aCD3) sous la forme de bouquets mimant une distribution discontinue, typique de celle proposée pour la distribution des pMHC sur les APC (126), (127).

La cellule T est aussi capable de réagir à la mobilité de ligands présentés par des bicouches ou bien fixes ou bien mobiles, mettant en lumière que le paramètre évident de la diffusion des ligands (et donc du TCR) influence grandement la réponse cellulaire, en particulier son étalement et l'organisation de son cytosquelette d'actine, mettant en lumière des mécanismes de glissement moléculaire à l'interface entre les récepteurs du lymphocyte et son cytosquelette, ce qui avait été proposé pour les intégrines dans un contexte cellulaire différent (128).

Enfin, une troisième propriété que la cellule T est capable d'évaluer est l'élasticité (ou plus généralement les propriétés mécaniques au sens large) de la surface qu'elle sonde. En effet, elle apparaît capable de différencier des gels polymériques ou des hydrogels de rigidité modulée (129) et de s'y adapter à l'image de la durotaxie des fibroblastes. Cette information lui permet de moduler leur réponse à différents signaux chimiques (130) qui leur sont présentés, voire elles sont capables de changer de comportement, par exemple de façon d'adhérer et s'étaler, en fonction des molécules / couples de molécules qui décorent ces substrats plus ou moins mous (131) (132). Ceci est une signature d'une capacité de mécanosensibilité, cette fois-ci à l'échelle de la cellule, et qui trouve une résonance particulière au vu de résultats montrant que les APCs ont des propriétés mécaniques différentes par type cellulaire, mais aussi que ces propriétés sont modulées au cours de la réponse inflammatoire (133). Une information intéressante que l'on peut souligner est que les cellules T ont une rigidité moindre que les APC qui leur sont présentées. De plus, la rigidité du substrat contrôle aussi le comportement à long terme des cellules T qui le rencontre, comme leur prolifération (134).

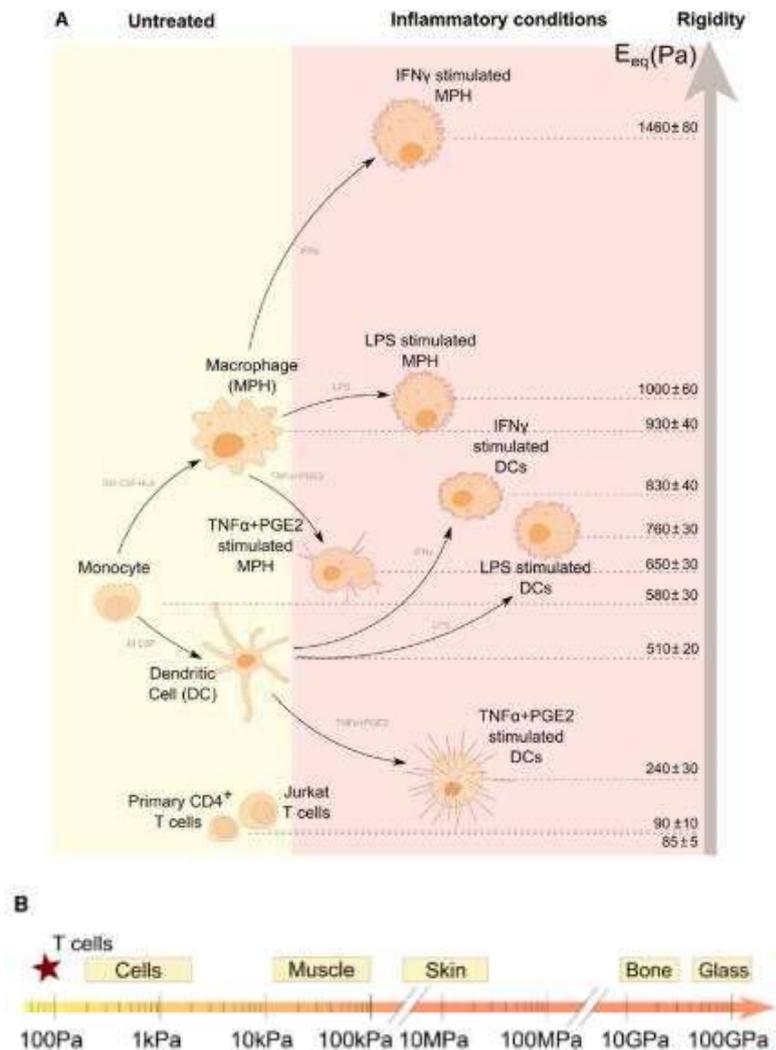


Fig. 1.22 : Mise en évidence d'élasticité ou module de Young variable de différentes APC A) Module de Young mesurées dans des condition normales (panel jaune) ou dans des conditions inflammatoires (panel rose) B) échelle de rigidité montrant la différence d'élasticité des cellules immunitaires comparées aux autres cellules et composants de l'organisme (133).

9.4. La cellule T activée produit des forces en retour, voire adapte sa mécanique

Il est intéressant de noter que la cellule T non seulement est capable de sentir les forces et les conditions mécaniques provenant de ce qui l'entoure, mais peut aussi, lors d'un contact avec un substrat, générer des forces qui peuvent être non négligeables et/ou moduler ses propres propriétés mécaniques. Des exemples frappants peuvent être trouvés dans la littérature récente. En premier lieu, lors des premiers instants du contact avec une surface plane, la cellule T teste celle-ci par des contacts intermittents via des protrusions riches en actine, un petit peu à la manière de doigts, qui viennent délicatement tester la composition de la surface avant de servir de points de nucléation à l'étalement (74), (135). Lorsque la cellule T est mise

en contact avec une bille activatrice, elle est capable d'agir sur celle-ci, d'abord en la repoussant grâce à une structure dénommée punch, puis en allant jusqu'à une forme de phagocytose plus ou moins frustrée (136). De plus, il a été montré que le module élastique et la tension membranaire de la cellule T variait au cours d'une activation générée par un tel contact (137) (Fig 1.23), probablement par consommation des plis membranaires typiques des lymphocytes (138).

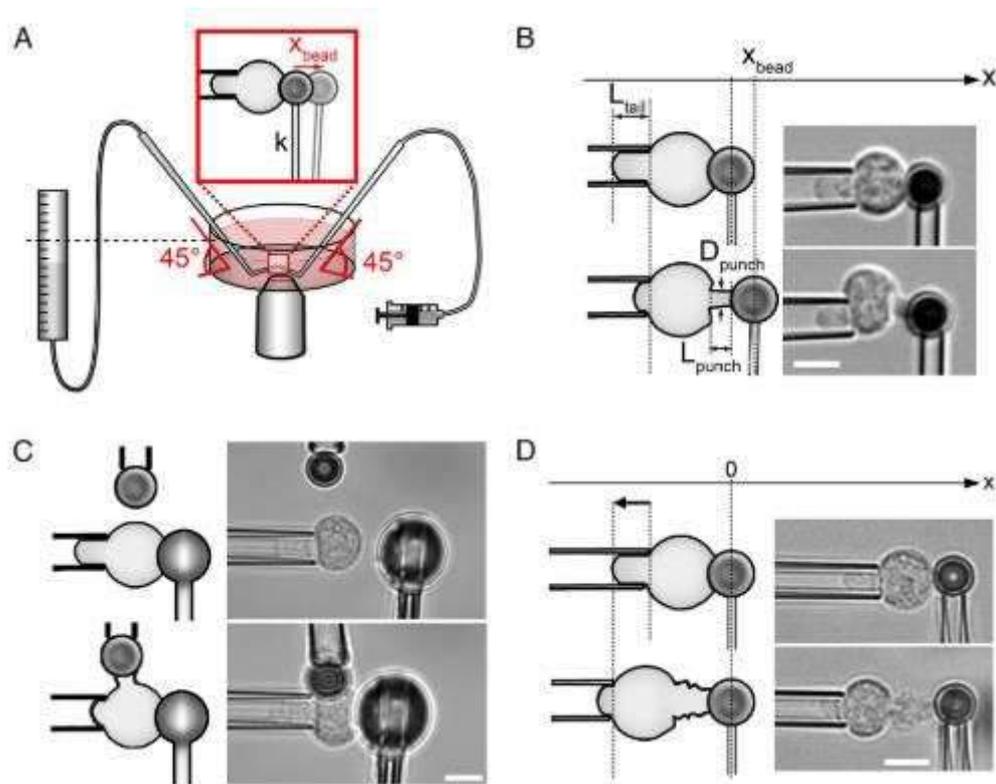


Fig. 1.23 : Expérience de micropipettes permettant de mettre en contact une cellule T et une bille activatrice, mettant en évidence que la cellule T exerce des forces lors de son activation. A) Système expérimental de micropipette ayant une courbure de 45° permettant ainsi d'être dans le plan focal du microscope inversé. (B) Mesures du déplacement selon l'axe x de la bille activatrice suite à l'exercion de force émise par la cellule T. C) Micro-indentation du profil d'une cellule pendant son activation plusieurs fois toutes les 10s fournissant une mesure du module de Young, décrivant la rigidité effective de la cellule avant et après activation. D) Expérience similaire que B sauf que dans ce cas la position de la bille est fixe et on mesure le déplacement de la cellule T barre d'échelle = 5 μm (137).

9.5. La forme même de la cellule peut être déterminante

Les cellules T sont des cellules non adhérentes en particulier lors de cultures de lignées. Lorsqu'on cherche à les étudier, il est très fréquent de devoir les faire adhérer sur une surface, et les modalités de cette adhésion peuvent être, comme précédemment discuté, cruciales pour la fonction que l'on veut regarder. En particulier, cette interaction peut pré activer, ou anergiser, les cellules.

Introduction

Un paramètre congruent de l'adhésion sur une surface est la forme que la cellule prend à la suite de cette interaction. En effet, des travaux de biologie cellulaire, dépassant le cadre de l'immunologie, ont montré que cette dernière pouvait influencer sur le résultat des flux d'information passant au travers de voies de signalisation (139). La forme d'une cellule est contrôlée par ses interactions avec la surface, la tension de sa membrane et aussi par l'organisation de son cytosquelette, voire la déformation de ses organelles, en particulier son noyau (140).

Dans le cas des lymphocytes T, des études pionnières ont montré que les capacités d'activation sont modulées par la forme de la cellule, en particulier lors de sa migration, c'est à dire que la réponse cellulaire, sous la forme de flux calcique, dépend d'où est rencontré le signal activateur (ici, sous la forme de billes manipulées par des pinces optiques, (141), (142). Il a de même été montré que les forces appliquées sur la cellule T pouvait contrôler sa forme (143). De même, l'activation calcique peut, dans certains systèmes et lorsque l'adhésion n'est pas suffisante, entrainer un arrondissement de la cellule T, soit un changement fort de forme, qui rappelle les changements de forme que subissent les cellules adhérentes en culture, préliminairement à leur mitose. Le va et vient entre forme et fonction est donc permanent : la première doit donc, au moins, être observée sinon contrôlée lors de l'étude de la deuxième.

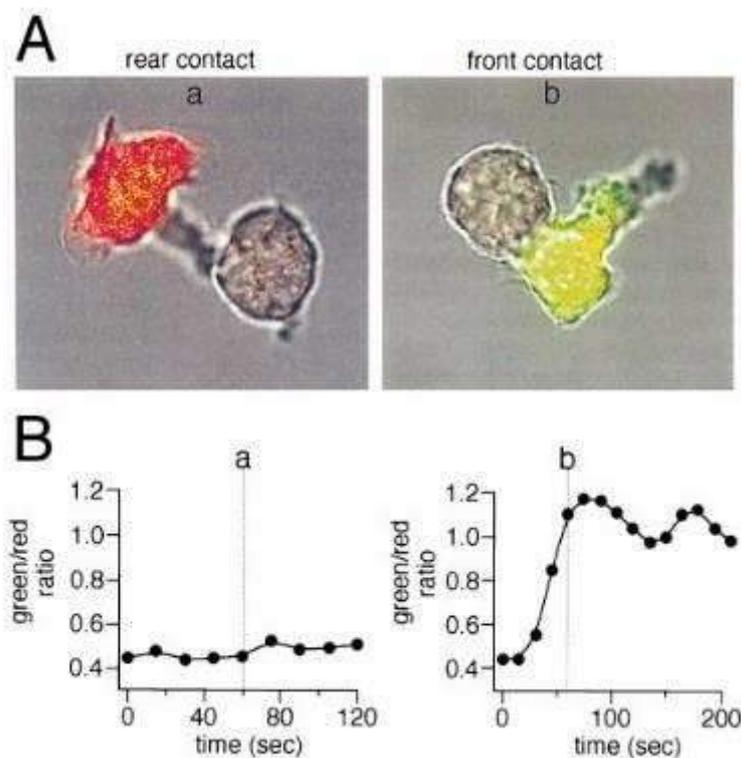


Fig. 1.24 : Mise en évidence d'une réponse calcique différente lors du contact entre une cellule B et une cellule T en fonction du point de contact sur la cellule T. A) Une cellule B est piégée par un système de pince optique et est mise au contact d'une cellule T soit à l'arrière au niveau de l'uropode a ou à l'avant au niveau du lamellipode b. Les cellules sont chargées avec une sonde calcique ratiométrique (Fluo-3, Fura Red) permettant ainsi de mesurer l'augmentation intracellulaire calcique. B) Quantification du niveau calcique dans la cellule T et on constate que lors du contact à l'avant la cellule T s'active fortement et rapidement (141).

9.6. Est-ce physiologique ?

En conclusion, les forces apparaissent, à différentes échelles d'espace et de temps, voire à différentes étapes du processus inflammatoire comme des modulateurs de la réponse. Ceci semble être un mécanisme général, car ce qui est proposé pour le lymphocyte T s'applique aussi au lymphocyte B, avec d'autres conséquences cellulaires et physiologiques : formation d'une synapse (144), implication des forces dans l'extraction de leur antigène (145), (146). Ce caractère général est renforcé par le fait que les propriétés physiques, à la fois des interactions moléculaires aux interfaces entre deux cellules (109), mais aussi des cellules partenaires (133) sont en jeu à toutes les étapes clés de la construction de la réponse immunitaire. Il a été aussi montré que l'interaction n'est pas qu'unidirectionnelle, c'est à dire que le lymphocyte T seul ne se fait pas qu'"influencer" par le milieu extérieur ou sa cellule partenaire (147), mais qu'il pouvait organiser cette dernière:(148); (149) voire utiliser les forces qu'il exerce sur cette dernière pour parfaire sa réponse (150). Ces derniers ont étudié la formation de la synapse immunologique formée entre un lymphocyte T cytotoxique (CTL) et une cellule cible infectée. R. Basu et ses collaborateurs ont montré que c'est une structure physiquement active capable d'exercer une force mécanique. Une des questions posées était de savoir si les forces exercées au niveau de la synapse favorisaient la destruction des cellules cibles. Les CTLs tuent en sécrétant des protéases toxiques et la perforine dans la synapse. Les expériences réalisées ont pu montrer une corrélation entre la force exercée dans la synapse et la vitesse de formation de pores sur la cellule cible. Ces expériences mettent en évidence un lien direct entre le niveau de cytotoxicité (augmentation de l'activité des perforines) et la force exercée à la synapse. Ces résultats montrent la mécanosensation est utilisée dans la réponse immunitaire et démontrent que les cellules utilisent des forces mécaniques pour contrôler l'activité des signaux chimiques sortants.

10. Les approches actuelles de la mécanotransduction de l'activation T sont cependant limitées

Les limitations des approches expérimentales actuelles sont intrinsèquement liées à la nature des cellules T : elles sont de petite taille, fortement activables, parfois capricieuses. Elles sont "en suspension", et bon nombre de méthodes impliquent de devoir les immobiliser ou du moins les faire adhérer sur un substrat, ou bien elles doivent être micromanipulées.

Pour ce qui est des surfaces modèles, outre les gels dans lesquels elles peuvent se mouvoir à 3D mais qui pour l'exploration de la mécanosensibilité sont encore peu utilisés et seulement pour des cellules de grande taille (151). Leur utilisation n'a pas encore été rapportée pour des cellules aussi petites que les cellules T. L'environnement in vivo ne permet pas de réaliser de telles approches non plus. On est donc majoritairement limités à des systèmes en 2D, surfaciques. Ces surfaces ne miment, à l'heure actuelle qu'une à deux/trois propriétés physiques de l'APC qu'elles sont censées représenter (quelques articles seulement ont été choisis pour chaque cas, sans exhaustivité) :

- présentation moléculaire, sur surface dure (74)
- présentation moléculaire, sur surface de rigidité variable (132).
- présentation moléculaire, sur surfaces de fluidité contrôlée (128)
- présentation moléculaire micro-organisée (152)
- présentation moléculaire nano-organisée (126)
- co-présentation nano-organisée (31)
- présentation moléculaire nano-organisée sur substrats mous (153).

De même, il existe quelques exemples de mesures de forces, avec une cellule T mais en face d'une surface modèle :

- un levier d'AFM sans (85) ou avec un suivi de l'activation (154).
- une bille, présentée par un système porté par une micropipette type BFP : (123), (136), ou type pipette souple (137).
- une surface avec des senseurs de forces utilisant des brins d'ADN (155).

Introduction

Peu d'études donc se sont intéressées à l'activation T, sous force, et encore moins, voire aucune à notre connaissance, aux instants initiaux de cette activation. Les plus intéressantes sont citées ici :

Les références (156); (157) ont utilisé la technique de Single Cell Force Spectroscopy que l'on va introduire dans ce manuscrit (158) (159). Ils en ont tiré les forces d'adhésion, avec des peptides variables, entre une APC et une cellule T, à des temps longs d'interaction et ont tenté de relier ceci à la formation de la synapse immunologique. Aucune visualisation en temps réel de l'activation n'a été réalisée. D'autres molécules, ainsi que deux types d'APC (DC ou B) ont été étudiées à l'aide de cette même technique, toujours avec des mesures d'adhésion (160). Aucune visualisation en temps réel de l'activation n'a été réalisée.

Des mesures de pinces optiques, avec une cellule T comme objet sonde ce qui n'est pas évident pour avoir une calibration propre des raideurs du piège, ont été réalisées entre cellules mais se sont cantonnées, de par les faibles raideurs accessibles sans dommage aux cellules (la raideur est liée à la puissance du laser utilisé et limite les forces maximales mesurables), à des mesures en molécule unique (161). Un système couplant AFM et pinces optiques a permis une étude très élégante des forces d'adhésion en fonction d'une costimulation cellulaire (162). Ces expériences sont chères (un AFM haut de gamme et des pinces optiques sur le même système optique), fines (expérimentalement, chaque mesure est un challenge), délicates mais riches en potentialités ont été réalisées. Pour des raisons pratiques, elles se sont limitées à des études aux temps longs des interactions tripartites, l'interaction T régulateurs (Treg) et APC est réalisée grâce à l'AFM et un autre lymphocyte T est mis en contact avec l'APC grâce aux pinces optiques simultanément (Treg/APC/T).

-Enfin, on peut noter que les considérations de mécanique et de forces lors des processus liés à l'activation T avaient été évoqués il y a plus de 30 ans avec des techniques de micropipettes. La mécanique lors de l'étape de cytotoxicité des cellules T CD8+ (163) mais aussi les forces à l'interface T/APC (164) avaient été quantifiées, avec une précision toute relative due aux limitations techniques de l'époque pour les acquisitions vidéos, en temps et en finesse d'image.

II. Questions ouvertes

Il n'y a donc pas encore de consensus clair quant au type de force qui s'exerce dans un contexte physiologique sur les liaisons TCR/pMHC. La question résiduelle de ces études est l'identification du substrat moléculaire de cette mécanosensibilité du TCR. En effet à l'heure actuelle on n'est pas capable de dire combien de pMHC sont nécessaires à l'activation d'une cellule T. De même, aucun modèle d'engagement du TCR décrit dans la littérature permet de rassembler toutes les données dans un même sens. Est-ce les mêmes pMHC en contact avec des TCR respectifs ou une succession de ceux-ci. Est-ce que le temps de contact entre le complexe TCR/pMHC doit être continu ou peut-il résulter d'une séquence d'événements d'attachement et détachement ? Ce contact doit-il présenter une certaine fréquence ou non ? Est-ce que la direction de la force exercée modifie l'activation, perpendiculaire à la membrane présentant un système « serrure-clé » qui toutefois ne permet pas d'intégrer le fait qu'un TCR puisse reconnaître plusieurs variants peptidiques, ou tangentiel (116) ?

Est-ce au travers d'un changement conformationnel du TCR lorsqu'il subit une poussée ou une traction lorsqu'il est lié au pMHC (165), (166) ? Est-ce au travers d'un changement de position ou d'état de phosphorylation, soit de lui-même ou d'une molécule adaptatrice qui lui est proche (167) ? Est-ce au travers d'un changement de répartition des molécules portées par la membrane suite à la déformation de celle-ci (168), (169) ?

Néanmoins un lien clair et direct entre ces propriétés fines à l'échelle moléculaire et l'activation T à l'échelle cellulaire reste encore à apporter, comme le souligne la revue (113). En particulier, les forces sont-elles utilisées comme amplificateur pour la sélectivité de l'analyse du peptide ? Existe-t-il un lien direct avec le cytosquelette qui est source des forces et déplacements cellulaires (170), (149) ? Des sondes de force, basées sur des étirements de molécules mesurés par microscopie de fluorescence, ont été proposées comme des solutions potentielles pour aborder ces points (171).

Questions ouvertes

III. Objectifs et positionnement de notre étude

C'est sur toutes les études publiées dans la littérature cités précédemment dans la compréhension des aspects biophysiques, en particulier le rôle des forces, dans la réponse immunitaire que s'inscrit ce travail. Toutes ces approches, en cellule unique, sont sous-tendues par les difficultés expérimentales de reproductibilité et de dispersion des données mesurées. Elles sont extrêmement riches en informations, et permettent d'accéder à des informations fines qui sont souvent perdues lors de l'utilisation de techniques sur des populations de cellules ou bien auxquelles ces dernières ne peuvent avoir accès, en particulier pour ce qui est de l'information de force ou de mécanique.

Nous avons donc choisi de proposer une étude des premiers instants de la reconnaissance T, à l'interface entre une cellule T et une APC, sous force.

Le terme « sous force » réfère au fait que le contact entre une cellule T et APC sera finement contrôlé mécaniquement par l'utilisation de la microscopie à force atomique, contrairement à la sédimentation d'une cellule sur une autre. Il fait également référence au fait que nous pourrions imposer une morphologie à la cellule T ou à l'APC.

La gamme de temps que nous visons recouvre les premières minutes au cours desquelles une reconnaissance efficace donne lieu à l'évocation de flux calciques que l'on peut imager à l'aide de sondes adéquates, génétiques ou organiques. Notre objectif principal a été de standardiser au plus possible ces mesures de façon à essayer de réduire la dispersion des mesures réalisées.

Pour ce faire, nous avons choisi :

1. d'utiliser l'AFM comme technique de force, avec comme visée finale la technique de SFCS détaillée ci-dessus. Ceci entraîne la contrainte de devoir faire adhérer les cellules partenaires, à la différence des techniques basées sur les pipettes. Le fait de contrôler les forces nous permet de connaître avec précision le moment initial du contact entre les cellules. L'AFM est aisément couplable avec des microscopies comme la microscopie de fluorescence ou des techniques de microscopie de surface comme le RICM ou le TIRF. De plus l'utilisation de

Objectifs et positionnement de notre étude

l'AFM nous permet d'avoir accès à une grande gamme de force applicable, en effet la résolution varie de 5 à 10000 pico Newton (pN) ;

2. ceci nous donne la possibilité d'imager les morphologies cellulaires en microscopie de transmission au cours du contact cellule / cellule et d'imager en fluorescence simple les flux calciques. Ceci implique alors que la cellule T bouge le moins possible durant les minutes de mesure nécessaire pour suivre le phénomène. Avec les limitations de notre système AFM, la cellule T sera donc portée par la lamelle de verre et l'APC par le levier de l'AFM ;

3. pour suivre l'activation dont nous contrôlons l'instant initial par la force mesurée, il nous faut aussi contrôler l'état d'activation des cellules T ce qui demande de trouver une ou des molécules permettant une adhésion forte mais non pas anergisante ; c'est-à-dire qui permettra de visualiser des flux calciques ultérieurement lors de stimulation avec une molécule activatrice ou des complexes pMHC portés sur une APC.

4. cette adhésion devra laisser le plus possible le cytosquelette "libre" pour ne pas trop influencer les flux calciques et la réponse de la cellule ;

5. comme les approches en cellules uniques adhérees montrent classiquement une dispersion des formes des cellules sur le substrat, on va chercher à homogénéiser la forme des cellules T par adhésion sur des motifs contrôlés protéiques (microcontact printing) qui ne devront pas activer / désactiver les cellules et vérifier la conséquence sur les propriétés mécaniques. Ceci aura de plus l'avantage de localiser les cellules ce qui peut permettre d'augmenter les populations testées de manière contrôlée. Par contre, les cellules T sont plus petites que les cellules utilisées habituellement avec de telles approches, donc il faudra designer des structures ad hoc ;

6. comme les cellules T primaires demandent quelques étapes de préparation qui vont surajouter aux étapes de mise au point des mesures couplant les points 1 à 5, nous avons choisi de travailler avec un système murin modèle (3A9m vs COS APC) qui récapitule les étapes d'activation T jusqu'aux flux calciques et qui a été bien étudié au CIML. Outre la facilité de manipulation, l'existence de nombreuses variantes des cellules T, des APC, la

Objectifs et positionnement de notre étude

facilité de transfection et donc de modification des systèmes existants se révèlent intéressantes.

Nous avons donc procédé comme suit :

a. nous avons validé le couplage AFM en mode force et le suivi des signaux calciques sur des systèmes modèles

b. nous avons déterminé les molécules permettant de faire adhérer ou non les cellules T de manière contrôlées, c'est à dire sans les pré-activer ou les anergiser

c. nous avons obtenu des cellules micropatternées que nous avons caractérisées mécaniquement et en réponse calcique, par stimulation soluble ou cellulaire avec les APC ad hoc

d. nous avons modifié les cellules T pour les faire exprimer une ancre sans lien avec l'activation T pour lever des questions actuelles (rôle de CD45) et caractérisé les cellules mécaniquement et en réponse calcique avant de tenter de les patterner ;

e. nous avons obtenu une méthode de capture efficace de capture des APC sur le levier et étudié le rôle des conditions de détachement des COS APC de leur boîte de culture

f. nous avons montré, sur des cellules T non patternées et pour un temps de l'ordre de la minute, lorsque la signalisation calcique est bloquée, que l'interaction T/APC est bien peptide dépendante

g. nous avons observé que la relaxation de force, lors du contact cellule / cellule sous force, montrait une dépendance au peptide utilisé.

h. enfin, nous avons patterné, caractérisé mécaniquement et structurellement les COS APC, en particulier leur lamellipode et tenté de l'utiliser comme un substrat fin et relativement transparent pour étudier les interactions avec les cellules T de manière optique, en microscopie interférentielle et en TIRF.

Objectifs et positionnement de notre étude

Les données obtenues, même si nous n'avons pu assembler encore à l'heure actuelle tous les développements sur le même échantillon (des cellules T patternées sous force en SCFS dans différentes conditions d'activabilité, ie., avec ou sans flux calciques inhibés), sont présentés et discutés dans la partie résultat qui est divisée en plusieurs sous parties. La partie matériel et méthode qui la précède présente de manière directement utilisable les protocoles utilisés. Une conclusion et des perspectives sont ensuite présentées.

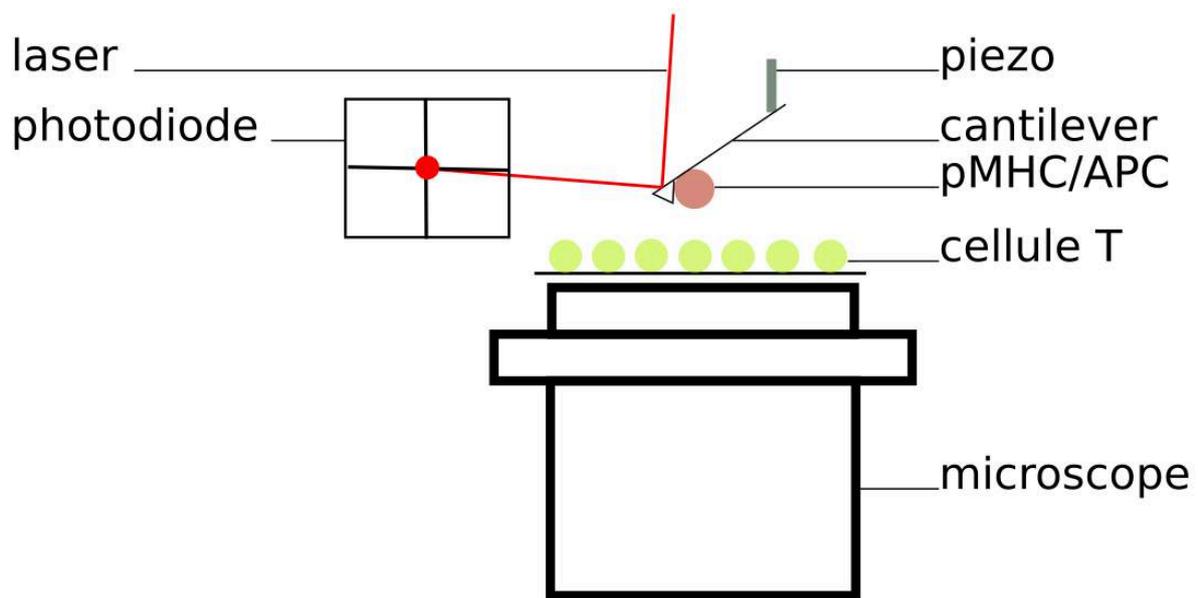


Fig. 3.1. : Schéma du système expérimental couplant microscopie à force atomique et microscopie à fluorescence. Ce système doit nous permettre de mesurer les événements initiaux de l'activation T grâce à la visualisation simultanée de flux calciques induits suite au contact d'une APC sur une cellule T, mise en forme ou non, à une force et temps de contact contrôlés.

IV. Matériel et Méthode

Note préliminaire : Les protocoles qui vont être présentés dans cette section sont faits pour être directement utilisables. Nous avons choisi délibérément de les présenter majoritairement sous forme de liste d'actions successives de façon à permettre au lecteur d'en connaître toutes les étapes. Les produits et matériel utilisés feront l'objet d'une liste en annexe.

1. Lignées cellulaires et culture cellulaire

1.1. Présentation des lignées cellulaires

Nous avons utilisé dans ce travail un système modèle de l'activation T basé sur deux lignées cellulaires. Ce système récapitule les étapes de l'activation de cellules primaires, c'est à dire présente les mêmes caractéristiques de phosphorylations, flux calcique et production de cytokine (172), (23). Le fait que ce soient des lignées est une facilité indéniable pour les expériences de biophysique que nous avons cherché à mettre en œuvre. De plus, ce système a été bien caractérisé dans le laboratoire (Chouaki-Benmansour, Ruminski et al. 2018) au CIML qui dispose de plus des souris ayant des cellules T portant le même TCR, et donc permettant à terme le passage facile à un système plus physiologique.

1.1.1. Lymphocytes T

Les lymphocytes T utilisés pour ce travail de thèse sont issus d'une lignée cellulaire nommée 3A9m provenant de la lignée 3A9 créée originellement par (173). La lignée provient de la fusion d'un thymome BW5147 (174) et d'un lymphocyte T murin créant ainsi un hybridome. La lignée a été donnée par D. Vignali à l'équipe de HT He (CIML). Elle diffère de la lignée originale (où l'expression du TCR et de CD4 était instable) en ce sens qu'il s'agit d'un variant ayant perdu l'expression de CD4 (3A9 clone N49), re transfecté avec un vecteur pCDNA3 mouseCD4, permettant l'expression stable du corécepteur. Dans ces cellules 3A9m (ou 3A9/N49/mCD4, parfois appelés mCD4), le niveau d'expression de CD4 est comparable à celui des cellules d'origines avant qu'elles ne dérivent.

Ces cellules présentent les mêmes marqueurs de surface qu'un lymphocyte T primaire, en particulier un TCR $V\alpha 3V\beta 8.2$ spécifique d'un antigène HEL (Johnson, Carland et al. 1989), un complexe CD3, un corécepteur CD4, d'un très faible niveau d'expression de molécules de CoStimulation (CD28, CD40, ICOS), et du récepteur de surface Thy1 (CD90) et du récepteur à l'Interféron gamma (IFN γ R/CD119). Ces cellules sont donc des hybridomes

T CD4+ de type Th1.

Différentes constructions ont été exprimées dans ces cellules et donné lieu à différents sous-clones :

- 3A9m Lck₁₋₁₂::EGFPm::HRAS-Cterm, qui exprime une construction membranaire où la GFP est ancrée au feuillet interne de la membrane, en Nterminal par les 12 premiers AA de Lck (1 myristate et deux palmitates), en Cterm par les 10 derniers AA de H-Ras (2 palmitates, un farnesyl).

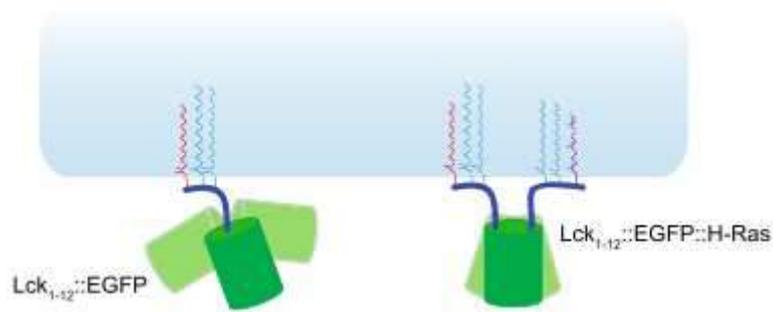


Fig. 4.1 : Illustration de la protéine Lck₁₋₁₂::EGFPm::HRAS-Cterm à la membrane (24).

- 3A9m-LifeActGFP, 3A9m-LifeAct-RFP permettant la visualisation de l'actine,
- 3A9m MCID CloneJ qui exprime une construction ancrée par les 12 premiers AA de Lck fusionnée à la séquence de mCherry et de la 5-phosphatase INP54 (*S. Cerevisiae*) hydrolysant PIP_{4,5}P₂ en PI4P



Fig. 4.2 : Illustration de la protéine tronquée de Lck fusionnée à la séquence de mCherry et de la 5-phosphatase INP54 (24).

- 3A9m MEGF10::YFP qui exprime le récepteur de surface MEGF10 humain exprimé dans les cellules neuronales et musculaires (impliqué dans la phagocytose de cellules apoptotiques) couplé à la YFP en C-terminal, permettant de rendre les lymphocytes T adhérents sur la surface de culture et sur de la Poly-L-lysine.

1.1.2. Cellules présentatrices de l'antigène

Les Cellules Présentatrices d'Antigène ou CPA que nous avons utilisées dans ce travail sont des cellules modèles au sens premier du terme : elles proviennent de la lignée cellulaire COS7 issues du singe vert et sont de type fibroblastique. Elles sont adhérentes en culture, ne possèdent pas de molécules de surface reconnues par les 3A9m et ont été transfectées avec les chaînes $\alpha\beta$ du MHCII I-Ak. Elles ont également la commodité de ne pas nécessiter la co-expression de la chaîne invariante. Elles expriment les MHC II à leur surface, et peuvent être chargées avec des peptides antigéniques provenant du "Hen Egg Lysozyme" ou HEL.

Ce système cellulaire expérimental permet d'induire les différentes étapes de la transduction du signal TCR dépendante, des plus précoces (phosphorylation des tyrosines, réponse calcique) au plus distales (sécrétion IL-2, expression CD69, extinction CD62L). Bien que ce système soit minimal il offre de nombreux avantages : c'est un système que l'on peut qualifier de « Lego ». En effet, il peut être complexifié à souhait en transfectant d'autres molécules impliquées dans la réponse immunitaire, telles que, par exemple, des molécules de stimulation (B7.1, B7.2) ou d'adhésion (ICAM1, ligand de LFA1). Cet éventail de possibilités permet de se focaliser sur la compréhension de l'interaction entre le lymphocyte T par son TCR avec le pMHC de l'APC.

Nous disposons de plusieurs variantes cellulaires portant les noms suivants :

- Les COS APC exprimant les chaînes $\alpha\beta$ du MHC II (haplotype I-Ak) que l'on peut charger avec des peptides exogènes dérivés de HEL,
- les COS APC* (également noté COS APC p4863c désignant le peptide et son expression constitutive) exprimant la chaîne α du MHC II et la chaîne β modifiée où la séquence codante du peptide HEL a directement été insérée dans la partie N-terminale de la chaîne (175).
- Les COS APC-Thy1-GFP qui expriment une construction chimérique de la molécule Thy1 fusionnée avec la GFP (entre le domaine Immunoglobuline et l'ancrage GPI) et qui permettent de visualiser leur membrane plasmique en fluorescence.

1.1.3. Peptides

Lors de cette étude nous avons utilisé deux peptides différents, chacun d'une longueur de 16 acides aminés. Ils ont été générés selon l'étude de (176).

Matériel et Méthode

Désignation	Séquence	Acides aminés	Pureté	
Peptide 46-61	NTDGSTDYGILQINSR	16	>95 %	CD4 dépendant
Peptide 48-63	DGSTDYGILQINSRWW	16	>95 %	CD4 indépendant

Tableau 1 : Nom et séquences peptidiques des peptides solubles utilisés pour charger les MHC II des APC modèles. Les peptides ont été générés par la société Génosphère. (176)

Les peptides sont synthétisés chez Genosphère reçus sous la forme de poudres et sont aliquotés dans du DMEM à une concentration de 30mM et gardés à -80°C. Ils sont utilisés à une concentration de 10µM concentration ultra-saturante (1µM permet de mesurer une sécrétion d'IL-2 maximale, data Audrey Salles, CIML)

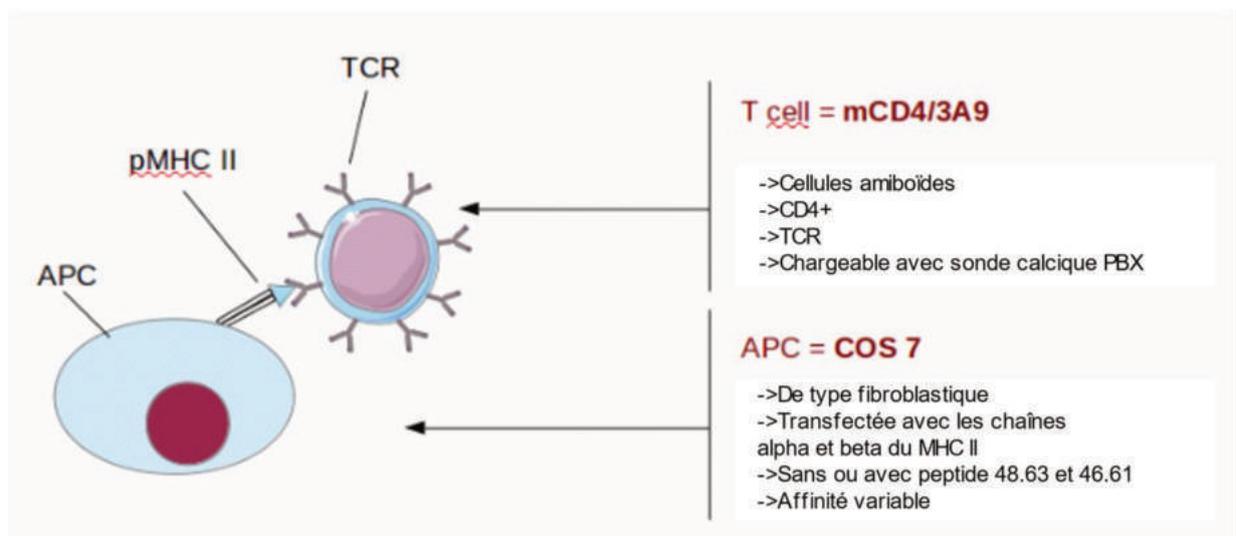


Fig. 4.3 : Modèles cellulaires du système biologique. Le lymphocyte T a un diamètre d'environ 12 µm et est non adhérent (en haut en rose). La cellule présentatrice d'antigène a un diamètre d'environ 20µm et est adhérente lorsqu'elle est en culture (en bas).

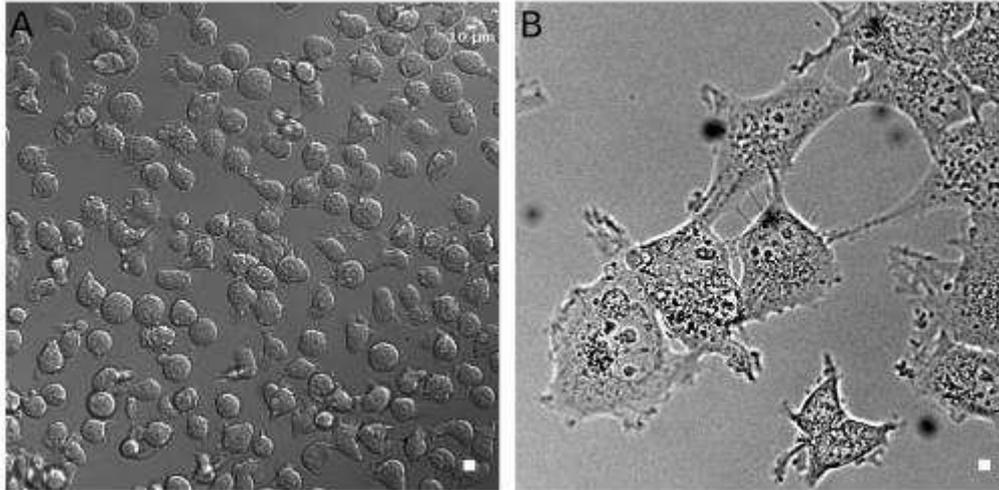


Fig. 4.4 : Observations des lymphocytes T et COS APC en lumière blanche A : Lymphocytes T en culture, B : COS APC en culture sur une surface de verre non fonctionnalisée, on note la dispersion des tailles, morphologie et adhésion des deux types cellulaires, barre d'échelle = 10µm.

On peut voir que les deux partenaires cellulaires présentent des phénotypes morphologiques différents et que dans la même population il y a une grande dispersion des formes cellulaires présentes sur une même surface. Lors du détachement des COS APC, avec de l'EDTA 0,53mM, les cellules sont rondes et de plus grande taille que les lymphocytes T permettant ainsi de distinguer facilement les deux populations quand on les réunit.

Ci-dessous, nous donnons de manière synthétique les protocoles d'obtention de ces lignées ainsi que leurs conditions de culture :

1.2. Culture cellulaire

- HBSS complété avec 1 % Hepes

1.2.1.3A9m, et lignées dérivées

- Les cellules 3A9m sont cultivées en RPMI complété avec 5 % de serum de veau fœtal, 1% de sodium pyruvate et 1% d'Hepes
- Les cellules sont maintenues en culture en plaque 24 puits. Tous les 3 jours, 1 ml d'un puit de culture présentant une confluence 50-70% est utilisé pour maintenir la lignée en culture par dilutions successives dans 5 puits contenant 2ml de milieu de culture

Matériel et Méthode

complet, et 1 puit avec 1ml (une ligne de puits)

- Pour les expériences nécessitant de plus grandes quantités de cellules :
- Les cellules sont comptées au moyen d'une lame de Malassez
- Centrifugation à 1200 rpm/5 min/ température ambiante
- Eliminer le surnageant
- Re suspendre les cellules à une concentration de $5 \cdot 10^5$ cellules/ml.
- Ensemencer un flasque 75cm² avec 25 ml de milieu et 1ml de suspension cellulaire
- Typiquement deux jours suffisent pour obtenir environ $20 \cdot 10^6$ cellules.
- Les cellules sont incubées @37°C, 6% CO₂

1.2.2. COS7 APC et dérivées

- Les cellules sont cultivées en DMEM complémenté avec 5 % de serum de veau foetal, 1 % de sodium pyruvate et 1 % d'Hepes
- Les cellules COS APC sont cultivées en présence de généticine G-418 1mg/ml
- Les cellules COS APC* et les COS APC Thy1::GFP sont cultivées en présence de généticine G-418 (1mg/ml), puromycine (0.25µg/ml)
- Pour chaque passage (tous les 3 jours)
- Choisir une flasque où la confluence n'excède pas 75-80%
- Laver 2X les cellules avec du PBS 1x (sans calcium/magnesium).
- Éliminer le PBS, ajouter de l'EDTA 0,53mM (2mL)
- Incuber 5 min les cellules à 37°C 10% CO₂.
- Taper sur la tranche de la flasque
- Vérifier sous microscope que les cellules sont correctement détachées
- Récupérer les cellules avec 8ml de DMEM complet
- Centrifugation à 1500 rpm/5 min/ température ambiante
- Re suspendre les cellules à une concentration de $1 \cdot 10^5$ cellules/ml
- Ensemencer les cellules dans des flasques avec 25ml DMEM complet à raison de 1, 2 ou 5 ml de culture cellulaire (pour pouvoir choisir une flasque de cellule en parfait état de confluence)
- Incuber les cellules à 37°C 10% CO₂

1.2.3. Congélation

- Congeler les cellules en 90% FCS + 10% DMSO.
 - 4 millions d'hybridomes T/ml
 - 1 million de cellule COS-7/ml
- Stocker les cellules à -80°C pendant au moins une semaine avant de les transférer en azote liquide.

1.2.4. Décongélation

- Mettre le bain marie à 37°C
- Prendre une ampoule de cellules du congélateur -80°C ou azote liquide
- Mettre l'ampoule dans le bain marie et laisser décongeler à 90%, il doit rester un petit fragment de glace.
- Disposer le contenu de l'ampoule dans 10ml de milieu RPMI et centrifuger 1500rpm/5 min/température ambiante
- Préparer une plaque de culture de 24 puits contenant 2ml de milieu RMPI complet dans 23 puits et 1mL de culture dans 1 puits.
- Re suspendre le culot cellulaire dans 1 ml de milieu complet et l'ajouter au puits ne contenant qu'un ml de milieu afin d'obtenir un volume final de 2ml.
- Prendre un 1 ml de ce puit et le transférer au puit suivant, ainsi de suite, pour toute la plaque.
- Procéder ainsi à la culture de la lignée décrite précédemment.

1.2.5. Protocoles de fixation et marquage

Nous avons réalisé deux marquages :

- Sur cellules vivantes afin d'observer le noyau et/ou la membrane plasmique. Le Hoechst est un intercalant de l'ADN permettant de marquer le noyau, il rentre de manière passive dans la cellule, il n'est donc pas nécessaire de perméabiliser.
 - Incuber le marqueur nucléaire Hoechst Cf=0.01mM 10 minutes à température ambiante à l'obscurité dans PBS 1X filtré à 0.2µm

Matériel et Méthode

- Lavage PBS 1X filtré à 0.2µm
- Sur cellules fixées afin d'observer le cytosquelette d'actine.
 - Préparer un tampon de dilution contenant 40ml de PBS 1X, 0.4g de BSA et 120µl de Triton 100X.
 - PFA 2 % 1mM gluCOSe 20 minutes à 4°C
 - Retirer le liquide de l'échantillon
 - Rincer avec du PBS 1X une fois en laissant très peu de liquide afin de ne pas sécher l'échantillon
 - Ajouter la solution PFA/gluCOSe
 - Rincer avec du PBS 1X 3 fois
 - Si on veut également marquer le noyau, ajouter du Hoechst Cf=0.01mM 10minutes à température ambiante à l'obscurité dans PBS 1X
 - Lavage PBS 1X
 - Phalloïdine fluorescente concentration initiale (MW=1320g/mol, pour Alexa488 A12379 Life technologies, resuspendu dans 1.5mL et aliquots de 55µL), concentration finale 10µL (provenant de l'aliquot) dans 1200µL de tampon de dilution 20minutes à température ambiante et à l'obscurité
 - Conservation échantillon à 4°C et à l'obscurité

1.2.6. Charge calcique

1.2.6.1. Solutions :

Le kit de marquage pour le calcium est commercial, il s'agit de « PBX Calcium kit » (Bdbiosciences Ref 640177) et permet de visualiser en fluorescence les variations de calcium intracellulaire dus à l'activation de récepteurs couplés aux protéines G ou des canaux calciques. Ce kit est composé de 3 solutions : 10X PBX Signal Enhancer, du Calcium Assay Buffer tous deux sont stockés à température ambiante et le Calcium Indicator. Ce dernier est re suspendu dans 100µl de DMSO et aliquoté à raison de 20x5µl et conservé à -20°C en présence de sachets anti dessiccation. Cette sonde possède des propriétés spectrales très similaires au Fluo-4. Mais elle est sensible à des augmentations faibles de calcium intracellulaire (Kd~312nM) similaire au Fluo-4. Le protocole de charge a une formulation qui comparé à d'autres sondes calciques classiques (Fluo-4 AM, Fluo-3 AM et Fluo-8) permet de limiter l'extrusion de ces

sondes hors de la cellule, ainsi que leur compartimentalisation (23). PBX est utilisée au CIML et il a été montré que charger les cellules 3A9m n'affectait pas la viabilité cellulaire et qu'elle était photo-stable pendant 30 minutes d'illumination répétées en microscopie confocale. Le spectre d'excitation de cette sonde est de 485 nm à son point maximal et a une émission à 525nm (informations BD Biosciences feuillet technique) ce qui est similaire au spectre de la sonde calcique Fluo-4 AM.

Les autres solutions nécessaires sont du PBS 1X, de l'HBSS Ca^{2+} et Mg^{2+} (déjà inclus dans le milieu), de l'Hepes 1M, du PBS 1X BSA 1% et du RPMI complet.

1.2.6.2. Préparation des surfaces :

- **Labtek 8 puits (Nunc)**
 - La veille de l'expérience, incuber 200 μ l/puit d'anticorps (concentration variant de 10 à 50 μ g/ml final) et autres molécules des labteks et les mettre à 37°C toute la nuit.
 - J0, récupérer la dilution d'anticorps
 - Laver les labteks en PBS 1X
 - Saturer les surfaces en PBS1X BSA1 % (Fraction V) ($V_{\text{min}}=200 \mu\text{l}$) de pendant 1h à 37°C.
 - Rincer 3 fois au PBS 1X et effectuer un rinçage avec de l'HBSS Hepes (10mM, 1/100^e) qui est le milieu d'observation pour les cellules

- **Boîte de Petri (WPI Instruments, Fluorodish F35-100)**
 - Les surfaces sont préparées le jour même, adsorption d'anticorps ou autres molécules 1h à température ambiante
 - Rincer au PBX 1X et effectuer un dernier rinçage avec de l'HBSS Hepes qui est le milieu d'observation pour les cellules

- **Préparation des cellules**
 - Compter les cellules 3A9m, pour obtenir une concentration finale= 1 million de cellules/ml dans 5ml de RPMI complet

Matériel et Méthode

- Centrifuger à 90-100g pendant 8 min à 18°C et les re suspendre dans du RPMI complet frais.
- Répartir 100µl de cellules dans une plaque 96 puits à fond sur 50 puits (5 lignes, 10 colonnes)
- Mettre les cellules pendant 10min à l'incubateur 37°C 6 % CO₂
- Pendant ce temps préparer le tampon de charge : 500µl de PBX Signal Enhancer 10X dans 4.5mL de Calcium Assay buffer 1X + 5µl d'indicateur calcique stocké à 20°C) en prenant comme précaution de limiter la luminosité de la pièce afin de protéger la solution.
- Mettre 100µl de Ca²⁺ assay buffer dans chaque puit contenant des cellules et homogénéiser.
- Incuber à 37°C 6 %CO₂ pdt 45min-1h, protéger la plaque de la lumière avec du papier aluminium en la sortant de l'incubateur.
- Centrifuger la plaque à 90-100g à 18°C pdt 8 min, retourner.
- 200µl HBSS/Hepes 10mM dans chaque puit. Centrifuger la plaque à 90-100g à 18°C pendant 8 minutes, retourner la plaque. Répéter l'opération 3 fois.
- Mettre 200µl dans les puits de la première ligne puis les transférer à la ligne du dessous jusqu'à réunir le contenu de 5 puits, Vf= 200µl.

Précaution :

Laisser la plaque à température ambiante et mettre l'échantillon de cellules à 37° 1 min avant de les déposer sur la surface. Attention 🧤🧤 ne pas conserver les cellules chargées à 37°C, cela favorise la compartimentation de la sonde calcique dans les compartiments intracellulaires, et l'absence de réponse en fluorescence.

1.2.6.3. Variante pour les surfaces patternées sur les boîtes de Petri :

- Réunir le contenu de 5 puits (verticaux), Vf= 200µl
- Réunir le contenu de 5 puits (horizontaux), Vf= 1mL
- Adapter la concentration à la surface disponible.

1.2.6.4. Acquisition des films

Les enregistrements sont réalisés sur un microscope confocal LSM 510 avec un objectif 40x NA 1.2 à immersion à eau. Les réglages du microscope sont décrits dans le matériel et méthode section 7. On utilise une platine thermostatée à 37°C. Les labteks contiennent 200µL de HBSS : Hepes 10 mM dans chaque puit. Un puit non coaté va être utilisé avec un petit volume de cellules pour trouver le point de focalisation au niveau du contact de la cellule avec le substrat. De plus, on va utiliser ces cellules pour ajuster les réglages du microscope, à savoir la puissance du laser et les gains utilisés pour obtenir le meilleur ratio signal/bruit tout en évitant d'avoir un signal trop fort (entre 10 et 20 u.a. sur 256 niveaux de gris (8bits) pour éviter que le signal soit saturé au cours de l'acquisition, ce qui fausserait la quantification). L'astuce pour savoir si on ne sature pas le détecteur est d'utiliser l'outil palette du logiciel Zen permettant de visualiser le signal. On peut également utiliser l'outil « Profil » du même logiciel pour voir à quelle valeur d'intensité de fluorescence on se situe dans des conditions non activatrices et d'anticiper une augmentation de fluorescence d'un facteur 6 au minimum.

200µl de cellules sont prélevées de la plaque 96 puits et transférés dans un tube qui sera placé 1 minute au bain marie à l'abri de la lumière. Ensuite les cellules sont semées en goutte dans un puit de la labtek et dès qu'une cellule arrive à la surface on débute l'acquisition.

1.2.6.5. Traitement des données

Le traitement des données est automatisé par le logiciel d'analyse de tracking cellulaire permettant simultanément la mesure de l'amplitude de fluorescence. Ce logiciel a été développé au CIML et a représenté une grande partie du travail de thèse d'Audrey Salles (177). Des informations plus précises que celles que nous allons détaillées peuvent être trouvées dans la publication : « Barcoding T Cell Calcium Response Diversity with Methods for Automated and Accurate Analysis of Cell Signals (MAAACS) » publié dans Plos Computational Biology en 2013 (23). Le suivi des cellules est réalisé par l'algorithme de suivi de particules uniques (178)). Les coordonnées de localisation sub-pixel des particules (issues de la convolution de chaque objet cellulaire par un disque de diamètre adapté) sont tabulées en un fichier Excel (Microsoft), ainsi que les valeurs brutes et normalisées d'intensité de fluorescence. Les valeurs sont également normalisées, selon la valeur médiane de fluorescence de chaque cellule avant la détection du maximum d'activation.

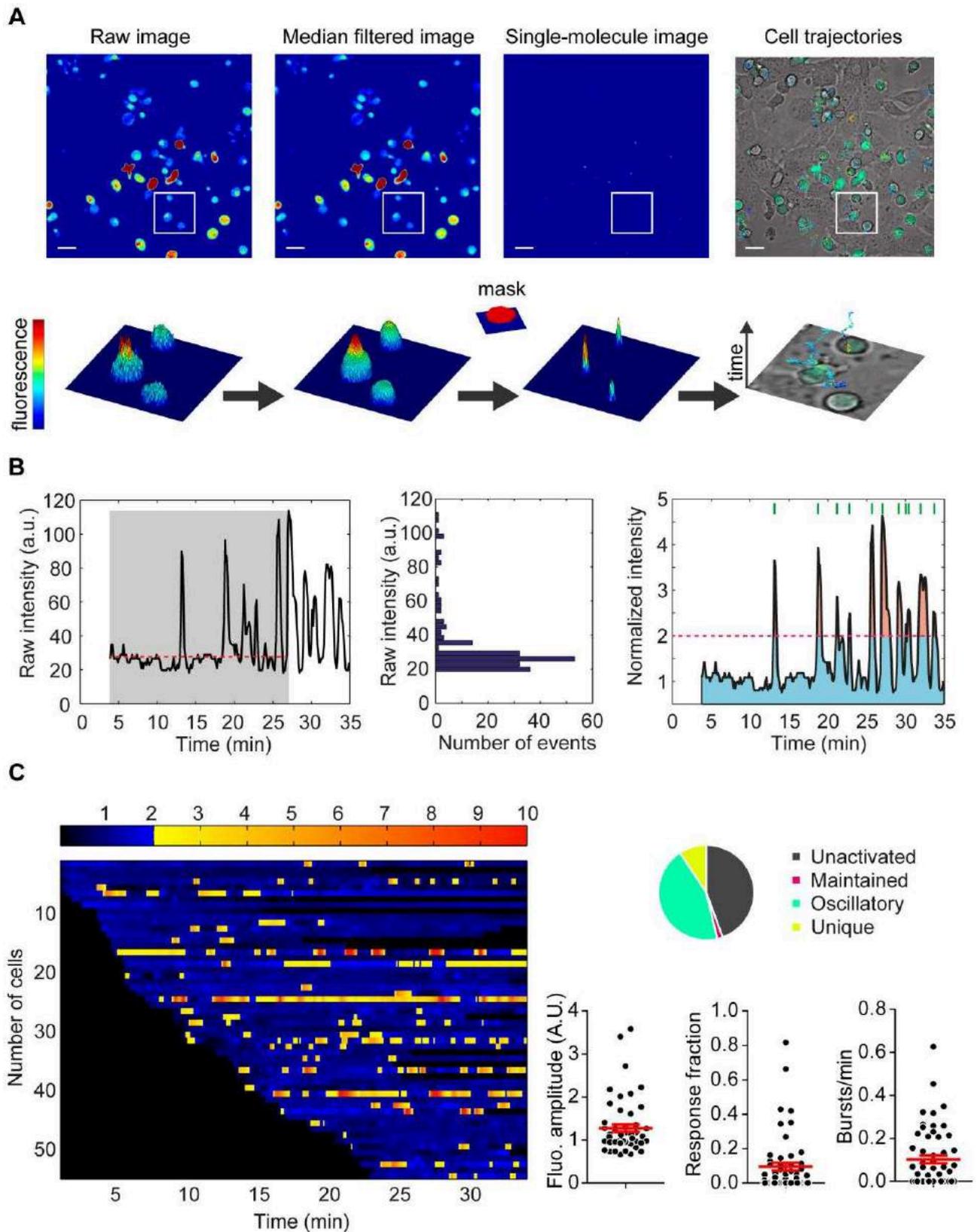


Fig. 4.5 : Tirée de la publication (23) cet assemblage résume les différentes étapes du suivi cellulaire et du traitement du signal en post-analyse (voir texte pour explications).

Ce logiciel permet d'obtenir 3 paramètres majeurs des films :

- La vitesse : il s'agit de la partie tracking cellulaire, un masque circulaire adapté au type cellulaire est utilisé et permet de moyenniser l'image de fluorescence brute pour qu'une cellule représente un point et obtenir ainsi une image de type suivi de molécule unique. Le suivi du déplacement est ainsi possible d'une image à l'autre et permet de déterminer la trajectoire effectuée pour un temps donnée et obtenir une vitesse exprimée en $\mu\text{m}/\text{min}$.

Ce paramètre nous a permis de déterminer si une cellule était adhérente ou mobile sur la surface.

- L'amplitude de fluorescence : elle permet la mesure directe de l'activation des cellules T. Toutefois, une cellule au repos possède des variations de flux calciques intracellulaire qui peuvent être détectés mais ne doivent pas être pris en compte. Pour cela, un seuil d'activation a été établi en dessous duquel on considère que les changements de fluorescence sont non spécifiques. Ces seuils varient en fonction du type cellulaire et du type de stimulus, pour les hybridomes 3A9m il est de 1.7. Ce seuil est calculé en utilisant deux jeux de données (un ensemble de cellules non activées et un ensemble de cellules activées). Il vise à maximiser la probabilité de détection tout en minimisant la probabilité de faux positifs. Cette valeur est calculée en considérant l'aire sous la courbe d'élévation de fluorescence et la courbe, ramenée par unité de temps (minute), afin de normaliser ces valeurs à la durée de la trace. Par ailleurs, ne sont incluses dans l'analyse que les traces représentant plus du tiers de la durée d'enregistrement (c'est à dire 10 minutes pour une trace de 30 minutes, par exemple).

Ce paramètre nous a permis de déterminer si les molécules à la surface que nous utilisons sont activatrices ou non et dans quelles mesures elles modifient l'activation (réponse moins forte ou anergie).

- Le pourcentage de cellules activées et le type de réponse associée : le premier paramètre nous permet d'avoir une lecture un peu binaire de l'activation à savoir quelle proportion de cellules sont activées dans le champ d'observation. Pratiquement, ce paramètre est déterminé si la fluorescence d'une cellule dépasse le seuil calculé au préalable, au cours de sa trajectoire.

On peut également accéder à des données plus précises à savoir lorsqu'une cellule est activée quel type de réponse calcique celle-ci présente : un pic unique, des flux oscillants ou une augmentation du flux calcique maintenue au cours du temps. Cette catégorisation est possible en tirant parti de deux autres paramètres. Il s'agit d'une part de la fraction du temps au cours de laquelle la cellule montre une fluorescence au-dessus du seuil (fraction response) et le nombre de pics de fluorescence par minute. Ainsi, si une trace ne montre qu'un seul pic de fluorescence, elle est catégorisée comme « unique », une trace montrant des oscillations et dont la fraction response est comprise entre 20 et 80% de la trace totale, elle est notifiée comme oscillante. Au-delà de 80%, on considère la réponse comme maintenue.

Grâce à tous ces paramètres nous avons pu savoir comment variait la vitesse de chaque cellule, et l'amplitude de ses flux calciques et leur morphologie.

Enfin, ce logiciel permet de détecter environ 200 cellules ce qui en fait un outil statistique intéressant et de générer des **Fig.**ures pour chaque cellule, on obtient ainsi la trajectoire de chaque cellule et son amplitude de fluorescence avant et après normalisation, sachant qu'il est possible et nécessaire de renormaliser toutes les cellules (grâce à une post analyse) une à une et d'en supprimer si elles sont mortes.

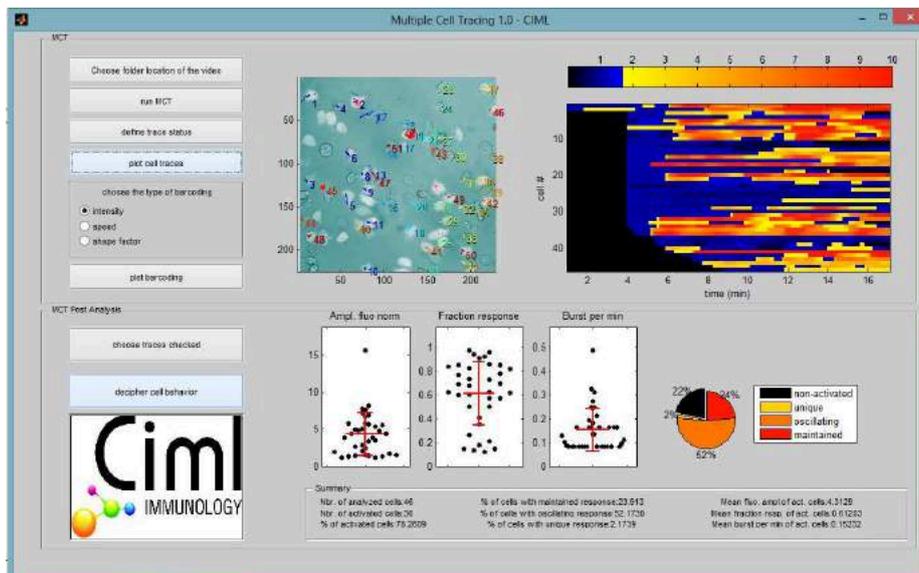


Fig. 4.6 : Interface du logiciel MAACS post-analyse où l'on peut observer une image de microscopie confocale avec les cellules suivies, un code barre représentant l'amplitude de fluorescence (bleu=pas d'augmentation, rouge=fluorescence maximale détectée) une ligne correspondant à une cellule. Enfin des scatter-pot et diagramme circulaire récapitulant le pourcentage de cellules activées et le type de réponse.

2. Constructions moléculaires

2.1. Protocoles de nucléofection AMAXA

Toutes les constructions moléculaires et cellulaires ont été réalisées au sein du Centre d'Immunologie de Marseille dans l'équipe du Dr. HT. He par Y. Hamon et ses étudiants (Audrey Salles, Nassima Chouaki, Elise Bergot, Kilian Ruminsky). Nous décrivons ici les protocoles de transfection transitoire et d'obtention de clones stables.

2.1.1. Hybridomes T

Les hybridomes T murins sont transfectés par nucléofection avec le kit AMAXA (Lonza) contenant la solution V.

A J-1 de la transfection :

- Cultiver les cellules de sorte que la concentration cellulaire le jour de la transfection soit de $7.10^5/ml$

Jour de la transfection :

- Un puits de transfection doit contenir 5 millions d'hybridomes T murins pour 5 μg d'ADN.
- Placer une plaque 6 puits, contenant 5 ml du milieu complet à 37°C
- Précipiter 5 μg d'ADN/point de transfection avec de l'acétate de sodium 0.1M éthanol et homogénéiser dans 10 μl d'eau stérile
- Resuspendre 5.10^6 cellules dans 100 μl de solution V kit AMAXA.
- Homogénéiser ces 100 μl avec les 5 μg d'ADN, en évitant de former des bulles.
- Transférer la solution dans une cuve d'électroporation
- Electroporer en utilisant le programme B-024
- Déposer les cellules transfectées en goutte à goutte dans un puits de plaque 6 puits.
- Remettre en culture pour caractérisation ultérieure

Remarque importante : La solution du kit est toxique : éviter que les cellules restent plus de 15 min dans cette solution d'électroporation.

Pour les cellules COS APC Thy1 ::GFP, le protocole est similaire à l'exception de

Ratio cellules/ADN : 10^6 cellules/5 μ g ADN

Kit V protocole A-024

2.2. Obtention de clones stables

L'expression du transgène est monitorée après 24 h de transfection (la cinétique d'expression après nucléofection est généralement plus rapide que par lipofection). Une partie des cellules est alors utilisée pour évaluer l'efficacité de la transfection et l'expression de la protéine en cytométrie de flux voire en imagerie. Suivant l'efficacité de la transfection, la deuxième partie est transférée dans de nouvelles flasques contenant du milieu complet supplémenté avec les antibiotiques adéquats.

2.2.1. Hybridomes T murins

- Les cellules 3A9m étant résistantes à la généticine (re transfection de CD4), les différentes lignées stables ont été obtenues après sélection en milieu RPMI complet+ puromycine (1,5 μ g/ml final)
- Après 3 semaines de sélection, l'expression du transgène (Tg) est vérifiée par cytométrie de flux ainsi que l'expression membranaire des marqueurs des lymphocytes T dans la signalisation T (TCR, CD4, CD45)
- Suivant le niveau d'expression requis et afin d'obtenir des populations moins hétérogènes, les cellules sont triées au FACS. Les populations TCR+, Tg+ sont soit remises en culture (population polyclonale de type bulk), soit déposées dans des plaques 96 puits, à raison de 1 cellule/puit soit par dilution limite, soit directement en sortie de trieur sur une plateforme autoclone.

2.2.2. Cellules COS APC

Les clones stables de COS-7 exprimant le MHC II ont été générés en suivant une stratégie similaire à celle employée pour les hybridomes T murins. En revanche après tri cellulaire, les populations triées ont été amplifiées sous forme de population polyclonale (bulk). Les concentrations en antibiotiques utilisées pour la sélection de ces cellules sont 1 mg/ml pour la généticine et 0,25 μ g/ml pour la puromycine.

i. Cellules 3A9m MEGF10

La construction MEGF10::EYFP a été décrite dans (179). Brièvement, les 220 dernières bases du 5' UTR et l'ADNc codant pour la forme humaine de MEGF10 a été obtenu du clone IMAGE (Genbank #AB058676) et cloné en amont de la séquence codante de la EYFP dans le vecteur pEYFP-N1 (sites XhoI/AgeI). Parallèlement, une construction chimérique composée du domaine extracellulaire (ECD) de hMEGF10, couplée à la EGFPm et ancrée au feuillet externe (hMEGF10 ECD::GFP::GPI) a été réalisée par clonage in-fusion HD cloning (Takara). Brièvement les 2558 premières bases de hMEGF10 ont été amplifiées par PCR avec la Pfu ultra high fidelity DNA polymerase (Agilent) (Sens 5'-TAC CGG ACT CAG ATC TCGAG ACC ATG GTT ATT TCT TTG AACTCA TGC-3'; Antisens 5'-T GGT GGC GAC CGG TGG ATC CCC ATC AGC AGG GAG AGC AG-3') à partir de la matrice pEYFP-N1 hMEGF10::EYFP, selon les indications du fournisseur (Tm=56°C, élongation 3 min)(Fig. 0A).

Le code couleur des oligonucléotides est

Noir / Séquence de 15bp pour la réaction de clonage par in-fusion

Rouge / sites de restriction enzymatique XhoI/BamHI

Vert / Contexte Kozak/linker

Bleu / séquence homologue à la matrice

Le fragment PCR est cloné par recombinaison « in-fusion » (In-Fusion® HD Cloning Plus CE, Takara ref : 638916) en présence de cloning enhancer (takara) dans le vecteur pEGFP-N3 GFP:GPI coupé XhoI puis BamHI

Matériel et Méthode

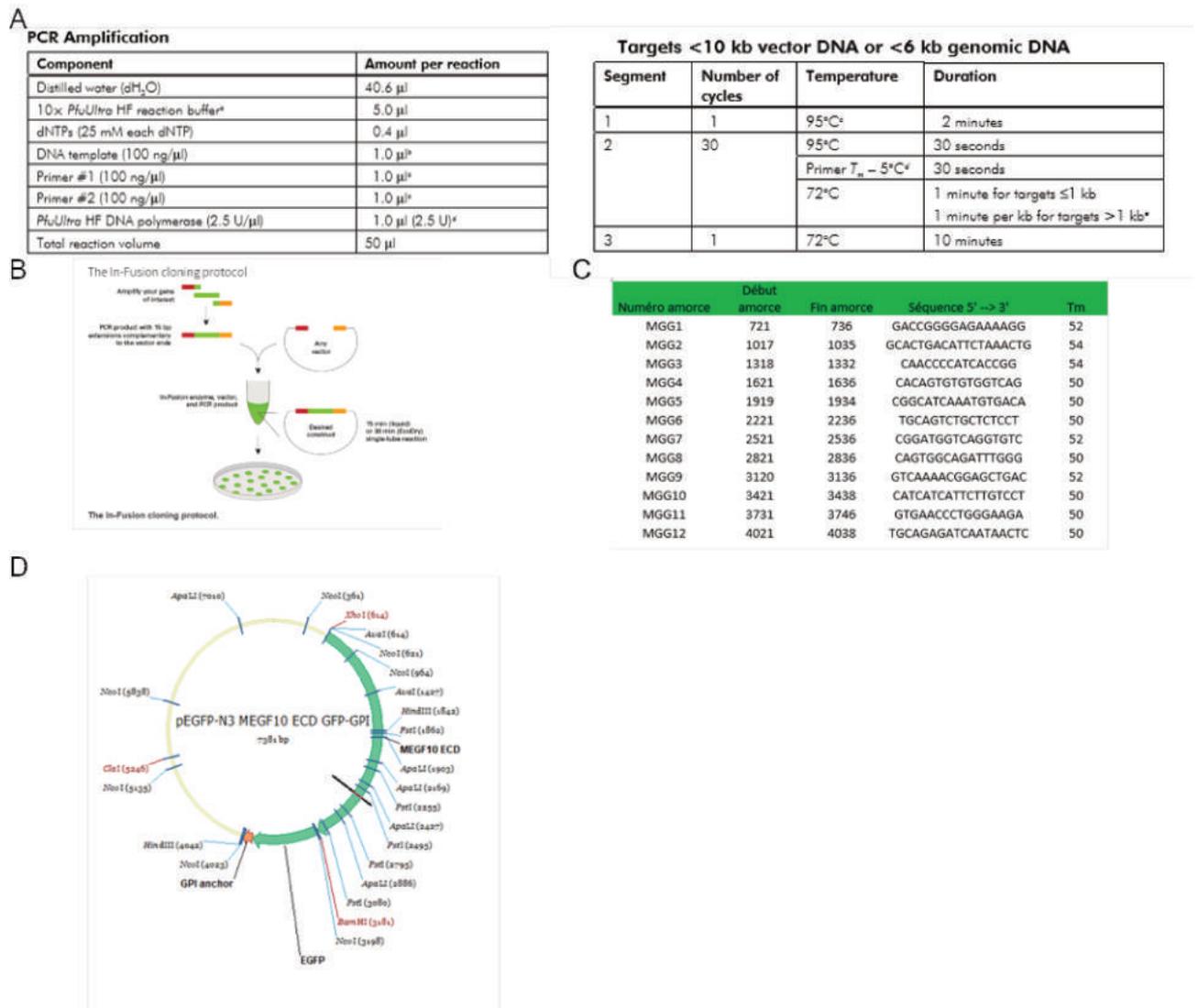


Fig. 4.7 : Production et expression de la protéine MEGF10. A : description des étapes de PCR, B : expression dans des bactéries des différents fragments, C : tableau présentant les amorces utilisées pour le séquençage D : carte du vecteur de MEGF10 ECD GFP-GPI.

Les différentes colonies bactériennes obtenues après transformation ont été criblées par minipréparations de plasmides puis séquençage intégral du fragment PCR inséré. Les amorces pour le séquençage ont été dessinés tous les 300bp (Sigma oligos). Le séquençage est externalisé chez MWG biotech. Les séquences sont analysées par la fonction « contig » de Vector NTI et comparé à une construction théorique.

La séquence de la EGFP a été ultérieurement remplacée par tagBFP2 (domain swapping) selon la même stratégie de PCR/clonage in-fusion (clonage BamHI/SalI dans le vecteur pEGFP-N3 MEGF10 ECD GFP-GPI du fragment tagBFP2 amplifié à partir du vecteur pTagBFP2-N (Evrogen) avec le couple d'amorces suivant (Sens 5'-CTC CCT GCT GAT

Matériel et Méthode

GGG **GAT CCA** ATG GTG TCT AAG GGC GAA-3' Antisens : 5'-TT ATT TGG ACG CGT **GTC GAC ATT AAG CTT GTC CCC CAG**-3'; code couleur identique).

Culture cellulaire

La culture des 3A9m lymphocytes T initiaux et des COS APC est décrite dans la section matériel et méthode de l'étude précédente. Les cellules 3A9m ont été électroporées par nucléofection Amaxa (Lonza KitV, programme B-024). Les cellules 3A9m électroporées (3A9 Meg) ont été obtenues par sélection en RPMI complet supplémenté en puromycin - 1.5µg/ml). Avant le tri cellulaire, les cellules ont été marquées avec un anti-TCR recombinant monovalent fluorescent (AF647 ::Fab H57.597 -2µg/ml, 1h, 10°C; MiMabs) La population double positive (YFP positive/TCR positive) a été triée Cell sorting cytometry (Facs Aria Illu Becton Dickinson), en mode deux voies. Les cellules récupérées ont été remises en culture, en présence de fortes doses d'antibiotiques (Pen/Strep 1000U/ml), pendant 1 semaine. La population est expandue puis congelée (après vérification de clonalité YFP/TCR) en FCS 90%/DMSO 10% à 2.5x10⁶ Cellules/ampoule/ml)

Préparation des surfaces continues

Anticorps Coating

Les boîtes de pétri (WPI Instruments, Fluorodish FD35-100) sont incubées avec 50µL d'anti-CD45 H193.16.3 (50µg/ml final) ou de pll0.01% pendant 45 minutes à température ambiante. La zone de fonctionnalisation sous la boîte est marquée au feutre. La goutte est aspirée au bout de 45 min. et les boîtes de pétri sont rincées PBS 1X filtré à 0.2µm. Le dernier rinçage est effectué avec le milieu d'observation des cellules HBSS 1X Hepes 10mM.

Poly-L Lysine coating

Les boîtes de pétri sont traités à l'air résiduel plasma pendant 10 minutes, puis sont incubées en présence d'une solution de poly-L-lysine (0.1% ou 0.01% w/v H₂O, Sigma ; ref P8920-100ml)) pendant 45minutes à température ambiante. La zone de fonctionnalisation sous la boîte est marquée au feutre. La goutte est aspirée au bout de 45 min. et les boîtes de

Matériel et Méthode

pétri sont rincées PBS 1X filtré à 0.2µm. Le dernier rinçage effectué est avec le milieu d'observation des cellules HBSS 1X Hepes 10mM.

Micro-Impression de protéine

50µL d'une solution de BSA 1 % (w/v PBS1X) biotinylée est incubé sur le tampon de PDMS préalablement lavé pendant 45 minutes à température ambiante. La goutte est aspirée et la fine couche de liquide restante est séchée grâce à un flux d'azote. Le tampon est appuyé sur la surface d'une boîte de Pétri fond verre selon une pression exercée sur les coins externes du tampon ainsi qu'au centre grâce à une pince. Le tampon est laissé en contact 10 minutes dans l'incubateur de culture cellulaire (37°C, 5° CO₂) et est ensuite délicatement retiré. La surface est lavée au PBS 1X filtré à 0,2µm trois fois.

La poly-L-lysine à 0,01 % est ensuite incubée pendant 1h à température ambiante. Les patterns sont révélés en ajoutant de la streptavidine fluorescente (SA-AF546, 20-100µg/ml) pendant 20minutes à température ambiante sous protection de la lumière. Il est également possible de transférer directement la poly-L-lysine sur la surface. Pour cela, la poly-L-lysine (0.1%) est directement incubée sur le tampon de PDMS. Nous avons également testé et adopté le fait de rajouter une étape afin d'augmenter le transfert de la poly-L-lysine grâce à l'utilisation de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate 10% w/v PBS 1X), constituant ainsi la première étape. En effet il a été montré que le SDS permettait de transférer plus efficacement la poly-L-lysine sur une surface, dans le cadre d'une étude sur la guidance neuronale (180). Après 20 min. la goutte de SDS 10% est aspirée, le tampon de PDMS est séché sous flux d'azote, (5 secondes environ). La Poly-L-lysine (0,1 %) est ensuite incubée pendant 45 minutes, puis aspirée et séchée.

Le tampon de PDMS est retourné sur la surface en verre pendant 10min à 37°C, 5 % CO₂. Le tampon est retiré, puis la boîte de pétri est rincée (3x PBS 1X). La molécule passivante est ensuite incubée (PLL-PEG, 100µg/ml, BSA 1% w/v PBS 1X, F127 2% w /v PBS 1X. La surface est de nouveau rincée avec PBS 1X avant un dernier rinçage milieu d'observation des cellules HBSS 1X Hepes 10mM. A noter que la surface ne doit pas sécher, avant l'ajout des cellules sur les surfaces. Les cellules 3A9m préalablement chargées ou non avec la sonde calcique fluorescente PBX sont respectivement conservées à 25°C ou à 37°C pendant au moins 45minutes/1heure après la dernière centrifugation avant toute expérience.

Microscopie confocale.

Les cellules 3A9m sont resuspendues en DMEM F12/nutridoma 1% puis transférées en labtek (8 puits/Nunc) coatées en poly-L-lysine (0.01% w/v H₂O, 30 min, 37°C, suivi de trois lavages en H₂O puis un lavage final e DMEM F12/nutridoma 1%. Les observations sont réalisées sur un microscope Zeiss LSM 780 (Laser Argon 488nm, 0.2%, objectif 40x/1.4 Oil, pixel size 0.101µm, zoom 2, pixel dwell time 2.05µs, Z-stack, 13 coupes espacées de 1 µm).

3. Cytométrie en flux

Afin de qualifier nos cultures cellulaires, outre le comptage et la vérification du taux de viabilité via un marquage classique 1 : 1 au bleu Trypan, nous quantifions les expressions des protéines d'intérêt une fois par semaine. A partir de standards établis au CIML et transposés au LAI, la cytométrie en flux nous permet de visualiser les dérives des cultures. Typiquement, les LT dérivent en 3/4 semaines et les COS en 4/6. A chaque fois que nous notons une variation significative de l'expression, nous repartons d'une ampoule congelée.

3.1. Principe

La cytométrie en flux est une technique de micro fluidique permettant de faire passer dans un capillaire très fin des cellules à haute vitesse et au travers d'un laser (ou plus) de longueur d'onde donnée. Le signal du laser est envoyé sur des détecteurs photomultiplicateurs et permettent d'extraire 2 types de paramètres concernant les cellules lorsqu'elles proviennent d'une culture monopopulation (ie. Un seul type cellulaire) :

1-en fonction de la déflexion du laser on peut connaître la taille de la cellule ainsi que sa granulosité. Ces valeurs permettent d'extraire des données indirectes de viabilité cellulaire en distinguant les débris cellulaires des cellules vivantes et les cellules mortes qui sont de plus grosse taille (FSC Forward Scatter élevé) et granulosité (SSC Side Scatter élevé), voire d'observer les populations de multiplets.

2-l'expression cellulaire de marqueurs d'intérêts grâce à un marquage fluorescent révélé par le laser. En effet, les cellules peuvent être incubées avec un anticorps spécifique (ou un ensemble de) couplé à un fluorochrome. Le signal de fluorescence est récupéré sur des

capteurs photomultiplicateurs et permettent de quantifier la présence d'une molécule à la surface. La diversité des fluorochromes actuels permet de pouvoir mesurer la présence de divers marqueurs simultanément.

3.2. Application à nos échantillons cellulaires

Nous avons utilisé cette méthode afin de vérifier l'expression des marqueurs de surface des cellules T et des APC afin d'avoir une expression optimale et similaire au cours du temps. Cela nous a également permis de suivre la dérive de ces marqueurs à la surface cellulaire et ainsi procéder à une décongélation d'un nouveau lot de cellules (typiquement toutes les 3 ou 4 semaines). Les cellules ont été passées sur un cytomètre LSR II de la marque BD biosciences avec 3 lasers λ : 355 nm, 488 nm et 633 nm tout d'abord au CIML puis sur la plateforme cellulaire du LAI où nous avons adapté nos fenêtres de détection afin d'avoir les mêmes réglages.

Nous avons spécifiquement étudié l'expression :

- Des marqueurs CD3 et CD45 pour les lymphocytes T. Nous avons aussi ponctuellement vérifié l'expression de CD4. Utilisant un co-marquage, nous avons préalablement vérifié que les spectres des fluorochromes couplés aux anticorps utilisés respectivement, PE et Alexa Fluor 647 ne se chevauchent pas et ainsi de ne pas à avoir à faire des compensations des signaux de fluorescence.
- Le MHCII sur les APC modèles par marquage avec un anticorps anti-MHC II-FITC.

Les protocoles de marquage pour les expériences de cytométrie en flux sont présentés ci-dessous :

3.2.1. Lymphocytes 3A9m et MEGF10 ::EYFP

- Compter les cellules à l'aide d'une lame de Malassez
- Centrifugez les cellules à 1500 rpm 5 minutes
- Mettre 10^6 de cellules dans 200 μ L de PBS 1X et procéder au marquage
- Marquage 30min à 4°C de 200 μ L de cellules avec un anticorps anti-TCR (H57-PE) (Ci=0.2mg/ml 1/100^e), et un anticorps anti-CD45 (H193-Alexa Fluor 647)

Matériel et Méthode

(Ci=1mg/ml), (1/200^e)

- Aspirer le surnageant et mettre 400 μ L de PBS 1x et répéter 1 fois
- Passer les cellules au cytomètre

3.2.2. Cellules présentatrices COS APC

- Décoller les cellules avec de l'EDTA 0.53mM (protocole de culture cellulaire) ou Trypsin /EDTA (voir le chapitre 5 résultat section 3 page 160) pour une discussion sur ce point précis)
- Compter les cellules à l'aide d'une lame de Malassez
- Centrifuger les cellules à 1500rpm pendant 5 minutes
- Mettre 10⁶ de cellules dans 200 μ L de PBS 1X et procéder au marquage
- Marquage 30minutes à 4°C de 200 μ L de cellules avec un anticorps anti-MHC II (BD Pharmigen FITC mouse α -mouse IA[k] Ci=0.5mg/ml 1/200^e)
- Centrifuger les cellules à 1500rpm pendant 5 minutes afin d'éliminer les anticorps en solution.
- Aspirer le surnageant et mettre 400 μ L de PBS 1x et répéter 1 fois
- Passer les cellules au cytomètre. Les cellules n'étaient pas fixées car nous avons réalisé les mesures au cytomètre dès la fin du marquage.

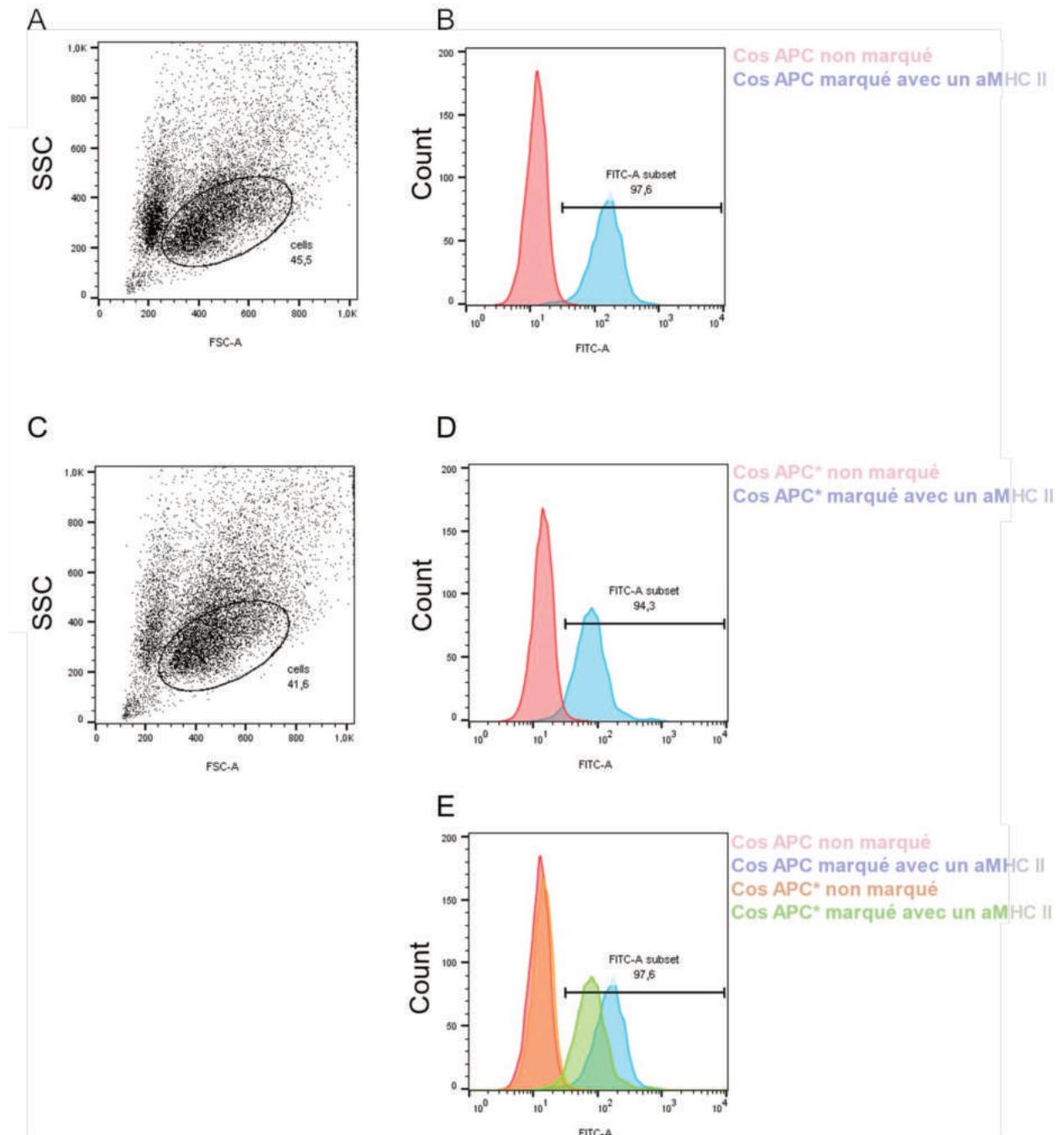


Fig. 4.8 : A : Cytogramme des COS APC avec avec sélection des cellules analysées (gate) B : marquées avec un anticorps anti-MHC II FITC. C : Cytogramme des COS APC* avec sélection des cellules analysées (gate) D : marquées avec un anticorps anti-MHC II FITC. E : Superposition des deux populations (panel du bas) où l'on constate une différence d'expression de MHC II entre ces deux lignées.

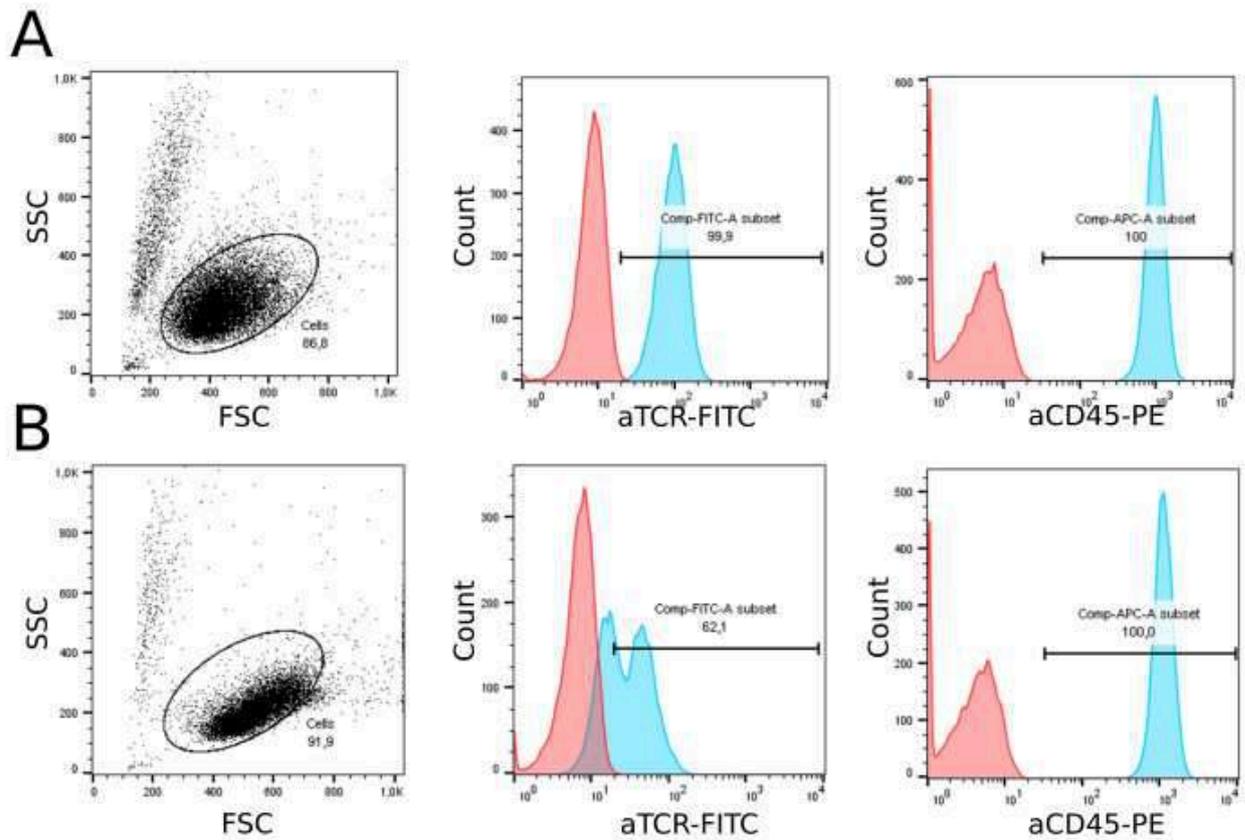


Fig. 4.9 : Dérive de l'expression du TCR, A : Cytogrammes de 3A9m marquées avec un aTCR FITC (panel milieu) et aCD45-PE (panel de droite). B : idem avec le même batch de cellules 3 semaines après. L'expression du TCR a dérivé et nécessitera de décongeler une nouvelle ampoule. L'expression de CD45 est stable au cours du temps.

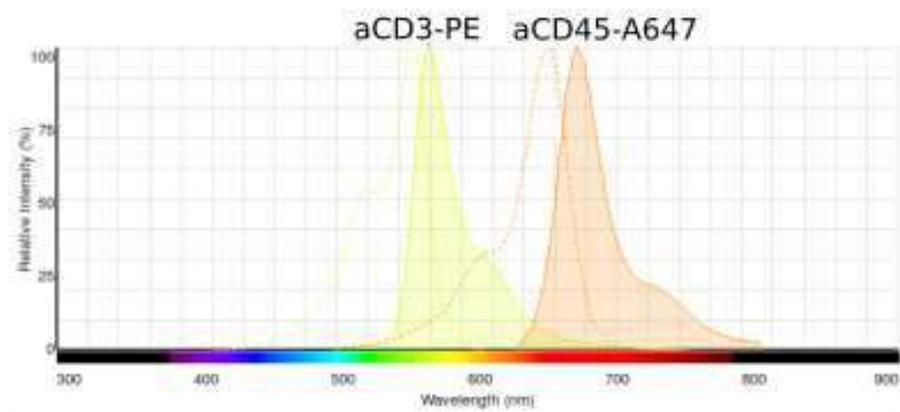


Fig. 4.10 : Exemple de résultats d'un générateur de spectre des fluorochromes d'intérêt utilisés pour le marquage des lymphocyte T. En jaune le spectre d'excitation (ligne pointillée) et d'émission (ligne pleine) pour PE (anti-CD3) et en rose le spectre d'excitation (ligne pointillée) et d'émission (ligne pleine) pour AlexaFluor647 (anti-CD45).

3.3. Analyse en cytométrie en flux

Les cytogrammes ont été analysés avec le logiciel Diva (BD Biosciences) permettant d'obtenir différentes caractéristiques cellulaires : taille et granularité qui sont un résultat indirect de la viabilité cellulaire et le pourcentage de cellules marquées en fluorescence. En effet, une cellule morte présentera une granularité plus importante. Les fenêtres ont été déterminées une première fois après une calibration et ont été maintenues le plus possible au cours du temps. Cette analyse a été effectuée de manière routinière par M. Pélicot-Biarnes, qui effectuait aussi les expériences de cytométrie.

4. Protocole de production d'Ac monoclonaux

Les anticorps utilisés pour cette étude ont été produits à partir de la collection d'hybridomes du CIML (anti TCR H57.597, anti CD3 2C11, anti CD4 GK 1.5, anti CD45 H193.16.3, anti MHC II 10.3.6). Les cellules ont été cultivées de façon routinière dans un milieu de culture complet (DMEM, sérum de bovin fœtal à 10 % (FBS), pyruvate de sodium 1mM) avant de passer à la phase d'expansion et de production. Des hybridomes ont ensuite été cultivés dans du DMEM avec une concentration décroissante de sérum fœtal appauvri en immunoglobulines bovines (Thermo Fischer Scientific) jusqu'à 0,5 %. Les cellules ont ensuite été maintenues en culture pendant 5 jours supplémentaires pour permettre la sécrétion d'immunoglobulines avant la collecte des surnageants et la purification des anticorps selon les procédures standard.

5. Tri des cellules

Le tri s'effectue sur un trieur Aria (Becton Dickinson). Il repose sur un marquage suivi de la séparation des cellules en fonction de l'expression des marqueurs d'intérêt.

- S'assurer que la confluence des cellules est optimale (<80% ou milieu non acidifié pour les cellules non adhérentes)
- Récupérer les cellules (éviter la trypsine pour les cellules adhérentes)
- Centrifuger les cellules (en général 200g, 5 min, 10°C)
- Resuspendre les cellules en milieu DMEM F12 w/o red phenol (gibco, ref 21041025),

Matériel et Méthode

1% Nutridoma-SP (Sigma/Roche, ref 11-011375-001)

- Ajuster les cellules à 1 à 2×10^6 cellules/ml
- Si nécessaire faire un marquage de surface de préférence avec un Fab (éviter l'aggrégation de molécules et le déclenchement de voies de signalisation)
- En règle générale, on utilise une concentration saturante d'anticorps (2.5 à $5 \mu\text{g/ml}$, 1h, 10°C)
- Prévoir des contrôles négatifs pour les compensations (cellules non fluorescentes et chaque marquage individuel).
- Centrifuger les cellules (200g, 5 min, 10°C)
- Resuspendre les cellules en PBS1X à 1×10^6 cellules/ml pour les cellules adhérentes
- Resuspendre les cellules en DMEM F12/N à 2.5×10^6 cellules/ml pour les cellules en suspension

Dans tous les cas, garder les cellules sur la glace, en attendant le tri

Il y a deux modes de récupération

- Soit en tube FACS 5 ml (Falcon, ref 352054)
- Soit, couplé au tri, un clonage avec un dispositif de plateau mobile où les évènements triés sont déposés dans une plaque de culture (24/48/96/192puits) « autoclone »
- Préparer le milieu de collecte des cellules triées (milieu de culture où le pourcentage de sérum est doublé par rapport aux conditions de culture courantes, ajouter pénicilline/streptomycine (Gibco, ref : 15140.122) au 1/10 (concentration finale Pen : 1000U/ml , Strep. : $1000 \mu\text{g/ml}$). Les tris sont réalisés en conditions semi-stériles.
- Suivant le type de tri, préparer des tubes FACS 5ml avec 1ml de milieu de récupération, ou des plaques 96 puits (avec $100 \mu\text{l}$ de milieu de récupération) pour le tri en autoclone

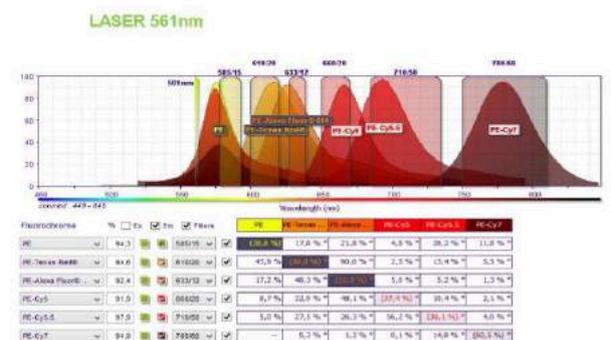
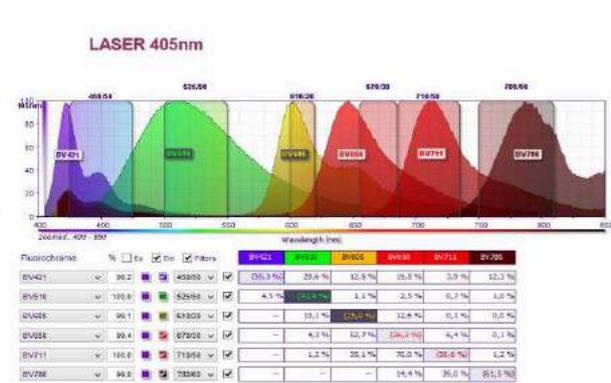
Trieur Becton Dickinson, Trieur Aria Illu



Aria Illu (Trieur)

19 paramètres:
- FSC
- SSC
- 17 Birescences

Laser	Détecteurs	Violet 405 nm 30	Blue 488 nm 20	Green 561 nm 50	Red 633 nm 20	Fluorochromes au choix
B-SSC	C		488/10			SSC
B-FITC	B		502LP 530/30			FITC/Alexa 488/EGFP/CFSE/Fluo-4
B-PerCP-Cy5.5	A		670LP 695/40			PerCP-Cy5.5/PerCP*/Sytox green*
V-BV421	F	450/50				Pacific Blue/V450/eFluor450/Vivid/Live Dead Fixable
V-BV510	E	505LP 525/50				BV510/V500/PacOrange/Sytox Blue/Aqua Dead
V-BV605	D	595LP 610/20				BV605/QuDot 605/ BV570*
V-BV650	C	630LP 660/20				BV650/QuDot 655
V-BV711	B	670LP 710/50				BV711
V-BV785	A	750LP 780/60				BV785
R-APC	C				660/20	APC/Alexa647/Cy5/To-pro-3
R-Alexa700	B				675LP 730/45	Alexa700
R-APC-Cy7	A				735LP 780/60	APC-Cy7/APC-H7/APC-Alexa 750/APC-eFluor780
G-PE	F			570LP 585/15		PE/Td Tomato/DrRed
G-610-20	E			595LP 610/20		PE-TexasRed/PI/PE-CF594/mCherry
G-630	D			620LP 630/30		PE-Alexa610/PI
G-PE-Cy5	C			640LP 660/20		PE-Cy5/7-AAD
G-PE-Cy5.5	B			665LP 710/50		PE-Cy5.5/PE-Alexa700
G-PE-Cy7	A			735LP 780/60		PE-Cy7



L'utilisation du trieur, en tant que tel, est assurée exclusivement par un opérateur de la plateforme de cytométrie du CIML selon un protocole et une demande d'utilisation définis à l'avance.

Exemple de feuille de demande de tri

Demande de tri

Date de la demande : 08/11/2017

Equipe : HTH Nom-utilisateur : HAMON Tel (poste) : 9457

Date de tri souhaitée dans l'ordre :

1	05/12/2017	2	06/12/2017	3	07/12/2017	4
---	------------	---	------------	---	------------	---	-------

Cellules à trier : nom : mCD4

Méthode d'enrichissement : Tri-en-plaque-pour-clonage-1-à-5-cellules-puits/96

Origine : cellules primaires → ou → lignées immortalisées

Homme → souris → infectées → transfectées

Si homme sérologie :

--date :

--résultats :

Si cellules infectées, avec quel micro-organisme ?

.....

Si cellules transfectées, avec quel vecteur ?

pEGFP-N2-ou-pTagBFP2-ou-mcherry

Types de marquages utilisés :

Antigène	Fluorochrome	Pic d'émission en nm
ABCG1	TagBFP2	430
MEGF10_GFP_GPI	EGFPm	488
anti-TCR	alexa-647	647
mcherry	560
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

..... Saut de page

Matériel et Méthode

Tri-en-facsflow : oui non → Tri-en-PBS : oui → non
 ... (apporter 5 litres la veille au soir de PBS-EDTA-Hépes)

Tri-en-autoclone : oui non

Nombre approximatif de cellules à trier : (= événements à passer)

Nombre d'échantillons : (apporter 15 ml d'eau distillée + EDTA)

Nombre de populations à trier par échantillon : (cocher le nombre choisi)

1 voie → 2 voies → 3 voies → 4 voies

Décrire les populations à trier et le % pour chaque voie :

P1	FP positivité	P2	TCR-pos (H57-alexa-647)
P3	****	P4	****

Nombre de cellules minimum à récupérer :

Type de tubes de récupération :

1 ml → 5 ml → 15 ml

Date de la dernière demande de tri identique : 19/10/2010

Joignez, par courriel, le pdf de votre demande de tri avec ce formulaire.

Suivant le type de population souhaitée à la suite du tri, on optera pour

- Un tri en tube pour une population polyclonale (type bulk).
- Une population oligoclonale, on choisira un tri en autoclone à 5 cellules par puits
- Une population monoclonale, tri à 1 cellule par puit (prévoir plusieurs plaques 96 puits, mortalité importante)

Vérifier tous les jours la viabilité et l'expansion de la population cellulaire. Adapter à la population triée désirée une méthode de criblage adapté (microscopie/cytométrie).

En fonction de la clonalité des populations obtenues, il est à envisager plusieurs cycles de tri/expansion pour stabiliser l'expression d'un transgène. En particulier dans les populations monoclonales, il faut absolument veiller à ne pas sélectionner un seul clone, le risque de populations cellulaires « monstrueuses » est alors très élevé.

En règle générale, on choisit dans un premier temps d'analyser une population polyclonale, d'un point de vue fonctionnel, pour ensuite éventuellement trier différents clones indépendants montrant les mêmes propriétés que la population hétérogène.

6. Couplage de fluorochromes

200µL (environ 100µg) de solution d'anticorps ou de polylysine 0.01% ont été mélangés à 20µL de solution de bicarbonate de sodium 1M (pH entre 8,0 et 8,5). Le rapport molaire dye libre/protéine a été fixé à 3:1. Après 1h d'incubation à RT sous agitation constante, les colorants non couplés ont été séparés des anticorps marqués par chromatographie d'exclusion de taille (sur colonnes séphadex G25 PD10 (VWR, ref : 17-0851-01) suivie d'une dialyse (Slide-A-Lyzer, Thermofisher scientific, ref 66333), contre PBS 1x pendant la nuit à 4°C). Une dernière dialyse d'une heure supplémentaire contre PBS 1x, a été réalisée pendant 1 heure à 4°C. La concentration et l'efficacité de marquage ont ensuite été évaluées à l'aide de la technologie Nanodrop (NanoDrop ND-1000). Le rapport dye/ protéine obtenu se situait généralement entre 0,5 et 0,95. (par suite du calcul utilisant la loi de Beer Lambert et les valeurs d'absorbance et le coefficient d'extinction du fluorochrome).

7. Microscopie à Force atomique

7.1. Principe

La microscopie à force atomique (en anglais Atomic Force Microscopy, AFM) a été inventée en 1986 par Gerd Binnig, Calvin Quate et Christoph Gerber (181). C'est un type de microscopie permettant de faire des images à très haute résolution car il utilise une sonde locale. L'AFM dérive du microscope à effet tunnel (en anglais Scanning Tunneling Microscope, STM) inventée par Gerd Binnig et Heinrich Rohrer qui ont reçu le prix Nobel en 1986 pour cette invention.

L'AFM utilise une pointe fine (en anglais tip) portée sur un ressort (en anglais cantilever) qui est utilisée pour scanner par déplacement par cales piézoélectriques la surface comme on lirait en Braille. C'est une microscopie qui lit la topographie de la surface et qui fournit donc un accès à la rugosité, à la hauteur des objets déposés, avec des résolutions (x,y) de l'ordre du nm et z à mieux que le nm pour des échantillons plats, de l'ordre de quelques nm pour des cellules.

Le mouvement du cantilever est quant à lui enregistré à l'aide d'un faisceau laser infrarouge qui est positionné sur le cantilever et dont la réflexion est envoyée sur un capteur constitué d'un quadrant de photodiodes. Ainsi donc, lorsque le tip et par extension le cantilever subi une déflexion cela fait varier la réflexion du laser qui se déplace sur le capteur.

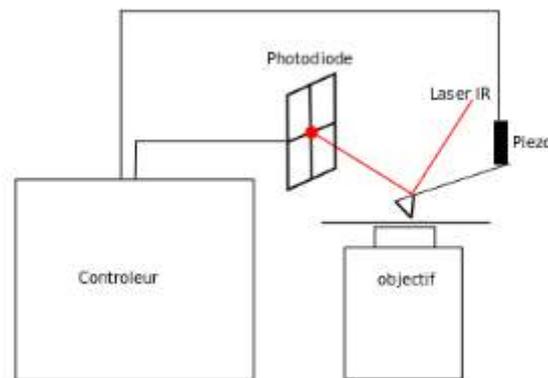


Fig. 4.11 : Principe simplifié de la microscopie à force atomique (AFM) montée sur un microscope optique inversé, le laser IR est positionné sur le ressort et est réfléchi sur la photodiode permettant ainsi de suivre le mouvement du cantilever.

En biologie, L'AFM peut être utilisé en 2 modes :

- Mode dit Imagerie : le tip reste en contact de la surface et/ou échantillon et permet la reconstitution d'une image de très haute résolution (de l'ordre du nanomètre). Différentes techniques existent pour obtenir cela (mode contact, mode intermittent, ...). Nous n'avons que ponctuellement utilisé l'imagerie, donc nous ne la détaillerons pas plus. Pour une introduction, on pourra se référer à (182). On donnera un exemple d'imagerie appliquée au présent projet dans le chapitre des résultats section 2 (page 139)
- Mode dit Spectroscopie de force : le tip vient au contact de l'objet à la surface et vient appuyer à une force donnée et ensuite s'éloigne de la surface. Ce mode peut être utilisé pour étudier les propriétés des molécules uniques mais aussi à des échelles plus macroscopiques à l'échelle cellulaire.

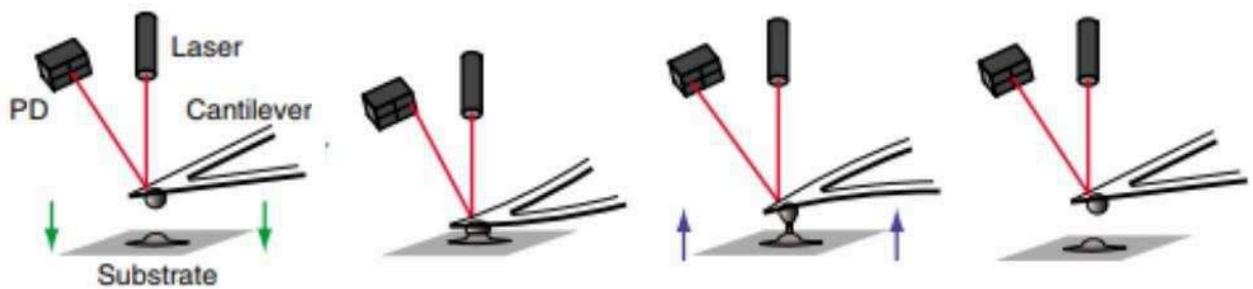


Fig. 4.12 : Exemple du mouvement du ressort en mode spectroscopie de force lors de l'approche (flèches vertes) d'une cellule sur une surface, de la mise en contact et du retrait de la surface (flèches bleues). **Fig.**ure adaptée de (183).

Lors de ce travail de thèse nous avons majoritairement utilisé l'AFM en mode spectroscopie de force afin de mesurer les propriétés mécaniques des deux partenaires cellulaires. L'utilisation de ce mode d'AFM a permis de mesurer des forces en molécules uniques comme par exemple l'interaction de LFA1/ICAM (184), de l'intégrine VLA-2 avec le collagène de type 1 afin de comprendre l'interaction avec la matrice extracellulaire (182). La résolution de force que l'on peut appliquer varie de 10^{-2} à 10^2 nN conférant ainsi à cette technique un spectre très large d'objets d'études (185), (186), (187).

Nous nous intéressons dans ce travail à des cellules qui sont vivantes et fragiles, c'est pourquoi la variation de force que nous allons utiliser est faible de 0.25nN à 1nN afin de ne pas les endommager ou tuer.

Notre système est un JPK Nanowizard 1 (JPK Instruments), qui possède en mode force spectroscopie un mode « boucle fermée » (close loop) sur un élément piezoélectrique ayant une amplitude de déplacement de $15\mu\text{m}$. L'AFM repose sur un microscope Axiovert 200 équipé d'un système de fluorescence Colibri 2 diode illumination system (Zeiss, Oberkochen, Germany) et une caméra CoolSnap HQ2 (Photometrics, Tucson, AZ, USA).

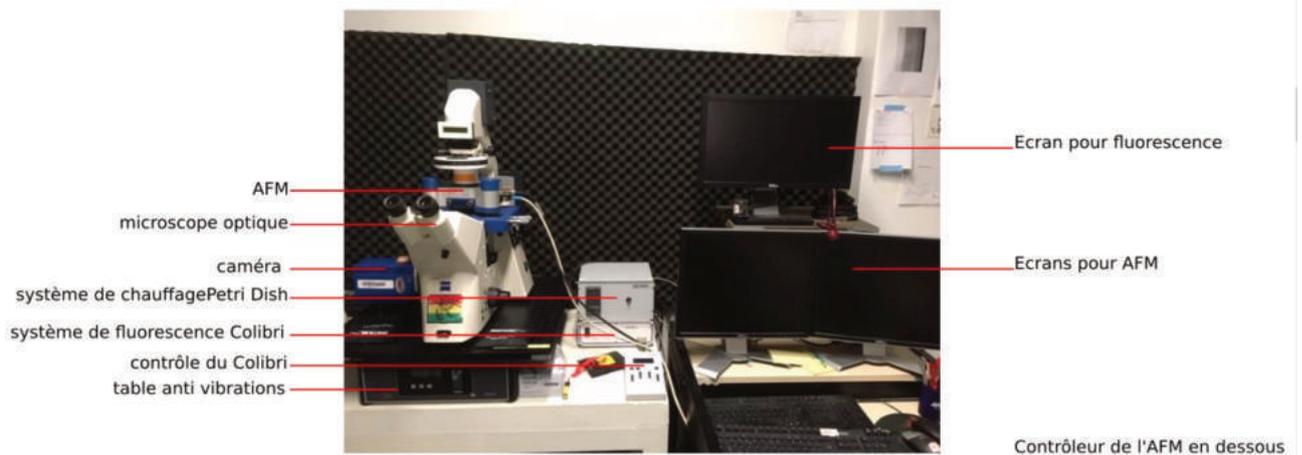


Fig. 4.13 : notre système expérimental couplant la microscopie à fluorescence et l'AFM.

7.2. Calibration

Le cantilever possédant un tip est un ressort. La déflexion du ressort est directement proportionnelle à l'interaction entre l'indenteur et l'échantillon. Deux mesures sont nécessaires afin de convertir le signal reçu sur le photo-détecteur (V) en une valeur de force (N). Cette calibration est une étape clef pour les mesures de force qui sont au cœur de notre travail. Nous détaillons ci-dessous notre méthode « traditionnelle » basée sur des fonctions implémentées dans le logiciel de contrôle de notre AFM. Très récemment, des méthodologies plus complexes ont été proposées pour améliorer la reproductibilité de cette étape (188) mais n'ont pas encore été implémentées chez nous.

La première étape consiste à acquérir une courbe de force de référence sur une surface très dure, de l'ordre du GPa (par exemple du verre). Cela va permettre de calibrer la distance de déflexion du ressort en fonction du changement de voltage sur la photodiode, il s'agit de la valeur de sensibilité (nm/V). Cette dernière dépend du type de ressort utilisé mais aussi du chemin optique du laser de détection de l'AFM. En effet, cette valeur peut varier si le ressort est monté sur différents instruments. Une fois que la déflexion réelle du cantilever, notée ici x , est connue, la constante de rigidité " k " (pN/nm) est la seconde valeur nécessaire afin d'obtenir une valeur de force. Cela étant possible en utilisant la loi de Hooke :

$$F = kx$$

Il existe différentes méthodes afin de calibrer la constante de rigidité "du ressort. Le fournisseur donne une constante de rigidité mais il est nécessaire de faire une calibration avant chaque expérience. La méthode que nous allons décrire repose sur la mesure du bruit thermique (189). Nous avons utilisé cette technique à chaque fois tout au long de ce travail de thèse.

Les fluctuations de l'environnement, que ce soit dans l'air ou dans un liquide, créent des petites impulsions de force, comme par exemple, la diffusion de petites particules dans un mouvement Brownien. Les ressorts souples sont sensibles aux fluctuations thermales et l'AFM peut être utilisé pour mesurer et analyser ces mouvements.

La mesure de k repose sur l'analyse des fluctuations dans un milieu de viscosité donnée (ici prise égale à celle de l'eau), à une température donnée (adaptée à l'expérience), avec une inclinaison du levier donnée (10°) et sur un mode de fluctuation donnée (ce qui entraîne l'utilisation d'une constante de correction pour le mode utilisé, implémentée dans le logiciel de l'AFM, typiquement 0.817 sur le premier pic et 0.251 sur le deuxième pic), (**Fig.** 13).

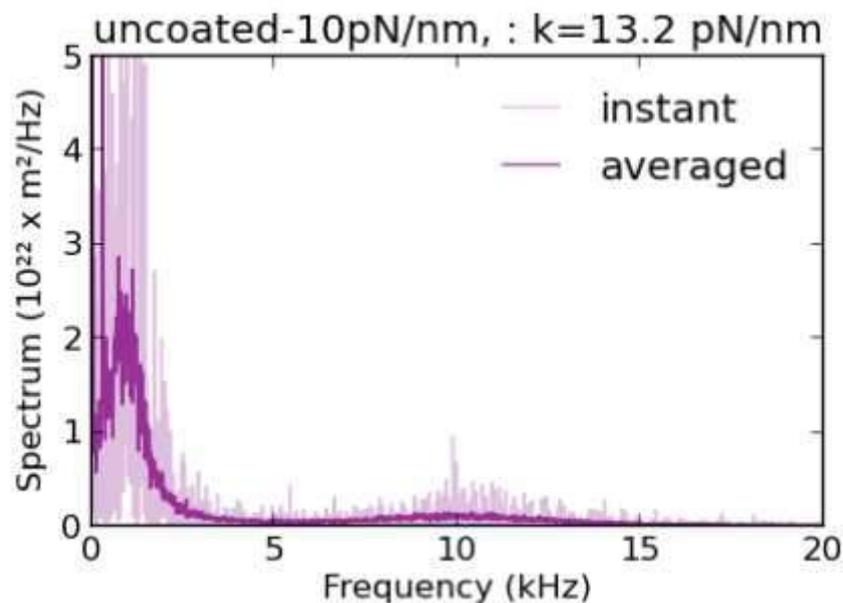


Fig. 4.14 : Spectre de la fréquence de résonance d'un cantilever triangulaire MLCT (Bruker) à 200 μ m au-dessus de la surface. On peut observer les deux premiers pics qui vont permettre une calibration fine du bruit thermique par ajustement avec un modèle ad hoc (fonction de Lorentz)

7.3. Paramètres expérimentaux des mesures du module de Young cellulaires

Une fois les cellules adhérees à 25°C ou 37°C 5 % CO₂ et rincées pour éliminer les

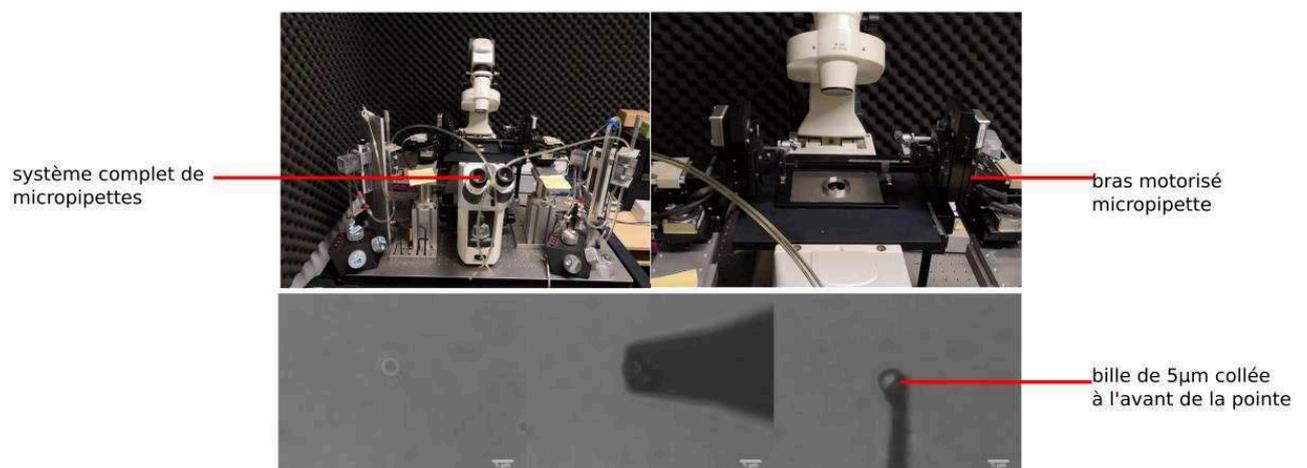
Matériel et Méthode

cellules ayant une adhésion faible et partielle, la boîte de Petri (WPI Instruments, FluoroDish Cell culture treated) est montée dans la chambre à température contrôlée (PetriDishHeater, JPK Instruments, Berlin, Germany). Une bille de verre d'un diamètre de 5 μm a été collée avec une colle polymérisable aux rayons UV (Dymax OP-29) par micro-manipulation à un cantilever MLCT de forme triangulaire.

Pour ce faire, le cantilever est tenu par un levier et contrôlé par le moteur de la micropipette de droite et on vient le tremper dans de la colle optique polymérisable aux UV (OP-29) qui est présente sur une lamelle de verre. Le contraste de la colle avec la lumière blanche permet de distinguer l'interface air/colle et nous permet ainsi de tremper juste la pointe dedans. Pour éviter de laisser trop de colle sur le cantilever on laisse la pointe au contact avec le verre et on la déplace de quelques millimètres afin d'« essuyer » les excédents de colle.

Ensuite, on sélectionne grâce à la micropipette de gauche une bille au diamètre souhaité et on fait en sorte que cette bille soit isolée pour éviter de coller les billes situées trop proches de la bille d'intérêt. On vient placer le cantilever au-dessus de la bille avec précaution, le cas idéal étant que l'on n'ait pas à repositionner la bille ultérieurement et ainsi polluer la surface de contact avec de la colle, on reste quelques secondes au contact puis on remonte lentement de quelques millimètres le cantilever. Si la bille a collé elle apparaîtra défocalisée par rapport à la surface.

On augmente la puissance de la lumière blanche afin de commencer le processus de polymérisation de la colle pendant 5-10 minutes. Après ce délai on vérifie que la bille soit toujours collée sur le cantilever, on peut alors récupérer celui-ci et le mettre au four à UV pendant 40 minutes.



Nous avons également vérifié que le fait de coller une bille sur un cantilever ne modifiait pas ses propriétés de fréquence et sa constante de raideur.

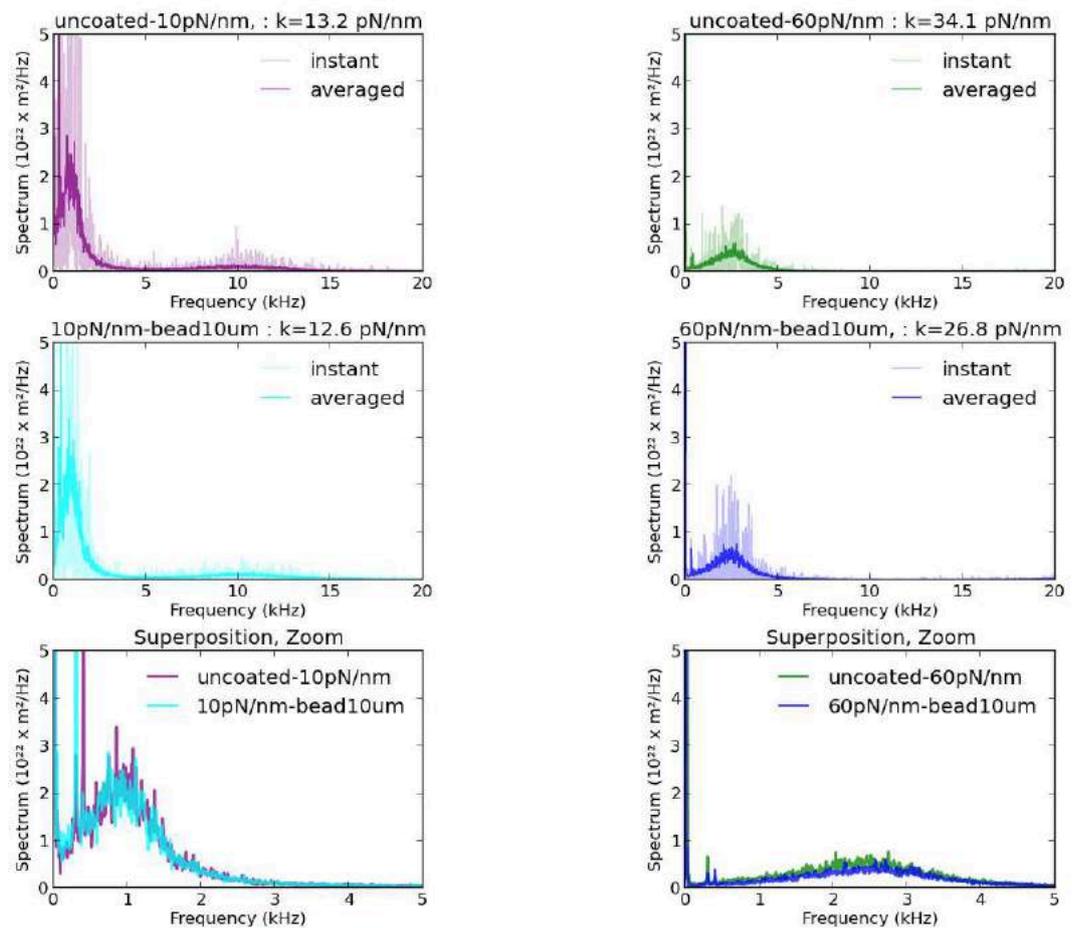


Fig. 4.16 : Comparaison des spectres de fréquences de deux cantilevers MLCT-UC sans bille (panel du haut) ou avec une bille collée de $10\mu\text{m}$ de diamètre (panel central), superposition des spectres (panel du bas) où l'on constate que la présence de la bille n'entraîne pas de modification lors de la calibration du bruit thermique.

Cette mise en place permet de mesurer les propriétés mécaniques cellulaires en utilisant des échelles de micro-indentation du même ordre de grandeur. L'AFM modifié est calibré in situ avant les expériences et en utilisant la méthode du bruit thermique. Les valeurs mesurées sont implémentées dans le logiciel de contrôle JPK SPM et sont compatibles avec les valeurs de références fournies par le constructeur (10 nN/ μm). Les vitesses d'approche et de rétraction sont identiques et de $2\mu\text{m}/\text{s}$ sur une distance de $3\mu\text{m}$ pour la calibration et $7\mu\text{m}$ pour les expériences. La force maximale typique appliquée varie entre 500pN et 1nN en fonction des conditions.

La fréquence d'acquisition des points est de 2048 Hz.

7.4. Traitement des données

Les courbes de force ont été traitées avec le logiciel fourni par JPK "JPK Data Processing" (JPK DP) ou bien des fonctions de calcul et/ou de visualisation en Python utilisant un export texte des données brutes, réalisées par JPK DP.

A partir d'une courbe de force on peut extraire plusieurs paramètres tels que :

1a. Lorsque l'on appuie avec une pointe pyramidale ou portant une bille : le module élastique ou module de Young, le modèle peut être appliqué à différentes indentations, il est toutefois important de vérifier que le fit (concordance/correspondance) soit le plus confondu que possible avec le point de contact afin d'obtenir une valeur robuste.

1b. Lorsque l'on effectue un contact ente objets : la pente du contact qui correspond à la constante élastique (de ressort) du couple constitué de deux objets (bille/cellule ou cellule/cellule)

Ces deux premières mesures se réalisent sur la courbe d'aller de la courbe de force (Fig. 4.17 A)

2. Lorsque le temps de contact est non nul : la relaxation de contrainte de la ou des cellules, c'est-à-dire le retour à l'état basal de la cellule avant appui ou à la dissipation totale de l'énergie suite à une contrainte (Fig. 4.17 C).

3. S'il y a adhésion : la force maximale de détachement entre 2 cellules, dans ce cas précis entre un lymphocyte T et une APC présentant ou non un peptide via son MHC II.

4. S'il y adhésion : le nombre d'événements moléculaires et leur amplitude : lors de la séparation entre deux cellules à une vitesse faible on peut voir différentes échelles/étapes de détachement.

Ces deux derniers paramètres sont mesurés sur la courbe de retour de la courbe de force (Fig. 4.17 B).

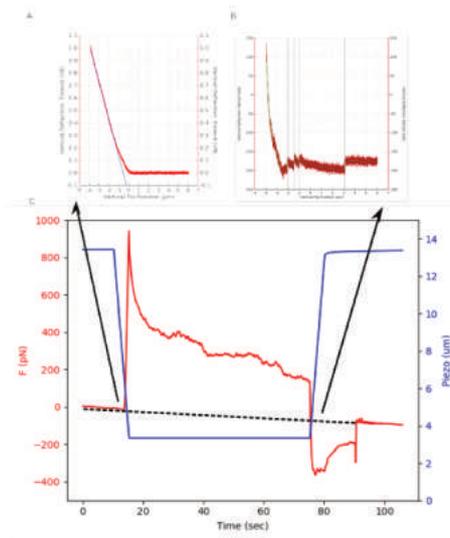


Fig. 4.17 : Courbe de force obtenue avec le logiciel JPK Data Processing, en A : rouge vif la courbe d'approche qui correspond au mouvement du cantilever vers la surface/cellule et qui va être au contact jusqu'à atteindre une force de 500pN. En B : rouge bordeaux, la courbe de rétraction qui correspond au mouvement inverse du cantilever. C : visualisation d'une courbe force = f(temps) en rouge avec ici un temps de contact de 60 secondes et la courbe correspondant au mouvement du piezo, en bleu, qui est en mode « constant height ».

7.4.1. Mesures de module élastique

Après avoir vérifié que les valeurs de calibration étaient correctes et que les courbes étaient exploitables à savoir une ligne de base bien marquée et un point de contact identifiable, on applique le modèle de Hertz qui permet de décrire la mise en contact de deux sphères de rayons différents.

Ce modèle permet d'utiliser les contraintes localisées au point de contact de deux sphères ce qui va créer une légère déformation due aux forces appliquées. La déformation dépend de l'élasticité du matériau en contact aussi appelé module de Young.

Nous créons un contact dans cette étude une bille et une cellule ou entre deux cellules. Chaque partenaire possède un rayon différent ce qui permet de remplir les conditions d'utilisation du modèle de Hertz, le rayon de la bille étant choisi comme plus petit que celui de la cellule, on obtient une équation simplifiée :

$$F = \frac{4\alpha^3 E}{3R}$$

Où E^* est le module de Young renormalisé par le coefficient de Poisson "v":

$$E^* = \frac{E}{1-\nu^2}$$

Bien que l'on puisse utiliser ce modèle afin d'en extraire un module élastique d'une cellule certaines hypothèses sont faites : la cellule est supposée être un milieu infini et homogène, incompressible, ce qui conduit à l'utilisation du coefficient de Poisson " ν " à une valeur de 0,5. Dans ce manuscrit, nous présenterons des mesures de E, ce qui est traditionnellement fait en indentation par AFM.

7.4.2. Mesures de forces de détachement ou d'évènements adhésifs

Ces mesures sont réalisées grâce au logiciel JPK Data Procession (JPK DP) qui nous a permis de déterminer la force maximale de détachement nécessaire entre 2 cellules, ici la COS APC et la cellule T en identifiant le point minimum de la courbe de retour par rapport à la position où la force est nulle, dite « ligne de base ».

De plus nous avons pu déterminer le nombre d'évènements adhésifs en ne sélectionnant que les évènements survenant après le point minimum de la courbe retour. Nous avons utilisé l'option de lissage de la courbe (smoothing) afin d'éliminer le bruit. Nous essayons de maintenir ce lissage le plus minimal possible, dans l'analyse des données présentées dans les résultats section 4, et typiquement entre 20 et 25 avec une signifiante de 0.05. Tous les sauts trouvés par le logiciel sont vérifiés visuellement si le fit n'est pas correct cet évènement sera retiré. De plus, on peut déterminer la pente de chacun de ces sauts en choisissant sur quelle distance la pente sera calculée, dans notre cas 50nm. Les derniers évènements de détachement peuvent être des tubes de membrane et peuvent éventuellement être quantifiés car ils présentent une pente nulle ou quasi nulle. Dans les mesures présentées dans le chapitre 5 section 4 (page 167), nous ne faisons pas la distinction des évènements ligand/récepteur et tubes de membrane, nous considérons tous les sauts afin de comparer leur nombre et amplitude entre différentes conditions.

De plus l'utilisation d'un cantilever sans or permet d'éviter une dérive du signal (elle est souvent quasiment nulle si le cantilever est correctement aligné et la température du système est stable) et pouvons également visualiser un objet à travers celui-ci, permettant ainsi un placement plus aisé d'une bille ou COS APC au-dessus d'une cellule T. Notre AFM a un élément piézoélectrique permettant une course du cantilever de 15 μ m qui peut dans certains cas lors du contact d'une COS APC avec une cellule T d'obtenir une courbe de force ne revenant pas au point initial. Ainsi, vu que la dérive est quasiment nulle on peut mesurer

l'adhésion résiduelle entre ces deux objets (voir Chapitre 3 section 4, page 167).

8. Microscopie optique de surface : microscopie de réflexion par Contraste Interférentiel

Outre les microscopies en transmission et de fluorescence classique qui sont couplées à l'AFM décrit ci-dessus et qui sont plus classiques dans le monde de la biologie (et ne seront donc pas présentées en détail dans ce manuscrit), nous avons utilisé une méthode de microscopie dite de surface afin de qualifier l'adhésion de nos cellules sur les substrats de verre décorés et utilisés.

8.1. Principe

Pour étudier les interactions entre les surfaces, il est nécessaire de mesurer avec précision la distance qui les sépare. L'interférence de la lumière est couramment utilisée pour mesurer les petites séparations entre les surfaces. La première application de ce principe remonte à Isaac Newton. Mais la première application aux cellules vient d'Adam Curtis dans les années 1960. Il a utilisé le même principe pour mesurer la distance entre un substrat de verre et la face inférieure d'une cellule vivante y adhérant, sous l'eau et observée au microscope optique. Il a appelé cette technique "microscopie à réflexion d'interférence" ou IRM. Après cette publication, de nombreuses améliorations et perfectionnements ont été apportés à cette technique mais la difficulté majeure de cette technique apparaît rapidement : toutes les mesures basées sur l'interférence reposent finalement sur une connaissance détaillée de l'indice de réfraction de l'objet étudié, et cet indice de réfraction est très variable dans une cellule. Cela signifie qu'en ce qui concerne les cellules vivantes, en l'absence d'informations supplémentaires sur la nature optique d'une cellule, les mesures de distance restent aux mieux qualitatives. De plus, il y a une ambiguïté sur la mesure de la hauteur lorsqu'une seule longueur d'onde est utilisée.

Pour ces raisons, l'intérêt pour l'IRM quantitative s'est lentement éteint et n'a rapidement été utilisé que comme indicateur qualitatif d'adhésion. Néanmoins, une technique connexe appelée "Reflection Interference Contrast Microscopy" (RICM) a été développée en 1980 par Sackmann et ses collaborateurs et appliquée à des surfaces beaucoup plus contrôlées en termes de comportement optique. En effet, le contraste amélioré du RICM (provenant principalement du développement de la technique anti-flex), est parfaitement adapté aux

mesures quantitatives de distances entre des surfaces dont l'une est plane et transparente. L'image obtenue avec cette technique est une matrice 2D d'intensités qui peut être convertie en carte de distance substrat/objet. L'un des intérêts majeurs de cette technique est que la résolution axiale peut aller bien au-delà de la limite optique (jusqu'au nm pour des systèmes très bien définis). L'apparition de caméras rapides et sensibles et le développement de l'informatique ont permis d'utiliser de plus en plus cette technique pour caractériser une variété de phénomènes dynamiques tels que l'adhésion des vésicules, la dynamique des billes colloïdales, la cinétique moléculaire récepteur-ligand et même la description très approximative de l'adhésion cellulaire. Les dix dernières années ont apporté quelques améliorations à cette technique comme l'introduction de l'étude des longueurs d'onde multiples qui permet la détermination absolue de la hauteur.

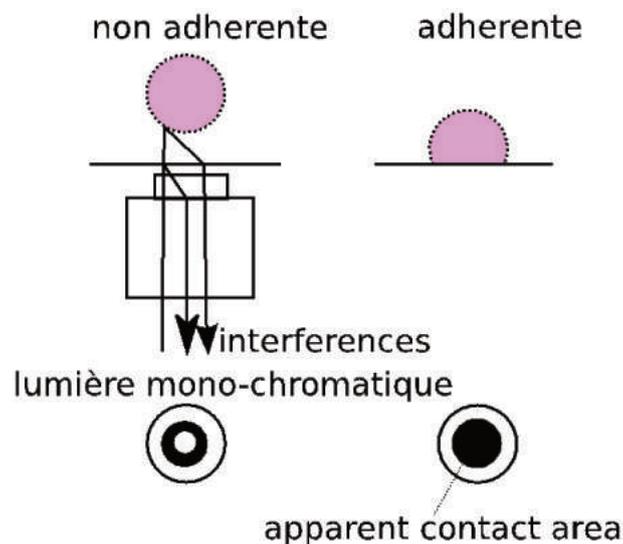


Fig. 4.18 : Principe de la microscopie réfléctive à contraste interférentiel, une lumière monochromatique est réfléchiée et crée différentes interférences en fonction des différentes interfaces rencontrées.

Ces innovations, ainsi que des travaux expérimentaux et théoriques plus anciens, font du RICM une technique très puissante pour étudier les interactions entre surfaces, en particulier l'adhésion. Les avantages sont nombreux : aucun marquage de l'échantillon n'est requis. Facile à mettre en œuvre et bon marché, elle peut être combinée avec plusieurs autres techniques microscopiques, telles que la fluorescence, les pinces optiques ou magnétiques. Mais cette technique reste encore sous-utilisée et sous-développée principalement parce que l'interprétation des données n'est pas simple.

Néanmoins le principe reste simple, on utilise une source de lumière non cohérente qui émet des rayons qui vont passer à travers un filtre passe-bande (vert, bleu ou rouge dans notre cas) et dans un ensemble de diaphragmes (ouverture et champ) et à travers un polariseur. Ensuite,

les rayons lumineux seront réfléchis sur un miroir dichroïque et passeront à travers une plaque quart d'onde qui la polarisera circulairement avant d'être focalisée sur l'échantillon par l'objectif. En raison de réflexions sur différentes interfaces à l'intérieur de l'échantillon, la direction de polarisation sera inversée. En passant une seconde fois la plaque quart d'onde, les polarisations redeviendront linéaires mais cette fois-ci perpendiculaires à la polarisation initiale. Ainsi les rayons lumineux pourront passer à travers le second polariseur (appelé l'analyseur) placé devant la caméra perpendiculairement au premier. Ainsi, toute la lumière réfléchie par l'objet a une polarisation correcte pour passer l'analyseur. D'autre part, toute la lumière provenant de la réflexion interne de l'objectif du tube sera bloquée, améliorant considérablement le contraste.

8.2. Paramètres expérimentaux appliquées aux cellules 3A9m, et Meg

Les cellules sont préparées suivant le protocole ci-dessous, et cela permet de suivre au cours du temps l'aire de contact apparente. Ces informations nous permettent de déterminer l'aire d'étalement maximale en un temps minimum, et par exemple déterminer la polarité cellulaire en utilisant la valeur du quotient isopérimétrique ou de circularité. $f_{circularity} = \frac{4\pi A}{p^2}$ avec A pour l'aire de la zone de contact et le périmètre.

Quand $f=1$ cela signifie que la cellule est circulaire alors que $f=0.5$ la cellule est polarisée et présente une forme elliptique.

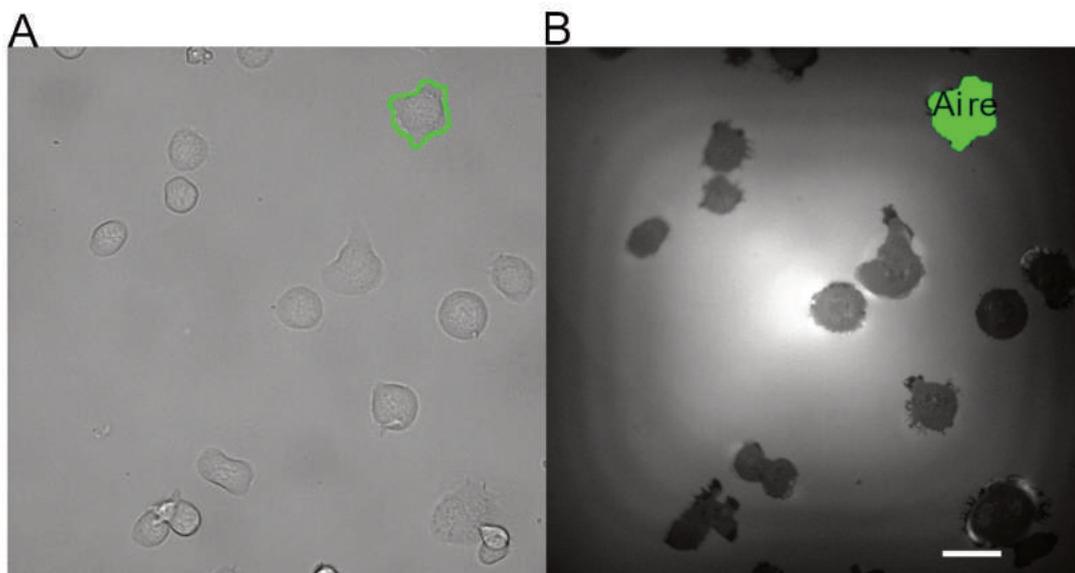


Fig. 4.19 : Mesure de l'aire des lymphocytes T, exemple d'images obtenue en A : lumière blanche, B : RCM où l'on a sélectionné à la main l'aire à mesurer, barre d'échelle= 20µm.

8.3. Traitement des données

Le traitement des données a été réalisé sur ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

L'analyse a été réalisée grâce au logiciel Image J et les aires de contact ont été entourées à la main avec l'outil "freehand selection" ou en utilisant une macro écrite par L. Limozin du LAI, utilisée et décrite de manière extensive dans la thèse de Cristina Gonzales (soutenance Déc. 2018).

9. Microscopie confocale

9.1. Principe

Décrite pour la première fois par Minsky en 1957, la technique d'imagerie confocale de fluorescence représente une avancée technologique importante puisqu'elle permet d'obtenir des images de grande résolution (Winston, 2016) latérale $\sim 160\text{nm}$. Ces images sont comme des coupes "optiques" d'une épaisseur de l'ordre de la centaine de nm, et peuvent être obtenues à différents niveaux dans l'épaisseur d'un échantillon. Basée sur l'élimination des signaux de fluorescence provenant des régions situées en dehors du plan focal, cette technique donne ainsi accès à des informations situées à l'intérieur des cellules.

Un microscope confocal est un système optique où l'illumination et la détection sont limités à un même volume de taille réduite. L'image confocale (ou coupe optique) est ensuite obtenue par le déplacement de ce point de focalisation de la lumière d'excitation dans les trois dimensions de l'échantillon x,y,z .

Depuis le modèle d'étude de Minsky qui utilisait une lumière d'excitation diffuse générée par une lampe, deux évolutions technologiques ont contribué à l'augmentation de la résolution des images confocales :

- L'utilisation d'un laser comme source d'excitation constitue une source de lumière facilement focalisable et l'utilisation d'objectif possédant une grande ouverture numérique (N.A, numerical aperture) permettant ainsi une focalisation de la source lumineuse en un point de taille réduite.

- L'excitation des fluorophores étant limitée au point de focalisation du faisceau laser, le risque de photoblanchiment est réduit.

Le système confocal simple (nous ne développerons pas le bi-photon ou scanning disk) utilise une lumière d'excitation dont la longueur d'onde excite directement le fluorophore. Ainsi, la fluorescence émise peut provenir de toute l'épaisseur de l'échantillon traversée par le faisceau laser. L'élément clé de ce microscope confocal est alors représenté par un iris confocal ou pinhole placé devant le photodétecteur qui élimine la fluorescence provenant des régions non focales. Pour observer des signaux fluorescents il est nécessaire d'avoir (valable pour tous les types de microscopie en fluorescence) : i) une source de lumière pour l'excitation (laser, lampe HBO, diodes LED), ii) un fluorophore, iii) des filtres pour séparer les photons d'émission des photons d'excitation, iv) un détecteur qui enregistre l'émission de photon et transforme ce signal lumineux en signal électrique ou en image photographique. Pour la microscopie confocale, la lumière d'excitation est délivrée par un laser et la détection est assurée soit par une caméra CCD haute sensibilité soit par des photomultiplicateurs.

9.2. Applications de la microscopie confocale à notre projet

9.2.1. Imagerie calcique et technique MAAACS

Nous avons utilisé la microscopie confocale pour l'imagerie calcique sans force, lorsque nous avons testé l'effet des différentes molécules sur l'activation. Pour cela 3 microscopes différents ont été utilisés Zeiss LSM 510, Zeiss LSM 780 et Zeiss LSM 880. Nous avons utilisé le laser argon à une longueur d'onde $\lambda = 488$ nm afin d'exciter la sonde calcique PBX avec un miroir dichroïque et un filtre Long Pass 505 nm. Etant donné le temps d'acquisition assez long (entre 15 et 60 minutes pour les réactivations) il était essentiel de limiter le photoblanchiment et la phototoxicité nous avons réduit la puissance du laser au maximum, en général en dessous de 2%, et avons augmenté le gain, tout en vérifiant avec l'outil « palette » du logiciel Zen (Zeiss) que nous avions un bon ratio signal/bruit, nous prenions une image toutes les 7 secondes en fluorescence et en lumière blanche. Le but étant dans le cas des mesures calciques de mesurer simultanément la variation d'amplitude de fluorescence de beaucoup de cellules, une haute résolution n'était donc pas nécessaire. Pour cela nous avons utilisé un objectif 40x avec une ouverture numérique de 1,2 et à immersion à eau. Nous n'étions pas à proprement parler en mode confocal, le pinhole était réglé sur 4 Airy Units. Cette approche était nécessaire, d'une part pour limiter le nombre de coupes optiques,

et minimiser le photoblanchiment des échantillons, et cela permettait dans certains cas de détecter un grand nombre de cellules situées à différentes altitudes par rapport au plan focal (cas de cellules 3A9mensemencées sur des monocouches de cellules COS APC).

9.2.2. Imagerie de cellules fixées ou vivantes

Les cellules ont été imagées vivantes ou marquées suivants les protocoles décrits dans ce chapitre dans la section 1 (page 65). Nous avons utilisé 2 objectifs différents 20X NA0.8 et 63X NA 1.4 avec immersion à huile. La taille de l'iris focal était de 40 μ m et avons utiliser les laser 405nm et 488nm avec deux miroirs MBS 405 et MBS 488/561. Pour la détection nous avons utilisé le canal spectral et avons pris une plage de 80nm.

9.3. Traitement des données

Nous avons utilisé ImageJ pour observer les images et quantifier à quelle distance le noyau se situait de la membrane apicale. Nous avons généré des coupes orthogonales pour les cellules sur les patterns et compté le nombre de pas ou slices qu'il y a entre le noyau et la membrane. Avec cette méthode simple, rapide et en connaissant la taille du voxel nous pouvons voir quand la fluorescence émise par le noyau disparaît et combien de couches optiques restent jusqu'à l'obtention de la disparition de la membrane apicale. Nous avons besoin d'avoir une idée globale de la position du noyau, il est vrai qu'il serait intéressant de répéter ces expériences et d'appliquer un traitement plus fin.

10. Photolithographie

10.1. Principe

La photolithographie est une technique de fabrication très employée par l'industrie électronique.

Cette technique consiste à la reproduction en une reproduction d'un masque sur un substrat recouvert d'une couche de résine photosensible. Cette dernière est composée généralement de polymères thermoplastiques, et est déposée par centrifugation en un film mince, de quelques

micromètres, et uniforme. Après l'enduction du substrat, un aligneur permet, comme son nom l'indique, d'aligner le substrat et le masque. Cette étape est critique à la réussite de la technique. Ensuite, il y a une phase d'exposition au cours de laquelle la résine est soumise à un rayonnement UV. Le développeur permettra de révéler la partie du substrat à structurer.

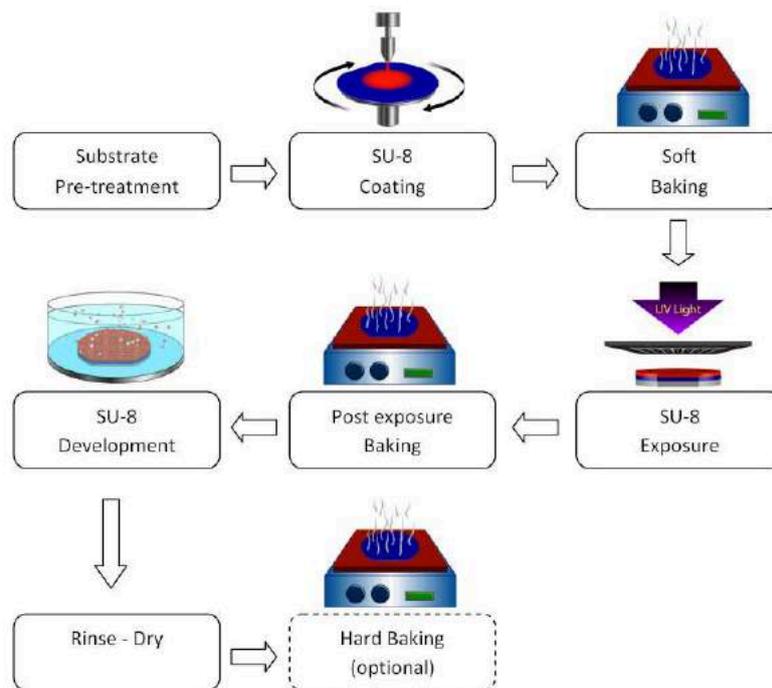


Fig. 4.20 : principe de la photolithographie, la galette de silicium est enduite de résine SU-8 répandue grâce à un spincoater puis cuite et exposé aux UV afin de former les motifs désirés, recuite et enfin développer. (Figure société eyeflow microfluidics)

10.2. Caractéristiques des galettes de silicium utilisées

Le masque a été prêté par le Dr. O. Théodoly (LAI). Des masques secondaires ont été dessinés par PH Puech et réalisés par une société extérieure ; les masters issus ont été réalisés par L. Aoun (LAI) au LOF (Bordeaux) et C. Gosse (Marcoussis).

Les galettes de silicium proviennent de Siltro'nix et présentent les caractéristiques suivantes :

- Specification: Prime Cz, Diamètre: 4 " ($100 \pm 0,3\text{mm}$)
- Type et doping : Aucun
- Orientation : $(100) \pm 0,5^\circ$
- Epaisseur : $525 \pm 25\mu\text{m}$
- Surface : 1 face polie

Matériel et Méthode

Les galettes de silicium sont préalablement lavées :

- Acétone 10 minutes aux ultrasons
- Isopropanol 10 minutes aux ultrasons
- Sécher avec de l'azote
- Passer eu Plasma 10 minutes et enduites avec de la résine Su8 2005.

La suite du protocole est celle décrite dans (190)

On peut vérifier l'impression sur la galette de silicium grâce à un profilomètre qui permet de mesurer le relief d'une surface grâce à la présence d'une pointe souple. Le principe est le même que l'imagerie en AFM mais cela se passe à une échelle beaucoup plus grande, qui de l'ordre du micromètre. Nous avons utilisé, avec l'aide de F. Bedu de la salle blanche PLANETE du Cinam, un profilomètre de marque Bruker et ainsi vérifié que nos moules avaient l'épaisseur désirée.

Une fois le moule fini, il est mis sous vide avec de l'APTES pendant 20min et une couche de PDMS Sylgard 184 (Dow Corning) (elastomere 1 : 10 et silicone 9 : 10).

Après dégazage dans une cloche sous vide pour enlever les bulles piégées dans le PDMS, qui est une étape importante car s'il reste des bulles cela peut endommager le motif et en changer la structure. On place le masque avec le PDMS dans un four à 65°C toute la nuit et le lendemain on peut demouler avec précaution les tampons de PDMS.

11. Impression protéique par Micro-Contact Printing

Afin de contrôler forme et position des cellules d'intérêt, il est devenu courant d'utiliser le microcontact printing de protéines (191), (192), (193). Cette technique de « tamponnage protéique » repose sur la fabrication de tampons portant les motifs désirés. Ceux-ci sont en PDMS, un élastomère relativement facile à manipuler (194).



Fig. 4.21 : Tampon de PDMS d'environ un cm², la zone qui sera imprimée correspond à la petite partie opaque au centre du tampon qui contient une répétition de cercles à une taille donnée.

Dans notre étude nous voulons avoir des formes adhésives via une molécule d'intérêt sur du verre dans des boîtes de Pétri commerciales adaptées à l'AFM (WPI Instruments Fluorodish FD35-100) et ensuite le contour de ces motifs est complété avec une molécule répulsive ou passivante de façon que les cellules utilisées (ici les 3A9m et les COS APC) n'adhèrent que sur la partie définie et s'étalent complètement dessus.

Cette partie du travail de thèse a nécessité un long temps d'expériences et d'optimisation et fait partie du chapitre 5 section 2 (page 123) où la technique ainsi que les molécules utilisées seront décrites ainsi que les différentes stratégies que l'on a mise en place. Ce travail sera amplement discuté et on essaiera d'apporter des explications aux problèmes rencontrés et des alternatives à la mise en place d'une surface imprimée contrôlée.

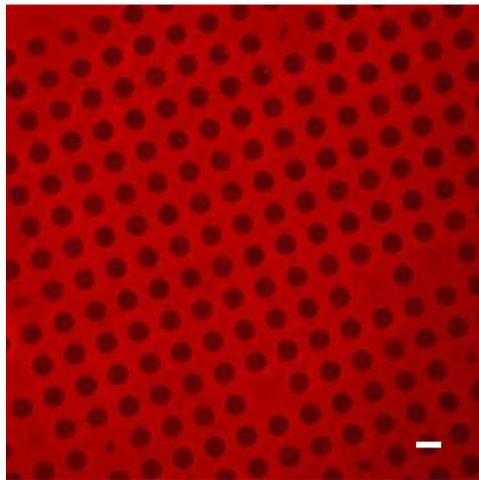


Fig. 4.22 : pattern de bBSA révélée avec de la streptavidine fluorescente, les cercles sont remplis avec de l'anticorps anti-CD45, barre d'échelle = 15µm.

12. Construction des sets de données et traitement statistique

Le traitement de données a été réalisé en utilisant soit des logiciels en libre accès sur des machines ayant comme système d'exploitation Linux ou Windows, ou bien avec des logiciels propriétaires sous Windows.

Matériel et Méthode

Collection des données :

Les données ont été rassemblées sous la forme de tableaux de valeurs dans Calc (LibreOffice) ou GraphPad.

Représentations graphiques :

Les courbes, boîtes à moustaches, histogrammes ont été tracés (i) en utilisant la librairie Seaborn de Python avec le logiciel Spyder2, et vérifiés avec des librairies classiques telles que Matplotlib sous Python ou R (ii) avec GraphPad (iii). Certains ont été obtenus en utilisant le logiciel QtiPlot.

Tests statistiques :

Les données ont été traitées en utilisant Graphpad Prism (6 or 7) et/ou les logiciels R / Rstudio pour les analyses statistiques en utilisant des paquets préexistants (<http://cran.rstudio.com/>, packages asbio et pgrimess pour les tests de Kruskal-Wallis ou Wilcoxon). Le test le plus couramment utilisé est celui dit de Mann-Whitney (non paramétrique, car la taille de l'échantillon est faible).

Regroupement des données :

RICM, Confocal : un point correspond à une cellule.

AFM module de Young : un point correspond à la moyenne des valeurs de module de Young pour une cellule. 10 courbes étaient réalisées par cellule et ne conservions que celle où le modèle de Hertz s'appliquait avec une détection correcte du point de contact. Nous avons jugé que nous pouvions moyenniser ces valeurs en observant l'absence de tendance lors de mesures répétées sur la même cellule, dans notre gamme de répétition. (Fig. 4.22 A).

AFM, relaxation : un point correspond à une cellule sur laquelle le fit en loi de puissance a convergé.

AFM mesures cellule/cellule : un point correspond à un couple T/APC. Nous avons vérifié le nombre de fois nous pouvions mettre en contact une même COS APC porté par le levier avec une cellule 3A9m différente (une courbe est prise par 3A9m avec un repos de plusieurs

Matériel et Méthode

minutes entre deux contacts) (Fig. 4.22 B) : une même COS APC pour rencontrer entre 3 et 6 différentes cellules 3A9m sans que l'on observe de tendance notable sur les valeurs mesurées

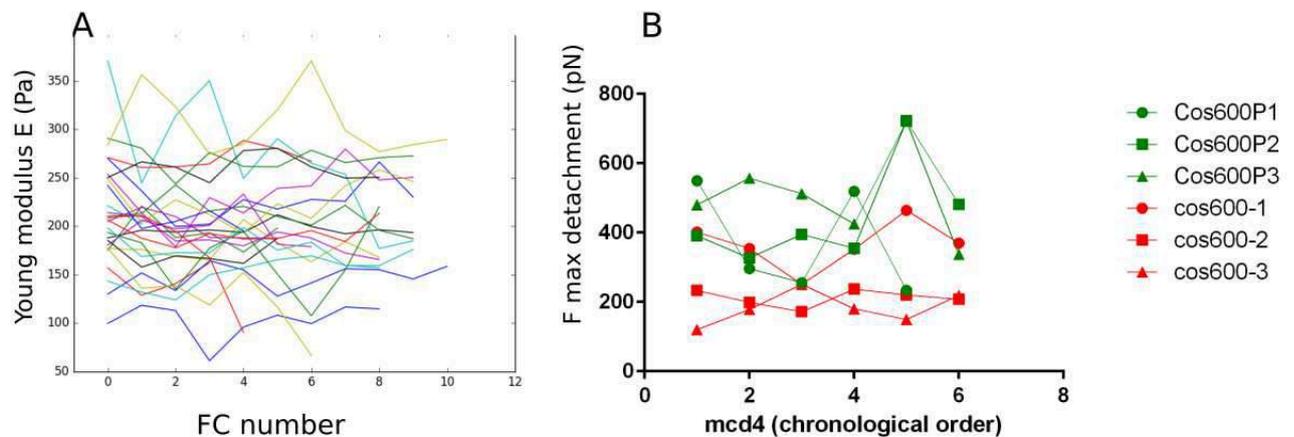


Fig. 2.23 : Plots des valeurs de module de Young en fonction de l'acquisition temporelle de la courbe de force A : Vérification de l'influence du nombre de répétition de courbes de force sur une cellule 3A9m. B : Détermination du nombre de contact cellule-cellule possible avec une même COS APC sur différentes cellules 3A9m.

13. Tableau des références des anticorps et produits utilisés

Nom	Fournisseur	Reference
Produits		
Accutase	Thermo Fischer	00-4555-56
BSA	Sigma	A6003
BSA biotin	Sigma	A6043
ConA	Sigma	C2272
ConA biotine	Sigma	C2272-2MG
DMSO	Thermo Fischer	D12345
EDTA	Sigma	E7889
FBS	Life Technology	10270106
Fibronectine	sigma	F2006
Glutaraldéhyde	Sigma	7526
Hepes	Gibco	15630080
Hoechst	Thermo Fischer	H3570
PBX	BD Biosciences	640177
PBS 1X	Gibco	10010-023
PBS 1X sans Ca ²⁺ Mg ²⁺	Gibco	14190-094
PDMS	Dow Corning	Sylgard 184

Matériel et Méthode

		10:1
PFA	Thermo Fischer	FB002
PLL 0.1%	SigmAa	P8920
PLL 0.01%	Sigma	P4832
PLL-PEG	SuSoS	
Phalloïdine Alexa Fluor 488	Molecular Probes	A12379
probenicid	Invitrogen	P36400
Prot A Biotin	Sigma	P2165
Streptavidin	Sigma	S4762
Streptavidine FITC	Sigma	S37625
Sodium pyruvate 100mM	Gibco	11360-039
Triton 100X	Thermo Fischer	HFH10
Trypsin EDTA (0,05%)	Sigma	25300054
Trypan	Gibco	152500161

Milieux de culture cellulaire		
DMEM	Gibco	61965-026
DMEM F12	Gibco	21041025
HBSS	Gibco	14025-050
Nutridoma-SP	Sigma-Roche	11-011375-001
RPMI	Gibco	21875-034

Antibiotiques		
geneticine G-418	Gibco	11811031
penicilline/strepstomycine	Gibco	15140-122
puromycine	Gibco	A1113802

Anticorps		
anti-TCR H57.597	CIML	
anti-CD3 2C11	CIML	
anti-CD4 Gk1.5	CIML	
anti-CD45 H193,16,3	CIML	
anti MHC II 10.3.6	CIML	
anti-TCR PE H57	BD Pharmigen	0.2mg/ml
anti-CD45 AlexaFluor 647	BD Pharmigen	1mg/ml

Matériel et Méthode

anti-MHC II FITC IA[k]	BD Pharmigen	0.5mg/ml
------------------------	--------------	----------

Cantilevers				
Type	Provider	Tip	k (pN/nm)	Recouvert d'or ?
MLCT-0	Brucker	non	10...	oui
MSCT	Brucker		10...	oui
MLCT	Brucker	pyr 15°	10...	oui
MLCT uc	Brucker	pyr 15°	10...	non
MLCT DC	Brucker		10...	oui
MLCT Bio DC	Brucker		10...	oui petite zone

V. Résultats

1. Couplage de la microscopie à force atomique et la microscopie à fluorescence

De nombreuses études ont montré que les forces jouent un rôle important dans l'engagement du complexe TCR/CD3 ainsi que dans l'initiation du signal (voir section 8 de l'introduction). Il est donc intéressant d'être capable d'induire une stimulation mettant en place des forces contrôlées et pouvoir visualiser les conséquences de celle-ci, qu'elles soient biochimiques (phosphorylations, flux calciques) ou mécaniques (déformations ou forces). En particulier, il est crucial d'être capable de définir l'instant initial du contact entre la stimulation (quelle qu'elle soit) et la cellule T, de façon à pouvoir observer les délais et temps caractéristiques de la réponse. Ceci est extrêmement difficile avec des stimulations en solution ou par rencontre aléatoire de cellules car limité par la diffusion des molécules ou les déplacements cellulaires, il n'y a pas de vrai read-out du début du contact. Les techniques basées sur les mesures de forces permettent de connaître cet instant de manière précise, car on peut détecter le contact entre la sonde de force, modifiée ou non, et la cellule cible dès que l'on détecte une force supérieure au bruit de mesure de la technique.

Nous avons, dans ce cadre, développé une technique utilisant l'AFM (stimulation, mesure de réponse mécanique) couplée à la microscopie en fluorescence afin de visualiser les événements précoces de l'activation de cellules immunitaires telles que des lymphocytes T ou des macrophages (conséquences, ici les flux calciques). Cette méthode permet, symétriquement, de photoactiver des cellules modifiées de manière ad hoc (195) et de mesurer leur réponse mécanique. L'aspect intéressant de cette technique est que les mesures sont réalisées de manière simultanée, sans modification des systèmes AFM et optique.

Nous avons mis en évidence dans cette étude trois points principaux :

1-la présence de signaux qui sont généralement considérés comme « parasites » lors du couplage de l'AFM et de la microscopie à fluorescence. Nous avons montré qu'ils peuvent être directement utilisés comme « time stamps » pour aligner les deux mesures produites sur deux microscopes posés l'un sur l'autre, sans utiliser de système complexe de contrôle (pas de trigger, pas de modifications de l'électronique). Cet effet n'est pas nouveau car il est connu

Résultats

dans la communauté « AFM » mais il n'est que rarement mentionné dans la littérature et, à notre connaissance, jamais utilisé à de telles fins. Il était intéressant pour nous de caractériser ce phénomène de façon quantitative et de pouvoir l'utiliser à notre avantage pour l'établissement de notre système expérimental.

2-nous avons pu appliquer cette méthode pour suivre la stimulation d'une cellule Jurkat ou d'un macrophage par une bille portée sur la pointe d'AFM et enregistrer simultanément l'apparition d'un signal calcique.

3-nous avons pu suivre, à l'inverse, les conséquences mécaniques induites dans une lignée lymphocytaire modifiée, mise en place au laboratoire par M. Pélicot-Bianes, suite à l'activation d'une sonde photoactivable pour la petite GTPase Rac.

Dans cette étude, ma participation s'est majoritairement portée sur le premier point. J'ai, en apprenant à maîtriser l'AFM en début de thèse, porté mes efforts d'abord sur la mesure de la puissance de différentes longueurs d'onde utilisées avec différents objectifs, mais aussi sur la caractérisation du signal (forme, intensité, régularité) conséquence du couplage de l'AFM et de la microscopie de fluorescence.

Outre l'acquisition d'une certaine aisance avec l'AFM couplé à la fluorescence, ce travail a permis de déterminer quels paramètres (forces, temps, vitesses) seront à privilégier par la suite pour faire des mesures mécaniques sur des lymphocytes ou pour étudier l'interaction TCR/pMHC en mettant en contact une APC et un lymphocyte T avec des conditions de force contrôlée et un enregistrement simultané des flux calciques (présentés dans les sections 2 et 4 des résultats).

Ce travail a été publié dans Ultramicroscopy en 2016 (196) et l'article complet est présenté après une présentation rapide de quelques données complémentaires que j'ai obtenues lors de la mise en place des expériences.

1. Réponse du système Colibri (% demandé vs. Puissance obtenue) ; choix des objectifs

Une des premières caractérisations que j'ai réalisées a été de mesurer la puissance des diodes du système Colibri (Zeiss) choisi pour exciter la fluorescence sur notre microscope. Ce système a été choisi car, à sa date d'achat, il était le seul système permettant de ne pas introduire de bruit mécanique à chaque image car il est entièrement électronique : la diode

Résultats

s'allume et s'éteint pour chaque prise d'image, sans mouvement de pièce mécanique. Les diodes atteignent leur stabilité en un temps de l'ordre de la msec (ce que nous avons pu vérifier en enregistrant grâce à une caméra rapide la lumière d'excitation en fonction du temps), bien plus court que les temps d'exposition raisonnablement utilisés par la suite. De plus, il s'agissait d'utiliser des puissances de lumière d'excitation suffisantes, mais faibles, car une cellule marquée est très sensible. La lumière peut provoquer une toxicité par un stress oxydatif dû à la libération de ROS (reactive oxygen species). De plus, une puissance trop élevée peut également induire un photoblanchiment rapide de la sonde fluorescente ne permettant plus dans ce cas précis de suivre un signal calcique au cours du temps de manière fiable (lors du stage post-doctoral de R. Fabre, il a été observé que ce bleaching noie les signaux calciques évoqués par une bille recouverte d'aCD3, lorsque l'illumination est réalisée, même faible, de manière continue).

Ainsi, il est nécessaire de déterminer les puissances adéquates pour chaque longueur d'onde d'excitation dont nous disposons et de limiter, lorsque cela est possible, le champ d'exposition, par l'utilisation d'un diaphragme sur le microscope. Dans un deuxième temps, on adaptera le temps d'exposition lors de la prise d'image, ainsi que la fréquence d'acquisition de la caméra, ce qui a un effet complémentaire.

Nous avons utilisé un puissance mètre optique (PM100D Thor Lab) présentant un capteur circulaire d'environ 1 cm de diamètre. Nous avons réalisé ces expériences dans l'obscurité et mesuré la luminosité de la pièce pour faire le 0 de la sonde. Afin de focaliser le point de sortie de la diode, nous avons placé une feuille blanche sur le porte échantillon et fait le focus dessus afin d'obtenir un point lumineux bien défini. Ensuite, nous avons fait trois mesures successives en exposant le capteur 5 secondes à chaque illumination à différents pourcentages de puissance de la diode : 0, 25, 50, 75 et 100% et cela pour 3 longueurs d'onde différentes 470nm, 555nm et 625nm.

Tout d'abord, nous pouvons noter que l'augmentation de la puissance des diodes n'est pas linéaire avec les mesures de puissance obtenues. La diode 470nm est la plus puissante parmi les longueurs d'onde dont nous disposons ; c'est un avantage pour nous car elle correspond à l'excitation de sondes calciques comme Fluo4AM ou PBX (qui sera notre sonde de référence par la suite, voir Chapitre 4, page 66 et 5, page 163).

Résultats

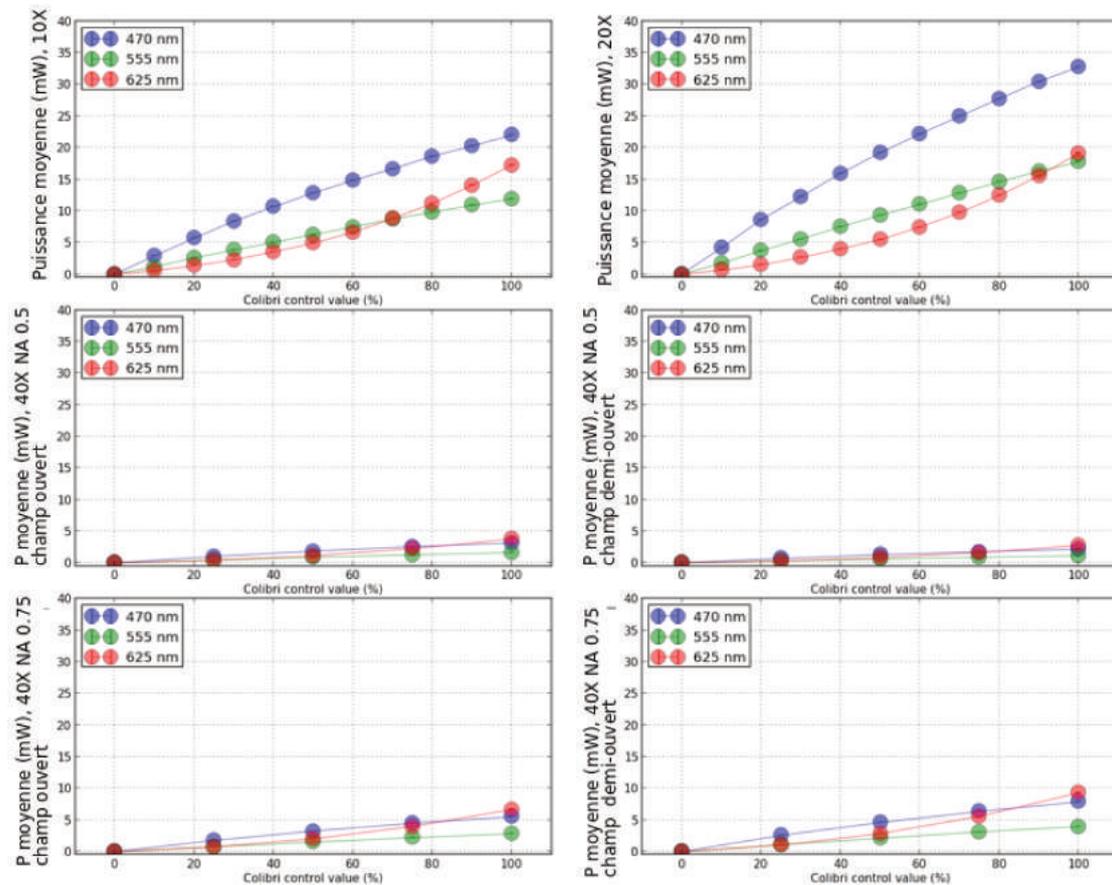


Fig. 5.S1 : Puissance moyenne des diodes à une longueur d'onde donnée et un pourcentage donné, respectivement 470nm (bleu), 555nm (vert) et 625 nm (rouge) à 0, 25,50, 75 et 100% de chaque diode. 3 mesures à chaque pourcentage ont été réalisées et on a représenté la moyenne de ces valeurs. Les mesures ont été faites avec 4 objectifs différents, 10X, 20X NA 0.8, 40X NA 0.5 et 40X NA 0.75. Pour les objectifs à 40X 2 conditions ont été testées : diaphragme ouvert ou semi-ouvert. Le même type de mesures a été aussi effectué avec une lampe HBO avec des filtres pour FITC et TRITC, mais nous ne les présenterons pas ici pour ne pas alourdir la **Fig.**ure.

Les objectifs 10X et 20X NA 0.8 laissent passer beaucoup plus de lumière, il faudra donc limiter le temps d'exposition de l'échantillon lors de son utilisation pour éviter d'induire des phénomènes de photoblanchiment ou de phototoxicité. Leur faible grossissement peut être limitant, mais l'objectif 20X 0.8 est très brillant, ce peut être une solution pour avoir non seulement une cellule sur laquelle on va appliquer des forces dans le champ mais aussi une population de cellules autour qui peuvent servir de cellules contrôles (ne recevant pas d'interaction de contact). Les deux objectifs 40x sont les plus adaptés pour des expositions de fluorescence longues ; toutefois la puissance faible pourrait être une contrainte afin d'obtenir un bon ratio signal /bruit.

Nous pouvons donc utiliser les objectifs 20X0.8 et 40X0.75 qui sont relativement brillants pour enregistrer des flux calciques en microscopie à fluorescence tout en étant conscient des limites imposées par le système expérimental, notamment quelle variation de l'amplitude de

Résultats

fluorescence sont typiques lors de l'activation de notre système cellulaire en fonction du substrat (voir résultats section 2). D'autres objectifs, comme un 63x1.25 à immersion ont été testés mais sont plus malaisés à utiliser pour une approche de mesures de forces entre cellules (sachant qu'une fois qu'on a utilisé un objectif à immersion, on ne peut basculer sur un autre objectif à longue distance... pour par exemple trouver une autre cellule ou un autre champ adéquat, sans avoir d'objets parasites collant ou tapant le levier...)

2. Choix des leviers ; rôle de l'or

Nous avons observé et mesuré les signaux de couplage de la fluorescence sur les cantilevers qui avaient été repérés lors d'études précédentes (stage postdoctoral de R. Fabre, dans le cadre de l'ANR JCJC DissecT, suivi du stage de l'Ecole Centrale de Marseille de S. Cazaux (197). Nous avons vérifié la reproductibilité du signal de couplage pour cela nous avons répété un signal identique provenant d'une seule longueur d'onde, à la même puissance et à écarts de temps répétés réguliers (toutes les 5 secondes). Nous avons également observé la forme et mesurer l'amplitude de ces signaux pour les longueurs d'onde d'excitation dans le visible (470nm, 555nm, 625nm). Nous avons pu constater que l'amplitude dépendait fortement de la présence ou non d'une couche d'or sur le cantilever. L'amplitude de ces signaux était dépendante de la puissance de la lumière d'excitation lorsque le cantilever était recouvert d'or (le métal se dilatait plus) et au contraire ne présentait que peu ou pas de variation sur les cantilevers sans or (154).

3. Modification des sondes de force ; réalisation à bas coût de sonde colloïdales

Toujours dans l'optique d'étudier l'activation du lymphocyte T en proposant un système cellule-cellule couplé avec l'AFM il s'est avéré nécessaire de connaître les propriétés mécaniques, plus particulièrement l'élasticité cellulaire, de chaque partenaire du couple cellule-cellule. En effet, il a été montré que les lymphocytes T sont moins rigides que les APC physiologiques et que les APC entre elles en fonction de leur origine ont des propriétés mécaniques différentes (133).

Dans le cadre des indentations par AFM, il a été montré que la forme de l'indenteur modifiait non seulement les valeurs mesurées mais aussi pouvait entraîner des biais forts dus à une géométrie mal contrôlée du contact levier / cellule (198): nous avons donc choisi d'utiliser des indenteurs sphériques (une bille portée par un levier d'AFM) de tailles contrôlées afin d'être à la fois plus « doux » avec les cellules (ce qui n'est pas le cas avec une pointe pyramidale ou

Résultats

conique, où l'on peut parfois percer la membrane et endommager la cellule) et d'avoir une mesure « moyennée » sur une zone plus large, de l'ordre de celle qu'on peut attendre d'un contact initial entre deux cellules (quelques μm^2).

Le prix de telles sondes de forces colloïdales commerciales est prohibitif (parfois une centaine d'euros pièce), et peu de compagnies proposent des leviers souples tels que ceux que nous souhaitons utiliser avec les cellules T (constante nominale $\sim 10\text{pN/nm}$), à la suite des études précédentes du laboratoire (85). Nous avons donc mis en place un protocole de collage de billes par micromanipulation (voir matériel et méthode section 7.1.3) sur des leviers. On peut donc coller une bille de taille désirée et variable (de $1\mu\text{m}$ à plusieurs dizaines de μm), de chimie (fonctionnalisée ou non) et de composition voulue (silice, verre, polymère) sur le levier voulu (ce qui permet de choisir sa rigidité, sa géométrie, son coating métallique, à façon) et vérifié que la présence d'une bille ne modifiait pas les propriétés physiques du cantilever à savoir sa fréquence et sa constante de raideur (voir matériel et méthode section 7.1.3).

Il s'est rapidement avéré qu'il était plus facile de coller de manière reproductible une bille sur un cantilever possédant une pointe avec une pyramide quadratique afin de mieux caler la bille au centre et aussi pour ne pas la perdre lors d'expériences répétées. En dessous de $4\mu\text{m}$, pour des raisons géométriques, le levier ne doit pas avoir de pointe car cette dernière a, pour la gamme de leviers utilisés, une taille maximale de l'ordre de $4\mu\text{m}$. Une solution plus complexe est de couper celle-ci avec un faisceau ionique focalisé (FIB, réalisé au CINaM) (154). Nous avons pu visualiser cela en imageant en transmission les leviers portant des billes, posés sur la tranche et maintenus par de petits morceaux de PDMS réticulé (Fig. 5.S2).

Ainsi, en utilisant une bille de $5\mu\text{m}$ de diamètre nous disposons de l'ordre d'un μm de bille dépassant permettant de faire le contact sans induire de biais, ce qui veut dire que l'on peut indenter d'un μm la cellule tout en conservant une géométrie sphérique (on y est aidé par une inclinaison faible du levier, de l'ordre de 10° , imposée par le montage de l'AFM).

Deux types de colle sont généralement utilisés dans la littérature pour construire ces sondes colloïdales (85), (199): une colle optique polymérisable aux UV et une autre colle de type époxy, bi-composant. La deuxième est d'usage plus facile, car elle réticule à l'air libre en peu de temps (il en existe plusieurs types en magasins de bricolage, avec des temps de séchage entre la minute et l'heure), alors que la première nécessite de déplacer le levier avec la bille, la

Résultats

colle encore peu réticulée, jusqu'à un four UV, ce qui peut être délicat et entraîner la perte de la bille.

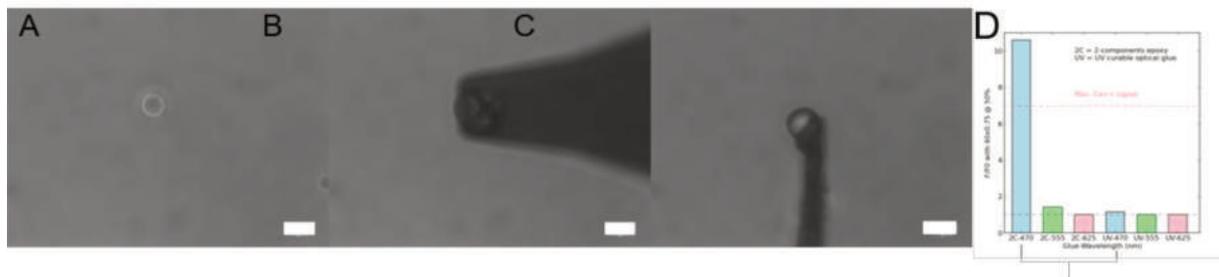


Fig. 5.S2 : Collage d'une bille de 5µm de diamètre sur un cantilever possédant une pointe avec une pyramide quadratique. A : bille de verre de 5µm de diamètre, B : cantilever avec une bille collée à l'avant vue de dessus, C : comme précédemment mais vue de côté, barre d'échelle = 5µm., D : Mesure d'autofluorescence de deux colles à 3 longueurs d'onde différentes : 470nm, 555nm, 625nm, 2c=bi composante et UV=colle polymerisable aux UV. 470nm correspond à la longueur d'onde d'excitation des sondes calciques utilisées. La ligne en pointillée montre le signal maximal de fluorescence que l'on peut espérer avoir, d'après des mesures préliminaires, en utilisant un objectif 40X NA 0.75.

Nous avons donc mesuré à différentes longueurs d'onde le signal d'autofluorescence émis par ces colles, avec la configuration de filtres multi bandes que nous souhaitons utiliser lors de nos expériences (au moins deux couleurs, une pour les micropatterns protéiques et une pour la sonde calcique, voir chapitres 5.2 et 5.3 respectivement pages 123 et 149), afin d'effectuer le choix de celle qui est la plus judicieuse pour le couplage AFM / fluorescence (Fig.5S2). Notre sonde ayant une fluorescence excitable dans la gamme de Fluo4AM, la colle 2 composants est non utilisable pour les mesures AFM+fluorescence, mais peut être une solution facile et robuste pour fabriquer des sondes colloïdales rapidement, pour des mesures mécaniques seules.

Toutes ces expériences préliminaires au travail de thèse et complémentaires nous ont permis d'avoir un système expérimental plus adapté pour réaliser les expériences que nous présenterons dans les sections 2, 3 et 4.

En conclusion, nous devons utiliser :

- La diode 470nm à une puissance faible (25%) et un temps d'exposition limité (250msec), avec une fréquence d'images raisonnable (pour pouvoir suivre la dynamique des phénomènes calciques, par ex, 0.2fps, pour éviter des phénomènes de

phototoxicité et photoblanchiment avec l'objectif 20X. 0.8 ou 40x0.75 afin d'avoir un bon ratio signal/bruit.

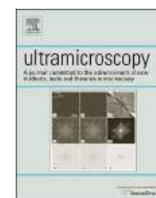
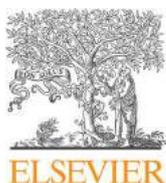
- Un cantilever sans or car cela évite une dérive du signal et nous permet aussi de visualiser un objet à travers celui-ci, permettant ainsi un placement plus aisé d'une bille ou COS APC au-dessus d'une cellule T. En outre, notre AFM a un élément piézoélectrique permettant une course du cantilever de 15 μ m (voir matériel et méthode section 7.1.1) qui peut dans certains cas lors du contact d'une COS APC avec une cellule T d'obtenir une courbe de force ne revenant pas au point initial. Ainsi, vu que la dérive est quasiment nulle on peut mesurer l'adhésion résiduelle entre ces deux objets (voir résultats section 4). Une bille d'au moins 5 μ m de diamètre lorsqu'elle est collée à l'avant de la pointe permettant ainsi de remplir les conditions pour utiliser le modèle de Hertz de manière raisonnable sans correction de la taille de l'objet à indenter par rapport à celle de l'indenteur. Cela permet également de ne pas avoir un contact possiblement « parasité » par la pointe se situant juste derrière pour les forces de contact que l'on va utiliser (c'est à dire entraînant des indentations de l'ordre de 1 à 2 μ m, voir chapitre 5.2 page 123).
- Utiliser la colle polymérisable aux UV qui est la moins autofluorescente dans la gamme de longueur d'onde utilisée pour les flux calciques. Même si son utilisation est plus compliquée, elle permet les montages les plus versatiles.

Publication: Synchronizing atomic force microscopy force mode and fluorescence microscopy in real time for immune cell stimulation and activation studies (196).

Résumé : Une méthode est ici présentée pour combiner le mode force de la microscopie à force atomique (AFM) et la microscopie à fluorescence afin de (a) stimuler mécaniquement les cellules immunitaires tout en enregistrant l'activation ultérieure sous forme de flux calciques, et (b) observer la réponse mécanique d'une cellule suite à la photoactivation d'une petite protéine G, notamment Rac. En utilisant des configurations commerciales et un signal robuste couplant la lumière d'excitation de fluorescence et la flexion du cantilever, les signaux de force appliquée et d'activation ont pu être facilement synchronisés. Cette approche permet de contrôler tout l'historique mécanique d'une cellule unique jusqu'à son activation et sa réponse jusqu'à quelques centaines de millisecondes, et peut être étendue avec des adaptations

Résultats

très minimes à d'autres systèmes cellulaires où la mécanotransduction est étudiée, soit par stimulation purement mécanique, soit via un ligand spécifique lié en surface.



Full length article

Synchronizing atomic force microscopy force mode and fluorescence microscopy in real time for immune cell stimulation and activation studies



Séverine Cazaux^{a,b,c}, Anaïs Sadoun^{a,b,c}, Martine Biarnes-Pelicot^{a,b,c}, Manuel Martinez^{a,b,c}, Sameh Obeid^{a,b,c,1}, Pierre Bongrand^{a,b,c,d}, Laurent Limozin^{a,b,c}, Pierre-Henri Puech^{a,b,c,*}

^a Aix Marseille Université, LAI UM 61, Marseille F-13288, France

^b Inserm, UMR_S 1067, Marseille F-13288, France

^c CNRS, UMR 7333, Marseille F-13288, France

^d APHM, Hôpital de la Conception, Laboratoire d'Immunologie, Marseille F-13385, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 March 2015

Received in revised form

17 September 2015

Accepted 12 October 2015

Available online 19 October 2015

Keywords:

Atomic force microscopy

Fluorescence microscopy

Immune cells

Signalling

Activation

Cell mechanics

ABSTRACT

A method is presented for combining atomic force microscopy (AFM) force mode and fluorescence microscopy in order to (a) mechanically stimulate immune cells while recording the subsequent activation under the form of calcium pulses, and (b) observe the mechanical response of a cell upon photoactivation of a small G protein, namely Rac. Using commercial set-ups and a robust signal coupling the fluorescence excitation light and the cantilever bending, the applied force and activation signals were very easily synchronized. This approach allows to control the entire mechanical history of a single cell up to its activation and response down to a few hundreds of milliseconds, and can be extended with very minimal adaptations to other cellular systems where mechanotransduction is studied, using either purely mechanical stimuli or via a surface bound specific ligand.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Atomic force microscopy (AFM) is a surface probe technique that uses a soft cantilever to image surfaces or to measure or apply forces while interacting with them [1]. Over the last 20 years, AFM in force mode has been largely developed for quantitating molecular interactions, from single molecule unbinding or unfolding events [2–4] to single cell detachment from a substrate or from another cell [5–7].

Recently, force measurements have attracted the attention of many immunologists, in particular in the field of adaptive immunity. A key step of the immune response is the detection by T lymphocytes, thanks to their T cell receptor (TCR), of foreign peptides bound to major histocompatibility complex molecules (pMHC) and displayed on the surface of antigen presenting cells (APCs) [8]. AFM has been applied to the determination of the forces that single TCR/pMHC [9] or BCR/antigen [10] can stand,

since force has been recently suspected to be a possible regulator of the antigen discrimination by those molecules [11–16]. Alternative techniques, such as Biomembrane Force Probe [17] and flow chamber [18], were also used to dissect the contribution of forces to single molecule recognition of the TCR/pMHC complex, helping to understand the exquisite sensibility and reliability of this molecular system [19,20]. Further, AFM helped to determine the forces that the immune synapse between a T cell and an APC can create or sustain [21,22]. In the recent years, such techniques have become a very important set of tools to dissect the relationship between cellular mechanics, forces and function, in particular in immune cells [23]. Moreover, immune cells are increasingly recognized to have mechanosensory behaviours [24], which may contribute to their remarkable capabilities of foreign peptide detection [25,26].

A delicate issue in examining the relationship between the receptor binding events (i.e. the TCR/peptide/MHC encounter in the context of T cell recognition [8]) and the early biochemical consequences is to detect the precise moment when the molecules contact with sufficient temporal resolution, let alone controlling when that contact takes place (i.e. the initial encounter). In most biological assays, this question is not addressed otherwise than taking as zero time the initial combination of the relevant

* Corresponding author at: Aix Marseille Université, LAI UM 61 / Inserm, UMR_S 1067 / CNRS UMR 7333, Marseille F-13288, France.

E-mail address: pierre-henri.puech@inserm.fr (P.-H. Puech).

¹ Present address: Institut FEMTO-ST, UMR6174-CNRS, UFC – 32, Av. de l'Observatoire, F-25044 Besancon, Cedex, France.

components, while even in video microscopy experiments cell contact is determined by visual examination of the images or in the case of lymphocyte stimulation, by the detection of a Ca^{2+} increase [27,28] or Zap70 phosphorylation [29], among other possibilities.

In the field of mechanotransduction, it has become more and more evident that the consequences of a stimulation event have to be followed simultaneously to the stimulation [30], in order to decipher not only the magnitude of the response, but also to describe the entire history of the stimulation [19,31], where potential delays and time modulations of the response in regard to the stimulation could be affected specifically by mutations or drugs, bringing detailed information about the mechanisms at play. One way of following the signalling activity, in real time, is to visualize it using fluorescent reporters (see above).

In this context, AFM has been very rarely reported, to our knowledge, to be used simultaneously to optical fluorescence imaging in cell biology. These techniques are usually combined by successive applications and led to the implementation of new modalities in commercial AFM (such as JPK Overlay, JPK Instruments, or MIRO, Bruker) to allow easy image superpositions. Potential causes of such a non simultaneous use in imaging/force mode are of two main origins: (a) a common knowledge in the AFM community is that gold coated levers are “reacting” to fluorescence excitation light, whether HBO lamps or lasers are used, and (b) that shutters or advanced optical systems such as confocal scanning heads are producing vibrations that may perturb the AFM measurements. A handful of reports present experiments where AFM indentation is performed while recording a fluorescent signal, e.g. calcium fluxes, but no detail is provided about the exact coupling of the two techniques and their synchronization [30,32,33].

In the literature, reports can be found where force measurements are made concomitantly with fluorescence imaging, but they have been mainly performed using micropipette derived systems such as dual micropipette manipulation [34] (where forces are estimated) or Biomembrane Force Probe [19,31] (with a limitation of the maximal forces that can be applied). The problem of external vibrations is essentially the same as for AFM experiments. In micropipettes, the observation of the cellular system is made from the side and far from any optically flat surface. As a consequence, it suffers from two experimental limitations as compared to AFM: (a) it limits the use of high resolution microscopies and high magnification/NA lenses; (b) the positioning of the probe onto the cell's surface is made with a poor lateral accuracy. As a consequence, only whole cell fluorescence signals can be currently studied. In some seminal experiments, the time resolution of the measurements is also relatively low [31] but this was sufficient to reveal very interesting features of the response of cells to mechanical signals such as delays and recovery times. Due to their lower force range, the application of optical tweezers was not considered here and, as such, is not presented.

A major strength of AFM stems from the possibility of using several modalities on the same set-up: imaging, force indentation to investigate cell mechanics and adhesion force measurements over a great range of force values, from single molecules to cell/cell separation [1]. Aside, it can be coupled to advanced surface microscopies such as reflection interference contrast microscopy (RICM, [35]) or total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM, [36]), or to other high resolution microscopies such as confocal [37], allowing to use the power of fluorescence imaging, with a broad range of dyes or reporter molecules, in order to follow a structure (membrane, nucleus, receptor), its dynamics or a cytosolic signal (calcium fluxes, pH variations) in conjunction to the stimulating signal. While the determination of the moment of contact of the lever tip with the tested cell is relatively simple (by

detecting a variation of the force felt by the lever), coordinating the signals from fluorescence and AFM can be complicated and complex synchronization could be necessary. To our knowledge, this point was never clearly reported in literature.

We have developed an original technique allowing us to use AFM to mechanically and specifically stimulate, in a controlled manner over time and space, single white blood cells (T cells, macrophages), while following their activation response simultaneously via conventional calcium probes. We describe a coupling signal existing between fluorescence microscopy and AFM, and use it as a timer to synchronize the stimulus and the response of the cell. In a symmetrical approach, we have used a reverse method that allows to submit T cells to controlled photo-stimulations, gaining insight in their mechanical properties, when activating a small GTPase, Rac, in realtime. This method being simple to put in place, and even if limited in terms of temporal resolution, is a first step toward an easy integration between force mode AFM and signaling studies using fluorescent reporters. This opens a way to new strategies to investigate different components of immune cell mechanotransduction.

2. Materials and methods

2.1. Cells and cell culture

Two cell types were used: (a) human Jurkat T cells (clone E6-1, ATCC TIB-152), as a model for lymphocytes, and (b) murine J774 macrophages (clone J774A.1 ECACC, Salisbury UK, gift from A. Dumêtre, UMD3, AMU, Marseille) as a model for phagocytes. Cells were counted and passaged three times a week, with a 2 min trypsination step for the macrophages, and their viability assessed by the use of Trypan Blue labelling. The cell culture medium (RPMI 1640) and complements (7% FBS, 1% Hepes 1 M, Glutamax, Pen/Strep) were obtained from Gibco (Life technologies). Cells were monthly tested for the presence of mycoplasma.

2.2. Reagents

Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich: CaCl_2 as a salt (#C1016), bovine serum albumin (BSA) as a powder (#A3294), poly-L-lysine (PLL) as a 0.1% water solution (#P8920). PBS (as $10 \times$ sterile solution, w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) was purchased from Gibco (Life technologies). Hellmanex was purchased from Hellma Analytics.

2.3. Cells loading with calcium reporter

For calcium imaging, the cells were loaded in suspension with the green fluorescent probe Fluo4 (supplied as Fluo4-AM, #F-14201, Molecular Probes) using protocols adapted from provider's ones prior to immobilization on PLL-coated glass coverslips. Such markers are known to report efficiently the intracellular rise of calcium upon stimulation of immune cells by exhibiting an increase in their fluorescence levels. In short, Fluo4-AM (50 μg in 23 μL) and Pluronic F127 (20% final concentration), purchased from Invitrogen, were dissolved in DMSO and mixed in a 1:1 ratio. 5×10^5 cells were centrifugated in PBS (1000 rpm, 4 min, RT) and resuspended in a final volume of 500 μL , in which 1 μL of the mixture Fluo4-AM/pluronic is introduced to ensure that DMSO concentration during incubation is $< 0.1\%$. After 30 min incubation at 37 °C, protected from light, the cells are gently centrifugated and resuspended in 150 μL of PBS before being plated on the PLL coverslide at RT, where a supplementary resting step of 30 min is respected.

2.4. Rac-PA plasmid and cell transfection

The plasmid of photoactivable Rac fused with the fluorophore mVenus (called hereafter Rac-PA) pTriEx-mVenus-PA-Rac1 was a gift from Klaus Hahn (Addgene plasmid #22007) [38]. Jurkat cells were electroporated using Amaxa system (Lonza, program X-001) using 16 μg of plasmid for 10^6 cells. Cells transfected with Rac-PA plasmid were either kept in RPMI 10% FBS or starved overnight in RPMI 0.2% FBS before the experiment. Non transfected and sham-transfected (no plasmid) cells displayed the same mechanical behaviour as plasmid transfected ones (not shown); the former were used as control in our experiments.

2.5. Cells immobilisation

2.5.1. Lymphocytes

Round coverslips (170 μm thick) were (a) washed in 1% Hellmanex solution for 30 min at 60 °C in an ultrasonic bath (b) successively rinsed with pure ethanol and ultra pure water three times (c) washed in ultra pure water for 30 min at 60 °C in an ultrasonic bath (d) successively rinsed with ethanol and ultra pure water three times (e) dried under an argon flux before storage in dust-free environment. Prior to use, a coverslip was activated for 1 min in a residual air plasma cleaner used at maximal power (Harrick Plasma). A puncher-cut reticulated PDMS well (diameter 8 mm; typical height 1 mm) was used to delimit a zone on the activated coverslip; the well was filled with 100 μL of 0.01% poly-L-lysine in ultra pure water and incubated for 30–45 min at RT. Substrates were gently rinsed three times with PBS before seeding diluted Jurkat cells suspensions (labelled with Fluo4 or not) and letting them to adhere during 15–30 min at room temperature. The glass coverslips were gently washed with PBS 1% BSA 1 mM CaCl_2 to remove unbound cells. After labelling the PLL zone with a felt pen, the PDMS well was then removed and the slide mounted in a BioCell (JPK Instruments) or Coverslip Holder (JPK Instruments) filled with the same medium. Note that the use of PLL to immobilize cells has been seen to provoke minimal activation levels of the cell lines under study (see below).

2.5.2. Macrophages

J774 cells were detached from culture flasks using a 2 min Trypsin/EDTA treatment at RT, washed by centrifugation and re-suspended in culture medium before being seeded onto ethanol/flame-sterilized glass round coverslips in 6 wells plates. They were made to adhere overnight, in culture medium, at 37 °C. Before the experiments, glass coverslips were rinsed to remove unbound cells. The pre-adhered cells were eventually loaded with Fluo4 using the same procedure as for the Jurkat cells, and mounted into the Biocell temperature control system. The final steps are the same as described above for the lymphocytes.

2.6. Atomic force microscope/fluorescence set-up

2.6.1. AFM

Measurements were conducted with an AFM (Nanowizard I, JPK Instruments, Berlin) mounted on an inverted microscope (Zeiss Axiovert 200). The AFM head is equipped with a 15 μm z-range linearised piezoelectric ceramic scanner and an infra-red laser. The set-up was used in closed loop, constant height feedback mode [9].

Veeco MLCT cantilevers variants (rectangle (B), large triangle (C), small triangle (D) – see Supplementary Fig. 1) were used in this study, either with tip and gold coating on the back side (MLCT-AU), with tip and no gold (MLCT-UC) or without tip and with gold (MLCT-0). Since they were not commercially available, levers without tip and without gold coating were produced by chemical

attack of commercial MLCT-0 levers as described in [Supplementary information](#). When needed, for levers with non square-base pyramidal tip, the assumption of a regular pyramidal tip of half angle 15° to the face was used, calculated from provider data. The sensitivity of the optical lever system was calibrated on the glass substrate and the cantilever spring constant by using the thermal noise method [39]. Spring constants were determined *in situ* using built-in routines of the JPK SPM software (JPK Instruments, v3) at the beginning of each experiment, and the same correction factors were used for all levers types as a first approximation [40]. The calibration procedure for each cantilever was repeated up to three times to rule out possible errors, and repeated at the end of some series of experiments. Spring constants were found to be consistently close to the manufacturer's nominal values and the calibration was stable over the experiment duration.

2.6.2. Fluorescence microscopy

The inverted microscope was equipped with 10 \times , 20 \times NAO.8 and 40 \times NAO.75 lenses (with a supplementary 1.6 lens), and via a C-mount with a firewire CoolSnap HQ2 camera (Photometrics). Bright field images were used to select cells and monitor their morphology during force measurements. The microscope was also equipped with a LED illumination system (Colibri 2, Zeiss). A PC, separate from the AFM, controlled the camera and Colibri using Zen 2011 software (Zeiss) with suitable plugins under MS Windows 7 64 bits. Alternatively, Micromanager software [41] was used to capture simple transmission images on the same computer when fluorescence imaging was not needed.

Diodes coupled with filters were mounted in the LED illumination system for four simultaneous configurations: UV=(diode 365 nm+filter 387/11); B (for blue)=(diode 470 nm+filter 485/20); G (for green)=(diode NWhite 540–580 nm+filter 560/25); R (for red)=(diode 625 nm+filter 650/13); beams combiners=395, 490, 600 nm (respectively). A corresponding quadriband filter set was inserted in the microscope (dichroic and emission filters from F66-888 set, AHF). Alternatively, an HBO lamp (100 W, X-Cite 120) was connected to the LED illumination system via an optical fibre and was used, together with suitable filters sets for FITC and TRITC excitation (Semrock). The switch between HBO and LED illumination was made using an internal motorized mirror controlled by Zen software.

2.6.3. Coupling

No triggering connection is made between the AFM group (AFM head, AFM controller, AFM computer) and the optical group (optical microscope, camera and imaging computer).

2.6.4. Noise and temperature control

The AFM and optical microscopes were isolated from ambient acoustic and mechanical noises using acoustic foam and an active damping table (Halcyonics). All experiments were carried out at 25 °C (except when mentioned), for no more than an hour and a half when cells were present, before replacement of the substrate, cells (if any) and cantilever.

2.7. Cantilever modification: glueing a bead

9.6 μm diameter latex beads (Invitrogen) were glued at the end of MLCT-UC levers using micro-manipulation techniques on a Biomembrane Force Probe/Micro-manipulation set-up [35]. Briefly, a diluted ultra pure water suspension was let to dry on a coverslip and an UV curing glue (OP29, Dymax) was spread close by. A cantilever (attached with double face tape onto a 3D micro-manipulator (Sutter Instruments)) was first dipped into the glue, then approached from a bead under constant bright field microscopy observation. After lifting the bead from the surface, the glue

was allowed to pre-polymerize for > 5 min under the direct light of the halogen lamp of the microscope set to its maximum power. Then the lever was collected and cured for 20 min in a UV oven at maximum power (BioForce Nanosciences). The presence and position of the bead was checked by microscopic observation of the lever at the end of the process, from a top view and from a side view, allowing a precise determination of its radius using Fiji software [42] (see Supplementary Fig. 1B). Note that the chosen glue does not introduce any large auto-fluorescent background as it has been observed with 2-component epoxy glues (the auto-fluorescence being slightly present in the B light, but not in the G or R ones, not shown). The rigidity of the bead/glue/lever link is far greater than the one of the tested cells as seen as a rigid, linear behaviour when calibrating the modified lever in situ on glass.

2.8. Mechanical characterization of the cells as a function of labelling

In order to measure the local Young modulus of the cells, AFM indentation experiments were performed using non modified MLCT-AU levers. Adhered cells were selected by optical examination and the pyramid shaped tip was positioned in the centre of the cell. Resulting Young moduli were found to depend neither on the fine positioning of the lever when indenting the central, higher part of the cells (excluding any lamellar, thinner structure that may exist at the border of the cell) nor for the use of MLCT levers with or without gold coating (not shown).

The maximal exerted force was set at 500 pN (leading to indentation depths of the order of $1 \mu\text{m}$), the contact duration at 0 s, the speed of pressing and pulling at $2 \mu\text{m/s}$ in all cases. At least 10 force curves were recorded for each cell. Each force curve was examined visually and processed with the JPK DP software (JPK Instruments): corrections for baseline, possible tilt of the baseline and a modified Hertz model for pyramidal tips were applied (see above), making the hypothesis that the cell behaves as an incompressible material [37]. The entire force span (from the baseline to the maximal contact force) was fitted. A median value per

cell was then calculated and tabulated, leading to the distribution for at least 13 cells in each condition, with or without the Fluo4 labelling. The resulting box-plots were then plotted using Matplotlib (<http://matplotlib.org/>) and Seaborn (<http://stanford.edu/~mwaskom/software/seaborn/>) Python libraries. No obvious correlation between the Young modulus and the force curve number (corresponding to the “mechanical history” of the cell) was observed and, during occasional longer (> 1 s) contact times experiments, no large difference in relaxation patterns of different cell types was revealed (not shown).

2.9. Study of the coupling signal

Clean coverslides were mounted directly in the Biocell or CoverSlip Holder (JPK Instruments) and covered with $700 \mu\text{L}$ PBS $1 \times$ w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Unless indicated, the experiments were performed at room temperature.

After calibrating the desired lever and checking that its spring constant was consistent with the manufacturer's nominal value, the lever's end was set at a height of $\sim 7.5 \mu\text{m}$ from the coverslip (Fig. 1A). This distance is comparable to the typical thickness of a T cell or a macrophage attached to a substrate (up to $10 \mu\text{m}$). Focus was adjusted, in bright field, onto the lever end.

Using Zen software (Zeiss), the wavelength, power (in %), duration and interval (s) were chosen and sequences of light pulses (duration 0–500 ms, intervals 200 ms–several seconds) were flashed using the LED illumination system onto the lever. Simultaneous recording of the lever deflection was made at 1 kHz using the JPK SPM software Real-time option. Data was saved as text (.csv) files and processed using IgorPro (Wavemetrics) or Python 2.6 for measurements using built-in procedures or programmed ones. Final values were stored in LibreOffice Calc sheets. The resulting data graphs were then plotted using Matplotlib.

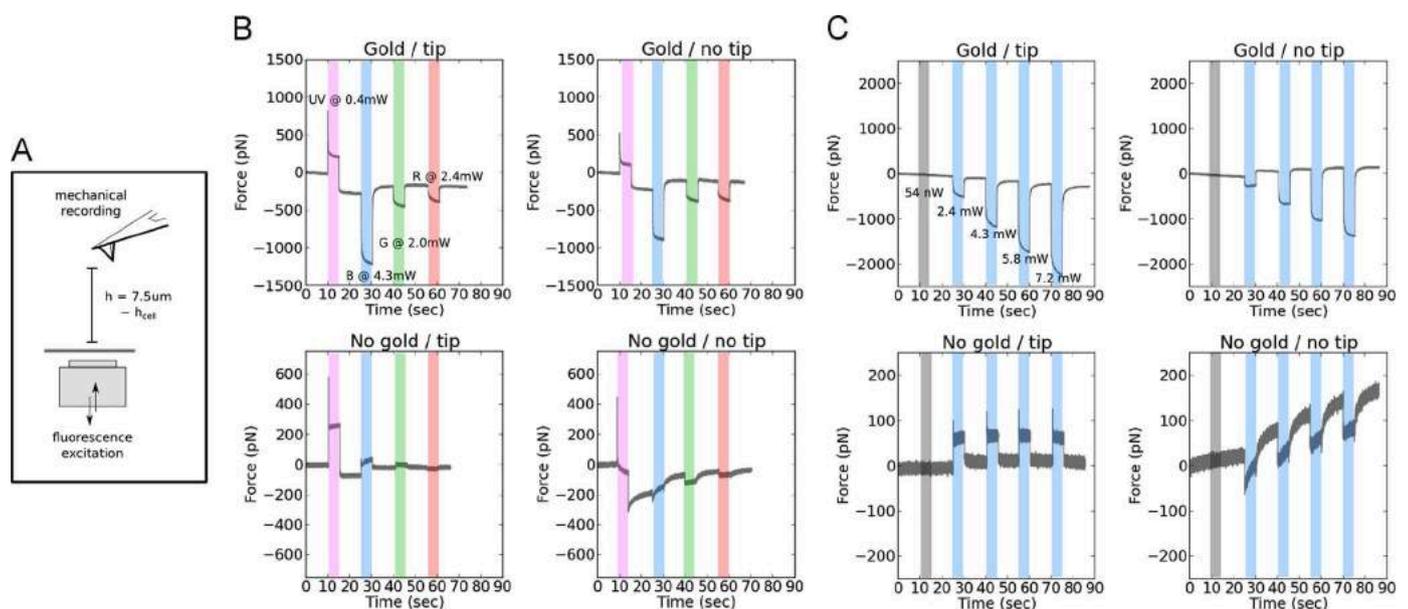


Fig. 1. Observation of the AFM/fluorescence coupling signal. 5 s fluorescence excitation was used at different wavelengths, with a MLCT large triangle lever with or without gold, with or without tip. (A) Schematics of the experiment. The cantilever end is set at a height of $\sim 7.5 \mu\text{m}$ above the coverslip (see text). (B) The coupling signal shape and sign depend on the type of coating of the lever and on the wavelength of the excitation. These representative signals have been acquired at the half max power of each diode (UV (violet), B (blue), G (green) and R (red)), corresponding to the noted power values. (C) Signal intensity variation upon increasing the blue diode power (0%, 25%, 50%, 75% and 100% of diode power, corresponding to the indicated real measured power values). Levers with a gold coating show a strong dependence of the coupling signal at 470 nm excitation upon its power (grey stripe, off; blue stripes, on), whereas the non gold coated levers appears to be rather insensitive to this parameter. On (B) and (C), the relaxation for the levers with a gold coating to come back to its resting state appears to be slow, and drift is more important. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

2.10. Light power measurements

The power of the excitation fluorescence light was measured using a PM100D power-meter (ThorLab) in combination with a S120C probe (ThorLab), directly at the exit of the objective. With the help of a paper sheet, the focusing of the lens of interest ($40\times$ NA0.75 for force measurements or $20\times$ NA0.8 for light stimulation ones) was made using 470 nm visible diode (LED configuration B). Using the microscope stages, the x,y position of the detector was set so that the resulting measured power did not vary for any minute motion of the detector over the lens. Wavelengths and nominal power (LED illumination %) were varied using the remote control of the LED system (Zeiss), while the mean value and SD over an averaging period of 10 s were measured. No wavelength correction was applied to the signal detected.

2.11. Following the dynamics of the LED system emitted light

A high speed giga-ethernet camera (GE 680, Prosilica), attached to a computer independent of the AFM / fluorescence set-up, was used in combination with the JAI SDK and Control Tool (<http://www.jai.com>) to record the excitation light sequences emitted by the LED system. These sequences were imposed by the Zen software (Zeiss). A semi-reflective filter was used to redirect part of the light onto the fast camera set to a ROI size that allowed acquisition up to ~ 1000 fps. The exact frame rate was recorded by JAI SDK while taking the movie. The obtained movies were processed using Fiji to calculate the mean intensity of the images vs. time. The subsequent data was plotted and analysed using Matplotlib library for Python (see Supplementary Fig. 3A).

2.12. Mechanical stimulation of cells and recording of calcium fluxes

Adherent and Fluo4 loaded lymphocytes, or macrophages, were contacted with bead decorated levers under a max force of 1 nN, with a pressing and pulling speeds of $1\ \mu\text{m/s}$ for a total cantilever travel distance of up to $10\ \mu\text{m}$. Typical contact times were 180 s for lymphocytes and 120 s for macrophages. Fluorescence was simultaneously excited by 200 ms pulses of 50% LED in configuration B (~ 4.5 mW), separated by 2 s intervals.

Images were saved as .tiff files sequences and processed using Fiji software: the background, the cell submitted to the mechanical forces and eventually some surrounding cells were ROI-ed using the circle tool with zones of equal area, then the fluorescence level, F , (as grey levels) was measured. Ad-hoc Python or IgorPro procedures were then used to automatically (a) subtract the background, F_0 , from the cell fluorescences frame per frame (b) calculate the ratio F/F_0 (c) post-synchronize the fluorescence ratio with the force as a function of time by aligning the first coupling signal to the first picture data. The synchronization of the other coupling signals/frame fluorescence signals was carefully inspected along the force vs. time curve. The resulting graphs were plotted using Matplotlib library for Python 2.6.

2.13. Mechanical recording of the effect of activating Rac-PA

Rac-PA transfected cells were selected by imaging them with B light at 100% for 250 ms using a $20\times$ NA 0.8 lens (~ 36.8 mW). After setting the lever above one cell, the sample was kept in dark for a couple of minutes i.e. far longer than the half life of the excited state [38].

2.13.1. Before/after experiments

Up to 10 force curves were taken at 1 nN max force and $1\ \mu\text{m/s}$ speed, with a gold coated lever with a pyramidal tip. Then, a 15 s light pulse was used to activate the protein by illuminating the

entire field of view. Then, up to 10 additional force curves were taken subsequently, as soon as the fluorescent light was switched off. Using the same methodology as described above, we measured the Young modulus for each indentation curve. Median values, for each cell, before and after the pulse were calculated and plotted as a box-plots, for cells having been (or not) transfected with the plasmid and (or not) starved overnight.

2.13.2. Real time experiments

A succession of force curves (max force 500 pN, speed $1\ \mu\text{m/s}$) were continuously taken using a lever without gold coating and with a pyramidal tip. The 15 s pulse was applied by illuminating the entire field of view. The force data were recorded in real-time at 1 kHz together with separate force curves (which were used to obtain the Young modulus). The post-synchronization of Young modulus vs. time was performed as follows: on the force vs. time plot, the coupling signal was observed and used, together with the position of the first maximum in force as obtained using Python. The position of the subsequent maxima was used to position the Young modulus values versus time. Note that the separation in time is not homogeneous because it depends on the local value of E (the smallest the E , the longer the time to reach the max force will be) if one indexes the max value of indenting force to the image time stamp.

2.14. Statistics

Data processing was performed using open source softwares on Linux PC machines. Linear fitting was performed using QtiPlot (<http://www.qtiplot.com/>) software and cross-checked using Statsmodel library for Python 2.6, and Calc from LibreOffice 3.5. Box-plots were plotted using Python Seaborn library using Spyder2, and cross-checked with classical Python Matplotlib and R procedures. Data were processed using R/Studio softwares for statistical analysis using existing packages (<http://cran.rstudio.com/>, packages asbio and pgirmess for Kruskal–Wallis or Wilcoxon tests).

3. Results

3.1. The fluorescence excitation light causes the AFM lever to bend

As reported qualitatively in the AFM community (see Section 4), a coupling signal is observed between cantilever deflection and fluorescence illumination (Fig. 1). Here, the use of a diode illumination system allowed to vary systematically the wavelength, power, duration and intervals of the light pulses. Since neither a shutter is used nor a mechanically moving piece attached to the optical microscope, on which this AFM stands, such an illumination system has no direct mechanical impact on the entire set-up: as a control, the system was set on/off for a controlled duration with a diode power of 0 W, and no signal was seen (Fig. 1C, shaded zones). The characteristic time for the diodes to reach their plateau emission for a given power is < 1 ms (data from provider and Supplementary Fig. 3A), much lower than the typical illumination durations that are used for regular fluorescent compounds typically used in biology to get good S/N ratios (~ 100 ms).

The coupling signal was verified to be reproducible (Fig. 2A, Supplementary Figs. 3 and 4); its shape (for visible excitation wavelengths) and magnitude varied strongly as a function of the presence or absence of a layer of reflective gold on the backside of the cantilever (Fig. 1B). The magnitude varied strongly upon the power of the excitation light at a given wavelength when the lever was coated with gold, and showed very little, if no, variation when no gold layer was present (Fig. 1B, C, Supplementary Fig. 2). For a

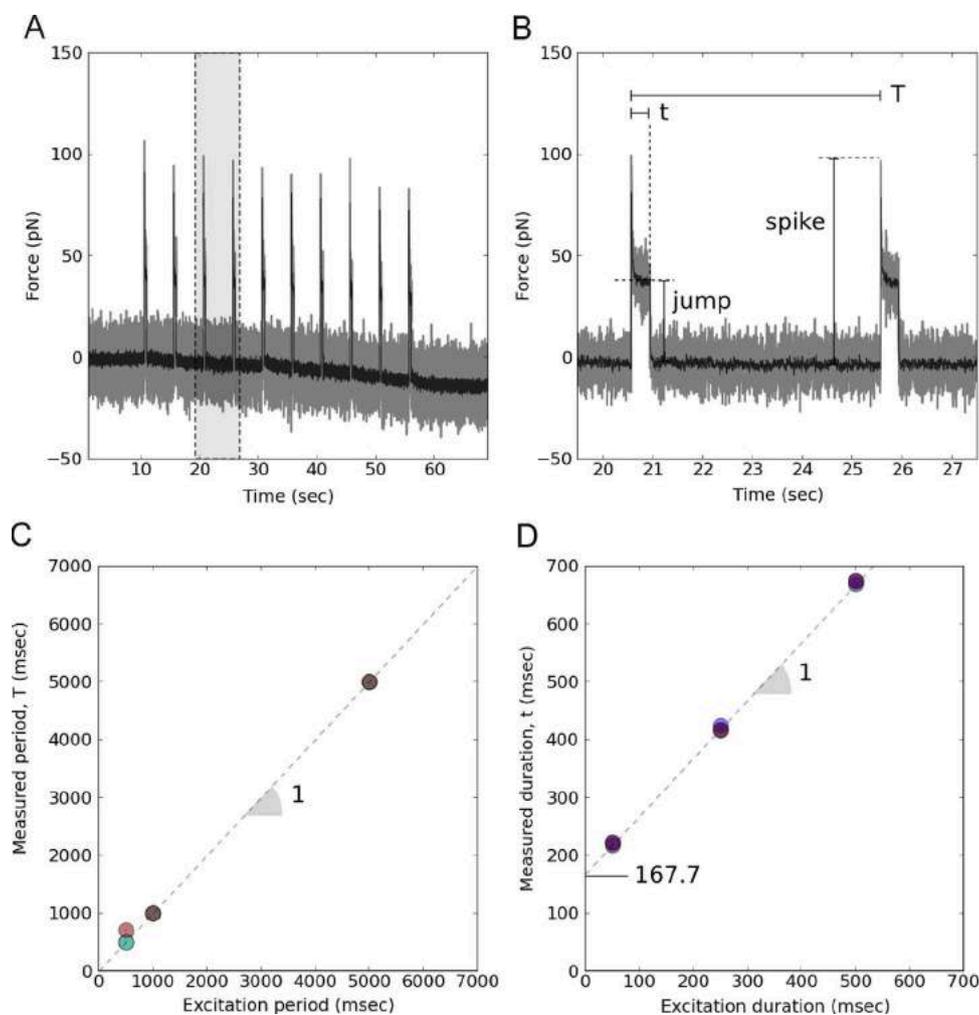


Fig. 2. Using the coupling signal as a timer. Characterization of the coupling signal observed at 470 nm. (A) Typical repetitions of short pulses (50 ms every 5 s) of excitation light as recorded by the deflection of the lever for MLCT-UC large triangle lever. (B) zoom, corresponding to the grey zone in (A), on two successive signals detailing the shape of the signal. T is the period and t the duration of the response of the lever to the light pulse. (C) Period of the observed lever bending, T , as a function of the imposed excitation period. The SD of the measurements (over at least 10 measurements) are smaller than the marker size. Combinations of imposed durations (50, 250, 500 ms) and imposed periods (500, 1000, 5000 ms) are represented as points of different colours (red, blue, green, as a function of the value of duration) that collapse as black dots except for the case of $t=T=500$ ms (red dot). The dotted line is a slope/linear fit of slope 1.0 with a $R^2=0.99$. (D) Duration of the observed lever bending, t , as a function of the imposed excitation duration. Combinations of $t=50, 250, 500$ ms and $T=500, 1000, 5000$ ms are represented as points of different colours (as a function of the value of T). The SD of the measurements (over at least 10 measurements) are smaller than the marker size. The dotted line is a linear fit of slope 1.0 and intercept 167.7 ms with a $R^2=0.99$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

given lever type, the shape and sign (i.e. positive or negative forces) appeared to be dependent on the wavelength (Fig. 1A, in particular when comparing visible vs. UV lights, and Supplementary Fig. 2). The relaxation of the lever was slow when gold was present and rapid otherwise (Fig. 1C). The presence of a glued bead of 10 μm in diameter, or its type (polystyrene or glass) did not modify largely the shapes and magnitudes of the observed signal (for G light, see Supplementary Fig. 6F, G; for other wavelengths, the results were similar, not shown). We did not vary systematically the size of the bead, but from our results one may infer that beads up to 10 μm in diameter do not strongly affect the signal, regardless of their composition. This is also supported by the fact that the effect of the presence of the tip was rather negligible under our experimental conditions, in regard to chemical treatment or presence of gold (Supplementary Fig. 2). Aside, (i) the absolute deflections were very large for UV light for all cantilever types and for visible light when gold coating was present (e.g. for commercial levers, ~ -2000 pN with gold vs. $\sim +50$ pN without gold for 470 nm excitation at maximal diode power) and (ii) the AFM showed a higher stability in time (i.e. smaller baseline variation) when using gold-less cantilevers (Fig. 1).

The main effect of the absence of gold coating was to abolish the variation of the shape and intensity of the coupling signal as a function of the excitation power for visible wavelengths, and to keep the observed deflection at low forces in particular for the 470 nm excitation (Fig. 1C). This wavelength corresponds to the excitation of calcium reporter molecules of the Fluo4 family that were of particular interest for the present study. As a consequence, we set out to characterize the step-like coupling signal observed with commercially available MLCT-UC levers (having a tip but no gold coating), in order to use it as a timer signal. Such levers have the advantage of not suffering from harsh acidic treatment that may damage them or be imperfect (Supplementary Fig. 1A).

By inserting an IR filter in the AFM head (780 nm, diameter 12.5 mm, Edmund optics, maintained on the JPK glass block using immersion oil), it was verified that the observed signal was not created by an incoming light from the visible diodes onto the QPD (not shown). Using AFM force mode in either constant height or constant force mode during the contact with a hard glass substrate, it was concluded that the signal resulted from an actual bending (potentially with complex modes of deformation) of the lever by observing its decrease or disparition (Supplementary

Fig. 4). Moreover, the signal did not appear to vary (for gold less levers) when the cantilever travelled towards or away from the substrate over several micrometres, at various speeds.

The magnification ($10\times$, $20\times$, $40\times$) and the NA of the lens (air $40\times$ NA0.5, air $40\times$ NA0.75, oil $40\times$ NA1.20) were varied and the coupling signal was observed in all cases, with variable intensity but qualitative identical behaviour/shape (not shown). We then chose for the rest of the study the $40\times$ NA0.75 air lens since it represented a good compromise between working distance, magnification and sensitivity for fluorescence measurements for our cell types. Moreover, this air lens does not introduce any supplementary mechanical coupling between the AFM and the optical microscope.

3.2. Using the coupling signal as a timer

We studied the characteristics of the coupling signal observed in the case of a commercial MLCT-UC lever (Fig. 1C, magnified in Fig. 2) in order to determine how to use it to synchronize the AFM force signal and the fluorescence imaging. The coupling signal is composed of a rapid, almost instantaneous, spike, followed by a rectangular jump. We submitted a large triangle lever to periodic illumination of B light of controlled duration and period and quantified the effect in terms of time (duration, t , and periodicity, T , Fig. 2) and magnitude (amplitude, in force) (Fig. 3). Keeping the medium at room temperature ($\sim 20^\circ\text{C}$) or imposing the temperature to be 25 or 37°C using a temperature control system (Biocell, JPK Instruments) did not change the observations reported below (not shown).

The period, T , varied linearly, as expected, with the imposed illumination period, with a slope of 1.0 (Fig. 2E). Combinations of imposed durations (50, 250, 500 ms) and imposed periods (500, 1000, 5000 ms) are represented as points of different colours (as a function of the value of duration). They collapse as black dots except for the case of duration=period=500 ms (red dot). A first conclusion is that the coupling signal could then be used reliably as a timer.

The duration of the lever deflection, t , was measured as a function of the imposed excitation duration (set via Zen software), on the same lever, with the same combination of duration/period (coded in colours in Fig. 2D). A linear response is achieved with a slope=1.0 but with an intercept of 167.7 ms, showing that the recorded response of the lever is longer than the desired excitation. We found this extra duration to originate from the [camera

(firewire)/diode illumination system (USB2)/acquisition software] part of the set-up, and could not be decreased very notably by playing either on the ROI of the acquisition or on the camera binning (Supplementary Fig. 3). This introduces a limitation on the shorter excitation/shorter periods that can be used with our system.

We further examined the force characteristics of the coupling signal on three of the softest levers commonly used in biology: MLCT-UC 10 pN/nm (large, triangle), 20 pN/nm (rectangle), 30 pN/nm (small, triangle) (Supplementary Fig. 1A). While the rectangular jump height did not appear to depend on the excitation power at 470 nm (Fig. 3A), the spike seemed to be more variable for a given power (higher SD) and for varying powers (Supplementary Fig. 3A). The shape of the lever appeared to have a rather strong influence on the spike height (Fig. 3B) and only a moderate one on the jump height (Fig. 3C). It is noteworthy that the two signals were always $>5\times$ and $\sim 2\times$ (respectively) higher than the typical noise of our AFM (~ 15 pN). As a consequence, this signal could be always seen and, as long as forces that are used / measured are on the 500–1000 pN range, would be only a moderate modulation of them. Interestingly, the large triangular and the rectangular levers appear to have to the smaller signals of all.

In order to extend the use of this signal as a timer, we examined the use of two wavelengths, either consecutively or simultaneously, and confirmed that the use of gold-less cantilevers can be efficiently extended to such a situation with similar precautions and restrictions (Supplementary Fig. 5). This leads to envision the use of this system for dual stimulation dyes or combinations of dyes for ratiometric measurements (e.g. Fluo4/Fura-Red), in combination with a vibration free, single camera, dual-detection using e.g. a DualView (DV2, Photometrics) system (see Section 4).

As a conclusion, the observed coupling signal for gold-less levers could be efficiently used as a way to synchronize the fluorescence images and forces in a mechanical stimulation experiment, whilst perturbing very moderately the applied or measured forces.

3.3. Immobilisation of immune cells and activability

We selected PLL as a relatively non-activating but efficient binding molecule for Jurkat T cells [9]. To verify cell activability, we used $10\ \mu\text{M}$ ionomycin in DMSO to stimulate adherent Fluo4 loaded cells. The max F/F_0 ratio was observed to be ~ 6.2 for

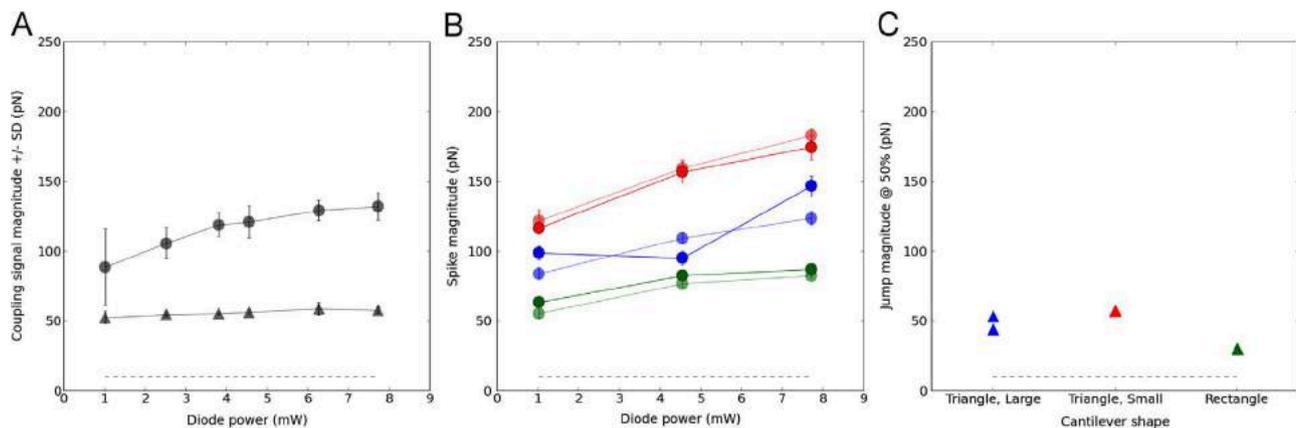


Fig. 3. Effect of lever shape and spring constant on the coupling signal. (A) Influence of the excitation power upon the spike (circles) and jump (triangles) magnitudes for a MLCT-UC large triangular lever. The jump appears rather independent of the power, smaller than the spike signal by at least a factor of 2, and the two signals are always larger than the typical noise of the experiments. (B) Influence of the power on the spike intensity (which shape does not vary) for two MLCT-UC cantilevers sets, showing the chip-to-chip variability (with $k=11.8$ – 17.44 , 38.9 – 38.7 , 18.2 – 21.9 pN/nm respectively for large triangular (blue), small triangular (red) and rectangular levers (green)). (C) Same levers as in (B), but for the magnitude of the jump (same colour coding as in (B)). The presented data was gathered using an excitation power of 4.3 mW and $t=200$ ms. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

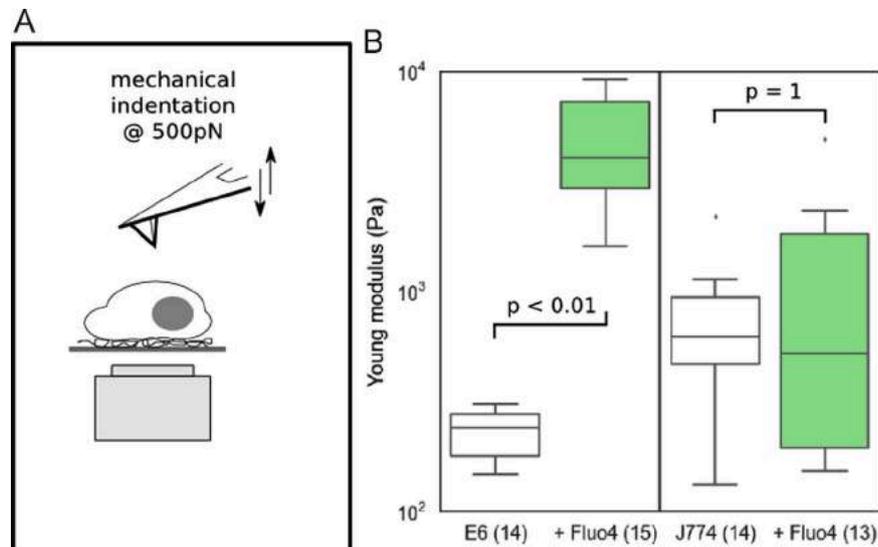


Fig. 4. Mechanical characterization of PLL adhered lymphocytes and adhered macrophages using a pyramidal indenter. (A) Schematics of the experiment. (B) Young modulus (log scale) as a function of cell type (left panel, Jurkat T cells; right panel, J774 macrophages) and labelling with calcium reporter (white boxes, no dye; green boxes, with Fluo4). The number of tested cells are indicated for each conditions. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

populations of Jurkat E6.1 cells (as compared to 2.6 when DMSO alone was used). For untreated glass adhered J774 macrophages, we found this ratio to be ~ 5.2 (as compared to 2.6). Experiments were performed at room temperature to avoid excessive sequestration of the Fluo4 dye in organelles. Using soluble activating anti CD3 antibodies led to calcium fluxes in Jurkat cells, with lower maximal ratio in comparison to ionomycin (not shown).

3.4. Quantification of cell mechanics as a function of cell type and Fluo4 loading

Using the pyramidal tip of soft gold coated levers, the mechanics of immobilized model lymphocytes and macrophages was investigated. Their Young modulus, E , was measured over the entire indentation range, using a given max contact force (500 pN) and at a given speed ($2 \mu\text{m/s}$) (Fig. 4). We found E values in the range of 100–1000 Pa, coherent with the values found in the literature for various types of white blood cells [9,43,44]. These values did not vary largely, for the Jurkat cells, when the temperature was 25°C or 37°C , or when the speed used for pressing the tip on the cell was varied between 1 and $10 \mu\text{m/s}$ (not shown), indicating a weak contribution of cytosol viscosity in this range of stimulation frequencies. The basal mechanics of the two cell lines was similar for the populations tested, the macrophages being slightly more rigid than the T cells (which is consistent with Ref. [45]). For the macrophage line, the labelling with Fluo4 did not exhibited a marked difference to the basal level. Interestingly, the Jurkat cell

line exhibited a significant variation of its Young modulus: the cells were more rigid when loaded with Fluo4 with no supplementary modification of the cells environment (Fig. 4).

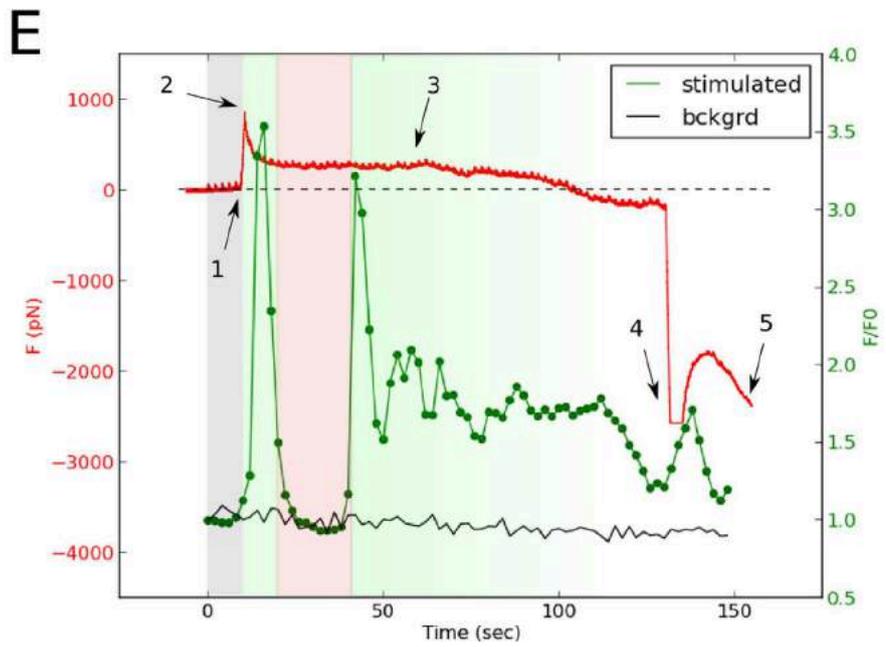
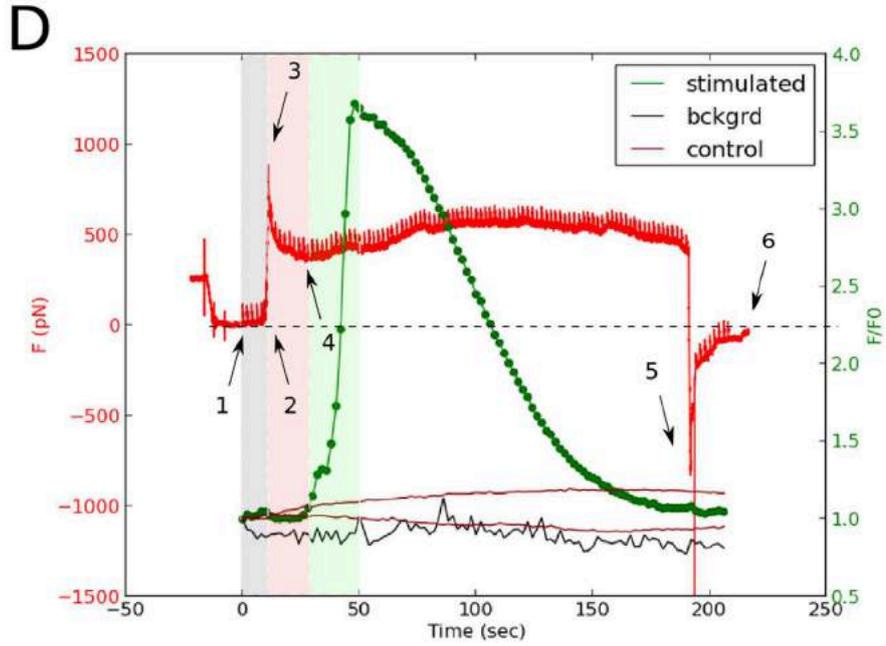
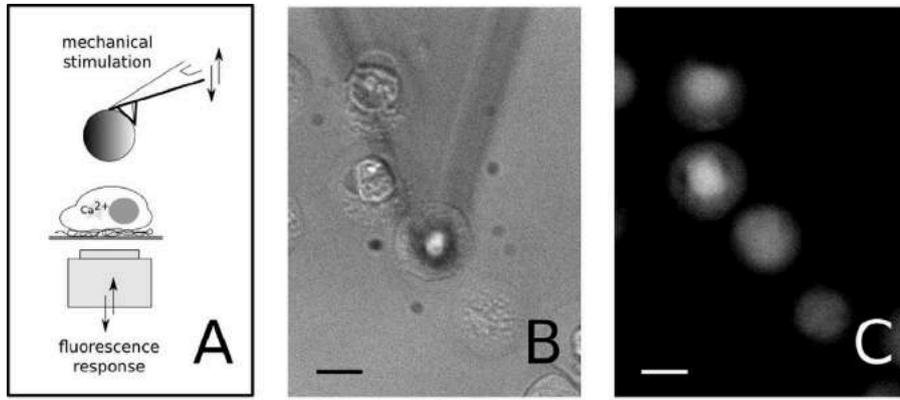
3.5. Mechanical stimulation of a single cell

The coupling signal was used as a way to synchronize a micro-mechanical stimulation of a single cell and the simultaneous recording of intracellular calcium fluxes. Experiments were performed, at 25°C , by pressing a bare latex bead, glued to the large triangle of MLCT-UC (no gold, nominal constant 10 pN/nm) onto adhered, Fluo4 loaded cells, while having set the focus for the optical detection onto the equator of the cell. Two prototype patterns that recapitulate the essential steps observed for the cells exhibiting visible calcium fluxes are presented in Fig. 5.

Upon reaching a pre-set maximal contact force of 1 nN (Fig. 5D #3, E #2), the piezo motion was stopped using closed-loop system, for a purely mechanical, continuous, stimulation. The cell could relax the stress via its viscoelastic properties (Fig. 5D #4, E #3) [46] and even apply pulling (negative variations) or pushing (positive variations) forces to the stimulating bead (Fig. 5D #4–5, E #4–5) [31].

For model T cells, when observed, the calcium signal was showing a single peak, delayed from the force peak, here $\sim 30 \text{ s}$ apart (Fig. 5D). The calcium peak was often observed to synchronize with some active behaviour of the cell (Fig. 5D, after #4), as monitored by modulations of the force levels achieved after the

Fig. 5. Mechanical stimulation of adhered cells while monitoring internal calcium fluxes with Fluo 4 dye. We used MLCT-UC large triangle with a bare $9.6 \mu\text{m}$ latex bead glued in front of the tip (see Supplementary Fig. 2). (A) Principle of the experiment, where a bare bead is approached from a cell at a given speed and pressed up to a force of $\sim 1 \text{ nN}$. At that moment, the position of the piezo is maintained constant, and the cell adapts and reacts to the applied force. (B) Transmission micrograph of the experiment, where the bead has been placed upon the centre of a Fluo4 loaded cell. (C) Corresponding fluorescence image. Bars: $10 \mu\text{m}$. (D) Result of a stimulation on a PLL adhered Jurkat T cell (continuous contact of 180 s), after synchronizing the first picture (green point, 1) with the first spike of the coupling signal on the force curve (red line). Forces and fluorescence are represented versus time. The fluorescence (green dots) is corrected from the background signal frame to frame using Fiji plugins, and normalized to the first image (F/F_0). (1) first image; (2) cell/bead contact; (3) reaching maximal contact force, followed by cell viscoelastic relaxation; (4) when the cell starts pushing on the bead i.e. the force increases, the calcium signal appears significantly. Afterwards, the cell pushes/pulls on the bead as the modulation of the recorded forces shows. (5) When pulling, the cell appears to adhere to the latex bead but can be completely separated from it as the force goes back to the baseline. We observed that shorter continuous contact times (typically up to 20 s) did not produce such calcium rises. (E) same as (D), but with a J774 macrophage (continuous contact of 120 s). (1) bead/cell contact; (2) reaching maximal contact force before viscous relaxation; (3) force oscillations when calcium signal oscillate; (4) when pulling the bead away, the cell strongly adhere to it and eventually is released, in (5), from the surface. This could be a signature of a phagocytic-like behaviour. In (D) and (E), grey stripes are zones where the piezo moves, before the bead to cell contact. After the contact, red stripes are denoting low calcium levels, whereas rising or high calcium regimes are in green. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



partial relaxation of the contact force. Surrounding, non mechanically stimulated cells were neither showing such a calcium peak, nor fluctuations (Fig. 5D, control). The observed fluorescence signal eventually plateaued and quickly decreased with different intensity vs. time slopes (slow then fast, then slow), potentially due to the combined effects of the return of the cell to its basal calcium level and/or the Fluo4 bleaching. When the bead was finally pulled from the cell surface, non specific adhesion was recorded (Fig. 5D #5), but total separation was possible for the accessible piezo pulling range (Fig. 5D #6), the cell staying attached firmly onto the PLL, with no apparent damage as observed in transmission microscopy. Sometimes tethers that were pulled from the cell and not fully detached at the end of all processes were observed (not shown).

For model macrophages, the pattern of fluorescence was observed to be more complex, often exhibiting oscillations in response to mechanical stimulation (Fig. 5E). The fluorescence fluctuations did not seem to be correlated with force fluctuations (Fig. 5E #3). The most prominent differences with the T cells appeared during the relaxation phase, where negative forces were recorded, meaning that the cell pulled on the bead (Fig. 5E #4), and during the separation process where the recorded adhesion forces were exceeding the detectable bending capabilities of the lever/QPD system (Fig. 5E #5). When moving away the lever from the surface by using AFM head motors and introducing a lateral motion of the head, the macrophage was always found to have detached from the substrate and to be bound to the bead, indicating that a potential phagocytosis event was at play [47].

3.6. Mechanical recording of Rac activation in Jurkat cells

A reciprocal approach to the previous experiments consisted in using the coupling signal between fluorescence and AFM force mode to follow the real-time mechanical modifications of photo-activable Rac transfected Jurkat cells.

First, mechanical characteristics of cells upon activation of Rac were examined at a population scale, with a “static” approach, by measuring the elastic modulus before and after an activating light pulse, using unmodified MLCT-UC levers. Median values, for each cell, before and after the pulse were calculated and plotted together with descriptive parameters of cell population as box-plots, for cells having been (or not) transfected and (or not) starved overnight, in combination (Fig. 6A–D). Comparison of the median of the cell population did not show the existence of a strong effect, but the close examination of the behaviour of individual cells (using the connecting lines on Fig. 6A–D) showed that, when Rac-PA was present and activated, more tested cells were showing an increase in their rigidity. This was confirmed by the examen of the fraction of cells exhibiting an increase in E over the activation of Rac-PA (i.e. having a median E after light pulse to median E before ratio greater than 1), for the different cell conditions (Fig. 6E). This effect appears to be mainly due to the action of Rac-PA (see Fig. 6A vs. C, Fig. 6B vs. D, and E) rather than to starvation (see Fig. 6A vs. B, Fig. 6C vs. D, and E). Aside, the spreading of the distribution before and after the light pulse did not appear to be different, indicating that cell populations mechanical heterogeneity was not affected. Interestingly, the starved cells appeared to be significantly stiffer than the non starved ones. In another set of experiments (to be reported elsewhere), the transfection protocol of Jurkat with various plasmids was observed not to largely modify Young modulus values obtained under moderate indentation forces (500–1000 pN).

In order to dissect the behaviour of individual cells, preliminary experiments were performed to follow in real-time the Young modulus of a given cell, using a MLCT-UC large triangle lever, when stimulating the cell with 470 nm intense light (~ 37 mW for

$20 \times$ NA0.8). Starved Rac-PA transfected cells were used since they appeared previously to have a strong response to the stimulation (Fig. 6E). The coupling signal was used here to detect the beginning of the stimulation period in the real-time recording of the force, hence to place the measured values of E vs. Time and the stimulation duration, as exemplified on Fig. 6F–H. This allowed to observe that (i) the effect of the activating light was almost immediate, (ii) reached a plateau after the pulse was stopped and (iii) rapidly decayed (< 45 s duration, which is consistent with published data [38]). The values before and after the pulse were similar, and some cells exhibited a strong variation of E upon stimulation, as could also be observed in individual median signals from Fig. 6D. The rapid and transient, reversible nature of the light induced perturbation may lead to an apparent weaker effect when calculating a median over time in the regions before and after the activating light pulse in the previous experiments. As a conclusion, the presented AFM/fluorescence coupling effect allowed to directly, and in real-time, observe modulations of the cell mechanics upon light activation of Rac that the simple examination of population behaviours may have not allowed to detect.

4. Discussion

A deflection signal that appears when usual wavelengths of fluorescence excitation light are shone onto a soft AFM lever has been observed and described. This coupling signal varies (i) in shape as a function of the presence of a reflective gold layer and as a function of the wavelength used, and (ii) in intensity as a function of the power of the light when a gold coating is present. However, this signal appeared to be, in the absence of gold reflective coating, regular and of small amplitude (~ 50 – 100 pN), with the same period as the imposed excitation, and with a controlled duration that varies with the duration of the excitation. It was concluded from controls that this signal cannot be totally removed, but minimized by using the proper type of commercially available AFM levers.

Importantly, it must be noted that this coupling effect has been observed qualitatively among several labs, with different brands/types of AFM, and with light sources such as halogen lamps, diodes or lasers (C.M. Franz, F. Rico, A. Rigato, F. Eghiaian, personal communications, among others), but it has not been fully described and, to our knowledge, never exploited as we propose here.

As a consequence, we chose to use it to synchronize the signals coming from the AFM (force) and from the fluorescence detection (image) with no additional electronics, in mechanical stimulation experiments where the cellular consequences activation was followed by simultaneous fluorescence measurements. Conditions for this usage as a timer were established in time ranges that are compatible with the use of single wavelength calcium probes such as Fluo4 to have (i) sufficient excitation for a good detection and (ii) minimize dye bleaching.

Subsequently, this signal was used to follow, in real time, calcium response of T cells and macrophages when submitted to a purely mechanical stimulation to demonstrate the capabilities of the AFM/fluorescence set-up and the richness of the accessible mechanical, adhesive and signalling information. Single cell passive (elastic deformation and viscous dissipation) and active behaviours (pushing/pulling) were recorded with an excellent control over forces and times.

We also used the coupling signal in a reverse way, in order to record mechanical perturbations of single T cells when cytoskeletal modifications were induced by the use of a photoactivable Rac. It was observed that the protein modified the mechanics by stiffening the cell. Single cell recording allowed us to observe

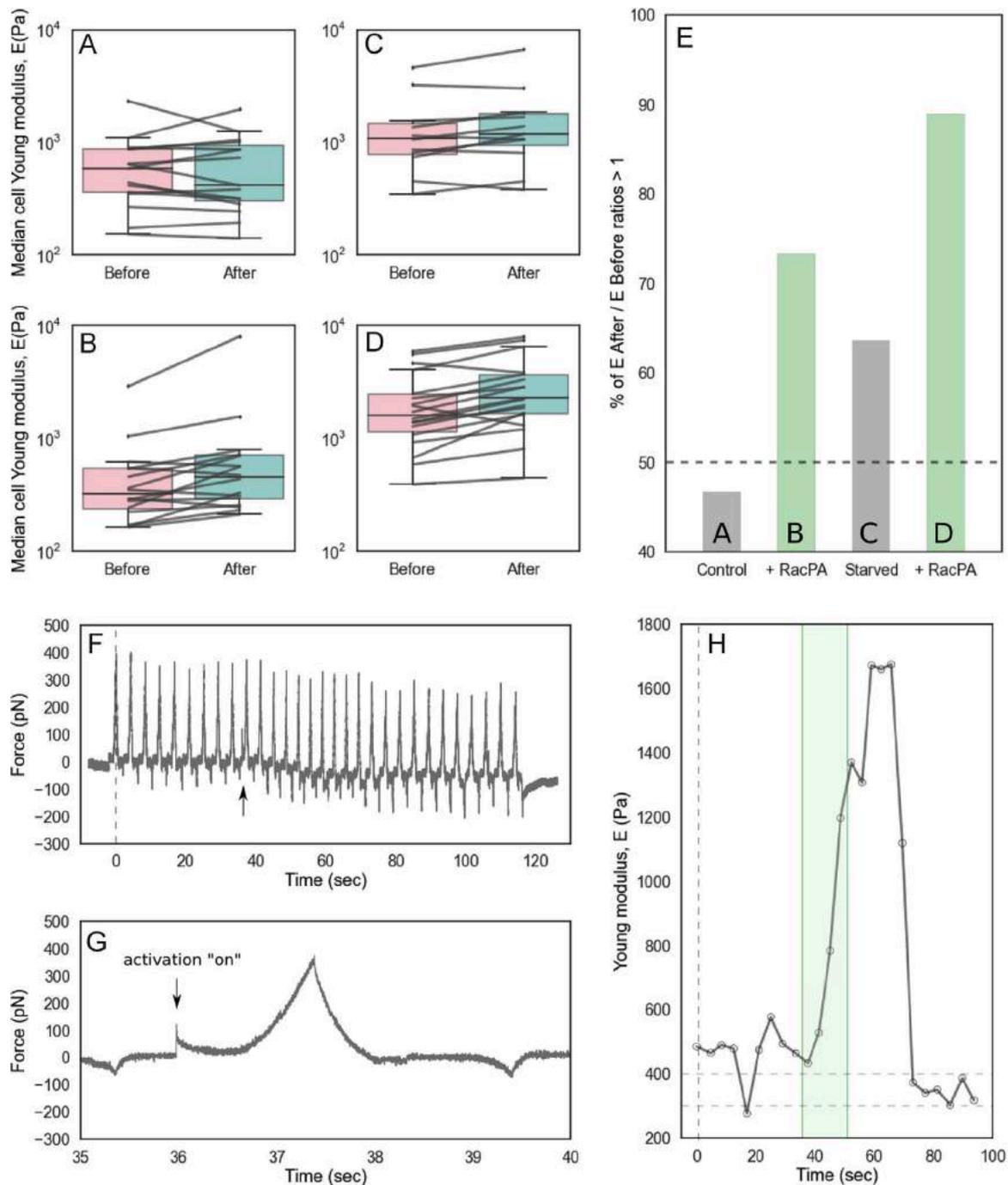


Fig. 6. Recording of mechanical response to light stimulation of Rac-PA transfected T cells. We indented the cells with large triangle levers with tip, with (A–E, MLCT-AU) or without gold (F–H, MLCT-UC). (A–D) Median Young modulus of cells distributions before and after 15 s pulse of blue light at ~ 36.8 mW (Colibri, $20\times$ NA0.8) (A) non-transfected and non-starved, (B) non-transfected and starved, (C) transfected and non-starved, (D) transfected and starved cells. Each point is a median over up to 10 force curves for one cell for each condition. Box-plots of the populations, showing that no net difference of the median values over the populations (Wilcoxon $p=0.85$ (A), 0.65 (B), 0.22 (C), 0.20 (D)). Tendencies for single cells to present an increase in rigidity when Rac-PA is present, are superimposed as dots connected by lines. (E) % of E after/ E before > 1 as a way to quantify the previously observed tendency. (F) Prototypical real-time of force application on a transfected, starved cell. (G) Zoom on the zone where the starting of the activation light at 470 nm can be detected (arrow on (F), (G)). (H) Variation of the Young modulus over the first 100 s (from (F)) as a response of a 15 s pulse of blue light at ~ 36.8 mW (green zone), showing the absence of delay, the duration and the rapid relaxation of the effect. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

delays and relaxations that might be due to the reversible photoconversion of the Rac variant among other potential causes.

Hereafter, open questions concerning the origin of this signal and limitations of its use that remain to be addressed are discussed.

4.1. Origin of the coupling signal

Controls were performed to clarify the origin of the observed coupling signal: (i) cantilever rigidity, shape, coating were tested; (ii) light intensity, wavelength were varied (the use of a mercury

lamp of 100 W provided qualitatively the same results as the ones shown here with the Colibri diode system); (iii) an IR filter was introduced in the AFM head to block any non-IR light that may have reached the QPD; (iv) temperature of the experimental buffer was not externally controlled (room temperature $\sim 20^\circ\text{C}$) or imposed at 25 or 37 $^\circ\text{C}$ in order to control the potential heating of the lever/medium by the IR laser.

It could be concluded that the signal is due to an actual bending of the lever (Supplementary Fig. 4). Low intensity fluorescence diodes, in liquid, may create a local heating of the lever, resulting in a bending since it is behaving as a bi component/bimetallic material. Commercial levers are usually coated on one side with chromium (or titanium), and in some cases with a supplementary layer of gold. When gold is present, the metallic layer deposited on the lever is thicker, so the lever is more asymmetric and possesses a more thermally conductive structure which may explain the larger effect that are observed on such levers (Fig. 1). The lever could then be understood as a local thermometer, and gold dilatation to create ample asymmetric motion of the lever, by bending it down (to negative forces).

On our set-up, the duration of the apparent effect has been shown to be biased by a residual time introduced by the fluorescence microscopy controlling system (Zen/Colibri/Camera), and could be slightly lowered (reduction $\sim 10\text{--}20\%$) by using binning and ROI-ing the image (Supplementary Fig. 3). Nevertheless, this delay was never eliminated in our hands, hence reducing the time resolution accessible.

4.2. Modification of levers

When gold coating was absent or removed, we observed (i) that the levers were more “transparent” when observed in transmission (Supplementary Fig. 1), (ii) a subsequent decrease of the sum signal of the AFM (i.e. the total reflected laser reaching the QPD), similar for absent or removed gold cases, and that (iii) in the four conditions examined, the spring constant of corresponding levers was not varying much and that the variation stayed within the observed variation between cantilevers batches.

As reported by other groups [48,49], removing gold or using gold-less levers also improved the stability of the system: the drift was reduced to almost nil (Fig. 3A). A gold-less lever offered the supplementary advantage that the placement of the tip or the glued bead onto the cell and its centring were greatly eased. On another hand, this transparency implies to verify that the IR laser used for monitoring the lever bending has no strong influence on the cell's behaviour, as sometimes reported for optical tweezers (see below).

Removing gold with harsh acidic treatment was tested here but has shown some limitations: it was difficult to robustly achieve a very homogeneous uncoating along the entire body of the levers. In Supplementary Fig. 1, zones with different contrasts can be observed, suggesting an incomplete removal of the metal layer(s). Since the acidic treatment is vigorous, the underlying attaching layer of chromium (or titanium), or even the body of the lever itself, could be deteriorated non homogeneously. This could explain the differences between commercially available levers with no gold and chemically attacked ones in particular in the shape of the coupling signal, its sign and in its relaxation dynamics. Additional XPS studies of this residual layer may help to understand better the variation of the signal by allowing a refined description of the lever surface composition.

The cantilever tip, when present, limits the size of beads that could be glued on the lever end to obtain smoother, spherical indentors for mechanical stimulation (Supplementary Fig. 1B). In order to keep the benefit of the very regular signal that was obtained using commercially available gold-less levers, a new

strategy (inspired by [50]), was preliminary tested on used levers, first washed with EtOH/ultra pure water, then air dried. A ion-beam milling set-up, coupled to a SEM, was used to cut the extremity of the lever to remove the tip without changing too much the lever length and their spring constant (Supplementary Fig. 6). In this way, the surface state of commercially available uncoated levers could be largely preserved together with their low spring constant. However, this technique is delicate and time consuming (1 lever per 20–30 min). We observed that the coupling signal for 470 nm exciting light is similar between a cut and a non cut levers (Supplementary Fig. 4D, E). The variations are of the same order as the inter lever dispersion observed (Fig. 3). The tip does not appear to contribute largely to the observed effect (Fig. 1, Supplementary Figs. 2 and 6). The same results were observed for levers without gold coating, bearing or not a 10 μm glass bead, supporting the fact that the bead does not affect much the observed signal, either in shape or in magnitude, in our optimized conditions (Supplementary Fig. 6F, G).

4.3. Lever mirror effects

Reports have shown that gold coated levers may act, when used in combination with fluorescence, as mirrors [33]. We set to observe this potential effect with non gold coated levers by measuring the fluorescence signal at different (x,y) positions under the lever when pressing/pulling on a cell that did not present a strong mechanical activation (e.g. If contact time is kept low, $\sim 10\text{--}20$ s; Supplementary Fig. 7). In such conditions, the mirror effect was observed to be of rather low intensity, depended on the initial fluorescent level of the cell under study, and potentially of its spreading state (i.e. its thickness). When compared to the activation signal that were observed in Fig. 5D, E, this mirror effect is of small amplitude.

4.4. Precautions and further developments

4.4.1. Limits of the timer

In order to be properly used, the coupling signal has to be characterized for every type of lever that could be of interest. The present article reports the use of gold-less, commercial silicium nitride levers that appear to have a reproducible, fast appearing/disappearing coupling signal, in particular when a blue excitation light is used e.g. for calcium reporters. In our hands, the main limitation is due to the existence of a ~ 160 ms extra duration of the coupling signal compared to the excitation coming from the excitation system, that, on our simple system, limits the possibility to take pictures at a high frame rate (i.e. with periods shorter than this extra duration plus the duration of the excitation). Aside, when using the coupling signal as a timer, the question of where to set the correspondence between a force point and an image (beginning, middle or end of a jump) has to be taken into account if one wants to look at short time effects (i.e. on the order of the minimal pulse duration possible). Here, we chose to align the beginning of the pulse for simplicity.

4.4.2. Other sources of excitation

Such a coupling signal can be also observed with lasers, and even in TIRF mode of illumination (C.M. Franz, personal communication). Tests have shown that the use of an HBO source using the Colibri as a shutter created a mechanical noise of rather large intensity as compared to the coupling signal, preventing its use (not shown).

4.4.3. Cantilevers without coating

When modifying the coating of the levers, precautions have to be taken to verify that (i) such levers have a sufficient reflectivity

for the AFM to perform reliable measurements and (ii) since they are more “transparent”, that the levels of infra-red or red light that pass through and hit the cell is not perturbing it. On the set-up used here, with commercial gold less levers or made using chemical attack, reflectivity was good enough to achieve a good signal to noise ratio and the IR laser did not seem to have strong effects onto the tested cells, loaded or not with fluorescent reporters, as inferred from their shape and behaviour.

4.4.4. Ratiometric or FRET imaging

We tested the superimposition of 470 nm/555 nm lights, simultaneously or one after the other, and observed that the resulting signals are additive and stay of low magnitude for uncoated levers (Supplementary Fig. 5). This opens, for example, the use of Fluo4/FuraRed mixture as a way to perform, easily, with a single detection channel, ratiometric calcium measurements. For more complex signal reporters, such as Fura2 or even FRET dyes such as ROZA, a reporter of Zap70 activation [29], the combination with a DualView detection system (DV2, Photometrics, <http://www.photometrics.com>), allowing the simultaneous detection of two wavelengths without any mobile part, on the same camera, could prove a rather easy implementation, using the coupling signal as an reliable timer.

4.5. Perspectives: stimulations using specific molecules

The present experiments open the way to mechanical (with bare beads) or specific (with beads grafted with specific, density controlled and oriented molecules) stimulation experiments. Controlling the bead size, specific molecule grafting density, indentation force, contact time, and recording the indentation depth may allow to gain a fine control on the number of molecules that are presented to the tested cell. If the recognition/adhesion events are long-lived enough and create solid bonds, the pulling part of the force curves may be compared to this number thanks to a detailed analysis of the rupture events along the separation, opening exciting new perspectives in the field of Single Cell Force Spectroscopy-based techniques [2,6,52–55].

5. Conclusion

A coupling signal existing between AFM and fluorescence microscopy, manifesting as a bending of the AFM cantilever upon shining excitation light, has been described. It has been characterized in terms of duration, periodicity and intensity, as a function of excitation wavelength and power, for four different types of soft cantilevers that are commonly used in biological applications of AFM force mode. Three different geometries and rigidities (< 100 pN/nm) were examined. For commercial uncoated levers, this signal is of moderate intensity (~50–100 pN), reproducible, and can hence be used as an intrinsic timer for real-time use of AFM and epifluorescence.

This approach presents the advantage of avoiding the needs of a physical connection between the AFM computer and the fluorescence detection system to synchronize the observed signals (force on one side and fluorescence images on the other side).

Two applications were presented, namely (i) single immune cell mechanical stimulation while following the consequences of the contact via fluorescent calcium reporters and (ii) single T cell stimulation by light, using a photoactivable Rac protein, while recording the mechanical consequences of this activation.

The present study highlights the precautions of use and limitations, in particular discussing the time resolution (number of frames per second, duration of the excitation). Modifications of the set-up have been proposed to enlarge this approach to more

complex, dual wavelengths dyes (such as ratiometric calcium dyes or FRET reporters), together with optimizing the geometry of the mechanical contact by modifying the levers.

The mechanical stimulation experiments are paving the way to specific stimulations where a given molecule will be oriented, at a known density, grafted on the bead modified lever, to represent a model APC. Physical/mechanical parameters of the contact (duration, frequency, force, rigidity of the lever i.e. apparent APC rigidity [51]) could then be varied in order to decipher the transfer function of given pathways encoding the information received at the membrane and transmitted to the cytosol, exploiting the fluorescence recording in real-time or relevant markers. Such a simple technique may open the use of AFM to dissect mechanochemistry at single cell level, by allowing forces and their consequences to be easily correlated.

Two exquisite systems of utmost importance in immunology would be by targeting the TCR and/or other activating/adhesive molecules on T cells, and following the consequences of the interaction between the antibody Fc fragment and its receptor (FcR) using suitably opsonized beads of various sizes in the macrophage context.

Contributions

PHP designed, performed experiments, processed the data and wrote the article. MBP performed the plasmid transfection and stimulation experiments. SC, AS, MM, SO performed experiments and processed the data. LL performed experiments and participated in writing the article. PB participated to the design of the study and in writing the article.

Acknowledgements

Fundings: Prise de Risques CNRS, ANR JCJC “DissecTion” (ANR-09-JCJC-0091), PhysCancer “H+-cancer” (to PHP). Labex INFORM (ANR-11-LABX-0054) and A*MIDEX project (ANR-11-IDEX-0001-02), funded by the “Investissements d’Avenir” French Government program managed by the French National Research Agency (ANR) (to Inserm U1067 Lab and as PhD grant to AS). GDR MIV (as a master grant to SO).

Providing material or technical help: P. Robert (U1067, Marseille), Y. Hamon and H.-T. He (CIML, Marseille, France). A. Dumêtre (UMD3, Marseille, France) [J774 cells], K. Hahn [Rac-PA plasmid], F. Bedu and H. Dallaporta (CINAM, Marseille) [ion beam cutting]. F. Eghiaian, A. Rigato and F. Rico (U1006, Marseille) [chemical gold removal recipes and discussions]. P. Dumas (CINAM, Marseille) [discussions]. R. Fabre (CIML, Marseille) [preliminary experiments].

Companies: JPK Instruments (Berlin, Germany) for continuous support and generous help. Zeiss France for support.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultramic.2015.10.014>.

References

- [1] C.M. Franz, P.-H. Puech, et al., Atomic force microscopy: a versatile tool for studying cell morphology, adhesion and mechanics, *Cell. Mol. Bioeng.* 1 (4) (2008) 289–300.
- [2] Y.F. Dufrière, E. Evans, A. Engel, J. Helenius, H.E. Gaub, D.J. Müller, et al., Five challenges to bringing single-molecule force spectroscopy into living cells, *Nat. Methods* 8 (2) (2011) 123–127.

- [3] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H.J. Gruber, K. Schilcher, H. Schindler, et al., Detection and localization of individual antibody–antigen recognition events by atomic force microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (8) (1996) 3477–3481.
- [4] V.T. Moy, E.L. Florin, H.E. Gaub, et al., Intermolecular forces and energies between ligands and receptors, *Science* 266 (5183) (1994) 257–259.
- [5] C.M. Franz, A. Taubenberger, P.-H. Puech, D.J. Muller, et al., Studying integrin-mediated cell adhesion at the single-molecule level using AFM force spectroscopy, *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2007 (406) (2007) 15.
- [6] J. Helenius, C.-P. Heisenberg, H.E. Gaub, D.J. Muller, et al., Single-cell force spectroscopy, *J. Cell. Sci.* 121 (Pt 11) (2008) 1785–1791.
- [7] P.-H. Puech, K. Poole, D. Knebel, D.J. Muller, et al., A new technical approach to quantify cell–cell adhesion forces by AFM, *Ultramicroscopy* 106 (8–9) (2006) 637–644.
- [8] J.B. Huppa, M.M. Davis, et al., Chapter One – the interdisciplinary science of T-cell recognition, in: F.W. Alt (Ed.), *Advances in Immunology*, vol. 119, Academic Press, 2013, pp. 1–50.
- [9] P.-H. Puech, D. Nevoitris, P. Robert, L. Limozin, C. Boyer, P. Bongrand, et al., Force measurements of TCR/pMHC recognition at T cell surface, *PLoS One* 6 (7) (2011) e22344.
- [10] E. Natkanski, W.-Y. Lee, B. Mistry, A. Casal, J.E. Molloy, P. Tolar, et al., B cells use mechanical energy to discriminate antigen affinities, *Science* 340 (6140) (2013) 1587–1590.
- [11] H.-T. He, P. Bongrand, et al., Membrane dynamics shape TCR-generated signaling, *Front. Immunol.* 3 (2012) 90.
- [12] S.T. Kim, K. Takeuchi, Z.-Y.J. Sun, M. Touma, C.E. Castro, A. Fahmy, M.J. Lang, G. Wagner, E.L. Reinherz, et al., The alphabeta T cell receptor is an anisotropic mechanosensor, *J. Biol. Chem.* 284 (45) (2009) 31028–31037.
- [13] S.T. Kim, Y. Shin, K. Brazin, R.J. Mallis, Z.-Y.J. Sun, G. Wagner, M.J. Lang, E. L. Reinherz, et al., TCR mechanobiology: torques and tunable structures linked to early T cell signaling, *Front. Immunol.* 3 (2012) 76.
- [14] Y.-C. Li, B.-M. Chen, P.-C. Wu, T.-L. Cheng, L.-S. Kao, M.-H. Tao, A. Lieber, S. R. Roffler, et al., Cutting edge: mechanical forces acting on T cells immobilized via the TCR complex can trigger TCR signaling, *J. Immunol. (Balt. MD)* 195(10) (2010) 5959–5963.
- [15] Z. Ma, T.H. Finkel, et al., T cell receptor triggering by force, *Trends Immunol.* 31 (1) (2010) 1–6.
- [16] Z. Ma, D.E. Discher, T.H. Finkel, et al., Mechanical force in T cell receptor signal initiation, *Front. Immunol.* 3 (2012) 217.
- [17] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, E. Evans, et al., Energy landscapes of receptor–ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy, *Nature*, 397, (1999) 50–53.
- [18] A. Pierres, A.-M. Benoliel, P. Bongrand, et al., Studying molecular interactions at the single bond level with a laminar flow chamber, *Cell. Mol. Bioeng.* 1 (4) (2008) 247–262.
- [19] B. Liu, W. Chen, B.D. Evavold, C. Zhu, et al., Accumulation of dynamic catch bonds between TCR and agonist peptide–MHC triggers T cell signaling, *Cell* 157 (2) (2014) 357–368.
- [20] P. Robert, M. Aleksic, O. Dushek, V. Cerundolo, P. Bongrand, P.A. van der Merwe, et al., Kinetics and mechanics of two-dimensional interactions between T cell receptors and different activating ligands, *Biophys. J.* 102 (2) (2012) 248–257.
- [21] S. Hoffmann, B.H. Hosseini, M. Hecker, I. Louban, N. Bulbuc, N. Garbi, G. H. Wabnitz, Y. Samstag, J.P. Spatz, G.J. Hämmerling, et al., Single cell force spectroscopy of T cells recognizing a myelin-derived peptide on antigen presenting cells, *Immunol. Lett.* 136 (1) (2011) 13–20.
- [22] B.H. Hosseini, I. Louban, D. Djanjij, G.H. Wabnitz, J. Deeg, N. Bulbuc, Y. Samstag, M. Gunzer, J.P. Spatz, G.J. Hämmerling, et al., Immune synapse formation determines interaction forces between T cells and antigen-presenting cells measured by atomic force microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (42) (2009) 17852–17857.
- [23] W. Chen, C. Zhu, et al., Mechanical regulation of T-cell functions, *Immunol. Rev.* 256 (1) (2013) 160–176.
- [24] M.L. Previtiera, Mechanotransduction in the immune system, *Cell. Mol. Bioeng.* 7 (3) (2014) 473–481.
- [25] A. Brodovitch, P. Bongrand, A. Pierres, et al., T lymphocytes sense antigens within seconds and make a decision within one minute, *J. Immunol.* 191 (5) (2013) 2064–2071.
- [26] E. Judokusumo, E. Tabdanov, S. Kumari, M.L. Dustin, L.C. Kam, et al., Mechanosensing in T lymphocyte activation, *Biophys. J.* 102 (2) (2012) L5–L7.
- [27] A. Salles, C. Billaudeau, A. Sergé, A.-M. Bernard, M.-C. Phélipot, N. Bertaux, M. Fallet, P. Grenot, D. Marguet, H.-T. He, Y. Hamon, et al., Barcoding T cell calcium response diversity with methods for automated and accurate analysis of cell signals (MAAACS), *PLoS Comput. Biol.* 9 (9) (2013) e1003245.
- [28] C. Torigoe, T. Tadakuma, M. Nakanishi, et al., Single-cell observation of calcium signals in T cells and antigen-presenting cells during antigen presentation, *Immunol. Lett.* 46 (1–2) (1995) 75–79.
- [29] C. Randriamampita, P. Mouchacca, B. Malissen, D. Marguet, A. Trautmann, A. C. Lellouch, et al., A novel ZAP-70 dependent FRET based biosensor reveals kinase activity at both the immunological synapse and the antisynapse, *PLoS One* 3 (1) (2008) e1521.
- [30] G.T. Charras, M.A. Horton, et al., Single cell mechanotransduction and its modulation analyzed by atomic force microscope indentation, *Biophys. J.* 82 (6) (2002) 2970–2981.
- [31] J. Husson, K. Chemin, A. Bohineust, C. Hivroz, N. Henry, et al., Force generation upon T cell receptor engagement, *PLoS One* 6 (5) (2011) e19680.
- [32] G.T. Charras, P.P. Lehenkari, M.A. Horton, et al., Atomic force microscopy can be used to mechanically stimulate osteoblasts and evaluate cellular strain distributions, *Ultramicroscopy* 86(1–2) (2001) 85–95.
- [33] G.M. Lopez-Ayon, D.J. Oliver, P.H. Grutter, S.V. Komarova, et al., Deconvolution of calcium fluorescent indicator signal from AFM cantilever reflection, *Microsc. Microanal. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Can.* 18 (4) (2012) 808–815.
- [34] Y.-S. Chu, W.A. Thomas, O. Eder, F. Pincet, E. Perez, J.P. Thiery, S. Dufour, et al., Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42, *J. Cell. Biol.* 167 (6) (2004) 1183–1194.
- [35] P. Robert, K. Sengupta, P.-H. Puech, P. Bongrand, L. Limozin, et al., Tuning the formation and rupture of single ligand–receptor bonds by hyaluronan-induced repulsion, *Biophys. J.* 95 (8) (2008) 3999–4012.
- [36] J. Te Riet, J. Helenius, N. Strohmeyer, A. Cambi, C.G. Figdor, D.J. Müller, et al., Dynamic coupling of ALCAM to the actin cortex strengthens cell adhesion to CD6, *J. Cell. Sci.* 127 (Pt 7) (2014) 1595–1606.
- [37] A.R. Harris, G.T. Charras, et al., Experimental validation of atomic force microscopy-based cell elasticity measurements, *Nanotechnology* 22 (34) (2011) 345102.
- [38] Y.I. Wu, D. Frey, O.I. Lungu, A. Jaehrig, I. Schlichting, B. Kuhlman, K.M. Hahn, et al., A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells, *Nature* 461 (7260) (2009) 104–108.
- [39] H.-J. Butt, M. Jaschke, et al., Calculation of thermal noise in atomic force microscopy, *Nanotechnology* 6 (1) (1995) 1.
- [40] B. Olher, Practical advice on the determination of cantilever spring constants (Application note AN94), Bruker (ex. VeecoInstruments), 2007.
- [41] A. Edelstein, N. Amodaj, K. Hoover, R. Vale, N. Stuurman, et al., Computer control of microscopes using μ Manager, in: M. Frederick, A. Ausubel (Eds.), *Curr. Protoc. Mol. Biol. Ed., Chapter 14, Unit 14.20*, 2010.
- [42] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, et al., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods* 9 (7) (2012) 676–682.
- [43] F. Rico, C. Chu, M.H. Abdulreda, Y. Qin, V.T. Moy, et al., Temperature modulation of integrin-mediated cell adhesion, *Biophys. J.* 99 (5) (2010) 1387–1396.
- [44] E.P. Wojcikiewicz, X. Zhang, A. Chen, V.T. Moy, et al., Contributions of molecular binding events and cellular compliance to the modulation of leukocyte adhesion, *J. Cell. Sci.* 116 (Pt 12) (2003) 2531–2539.
- [45] N. Bui, M. Saitakis, S. Dogniaux, O. Buschinger, A. Bohineust, A. Richert, M. Maurin, C. Hivroz, A. Asnacios, et al., Human primary immune cells exhibit distinct mechanical properties that are modified by inflammation, *Biophys. J.* 108 (9) (2015) 2181–2190.
- [46] H.W. Wu, T. Kuhn, V.T. Moy, et al., Mechanical properties of L929 cells measured by atomic force microscopy: effects of anticytoskeletal drugs and membrane crosslinking, *Scanning* 20 (5) (1998) 389–397.
- [47] M. Herant, V. Heinrich, M. Dembo, et al., Mechanics of neutrophil phagocytosis: experiments and quantitative models, *J. Cell. Sci.* 119 (9) (2006) 1903–1913.
- [48] A.B. Churnside, R.M.A. Sullan, D.M. Nguyen, S.O. Case, M.S. Bull, G.M. King, T. Perkins, et al., Routine and timely sub-piconewton force stability and precision for biological applications of atomic force microscopy, *Nano Lett.* 12 (7) (2012) 3557–3561.
- [49] M. Radmacher, J.P. Cleveland, P.K. Hansma, et al., Improvement of thermally induced bending of cantilevers used for atomic force microscopy, *Scanning* 17 (2) (1995) 117–121.
- [50] M.S. Bull, R.M.A. Sullan, H. Li, T.T. Perkins, et al., Improved single molecule force spectroscopy using micromachined cantilevers, *ACS Nano* 8 (5) (2014) 4984–4995.
- [51] D. Mitrossilis, J. Fouchard, D. Pereira, F. Postic, A. Richert, M. Saint-Jean, A. Asnacios, et al., Real-time single-cell response to stiffness, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (38) (2010) 16518–16523.
- [52] J. Kashef, C.M. Franz, Quantitative methods for analyzing cell–cell adhesion in development, *Dev. Biol.* 401 (1) (2015) 165–174.
- [53] A.V. Taubenberger, D.W. Huttmacher, D.J. Muller, Single-cell force spectroscopy, an emerging tool to quantify cell adhesion to biomaterials, *Tissue Eng. Part B Rev.* 20 (1) (2014) 40–55.
- [54] J. Friedrichs, K.R. Legate, R. Schubert, M. Bharadwaj, C. Werner, D.J. Müller, M. Benoit, A practical guide to quantify cell adhesion using single-cell force spectroscopy, *Methods* 60 (2) (2013) 169–178.
- [55] D.J. Müller, J. Helenius, D. Alsteens, Y.F. Dufrière, Force probing surfaces of living cells to molecular resolution, *Nat. Chem. Biol.* 5 (6) (2009) 383–390.

2. La mise en forme des cellules T par micropatterning permet de contrôler la forme, la mécanique et l'activation

1. Contexte de l'étude

Dans le but à long terme de proposer des tests d'activation de cellules T standardisés, en particulier à l'aide de techniques basées sur des mesures en fluorescence raffinées des mesures de forces comme l'AFM ou les pinces optiques, nous avons voulu mettre en place une stratégie permettant de faire adhérer, de manière reproductible, des cellules T sur des "patterns" protéiques, typiquement des anticorps, produits par micro-contact printing (200).

Cette technique, reposant sur l'impression de micro-tampons encrés par une solution protéique est maintenant quasi commerciale et relativement aisée à mettre en place avec des protéines de la matrice extracellulaire et des cellules "calmes", adhérentes et de grande taille, et même à coupler à des mesures de force (201). Après l'avoir testée pour des COS APC (voir chapitre 5 section 4 page 163), nous avons cherché à l'adapter aux lymphocytes T : ces cellules étant plus petites, cultivées en suspension et surtout activable, la tâche s'est révélée relativement compliquée.

Outre le fait de contrôler l'aire d'adhésion des cellules, l'idée est de contrôler la position dans le plan de l'échantillon et la forme des cellules de façon à tenter de diminuer les dispersions des données mesurées qui pourraient être introduites par ces paramètres simples, mais souvent négligés lors des études de cellules T aux surfaces. Nous avons choisi de proposer aux cellules des zones d'adhésion en forme de disque, d'aire contrôlée et compatible avec leur étalement naturel sur la molécule correspondante. Pour n'obtenir que des cellules aux endroits désirés il est nécessaire de trouver une molécule répulsive ou passivante empêchant l'adhésion non spécifique des cellules T.

Afin de déterminer les molécules adéquates, à la fois pour permettre l'adhésion mais aussi pour compléter les motifs de manière non adhérente ou répulsive, pour les limiter, nous avons utilisé une technique de tracking permettant d'enregistrer et quantifier à la fois les déplacements des cellules sur les surfaces mais aussi un signal fluorescent correspondant au

Résultats

cours du temps, ici, un signal correspondant aux flux calciques, signes manifeste d'une activation. Nous avons couplé ceci avec des surfaces activatrices, adhésives ou repulsives également nommées passivées, et vérifiées que les cellules adhérees sur des substrats non activateurs étaient activables par une stimulation ou bien soluble (aCD3) ou bien par des cellules COS APC venant les contacter par sédimentation.

Nous avons ensuite testé de nombreuses méthodes et traitements de surface afin d'obtenir des motifs reproductibles, défini un protocole différent des protocoles classiques qui semble le mieux adapté à notre système basé sur des aCD45 comme molécules adhésives et précisé les protocoles de marquage calcique pour pouvoir faire adhérer les cellules complètement sur les motifs.

Enfin, nous avons qualifié ces cellules, en termes de mécanique par indentation par AFM, étudié l'influence du marquage calcique et de la température des expériences et observé leur capacité à être activée par un anticorps soluble. Nous mettons en évidence un effet non trivial des aCD45 qui correspond à une question qui n'est pas tranchée dans la littérature autour de l'impact précis de l'agrégation de CD45 dans l'activation T. Ceci nous a conduits à proposer une construction cellulaire nouvelle pour essayer de lever les ambiguïtés relevées (page 149).

Nous obtenons ainsi un système de localisation, forme, mécanique et activation contrôlée, qui même si des améliorations possibles subsistent, permet d'envisager à termes des expériences "sous force" (contact de force contrôlé par l'AFM), entre cellules, plus contraintes certes, mais peut être plus modélisables par la suite. Nous discutons, à la fin de ce chapitre, des améliorations possibles et des questions en suspens, et en particulier soulignons la difficulté d'obtenir des surfaces patternées de manière reproductible avec les supports qui nous sont imposés par l'utilisation d'un AFM (donc avec des contraintes mécaniques élevées) avec une chambre thermostatée commerciale.

2. Résultats

Ainsi que décrit dans la section précédente, nous avons divisé notre travail en quatre étapes :

Résultats

1. Détermination des molécules adhésives et répulsives (passivantes c'est-à-dire non adhérentes) adéquates pour notre système, en prenant en compte leur effet sur l'activation des cellules T
2. Adaptation des protocoles de micro-impression pour notre système, avec validation des tailles de motifs et détermination des conditions d'étalement minimales (en particulier en temps) pour nos cellules
3. Caractérisation des propriétés mécaniques des cellules "en forme", avec et sans marquage calcique
4. Validation de leur activation en comparaison de tests plus classiques basés sur (23).

2.1. Optimisation de l'adhésion / non adhésion (répulsion) des cellules T avec contrôle de leur activabilité

Le modèle cellulaire que nous utilisons, dérivé de la lignée 3A9m n'a pas besoin de molécule de costimulation pour s'activer, comme cela a été montré dans différentes études (23), (24).

Les hybridomes T 3A9m que nous avons utilisés dans notre étude sont des cellules non adhérentes, cultivées in vitro mais que l'on peut faire adhérer expérimentalement. La première étape de notre protocole a été de les faire adhérer sur les substrats en verre commerciaux (FluoDish, WPI) recommandés pour l'utilisation avec notre système d'AFM thermostaté (JPK PetriDish Holder). Nous avons cherché des molécules permettant à la fois d'immobiliser ces cellules, sans pour autant les activer ou les anergiser, c'est-à-dire sans visualiser de flux calciques outre que dans le cas de stimulation avec une molécule activatrice ou un complexe pMHC/APC. L'objectif était ici de localiser les cellules, les mettre en forme, avec l'idée qu'elles ne doivent pas être trop migrantes à l'échelle de temps pour les mesures en mode force de l'AFM à terme. Nous avons contrôlé de manière régulière l'expression de certaines molécules de surface critiques (TCR, CD45) par cytométrie pour éviter tout biais lors de nos expériences (voir matériel et méthodes).

2.1.1 Choix des molécules

Résultats

Nous avons sélectionné un panel assez large de molécules en utilisant la technique basée sur MAAACS (23), en utilisant les paramètres suivant comme readout de certaines capacités des substrats. Le choix des molécules a été guidé par ce qui est généralement utilisé dans la littérature pour immobiliser les cellules T mais dont l'effet sur l'état d'activation n'est pas toujours documenté (34), (202) ou commencent à remettre en question des molécules généralement utilisées comme la poly-L-lysine (203):

3. Vitesse moyenne de déplacement des cellules à la surface sur une durée de 15 à 30 min (plus elle est faible, plus les cellules sont adhérentes ; lorsqu'un substrat est non adhésif et que l'on induit un flux de liquide, elles sont éliminées du champ de vue)
4. Fraction de cellules activées, c'est à dire dont la fluorescence dépasse un seuil donné, et intensité de ces flux intégrés au cours du temps et normalisés (voir matériels et méthodes)

Afin de tester l'activabilité des cellules après adhésion (le comportement des cellules est suivi sur 15 min dans une première phase), nous avons utilisé un anticorps aCD3 soluble, connu pour sa capacité à activer des cellules T par agrégation du complexe TCR/CD3 (lors d'une seconde séquence de 15min).

Trois catégories de molécules ont été testées (Fig. 5.1), activatrices a priori (aCD3), adhésives et passivantes ou répulsives, à différentes doses, sans et avec stimulation soluble, ainsi qu'un certain nombre de contrôles. L'ensemble des conditions est résumé dans le tableau 1 (présenté en fin de cette section). Dans ces expériences, les molécules d'intérêt sont incubées pendant une nuit dans des Labteks pour suivre les conditions typiques de MAAACS.

Nous avons observé que sur une surface coatée avec 2C11 (anticorps anti-CD3), comme attendu, les cellules adhéraient et s'activaient de manière très forte dès leur contact à la surface. Nous avons testé trois concentrations différentes d'aCD3 (10, 25 et 50µg/ml) et n'observons pas une réponse dose dépendante. Ce résultat peut être expliqué par le fait que nous avons testé qu'une fois la concentration d'aCD3 à 25µg/ml.

En revanche ce n'est pas le cas lorsque les cellules contactent un substrat de aCD45 adsorbé, quelle que soit la concentration d'anticorps utilisé pendant l'incubation. Sur aCD45, les cellules apparaissent relativement immobiles une fois le substrat contacté, ce qui est observé pendant l'expérience et confirmé par une vitesse moyenne faible. Ces cellules peuvent être réactivées, plus ou moins efficacement et ce de manière dépendante de la concentration en

Résultats

aCD45 utilisée pour la fabrication des surfaces, par addition d'anti-CD3 soluble. En effet, on peut noter que le pourcentage d'activation après stimulation avec un aCD3 soluble est constant toutefois l'amplitude de fluorescence quant à elle diminue si les cellules T sont adhérentes sur des concentrations fortes d'aCD45.

Sur des surfaces répulsives dites aussi passivantes tels que PLL-PEG, F127 ou F108 (des pluronics), BSA, BSA-biotine ou BSA-biotine/streptavidine, les cellules n'adhèrent pas et sont très peu activées par le contact avec le substrat. Elles demeurent activables par aCD3 soluble. Pour les autres conditions, et comme indiqué dans le tableau, les cellules ont été observées comme étant faiblement adhérentes et/ou pré-activées de manière notable par les substrats.

Le fait que CD45 soit une molécule possédant un large domaine extracellulaire et très abondante à la surface des cellules T 3A9m est un avantage pour l'utilisation comme ancre moléculaire comme d'autres l'ont fait avant nous (204). Néanmoins, le rôle de CD45 sur l'activation n'est pas clair dans la littérature. La ségrégation de molécule que l'on induit à l'interface surface/cellule peut influencer l'activation (205).

Résultats

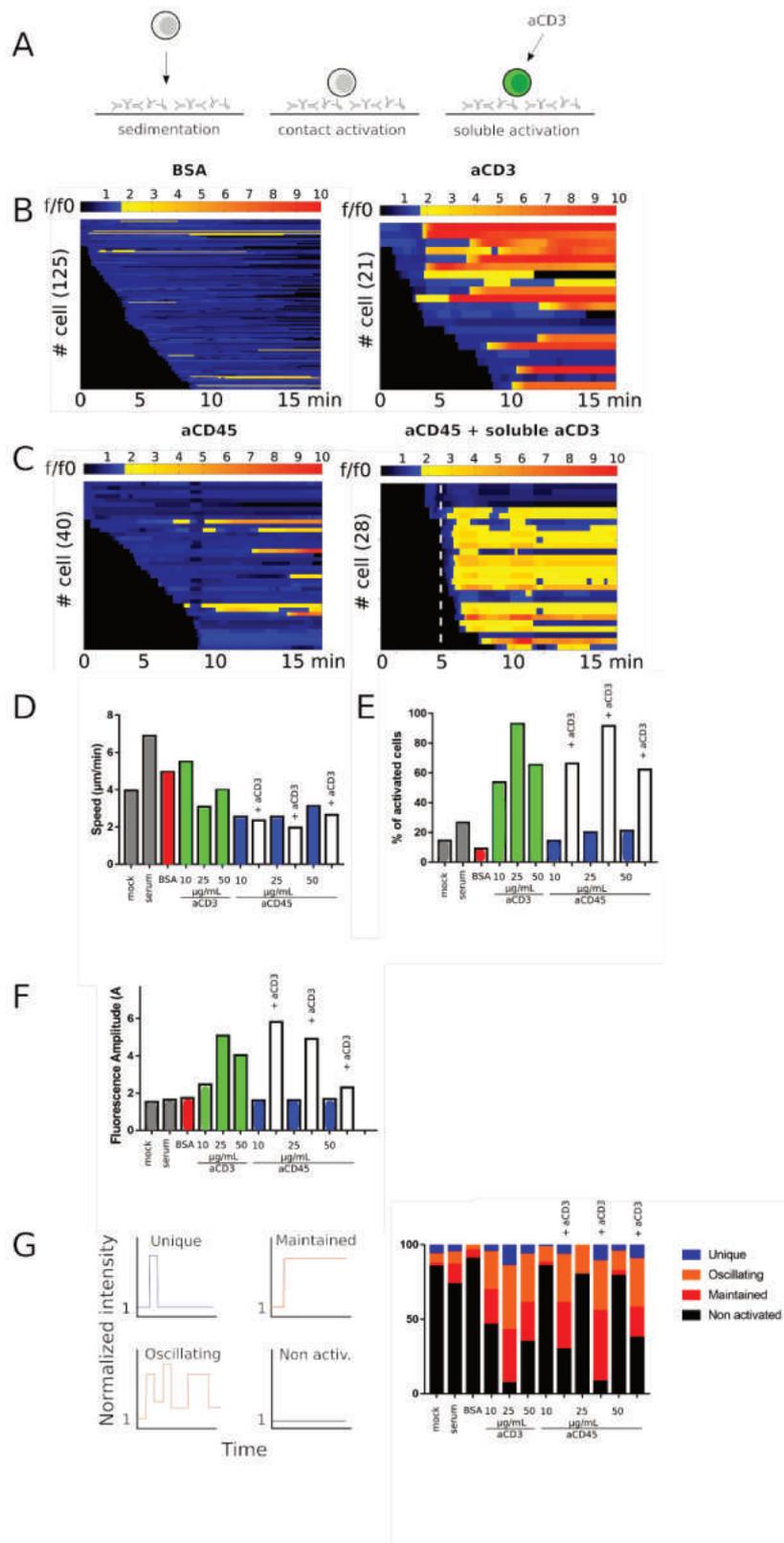


Fig. 5.1 A. Schéma d'une expérience de MAAACS. Les cellules sédimentent sur un substrat donné et on suit leur position ainsi que les flux calciques éventuellement évoqués sur 15 min. A la suite, une éventuelle activation par aCD3 soluble à une concentration de 20 μg/ml est suivie sur 15 min. B. Cartes de flux calciques typiques (normalisés) en fonction du temps. Une ligne correspond à une cellule. Deux cas sont présentés : un cas non adhésif et non activant (BSA), un cas activant (aCD3). C. Cas

Résultats

d'une surface adhésive, mais non activatrice (aCD45) sans puis avec une stimulation par aCD3 soluble. L'injection est identifiée par la ligne en pointillés. D. Mesures de vitesses moyennes par MAAACS pour quelques conditions qui seront utiles pour la réalisation des surfaces à motifs transférés. Des vitesses < 3µm/min seront considérés comme identifiant des surfaces adhésives. E. Fraction de cellules identifiées par MAAACS comme s'étant activées. F. Amplitudes de fluorescence normalisée moyenne enregistrées par MAAACS. E-F : les valeurs présentées sont les moyennes sur une population de cellules provenant de plusieurs répétitions de chaque condition (au moins 2). G. Morphologie des flux calciques observés en fonction de la condition.

Ceci nous a conduit à tester aussi des surfaces PLL (les cellules se déplacent de manière notable dessus) ainsi que des anticorps anti MHC-1, anti CD4, comme ancre, à l'image de (74) (les cellules adhèrent trop peu) et à développer une nouvelle variante de 3A9m capable d'adhérer avec un autre système moléculaire, non relié à l'activation T (74).

Nous avons donc, comme molécule adhésive aCD45, et comme molécules répulsives choisies BSA (et ses variantes), PLL-PEG et F127. Nous verrons par la suite que ce choix s'est réduit lors des essais de transfert des motifs sur le verre.

Nous pouvons voir sur la Fig. 5.1 que l'amplitude de fluorescence des cellules 3A9m augmente en fonction de la concentration d'anti-CD3 que l'on utilise. Nous choisissons d'utiliser une concentration de 10µg/ml et cela deviendra notre contrôle positif à chaque expérience. Dans (23) un anti-TCR biotinylé était utilisé à une concentration de 6,5µg/L et induisait une réponse calcique plus élevée due notamment à l'agrégation des TCR. L'anti-CD45 permet d'immobiliser fortement les cellules comme ce qu'on peut observer grâce aux données de vitesse et n'anergise pas ces dernières. En effet, le pourcentage de cellules activées reste identique quel que soit la concentration utilisée. Toutefois, on note que plus on augmente la concentration d'aCD45 sur la surface plus l'amplitude de fluorescence diminue suggérant un possible effet du nombre de CD45 recrutés pour l'adhésion.

Lymphocyte T (3A9m)	Activation au contact	Activation par anti-CD3 soluble	Anergie	Activation par APC avec pMHC
mock	non			
serum	oui			
fibronectine	non			
Polylysine 0,01 %	non			
PLL-peg	non			

Résultats

BSA 0,1 %	non			
BSA 1 %	non	oui	non	
BSA 10 %	non			
Anti-MHC 1	non			
Anti-CD43	non	oui	non	
Anti-CD3 10µg/ml	oui	oui	non	
Anti-CD3 25µg/ml	oui			
Anti-CD3 50µg/ml	oui			oui
Anti-CD45 1µg/ml	oui			
Anti-CD45 10µg/ml	oui	oui	non	
Anti-CD45 25µg/ml	oui	oui	non	
Anti-CD45 50µg/ml	oui	oui	non	
Anti-CD45 100µg/ml	oui			
F127 100µg/ml	non	oui	non	
F127 500µg/ml	non			
F108 100µg/ml	non	oui	non	
F108 500µg/ml	non			
biotinBSA 1 %	non			
Streptavidin 100µg	+/-			
mICAM 10µg/ml	non	oui	non	
WGA 50mM	oui			
WGA 250mM	oui	oui	non	
ConA 50mM	oui			
Con A 250mM	oui	oui	non	
Anti-CD45 1µg/ml +BSA 0,1 %	non			
Anti-CD45 10µg/ml +BSA 0,1 %	non			
Anti-CD45 25µg/ml +BSA 0,1 %	non			
Anti-CD45 50µg/ml +BSA 0,1 %	non	oui	non	
Anti-CD45 100µg/ml +BSA 0,1 %	non			
Anti-CD45 1µg/ml +BSA 1 %	non			
Anti-CD45 10µg/ml +BSA 1 %	non			
Anti-CD45 25µg/ml +BSA 1 %	non			

Résultats

Anti-CD45 50µg/ml +BSA 1 %	non	oui	non	
Anti-CD45 100µg/ml +BSA 1 %	non			
Anti-CD45 1µg/ml +pll-peg 100µg/ml	non			
Anti-CD45 25µg/ml +pll-peg 100µg/ml	non			
Anti-CD45 50µg/ml +pll-peg 100µg/ml	non			
Proteine A 100 µg/ml	non			
Proteine A 100 µg/ml +anti-CD45 50µg/ml	non			
Proteine A 100 µg/ml +anti-CD45 50µg/ml + BSA1 %	non			
Proteine A 100 µg/ml +anti-CD45 50µg/ml +pll-peg 100µg/ml	non	oui	non	
Proteine G 100 µg/ml	non			
Proteine G 100 µg/ml +anti-CD45 50µg/ml	non			
Proteine G 100 µg/ml +anti-CD45 50µg/ml + BSA1 %	non			
Proteine G 100 µg/ml +anti-CD45 50µg/ml +pll-peg 100µg/ml	non			
Stamp 10 bBSA 1 % +anti-CD45 50µg/ml + SA-546 100µg/ml	non	oui		
Stamp 15 bBSA 1 % +anti-CD45 50µg/ml + SA-546 100µg/ml	non	oui		
Stamp 20 bBSA 1 % +anti-CD45 50µg/ml + SA-546 100µg/ml	non	oui		
Anti-CD45 50µg/ml t0 ajout des mcd4	non	oui	non	
Anti-CD45 50µg/ml t15 min	non	oui	non	
Anti-CD45 50µg/ml t30 min	non	oui	non	
Anti-CD45 50µg/ml t45 min	non	oui	non	
Anti-CD45 50µg/ml t60 min	non	oui	non	
Anti-CD45 50µg/ml t100 min	non	+/-	+/-	

Résultats

Tableau 1 : Récapitulatif de toutes les conditions testées pour déterminer le choix des molécules à patterner.

2.1.2 Définition de la taille des motifs utilisables

Nous avons ensuite quantifié l'étalement des 3A9m sur des substrats continus d'aCD45 (l'anticorps a été adsorbé sur la surface) en utilisant la RICM afin de mesurer l'aire d'adhésion au court du temps (Fig. 5.2), sur une durée de 60 min et à des températures compatibles avec, en particulier, la stabilité de la charge en indicateur calcique de nos cellules avant qu'elle ne compartimentalise. Nous avons analysé de plus la symétrie de cet étalement en calculant un indice de circularité par l'équation $4\pi A/P^2$ où A est l'aire et P le périmètre. La symétrie de la zone de contact est usuellement bien corrélée, sur ces substrats, avec la symétrie de la cellule observée en transmission (Fig. 5.3).

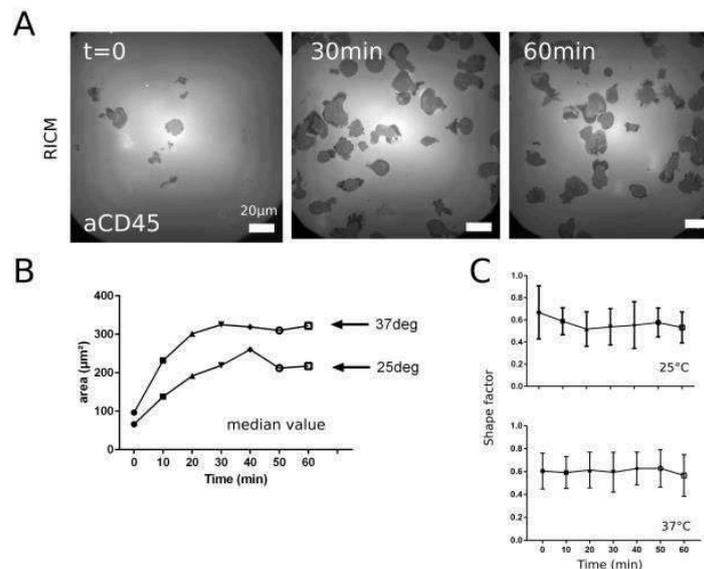


Fig. 5.2 A. Images de l'étalement de 3A9 sur une surface continue d'aCD45 à 50 µg/ml au cours du temps, suivi par RICM. B. Aire d'adhésion médiane au cours du temps, à 25 et 37°C, permettant de définir la taille maximale des motifs à partir de l'aire à 60min. C. Facteur de forme des cellules au cours du temps aux deux températures. Un facteur de 1 correspond à un cercle. Plus ce facteur diminue, plus la cellule est asymétrique.

Résultats

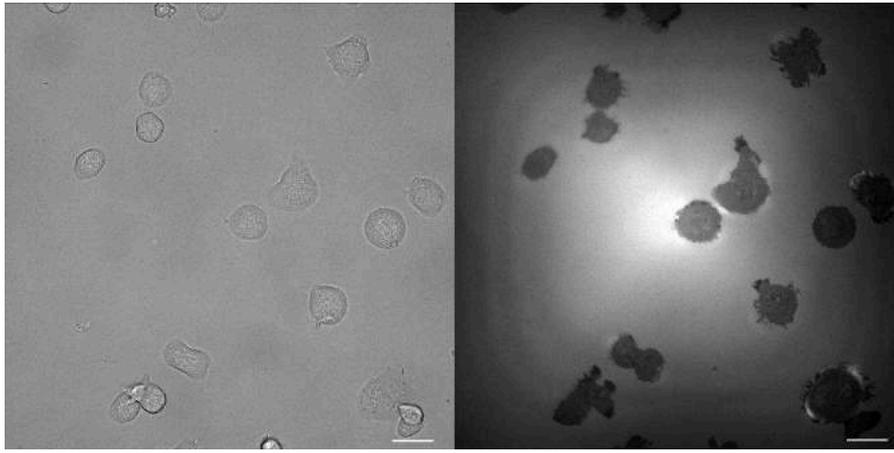


Fig. 5.3 : Caractérisation de la morphologie d'adhésion des cellules T 3A9m en lumière blanche (panel de droite) et RICM (panel de gauche) sur une surface continue d'aCD45 à 50µg/ml. On constate que la morphologie observée en lumière blanche correspond bien à l'aire de contact apparent en RICM montrant que la cellule est bien immobilisée, barre d'échelle = 20µm.

A partir de l'aire maximale atteinte sur des substrats continus de aCD45 (à 37°C, au bout d'1h), nous avons calculé le diamètre équivalent maximal de nos motifs discoïdaux, qui est de l'ordre de 20µm, contraignant ainsi nos conditions à des tailles inférieures. Nous avons ainsi réalisé des motifs de 10, 15 et 20 µm de diamètre, séparés par des distances variables. Pour des diamètres inférieurs à 10µm, nos premiers essais nous ont montré que les cellules ne s'immobilisaient pas et pouvaient être chassées par les flux induits par la stimulation aCD3 soluble ou bien adhérer sur plusieurs motifs lorsque ceux-ci ne sont pas suffisamment séparés (nous ne présentons pas ces tests préliminaires ici). Nous avons aussi confirmé que l'adhésion sur des surfaces continues passivées par de la BSA (ou des constructions autour de la BSA) restait quasiment nulle pour la même durée. Sur aMHCI à une concentration de 50µg/ml (l'anticorps a été adsorbé) les cellules adhèrent moins sans trop s'étaler, ce qui ne permettait pas de mesurer des propriétés mécaniques avec l'AFM (Fig. 5.4). En effet, dès que l'on induisait un flux (rinçage ou engagement du levier) trop de cellules étaient détachées et venaient empêcher toute utilisation de l'AFM. Sur aCD45, les cellules s'étalent de manière asymétrique et la symétrie moyenne (allongée) observée l'est à tous les temps (Fig. 5.3 et Fig. 5.4). Elles ont une membrane dynamique, ne sont pas motiles et peuvent rester plus de 3h adhérentes sans montrer de vacuolisation.

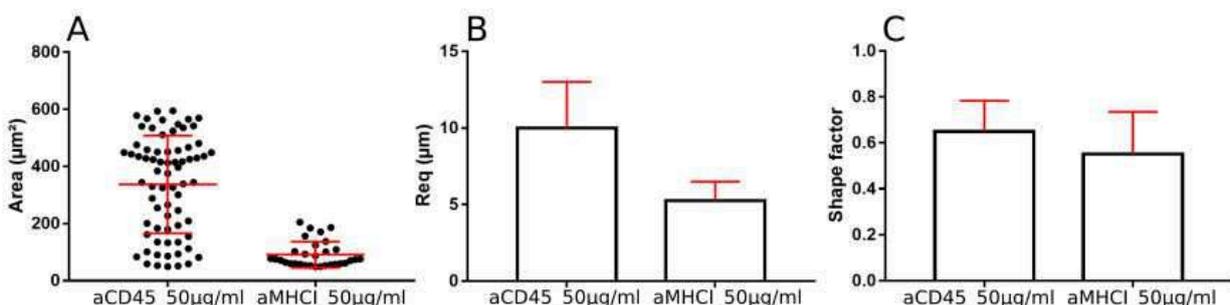


Fig. 5.4 : Mesures des propriétés d'adhésion des cellules 3A9m sur des surfaces continues de aCD45 ou aMHC I. A : Aire de contact apparente mesurée par RICM, les cellules sont peu adhésives sur l'aMHC I rendant ainsi cette molécule inutilisable pour l'immobilisation de ces cellules afin de réaliser ultérieurement des mesures d'AFM. B : Rayon équivalent de l'aire de contact, les cellules 3A9m s'étalent moins d'environ un facteur 2. C : mesures de la circularité des cellules 3A9m sur les différents substrats, il n'y a pas d'influence de la molécule utilisée sur la morphologie de l'étalement.

2.2. Transfert de motifs adhésifs / répulsifs adaptés aux cellules T

Nous avons testé plusieurs méthodes de transfert, en :

- Cherchant la méthode la plus reproductible, par observation des patterns et de leur homogénéité par microscopie de fluorescence, avec un reporter de la molécule d'adhésion ou bien de la répulsion fluorescent si cela était possible
- Cherchant les motifs les plus adhésifs en observant l'étalement et la fraction de cellules immobilisées par observation en RICM / microscopie de transmission [cellules] / microscopie de fluorescence [pattern]

2.2.1 Méthode "directe"

Dans un premier temps, nous avons réussi à imprimer des disques d'aCD45 fluorescent (marqué par nous avec Alexa Fluor 488 puis rapidement nous avons utilisé Alexa fluor 565), que nous avons complété par incubation avec les trois molécules répulsives que nous avons qualifiées (BSA, PLL-PEG, F127). Sur ces substrats, le temps nécessaire pour les cellules pour s'étaler sur les motifs s'est montré supérieur à une heure. Les contrôles fluorescents (en particulier la mesure de la fluorescence moyenne des motifs ainsi que de leur régularité / homogénéité) ont indiqué une reproductibilité faible et une dispersion importante des surfaces obtenues, en termes de densité d'aCD45. Il en résulte des acquisitions en RICM peu contrastées (signe d'une adhésion faible), avec des aires d'adhésion non homogènes (signe de la présence de défauts, potentiellement remplis par les molécules de répulsion incubée en deuxième étape). Nous avons donc conclu que nous transférons une très faible quantité d'aCD45 par tamponnage et que pouvait se surajouter une dégradation des molécules lors de l'étape nécessaire de séchage du tampon, avant application. Nous avons essayé de quantifier cela par mesures de fluorescences, et estimé que nous perdions 50% d'anticorps (Fig. 5.5).

Résultats

Nous avons essayé des transferts de BSA biotinyllée, suivi d'une passivation avec de la BSA ou du PLL-PEG, puis une fonctionnalisation streptavidine suivie de (i) aCD45 biotinyllé ou (ii) protéine A/G biotinyllé puis aCD45. Ces essais se sont aussi montrés infructueux en termes de reproductibilité et n'ont pas amélioré les conditions d'étalement en RICM.

Suite au couplage de l'anticorps au fluorophore souhaité nous connaissons exactement la concentration de protéine que nous avons et le taux de couplage du fluorochrome associé. Nous avons voulu quantifier grâce à la fluorescence quelle quantité nous étions capables de transférer en patternant directement l'aCD45 fluo ou en l'adsorbant. Ces expériences ont été réalisées dans le cadre du stage de Laura Ghequieres que j'ai co-encadré. Afin de mesurer ce ratio nous avons établi une gamme de différentes concentrations d'aCD45 fluo que nous avons transféré à la surface ou directement incubé.

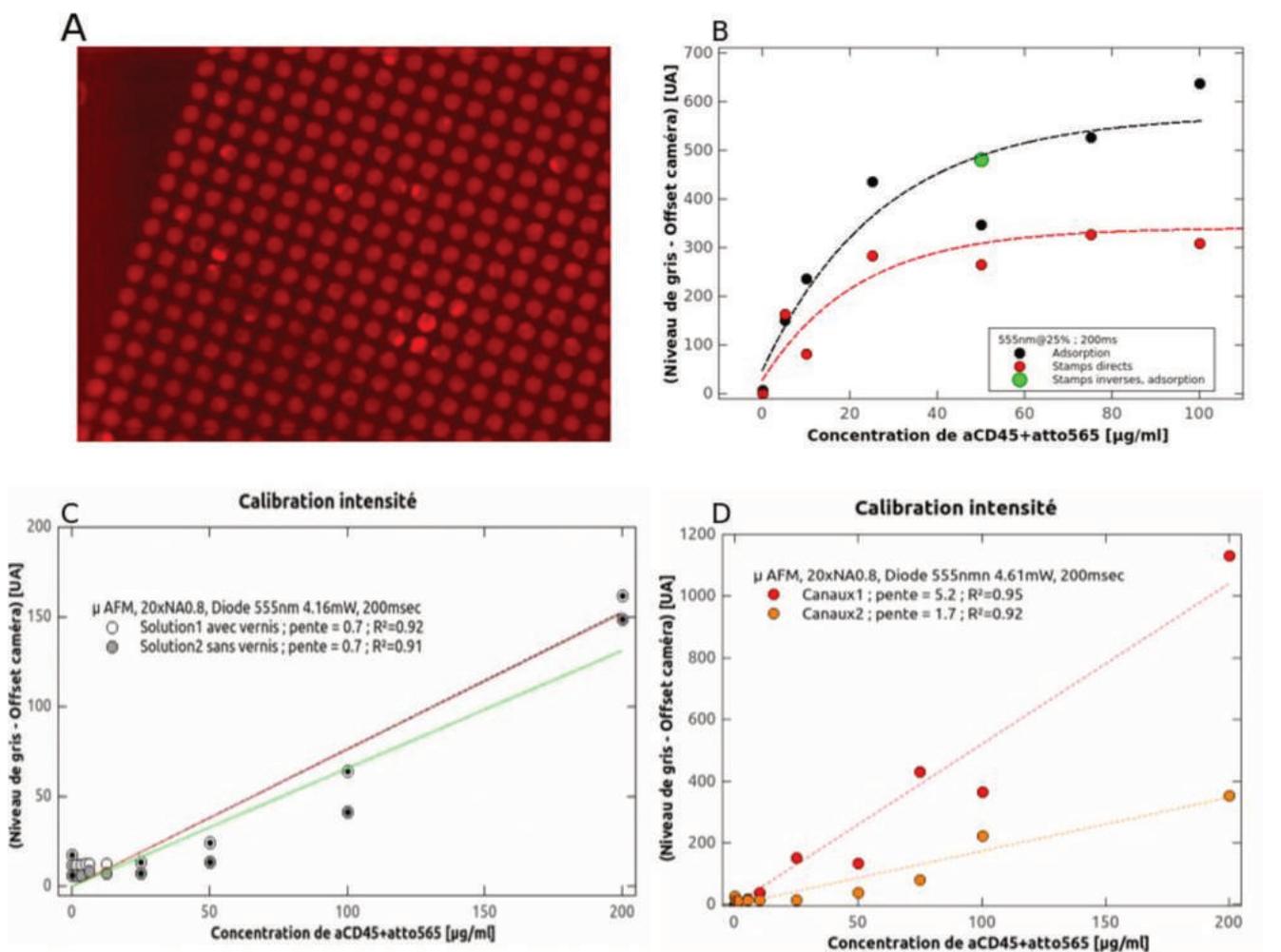


Fig. 5.5 : Conversion de l'intensité de fluorescence en densité de molécules. A : Image d'une surface micropatternée avec la méthode dite inverse où la BSA est transférée est un aCD45-Alexa Fluor 565

Résultats

est adsorbé, barre d'échelle = 20 μ m. B : Comparaison des intensités de fluorescence de l'aCD45 marqué sur la surface résultant des techniques de microstamping directe vs indirecte. On perd ~50% d'aCD45 lors de son transfert direct, nous utiliserons donc la méthode indirecte car elle permet un meilleur contrôle de la concentration et enlève le risque de dénaturation dû à une étape de séchage de la méthode directe. C : technique de calibration dite de lame/lamelle pour établir une courbe de calibration fluo = f (concentration aCD45). D : technique de calibration dite des canaux ayant le même but que C. Ces deux techniques ne nous ont pas permis d'établir des courbes de calibration linéaires et reproductibles.

Ensuite, nous avons mesuré l'intensité de fluorescence en utilisant toujours le même temps d'exposition et la même puissance ainsi nous avons pu établir le taux de perte d'anticorps à différentes concentrations. On constate une perte d'un facteur 2 entre une surface où l'anticorps a été directement transféré comparé à l'anticorps adsorbé, c'est pourquoi nous avons ensuite privilégié une méthode de stamping inverse, décrite ensuite (Fig. 5.6).

En outre, il était intéressant de savoir quelle densité finale de molécules allait être sur nos substrats exprimé en nombre de molécules/ μ m². Cette quantification s'est révélée difficile et nous n'avons jamais obtenu de résultats reproductibles nous permettant d'établir une courbe d'étalonnage. Pour calibrer les données de fluorescence obtenues et les transformer en densité de surface, nous avons utilisé 2 techniques différentes qui ont été précédemment utilisées en laboratoire lors des travaux de thèse de P. Robert (technique lame/lamelle) et de A. Hornung (206), (technique des canaux). Nous avons utilisé une gamme de concentration d'anticorps allant de 0 à 200 μ g/ml et nous avons soit placé une goutte de 4 μ l entre une lame et une lamelle en essayant d'avoir une épaisseur constante du montage. La lamelle a été scellée ou non avec du vernis pour vérifier que nous ne subissions pas une évaporation rapide de l'anticorps étant donné le petit volume que l'on ajoutait. Soit, nous injectons notre solution d'anticorps fluorescents dans des canaux microfluidiques de 30 μ m de hauteur (fourni par T. Sbarrato et A. Hornung) et nous mesurons la fluorescence de ces montages toujours dans des conditions identiques d'illumination. Dans le cas de la technique des canaux après la première mesure de fluorescence nous rincions au PBS 1X et nous mesurons à nouveau le signal de fluorescence. Ce signal sert d'arrière-plan pour chaque canal et est donc soustrait du signal initial. Ceci est valable car une grande quantité de fluorophore est adsorbée de manière non spécifique sur les parois du canal poreux. Ce fluorophore adsorbé ne modifie pas la concentration dans le bulk, mais ajoute une "fausse" fluorescence supplémentaire au signal obtenu et doit donc être soustrait. Le tracé de la fluorescence mesurée avec ces deux

Résultats

techniques ne s'est pas avéré être robuste dans notre cas et nous observons une grande dispersion des valeurs de fluorescence. (Fig. 5.5).

2.2.2 Méthode "inverse"

Nous avons par la suite mis en place une méthode que l'on a qualifié d'« inverse », car l'idée est d'imprimer la partie répulsive du motif, grâce à un tampon de relief complémentaire, et de remplir ensuite les zones laissées vides par de l'aCD45 par absorption simple. Ceci a l'avantage de préserver l'anticorps, mais les temps d'incubation ne peuvent être longs comme pour MAAACS (sur la nuit) au risque de polluer les surfaces de répulsion (ils sont ici gardés de l'ordre de l'heure, avec une concentration assez élevée en solution).

Nous n'avons pas réussi à transférer de manière efficace les molécules de répulsion PLL-PEG ou F127, avec des surfaces de verre et de tampon non modifiées ou avec des combinaisons de traitement par activation par plasma à air résiduel ou exposition aux UV. Il faut noter que nous ne pouvons effectuer de traitement chimique agressif avec les boîtes de Pétri à fond en verre commerciaux utilisés. Le contour de la boîte de Pétri est en plastique, collé (de nature non documentée) à la lame de verre. Nous sommes donc soumis, ce que nous verrons dans la discussion, à certaines différences subtiles de stérilisation et de traitement des lots de boîtes de pétri fond verre (traitement sur lequel nous n'avons malheureusement pu avoir de renseignement détaillé auprès du fournisseur WPI).

En revanche, le transfert de BSA ou BSA-biotine s'est révélé efficace, que les surfaces de verre soient natives ou activées par passage au plasma. Ces molécules, moins coûteuses et relativement robustes au séchage, nous sont apparues comme le meilleur compromis pour une répulsion efficace et observable (par utilisation de streptavidine fluorescente), même si l'utilisation de la BSA n'est jamais totalement neutre (207), (208).

En réalisant une quantité de tests assez importante, nous avons pu optimiser les conditions de concentrations, de temps, de pression sur le tampon en PDMS de façon à produire des répulsions efficaces, et en observant les concentrations de aCD45 qui, pour une incubation de l'ordre de l'heure, permet une adhésion ferme et un étalement complet pour les tampons de 10 à 20 μ m de diamètre. Nous avons ainsi établi une séquence la plus favorable comme étant (i)

Résultats

tampon BSA-biotinylée à une concentration de 10mg/ml sur verre nu ou plasma à RT (ii) adsorption de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aCD45 pendant 45 min à température ambiante et révélation des motifs par Streptavidine couplée au fluorochrome Alexa Fluor 546 pendant 20 minutes à température ambiante (Fig. 5.6) (voir matériel et méthodes page 106).

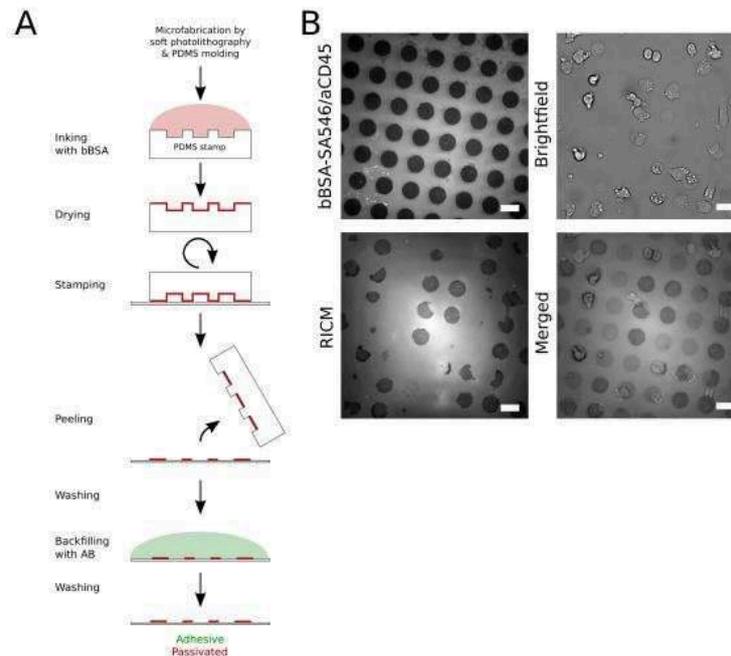


Fig. 5.6 : Impression protéique sur une surface de verre, A. Schéma du protocole d'impression par tamponnage (microcontact printing) inverse. B. Images (i) en fluorescence, de la partie répulsion du motif. Les ronds noirs contiennent l'aCD45 non marqué (ii) image en transmission des cellules sur cette surface ; (iii) aire de contact observé en RICM et (iv) superposition des trois images. Barre=20 μm .

Sur les substrats inverses, l'utilisation de aCD45 non marqué, a contrario de l'approche directe, laisse les zones adhésives libres de toute fluorescence parasite qui pourrait influencer la lecture de l'activation via la sonde PBX.

2.2.3 Optimisation de l'étalement cellulaire

Nous avons ensuite cherché à optimiser l'étalement des cellules sur les motifs (a) en minimisant le temps nécessaire pour que les cellules recouvrent les stamps inverses de aCD45 les plus larges, (b) en jouant sur la température lors de cet étalement pour minimiser la compartimentalisation de la sonde calcique (que l'on peut voir en fluorescence et qui dégrade

Résultats

l'état des cellules) et (c) en effectuant un lavage délicat des cellules non adhérentes, présentes entre les motifs, sans déplacer ou stimuler les cellules qui ont adhéré, et en laissant reposer quelques minutes ces dernières après le dernier rinçage.

De manière empirique, nous avons déterminé qu'une incubation de 45 min / 1h, à 25°C (Fig. 5.2 B), avec le marqueur calcique permet un bon compromis et une bonne reproductibilité des points (a) et (b). De plus, pour la concentration de aCD45 utilisée lors de l'incubation, les cellules ne montrent pas de changement de forme ou de décollement lors de la stimulation par aCD3 soluble. Ceci est très favorable pour des mesures en AFM comme celles présentées au chapitre 5 section 4 (page 163).

2.3. Caractérisation mécanique des cellules mises en forme ou non

Afin de déterminer l'indentation maximale que l'on peut utiliser pour un ajustement par un modèle de type Hertz, sans avoir d'effet supplémentaire dû au noyau de la cellule, nous avons imagé en microscopie confocale les positions relatives de l'actine corticale et de la membrane par rapport au noyau (Fig. 5.7). En effet, le noyau est un composant cellulaire très dense et rigide, connaître sa position est déterminante pour ne pas avoir son influence lors de la mesure d'élasticité globale de la cellule. Cette information nous permet d'avoir une idée de l'homogénéité lors du contact bille et cellule T. Les valeurs typiques observées sur les populations de cellules, sur patterns ou surfaces continues, sont supérieures à 1 μ m. En conséquence, nous avons choisi de limiter notre zone d'ajustement aux premiers 500nm d'indentation pour exclure autant que faire se peut les contributions du noyau.

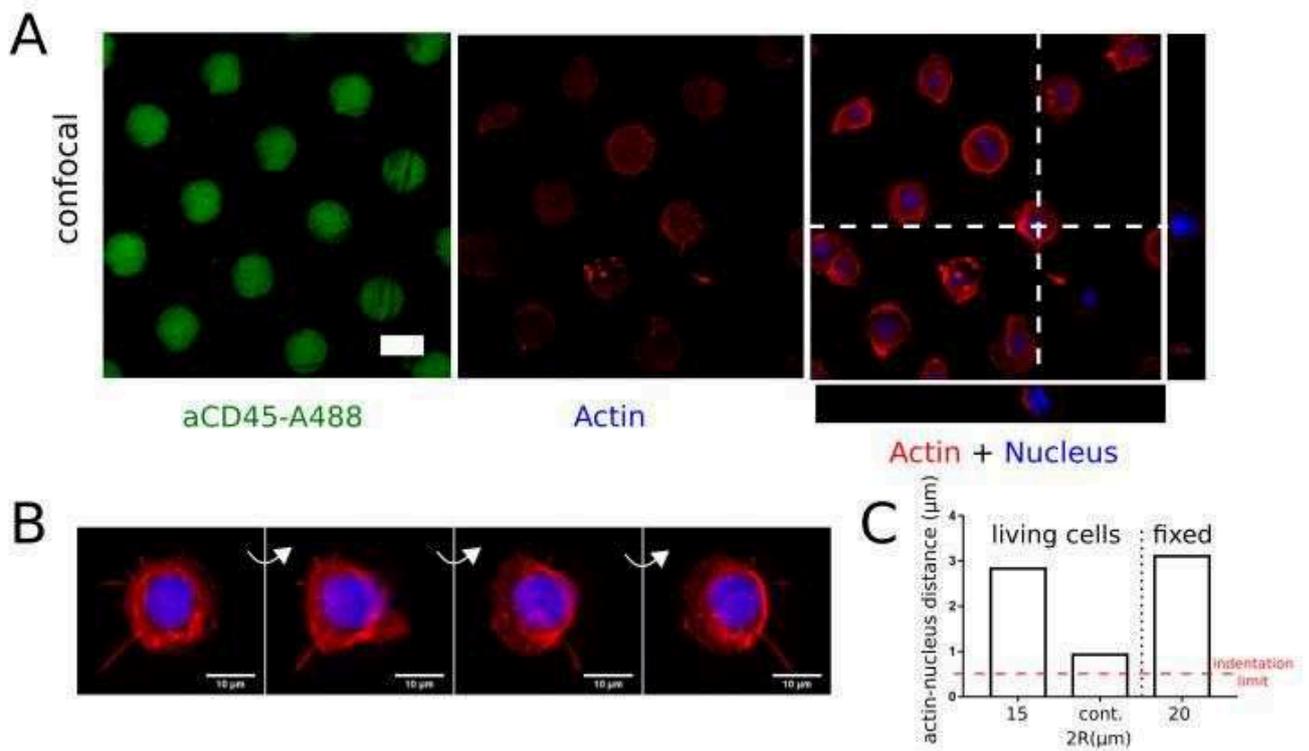


Fig. 5.7 A : Imagerie confocale des patterns (en utilisant un aCD45 marqué), de l'actine et du noyau, avec coupes orthogonales. B : Reconstruction 3D d'une cellule sur pattern (différents angles). C : Mesures de la distance actine corticale / noyau (qui n'est pas très loin de la distance membrane / noyau (209), (210)).

La mécanique des 3A9 a été caractérisée par indentation par AFM, à l'aide d'une sonde colloïdale que nous fabriquons au laboratoire par micro-manipulation (voir matériel et méthodes). Ceci nous permet une indentation sur des échelles latérales de l'ordre des contacts initiaux entre cellules.

Nous avons indenté de manière répétée des cellules adhérees avec une force maximale modérée (typiquement 500pN) avec des temps de contacts entre 0 et quelques secondes et un temps de repos d'une seconde entre chaque répétition avec un maximum de 10 courbes établies. La position du piézoélectrique est constante (constant height mode) et correspond à un mode classique de l'AFM en SCFS (158).

Dans le premier cas, nous avons extrait le module de Young à partir de la partie contact du segment aller de la courbe de force (154),(211), dans le second cas, nous avons cherché à

extraire l'exposant n d'une loi de puissance par un ajustement pour $f(t)$ avec $f = f_0 \left(\frac{t}{t_0} \right)^n$ (199).

Résultats

Nous avons vérifié qu'en maintenant la position du piézo constante, la relaxation de force observée n'induit qu'une variation très faible (de l'ordre de 4 à 5% en moyenne) de l'indentation (Fig. 5.8).

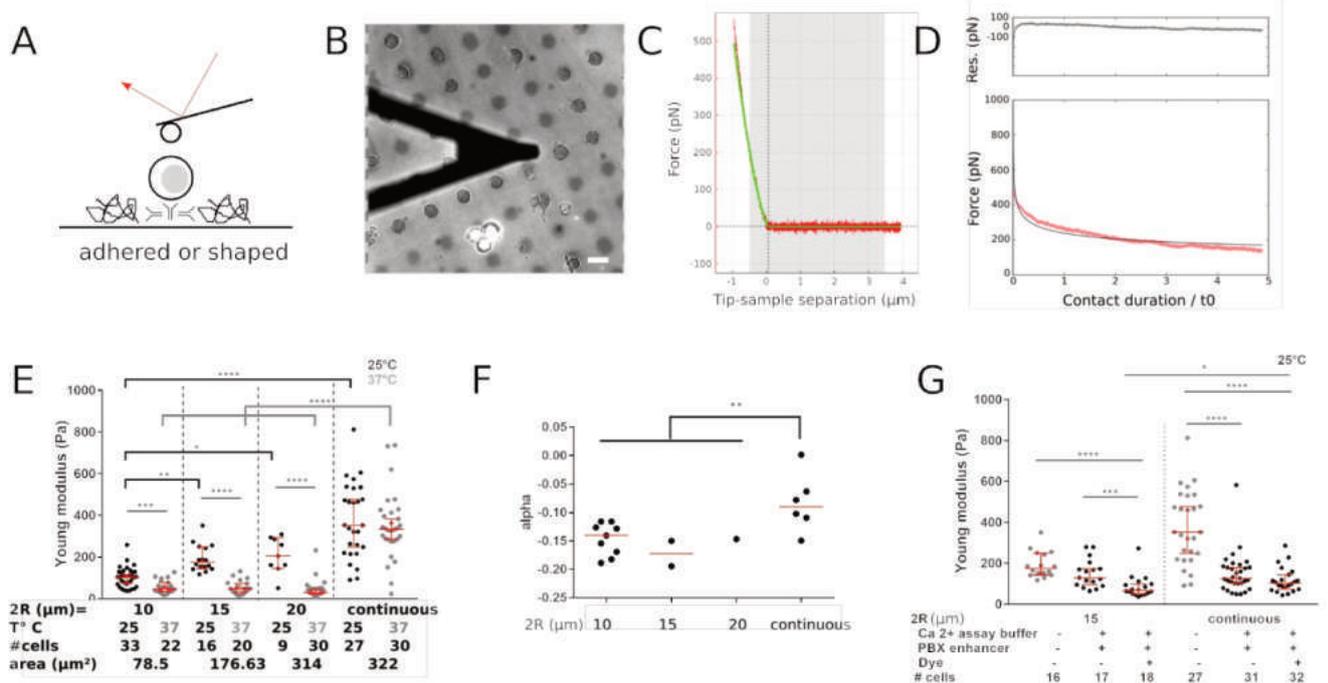


Fig 5.8 : Caractérisation des propriétés mécaniques des cellules T 3A9m A. Schéma d'une mesure d'indentation par AFM avec une sonde colloïdale sur cellule 3A9m adhérente ou patternées. B. Image composite montrant les patterns (observés en fluorescence), le levier (triangle noir) et les cellules patternées en transmission. Barre =20μm. C. Courbe typique d'indentation (Force vs. Indentation) et ajustement par un modèle de Hertz pour une sphère. D. Courbe typique de relaxation, ajustement par une loi de puissance et résidus du fit. E. Mesures du module de Young (un point = une valeur moyenne pour une cellule), en fonction de l'aire et du type d'adhésion. En noir, à 25°C – en gris, à 37°C. F. Exposant de la loi de puissance mesuré lors des relaxations, à 25°C (trop peu de mesures ont été faites à 37°C pour être présentées ici). G. Influence des différents composants du marquage par la sonde calcique sur le module de Young, mesuré à 25°C. Les marqueurs rouges correspondent aux médianes avec les écarts interquartiles. Tests statistiques = Mann-Whitney.

Nos mesures ont confirmé, comme attendu, que la température de mesure est un paramètre crucial pour la mécanique mesurée à l'instar des expériences réalisées par (212). Lorsque les expériences ont été réalisées à 25°C, le module élastique mesuré augmente en fonction de l'aire d'adhésion moyenne des cellules sur les motifs, mais nous avons surtout observé une différence significative entre les mesures réalisées sur le motif le plus grand et la surface continue, qui pourtant correspondent à deux aires d'étalement très comparables en moyenne, mais avec des morphologies très différentes (symétrique Fig 5.8B vs. Allongée Fig 5.3). A 37°C, cette tendance s'estompe, mais la différence forte entre le plus grand motif et la surface continue demeure.

Résultats

Pour les mesures sur motifs, les résultats pointent vers une forme d'homéostasie mécanique, qui serait plus en place à 37°C (213), (214). La variation forte enregistrée à chaque fois de module élastique, à aire constante, entre les cellules symétriques et non est reliée à la forme globale de la cellule. Par microscopie confocale, on observe que la distance moyenne actine/noyau est plus faible pour les cellules anisotropes, qui sont moins hautes. Ceci est en faveur d'effets complexes entre la position du noyau, l'organisation de l'actine au-dessus de celui-ci (140) et éventuellement des microtubules en dessous et de la distance noyau/actine corticale qui crée un effet de surface comparable à ce que l'on observe traditionnellement pour les structures fines tels les lamellipodes (215).

L'exposant de la relaxation est quant à lui moins sensible (à 25°C) à la façon d'immobiliser les cellules et les valeurs enregistrés ne sont pas très différentes, de manière notable, de celles enregistrées sur des systèmes cellulaires différents (138). Ceci tend à prouver que pour une température donnée, la composante visqueuse de la mécanique cellulaire à l'œuvre dans la relaxation de force n'est pas affectée de manière importante par la forme ou l'adhésion de la cellule.

En revanche, le fait de charger les cellules T avec l'indicateur calcique PBX a une influence forte sur les propriétés mécaniques, les rendant plus souples. Nous avons pu observer que cette modification trouve son origine dans le milieu utilisé lors de la charge (de couleur violette et de composition inconnue). On peut suspecter ce tampon de contenir des surfactants (acide pluronique) pour aider le marqueur à pénétrer le cytosol ou bien des inhibiteurs de transporteurs membranaires (probenecid) qui pourraient perturber membrane et cytosquelette. Sur cet effet physico-chimique pourrait se rajouter, en présence de sonde calcique, une séquestration même partielle du calcium intracellulaire par la sonde, ce qui pourrait induire une perturbation du cytosquelette à l'image de ce qui a été observé sur les monocytes THP1 (216), (217)(14). De plus nous avons également vérifié que l'étalement des cellules T sur aCD45 chargées avec la sonde calcique n'était pas perturbé comparé aux cellules non chargées.

2.4. Les cellules mises en forme sont réactivables par aCD3 soluble

Nous avons poursuivi l'utilisation de MAAACS pour qualifier de manière automatique les capacités d'activation des 3A9m patternées ou non lors d'une stimulation avec 20µg/mL d'aCD3 soluble (Fig. 5.9)

Nous avons pu observer que les cellules, incubées 1h, qui sont sur des surfaces d'aCD45 provenant d'une incubation de même durée, du même anticorps, sur des surfaces a priori identiques (50µg/mL, 45min), mais dont l'aire accessible varie du fait de la présence ou non des motifs, se réactivent de la même manière (fraction réactivées identiques, intensités de fluorescence identiques). La quantité d'aCD45 mobilisée n'influe pas de manière notable la réponse calcique. La forme des cellules, dans ce cas précis et contrairement à une stimulation localisée (141) n'influe pas l'activation. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de (218) qui ne voient pas d'effet de la mobilisation de aCD45 pour une stimulation forte. Nous estimons une variation du nombre de molécules proportionnelle au diamètre, ce qui, si l'adsorption conduisait à un taux de couverture de 100 %, à une consommation de 30 à 60 % des CD45 en fonction de l'aire d'adhésion car les anticorps adsorbés à la surface sont couchés (Fig. 5.10).

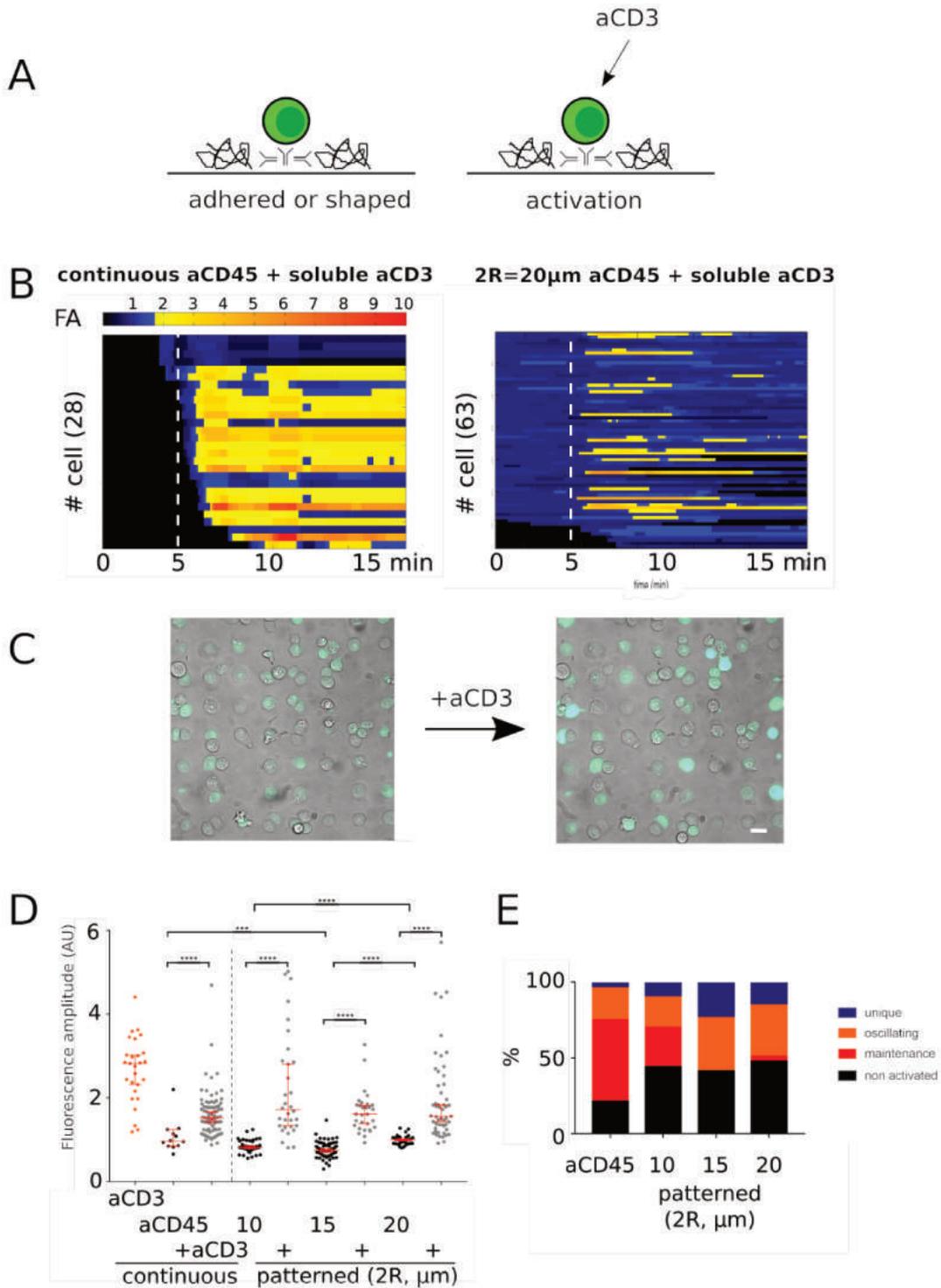


Fig. 5.9 : Observation et mesures de l'activation T par stimulation avec un aCD3 soluble à 20μg/ml. A. Schéma d'une expérience de MAAACS sur substrats patternés avec une activation par aCD3 soluble. B. Cartes de flux calciques typiques (normalisés) en fonction du temps. Une ligne correspond à une cellule. Deux cas sont présentés : un cas d'une surface continue d'aCD45 et un cas d'une surface micropatternée. L'injection d'aCD3 soluble est identifiée par la ligne en pointillés. C. Image composite montrant les cellules patternées avec leur fluorescence, avant et après stimulation par aCD3 soluble. D. Amplitudes de fluorescence normalisée moyenne enregistrées par MAAACS. Un point = une cellule. E. Morphologie des flux calciques observés en fonction de la condition.

Résultats

En effet, l'imagerie AFM de patterns montre une hauteur de 4nm ce qui correspond à des anticorps sur le côté. De plus, les morphologies des flux calciques évoqués par l'activation ne sont pas très largement différentes pour les différents substrats (Fig. 5.1). De même nous ne notons pas de délais dans l'apparition des flux calciques lorsque les cellules sont patternées ou non. Toutefois, il semble qu'un pourcentage plus faible de cellules soient activées lorsque celle-ci sont mises en forme, on peut alors se poser la question du rôle de la polarité dans l'activation. En effet, à aire constante, les cellules sans restriction sur aCD45 ont une aire maximale d'étalement correspondant à un pattern de 20 μ m de diamètre.

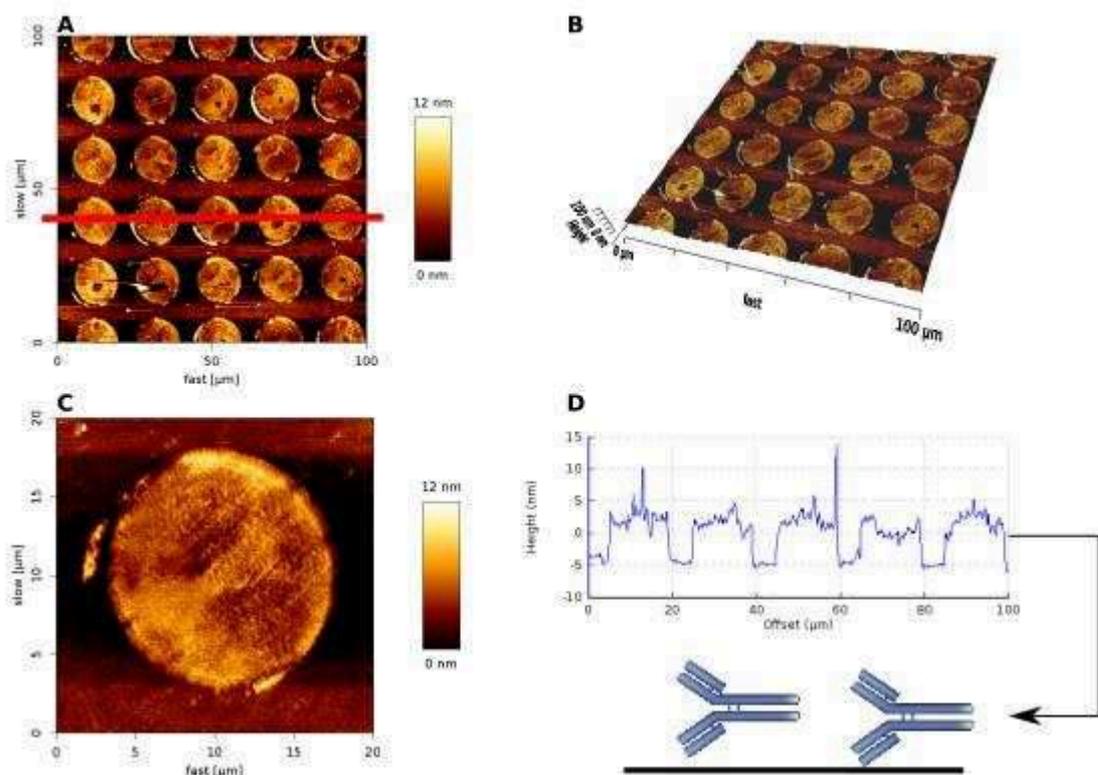


Fig. 5.10 : Imagerie en AFM des surfaces micropatternées avec aCD45 formant des formes circulaires de 15 μ m de diamètre. A : Imagerie d'une zone de 100*100 μ m de micropatterns où l'on voit que leur forme et leur localisation sont régulières, ligne rouge = zone où a été tracé le profil de hauteur, barre = code couleur pour représenter la hauteur (z) en nm. B : même image que A en projection 3D. C : Imagerie d'un seul pattern (20*20 μ m) qui permet de mettre en évidence l'homogénéité globale du pattern en hauteur. D : profil des micropatterns confirmant la régularité de leur taille et espacement et révèle qu'ils ont une hauteur ~4nm ce qui correspond à des aCD45 sur le côté comme représentée sur le cartoon associé.

Résultats

Apparté :

La quantité 50µg/mL qui est utilisée pour les stamps en adsorption peut paraître être dans la zone où la réactivation est la moins favorable d'après la Fig. 5.1 qui présente les résultats de MAAACS. Il faut noter que dans le cas de MAAACS "classique", l'incubation a lieu pendant une nuit alors que pour les cas de surfaces à motifs, l'incubation ne dure qu'une heure. Il est donc peu probable que l'on ait les mêmes taux de couverture, et donc on se retrouve sur les stamps avec des densités plus proches des surfaces de MAAACS "classiques" faites avec des concentrations plus faibles, donc plus efficaces en réactivation.

De plus, nous avons observé que les cellules 3A9m adhérentes sur des surfaces de aCD45 préparées de la même façon que pour les stamps (incubation courte) étaient activées de la même manière que lors de tests où les COS APC sont sur la surface et les 3A9m sédimentent dessus.

En outre, cette concentration nous permet de faire adhérer et s'étaler rapidement les cellules T sur la surface avec un pattern observé en RICM comme fort (Fig. 5.3)

On peut également s'étonner de l'intensité de la réponse calcique (amplitude de fluorescence), si elle doit être comparée à des travaux antérieurs de l'équipe du CIML. A cette époque, les stimulations en cytométrie étaient réalisées avec des complexes anticorps 2C11 biotinylés (anti CD3) /streptavidine. Or ces complexes sont bien plus efficaces pour agréger les récepteurs T que des anticorps bivalents seuls.

Tout cela nous permet de penser que cette concentration (à l'incubation) ne gêne pas la réactivation par des aCD3 solubles, ni par des cellules, ce qui explique que c'est elle que l'on a retenue pour les tests sur nos cellules modifiées et pour nos essais préliminaires de présentation COS APC / 3A9m sous force par SCFS.

3. Conclusions and perspectives

Nous avons pu obtenir des cellules 3A9m patternées, chargées par un indicateur calcique, de forme, de position et de mécanique contrôlées. Ces cellules sont de plus activables par aCD3 soluble et la méthode d'immobilisation des 3A9m ne semble pas gêner l'activation par contact avec des COS APC. Des tests de réactivation de cellules patternées par des COS APC ont été menés de manière préliminaire, mais la construction d'une statistique est gênée par les contacts cellule / cellule rares. L'utilisation de pinces optiques

Résultats

pour manipuler les COS APC pourraient permettre de créer ces contacts et d'en contrôler le $t=0$ afin de suivre finement les séquences temporelles d'évènements. Les pinces optiques pourraient permettre, par traction de tubes de membrane, de voir si la tension de la membrane, contrairement au module de Young, est affecté par la mise en forme, plus ou moins étalée, de la cellule (211). De plus, nous venons de recevoir (octobre 2018) le module CellHesion de JPK Instruments permettant d'avoir une course de $200\mu\text{m}$ ce qui permettra également de mesurer la tension membranaire grâce à l'utilisation de cantilevers fonctionnalisés et sur des cellules patternées ou non.

Nous avons pu mettre en évidence l'effet de la température et du milieu de charge en sonde calcique sur les propriétés mécaniques des cellules patternées ou simplement adhérees. L'effet de la sonde semble être dépendant et/ou du soin donné à introduire un temps de repos aux cellules après la charge car (154) présentent des résultats opposés pour Fluo4AM qui est un marqueur proche de PBX.

Le fait d'avoir des cellules uniques, localisées, standardisées permet de s'assurer de l'aire d'adhésion de toutes les cellules lorsque celles-ci remplissent les patterns. La standardisation de l'étalement des cellules et des différentes polarités possibles (avant/arrière permettant par exemple d'imposer à une cellule T une morphologie présentant un grand lamellipode à l'avant) ouvre des perspectives intéressantes pour l'imagerie à haute résolution de la structure et de l'organisation de la membrane cellulaire.

En effet, on peut imaginer mesurer les propriétés de diffusion du TCR par exemple lorsque les cellules T sont sur des patterns de différentes i) aire ii) polarité iii) protéines d'immobilisation (activatrice par exemple) permettant ainsi l'introduction de différentes perturbations au niveau i) de la composition des lipides membranaires ii) des protéines du cytosquelette iii) des protéines clés de l'activation (Zap -70, Lck parmi d'autres). En outre le fait d'utiliser des patterns non fluorescents permettra d'utiliser différents types de microscopie à haute résolution sans induire de bruit de fond parasitant l'imagerie, TIRF pour étudier l'interface cellule substrat, PALM et STED pour étudier l'organisation du cytosquelette.

Nous avons essayé de produire des motifs asymétriques (comme une ancre, un cône de glace...) pour mimer une cellule en mouvement par exemple, mais la difficulté est d'en définir la largeur optimale (c'est à dire l'aire minimale d'adhésion pour mettre la cellule en forme). Ce qui peut être aisé avec des molécules d'adhésion type intégrines sur ECM, où le cytosquelette est directement mobilisé, ne l'est peut-être pas pour des molécules de surface

Résultats

dont le lien au cytosquelette est plus ténu, à l'image de CD45. Une méthode d'avenir semble l'impression par laser UV sur des surfaces (type PRIMO, voir chapitre Conclusion et Perspectives en page 198), mais la difficulté en est le coût matériel et l'inclusion des surfaces produites dans des portoirs permettant un montage aisé sur l'AFM ou les pinces optiques disponibles au laboratoire, qui ont des systèmes thermostatés un peu contraints, en particulier en regard des vibrations mécaniques qui peuvent déstabiliser les mesures. Des portoirs métalliques, de dimension assez optimale, ont été commandés et reçus en juin 2018 mais n'ont pas encore pu être testés.

3. L'expression ectopique du récepteur non lymphoïde MEGF10 comme molécule d'adhésion de lymphocytes T ne me modifie pas les propriétés mécaniques et l'activation.

1. Contexte de l'étude

Dans le chapitre 5 section 2 (page 123), nous avons montré qu'il était possible de contrôler l'adhésion et l'immobilisation des cellules 3A9m sans induire leur activation et sans provoquer leur anergie. Pour cela nous avons fonctionnalisé, de manière continue ou patternée, des surfaces avec différentes molécules et sur lesquelles les cellules T interagissaient en ayant été préalablement chargées avec la sonde calcique PBX. Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence que la molécule optimale pour immobiliser les cellules 3A9 sans les activer préalablement tout en pouvant les activer par la suite est un anticorps anti-CD45, tout en considérant que la BSA était la plus adaptée pour passiver les espaces entre les zones patternées. Différentes études ont montré que certains anticorps anti-CD45 ne perturbaient pas la signalisation T (218). De plus tenant compte de l'abondance de CD45 à la surface d'un lymphocyte T (100 fois plus abondant que de TCR) nous avons pu exclure dans notre système que l'immobilisation d'une fraction de CD45 n'inhibait pas la réponse calcique des cellules T en présence d'anticorps stimulants (anti-CD3 ou de cellules présentatrices), même si dans certaines conditions expérimentales la réponse calcique est significativement modifiée. De fait, CD45 est fonctionnellement relié à la phospho-tyrosine kinase Lck, qui permet l'initiation de la cascade de signalisation biochimique de l'activation du lymphocyte T (219) et semblerait réguler l'axe de signalisation calcium/NFAT (Wang, Liang et al. 2000). L'exclusion de CD45 de la zone de contact entre le TCR et le pMHC est décrite dans plusieurs modèles d'activation notamment dans celui de la ségrégation cinétique mettant ainsi en évidence un de ces rôles dans les premières étapes de l'activation T (220). CD45 a donc, de manière probable, un rôle régulateur de l'activation en étant d'abord exclus puis plus tardivement, se retrouve dans la synapse pour limiter une trop forte activation (221). Cependant, des études montrent également que la ségrégation de CD45 n'est pas obligatoire pour initier l'engagement du TCR (218).

Plutôt que d'immobiliser même partiellement des récepteurs endogènes (que ce soit CD43, MHCI, CD45, tous montrent un léger effet sur la réponse calcique, nous avons développé une autre approche d'immobilisation des lymphocytes T, reposant sur l'expression ectopique d'une molécule d'adhésion qui n'est pas exprimée dans les cellules T. Nous avons

Résultats

choisi la protéine MEGF10 (pour Multiple Epidermal Growth Factor-like domain Protein 10). Cette protéine est l'orthologue du récepteur Ced-1 impliqué dans la reconnaissance des cellules apoptotiques chez le nématode *C. Elegans* (222). Différentes études chez la drosophile (gène DRAPER) (223) ou chez les eucaryotes supérieurs ont montré que cette famille de protéines membranaires avait conservé cette fonction (179), (224), (225). Cependant, on peut noter que l'expression de MEGF10 chez les mammifères est restreinte à la sphère cérébrale (exprimé dans les astrocytes, dans les cellules de la rétine) et musculaire où MEGF10 influencerait sur la prolifération des cellules musculaires (226), (227).

L'objectif de ce travail a été d'une part d'exprimer la protéine MEGF10 dans les cellules 3A9m, de mesurer si son expression modifiait ou non l'activation T, et de mesurer la mécanique de ces cellules par AFM.

2. Résultats

2.1. Expression à la membrane de MEGF10

MEGF10 est une protéine membranaire de type 1, composée de 1140 acides aminés (d'un poids moléculaire estimé de 170kDa), composé d'un domaine extracellulaire de 858 AA, à titre de comparaison, le domaine extracellulaire le plus long de CD45 (577 AA). Même si aucune donnée cristallographique ne vient étayer cette hypothèse, il semble prévisible que la longueur réelle de ce domaine soit plus grande que CD45, et par essence va potentiellement moins impacter la mobilité de la majeure partie des molécules de la membrane des cellules T. Le choix de MEGF10 est également dicté par sa capacité à présenter une localisation polarisée dans les cellules adhérentes à la membrane au contact avec le support (coaté ou non d'ailleurs) (Y. Hamon, observations sur cellules HeLa et (228)).

Notre première idée a été de créer une molécule chimérique où le domaine extracellulaire de MEGF10 était ancré sur le feuillet extracellulaire de la membrane plasmique par une ancre GPI, en aval d'une GFP. L'idée sous-jacente était de ne pas perturber les voies de signalisation intracellulaires de la cellule T, en particulier par le motif NPxY, phosphorylable par les kinases Syk, auxquelles appartient la kinase Zap70.

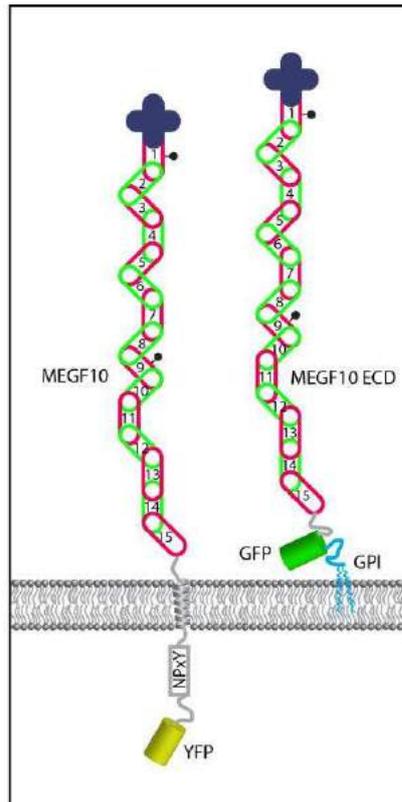


Fig. 5.11 : Représentation schématique de la protéine MEGF10 ; composé d'un domaine Emilin, (croix bleue, probablement impliqué dans l'oligomérisation du récepteur), de 15 à 17 domaines EGF-like (maillons rouges et verts), deux sites potentiels de glycosylation (cercles bleus) un segment transmembranaire de 20 AA (hélice grise), et un domaine cytoplasmique de 261 AA portant un domaine phosphorylable (NPxY) par la tyrosine kinase Syk (rectangle gris). Elle est exprimée dans notre étude sous la forme d'une protéine chimérique avec le YFP. Une construction alternative a été générée où le domaine extracellulaire de MEGF10 (ECD) a été fusionné à un ancrage GFP ::GPI.

Malheureusement, il ne nous a pas été possible d'observer après électroporation une fluorescence membranaire spécifique, que ce soit pour la version GFP ou TagBFP2. Nous n'avons cependant pas pu exclure que la protéine MEGF10 ECD ::GFP ::GPI était bien adressée à la membrane même non fluorescentes, du fait de l'absence d'anticorps spécifiques anti MEGF10 ECD. Il est possible en effet qu'une protéine fluorescente, encadrée en N- et C-terminal par deux autres protéines ne parviennent pas à conserver son chromophore correctement conformé (a fortiori en milieu extracellulaire). Afin de lever ces doutes, d'autres types cellulaires pourront être transfectés par ces constructions hybrides, même si on ne peut également exclure le rôle du 5' UTR de MEGF10 (absent de cette construction) jouant un rôle dans la translocation co-translationnelle de la protéine. L'hypothèse la plus vraisemblable est effectivement une construction imparfaite, d'autant qu'aucune adhésion exceptionnelle au plastique des boîtes de culture n'a pu être remarquée chez les cellules 3A9m transfectées avec ces constructions.

Résultats

Nous nous sommes contentés d'électroporer la construction originale MEGF10 ::YFP (179), et sélectionner, trier et étendre une population de cellules 3A9m exprimant un niveau comparable de TCR et un fort niveau de fluorescence YFP (**3A9m Meg**).

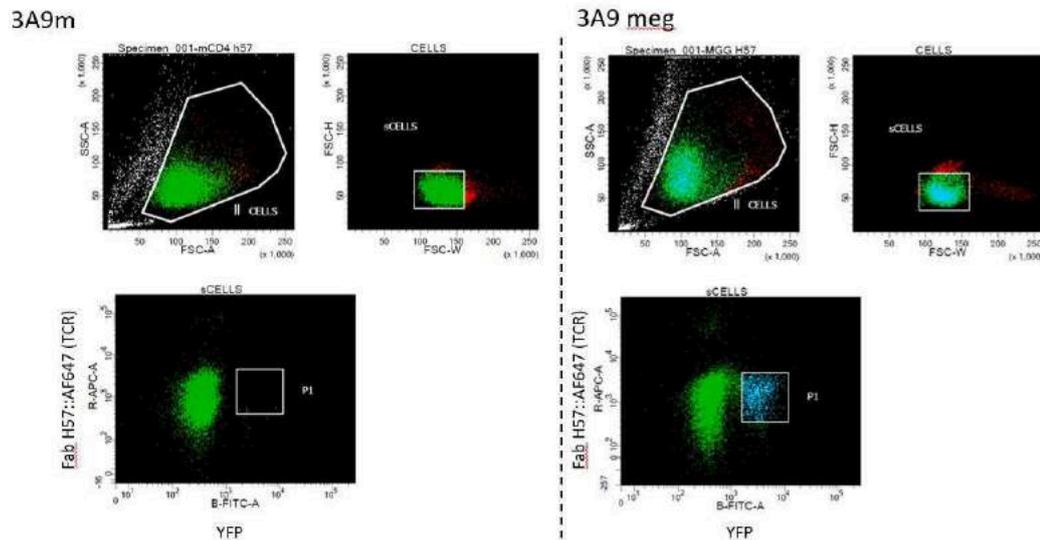


Fig. 5.12 : Tri cellulaire des cellules 3A9m exprimant la construction MEGF10 ::YFP. Les cellules triées (population P1) sont choisies en fonction de leur niveau de fluorescence dans le canal B-FITC-A (YFP) et leur niveau d'expression du TCR (R-APC-A). FSC-A : Forward SCatter-Area, SSC-A : Side SCatter-Area : Dot plot permettant de différencier les cellules selon leur taille et leur granulosité. FSC-W (width) vs FSC-H (height) dot plot permet de différencier les singulets des doublets de cellules. Panel de gauche, cellules 3A9m non transfectées. Panel de droite : 3A9 transfectées MEGF10 ::YFP

Cette précision en apparence sémantique n'est pas inutile. En effet, nous n'avons pas le moyen de distinguer les cellules qui expriment MEGF10 ::YFP de cellules n'exprimant que la YFP cytosolique (due à une intégration tronquée de la construction et une production d'un transcrit initiant au niveau de l'ATG de la YFP). Cependant, cette population mixte a au moins dans un premier temps permis de facilement mettre en évidence le phénotype espéré pour les cellules exprimant MEGF10. En effet, on note un très fort enrichissement de la protéine au niveau de la membrane basale au contact avec le support (poly-L-Lysine), qui s'étale très rapidement (entre 5 et 10 minutes) sous forme d'un voile mosaïque parsemé d'enrichissements locaux (crampons), consistants avec la littérature (Suzuki and Nakayama 2007). En comparaison, les cellules n'exprimant que la YFP cytosolique ne montrent pas cet enrichissement ni ces prolongements membranaires (Fig. 5.13A).

2.2. Caractérisation au microscope confocal de MEGF10

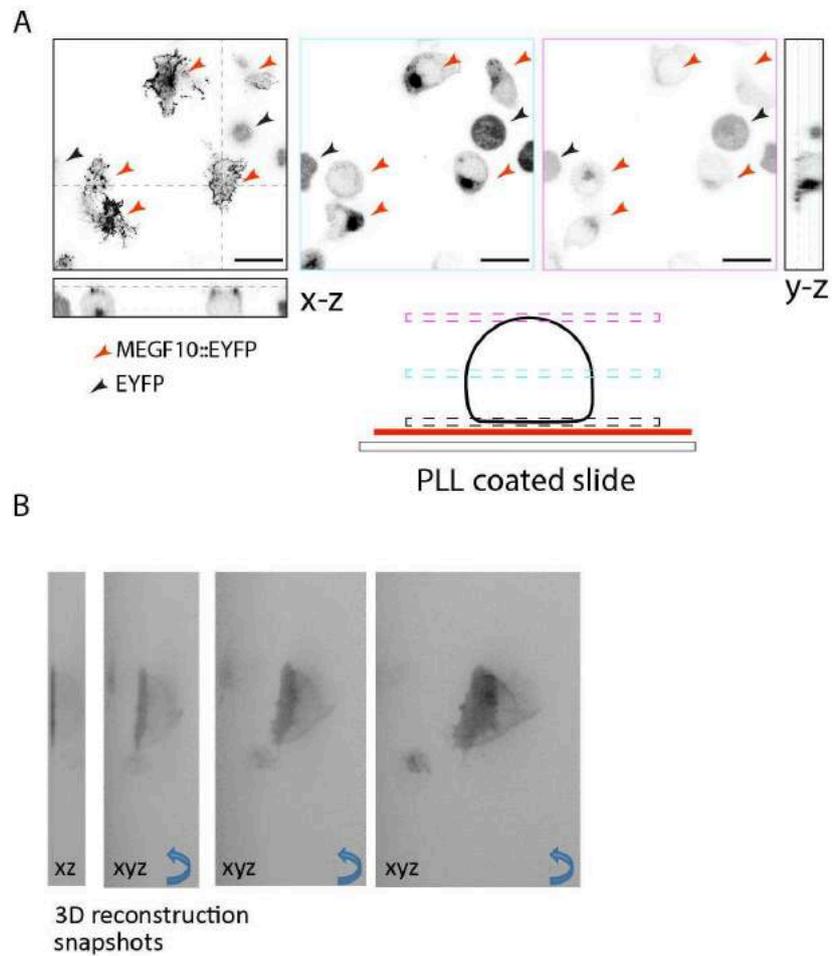


Fig. 5.13 : MEGF10 ségrège au niveau de la zone d'adhésion à l'interface verre et membrane basale. **A** : Microscopie confocale des cellules 3A9m MEGF10::EYFP et des cellules n'exprimant que la protéine EYFP étalées sur poly-L-Lysine 0.01%. Schéma décrivant à quelle hauteur les images ont été enregistrées, cadre noir : à la zone de contact, cadre bleu : au niveau de l'équateur, cadre rose : au niveau de la membrane apicale. **B** : reconstruction 3D d'une cellule 3A9 MEGF10 ::YFP adhérent sur poly-L-Lysine.

Nous pouvons ainsi objectiver d'une part un adressage polarisé de la protéine MEGF10 vers la zone de contact de ces cellules, s'accompagnant d'une faible expression au niveau de la membrane apicale de la cellule. Cette polarisation est avantageuse pour les approches de SCFS où la zone d'appui avec une bille ou une COS APC au niveau apical ne devrait pas être perturbée par la présence de MEGF10::EYFP.

2.3. Mesures mécaniques des cellules 3A9m Meg

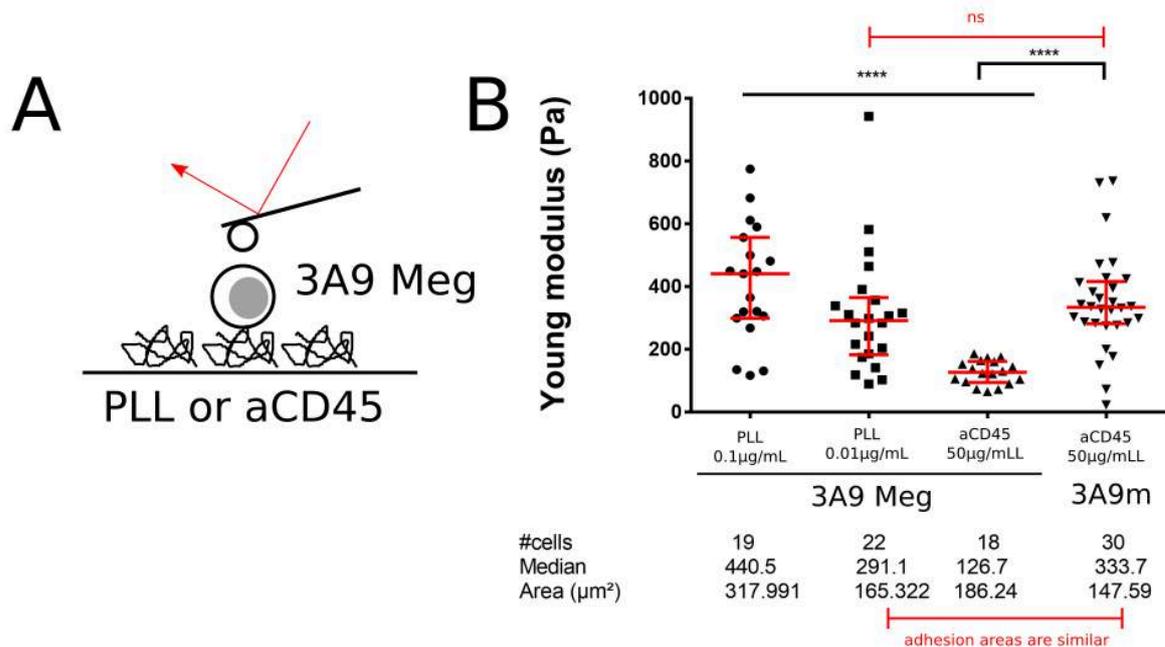


Fig. 5.14: MEGF10 présente des propriétés mécaniques similaires aux 3A9m et peuvent être modulées par la concentration de Poly-L-Lysine. Mesures de l'élasticité des cellules T 3A9 MEGF10::EYFP par AFM. A : Schéma descriptif des mesures des courbes de forces par AFM, les cellules ont adhéré sur un substrat (poly-L-Lysine/aCD45) et le levier est décoré avec une bille de 5µm de diamètre mis en contact 10 fois avec la cellule. B : Élasticité des cellules 3A9m MEGF10::EYFP en fonction de différents substrats sur des surfaces continues. Ces résultats sont comparés aux mesures mécaniques des cellules T 3A9m initiales (dernière colonne à droite) préalablement réalisées et présentées dans la section 2 des résultats.

Nous avons testé plusieurs conditions d'adhésion pour les cellules T 3A9m Meg. Tout d'abord en variant la concentration de poly-L-Lysine on constate qu'une concentration élevée de PLL (0.1%) entraîne un étalement plus important (quasiment un facteur 2) comparé à une concentration de 0.01%. Dans ce cas la membrane des cellules est plus rigide, comme en témoigne un module de Young plus élevé. En revanche, l'adhésion des cellules sur une surface coatée avec une concentration conventionnelle de poly-L-Lysine (0.01%) induit une aire d'adhésion ainsi que des valeurs d'élasticité du même ordre que celles mesurées pour des 3A9m étalées sur anti-CD45 ainsi que la présence de petites structures de type filopodes (Fig. 5.15). On remarquera cependant que lorsque les cellules 3A9m Meg sont étalées sur anti-CD45, l'aire d'adhésion est similaire à celle des 3A9m, mais l'élasticité de ces cellules est plus élevée que dans toutes les autres conditions expérimentales d'étalement. On ne peut qu'émettre l'hypothèse que l'interaction CD45/anti-CD45 est clairement perturbée par la présence de MEGF10 à la membrane basale. On peut raisonnablement proposer que du fait de la présence ces interactions, MEGF10::EYFP est distribué de façon homogène sur toute la surface cellulaire et non plus à la zone de contact. Cela pourrait affecter en retour le contact

Résultats

bille/cellule au niveau de la membrane apicale ou l'organisation du cytosquelette. Ces hypothèses pourront être vérifiées par de l'imagerie confocale afin de visualiser la distribution de MEGF10 lorsque les cellules sont immobilisées sur aCD45. On peut évoquer également un encombrement stérique, ou une compétition entre CD45 et MEGF10, pour lier les anticorps. Certaines données expérimentales laissent entendre que MEGF10 pourrait être en outre un récepteur de la molécule C1q du complément (229), potentiellement présente sous forme de traces dans les préparations d'anticorps monoclonaux (peu probable cependant).

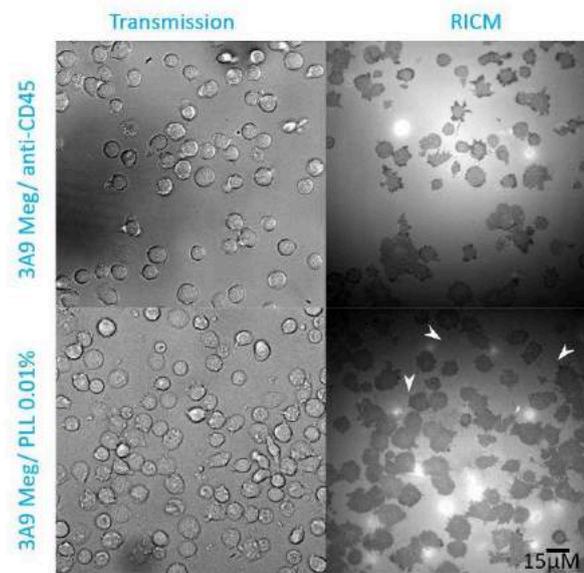


Fig. 5.15 : Morphologie des cellules 3A9m Meg adhérentes sur différents substrats
Imagerie en transmission et en RICM de cellules 3A9m Meg adhérentes sur des surfaces continues d'anti-CD45 (H193.16.3 ; 50µg/ml sur 45min) et sur de la poly-L-Lysine (0.01% w /v H₂O, les flèches blanches indiquent la présence de filopodes, barre d'échelle = 15µm

2.4. Evaluation de l'impact fonctionnel de MEGF10 sur la réponse calcique

Toutes ces mesures d'étalement et de mécanique n'ont en fait de sens que si les cellules 3A9m exprimant MEGF10::EYFP peuvent être activées a minima par anticorps mais surtout par cellules présentatrices, qui demeurent le mode d'activation in vitro le plus proche du « physiologique ».

Notre objectif était ici de comparer la réponse calcique des cellules 3A9m Meg à celle des cellules sauvages 3A9m. Même si par manque de temps, il manque le contrôle d'activation des 3A9m Megf en l'absence d'antigène, nous pouvons raisonnablement conclure qu'au

Résultats

moins sur cellules COS APC chargées de manière constitutive (HEL*) ou exogène (HELs), la réponse calcique en termes d'amplitude de fluorescence est comparable avec la réponse de cellules 3A9m sauvages.

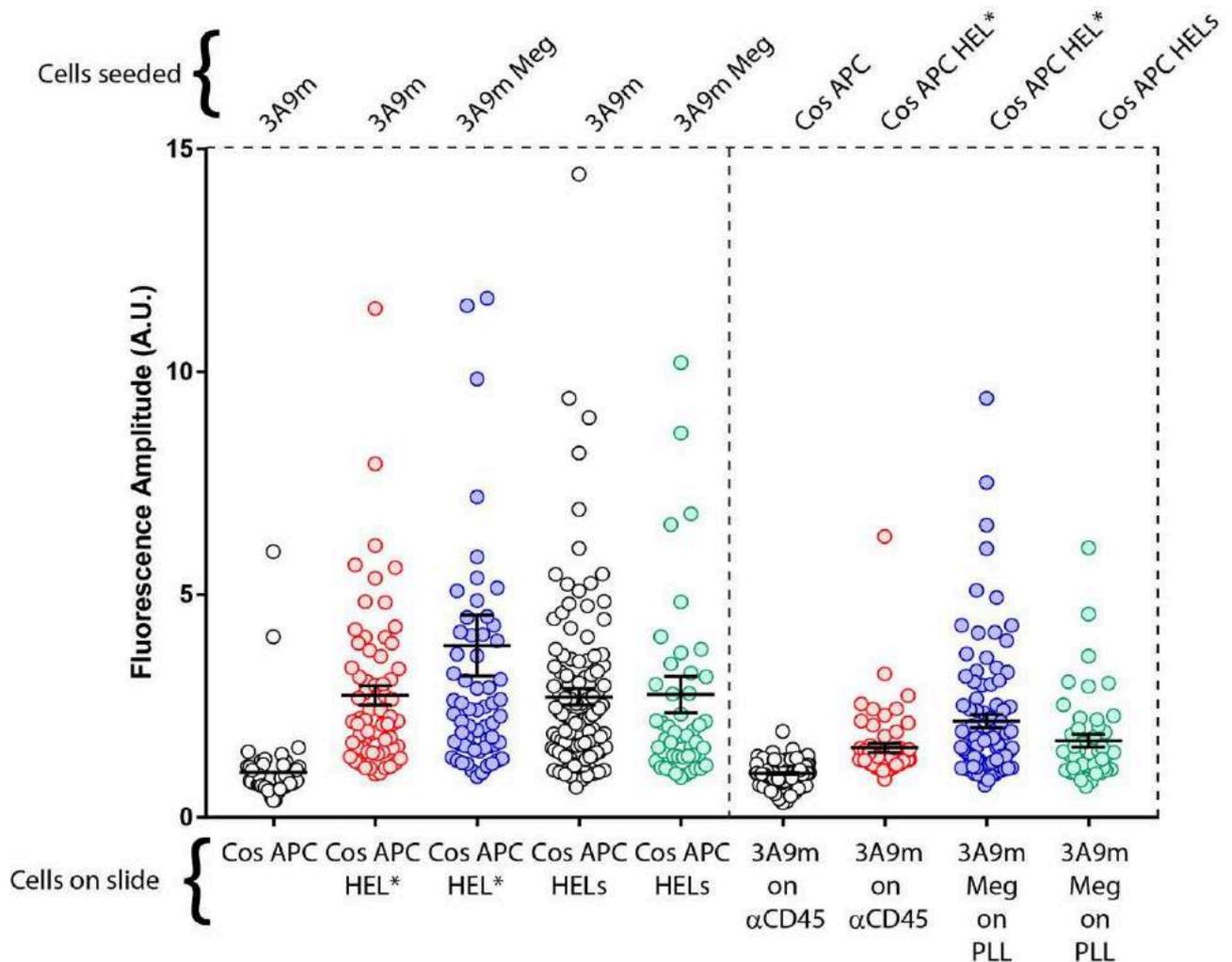


Fig. 5.16 : Réponse calcique des cellules 3A9m MEGF10::EYFP. Les cellules sont chargées avec la sonde calcique PBX et mises en présence de cellules COS APC, chargées ou non avec HEL 48-63 1 μ M (HELs) ou exprimant constitutivement le complexe MHCII-HEL48-63 (HEL*). Les différentes acquisitions en microscopie confocale sont analysées par le logiciel MAAACS. Les amplitudes de fluorescence mesurées sont exprimées sous forme de scatter plot (Panel de gauche). A l'inverse (panel de droite), les cellules T (3A9m ou 3A9m Meg chargées en PBX) ont été mises à adhérer sur le substrat adéquat (α CD45 ou PLL) puis sont mises en présence de cellules présentatrices COS APC +/-HEL, préalablement décrochées en PBS1X EDTA 0.53mM.

En fait nous avons examiné un autre cas de figure, mimant la situation expérimentale de l'AFM en mode force. En effet, les cellules T 3A9m MEGF10 ::EYFP sont mises à adhérer à la surface recouverte de poly-L-Lysine, puis des COS APC en suspension sont ajoutées et

Résultats

tombent par gravité sur les cellules T étalées (substrat continu). A titre de comparaison, les cellules 3A9m sont ensemencées sur des surfaces recouvertes d'anticorps α CD45.

On peut noter d'une part que le pourcentage de cellules activées dans cette configuration est globalement plus faible que dans la situation inversée (APC immobiles et cellules T mobiles). Cette différence peut s'expliquer par le ratio cellules T/APC qui n'est probablement pas encore optimal, un bon nombre de cellules T présentes dans le champ d'observation n'ont pas été contactées, au cours des enregistrements, par des cellules COS APC sédimentant. On note également que la réponse calcique dans les cellules 3A9m Meg est globalement plus faible en termes d'amplitude de fluorescence lorsqu'elles sont adhérentes sur une surface de PLL et stimulées par des APCs en suspension comparé à la configuration inverse où les APCs sont sur la surface et les 3A9m Meg rajoutées en suspension. En revanche, si l'on compare aux cellules sauvages, l'amplitude de fluorescence des cellules 3A9m Meg (sur PLL ; $FA=2.15\pm 0.15$) est significativement plus élevée que les 3A9m adhérentes sur α CD45 ($FA=1.56\pm 0.10$; $Pvalue=0.0089$, Mann&Withney). Ce sont des observations encore à confirmer qui tendraient à indiquer qu'à niveau d'expression équivalent de TCR, la réponse calcique des cellules 3A9m Meg seraient moins impactée par leur adhésion à un substrat que les cellules sauvages sur α CD45. On ne peut pour l'heure exclure, du au faible répétition d'expériences indépendantes ($n=2$, parfois $n=1$), d'aucune incidence sur la pré-activation des cellules 3A9 Meg lorsqu'elles sont adhérentes sur PLL.

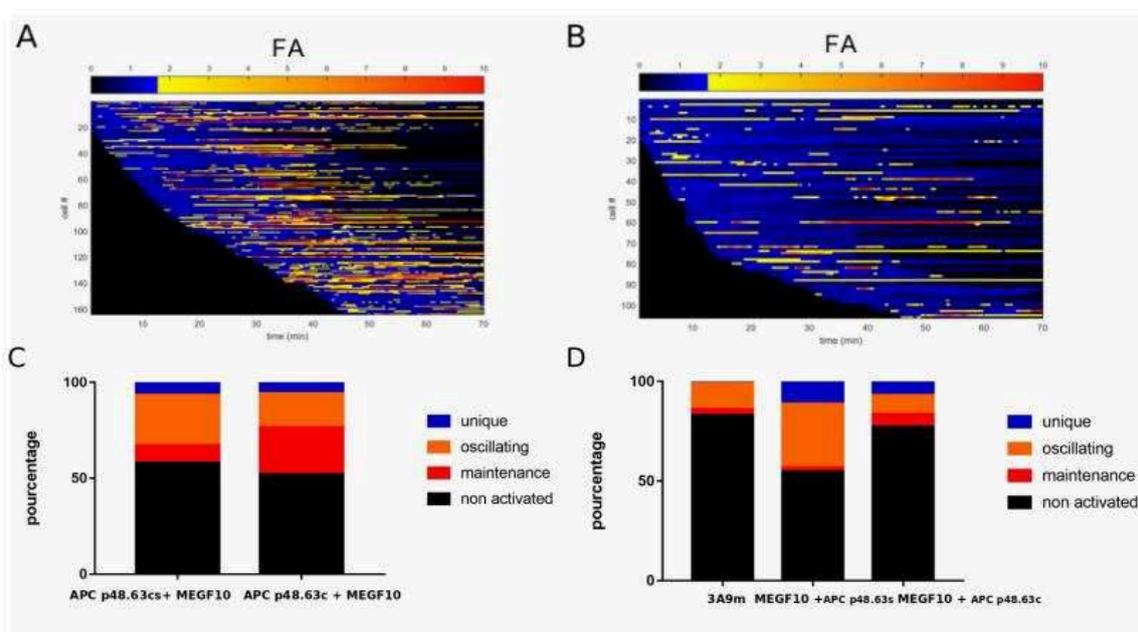


Fig. 5.17 : Mesure de l'activation des cellules 3A9m MEGF10::EYFP. Les cellules sont chargées avec la sonde calcique PBX A : Heatmap et patterns d'activation de cellules 3A9m MEGF10::EYFP ajoutées

Résultats

sur une couche de COS APC HELs. 1 ligne représente 1 cellule. B : Scénario inverse les cellules T sont immobilisées à la surface et les COS APC HELs sont ajoutées en suspension. C et D : morphologie des types de flux cancéreux, maintenu rouge), oscillant (orange) ou unique (bleu) des conditions A et B respectivement.

2.5. Micropatterning des cellules 3A9m MEGF10::EYFP

De manière similaire à l'étude réalisée sur les cellules T 3A9m, nous avons voulu réduire la dispersion des aires d'adhésion des cellules T 3A9 Meg et contrôler leur morphologie. Nous avons d'abord développé la même stratégie expérimentale qu'avec les 3A9m, à savoir transférer la passivation (biotin BSA) et compléter avec la PLL pour révéler in fine la surface imprimée par Streptavidine fluorescente (SA::AF546). Il apparaît que la passivation n'était pas assez forte, les cellules ne faisant pas de distinction entre les zones adhérentes et les zones répulsives. C'est en particulier ce que l'on peut observer sur la **Figure 8**. Les patterns sont difficilement révélés, mal définis, et les cellules n'adhèrent pas de manière contrôlée à la forme voulue. La localisation n'est donc pas assurée ni la forme ainsi que l'aire d'adhésion.

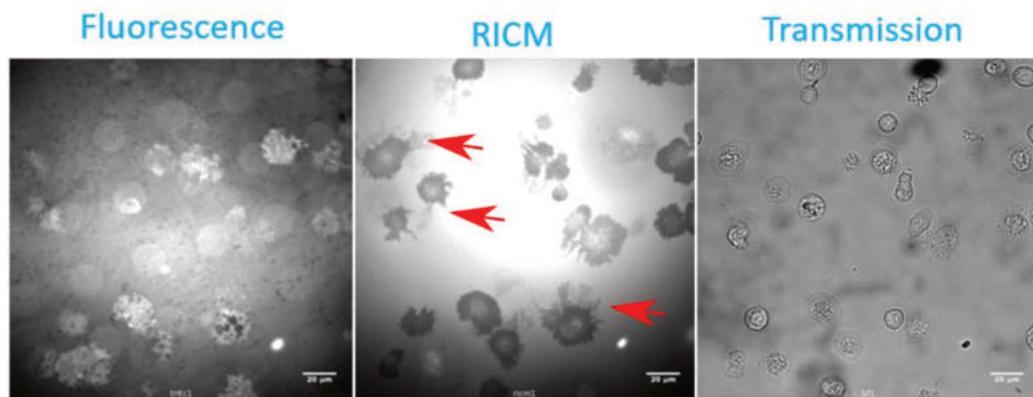


Fig. 5.18 : Exemples de micropatterns où les cellules adhèrent non spécifiquement, barre d'échelle = 20 μm . En fluorescence, on distingue les patterns circulaires mais aussi la fluorescence des cellules Meg qui sont adhérentes hors des cercles. En RICM, on voit que l'aire d'adhésion et la forme de la zone de contact ne sont pas contrôlées. Les images en transmission montrent que les cellules s'étalent fortement sur la polylysine rendant difficile la visualisation de la membrane plasmique.

Nous avons ensuite décidé de transférer directement la PLL, pouvant être utilisée très concentrée à un moindre coût par rapport à un anticorps. Il apparaît que le transfert de PLL sur la surface n'est pas homogène, une partie restant sur le tampon de PDMS. Nous avons passé les surfaces des boîtes de petri fond verre au plasma ce qui a légèrement amélioré la qualité et la reproductibilité du transfert. Nous avons utilisé des tampons de PDMS sur lequel nous avons incubé du Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) à 10 % et ensuite la Poly-L-Lysine fluorescente, que nous avons couplé nous-mêmes (voir matériels et méthodes). Il a été montré

Résultats

que pré-traiter le PDMS avec du SDS augmente la proportion de transfert de la PLL à la surface en plus que celle-ci soit préalablement activée (180).

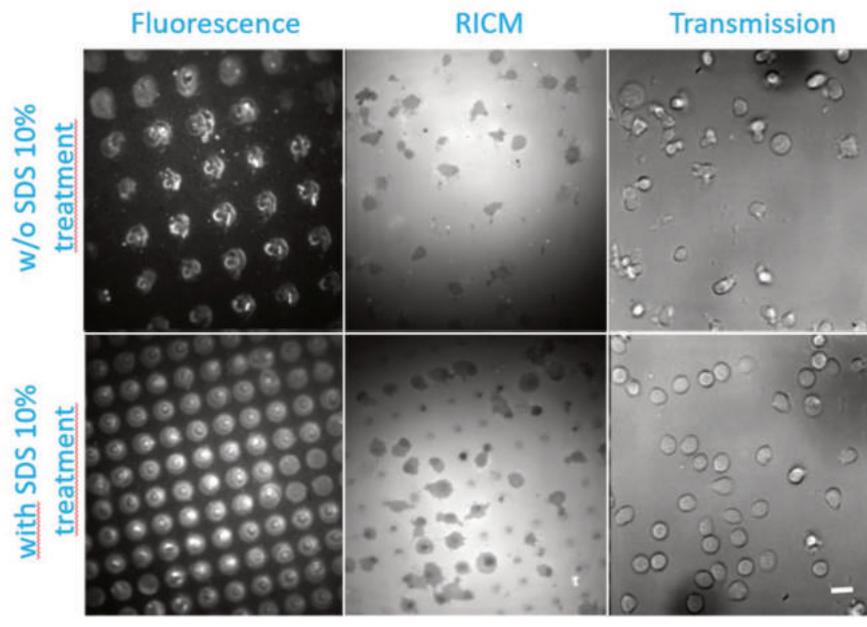


Fig. 5.19 : Deux exemples d'expériences d'impression de PLL fluorescente, passivée par F127 2 %. Les cellules T 3A9 MEGF10::EYFP sont incubées sur ces surfaces et observée en microscopie RICM, Fluorescence et transmission. On notera que le traitement préalable des tampons au SDS 10% permet d'augmenter l'efficacité et l'homogénéité du transfert, barre d'échelle = 20µm.

On note sur la Fig. 5.19 que le prétraitement SDS augmente à la fois l'intensité du transfert de la PLL fluorescente, mais également son homogénéité de transfert. L'observation en RICM montre l'adhésion spécifique des cellules aux zones patternées, avec des surfaces d'adhésion plus contrôlées. Loin d'être parfaites, ces observations préliminaires sont cependant encourageantes. En résumé, nous avons essayé différentes combinaisons de molécules (tableau 2).

Adhésion	Passivation	Résultats
Poly-L-Lysine	biotinBSA- Streptavidine fluorescente	Adhésion non spécifique de cellules entre les stamps
Poly-L-Lysine fluorescente	Pll-peg 5000	Adhésion spécifique Étalement non optimal
Poly-L-Lysine fluorescente	F127 2 %	Adhésion non spécifique de cellules entre les stamps
Poly-L-Lysine fluorescente	F127 5 %	Adhésion spécifique Étalement non optimal

Tableau 2 : Résumé des combinaisons de molécules testées afin d'imposer une aire de contact et une forme contrôlée aux cellules 3A9m Meg.

Les surfaces imprimées avec de la PPL comme molécule adhésive se sont avérées difficiles à obtenir, même en utilisant le couple PLL/PLL-Peg qui paraissait sur le papier être la situation la plus simple, la partie venant s'absorber sur la surface étant la PLL. On ne s'attendait pas à avoir des motifs potentiellement incomplets, que vient polluer la répulsion, et qui conduisent soit à une adhésion non spécifique, les cellules adhérant partout, soit à une adhésion spécifique mais rarement complète, c'est-à-dire que la cellule ne s'étale pas sur toute la surface du motif. Nous n'avons pu tester d'autres variantes comme celles discutées dans la conclusion de ce manuscrit.

2.6. Mise en place du contact de la cellule COS APC et cellule Meg par AFM

Nous avons cherché à tester la mise en contact de cellules 3A9 Meg et des COS APC, sous force avec l'AFM. Les premières sont adhérentes sur la PLL 0.01%, déposée sur des surfaces continues, et nous avons cherché à capturer les secondes sur des leviers recouverts de WGA 250 μ g/ml ou ConA 500 μ g/ml (incubation minimum 1h post plasma, à 37°C). Pour cela, une étape limitante des expériences est la capture efficace et rapide d'une COS APC sur le levier de l'AFM. Il s'est avéré que les cellules COS APC collaient très rapidement sur la polylysine donc il était impossible de venir capturer les cellules dans cette zone.

On peut voir (**Fig. 3.20 A**) que les cellules COS APC adhèrent très rapidement (5 minutes suffisent) sur la polylysine rendant ainsi impossible leur capture avec le levier. On imagine alors que lorsqu'on appuie sur une cellule COS APC, on nucléé plus facilement une adhésion qui est très rapidement forte, ce qui ne permet pas de capturer initialement la cellule COS APC prise entre un levier recouvert de lectine et la PLL. On a très rarement (une à deux fois) réussi à capturer une cellule, mais celle-ci a souffert du détachement, et potentiellement emmené avec elle une partie de la PLL de la surface, devenant ainsi « polluée ».

Ensuite, nous avons gardé sur la surface une zone avec de la polylysine et une zone de verre qui puisse être accessible avec le levier. Or, nous disposons d'une surface de travail limitée à un rayon d'action de 0.5 cm. Nous avons adapté notre fenêtre de travail en faisant le

Résultats

compromis de d'avoir une zone contenant la polylysine de surface moindre et ainsi de pouvoir disposer d'une zone de verre nu pour venir capturer les cellules COS APC sans pour autant être embêter par la polylysine.

Dans cette configuration, il a été également très difficile de capturer des cellules COS APC qui même en n'adhérant que faiblement au verre lors de l'étape de capture ont tendance à s'immobiliser sur le verre et non sur le cantilever lors du retrait du levier, alors que nous n'appliquons aux cellules une force variant de 1 à 2nN pendant 20 secondes à 1 min. Nous nous sommes posé la question de savoir si le mode de récupération des cellules de leur flasque de culture ne pouvait pas altérer la capacité des cellules à adhérer de nouveau sur une surface de verre (Fig. 5.20 B). Parmi les différents traitements, et sous observation en RICM, le décrochage des cellules en EDTA 0.53mM limite la ré-adhésion rapide des cellules COS APC, dans la même mesure qu'un tampon trypsine EDTA. A contrario, le décrochage à l'accutase permet un accrochage et un ré-étalement rapide sur du verre.

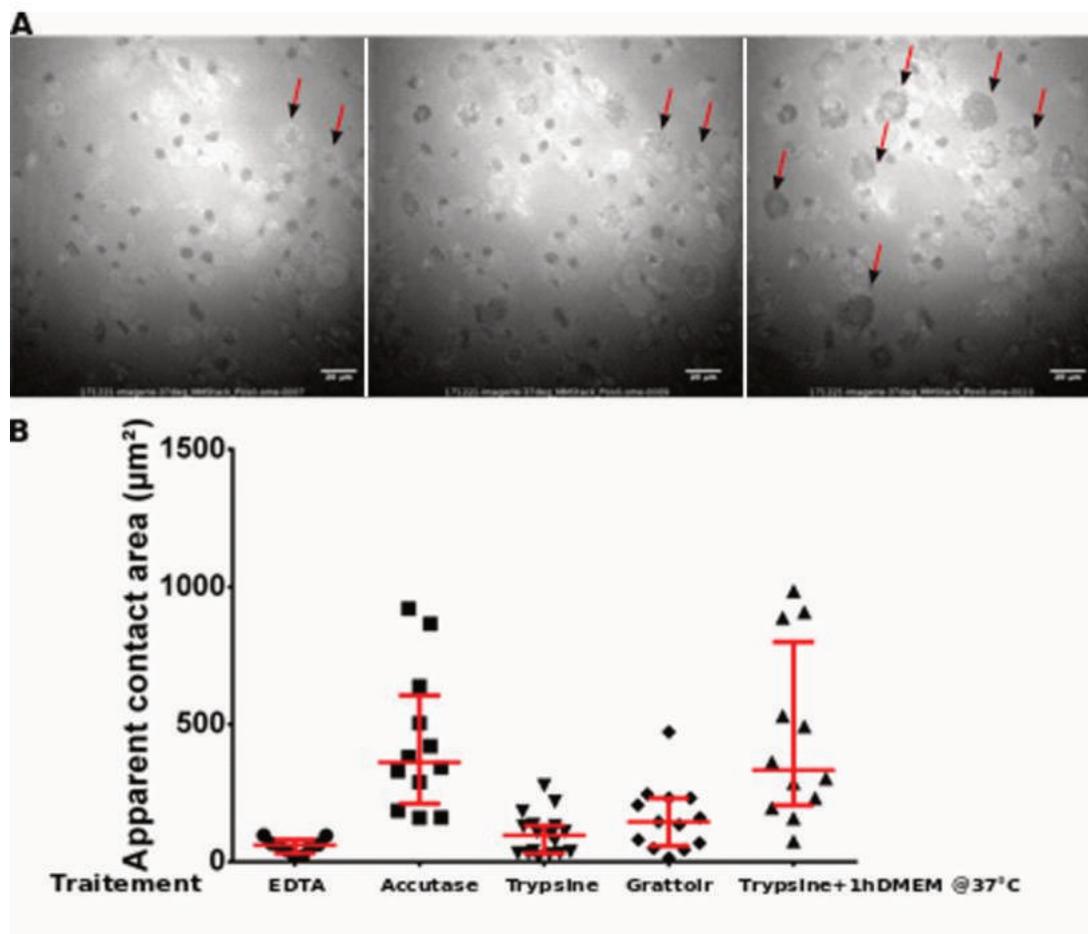


Fig. 5.20 : Images et mesures de l'aire des COS APC en RICM après sédimentation sur du verre A : Images de RICM de cellules Meg sur de la polylysine et de cellules COS APC (désignées par les flèches rouges), la première image est prise dès le contact des COS APC et ensuite une image toute les 5 minutes, barre d'échelle = 20 μm . B : Quantification des aires de contact des COS APC sur du

Résultats

verre après avoir subi différents traitements de décollement, 1 point = 1 cellule, barre = médiane avec 95% CI.

Puisque le verre seul n'étant pas suffisamment répulsif malgré les temps courts de contact de la cellule avec la surface nous avons essayé d'avoir cette zone de récupération coatée avec des molécules de répulsions comme la pll-peg, bsa ou pluronics F127 et même de l'anticorps α CD45 vu que l'on sait que les COS APC ne collent pas dessus (chapitre 5 section 5 page 196). L'utilisation d'un anticorps pour créer une passivation ne semble toutefois pas être une solution au long terme. La PLL-peg et la BSA ne sont pas assez répulsives. Nous commençons à savoir dans quelle direction continuer et ce serait d'utiliser le F127 à une concentration plus élevée que celle présentée dans le chapitre 5 section 5 (page 196).

3. Conclusions et perspectives

Les cellules 3A9 exprimant Meg sont une solution viable pour l'étude de l'activation précoce des cellules T.

Nos résultats tendent à montrer que l'expression de MEGF10 n'affecte pas l'activation de la réponse calcique de la lignée de cellules T 3A9m, constituant une approche alternative (ou peut-être complémentaire) à l'immobilisation des cellules T sur une surface recouverte par un anticorps dirigé contre un marqueur membranaire lymphocytaire. En outre, les images de microscopie confocale mettent en évidence que MEGF10 ségrégent au niveau de la zone de contact avec le substrat limitant ainsi tout changement extrême du paysage moléculaire au niveau de la membrane apicale, qui reste pour nous la zone où le contact cellule T/ COS APC a lieu. Les mesures de microscopie à force atomique et RICM montrent que le module de Young et l'aire d'étalement sont comparables entre 3A9m Meg sur PLL 0.01% et 3A9m étalées sur l' α CD45. Ces premières expériences, bien qu'il soit nécessaire d'en augmenter le nombre pour obtenir des statistiques robustes, permettent de valider l'expression de MEGF10 comme molécule d'adhésion des lymphocytes T et modèle pour étudier l'activation lymphocytaire T par observations des flux calciques en fluorescence.

Il reste cependant à trouver la méthode adéquate afin de pouvoir produire, et surtout reproduire, des patterns de polylysine et ainsi pouvoir contrôler la forme et l'aire d'adhésion de ces cellules.

Bien que nous ayons été ralentis par ces problèmes techniques, que nous avons aussi soulignés dans la partie 3A9m / patterns aCD45, nous avons travaillé simultanément à établir le contact entre une cellule COS APC et cellule T 3A9m en utilisant la microscopie à force atomique. Les résultats de ces expériences seront présentés dans la section suivante.

4. Observation d'une signature mécanique précoce de la reconnaissance de peptide entre cellule T et APC sous force.

1. Contexte de l'étude

Le but initial de nos expériences était de pouvoir analyser l'activation précoce des cellules T, sous force, à l'aide de l'AFM couplée à la microscopie de fluorescence à l'image de nos travaux précédents (154). Nous avons prévu d'apporter deux modifications d'importance à ces derniers : (i) effectuer le suivi de l'activation avec une cellule partenaire et non plus une bille, afin de nous rapprocher d'une situation de stimulation plus physiologique et (ii) contrôler la position et la forme de la cellule T par micropatterning (voir chapitre précédent).

Ce dernier point s'étant révélé plus compliqué à rendre reproductible que prévu, nous avons donc cherché à mettre au point de manière efficace la technique AFM+fluorescence entre cellules, ce qui est une variation de la spectroscopie de force sur cellule unique (Single Cell Force Spectroscopy, (158)). Nous avons travaillé avec le système 3A9m et COS 7 APC décrit auparavant.

Après avoir imaginé faire adhérer la cellule T sur le levier de l'AFM à l'aide des molécules identifiées lors des approches de type MAAACS (voir chapitre précédent) et les mettre en contact avec les COS adhérees sur le substrat à l'image de ce que l'on a pu trouver dans la littérature (230), nous avons choisi d'immobiliser les cellules T sur le substrat et de capturer les COS sur le levier. Cela a guidé nos travaux présentés précédemment et amenait trois avantages :

- La cellule T est ainsi plus facilement imageable, car elle reste, dans notre set-up, immobile lors de la mise en contact et du retrait de la cellule partenaire (le levier est déplacé par le piézoélectrique, et non pas l'échantillon comme sur d'autres AFM) ;

Résultats

- L'adhésion des COS sur le levier peut se faire en utilisant des lectines en adaptant des protocoles établis de longue date (199), ce qui est plus facile et moins coûteux que d'utiliser des anticorps ;
- Les cellules COS sont, lorsqu'on les récupère de leur flasque de culture, rondes, donc la géométrie du contact cellule / cellule sera proche de celui de bille / cellule mis en place dans (154), car les 3A9m sur des surfaces d'aCD45 non patterné ont des formes allongées et variables. Notons que l'on a pu micropatternner de l'aCD45 sur des leviers d'AFM de façon à n'avoir qu'une cellule T par levier, mais cette méthode est très coûteuse en temps expérimental car il faut, après avoir réussi le micropattern, laisser la cellule s'étaler ce qui rentre en compétition avec la compartimentalisation de la sonde (voir chapitre précédent).

2. Résultats

2.1. Des flux calciques, sous force, sont observés

Dans un premier temps, nous avons tenté d'effectuer une expérience « complète », avec des cellules T chargées en indicateur calcique (PBX), adhérentes sur des surfaces recouvertes de manière continue par aCD45. Sur ces surfaces, les cellules COS « 603 », présentant un MHC lié de manière covalente à un peptide de forte affinité pour le TCR mais exprimé en densité membranaire plus faible que dans le cas des COS « 600 » ou COS APC (ie. Sans peptide particulier avant charge en solution), n'adhèrent pas et peuvent être facilement capturées sur un levier d'AFM recouvert par une lectine (WGA ou ConA).

Dans le but d'utiliser des leviers non recouverts d'or, et qui n'existent commercialement qu'avec une pointe à leur extrémité, nous avons cherché à vérifier que cette dernière ne gênait pas le contact entre les cellules. En effet, les lectines présentes sur la pointe du levier peuvent créer un signal parasite d'activation sur les cellules T (231). Nous avons donc réalisé un montage de micropipettes, avec un cantilever recouvert de lectines vu de côté, afin de pouvoir (i) micromanipuler une COS ronde, de taille typique, juste détachée de sa surface de culture, (ii) observer si elle dépasse suffisamment de la pointe du levier, en prenant compte l'angle de présentation de ce dernier dans le montage, (iii) observer l'étalement de la COS et (iv) tenter de détacher la cellule après quelques minutes de renforcement de l'adhésion. Comme le

Résultats

montre la Fig. 5.21, l'adhésion de la COS est rapide et ne nécessite pas une grande force de contact. La cellule reste ronde, même après une dizaine de minutes, voire plus, d'étalement et elle dépasse de plusieurs microns de la pointe du levier, ce qui fait que l'on peut estimer que cette dernière ne va pas intervenir. Cela permet de ne pas avoir à découper la pointe de chaque levier préalablement, soit à l'aide pincettes (232), soit à l'aide d'un FIB/EM (154), ce qui est relativement pénible à mettre en place de manière reproductible. Enfin, nous avons vérifié que l'adhésion de la cellule COS sur le levier était suffisamment forte, pour cela nous avons utilisé une aspiration forte (> 5MHC20) sur la micropipette et déplacer celle-ci de plusieurs micromètres montrant que la cellule ne se détache pas. Elle se déforme fortement, et cette déformation est réversible comme ce qui a été montré dans des expériences de micromanipulation classique (233). Tout ceci nous permet de conclure que notre système permet de maintenir une cellule COS en bonne forme, sphérique tout en la maintenant fortement adhérente, sans gêne de la part de la pointe du levier. Des estimations géométriques simples, prenant en compte les tailles de la pointe, de la cellule et l'angle de présentation, permettent de plus de montrer que sur le levier C des MLCT (Bruker, levier triangulaire le plus long), on peut placer la cellule jusqu'au milieu de la partie plate sans risquer de contact avec la pointe (ce qui a été vérifié expérimentalement par PH Puech). Il faut noter que la forme sphérique maintenue de la COS, couplée à la relative transparence des leviers non recouverts d'or, permet de finement placer la cellule COS au-dessus de la cellule T cible lors des expériences de SCFS.

La Fig. 5.21 présente la présentation de la COS APC* à la cellule T. Il faut noter que la morphologie (sans parler du marquage avec le PBX) permet de différencier de manière facile les deux types cellulaires. Le temps de contact a été fixé à 1 minute, de manière à pouvoir observer les variations de flux calcique, la force de contact à 1 nN pour s'assurer un bon contact cellule / cellule sans pour autant « écraser » les partenaires et l'observation en microscopie de fluorescence utilise les paramètres suivants : diode 470 nm, 25 % de puissance, 250 msec d'intégration, 5 sec entre deux images, de façon à avoir un bon ratio signal/bruit tout en maintenant un niveau de photoblanchiment raisonnable.

Résultats

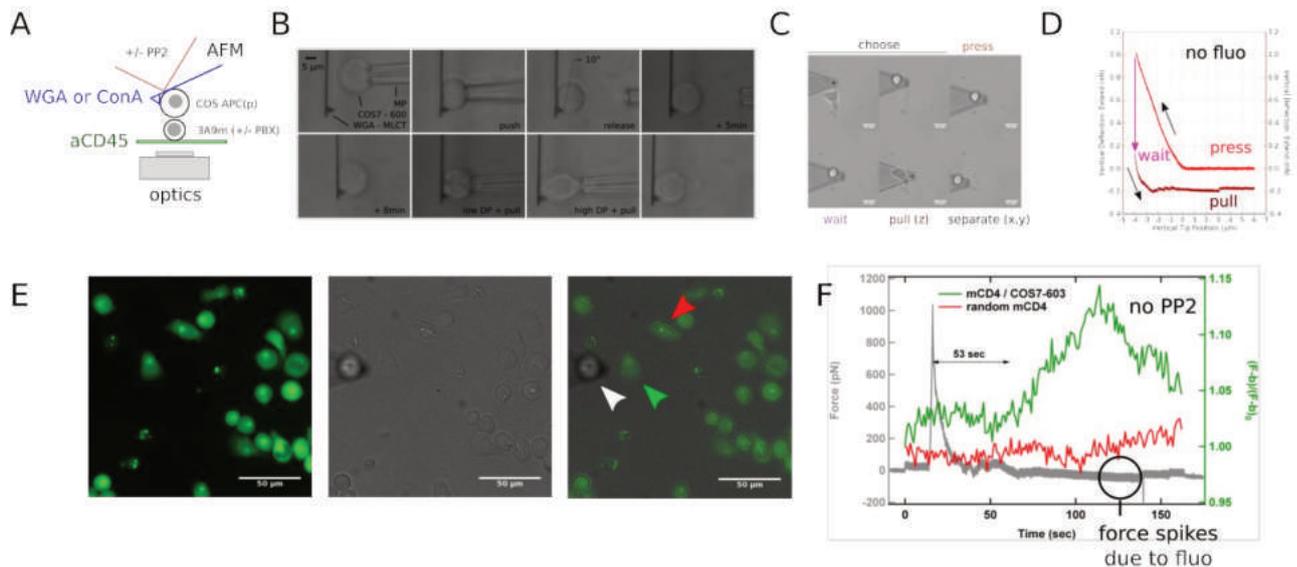


Fig. 5.21 : Interaction d'une cellule T et COS APC lors du couplage de la microscopie AFM et en fluorescence A Schéma de principe des mesures, en présence ou absence de PP2, avec des cellules 3A9m chargées en indicateur calcique ou non. B. Vérification de l'adhésion et de la géométrie des COS APC sur des leviers traités avec de la WGA, en utilisant un système de micromanipulation en vue de côté. C. Séquence de présentation d'une COS APC à une 3A9m adhérente, après que la COS APC a été capturée sur le levier par appui délicat de celui-ci, avec une force de 1nN pour 20 à 40 sec, suivi d'une phase de repos / adhésion de 5 min loin de la surface. La cellule COS APC est centrée puis pressée (1nN) sur la 3A9m pendant un temps donné (typiquement 1 min) puis le levier est éloigné verticalement à vitesse contrôlée (2μm/s). Parfois / souvent, à la fin de la séparation les cellules ne sont pas complètement séparées, à cause d'une distance de traction limitée. On déplace alors le levier dans le plan (x,y), provoquant la rupture des derniers liens (typiquement 100pN). Il est classique de voir la 3A9m « suivre » le mouvement et on devine parfois des tubes de membrane résiduels sur l'image de microscopie optique qui œuvre en continu pour ce type d'expériences. D. Courbe classique sur laquelle les trois premières étapes sont vues, ainsi que le résiduel de force d'attachement dû à la traction limitée en distance (les deux lignes de base sont non superposées), les flèches indiquant le mouvement. Cette courbe a été obtenue sans imagerie de fluorescence simultanée. E. Images de microscopie correspondant à une expérience avec mesure de fluorescence, en l'absence de PP2, avant présentation. Image de fluorescence des cellules (PBX), de transmission et superposition avec la COS APC* (flèche blanche), la 3A9m cible (flèche verte) et une cellule de morphologie similaire, proche, utilisée comme contrôle (flèche rouge). C. Courbes obtenues, en fonction du temps : en gris, force mesurée entre la COS APC* et la 3A9m cible ; en vert, fluorescence normalisée et corrigée pour le fond de la 3A9m soumise au contact avec la COS APC* montrant que des flux modérés apparaissent avec un délai de l'ordre de la minute, en rouge, celles de la cellules 3A9m au voisinage, non soumise au contact, qui ne montre pas d'apparition de flux calcique.

Il faut noter que ces expériences sont relativement complexes en pratique, car il faut (i) capturer la COS et la laisser adhérer, (ii) centrer les deux cellules et corriger l'offset du signal AFM manuellement, (iii) lancer l'acquisition du signal AFM et attendre d'enregistrer une ligne de base suffisante, (iv) lancer l'enregistrement de fluorescence pendant une fraction de la ligne de base, (v) lancer la courbe de force, (vi) à la fin de celle-ci, déplacer manuellement l'AFM pour rompre les adhésions résiduelles pendant que l'acquisition continue, (vii) enregistrer la ligne de base de nouveau, (viii) arrêter l'acquisition vidéo et enregistrer le signal de force et (ix) arrêter l'acquisition AFM après avoir enregistré la ligne de base finale.

Résultats

Sur la Fig. 5.21 F, une courbe typique de force est présentée avec l'enregistrement de fluorescence pour la cellule T correspondante. Une augmentation de la fluorescence (ici présentée sous la forme d'un ratio, et corrigée pour le fond de fluorescence), signe d'une apparition de flux calciques, est vue après ~ 1min de contact, ce qui est raisonnable par rapport à ce que l'on trouve dans la littérature. La fluorescence de cellules T dans le champ de vue, mais non contactées par la COS n'augmente pas, voire diminue légèrement à cause du photoblanchiment de la sonde. Lorsque ces expériences sont réalisées avec une COS nue, le flux calcique n'est jamais vu. De même, on ne voit pas d'activation lorsque le contact n'est pas réalisé, alors que les cellules sont alignées verticalement, ce qui élimine un effet possible du laser IR de l'AFM.

Ces expériences se sont révélées difficiles, surtout car les cellules T ont tendance à se déformer et/ou se déplacer de manière notable quand le flux de calcium se produit, ce qui modifie fortement les conditions de contact et par conséquent l'histoire de la stimulation. Après de multiples essais pour arriver à systématiser les choses, et face aux difficultés rencontrées lors du patterning des cellules T, nous avons donc choisi de nous placer dans des conditions où le flux de calcium ne peut advenir, c'est à dire en présence de PP2 (234), (66), (21). PP2 est une molécule qui a souvent été utilisée dans la recherche sur le cancer comme inhibiteur "sélectif" des kinases de la famille des Src. Il inhibe fortement les kinases Lck (IC₅₀=4 nM), Fyn (5 nM) et Hck (5 nM), et montre une inhibition plus faible de l'EGFR (480 nM) et pratiquement aucune inhibition de ZAP-70 (100 μM) et JAK2 (50 μM) (235), (234), (236), (237).

Dans cette condition, et avec ce système, des modifications du comportement précoce des cellules T ont été observées par l'équipe de HT He, en particulier sur l'organisation et la dynamique des protéines de membrane (article équipe HT He, CIML, en préparation). Il nous a donc paru naturel d'introduire la composante de force, dans des conditions expérimentales proches de celles utilisées au CIML, c'est à dire avec des cellules T adhérentes et non patternées.

2.2. L'interaction 3A9m / COS 7 APC dépend du peptide, en présence de PP2

Nous avons donc répété les expériences précédentes, avec des cellules T non chargées avec l'indicateur calcique, et nous avons réduit le temps de contact à 1 minute afin de nous

Résultats

focaliser sur les instants initiaux de l'interaction T/APC modèle. Des essais ont été effectués avec des temps de contacts plus longs, mais en nombre trop faibles pour pouvoir les prendre vraiment en compte ici.

Dans un premier temps, nous avons mesuré les paramètres caractéristiques de l'interaction, à savoir (Fig. 5.22) :

- La pente lors de la création du contact, qui renseigne a priori sur les propriétés mécaniques de la paire de cellules ;
- La phase de relaxation de la force, à position du piézoélectrique constante, pendant le contact. L'analyse en détail de cette phase sera réalisée dans une partie séparée (voir ci-après) ;
- La force maximale de détachement, en prenant en compte que le détachement peut ne pas être complet car on n'a, pour l'instant, pas une distance de traction suffisante pour séparer les deux partenaires (module CellHesion de 100 μ m (JPK Instruments) commandé début 2018 et non encore reçu). La stabilité de la ligne de base des leviers sans or, couplé à la méthodologie présentée dans le paragraphe précédent, permet de corriger cela de manière simple ;
- Un nombre de sauts de force, ainsi que leur intensité, présent sur la courbe de détachement, qui représente un nombre sous-estimé d'évènements adhésifs nécessaires pour séparer les deux cellules. La distance de traction trop courte masque certains évènements, dont le nombre peut être estimé par la différence de force entre la ligne de base à la fin de la courbe de force et celle après déplacement latéral de l'AFM (qui est la même que celle au début de l'expérience). Cette différence est typiquement de l'ordre de quelques 100aines de pN pour toutes les conditions, mais varie entre les couples de cellules pour une même condition, ce qui revient à un nombre d'évènements de l'ordre de 4 à >10, qui ne sont pas vus (voir ci-dessous).

Nous avons choisi de travailler non plus avec les COS 603 mais avec les COS APC et COS APC* que l'on peut charger en peptide à façon, en solution, avec en face les 3A9m Nous disposons donc de trois conditions : les cellules COS (i) sans peptide échangé mais incubées de même que pour un échange, ce qui nous servira de premier contrôle, (ii) avec le peptide 48.63 qui est un peptide de forte affinité, indépendant de CD4 et (iii) le peptide 46.61 qui lui est CD4 dépendant, de moindre affinité (176). Afin de ne pas permettre aux cellules d'être

Résultats

activées jusqu'aux signaux calciques, nous nous sommes placés en présence de 10 μM de PP2 (condition saturante). Le PP2 est incubé pendant toute l'expérience, qui peut durer jusqu'à 1h30 pour un échantillon de cellules T adhérentes : cette durée courte d'utilisation permet de conserver les cellules dans un état quasi optimal de viabilité.

Nous avons pu observer que la mécanique du contact entre les cellules ne dépend pas du peptide présenté ou de l'absence de peptide (Fig. 5.22). On peut donc raisonnablement faire l'hypothèse que la taille de la zone de contact entre les cellules sera toujours du même ordre de grandeur, ce qui assure que l'on n'a pas un biais fort dans la lecture des forces d'adhésion dû à des nombres de molécules très différents mis en contact. De plus, les mesures réalisées par cytométrie sur les populations cellulaires servent à vérifier que l'expression des molécules d'intérêt (TCR, MHC) ne varie pas au cours du temps d'utilisation des cellules (voir chapitre précédent).

Résultats

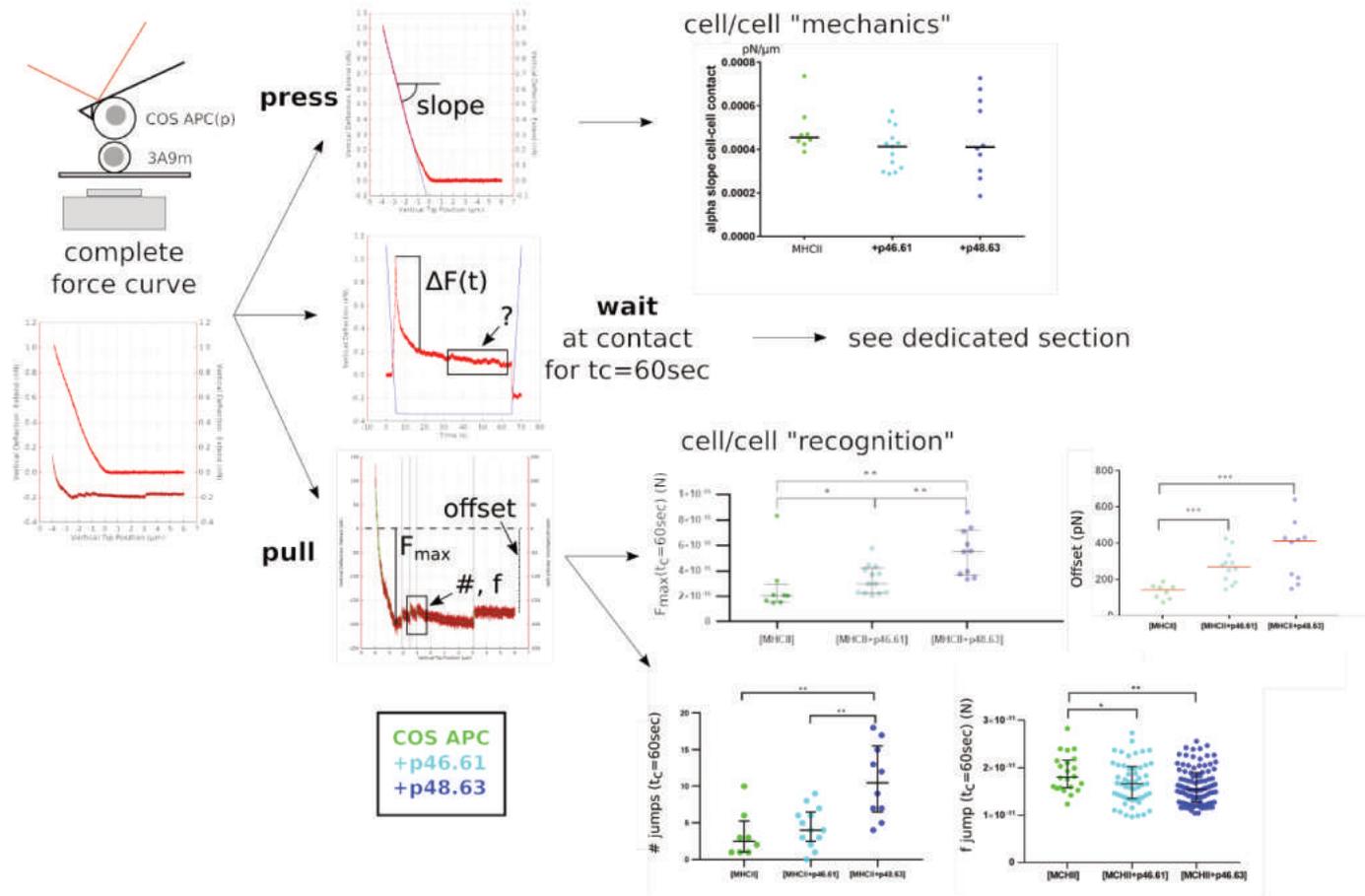


Fig. 5.22 : Mesures des propriétés mécaniques du couple T/COS APC. Schéma des mesures de force entre cellule, avec une courbe de force complète (appui, attente et retrait) que l'on traite en trois parties. Haut : la partie appui (Force vs. Distance) permet d'évaluer la constante d'élasticité (en $\text{pN}/\mu\text{m}$) du couple de cellules en mesurant la pente de la partie de la force décrivant le contact. Milieu : la partie attente (Force vs. Temps) permet d'évaluer la relaxation, passive ou active, du couple de cellule. Une méthode plus simple que dans la Section 2 (mécanique des cellules patternées) revient à mesurer la décroissance de la force. Pour analyser la possibilité d'une réponse active, modulée par le peptide, des analyses plus fines sont nécessaires et sont présentées dans une section à part ci-après. Bas : la partie retrait (Force vs distance) permet d'évaluer les forces d'adhésion globales (F_{max}), dont on peut voir la composante de retour à la ligne de base (offset) liée à la distance limitée de traction que l'on peut extraire grâce au fait que les leviers utilisés, sans or, n'ont pas de dérive notable au cours du temps. On mesure de plus les événements de détachement discrets (sauts ou jumps) lors de la séparation entre les cellules (nombre, #, et intensité, f). Les données présentées ici ont été obtenues pour deux peptides (p48.63 bleu foncé et p46.61 bleu clair) et un cas sans peptide qui nous sert de contrôle (vert). Un point correspond à un couple 3A9m / COS APC, sauf pour les valeurs de f (sauts de force, en pN), où un point correspond à un saut.

Des expériences préliminaires nous ont montré que l'on peut raisonnablement tester jusqu'à trois cellules T avec une même COS, qu'on laisse « reposer » entre deux contacts plusieurs minutes, les paramètres mesurés ne montrant pas de tendance notable entre les mesures successives par rapport à la dispersion des mesures effectuées sur la population globale (non montré ici, mais vérifié de manière systématique). Nous présentons donc les mesures qui suivent sous la forme « 1 point = 1 couple T/COS » de façon à caractériser une population donnée de contacts cellulaires.

Lorsque l'on mesure les forces maximales de détachement avec les précautions présentées, on observe qu'elles dépendent de la présence ou non du peptide, mais aussi de la nature du peptide présenté. Ceci montre que, pour un temps de contact d'1min, l'interaction médiée par les MHC ou pMHC a bien un certain degré de spécificité. En effet, pour le cas MHC « nu », les molécules de CD4 qui ne sont pas bloquées ou absentes dans notre système, peuvent amener un certain niveau d'interactions non peptide spécifique, qui vient s'ajouter aux interactions peptide dépendantes dans les autres conditions. Nous n'avons pour l'instant pas eu la possibilité (temporelle) de tester deux conditions contrôle supplémentaires évidentes, soit un aCD4 et un aCD3 bloquants, seuls ou en combinaison.

Dans la même ligne, le nombre d'évènements unitaires de détachement observés dépend de la présence ou non du peptide, et de la nature du peptide, celui ayant la plus forte affinité présentant le plus d'interactions (Fig. 5.22). En revanche, les forces de ces évènements uniques, mesurées de l'ordre de 20-25pN, ne dépendent ni de la présence, ni du type de peptide (Fig. 5.22). Ces résultats qui peuvent apparaître surprenants (intensité des forces, indépendance) sont cohérents avec ceux déjà mesurés dans le laboratoire lors d'une étude en AFM et molécule unique du couple TCR/(p)MHC à la surface d'hybridomes T murins CD8⁺ (85). De plus, des mesures à des temps de contact plus courts avec ou sans PP2 (quelques 100msec), soit des conditions typiques de mesures en molécule unique, montrent aussi des évènements discrets, bien sûr plus rares de même force (~20pN).

Ces résultats nous permettent donc de conclure, à ce stade, qu'en présence de PP2, et à temps court, le contact mécanique entre T et APC modèle s'effectue de manière indépendante du peptide présenté, mais que ce qui se passe, au moins au niveau de l'établissement de ponts moléculaires entre les deux cellules, est pendant le temps de contact d'une minute, sensible à la présence du peptide et à son type. Sans activation donc, la cellule T voit déjà une différence entre les partenaires qui lui sont présentés.

2.3. La relaxation mécanique du couple cellulaire 3A9m / COS APC sur 1 min dépend du peptide, en présence de PP2

Résultats

Lors du contact de 1min, la position du piézoélectrique est maintenue constante et la force appliquée, initialement 1nN, relaxe. Pendant ce temps relativement court, sur un substrat de aCD45 sur lesquels les cellules T sont relativement immobiles et en présence de PP2 ce qui ne permet pas à la cellule T de s'activer et de potentiellement changer de forme, la T et la COS ne bougent pas de manière macroscopique. Le suivi en temps réel, par microscopie à fond clair, de l'expérience ne montre pas de déplacement notable, et ni la cellule COS ni la 3A9m ne se déforment notablement dans le plan optique.

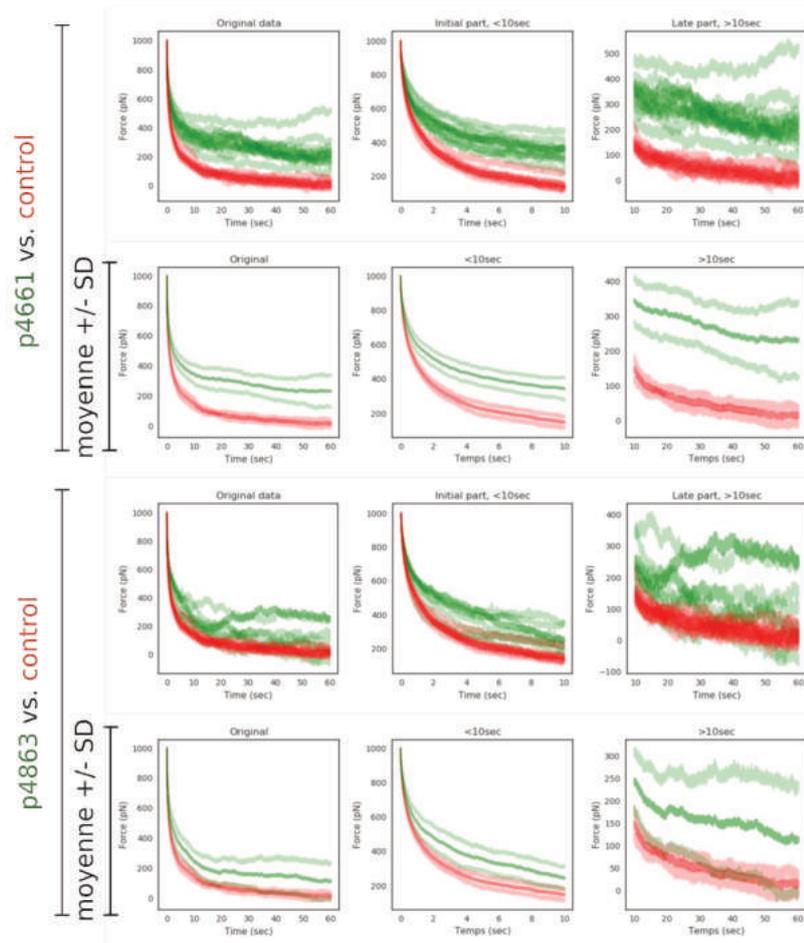


Fig. 5.23 : Phase de relaxation (force remise initialement à 1000pN et temps remis initialement à 0sec pour recaler les courbes). En vert, cas avec peptide. En rouge cas contrôle, sans peptide. Sur chaque ligne, le premier graphe présente la durée complète du contact, le deuxième la phase initiale, entre 0 et 10 sec, et le troisième la seconde phase, après 10 sec. On a aussi présenté les moyennes +/- SD sur les populations, avec les mêmes intervalles de temps. On observe des relaxations relativement « lisses » et régulière dans la première partie des courbes, alors que des ondulations de force sont visibles dans la seconde partie dans les cas avec peptide.

Nous avons observé, de manière surprenante, que cette relaxation dépend à la fois de la présence et aussi du type de peptide que portent les APC modèles. En effet, une analyse assez

Résultats

simple, en mesurant la valeur de la force à un temps donné et son écart à la valeur au moment du contact (Fig. 5.24 A) montre que, dès quelques secondes après le début de celui-ci, les contacts où les cellules COS portent un peptide relaxent moins vite et moins fortement la force appliquée. Comme la cellule COS présente peu de modifications mécaniques induites par les variations de peptide porté, il est imaginable que la cellule T, dans son ensemble, se modifie dès lors qu'un peptide est présent et reconnu, de façon à aider le contact entre les cellules comme par exemple en testant la liaison TCR/pMHC (137). D'une certaine manière, la cellule T s'adapterait donc au contact qu'on lui propose, et ce en présence de PP2, c'est à dire en étant limitée dans ses capacités d'activation.

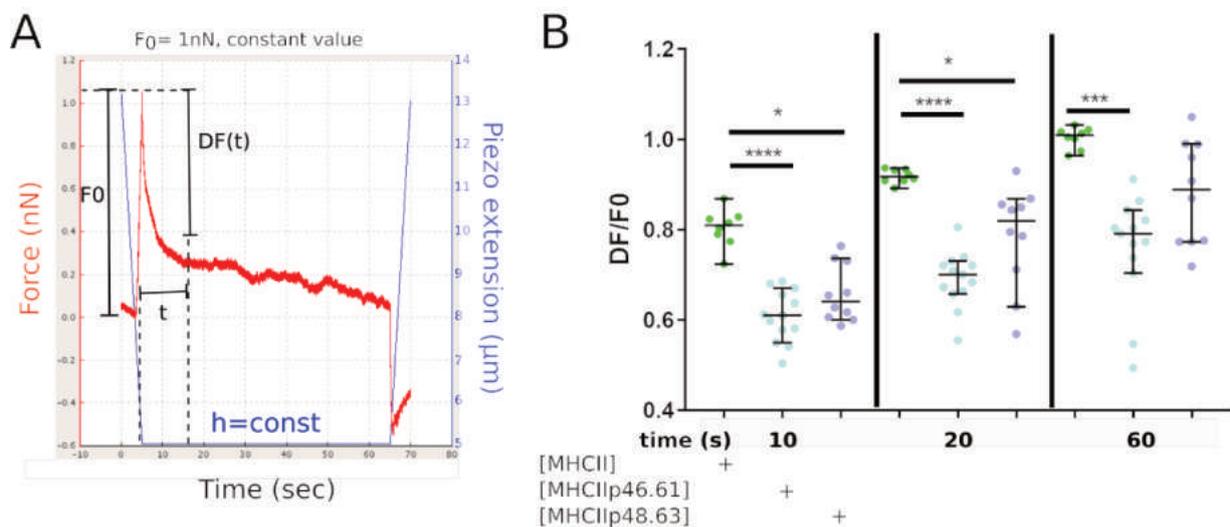


Fig. 5.24 : La relaxation mécanique du couple 3A9m / COS APC est influencée par la présence de peptide. A. Courbe de relaxation typique, à position constante du piézo, qui permet la mesure de DF(t) c'est à dire la décroissance de la force au cours du temps, que l'on normalise par la force au contact (F_0). B. Mesures obtenues : en vert, sans peptide, en variations de bleu, deux peptides, pour différents temps. Un point correspond à un couple de cellule, les tracés en noir à la médiane avec 95 % CI et les différences sont évaluées par un test de Mann-Whitney.

Cette différence est d'autant plus marquée que le temps de contact augmente : les différences de comportement sont bien plus marquées à 1 min qu'à 10 sec (Fig. 5.24 B). De manière intéressante, les deux peptides ne montrent pas de différence significative, mais le peptide CD4 dépendant semble présenter des valeurs plus basses de différence de force, indiquant peut-être une réponse plus forte. Cela reste à confirmer par blocage de CD4 et un accroissement de la statistique en nombre de couples testés.

2.4. Des ondulations de force sont observées a des temps > 10 sec et < 1 min, en présence de PP2 et elles dépendent du peptide présent.

En plus de la différence quantitative relevée lors de la relaxation, il nous est apparu qu'une différence morphologique de cette relaxation existait. En effet, à des temps < 10 sec, la relaxation est « lisse », relativement classique et comparable à celle observée pour des cellules non activables sur lesquelles on appuie avec une bille (238) , même si elle montre une dépendance en intensité en fonction de la présence et de la nature du peptide (Fig. 5.25). Pour des temps > 10 sec (ce temps est déterminé de manière arbitraire, par observation des données brutes), des oscillations apparaissent et semblent être peptides dépendants. Ce temps de 10 sec est cohérent avec un temps de transition entre une reconnaissance moléculaire et un début d'adaptation de la cellule T comme proposé dans (74) (voir discussion ci-dessous). Il faut noter qu'ici on ne voit pas de déplacement macroscopique des cellules sur les vidéos ou en live, et le système AFM ne dérive a priori pas.

Ces oscillations, que l'on devine à l'examen des courbes brutes, ont été complexes à extraire et quantifier de manière computationnelle. Plusieurs méthodes, développées en Python par PH Puech à partir de bibliothèques existantes par défaut ou sur GitHub ont été testées, avec plus ou moins de succès et donnent des résultats intéressants car complémentaires.

- Méthode 1 : utilisation sur la courbe complète de relaxation (0-60sec, 2048Hz) d'un polynôme de haut degré (>5, avec une valeur de 11, déterminée empiriquement, qui apparaît favorable) pour ajuster la tendance des courbes, la soustraire et analyse ensuite de la dispersion des données autour de la tendance centrale. Tentative d'utiliser une transformée de Fourier pour identifier des modes d'oscillation. Identification d'un problème : la tendance soustraite dépend fortement de la forme de la courbe initiale.
- Méthode 2 : utilisation de transformée de Fourier sur la courbe complète pour observer des fréquences d'oscillation, s'il en existe. Le signal sur bruit des courbes obtenues est relativement mauvais.
- Méthode 3 : découpe du signal pour des temps > 10 sec, extraction d'une moyenne glissée ou d'un filtre de Savitsky-Golay (degré 3), puis soustraction de la tendance globale, supposée ici linéaire, de cette dernière (linear detrending), et analyse de la dispersion des données autour de la tendance centrale. Utilisation d'une transformée

de Fourier sur ce segment de courbe pour identifier des modes d'oscillation, avec moyenne.

- Méthode 4 : même méthode que la méthode 3, mais avec sous-traction de tendance avant filtrage (inversion des deux étapes).
- Méthode 5 : filtrage des données par transformée de Fourier suivie de différents filtres (passe-bas, passe-haut), et transformée de Fourier inverse pour nettoyer le signal, sur la courbe complète ou coupée pour > 10sec. Cette méthode est assez compliquée à mettre en place et ses résultats sont peu satisfaisants.
- Méthode 6 : analyse de type Singular Spectrum Analysis (239) qui permet de décomposer un signal oscillant en ses composantes. C'est une méthode utilisée en économétrie de façon à étudier des patterns temporels, pour proposer des prédictions sur un comportement répétitif. Le temps de calcul pour une courbe, suivant une des implémentations en Python proposée sur GitHub (<https://github.com/aj-cloete/pySSA/>), a été colossal (> 24h pour 1 courbe, sur le PC 8 coeurs / 64 Go de RAM qui est le plus puissant du laboratoire) pour des résultats plutôt décevants. Le traitement mathématique est très complexe (extraction de valeurs propres, ...) et sa maîtrise n'est encore pour nous qu'extrêmement imparfaite ; de plus la version implémentée sous python que nous avons utilisée ne prend pas en compte l'architecture multi-coeurs du matériel utilisé, ou au moins une programmation de type multi-threading, ce qui rallonge les temps de calculs et ne permet pas d'être « réactifs » sur ce type d'analyse.
- Méthode 7 : ajustement de l'intégralité de la courbe avec une équation du type
$$F = A_1 \exp(-t/t_1) + A_2 \exp(-t/t_2) + B \sin(\omega t + \phi)$$
Pour tenir compte de deux phases de relaxation avec une modulation sinusoïdale du signal, ce qui fait un fit avec, dans le pire des cas 7 paramètres ajustables (ce qui n'est pas acceptable pour les données telles que l'on a), ce que l'on peut réduire à 4 en estimant $t_1 \sim 1\text{sec}$, $t_2 \sim 10\text{sec}$ et $w \sim 0.1\text{sec}$. Même avec cela, les ajustements sont difficiles...

Les informations obtenues, dont nous allons détailler l'extraction, peuvent être résumées ainsi : les oscillations sont de faible amplitude (~ 20-30 pN), sont sensibles en intensité à la présence et au type de peptide (elles augmentent avec l'affinité de celui-ci), et semblent être lentes (~ 1 pour 5 à 10 secondes). Ces résultats sont à mettre en parallèle des observations de

Résultats

(74) sur l'existence de protrusions responsables de contacts entre une cellule T et un substrat décoré, créant des contacts dont la durée de vie est variable suivant le type de surface (activatrice ou non).

Les méthodes utilisées ont été mises en place de façon à rechercher dans les signaux bruts, soit sur le temps de contact complet correspondant à toute la courbe, soit sur une partie de la courbe correspondant au signal entre 10 et 60 secondes.

Une première chose que l'on a cherché à faire a été d'enlever les mouvements de très faible fréquence (1/min) qui pourraient être attribués soit à un léger déplacement relatif cellule COS/levier, soit à des mouvements à l'interface entre les deux cellules. Sur le signal total, on a soustrait la tendance moyenne telle qu'ajustée par un polynôme, dont on a fait varier le degré. Pour un polynôme de degré 11, l'ajustement est relativement bon (Fig. 5.25 A) et le signal résultant de la soustraction montre que les oscillations observées initialement, de plus faible amplitude et de plus haute fréquence sont conservées (Fig. 5.25 B), et manifestement sont plus présentes pour le cas avec peptide que pour le cas sans. Nous avons ensuite cherché à caractériser ces oscillations, en particulier en observant leur magnitude et si elles présentaient une ou plusieurs fréquences typiques. La distribution des forces explorées nous donne une échelle (20-30 pN) et montre que celles-ci sont plus fortes pour le cas avec peptide (Fig. 5.25 C). L'utilisation de la transformée de Fourier, coupée pour les fréquences les plus faibles, fait apparaître une fréquence de l'ordre de 0.1 Hz, en fait, légèrement inférieure à 0.1Hz, soit une oscillation au moins toutes les 10 sec, ce qui correspond à ce que l'on observe qualitativement sur les données brutes corrigées de la tendance moyenne. De fait, on observe des mouvements lents (~1-2 par min), de grande amplitude (~100pN), sur lesquels se superposent des mouvements plus rapides (> 1-2 par 10 sec) de plus petite amplitude (~30pN), qui sont d'intensité plus forte et de présence plus importante lorsqu'un peptide reconnu est présent à la surface de la COS.

Il faut noter que ces traitements de données sont assez lourds à mettre en place et leurs résultats compliqués à interpréter. En particulier, l'ajustement avec un polynôme de degré aussi élevé, dont le degré optimal a été choisi de manière empirique (en le variant entre 5 et 21...), est discutable. Pour tenter de remédier à cela et potentiellement de faire mieux ressortir

Résultats

ce que l'on semble voir dans les données brutes, nous avons testé d'autres stratégies (Méthodes # >1).

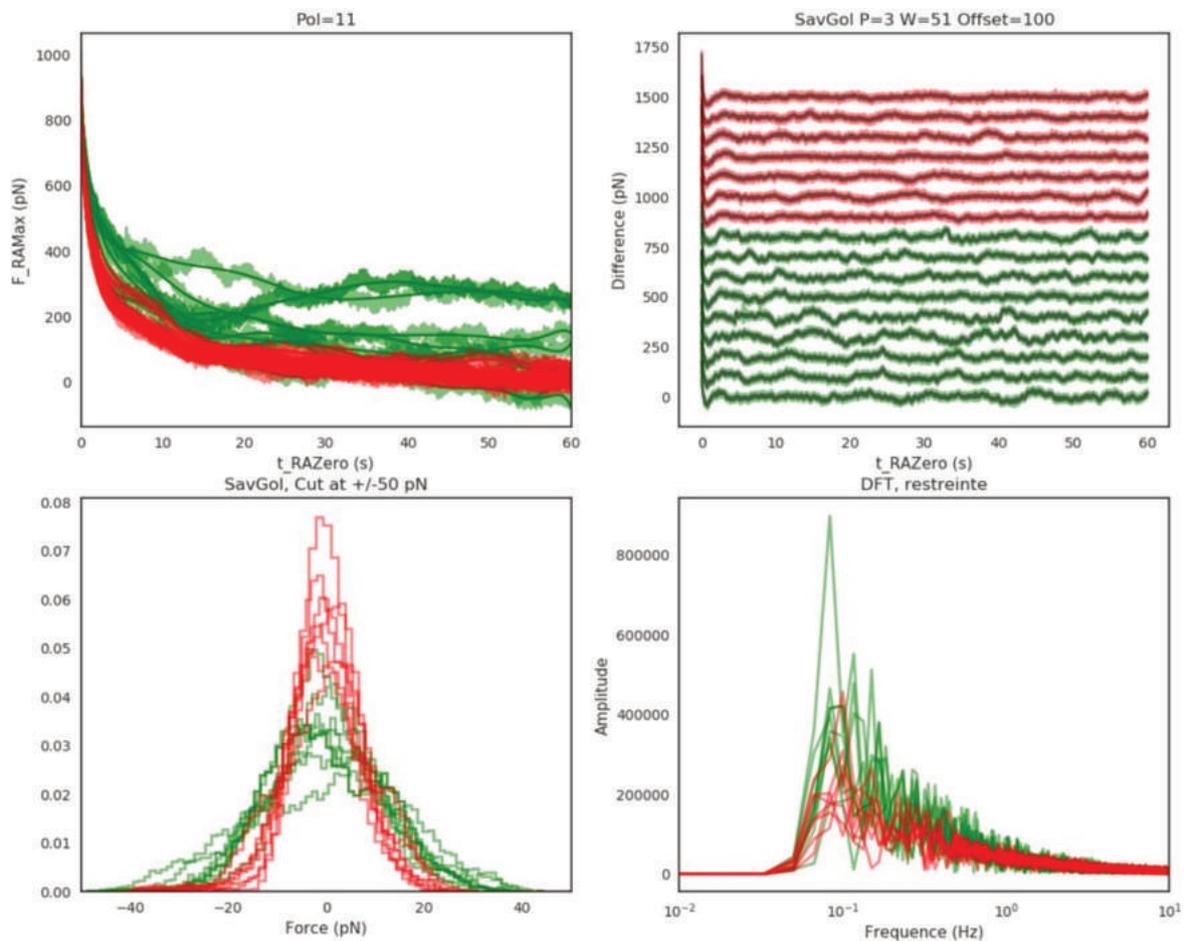


Fig. 5.25 : Résultats de la méthode 1. A : polynôme ajusté de degré 11, ce qui permet d'observer les régimes < et > à 10 sec de temps de contact. En rouge, le cas contrôle, sans peptide. En vert, un des cas avec peptide. B : le signal original soustrait du polynôme ajusté, ce qui permet de percevoir des ondulations de plus faible amplitude qu'en A, bien plus présentes pour le cas avec peptide que pour le cas sans. Les signaux ont été décalés de manière régulière pour une meilleure visualisation. C : distribution des valeurs de B, ce qui permet de voir qu'on explore des forces plus grandes pour le peptide que sans. D : transformée de Fourier de B qui montre que dans le cas avec peptide une fréquence propre de l'ordre de 0.1 Hz apparaît, de manière plus importante que dans le cas sans peptide.

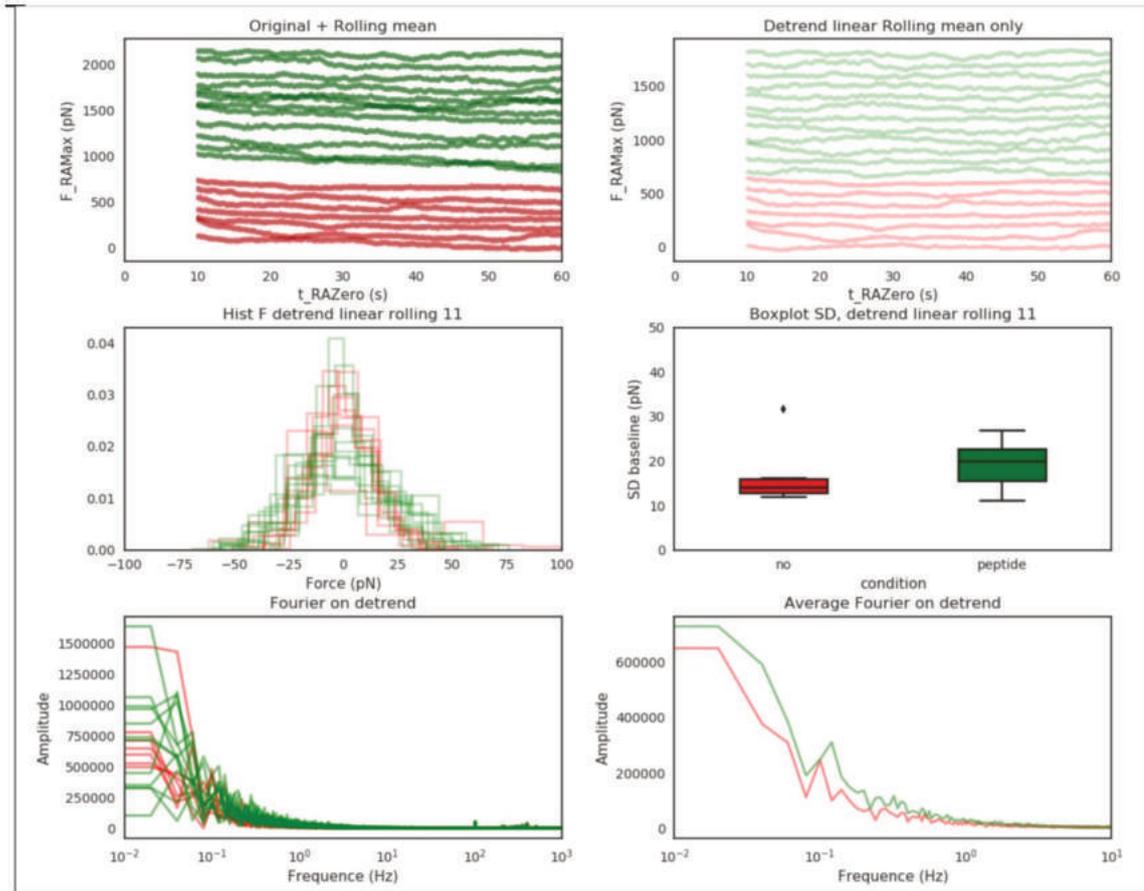
Nous allons détailler les méthodes 3 et 4 qui ont donné, avec moins d'approches discutables car plus simples, le même type de résultats que la méthode 1. En premier lieu, on ne considère que les points entre 10 et 60 secondes pour s'affranchir des larges variations de forces dues à la décroissance du signal dans la première partie. Puis, on calcule une moyenne glissée du signal restant avec une fenêtre de 11 points (ce qui, au vu de notre fréquence d'acquisition est plus que raisonnable) de façon à lisser un peu le bruit (i.e. Les hautes fréquences) (Fig. 5.26 A). La tendance du signal moyenné obtenu est alors éliminée de manière linéaire pour

Résultats

soustraire les variations larges (i.e. Les basses fréquences de la méthode 1), sans faire d'hypothèse autre qu'il existe une tendance pour le signal à décroître (ou pour quelques cas isolés qui n'ont pas été exclus car obtenus de manière expérimentale) dans cette fenêtre temporelle (Fig. 5.26 B). Sur le signal ainsi dé-trended, on extrait sa distribution, sous forme d'histogramme que l'on recentre à zéro pour des commodités de comparaison (Fig. 5.26 C) et sous forme de boîte à moustaches (Fig. 5.26 D). On observe de nouveau que les forces médianes explorées autour de la tendance centrale sont de l'ordre de 10 pN pour le cas sans peptide, alors qu'elles avoisinent les 30pN pour le cas avec peptide, confirmant ainsi les observations faites avec la première méthode présentée ci-dessus. On applique alors une transformée de Fourier sur le signal dé-trended. Il apparaît qu'il y a plus de signal à faible fréquence et autour de 0.1 Hz pour le cas avec peptide que pour le cas sans peptide (Fig. 5.26 E), même si certaines courbes semblent ne pas être dans la bonne catégorie. Afin de faire mieux ressortir la tendance en fonction de la condition, une transformée de Fourier moyenne a été calculée (Fig. 5.26 F) et on observe bien une plus forte composante des fréquences basses pour le cas avec peptide, ainsi qu'un pic au voisinage légèrement inférieur à 0.1Hz, ce qui est cohérent avec la première méthode.

Des méthodes similaires ont été appliquées sur la ligne de base des signaux expérimentaux (avant le contact entre les cellules) et aucune oscillation n'y est visible, la déviation standard typique de cette partie étant deux à trois fois plus petite que celle dans la zone de relaxation (Fig. 5.29). De plus, on vérifie qu'il n'y a, initialement, aucune différence de forme de signal ni d'intensité en fonction de la présence ou non de peptide et même à l'intérieur de chaque condition, ce qui permet d'exclure tout effet dû au cantilever utilisé ou aux réglages de l'AFM (En particulier, aux valeurs de constante de calibration). Les signaux observés ont donc bien une origine cellulaire, et une différence issue de la présence ou non, et du type, de peptide.

p4661 vs. control



p4863 vs. control

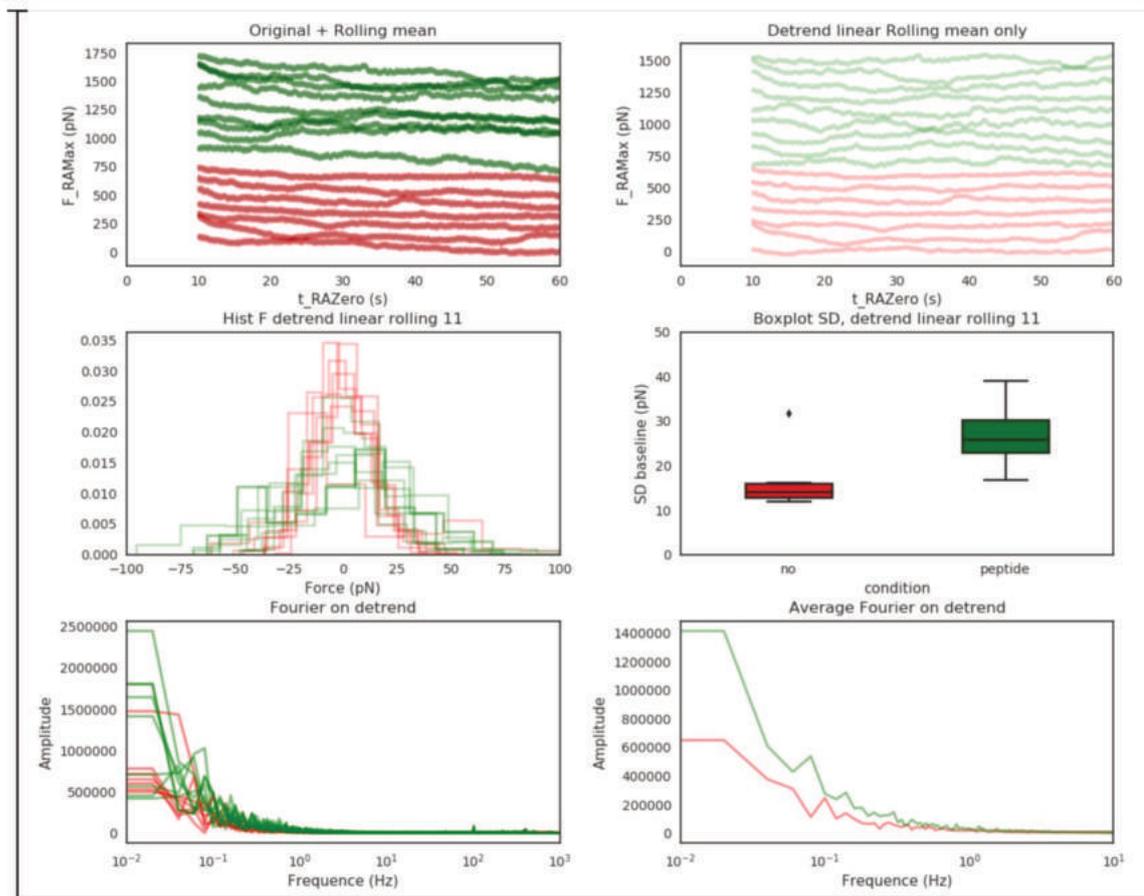


Fig. 5.26 : Résultats pour la méthode 3 avec le même code couleur que précédemment. On a appliqué une moyenne glissée sur la partie > 10 sec. On a ensuite dé-trendé de manière linéaire. Les signaux ont été décalés de manière régulière pour une meilleure visualisation, et on trace l'histogramme des valeurs obtenues, centré à zéro. On obtient ensuite les boxplot de la déviation standard du signal. Enfin, on calcule la transformée de Fourier de chaque courbe et la moyenne des transformées de Fourier par condition.

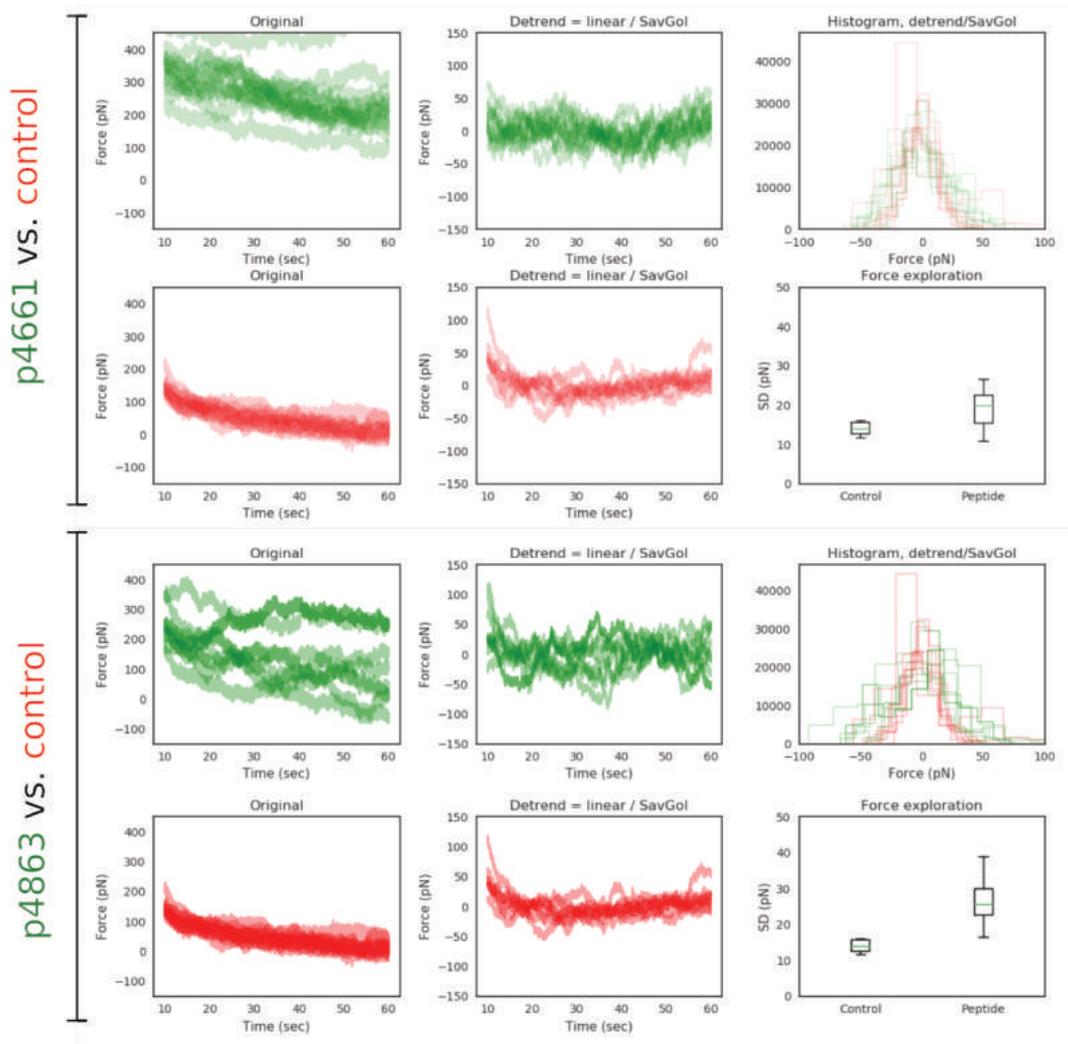


Fig. 5.27 : Résultats pour la méthode 4 avec le même code couleur que précédemment. Etude de l'amplitude du signal > 10sec, en redressant avant filtrage. Tracé des histogrammes du signal et des boîtes à moustache de la SD.

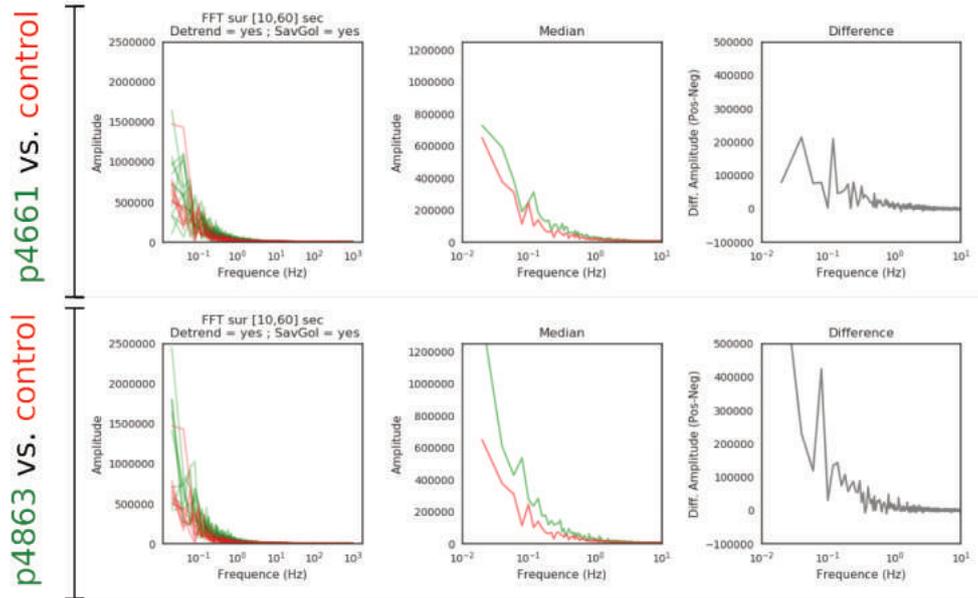


Fig. 5.28 : Résultats pour la méthode 4 avec le même code couleur que précédemment. Etude des transformées de Fourier (et de leur moyenne par population, ainsi que de la différence entre elles) sur signal > 10sec. On observe que pour les cas avec peptide, on a plus de signal avec des fréquences autour de 1/10 – 2/10 Hz.

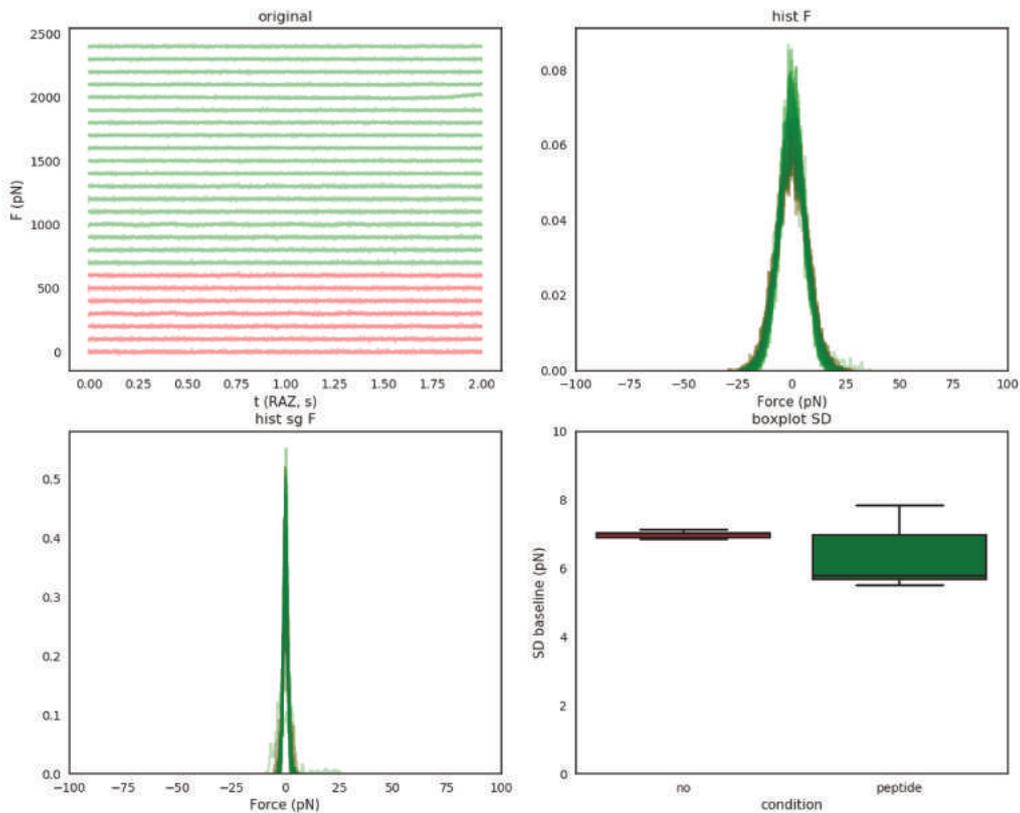


Fig. 5.29 : Même types d'analyse que pour la Fig. 5.26, mais réalisée sur la ligne de base des différentes expériences (ici p4661 – vert vs contrôle - rouge). Aucune oscillation ni différence importante n'est apparente sur le signal expérimental brut dans les deux cas. Histogrammes du signal brut et filtré à l'aide de la méthode de Savitsky-Golay (ordre 3). Boîtes à moustache de la déviation

standard du signal brut. Les valeurs de SD sont plus basses que pour la partie relaxation, et indépendantes de la présence du peptide. Les résultats sont similaires pour p4863.

3. Conclusion et perspectives

3.1. Des oscillations relativement lentes, peptides dépendants

Nous avons donc observé des oscillations lentes, de faible amplitude qui sont dépendantes du peptide et ce alors que l'activation est sous le contrôle de PP2. Ces oscillations, leur magnitude et leur fréquence, leur survenue après 10 sec de relaxation initiale qui déjà intègre le fait qu'il y a un peptide (voir section précédente), tout cela rappelle les résultats obtenus par Brodovitch et coll. (53), (74), (135) où ont été observés des « doigts » provenant de la cellule T lorsqu'elle arrive au voisinage d'une surface. Ces « doigts » testent mécaniquement la surface et la durée de vie des interactions renseigne la cellule sur le type de surface, ce qui la conduit à prendre une décision. Il faut quelques secondes à la cellule pour observer initialement la surface, sans force appliquée, puis elle prend sa décision au bout d'une minute, quand son activation n'est pas bloquée. On pourrait proposer qu'ici, sous force et avec une activation bloquée, la cellule T teste quand même et de manière efficace car les signaux dépendent de la présence et du peptide utilisé. Ces ondulations représentent donc potentiellement un signal précoce, mécanique, sans aucun marqueur, en l'absence d'activation et même préliminaire à toute activation de la capacité à reconnaître un peptide pour une cellule T.

3.2. Discussion et perspectives

Bien que très excitants ces résultats doivent être confirmés par des statistiques plus importantes et des contrôles supplémentaires, en particulier en bloquant CD3, CD4, en rajoutant des molécules d'adhésion (par transfection d'ICAM1 sur les COS, tout en gardant le même niveau de MHC) ou en venant perturber le cytosquelette et l'activité des deux cellules. En particulier, moduler le cytosquelette de la T permettrait de voir si les forces viennent d'elle seule, et moduler celui de la COS permettrait de mimer différentes mécaniques d'APC observées lors de l'inflammation (133).

Résultats

De plus, les forces enregistrées ici correspondent à un déplacement vertical du levier. Il serait intéressant de pouvoir appliquer les mêmes traitements de données au signal de déflexion latérale du levier (qui n'ont pas été enregistrées pour les expériences analysées ici). Cette « torsion » pourrait contenir une information supplémentaire à la force. Mais cette torsion, facile à mesurer sous la forme d'un voltage sur la photodiode de l'AFM est complexe à calibrer, en distance mais aussi en force. Il serait donc peut-être compliqué, voire risqué, de comparer deux mesures si elles ne sont pas faites avec le même couple levier/COS (car le centrage de cette dernière pourrait aussi être un paramètre crucial pour la torsion, pour d'évidentes raisons géométriques. Il faudrait donc pouvoir effectuer un ou plusieurs tests dans des conditions avec peptide, puis avec la même COS effectuer des mesures contrôle. Ce serait imaginable avec un contrôle où un bloquant serait ajouté.

On peut aussi, très simplement, varier la force d'appui et le temps d'attente afin de voir si le premier a une influence sur l'amplitude des oscillations et si l'augmentation du deuxième pourrait faciliter la détection et la qualification de ces dernières. Un point pourrait être aussi de jouer sur la fréquence d'acquisition du signal de façon à avoir plus de points par unité de temps, en particulier pour aide dans le calcul des transformées de Fourier, mais changer celle-ci a une influence sur le niveau de bruit apparent de la mesure, ce qui demandera sans nul doute de se pencher plus précisément sur une méthode de filtrage de fréquences pour distinguer le bruit physique des oscillations dues au système biologique.

La suite logique de ces expériences serait de revenir à celles sans PP2, et d'observer si on visualise bien des oscillations mécaniques avant les signaux calciques (qui peuvent eux aussi osciller...) et voir si des corrélations existent. Il faut noter à ce stade que l'introduction de la sonde calcique joue sur la mécanique de la cellule T (voir chapitre précédent) mais aussi que l'excitation de la sonde calcique entraîne des mouvements verticaux du levier qui sont du même ordre de grandeur que les oscillations vues ici voire légèrement plus grands, mais de forme régulière et de fréquence connue. Ceci pourrait compliquer encore la détermination propre des caractéristiques des oscillations. Une piste peut-être plus simple est de complexifier la cellule COS par transfection et de voir l'influence de molécules d'adhésion ou de costimulation sur ces oscillations.

Résultats

Enfin, on pourrait remplacer les cellules 3A9m par des cellules primaires de souris (disponibles au CIML), qui sont plus « actives » en moyenne, plus excitables, et voir si ces oscillations sont bien présentes dans un système plus physiologique en gardant néanmoins la cellule APC modèle dans un premier temps (une DC serait potentiellement préférable, mais de par sa géométrie et ses mouvements, il est à notre sens illusoire de voir quelque chose de fin, provenant exclusivement de la cellule T dans ce cas-là).

5. Etude sur l'autre partenaire cellulaire les COS APC

Au début de mon projet de thèse, une piste possible était de créer un contact cellule T/APC en ayant la cellule présentatrice d'antigène sur la surface à l'image de la littérature (240), (241) car cela était plus facile pour l'utilisation de l'AFM. En effet, la COS APC qui s'étale facilement sur des substrats simples est d'une taille plus grosse que la cellule T : ceci permet de pouvoir positionner plus finement la cellule T lors du contact.

Mais, rapidement, nous avons pris conscience de plusieurs limitations d'un tel système car certains points sont apparus comme limitants, à cause du système biologique, mais aussi à cause du système AFM utilisé (Nanowizar 1, JPK Instruments). Les principales sont détaillées dans ce qui suit :

- Les « colles » utilisées traditionnellement sur les leviers sont des lectines (ou plus rarement des anticorps), ce qui peut générer un état d'activation basal ou d'anergie des cellules T. De plus, pour coller une T sur le levier, il faut lui presser dessus, ce qui peut engendrer des effets indésirables (197). On notera cependant que cela n'est pas pris en compte dans nombre d'articles un peu anciens (242).
- On veut suivre la variation d'amplitude de fluorescence du lymphocyte T chargé avec une sonde calcique. Il faut donc avoir une imagerie de qualité du lymphocyte, car ces variations peuvent être parfois faibles. Or pour notre AFM, c'est le levier qui se déplace sur plusieurs microns, il faudrait donc pouvoir suivre le levier en restant à un focus fixe sur la cellule. Jusqu'à la livraison fin août 2018 d'un module CellHesion (JPK) avec un PIFOC (un piézo bougeant l'objectif du microscope couplé au déplacement de la pointe AFM, de manière logicielle), cela n'était pas possible. Cela nous a donc imposé d'immobiliser la cellule T sur la surface et développer des substrats d'adhésion contrôlée (chapitre 5 section 2 page 123).

1. Caractérisation des COS APC

Malgré cela, nous avons, en parallèle de l'étude sur les cellules T présentée dans les chapitres précédents et avec l'aide de L. Limozin du laboratoire LAI, développé l'étude de notre APC modèle afin de la caractériser mécaniquement, et pouvoir utiliser cette cellule comme surface présentatrice avec des techniques d'imagerie de surface.

Résultats

Ces travaux ont été réalisés en très grande majorité lors de stage d'étudiants en master 2 Ambroise Wu (M2DI, AMU) et Marie-Julie Dejardin M2 Pro Imagerie, Nice) que j'ai aidé à encadrer. J'y ai fortement contribué :

- En participant au développement de protocoles robustes d'immobilisation des COS APC sur des surfaces micro-patternées avec des protéines de l'ECM
- En caractérisant mécaniquement ces cellules par AFM, patternées ou non
- En réalisant de l'imagerie confocale sur ces cellules marquées extérieurement (cytosquelette) ou de manière constitutive (membrane) pour compléter les informations obtenues par d'autres types de microscopie, en particulier des microscopies de surface.

Ces travaux m'ont permis de participer à la publication d'un article dans Nano Letters en 2018 dont nous expliquerons ci-après l'objectif et les méthodes développés ensuite.

1.1. Micropatterning des cellules COS APC

Dans la même optique que pour les cellules T (chapitre 5 section 2 page 123), c'est à dire contrôler position, forme et mécanique des cellules COS APC, nous avons adapté les conditions de microcontact printing à ces cellules. Ces cellules étant plus grosses, il a fallu avoir des patterns variant de 30 à 50 μ m. Pour ces « gros » motifs, nous disposions grâce à une collaboration avec A. Rigato (ex Scheuring Lab, Marseille) de formes variées, mais nous avons porté notre attention sur des motifs circulaires (aussi grâce à O. Théodoly), à l'image de ceux utilisés pour les 3A9m.

Les COS APC sont des cellules adhérentes et de type fibroblastique, qui peuvent adhérer sur le plastique ou le verre nu dans des conditions de culture. Toutefois, afin de réaliser des zones confinées il est apparu nécessaire de mettre une molécule d'adhésion. Très rapidement, la fibronectine a été identifiée comme la molécule adéquate car elle permet une adhésion forte et est maintenue au moins 24h. De plus, c'est une molécule classique dans les protocoles d'impression de motifs., qui permet une impression relativement plus facile que dans les études présentées dans les chapitres précédents.

Résultats

Il s'est avéré par contre plus délicat de déterminer quelle condition, en particulier quelle molécule de passivation utiliser, c'est-à-dire celle qui va permettre une répulsion suffisante entre les formes imprimées. Plusieurs molécules ont été testées, et ce à différentes concentrations. D'après nos études sur les 3A9m et en regard de la littérature (243), nous avons réduit nos études détaillées à trois conditions : [PLL-peg] = 100µg/ml, [BSA]=1 % et [F127] = 2 % (Fig. 5.30).

En combinant de l'imagerie en transmission, en fluorescence et en AFM, ainsi qu'en utilisant des conditions plus ou moins « violentes » de rinçage pour tester l'accrochage cellulaire sur et entre les motifs, utilisé des cellules marquées de manière extérieure ou constitutive, nous avons pu identifier que la molécule la plus pratique et reproductible sur nos supports est le pluronics F127 2 % : elle permet de restreindre les APC à la zone imprimée sans que l'étalement ne déborde. Nous avons ainsi pu déterminer les conditions et temps optimaux pour l'étalement des cellules (de l'ordre de quelques heures, à 37°C et en présence de CO₂ – ce qui est bien plus court que les conditions utilisées généralement, par ex. pour PLL-PEG, typiquement sur la nuit) afin d'avoir des protocoles robustes et efficaces en temps de préparation d'échantillon (244), (245) (246).

Nous avons ainsi pu réaliser des mesures de force avec l'AFM sur différents types cellulaires COS APCS en imposant ou non le patron d'adhésion (Fig. 5.31 A). Certaines lignées expriment la molécule Thy1-GFP qui permet de faire de l'imagerie en live sur la membrane, et expriment ou non le peptide 48.63 de façon constitutive (APC COS HEL* ou noté p48.63c).

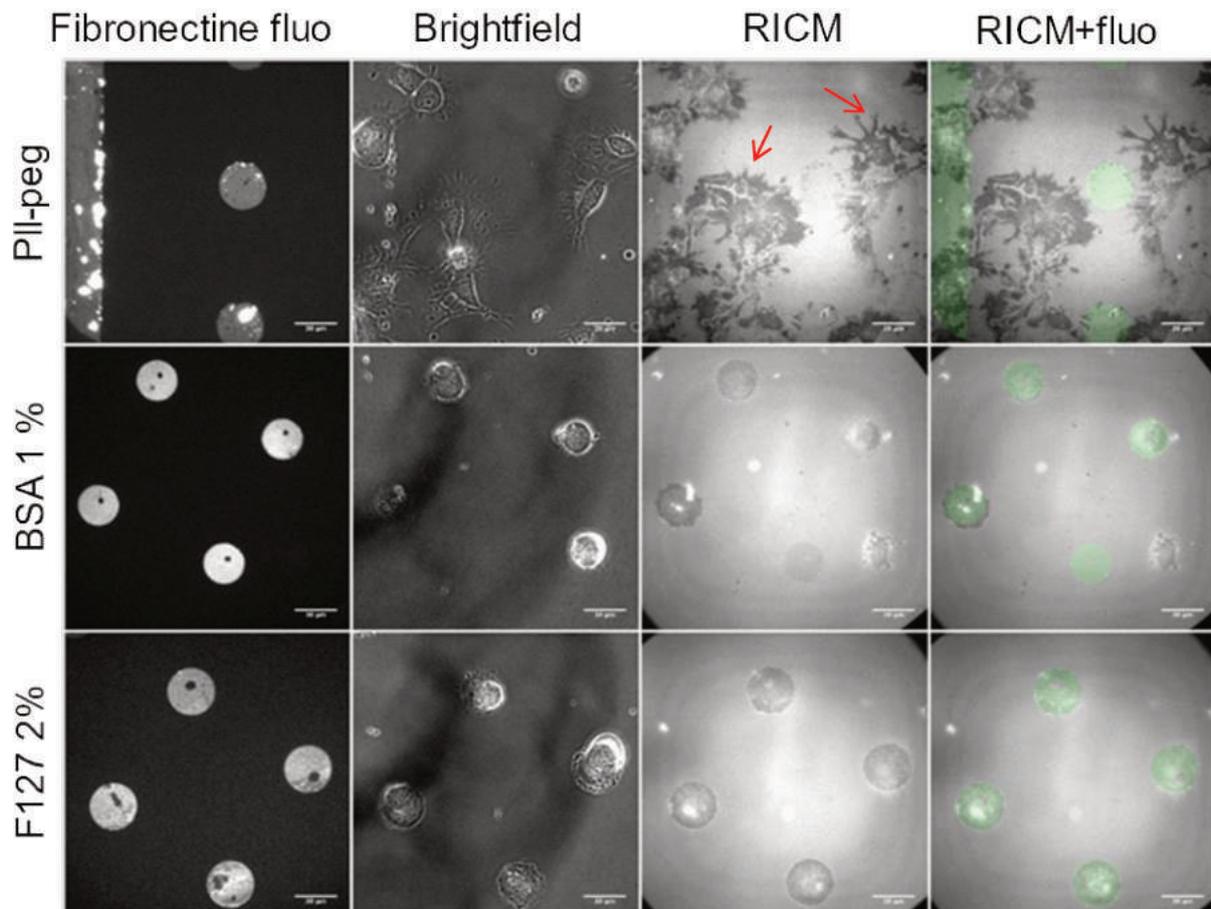


Fig. 5.30: Impression protéique pour l'immobilisation de COS APC. Les cercles sont formés avec de la fibronectine et du fibrinogène fluo et la surface est complétée avec différentes molécules répulsives : PLL-peg (ligne supérieure), BSA 1 % (ligne centrale) ou F127 2 % (ligne inférieure). Les flèches rouges indiquent une adhésion non spécifique, barre d'échelle=30 μ m. Image provenant (Wu, 2016).

1.2. Mesures d'indentation par AFM des COS APC afin de déterminer leur module de Young

Les mesures d'AFM (Fig. 5.31 B) sur les COS APC, au niveau du noyau, avec une force maximale de 500 pN, à 37°C présentant ou non le peptide montrent que leur élasticité est, lorsque patternée, d'environ 200 Pascal ce qui est un peu plus rigide que sur les 3A9m adhérentes sur des patterns de aCD45 (~100Pa). Sur le continu, étrangement, les 3A9m sont un peu plus rigide que les COS, peut-être à cause d'un effet dû au noyau plus prononcé (les mesures sont toujours menées pour les cellules étalées à cet endroit car plus reproductibles (observations de PH Puech). Dans le cas des COS APC on ne voit pas de différence significative entre un étalement sur une surface continue de fibronectine ou sur des patterns de

Résultats

30µm de diamètre, alors que les cellules 3A9m présentent un module de Young plus faible lorsqu'elles sont sur des patterns que sur une surface continue d'aCD45.

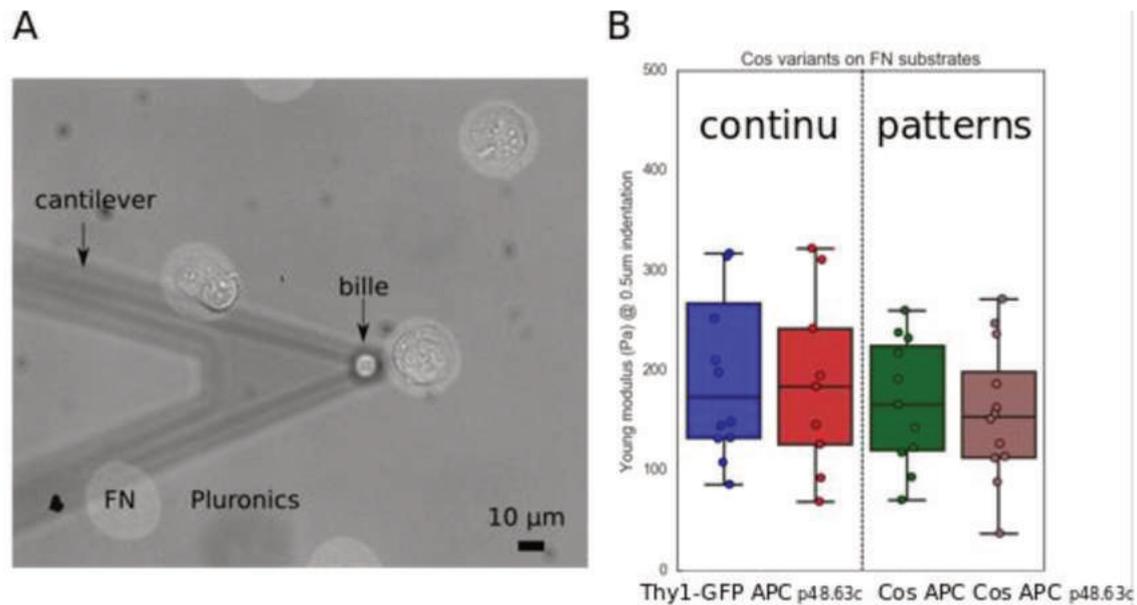


Fig. 5.31 : Mesures des propriétés mécaniques des COS APC, A : COS APC étalées sur des patterns de fibronectine et fibrinogène fluorescent et entourées de F127 2%. Le levier porte une bille de 10µm de diamètre et ne possède pas d'or afin de faciliter son placement au-dessus des cellules. B : Résultats des mesures du module de Young des COS APC sur une surface continue de fibronectine ou patternée, 1 point représente une cellule. Image adaptée du rapport d'A. Wu.

1.3. Microscopie confocales des cellules COS APC

Les cellules COS APC ont été fixées 15 minutes dans une solution de PFA 2% (Merck), glutaraldéhyde 0.2% (Sigma) et PBS 1X, puis saturées à la glycine 0.1M 30minutes sur la glace. Les cellules ont ensuite été marquées au Hoechst 33342 10 minutes à 0.001mM puis à la phalloïdine-ATTO 563 (Molecular Probes) 15 minutes et à la WGA-Alexa Fluor 488 (Santa Cruz) 10 minutes à 20µg/ml. Après chaque marquage, les échantillons ont été lavé deux fois au PBS 1X. L'observation a été faite au microscope confocal LSM 580 (Zeiss) à l'aide du logiciel Zen.

La microscopie confocale a permis de mettre en évidence que la cellule COS APC prenait une forme de dôme sur les patterns et son noyau est en position centrale sur ces structures permet-

Résultats

tant ainsi d'avoir une zone cellulaire autour de celui-ci qu'il est possible d'étirer en variant la taille des stamps.

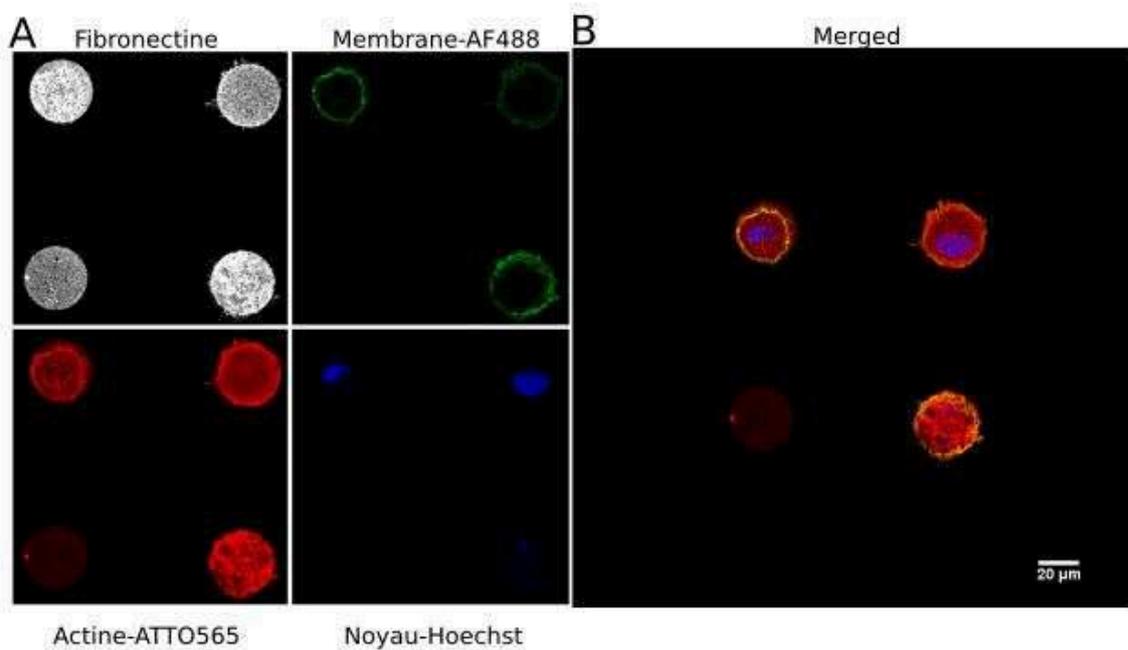


Fig. 5.32 : Imagerie confocale de cellules COS APC fixées. A : On peut voir les patterns de fibronectine de 30µm de diamètre, la membrane plasmique qui s'est parfaitement adaptée à la taille du cercle, le cytosquelette d'actine et enfin le noyau. B : Merged des images la membrane, actine et noyau où l'on peut voir que la position du noyau est assez centrale (244).

2. Essais de mise en contact d'une cellule T 3A9m et COS APC

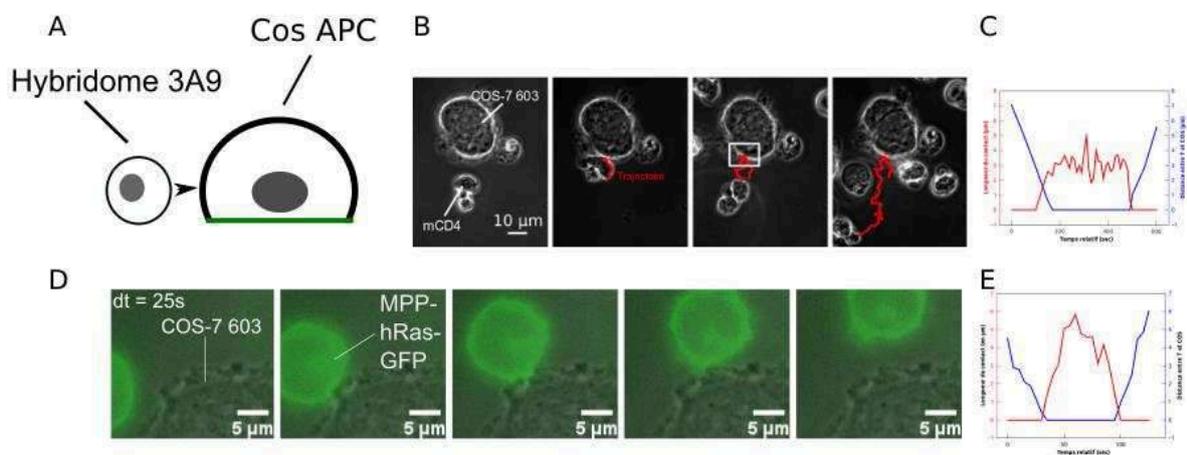


Fig. 5.33 : Observation des premiers essais de mise en contact entre APCs patternées et lymphocyte T. A : Modèle expérimentale de mise en contact de lymphocyte T marqué à la membrane (MPP hRas) ou non. B : Timelapse en transmission après dépôt d'hybridomes 3A9 non marqués dans un Petri

Résultats

Dish sur lequel des COS APC ont été patternées. La trajectoire (en rouge) a été déterminée par « tracking » à l'aide d'ImageJ-Fiji. Dt : temps entre chaque image. L'échelle représente 10 μ m. Un découpage de la zone dans le carré blanc a été effectué afin de mesurer la longueur de contact entre les membranes de 3A9 et de COS-7 603 ainsi que la distance entre ces deux types cellulaires au cours du temps. C : Mesures de la distance entre les COS-7 603 et les hybridomes 3A9 au cours du temps. D : Timelapse en fluorescence après dépôt d'hybridomes 3A9 marqué GFP à la membrane (MPP-hRas) dans un Petri Dish sur lequel des COS-7 603 ont été patternées. Le temps entre chaque image est de 25 secondes et l'échelle représente 5 μ m. E : Mêmes mesures que C mais entre les COS APC et les MPP-hRas (244).

Ces expériences ont permis d'observer et mesurer le temps et la zone de contact latérale entre une cellule 3A9m et COS APC dont l'adhésion et la forme sont imposées par le micropattern de fibronectine. Ce travail, (244) a été le point de départ à la mise en place dans l'étude publiée à des patterns de plus grande taille permettant ainsi d'obtenir un lamellipode le plus fin possible. Cette structure sera alors compatible avec le couplage d'autres techniques de microscopie tel que le TIRF et la RICM, permettant d'améliorer ce qui peut être réalisée sur des bicouches lipidiques supportées car le lamellipode n'est pas inerte et permet la diffusion des molécules dans la membrane plasmique ainsi que des fluctuations de cette dernière. L'idée finale est de pouvoir observer un contact cellule T/APC à travers le lamellipode à l'interface entre les deux cellules, c'est à dire avec une structure de type bicouche fonctionnalisée, mais plus réaliste car c'est la cellule elle-même qui exprime et oriente les molécules, à la membrane. Ce système cellulaire « lego » ouvre ainsi des perspectives intéressantes, en combinant l'expression contrôlée de molécules de reconnaissance et d'adhésion, par exemple.

Article : Lamellipod Reconstruction by Three-Dimensional Reflection Interference Contrast Nanoscopy (3D-RICN) (215),

Toutes les améliorations de protocoles et caractérisations décrites dans les paragraphes précédents ont permis d'initier le travail qui a conduit à la publication incluse dans ce manuscrit et dont je suis co-auteur.

L'objectif de cette étude était d'obtenir des mesures quantitatives sur la topographie de la cellule, à savoir quelle est la distance entre la cellule et le substrat, et quelle est son épaisseur par RICM multi-couleurs (247). Cette technique permet de lever les indéterminations sur les reconstructions de hauteurs, inhérentes à cette microscopie de surface. Le principe de la RICM (dans sa version mono-couleur) est décrit dans le matériel et méthode (section 7.2).

L'originalité de cette approche, appelée RICN, N pour nanoscopy, réside dans l'utilisation de plusieurs longueurs d'ondes et plusieurs ouvertures numériques d'illumination (INA) pour résoudre la position des différentes interfaces. En effet, deux problèmes majeurs associés à la quantification des images RICM de cellules sont que l'indice de réfraction n'est pas connu et que les réflexions des organites ou de la membrane apicale peuvent biaiser les données et rendre leur interprétation difficile. Cependant, les réflexions de la membrane apicale peuvent donner une idée de la forme 3D du lamellipode. Pour quantifier cela, cette étude a utilisé des résultats de travaux antérieurs qui ont contourné certaines limites du RICM : les réflexions multiples qui se produisent en présence de plus d'une interface ont été surmontées en utilisant un modèle de Fresnel à interfaces multiples (124).

Après des calculs numériques assez fastidieux on accède non seulement à la distance entre la cellule et le substrat, mais aussi à la position de la membrane apicale qui peut s'avérer être difficile à déterminer avec d'autres techniques de microscopie. Une représentation en 3D peut être générée et on peut voir précisément la topologie du contact cellule substrat et celle de la membrane apicale

Nous nous sommes intéressés à une zone particulière de certaines cellules adhérentes : le lamellipode : c'est une structure très fine que peut former une cellule et qui permet le déplacement et l'exploration son environnement.

Les COS APC s'étalant de manière très importante sur le verre (en conditions de culture, sur le verre ou la fibronectine), les lamellipodes que présentent ces cellules ont une extension assez large. Une idée qui nous a paru séduisante est d'utiliser ces lamellipodes comme des

Résultats

« bicouches moins modèles » que des bicouches supportées, en essayant de les transformer en plateformes de présentation de pMHC (ou de toute autre molécule que les COS peuvent exprimer, en relation avec la thématique de reconnaissance T). Le fait que ce soient des substrats cellulaires fait que l'on n'a pas besoin de contrôler l'orientation des molécules à la surface, leur bon accrochage à la surface, car les COS le font pour nous.

L'approche de cellules sur motifs de grande taille, qui permettent comme on le décrit dans l'article d'obtenir de grands lamellipodes assez homogènes en épaisseur, pourrait ainsi permettre des études par les microscopies de surface, comme la RICM ou le TIRF à angle variable, de l'interaction cellule T / APC.

Nous avons donc caractérisé de manière fine par un couplage de microscopies de surface, d'indice et de microscopie à force atomique, les dimensions de ce lamellipode, sur verre et sur fibronectine, pour des cellules en culture ou patternées. En particulier, la distance à la surface de la membrane base, l'épaisseur du lamellipode et son indice moyen, ont été déterminés par une approche couplée expériences / modèles / simulations. Une reconstruction 3D de ces lamellipodes a ainsi pu être obtenue.

Nous avons de plus réalisé quelques tests, avec des billes ou des cellules T, sédimentant sur ces lamellipodes, et pour l'instant, la méthodologie reste à mettre en place, car la COS, vivante, « ondule » de manière naturelle, ce qui a tendance à compliquer l'analyser des images de RICM des cellules T au voisinage, en particulier (244), (248). Nous ne présentons pas ici ces essais encore trop préliminaires.

L'article présentant la reconstruction du lamellipode de ces APC modèles est présenté ci-après.

Lamellipod Reconstruction by Three-Dimensional Reflection Interference Contrast Nanoscopy (3D-RICN)

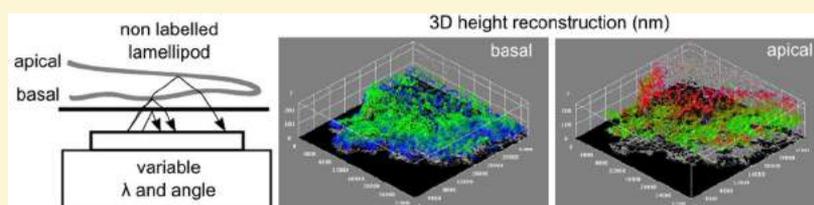
Marie-Julie Dejardin,^{†,||} Arnaud Hemmerle,^{‡,||} Anaïs Sadoun,[†] Yannick Hamon,[§] Pierre-Henri Puech,[†] Kheya Sengupta,^{*,‡,§} and Laurent Limozin^{*,†,§}

[†]Aix Marseille Univ, CNRS, INSERM, LAI, Marseille 13288, France

[‡]Aix Marseille Univ, CNRS, CINAM, Marseille 13288, France

[§]Aix Marseille Univ, CNRS, INSERM, CIML, Marseille 13288, France

Supporting Information



ABSTRACT: There are very few techniques to reconstruct the shape of a cell at nanometric resolution, and those that exist are almost exclusively based on fluorescence, implying limitations due to staining constraints and artifacts. Reflection interference contrast microscopy (RICM), a label-free technique, permits the measurement of nanometric distances between refractive objects. However, its quantitative application to cells has been largely limited due to the complex interferometric pattern caused by multiple reflections on internal or thin structures like lamellipodia. Here we introduce 3D reflection interference contrast nanoscopy, 3D-RICN, which combines information from multiple illumination wavelengths and aperture angles to characterize the lamellipodial region of an adherent cell in terms of its distance from the surface and its thickness. We validate this new method by comparing data obtained on fixed cells imaged with atomic force microscopy and quantitative phase imaging. We show that as expected, cells adhering to micropatterns exhibit a radial symmetry for the lamellipodial thickness. We demonstrate that the substrate–lamellipod distance may be as high as 100 nm. We also show how the method applies to living cells, opening the way for label-free dynamical study of cell structures with nanometric resolution.

KEYWORDS: Super-resolution, label-free imaging, lamellipodium, cell surface imaging, interference imaging, cell membrane topography

Cell adhesion and spreading are central phenomena regulating cell function and behavior, ranging from activation to proliferation.¹ Cell spreading, as well as motility, is usually mediated by a flat and dynamic protrusion, called the lamellipodium,^{2,3} which has been the object of numerous structural studies based on fluorescence^{4–6} and electronic microscopy.⁷ The shape of a motile cell, especially the lamellipodium, is known to be crucial for spreading, migration, and mechanosensing.^{3,8,9} However, in cell adhesion studies the focus is often on the substrate-proximal surface, which is typically imaged using fluorescence-based techniques to reveal specific proteins and structures involved in adhesion and associated signaling.¹⁰

An important aspect of adhesion is the quantification of the intimate contact of the cell membrane with the surface in terms of the cell-to-surface distance, usually achieved using different types of interference microscopy,^{11,12} allowing the determination of distances between cell surfaces well below the optical resolution imposed by the limit of diffraction, out of reach for classical or confocal fluorescence microscopy. Different fluorescence-related strategies, based on super-resolution or

deconvolution and combined with total internal reflection fluorescence microscopy or dual-objective astigmatism, can also be used to provide nanometer resolution in the axial direction.^{5,13–17} While permitting molecular specificity, fluo-based methods are limited by the necessity of labeling the sample, which is often inappropriate for fragile cells or medical samples. They are compromised by possible labeling or fixation artifacts¹⁸ and by photobleaching in the case of long-term live or repeated observation.

In the context of quantification of adhesion, reflection interference contrast microscopy (RICM) has often been the technique of choice.^{11,19–21} It consists of epi-illuminating the cell–surface region with a monochromatic light and collecting the interfering rays. This purely interferometric approach showed great initial promise^{11,19} but was later mostly used in a semiquantitative manner for cell analysis due to the complex optics of cells, although RICM does provide excellent

Received: July 31, 2018

Revised: September 3, 2018

Published: September 4, 2018

resolution in the context of simple objects like colloids, model membranes, or thin films.^{20–23} Recent application to cells of interferometric scattering microscopy (iSCAT²⁴), which relies on scattering from fine features and edges, provides semi-quantitative informations at high time and lateral resolution but with limited confidence in the nature of the structure imaged and limited resolution in the vertical direction.²⁵ Label-free techniques are currently undergoing a strong development, in particular to meet the needs of biomedical research,^{26,27} a striking example being the trawling of big databases of transmitted light images of cells using machine learning strategies.^{18,28} RICM of cells has known a revival in this context.^{29–31}

RICM is sensitive to abrupt changes in the refractive index at the interface of two media, and, in a first approximation, the collected intensity is related to the cell–surface distance.^{32–36} This approach was exploited to estimate membrane fluctuations. Two major problems associated with quantification of RICM images from cells are that the cell refractive index is not known and that extraneous reflections from internal organelles or the dorsal membrane may corrupt the data and render interpretation difficult.^{21,37} However, reflections from the dorsal membrane can provide an insight into the 3D shape of the lamellipod. To quantify this, we get inspiration from previous work that circumvented other limitations of RICM: multiple reflections that occur in the presence of more than one interface were overcome using a Fresnel model of multiple interfaces,^{22,38–40} and ambiguity due to the periodic relation between distance and phase shift was overcome by dual-wavelength illumination.^{41,42} Here, we image adherent cells in RICM mode with multiple illumination angles and wavelengths and develop a fitting procedure to reconstruct the 3D profile of the adhering lamellipodium with nanometric resolution (3D-RICM).

To establish the proof of the principle, we chose the fibroblast-like simian cell-line COS-7, which spreads easily on uncoated glass, making large lamellipods and having relatively slow dynamics postspreading. Cells were allowed to spread on glass and, after fixation, were imaged in RICM mode with multiple illumination conditions; we obtained 15 snapshots corresponding to a combination of illumination wavelengths 436, 546, and 625 nm and illumination numerical apertures (INAs) of 0.5, 0.56, 0.68, 0.86, and 1.05 (Figure 1A). Reflection of light from the sample is modeled assuming locally flat films oriented orthogonally to the optical axis, taking into account the s and p polarization of light through the polarizer/quarter waveplate/analyzer and using the Jones formalism to calculate the reflectivity taking into account multiple reflections and polarization^{22,39,40} (see the SI for details). The lamellipodial region is modeled as a thin layer of cytoplasm of thickness, d , and refractive index, n_{in} , sandwiched between two membranes, with the whole placed above the glass surface at a distance of h (Figure 1B). The images are normalized with respect to the background intensity for comparing with a theoretically generated map of the theoretical normalized reflectivity defined as $r = I_{lam}/I_{bgd}$, with intensity, I_{lam} , calculated for the lamellipod and I_{bgd} calculated for the background. For each experimental value of λ , INA, and for variable n_{in} (in 0.005 steps), a reflectivity map is generated for h between 0 and 500 nm in 2 nm steps and d between 0 and 1000 nm in 10 nm steps. Qualitatively, it accounts for an expected resolution better in h than d as well as a limit of sensitivity for large h and d . An example of such a

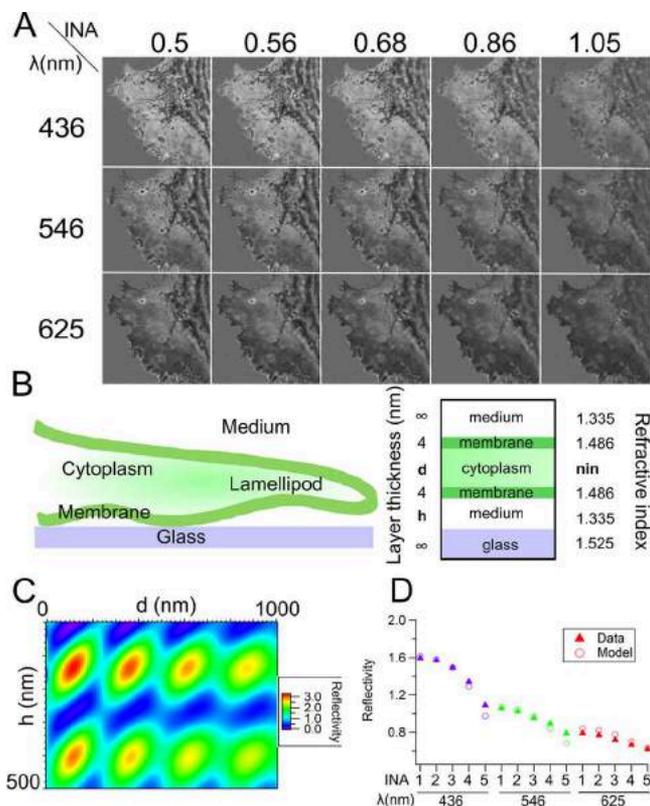


Figure 1. Principle of 3D-RICM. (A) Montage of a multichannel reflectivity image stack. RICM images are taken sequentially with three illumination wavelengths (λ) and five illumination numerical apertures (INAs). Image background intensity is normalized to 1 so that cell reflectivity is measured with respect to the background. The width of each image is ca. $30 \mu\text{m}$. (B) Thin-film model to calculate the reflectivity of a lamellipod with three parameters to determine cell–surface distance, h , cytoplasm thickness, d , and cytoplasmic refractive index, n_{in} . (C) Example of calculated reflectivity map ($\lambda = 436 \text{ nm}$, $\text{INA} = 0.95$, $n_{in} = 1.40$) for variable cell–surface distance, h , and lamellipod thickness, d . (D) Example of measured reflectivity for a pixel taken in the middle of panel A (triangle) and fitted theoretical reflectivity (circle) for each illumination condition (INA and wavelength).

map for $\lambda = 436 \text{ nm}$, $\text{INA} = 0.95$, and $n_{in} = 1.40$ is shown on Figure 1C. (The code used for reconstruction is available and explained in detail online: <https://github.com/ArnaudHemmerle/3DRICM>.)

To solve the inverse problem of finding parameters h , d , and n_{in} from the normalized multichannel data stack, a fitting error χ^2 is calculated for each pixel of the experimental image (see the SI), and the best solution (h , d , n_{in}), corresponding to the minimal value of χ^2 , is identified. A graphical example of data and best-fit theoretical reflectivities for one randomly chosen pixel is shown on Figure 1D. Estimates of the error in h , d , and n_{in} are expressed, for each pixel, in terms of the confidence interval δh , δd , and δn_{in} , which quantifies the error introduced in fitting due to acquisition noise (see Figure S2). The reconstruction algorithm was applied on an area of ca. $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$ chosen in the lamellipodial region.

The map of height h and its error δh are shown in Figure 2A,B. The distribution of h is represented on the histogram in Figure 2C, which exhibits a peak at 90 nm. The thickness of the lamellipodium is described by the map of d (Figure 2D) and confidence interval δd (Figure 2E). It is seen to be rather

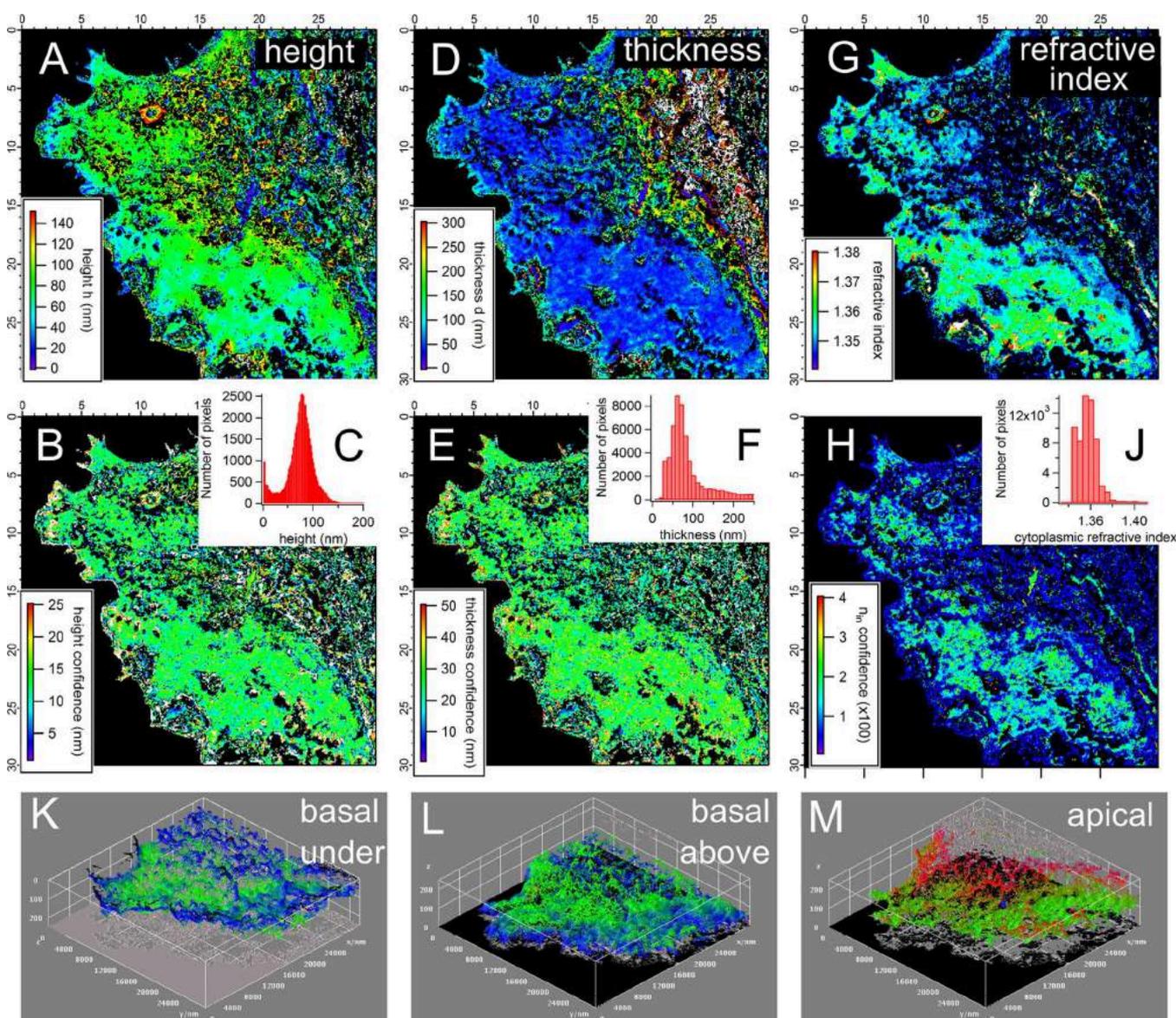


Figure 2. Topography obtained from the reconstruction algorithm. (A) Map of height h (cell–surface distance). (B) Map of δh , confidence interval for h . (C) Distribution of height h on the entire image but excluding black pixels. (D) Map of cell thickness d . (E) Map of δd , confidence interval for d . (F) Distribution of thickness d . (G) Map of cytoplasmic refractive index n_{in} . (H) Map of confidence interval for n_{in} . (I) Distribution of n_{in} . Note that only pixels that are deemed to be nonpathological (see the SI) and correspond to $d < 500$ nm are represented. (K–M) 3D representations of basal membrane ((K) seen from under or (L) seen from above) and of apical membrane ((M) seen from top). Numbers on images' axes indicate distance in micrometers for 2D maps (A,B,D,E,G,H) and in nanometers for 3D reconstructions (K–M).

flat with the distribution of d peaking at 75 nm (Figure 2F). The map of cytoplasmic refractive index n_{in} and its interval of confidence δn_{in} are shown on Figure 2G,H. The distribution of n_{in} , shown in the histogram of Figure 2I, peaks at 1.355. 3D surface plots of the basal and apical membranes were produced using Fiji⁴³ and are represented in Figure 2K–M. Sequences with azimuthal rotation are available in the Supporting Information. The correlation between the fit parameters and their errors as well as the independence of the three fitted parameters are mapped in Figure S4. Noticeably, h and d exhibit a certain degree of correlation shown in Figure S4. Correlation is also visible between d and n_{in} . This indicates that for certain pixel there is an underdetermination of the three parameters.

Because no other technique is able to image a lamellipodium in 3D and with the accuracy reported here, to validate 3D-

RICN, we compared the reconstruction of the dorsal surface with an atomic force microscopy (AFM) image and the optical thickness (expressed in terms of the optical path density) with quantitative phase image (QPI). The lamellipodial zone of the AFM image was oriented and scaled to correspond pixel by pixel to the 3D-RICN images and was corrected for indentation of 40 nm (Figure 3A, raw image in Figure S6), from which the apical membrane height (AMH) was calculated by summing h and d (Figure 3B). (This is close to the typical deformation of 70 nm measured with AFM (see Figure S5), which can arise from compression of the cytoplasm or pushing of the lower membrane against the substrate while imaging, even at a moderate force.) Comparison of AMH images, Figure 3A,B, is provided in the density map of Figure 3C, which exhibits a high density along the $x = y$ line, indicating a high overlap. Some points on the y axis reflect errors due to

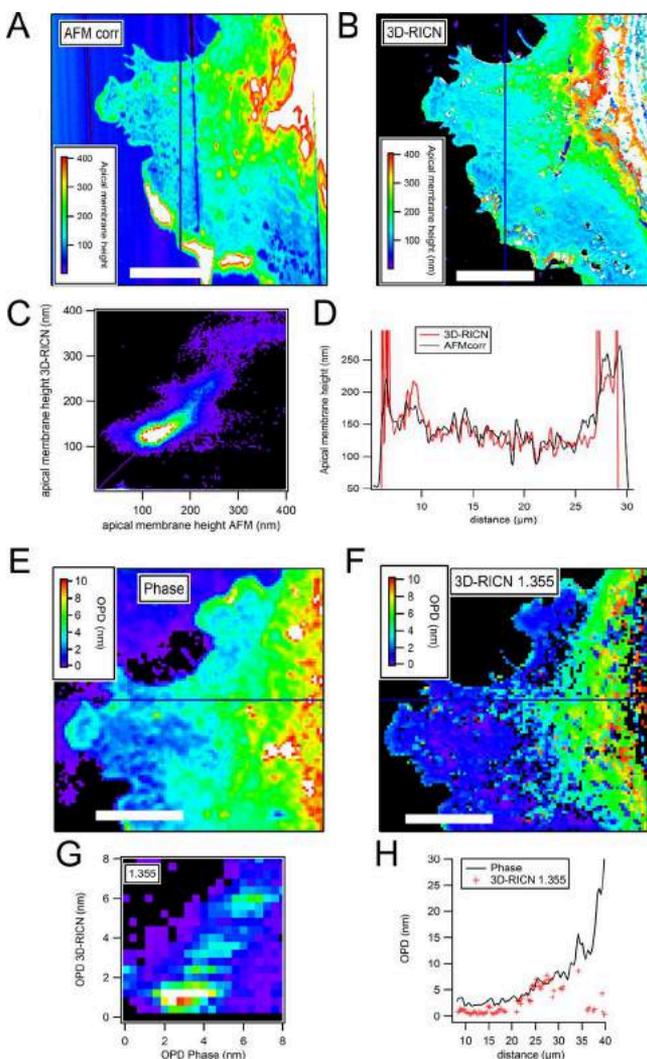


Figure 3. Comparison of 3D-RICN with AFM and QPI. (A) AFM image of height of the apical membrane after correction for an average indentation of 40 nm. (B) 3D-RICN map of the apical membrane height, obtained as the sum $h + d$. (C) Map density of the 3D-RICN map as a function of the corrected AFM image. (D) Height profile taken along the vertical blue line in panels A and B. (E) OPD obtained by QPI. (F) OPD obtained with 3D-RICN using d and $n_{in} = 1.355$. (G) Map density of OPD from panel F versus OPD from panel E. (H) Profiles comparing OPD from panels E and F taken along the horizontal blue line. Scale bar for panels A, B, E, and F: 10 μm .

incorrectly identified fringes in RICM. The profiles of AMH along the blue line of Figure 3A,B are compared in Figure 3D and show a good agreement. The standard height difference of the two profiles is <15 nm, while the lateral difference is on the order of 100 nm. A second test of 3D-RICN reconstruction was performed by comparison with quantitative phase imaging (QPI). The same cell was imaged with QPI (Figure 3E), and the zone of the lamellipod was cropped, scaled, and oriented to coincide pixel by pixel with 3D-RICN images. The optical path difference (OPD) was calculated from 3D-RICN data as $OPD = (n_{in} - n_{out}) \times d$ (Figure S7A). The OPDs from QPI and 3D-RICN were compared as density maps (Figure S7B), revealing a relatively poor agreement, likely because n_{in} may be error-prone, as already suggested by the observed correlation between d and n_{in} identified in Figure S4. We therefore corrected OPD from 3D-RICN, taking a uniform value of $n_{in} =$

1.355, which corresponds to the peak of n_{in} distribution (Figure 2J). This corrected OPD is mapped in Figure 3F. The comparison is shown as a profile in Figure 3G and a density map in Figure 3H. This shows a fair agreement between the two methods. However, the comparison is impeded by the observed limit of sensitivity of QPI in the lamellipod region as well as inhomogeneous background level correction.

We next imaged a cell spread on a circular patch of diameter 65 μm , coated with the extracellular protein fibronectin. In this case, the normalization of the 3D-RICN raw images was performed by dividing the cell image by the aligned image of an empty fibronectin patch. The reconstruction was performed as described above for the nonpatterned substrates. Results are shown in Figure 4. The central region of the cell has been masked because the proposed reconstruction does not apply in this zone due to the presence of the nuclear membrane just above the proximal cell membrane. Furthermore, the height of the apical membrane is expected to exceed 1 μm where the model is not applicable. h distribution peaks at 35 nm (Figure 4C), much lower than in the absence of fibronectin on the surface, with a globally uniform distribution (Figure 4A). This is roughly consistent with integrin complex size. The histogram of cytoplasmic refractive index peaks at 1.355 (Figure 4D), as was the case before. The cell thickness d histogram peaks at 300 nm (Figure 4E) and exhibits a radial distribution, as could be expected from the symmetry of the underlying pattern (Figure 4B). The AMH/OPD maps calculated from 3D-RICN data (Figure 4F, respectively, Figure 4H) show good agreement with AFM/QPI (Figure 4G, respectively, Figure 4J) (the latter assuming, as before, $n_{in} = 1.355$).

We next applied the method to live cell imaging, reducing the acquisition time by a factor of 5 to make sure that it was short enough for the cell to be considered quasi-static during acquisition. This could be achieved by taking a single frame in each channel rather than 5 in the static reconstruction detailed before. The reconstruction of h and d is shown in Figure S9. A thinning of the cell (upper left corner, see arrow) upon retraction can be observed. The close contact of stress fibers is visible. Surprisingly, the extent of close contact is very limited, hinting at weak adhesion of the whole cell in the lamellipodial region. This confirms that the similar heights obtained on a fixed cell were not a mere artifact of fixation.

Future use of the technique for live imaging would require an accelerated acquisition. This could be realized by using a filter wheel and a piezo-mounted objective to adjust automatically the position of the focus depending on the wavelength as well as a reduced set of INAs for imaging the cell. We have performed reconstructions of a close-up of the lamellipod for different sets of INAs to quantify how the h and d maps are influenced by the values and the number of INAs (Figure S8). Taking the results obtained for the full set of five INAs as the reference, we first see that using only two INAs leads to wrong reconstruction of most pixels, in particular for d and h . Taking three INAs largely improves the results, as shown also by the quantitative analysis of a patch of 40×40 pixels in an area of small roughness in the lamellipod. We conclude that the values of the INAs chosen have a strong influence on the quality of the reconstruction and that taking extreme values for the INAs leads to a better reconstruction than taking closely spaced ones.

We also observe that the roughness of the patch, as defined by the root mean square (rms) of height h , that is, of the bottom membrane, is a good indicator for the quality of the

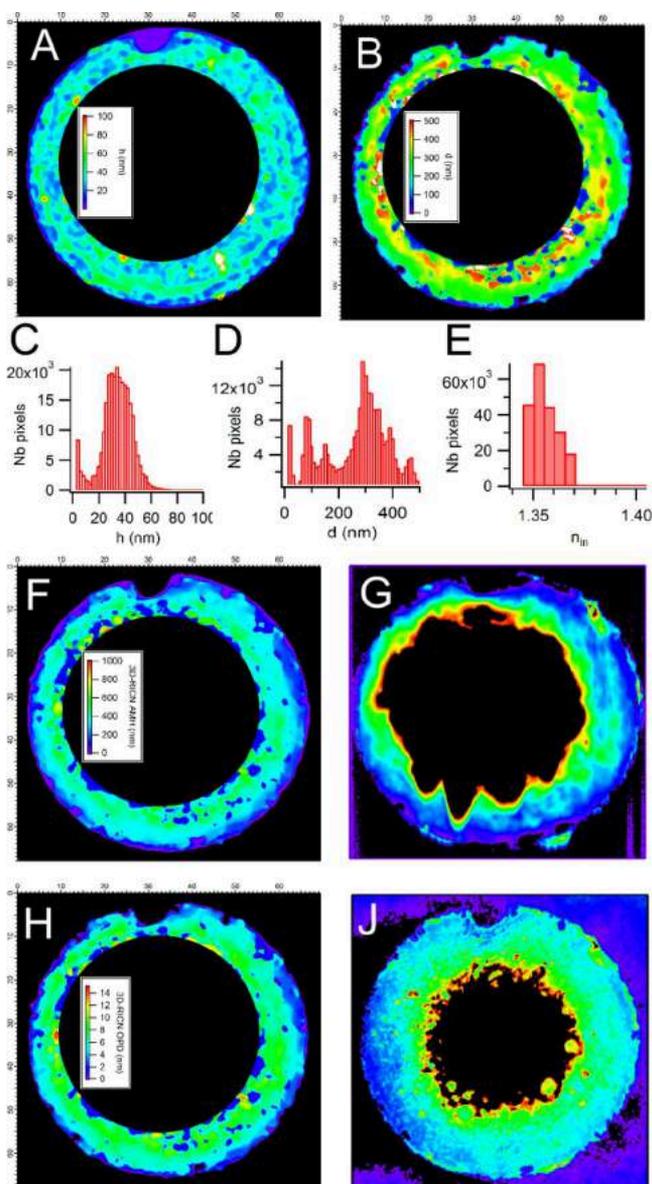


Figure 4. 3D-RICN reconstruction of a cell adhered on a patch of fibronectin and comparison with AFM and QPI. For clarity of the representation, the central part of the cell has been removed, and a $0.8\ \mu\text{m}$ radius median filter has been applied on the 3D-RICN reconstructions. (A) Membrane height, h . (B) Cell thickness, d . (C) Distribution of h . (D) Distribution of cytoplasmic refractive index, n_{in} . (E) Distribution of d . (F) Apical membrane height calculated from 3D-RICN data. (G) AMH measured from AFM. (H) Optical path distance calculated from 3D-RICN data. (J) OPD measured from QPI. NB: Lateral scale for panels A, B, F, and H is in micrometers.

reconstruction. Indeed, a wrong reconstruction of a pixel often leads to the convergence of the fit to extreme values far from the correct ones, leading to an artificial roughness of the image. Through a careful analysis, we determined that the set of three INAs (0.5, 0.68, 1.05), taking the two extreme values of the full set and an intermediate one, gives almost identical results as the reconstruction with the full set. This shows that a carefully chosen, smaller set of INA can be used in further studies for live imaging. Moreover, this convergence also ensures that our method is robust and uses enough INAs for a correct reconstruction of the lamellipod.

We also tested the reconstruction of the zones out of the lamellipod, including that under the nucleus, using appropriate layer-models. This, however, proved to be unsatisfactory, possibly because we were forced to limit the range of values searched due to the time required by the minimization algorithm. An obvious improvement will be the implementation of faster algorithms like progressive step refinement. One inherent problem of RICM that partly remains here is ambiguity linked to periodic fringes. Furthermore, the sensitivity of the technique to measure the refractive index is limited. The use of an additional wavelength may help to overcome both of these problems. In addition to the reconstruction of the basal nuclear membrane, perspectives of applications for 3D-RICN include monitoring of apical membrane ruffle or mitochondrial membranes as well as cell volume dynamics. Compared with wide-field fluorescence, we can expect lower phototoxicity due to the alternation of illumination wavelengths in 3D-RICN.

To conclude, we have reconstructed the 3D shape of a lamellipod, with 10 nm axial resolution and 100 nm lateral resolution, of a label-free cell adhering to a functionalized substrate. We thus provide, for the first time to our knowledge, a validated reconstruction of the absolute height of the basal and apical membrane of a cell based on interference contrast microscopy principle. We have demonstrated the reconstruction of a live cell with time resolution of ca. 1 min per frame. For both fixed and live cells, the lamellipod is relatively flat and with a thickness of ~ 100 nm, as could have been expected from previous studies with AFM or with state-of-art super-resolution microscopy of the actin cytoskeleton using double-objective astigmatism.⁵ The substrate proximal surface, inaccessible to AFM, of a cell adhering nonspecifically to glass was also imaged. The cell–surface distance was distributed around 80 nm and reduced to ~ 40 nm when specific adhesion was present, which is compatible with fluorescence data for COS cells.⁵ Such ultrafine topographical maps of the under-surface of cells are of interest not only for fundamental cell biophysics but also for applications like building cell-on-chip connections, for example, in the context of neurotechnology.⁴⁴ The method presented here opens the way to high-throughput characterization of cell shape at nanometer resolution without labeling.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.nanolett.8b03134.

Supplementary Movie 1: Azimuthal rotation of the 3D surface plot of the basal membrane seen from under, corresponding to Figure 2K. (AVI)

Supplementary Movie 2: Azimuthal rotation of the 3D surface plot of the basal membrane seen from above, corresponding to Figure 2L. (AVI)

Supplementary Movie 3: Azimuthal rotation of the 3D surface plot of the apical membrane seen from above, corresponding to Figure 2M. (AVI)

Materials and Methods and Supplementary Figures S1–S9. (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*L.L.: E-mail: laurent.limozin@inserm.fr.

*K.S.: E-mail: sengupta@cinam.univ-mrs.fr.

ORCID

Kheya Sengupta: 0000-0002-1060-2713

Laurent Limozin: 0000-0001-9523-8086

Author Contributions

||M.-J.D. and A.H. contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

The code used for reconstruction is available and explained in detail online: <https://github.com/ArnaudHemmerle/3DRICN>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Marguet and S. Mailfert from the PICsL platform for lending the Sid4bio camera as well as S. Monneret for initiating us to perform quantitative phase measurement. We thank M. Biarnes-Pelicot and L. Borges (PMMC) for help with cell culture, O. Théodoly for stamps, and P. Dillard for preliminary experiments with Jurkat cells. P.-H.P. thanks JPK instruments for continuous support. This work was partially funded by GDR Imabio (M.-J.D., A*MIDEX (ANR-11-347 IDEX-0001-02) (A.H. and K.S.) and Labex INFORM (ANR-11-LABX-0054) (A.S.).

REFERENCES

- Cretel, E.; Touchard, D.; Bongrand, P.; Pierres, A. A new method for rapid detection of T lymphocyte decision to proliferate after encountering activating surfaces. *J. Immunol. Methods* **2011**, *364*, 33–39.
- Giannone, G.; Dubin-Thaler, B. J.; Rossier, O.; Cai, Y.; Chaga, O.; Jiang, G.; Beaver, W.; Döbereiner, H.-G.; Freund, Y.; Borisy, G.; Sheetz, M. P. Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell* **2007**, *128*, 561–575.
- Oakes, P. W.; Bidone, T. C.; Beckham, Y.; Skeeters, A. V.; Ramirez-San Juan, G. R.; Winter, S. P.; Voth, G. A.; Gardel, M. L. Lamellipodium is a myosin-independent mechanosensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, 2646–2651.
- Abraham, V. C.; Krishnamurthi, V.; Taylor, D. L.; Lanni, F. The actin-based nanomachine at the leading edge of migrating cells. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1721–1732.
- Xu, K.; Babcock, H. P.; Zhuang, X. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 185–188.
- Fritz-Laylin, L. K.; Riel-Mehan, M.; Chen, B.-C.; Lord, S. J.; Goddard, T. D.; Ferrin, T. E.; Nicholson-Dykstra, S. M.; Higgs, H.; Johnson, G. T.; Betzig, E.; Mullins, R. D. Actin-based protrusions of migrating neutrophils are intrinsically lamellar and facilitate direction changes. *eLife* **2017**, *6*, e26990.
- Small, J. V.; Auinger, S.; Nemethova, M.; Koestler, S.; Goldie, K. N.; Hoenger, A.; Resch, G. P. Unravelling the structure of the lamellipodium. *J. Microsc.* **2008**, *231*, 479–485.
- Mogilner, A.; Keren, K. The shape of motile cells. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, R762–R771.
- Dillard, P.; Varma, R.; Sengupta, K.; Limozin, L. Ligand-mediated friction determines morphodynamics of spreading T cells. *Biophys. J.* **2014**, *107*, 2629–2638.
- Geiger, B.; Spatz, J. P.; Bershadsky, A. D. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 21–33.
- Curtis, A. S. The mechanism of adhesion of cells to glass. A study by interference reflection microscopy. *J. Cell Biol.* **1964**, *20*, 199–215.

(12) Paszek, M. J.; DuFort, C. C.; Rubashkin, M. G.; Davidson, M. W.; Thorn, K. S.; Liphardt, J. T.; Weaver, V. M. Scanning Angle Interference Microscopy Reveals Cell Dynamics at the Nano-scale. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 825–827.

(13) Sundd, P.; Gutierrez, E.; Pospieszalska, M. K.; Zhang, H.; Groisman, A.; Ley, K. Quantitative dynamic footprinting microscopy reveals mechanisms of neutrophil rolling. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 821–824.

(14) Boulanger, J.; Gueudry, C.; Münch, D.; Cinquin, B.; Paul-Gilloteaux, P.; Bardin, S.; Guérin, C.; Senger, F.; Blanchoin, L.; Salamero, J. Fast high-resolution 3D total internal reflection fluorescence microscopy by incidence angle scanning and azimuthal averaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 17164–17169.

(15) Bourg, N.; Mayet, C.; Dupuis, G.; Barroca, T.; Bon, P.; Lécart, S.; Fort, E.; Lévêque-Fort, S. Direct optical nanoscopy with axially localized detection. *Nat. Photonics* **2015**, *9*, 587.

(16) Brodovitch, A.; Limozin, L.; Bongrand, P.; Pierres, A. Use of TIRF to Monitor T-Lymphocyte Membrane Dynamics with Submicrometer and Subsecond Resolution. *Cell. Mol. Bioeng.* **2015**, *8*, 178–186.

(17) Cardoso Dos Santos, M.; Déturche, R.; Vézy, C.; Jaffiol, R. Topography of Cells Revealed by Variable-Angle Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Biophys. J.* **2016**, *111*, 1316–1327.

(18) Christiansen, E. M.; Yang, S. J.; Ando, D. M.; Javaherian, A.; Skibinski, G.; Lipnick, S.; Mount, E.; O'Neil, A.; Shah, K.; Lee, A. K.; et al. In Silico Labeling: Predicting Fluorescent Labels in Unlabeled Images. *Cell* **2018**, *173*, 792–803.e19.

(19) Bereiter-Hahn, J.; Fox, C. H.; Thorell, B. Quantitative reflection contrast microscopy of living cells. *J. Cell Biol.* **1979**, *82*, 767–779.

(20) Radler, J.; Sackmann, E. On The Measurement Of Weak Repulsive And Frictional Colloidal Forces By Reflection Interference Contrast Microscopy. *Langmuir* **1992**, *8*, 848–853.

(21) Limozin, L.; Sengupta, K. Quantitative reflection interference contrast microscopy (RICM) in soft matter and cell adhesion. *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 2752–2768.

(22) Theodoly, O.; Huang, Z.-H.; Valignat, M.-P. New modeling of reflection interference contrast microscopy including polarization and numerical aperture effects: application to nanometric distance measurements and object profile reconstruction. *Langmuir* **2010**, *26*, 1940–1948.

(23) Huerre, A.; Jullien, M.-C.; Theodoly, O.; Valignat, M.-P. Absolute 3D reconstruction of thin films topography in microfluidic channels by interference reflection microscopy. *Lab Chip* **2016**, *16*, 911–916.

(24) Piliarik, M.; Sandoghdar, V. Direct optical sensing of single unlabelled proteins and super-resolution imaging of their binding sites. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4495.

(25) Park, J.-S.; Lee, I.-B.; Moon, H.-M.; Joo, J.-H.; Kim, K.-H.; Hong, S.-C.; Cho, M. Label-free and live cell imaging by interferometric scattering microscopy. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 2690–2697.

(26) Bon, P.; Savatier, J.; Merlin, M.; Wattellier, B.; Monneret, S. Optical detection and measurement of living cell morphometric features with single-shot quantitative phase microscopy. *J. Biomed. Opt.* **2012**, *17*, 0760041.

(27) Bon, P.; Barroca, T.; Lévêque-Fort, S.; Fort, E. Label-free evanescent microscopy for membrane nano-tomography in living cells. *J. Biophotonics* **2014**, *7*, 857–862.

(28) Pavillon, N.; Hobro, A. J.; Akira, S.; Smith, N. I. Noninvasive detection of macrophage activation with single-cell resolution through machine learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, E2676–E2685.

(29) Lee, D.; Fong, K. P.; King, M. R.; Brass, L. F.; Hammer, D. A. Differential dynamics of platelet contact and spreading. *Biophys. J.* **2012**, *102*, 472–482.

(30) Klein, K.; Maier, T.; Hirschfeld-Warneken, V. C.; Spatz, J. P. Marker-free phenotyping of tumor cells by fractal analysis of reflection

interference contrast microscopy images. *Nano Lett.* **2013**, *13*, 5474–5479.

(31) Monzel, C.; Becker, A. S.; Saffrich, R.; Wuchter, P.; Eckstein, V.; Ho, A. D.; Tanaka, M. Dynamic cellular phenotyping defines specific mobilization mechanisms of human hematopoietic stem and progenitor cells induced by SDF1 α versus synthetic agents. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1841.

(32) Pierres, A.; Eymeric, P.; Baloché, E.; Touchard, D.; Benoliel, A.-M.; Bongrand, P. Cell membrane alignment along adhesive surfaces: contribution of active and passive cell processes. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 2058–2070.

(33) Zidovska, A.; Sackmann, E. Brownian motion of nucleated cell envelopes impedes adhesion. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 048103.

(34) Pierres, A.; Benoliel, A.-M.; Touchard, D.; Bongrand, P. How cells tiptoe on adhesive surfaces before sticking. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 4114–4122.

(35) Munding, T. A.; Sommerfeld, A.; Reinehr, R.; Spatz, J. P.; Häussinger, D.; Boehm, H. Investigating cell-ECM contact changes in response to hypoosmotic stimulation of hepatocytes in vivo with DW-RICM. *PLoS One* **2012**, *7*, e48100.

(36) Biswas, A.; Alex, A.; Sinha, B. Mapping cell membrane fluctuations reveals their active regulation and transient heterogeneities. *Biophys. J.* **2017**, *113*, 1768–1781.

(37) Sengupta, K.; Aranda-Espinoza, H.; Smith, L.; Janmey, P.; Hammer, D. Spreading of neutrophils: from activation to migration. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4638–4648.

(38) Gingell, D.; Todd, I. Interference reflection microscopy. A quantitative theory for image interpretation and its application to cell-substratum separation measurement. *Biophys. J.* **1979**, *26*, 507–526.

(39) Wiegand, G.; Jaworek, T.; Wegner, G.; Sackmann, E. Studies of Structure and Local Wetting Properties on Heterogeneous, Micro-patterned Solid Surfaces by Microinterferometry. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *196*, 299–312.

(40) Limozin, L.; Sengupta, K. Modulation of vesicle adhesion and spreading kinetics by hyaluronan cushions. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 3300–3313.

(41) Schilling, J.; Sengupta, K.; Goennenwein, S.; Bausch, A. R.; Sackmann, E. Absolute interfacial distance measurements by dual-wavelength reflection interference contrast microscopy. *Phys. Rev. E* **2004**, *69*, 021901.

(42) Sengupta, K.; Limozin, L. Adhesion of soft membranes controlled by tension and interfacial polymers. *Phys. Rev. Lett.* **2010**, *104*, 088101.

(43) Schindelin, J.; et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682.

(44) Toma, K.; Kano, H.; Offenhäusser, A. Label-free measurement of cell-electrode cleft gap distance with high spatial resolution surface plasmon microscopy. *ACS Nano* **2014**, *8*, 12612–12619.

6. Méthodologie : Mesures mécaniques en AFM, Module de Young et tension membranaire

Au cours de ce travail de thèse, l'utilisation de l'AFM en mode force, en particulier pour évaluer les propriétés mécaniques de cellules adhérees a été central. Cela m'a permis de participer à des études satellites à mon sujet principal, l'activation T sous force, en collaborant avec des personnes extérieures au laboratoire (par ex. N. Bardin, du laboratoire d'immunologie de l'hôpital de la conception, autour d'une thématique « caténine »). Ces collaborations sont encore en cours.

Cela m'a permis de mettre en place des protocoles détaillés permettant de réaliser de manière standardisée des mesures mécaniques, mais aussi des procédures de traitement de données permettant de s'affranchir de biais possibles dus, majoritairement, à l'évolution au cours du temps de l'état des cellules, afin de pouvoir obtenir des données représentatives de populations de cellules.

Nous en avons tiré, dans le cadre d'une collaboration avec P. Legembre (Inserm, Rennes) autour du rôle de CD95L clivé dans la mécanique de cellules modèles de tumeurs du sein, une publication qui résume les étapes cruciales des expériences et des traitements des courbes de force, pour mesurer le module élastique de cellules adhérees, par indentation par AFM, et pour mesurer la tension de la membrane ou du complexe membrane/cortex d'actine par traction de tubes de membrane à l'aide de leviers décorés par des molécules adhésives. Les tubes de membranes correspondent à de petites structures composées uniquement de membrane plasmique sur laquelle on tire et dont la forme lors de la traction évoque un tube.

CD95 (Fas) est une protéine transmembranaire appartenant à la famille du récepteur du TNF, et est impliquée dans le processus de mort par apoptose de cellules mais aussi de lymphocytes T humaines activées. Le signal de mort cellulaire peut être induit par des anticorps anti-Fas ou par le ligand CD95L (Fas-L), appartenant à la famille du TNF. Ces deux molécules sont impliquées dans la carcinogénèse. Après le clivage par des métalloprotéases, CD95L (cl-CD95L pour cleaved CD95L) ne conduit plus à la mort cellulaire mais induit une migration des cellules cancéreuses et des cellules T activées (249). De plus, il a été montré que cette modification pouvait entraîner des changements des propriétés biophysiques de la membrane plasmique en augmentant sa fluidité et donc en modifiant sa diffusion (250).

Résultats

Cet article / protocole est présenté ci-après

Article: Quantifying CD95/c1-CD95L implications in cell mechanics & membrane tension by atomic force microscopy based force measurements Sadoun A, Puech PH. *Methods Mol Biol.* 2017;1557:139-151.

Quantifying CD95/cl-CD95L Implications in Cell Mechanics and Membrane Tension by Atomic Force Microscopy Based Force Measurements

Anaïs Sadoun, Pierre-Henri Puech

► **To cite this version:**

Anaïs Sadoun, Pierre-Henri Puech. Quantifying CD95/cl-CD95L Implications in Cell Mechanics and Membrane Tension by Atomic Force Microscopy Based Force Measurements. Patrick Legembre. CD95 Methods and Protocols, 70, Springer, pp.139-151, 2017, 978-1-4939-6778-0. <10.1007/978-1-4939-6780-3_14>. <hal-01530854>

HAL Id: hal-01530854

<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01530854>

Submitted on 31 May 2017

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

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

Quantifying CD95/cl-CD95L implications in cell mechanics & membrane tension by atomic force microscopy based force measurements

Anaïs Sadoun, Pierre-Henri Puech*

¹Aix Marseille Université, LAI UM 61, Marseille, F-13288, France.

²Inserm, UMR_S 1067, Marseille, F-13288, France.

³CNRS, UMR 7333, Marseille, F-13288, France.

* Email : pierre-henri.puech@inserm.fr

Summary

Atomic Force Microscopy (AFM) is an invaluable tool to investigate the structure of biological material surfaces by imaging them at nanometer scale in physiological conditions. It can also be used to measure the forces and mechanics from single molecule interaction to cell / cell adhesion. Here, we present a methodology that allows to quantify cell elastic properties (using the Young modulus) and cell membrane tension modulated by CD95/cl-CD95L interactions by coupling nanoindentation and membrane tube pulling using suitably decorated AFM levers.

Keywords

Atomic Force Microscopy, elasticity, Young modulus, membrane tubes, membrane tension, cytoskeleton.

Introduction

CD95L (FasL) is a potent apoptosis inducing factor through its ligation to CD95 (Fas) and has been implicated in carcinogenesis ¹. After cleavage via metalloproteases, CD95L (designated cl-CD95L for cleaved-CD95L) is no more leading to cell death but has been shown to induce migration phenotype in cancer cells and activated T cells ². Recently, this cleaved ligand was shown to augment plasma membrane fluidity ³, similarly to what happens during epithelial to mesenchymal transition (EMT), and is an instrumental step in allowing cell migration. Such a physical parameter of cell membrane has been linked to prognosis of cancer ⁴. Several characterisations of membrane physical properties, such as diffusive capabilities linked to their structure ⁵ or mechanical properties such as their elasticity ⁶ or their tension ⁷ have been performed over the last decades and have been linked to crucial modifications of cell function, such as trafficking, cell spreading or migration ⁸. Recently, cell tension has been elegantly studied in the context of EMT ⁹. To our knowledge, characterizing membrane tension in relation with CD95/cl-CD95L has never been performed. We propose here a protocol using Atomic Force Microscopy in force mode that allows us to measure cell elasticity and membrane tension, while stimulating cells with cl-CD95L.

The atomic force microscope (AFM), coming from a material science and physics background, was invented in the 80's ¹⁰, is a member of the scanning probe family of microscopes. It has found use in biology by allowing biologists to image the topography of biological surfaces with nanometer vertical and lateral resolution, using a sharp tip at the end of a soft cantilever to delineate the surface. This high resolution imaging in three dimensions requires little or no treatment (fixation is not mandatory) and can be performed under physiologically-relevant conditions (in liquid medium, at 37°C) ¹¹. In addition, AFM - force mode (so called « force spectroscopy ») has been developed over the years as a sensitive force measuring technique, able to detect or exert forces in the pN to nN range ^{12,13}, the soft lever being used as a spring which deformation reports the forces exerted at its extremity.

To probe cell mechanics, at single cell scale, several techniques have been developed to monitor either the local or the global mechanics over the last decades, such as micropipette aspiration ¹⁴ and indentation ¹⁵, optical tweezers ⁸, microplaques ¹⁶ and AFM. AFM has proved to be one of the most versatile techniques, allowing to obtain mechanical data from pressing on the biological substrate, either locally ¹⁷ or globally ¹⁸, and from pulling on the cell's membrane ^{19,20}. Several variants have been proposed, allowing to dissect viscoelastic regimes of cell mechanics ^{21,22} and even recently to couple

mechanical measurements with topographical imaging ²³

We describe here a methodology which enables to measure modulations of living cell mechanical properties coming from the interaction between CD95 and cl-CD95L, and to do this at two levels : on both the elastic behaviour, via their Young modulus, and their membrane tension. This uses AFM force mode with decorated, “sticky” levers. Pressing a lever which tip has a known shape allows to measure the Young modulus of the cell (the lower the softer the sample) ²⁴ ; pulling the very same lever eventually allows the extraction of a tube, and the force needed to extract it is related to the local tension of the cell membrane ^{9,20}. Discussion about data processing is also presented.

Chemicals and biological reactives

- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (Carl Roth GmbH 9105.3)
- Concanavalin A (Sigma, #C2272)
- DMEM (Gibco) 41966-029
- Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, #10270)
- Geneticin (Gibco, #10131)
- Helmanex (Helma)
- L-glutamine (Gibco, #25030)
- Phosphate-buffered saline (PBS) without Ca²⁺, Mg²⁺ (Gibco, #14190094)
- Puromycin (Sigma): P8833-10mg
- Trypsin-EDTA (0.5%) (Gibco, #25300), alternatively Accutase (PAA L11-007)

Material

- Atomic Force Microscope, preferentially coupled to an optical microscopeⁱ
- AFM levers (MLCT-UC, Brucker Instruments or other soft ($k < 60\text{pN/nm}$ preferentially) onesⁱⁱ)
- Cell culture pipettes and flasks
- Glass bottom petri dishes (WPI Instruments, Fluorodish FD-100)
- MilliQ water (Millipore)
- Micropipette systems (Gibson or else)
- Steritop filter units (500 ml) (Millipore, #SCGP U01 RE)
- Vacuum grease

Procedures

Cell culture

Cell culture medium : Prepare sterile DMEM 8% FBS 2mM L-glutamine. Store at 4°C and let warm gently at room temperature before use under the culture hood or for AFM experiments.

Cells lines : Epithelial cell lines MDA-MB-231 (ATCC, ²⁵) and BT 549 (ATCC, ²⁶) were obtained from P. Legembre's lab (Rennes, France) as cultures sent by DHL delivery system. On reception, medium was removed and fresh complete medium added. Cells were let to recover for at least one day before being passaged for the first time. Usually, only the third passage was used for the first experiments. Protocols were adapted to fit the closest possible the ones from P. Legembre's lab.

Cell passaging : the generation time is around 48hrs and are passaged 3 times a week using Trypsin/EDTA (1 min @ 37°C ; quenched with FBS supplemented medium ; centrifugation 5min @ 1000 rpm @ RT), with 80 % confluent cell layers as assessed by microscopic observationⁱⁱⁱ.

Cell deposition on glass bottom petri dish

The goal is to have well adherent, spread and separated cells to be able to test as many single cells in a sample as possible over the time course of the experiment (typically 1hr) before replacement of the sample and/or lever.

The day before the experiment :

1. Recover cells from culture flasks by using short (~ 1min @ 37°C) Trypsin / EDTA treatment, quenching Trypsin with FBS supplemented medium, centrifugation (1000 rpm, 5 min, RT) and dilution in culture medium.
2. Seed a small volume of cells (typically 250µL) the day before the experiment, in culture medium, on sterile glass bottom 35mm petri dishes filled with 3mL of culture medium.^{iv}
3. Let the cells adhere and spread over night at 37 °C under controlled CO₂ atmosphere

The day of the experiment :

1. Assess spreading and density of the cells by bright field microscopy.
2. Prior to experiment, rinse the petri dish three times with fresh medium, at ambient temperature

to minimize thermal adaptation of the AFM lever and remove unbound cells and floating debris if any.

3. Mount the Petri dish in a proper holder (here, the JPK Petri dish Holder) and set, if needed, the temperature to the one needed ^v. To increase mechanical stability, use thin layers of vacuum grease to ensure a tight fitting of the Petri dish to the holder.
4. Install the sample onto the microscope. Focus on the cells and find a place where cells are numerous, but also well separated, with a bare zone where the lever calibration will be performed (see below).

Cantilever functionalization

Following published protocols, clean, gold less with pyramidal tip cantilevers^{vi} were functionalized by adsorbing a lectin onto it^{vii}.

1. Clean cantilevers were activated by a 1min exposure to residual air plasma.
2. Dip them immediately in a solution of either conA or WGA for at least an hour^{viii}
3. Gently rinse them by agitation in PBS1x without Ca⁺⁺/Mg⁺⁺.
4. Use them immediately or store them in sterile PBS, at 4°C for maximum 3-4 days.

Cantilever mounting, calibrating and setting

This part is dependent on the precise AFM hardware used. The present directions are for JPK Instruments NanoWizard.

First, prepare the lever and its holder.

1. Clean the glass block (cantilever holder) by gently rubbing it with a Q-tip soaked in Helmanex / water solution
2. Rinse it by flushing ethanol and MQ water alternatively, at least three times, and finishing by water. Dry it rapidly and carefully under a stream of azote or air.
3. Mount the cantilever, keeping it wet, and adjust the fixation so that it will be held strongly on the glass block ^{ix}.

4. Set the holder onto the AFM head or module.

Second, set the sample in place (see section *Measurements* below) and rapidly process to the first steps that follow.

1. Introduce the lever / holder into the sample and check that it is properly dipping into the medium.
2. Focus the laser onto the lever's back, eg. using the inverted microscope's camera ^x and set it to have the maximal sum signal on the QPD.
3. Let the system reach a thermal equilibrium for 5 to 10 min, depending on the temperature difference between the room and the medium.
4. Engage, with a moderate force, the lever onto a bare zone of the sample, and take several force curves with a relatively high setpoint in order to get a linear curve in the contact region.^{xi}
5. Fit the contact region with a line to get the sensitivity of the set-up. Average over at least three independent force curves.
6. Retract the lever at least 100 μ m from the surface and record the oscillations of the lever under brownian motion. Analyse the spectrum to get the spring constant following ³⁰
7. Set the force measurement parameters : maximal pressing force, force curve length, speed of pressing and pulling, contact and recovery times, acquisition frequency. Typical values are, respectively, 100-250pN, 5 μ m, 2 μ m/s, 2 μ m/s, 0.1-1s, 0-5s, 2048Hz. Increasing the contact time and the contact force are intuitively linked to the increase in the probability of having binding, hence to be able to extract a tube ^{xii}. Set them to the desired values.

Measurements

1. Incubate the sample either with cl-CD95L (100ng/mL final concentration) or control molecule (eg. pcDNA3, at same dilution), or carrier medium for at least 30 min before starting the experiment. Exchange the medium for perturbator free medium if needed. Then proceed to the introduction of the lever / holder in the sample (see above). ^{xiii}
2. Choose a cell and bring it close to the lever position.
3. Capture a video micrograph of the cell of interest

4. Re-engage the lever before moving it above the desired cell or cell part (nucleus, lamellipodia – see Fig. 1).
5. Record several force curves per cell, before moving the lever away from the cell. The crucial parameters to keep constant and/or adjust are the contact time, the contact force and the speeds of pressing and pulling ^{xiv}.
6. Capture a second video micrograph of the cell of interest to document any morphological change during the experiment.
7. Repeat steps 1-7 up to 25 cells or 1h30 (typically) of experiment, before changing sample and/lever^{xv}

At this stage, two possibilities exist for comparing conditions : (A) separate experiments, with control conditions and desired sample ; (B) coupled experiments, with the same sample, with added soluble perturbation (here cl-CD95L). In the case (A), repeat the previous procedure with every sample. The case (B) is detailed below.

1. Start the experiment following the above procedure with an unperturbed sample.
2. Perform measurements on a limited set of cells for 45 min
3. Remove the head of the AFM or use sample holder side ports to introduce cl-CD95L (or control condition, eg. control pcDNA) to the desired final concentration, and wait several minutes to let it diffuse to uniform concentration above the sample.
4. Start again the measurements, either taking the first cells at hand or trying to find back the very same cells that were used in step 1. Each way will have profound impact on the statistical way to process the data and on the interpretation of the data.

A variant of (B) allows theoretically to have a kinetics, on a single cell, of the perturbation. For this, a high frequency of tube pulling may be required, increasing per se the risks of damaging the cell and/or introducing artifacts.

If needed (see below), to obtain data decoupling the membrane from the cytoskeleton, experiments have to be reproduced with samples pre-treated with small amounts of Latrunculin A following ^{19,20}

A short description on data processing

From the force curves, as shown on Fig. 1D, E, one can extract two physical parameters.

Young modulus

From the pushing part of the curve, the Young modulus (E , in Pa) that represent the elasticity of the cell (the stiffer the cell, the higher its value) can be extracted from a fit, using a Hertz-like model, taking into account the shape of the indenter. As an example, for a pyramidal, square-based indenter of half angle to the faces α , the relation between force, F , and indentation, δ follows

$$F = 0.7453 E \tan(\alpha) \delta^2 / (1 - \nu^2) \quad (33, \text{ as used in the JPK-DP processing software (JPK Instruments).}$$

The Poisson ratio, ν , is usually set to 0.5, which means that the cell is considered as non compressible.^{xvi}

The indentation is $(h - h_0) - (z - z_0)$ where h is the piezo displacement and z the deflection of the lever. « 0 » indexes represent the offsets in height and force. This is equivalent to the tip-sample separation as presented on Fig. 2. Care has to be given to find the correct position of the contact point that is the point where the tip touches the cell, ie. where the force starts to be non null ³⁴.

Moreover, E can vary with the pressing speed, as an indication of the visco-elasticity of the cell, so experiments (and controls) have to be performed keeping this parameter constant as much as possible.

Typical values of E for eukaryotic cells are found in the range 10Pa -10kPa.

A schematics of the principal steps of processing the pushing curve is presented on Fig. 2. They can be either included in homemade programs (eg. in Python, R, Igor Pro, C/C++ or Matlab) or used through AFM manufacturer software solutions (eg. here, JPK-DP software).

Membrane tension

Membrane tension can be accessed through the force needed to extract a tube from the cell. As exemplified on Fig. 3, a membrane tube pulling event is characterized by the presence of a plateau preceding the rupture event (corresponding to the rupture / detachment of the tube from the tip of the lever). The measurement of the length (often set as $> 100\text{nm}$ for a tube) and slope of the plateau (~ 0 pN/ μm for a tube), together with the plateau force, can be done using homemade programs (eg. in Python, R, Igor Pro, C/C++ or Matlab) or through AFM manufacturer software solutions (eg. JPK-DP software).

Care has to be given to use only force curves where one force step is present or to use the last force step having the right characteristics to ensure that the recorded forces are corresponding to tube pulling ³⁵. Usually, the fraction of curves where a tube is observed is kept below 30 % to do so.

The force of the pulling event itself represents a direct evaluation of the tension. If a tension value is needed, one can convert this force, f , to an apparent tension, T , by using the approximation $f = 2\pi(2T\kappa)^{1/2}$ where κ is the membrane bending rigidity ($\sim 2 - 3 \times 10^{-19}$ Nm) ³⁶. Depending on the variation of f as a function of the pulling speed (see note *xiii*), more complex models can be applied ²⁰.

Aside, T calculated using the previous way on unperturbed cells is an apparent tension since it contains the contributions of the membrane, σ , and of the anchorage of the membrane to the cytoskeleton, W_0 . A simple approach is to consider that $T = \sigma + W_0$, and obtain values of σ by performing experiments where the membrane / cytoskeleton interactions are removed (ie. where $W_0 = 0$). ²⁰.

Typical values of f , resp. T , for eukaryotic cells are found in the range 10-100pN, resp. 10-100 μ N/m.

Statistical representation & tests

In order to present the data, several options are available, depending on what is the source of variation that one wants to investigate. The simplest way is to have, per condition, one scatter plot of the tether force or tension. Then, depending on the shape of the point cloud and its symmetry, one can choose to present central tendencies by using whisker-plot (for non gaussian data) or mean +/- SD (or SEM) (for gaussian data). This representation guides the statistical tests that have to be performed to compare samples, eg. for two data sets (positive vs. control), either Wilcoxon or Student test, respectively. If the data is paired (eg. Same cell tested under two conditions), this can lead to a « before / after » plot, where the tendency over a population is seen through direct links between individuals. Tests have to be modified accordingly to the data pairing. Some softwares may guide the user through the choice of the proper test (eg. GraphPad Prism, or BioStaTGV – an online application ³⁷). Representations and tests can be standardized and automatized by using scripting languages (eg. R, Python, IgorPro, MatLab).

The previous presentation hides in fact one complexity : what does each point represents ? One tether ? The average over all tethers measured on one cell ? The average over the cells of a given sample ? This is left to the choice of the experimentalist but has to be specified in order to clarify from where the

measurements dispersion is coming from and what is represented by the data : cell type (here MDA vs. BT cells) or condition (BT with cFasL vs. BT cells with pcDNA3). Choosing to represent the average tension per cell, we observed a slight decrease of the mean apparent tension when cl-CD95L was incubated at 100ng/mL with MDA cells as compared to pcDNA3. The same behaviour was observed for BT cells (PHP, unpublished data).

Aside of these classical « 1D » representation, some authors proposed to use more complex, « 2D » maps of tether force vs. tether length to visualize subpopulations of events ³⁵

Figures and captions

Figure 1 : Using AFM force curves to investigate cell mechanics. **A** Top view micrograph of a gold less cantilever tip positioned above the nucleus zone of a fibroblast cell that is adhered to a glass bottom petri dish. The pyramidal tip can be seen. **B, C** Schematics of the experiments, in side view, with respectively, pressing on the cell to indent it and pulling on the membrane to extract a nanotube. **D, E** Typical couple of force curves, light red for B (ie. pressing) and dark red for C (ie. pulling), obtained successively. Note that D and E are presenting the same curves, the only difference being that we highlighted, on D, the fitted zone for extracting elastic measurements (Young modulus) via the application of a Hertz-like model, and, on E, the zone where the measure of the tube extraction force is performed, which is directly linked to the membrane tension. The morphology of the curve, showing a clear step-like, is the signature of the presence of a tube.

Fig 2 : Minimal sequence of data processing for mechanical measurements using the pressing part of the AFM force curves. Note that the important step is the calculation of the tip sample separation (third graph) that corresponds to the real indentation by correcting the piezo motion from the cantilever deflection. One has to be careful to check that the determination of the contact point, when fitting, is correct since errors in the Young values. Greyed zones are the selections for an automatic detection of the baseline and application of the Hertz/Sneddon fit by the JPK-DP software. Typical Young modulus for cells depend on spreading state, cell type and health. They are found, for the present cells, in the range 100 Pa – 1kPa

Fig 3 : Typical pulling parts of the AFM force curves. Only unfrequently tubes are pulled (20-30 % of the force curves). The main population of force curves exhibit either no interaction or adhesive events. Those latter have a non null slope before the force jump. On the last graph the presence of an adhesive jump before the pulling of the tube can be seen, that translates into a large and clear force plateau. In green, average curves by using a running average box of 20 points. In grey, linear fit of the force curve in the region before the force jump, showing a high slope for adhesive events and a null one for tether pulling. Typical forces for tube pulling are found for the present cells between 25 and 75pN, resulting in apparent tensions between 20 and 400 μ N/m. Greyed zones are the selections for an automatic detection of the force jumps and slopes by the JPK-DP software.

Aknowledgments

Funding : PhysCancer « H⁺-cancer » (to L. Counillon & PHP). InCa PLBiol 2014 (to P. Legembre & PHP). Labex INFORM (ANR-11-LABX-0054) and A*MIDEX project (ANR-11-IDEX-0001-02), funded by the « Investissements d'Avenir » French Government program managed by the French National Research Agency (ANR) (to Inserm U1067 Lab and as PhD grant to AS).

Providing material or technical help : M. Biarnes-Pelicot (U1067, Marseille), L. Counillon (Nice), A. Fouqué & P. Legembre (Rennes).

Discussions and comments on the manuscript : L. Limozin (U1067, Marseille), L. Counillon (Univ. Nice) & P. Legembre (Rennes).

Platforms : cell culture platform “PCC” (Luminy Campus, Marseille) – L. Borge

Companies : JPK Instruments (Berlin, Germany) for continuous support and generous help.

References

1. Fouqué, A., Debure, L. & Legembre, P. The CD95/CD95L signaling pathway: A role in carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1846**, 130–141 (2014).
2. Tazuin, S. *et al.* The naturally processed CD95L elicits a c-yes/calcium/PI3K-driven cell migration pathway. *PLoS Biol.* **9**, e1001090 (2011).
3. Edmond, V. *et al.* Downregulation of ceramide synthase-6 during epithelial-to-mesenchymal transition reduces plasma membrane fluidity and cancer cell motility. *Oncogene* **34**, 996–1005 (2015).
4. Sok, M., Sentjurc, M., Schara, M., Stare, J. & Rott, T. Cell membrane fluidity and prognosis of lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* **73**, 1567–1571 (2002).
5. Billaudeau, C. *et al.* Probing the plasma membrane organization in living cells by spot variation fluorescence correlation spectroscopy. *Methods Enzymol.* **519**, 277–302 (2013).
6. Picas, L., Rico, F., Deforet, M. & Scheuring, S. Structural and mechanical heterogeneity of the erythrocyte membrane reveals hallmarks of membrane stability. *ACS Nano* **7**, 1054–1063 (2013).
7. Gauthier, N. C., Masters, T. A. & Sheetz, M. P. Mechanical feedback between membrane tension and dynamics. *Trends Cell Biol.* **22**, 527–535 (2012).
8. Masters, T. A., Pontes, B., Viasnoff, V., Li, Y. & Gauthier, N. C. Plasma membrane tension orchestrates membrane trafficking, cytoskeletal remodeling, and biochemical signaling during phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 11875–11880 (2013).
9. Schneider, D. *et al.* Tension monitoring during epithelial-to-mesenchymal transition links the switch of phenotype to expression of moesin and cadherins in NMuMG cells. *PLoS One* **8**, e80068 (2013).
10. Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930–933 (1986).
11. Franz, C. M. & Puech, P.-H. Atomic Force Microscopy: A Versatile Tool for Studying Cell Morphology, Adhesion and Mechanics. *Cell. Mol. Bioeng.* **1**, 289–300 (2008).
12. Helenius, J., Heisenberg, C.-P., Gaub, H. E. & Muller, D. J. Single-cell force spectroscopy. *J. Cell Sci.* **121**, 1785–1791 (2008).
13. Dufrière, Y. F. *et al.* Five challenges to bringing single-molecule force spectroscopy into living cells. *Nat. Methods* **8**,

123–127 (2011).

14. Richelme, F., Benoliel, A. M. & Bongrand, P. Dynamic study of cell mechanical and structural responses to rapid changes of calcium level. *Cell Motil. Cytoskeleton* **45**, 93–105 (2000).
15. Guillou, L., Babataheri, A., Puech, P.-H., Barakat, A. I. & Husson, J. Dynamic monitoring of cell mechanical properties using profile microindentation. *Sci. Rep.* **6**, 21529 (2016).
16. Bui, N. *et al.* Human Primary Immune Cells Exhibit Distinct Mechanical Properties that Are Modified by Inflammation. *Biophys. J.* **108**, 2181–2190 (2015).
17. Rigato, A., Rico, F., Eghiaian, F., Piel, M. & Scheuring, S. Atomic Force Microscopy Mechanical Mapping of Micropatterned Cells Shows Adhesion Geometry-Dependent Mechanical Response on Local and Global Scales. *ACS Nano* **9**, 5846–5856 (2015).
18. Krieg, M. *et al.* Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish. *Nat. Cell Biol.* **10**, 429–436 (2008).
19. Krieg, M., Dunn, A. R. & Goodman, M. B. Mechanical control of the sense of touch by β -spectrin. *Nat. Cell Biol.* **16**, 224–233 (2014).
20. Diz-Muñoz, A. *et al.* Control of directed cell migration in vivo by membrane-to-cortex attachment. *PLoS Biol.* **8**, e1000544 (2010).
21. Wu, H. W., Kuhn, T. & Moy, V. T. Mechanical properties of L929 cells measured by atomic force microscopy: effects of anticytoskeletal drugs and membrane crosslinking. *Scanning* **20**, 389–397 (1998).
22. Alcaraz, J. *et al.* Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **84**, 2071–2079 (2003).
23. Eghiaian, F., Rigato, A. & Scheuring, S. Structural, mechanical, and dynamical variability of the actin cortex in living cells. *Biophys. J.* **108**, 1330–1340 (2015).
24. Cazaux, S. *et al.* Synchronizing atomic force microscopy force mode and fluorescence microscopy in real time for immune cell stimulation and activation studies. *Ultramicroscopy* **160**, 168–181 (2016).
25. MDA-MB-231 ATCC® HTB-26™ Homo sapiens mammary gland/breast. Available at: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx>. (Accessed: 5th April 2016)
26. BT-549 ATCC® HTB-122™ Homo sapiens mammary gland; breast d. Available at: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-122.aspx?geo_country=fr. (Accessed: 5th April 2016)

27. Puech, P.-H. *et al.* Measuring cell adhesion forces of primary gastrulating cells from zebrafish using atomic force microscopy. *J. Cell Sci.* **118**, 4199–4206 (2005).
28. Ulrich, F. *et al.* Wnt11 functions in gastrulation by controlling cell cohesion through Rab5c and E-cadherin. *Dev. Cell* **9**, 555–564 (2005).
29. Evans, E. & Kinoshita, K. Using force to probe single-molecule receptor-cytoskeletal anchoring beneath the surface of a living cell. *Methods Cell Biol.* **83**, 373–396 (2007).
30. Butt, H.-J. & Jaschke, M. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology* **6**, 1 (1995).
31. Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K. & Evans, E. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature* **397**, 50–53 (1999).
32. Brochard-Wyart, F., Borghi, N., Cuvelier, D. & Nassoy, P. Hydrodynamic narrowing of tubes extruded from cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7660–7663 (2006).
33. Bilodeau, G. Regular Pyramid Punch Problem. *J. Appl. Mech.-Trans. Asme* **59**, 519–523 (1992).
34. Crick, S. L. & Yin, F. C.-P. Assessing micromechanical properties of cells with atomic force microscopy: importance of the contact point. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **6**, 199–210 (2007).
35. Sariisik, E. *et al.* Decoding Cytoskeleton-Anchored and Non-Anchored Receptors from Single-Cell Adhesion Force Data. *Biophys. J.* **109**, 1330–1333 (2015).
36. Hochmuth, F. M., Shao, J. Y., Dai, J. & Sheetz, M. P. Deformation and flow of membrane into tethers extracted from neuronal growth cones. *Biophys. J.* **70**, 358–69 (1996).
37. BiostaTGV - Statistiques en ligne. Available at: <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>. (Accessed: 30th March 2016)

Figure 1

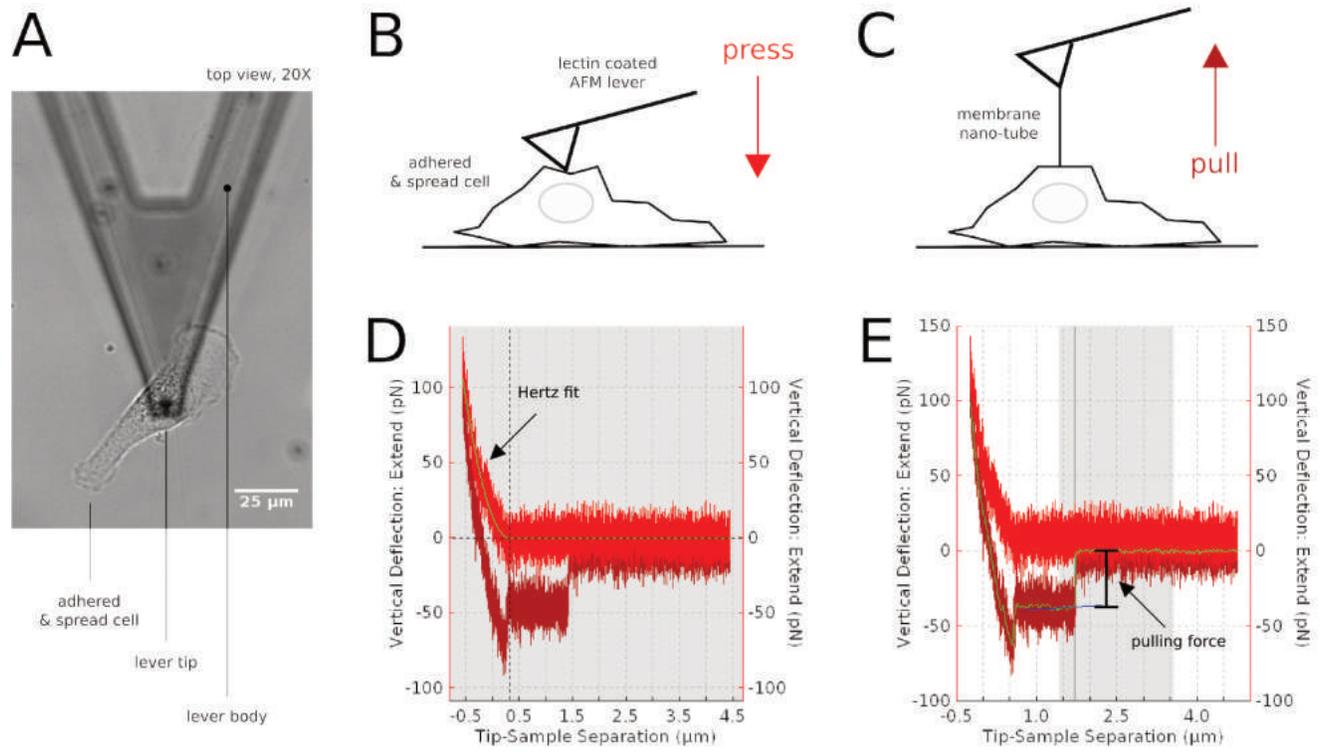


Figure 2

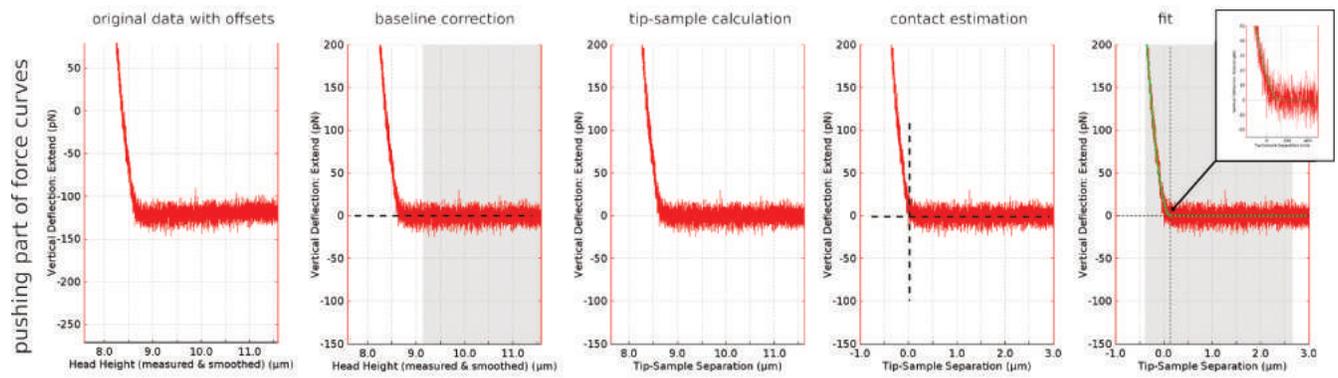
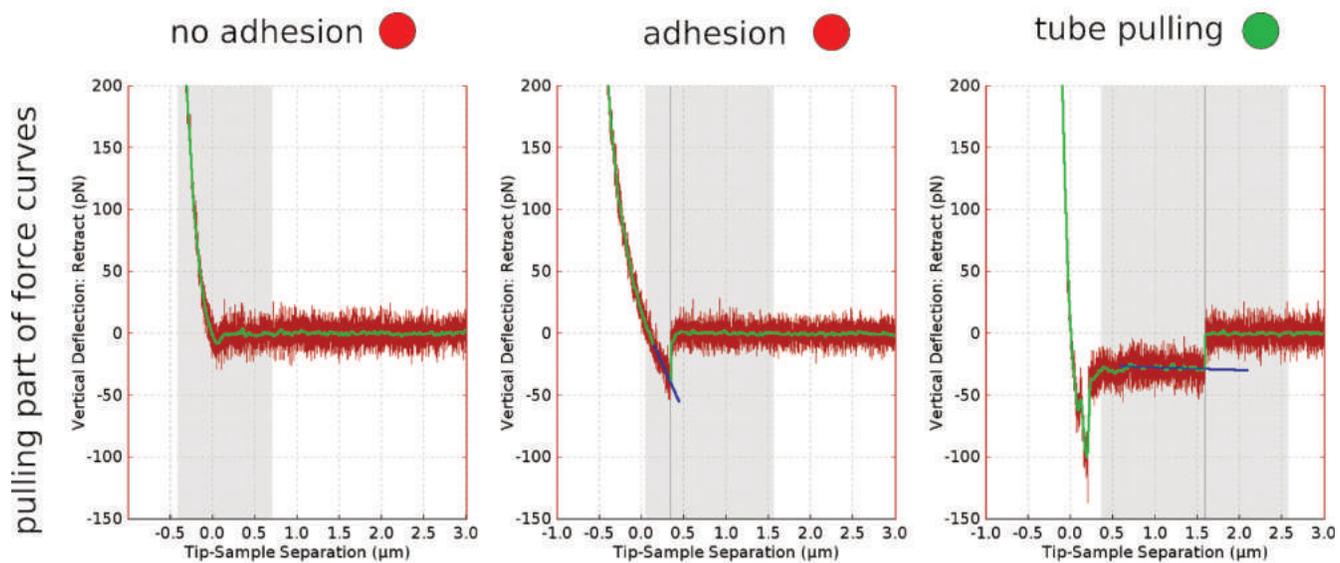


Figure 3



Notes

- i The present protocol has been performed using a JPK Nanowizard I (JPK Instrument, Germany) mounted on an Axiovert 200 inverted microscope (Zeiss), equipped with 10x, 20x and 40x lenses, coupled to a Colibri 2 diodes system (Zeiss) with suitable filter sets for fluorescence microscopy²⁴. This protocol may require some adaptation to be used with other AFM brands, but stays globally the same as long as the AFM sits on an inverted microscope.
- ii Another type of lever that can be used is MicroBiolever from Olympus (6 pN/nm)¹⁹.
- iii Mycoplasma absence was verified once a month using culture supernatants following a procedure of the cell culture platform (Mycoalert, Lonza).
- iv Cell concentration and seeding volume were adjusted so that cells are mainly found, after 24hrs of culture, separated one from the other, in order to allow for single cell measurement.
- v Here, the experiments are performed at room temperature. Temperature can be set and / or varied using adapted equipments such as PetriDish Holder (JPK Instruments) or homemade environmental chambers.
- vi Gold-less cantilevers are more stable over time (the force baseline is better) and they are more transparent than regular levers²⁴. The latter point eases the positioning the very tip of the lever onto a given part of a cell (see figure : the pyramidal tip is the darker point at the extremity of the V shape lever)
- vii Variation of the proposed protocol involves the adsorption of a first biotinylated BSA layer, then streptavidin and finally, the coupling of a biotinylated lectin. This ensures that the lectin is less likely to desorb over the time course of the experiment and that it is preferentially oriented (see^{11,18,27,28}).
- viii The molecule used to decorate the tip depends on the choice of the experimentalist to pull in a non differentiated manner on the membrane by « fishing » any sugar residues using lectins rather than pulling on specific linker eg. by using a dedicated antibody or hapten (fibronectin or RGD, or collagen, peptide to target certain classes of integrin, ...). For an example of specific tube pulling, see²⁹.
- ix Do not forget to center it properly. This ensures that the relative motion of the lever and the sample will be large and easy, and also it helps to rapidly focus the laser on the lever back from experiment to experiment, by keeping an almost constant lever position.
- x Be careful not to block the laser light by using inappropriate fluorescence filters. For the JPK Instrument set-up, the laser is infrared, so it can be detected by a CCD camera when no filter is present.
- xi Do not let the lever interact for a long time with the substrate in order to keep its coating intact .
- xii Tip to cell interactions may be modulated by the presence of divalent cations in the culture medium. Sometimes, the presence of a low level of albumin or serum may also help to modulate the interaction, by suppressing non specific interactions.
- xiii It may be needed to check rapidly that the calibration parameters did not change when moving the lever out of the sample. In particular, the sum signal should not change.
- xiv It has been long shown that molecular rupture forces are dependant on the local loading rate³¹, so retraction speed has to be kept constant. It can be varied to do more complex measurements^{19,20,32}
- xv The lever « efficiency » for pulling tube may decrease over time and force to slightly adapt the force and time parameters of the experiments. This may be due to the loss of antibody when only adsorbed at the lever tip surface, where their number is small due to the reduced size of the tip's end. Another possibility that may account for this diminished efficiency is the potential pollution of the tip by cell's material or debris eg. residues of membrane. To reduce this uncertainty, in particular in the case of taking numerous (>25) force curves per cell, we recommend to limit both the number of curves per cell and the number of cells per experiment, to respectively, typically 10 per cell and 15 per sample, and to increase statistics by multiplying the number of separate experiments (separate sample and separate lever), taking into account the variability coming from lever to lever as well as sample to sample.
- xvi This model can be considered as valid here since the adhesion is kept at low level and rather infrequent. If adhesion is large, other physical models, taking into account the fact that the work of adhesion may participate in the deformation, such as JKR or DMT models, have to be considered.

VI. Perspectives et conclusions

Lors de ce travail de thèse – qui se situe à l’interface de la biophysique et de l’immunologie – nous avons tenté de standardiser le plus d’étapes possibles, qu’elles proviennent de la partie plus physique ou plus biologique de nos approches. Cela s’est très rapidement manifesté au cours de travail et en a représenté une partie importante, en temps et en efforts expérimentaux. Le fait de vouloir étudier l’activation des cellules T sous force en cellule unique a amené plusieurs challenges :

- Le couplage de la microscopie à force atomique avec la microscopie à fluorescence qui nous a permis de mettre en évidence l’existence de signaux « parasites » lors de l’utilisation de 3 longueurs d’onde dans le visible. Ces effets sont notamment de plus grande amplitude sur des cantilevers recouverts d’or (chapitre 5 section 1 page 113). Sachant que nous voulions observer et enregistrer l’activation T via la fluorescence nous avons dû utiliser des cantilevers sans or qui se sont révélées être très avantageux. Les signaux parasites, alors de moindre amplitude sur ces cantilevers, ont été utilisés comme timer. D’une part, la transparence des cantilevers a facilité le placement d’une bille (chapitre 5 section 2 et 3 page 123 et 149) ou d’une COS APC sur une cellule T et d’autre part, à cause de leur dérive quasi ou nulle (chapitre 5 section 4 page 163). De plus cette caractéristique, nous a permis d’outrepasser une limite technique, notre AFM qui a un piezo permettant une course courte de 15 μ m, ne nous permettant pas de détecter tous les événements de détachement lors du contact cellule-cellule mais nous a permis de quantifier l’adhésion résiduelle.
- L’immobilisation et l’adhésion des lymphocytes T qui sont des cellules de petites tailles, facilement activable, et usuellement cultivées de manière non adhérentes. Cette étape a été divisée en deux grandes parties :
 - Le screening d’une quarantaine de molécules en utilisant ma méthode MAACS développée au CIML afin de déterminer quelle est la plus optimale pour l’adhésion (aCD45) et la passivation (BSA et ses dérivés)
 - La mise en place de micropatterns protéiques afin de toujours être dans une optique de standardisation dans ce cas de la forme, l’aire d’étalement et de la polarité de la cellule.

Ces premiers points nous ont permis d'observer et de mesurer des propriétés mécaniques sur une surface adhérente et non activatrice. Ces résultats ont soulevé plusieurs questions sur plusieurs points, à la fois biologiques et méthodologiques. En particulier :

- Sur l'utilisation de aCD45 pour immobiliser les cellules T, ce qui est couramment utilisé dans différents laboratoires (202). Comme nous l'avons montré l'immobilisation des CD45 n'est pas neutre sur le niveau subséquent d'amplitude d'activation des cellules T. C'est pourquoi nous avons mis en place un nouveau modèle cellulaire proposant ainsi une alternative à l'utilisation de marqueur lymphocytaire comme ancre d'adhésion. Les deux modèles cellulaires que nous avons utilisés et caractérisés sont fonctionnels en l'état, mais demandent encore quelques efforts expérimentaux pour une validation plus complète :
 - Mécaniquement : des mesures en AFM complémentaires permettant ainsi d'augmenter la quantité de données pour solidifier les tests statistiques. D'autres techniques de mesures de force ayant une résolution plus faible comme les pinces optiques sont aussi envisagées, car nous avons mis à évidence que sur des surfaces patternées d'aire différentes le module de Young des cellules 3A9m n'était pas modifié ne signifiant pas que la tension membranaire est quant à elle identique, d'autant plus que le recrutement de CD45 ne fait pas appel directement au cytosquelette (contrairement aux intégrines). Cette piste a commencé à être étudié lors de différents masters de M2 (251). L'inconvénient d'utiliser aCD45 peut devenir un avantage et permettrait ainsi d'approfondir l'effet de cette immobilisation sur l'organisation de la cellule T et son activation (252).
 - Mécaniquement : en quantifiant d'autres paramètres sur nos cellules patternées et/ou modifiées, comme la tension de la membrane, grâce à nos protocoles de traction de tubes que nous avons mis en place et publiés (211), mais aussi grâce aux pinces optiques. Cela permettra une description complète, avec une étude conjointe tension / module élastique, pour établir si dans nos conditions une corrélation existe, par exemple.
 - Microscopiquement : afin d'observer l'organisation de la membrane et du cytosquelette à l'aide d'imagerie confocale ou de techniques à haute résolution.

Un des points intéressant à étudier serait de mesurer la diffusion du TCR sur les cellules patternées ou non sur une surface aCD45 ou PLL et essayer de voir si cela corrèle avec nos résultats d'amplitude de fluorescence. La Fluorescence Correlation Spectroscopy, qui est au CIML, permet de mesurer les caractéristiques de diffusion à la membrane et de déterminer le type de confinement des protéines d'intérêt dans la membrane (253). Cette piste est une des perspectives à court terme et des expériences préliminaires ont été effectuées, mais n'ont pas été incluses dans ce manuscrit.

- Sur l'utilisation du micro-contact printing : comme nous l'avons soulevé dans cette thèse, la mise en place de surfaces contrôlées s'est avérée très difficile, avec parfois des variabilités d'efficacité de transfert assez marquées au long des années, que ce soit pour l'immobilisation d'aCD45 ou plus récemment pour PLL. Un des problèmes que nous identifions provient de l'utilisation de boîte de Pétri fond verre commerciales, qui sont traitées et dont nous n'avons pas pu obtenir plus d'amples informations de la part du fournisseur. Jusqu'à récemment (juin 2018) ces boîtes constituaient le seul substrat adaptable sur notre AFM pouvant être thermostatées et limitant les vibrations mécaniques du substrat lors d'utilisation de l'AFM pour effectuer des contacts par exemple entre cellules sur des temps longs, jusqu'à plusieurs minutes. En effet, la lame de verre est collée à une boîte en plastique nous empêchant d'essayer des nettoyages de surface agressifs (souvent à base d'acides forts), ce qui est souvent recommandé lors de l'impression de protéines. Nous avons tenté de limiter ces variations en effectuant des traitements doux de la surface, comme passer les boîtes au plasma, aux UVs ou de les nettoyer avec du liquide vaisselle suite à une discussion avec V. Viasnoff (Mechanobiology Institute, Singapour) (mais ils traitent par la suite, après des rinçages soigneux, leur verre à l'acide sulfurique concentré).

Pour outrepasser ce problème, nous ne pensons pas que continuer l'exploration de l'impression par micro-contact soit la meilleure solution à long terme. En effet, le choix d'utiliser cette technique, au départ, était du fait de sa simplicité et de sa rapidité d'exécution. Cependant, cette technique n'est pas, dans nos mains, suffisamment robuste pour nos expériences qui sont exigeantes en temps de préparation, en particulier pour des cellules fragiles (comme des cellules primaires) ou marquées (les marqueurs pouvant se compartimenter ou être toxiques à long terme). En effet trop d'étapes sont dépendantes de l'expérimentateur, par exemple le séchage et l'appui du tampon de PDMS sur la surface. Il est possible

d'automatiser cette technique comme ce qui a été proposé au LAAS Toulouse (Fredonnet et al., 2016) avec un système basé sur des électro-aimants pour obtenir toujours la même force d'appui lors du transfert. De plus, nous disposons au laboratoire d'une nouvelle technique d'impression protéique développée par la société Alvéole (<https://www.alveolelab.com/>) avec qui O. Theodoly collabore. L'optimisation de cette technique d'impression fait l'objet du travail de thèse de X. Luo (soutenance prévue en 2019). Cette technique permet d'imprimer, avec comme limite la résolution optique, toute forme de motifs désirés produits par dessin vectoriel, grâce à la projection d'une image sur un miroir et l'utilisation d'un laser UV qui va brûler sélectivement une zone continue recouverte de molécules répulsives (typiquement PLL-Peg) via l'utilisation d'une solution photo initiatrice. Les motifs imprimés sont alors révélés par incubation avec une protéine fluorescente. Nous avons fait quelques essais avec cette technique, mais ils se sont révélés, avec nos molécules, peu fructueux pour la plupart. Cette technique permettant facilement d'imprimer des motifs de l'ordre du micromètre nécessite d'être explorée davantage pour la continuité de ce projet : elle permettrait d'avoir rapidement des surfaces robustes offrant la possibilité de produire toutes les formes que l'on souhaite.

Ce qui serait particulièrement intéressant serait de faire varier la polarité de la cellule en imposant une forme d'adhésion non circulaire mais en forme de parapluie ou ancre de bateau. En effet, pour la même aire de contact (stamps $2R=20\mu\text{m}$ et surface continue d'aCD45) nous avons mis en évidence un module de Young différent alors que la seule variation était due à la forme de la cellule. De plus, la forme polarisée du lymphocyte T a été montré pour avoir une activation plus forte au niveau du leading edge comparé à l'arrière, comme mis en évidence dans (141) grâce à l'utilisation des pinces optiques.

Nous avons réalisé au cours de cette thèse des essais d'obtention de motifs asymétriques par tamponnage, mais la difficulté pour nos cellules de petite taille est de définir et tester rapidement l'épaisseur de la zone adhérente... Pour les techniques classiques, en comptant la réalisation du masque par une société de service, le temps se compte en mois... L'impression directe par la technique « Alvéole » serait donc une méthode à prototypage rapide.

On peut également développer des surfaces de l'ordre nanométrique ce qui permet également l'immobilisation cellulaire et dans ce cas soulève d'autres questions peut-être au niveau de l'organisation dans ce cas précis imposée de nano-clusters à la membrane. Le développement

Perspectives et conclusions

dans cette direction va faire partie du travail de thèse de Farah Mustapha (Début de thèse octobre 2018, financement DOC2AMU / Marie Curie).

L'optimisation de la chimie des surfaces est un point indispensable si l'on veut maintenir une standardisation de l'adhésion et de l'aire de contact des cellules et comme décrit au-dessus l'utilisation de ces substrats permettrait d'explorer de nouvelles pistes (polarité, organisation membrane et cytosquelette, activation différentielle).

Ensuite, les expériences de contact cellule T/APC nous ont permis de montrer que lorsque l'on bloque la signalisation avec PP2 la force de détachement du couple cellulaire, après un contact d'une minute, est peptide dépendant et présente beaucoup plus d'évènements discrets de dé-adhésion (sauts, voire tubes). Dans un premier temps nous devons augmenter le nombre d'expériences pour obtenir des statistiques plus robustes mais aussi nous pouvons désormais compter sur le système CellHesion (JPK) reçu très récemment et permettant d'avoir une course de 100 μm du piezo de façon à observer tous les évènements de détachement.

Enfin, les résultats très intéressants montrant la présence d'oscillations et d'une relaxation viscoélastique différente lors du contact entre le lymphocyte T et une APC chargée avec des peptides d'affinités variables sont à explorer davantage. En effet, la signalisation étant bloquée par PP2, la formation de la synapse ne peut théoriquement pas se faire et donc il n'y a pas de renforcement du signal. Cela signifie que nous sommes potentiellement capables de voir des évènements très précoces de l'activation du lymphocyte T.

Un des peptides testés étant dépendant du CD4, il serait dans un premier temps intéressant de bloquer avec un anticorps ce corécepteur et voir comment les oscillations/relaxation évoluent afin de déterminer le rôle mécanique du corécepteur.

Un grand avantage dans le monitoring de ces oscillations est que l'on peut s'abstenir d'utiliser la sonde calcique PBX pour observer l'activation du lymphocyte T. De plus nous avons montré dans ce travail de thèse que le fait de charger nos cellules avec une sonde calcique n'était

Perspectives et conclusions

pas neutre, on peut observer une modification du module de Young ce qui induit un petit biais au niveau de la mécanique cellulaire. En outre, l'utilisation des cellules chargées avec cette sonde calcique oblige d'avoir un temps d'expérimentation à 37°C restreint car nous avons observé une compartimentalisation de celle-ci au cours du temps, ce qui a déjà été documenté également dans différentes études (254).

Ensuite, il serait bien sûr crucial d'interférer avec le cytosquelette de la cellule T et / ou de la présentatrice, en observer la structuration au cours du temps, pour comprendre d'où proviennent ces oscillations et si c'est un comportement actif de la cellule T qui les fait apparaître.

Il serait aussi intéressant de regarder comment évolue les oscillations et leur amplitude lorsqu'on lève l'inhibition de PP2. Pour cela il faudrait maintenir l'utilisation de la sonde calcique pour tenter d'établir une corrélation entre flux calciques et comportement mécanique. Si l'on conclut que l'observation des oscillations est suffisante comme lecture directe d'évènements très précoces de l'activation, alors on pourrait s'abstenir de marquer les cellules et ne pas avoir les difficultés expérimentales que peuvent présenter le couplage de la fluorescence et de l'AFM.

Une piste supplémentaire, outre changer le type de système T/ APC modèle par un système avec des T primaires plus actives, serait d'utiliser des substrats de type gel ayant des rigidités plus proches du physiologique, comme support pour l'APC ou pour les patterns. A long terme il serait intéressant de faire ces mêmes expériences avec des pinces optiques ou un BFP, plus sensibles en force, en faisant un contact cellule / cellule et observer si ces oscillations résultent de petites microvillosités permettant de détecter et tester le peptide avec une fréquence plus élevée, conduisant ou non à l'activation. Cela serait également possible en « renversant » notre système expérimental et en mettant en place un « AFM latéral » (255), couplé à de la microscopie de fluorescence, qui n'est pas encore disponible en France (PH Puech, Financement CNRS PEPS « Technologies Frugales », 2017)

Le but final de mon travail était de combiner toutes ces améliorations à savoir des surfaces reproductibles et contrôlées, des cellules T adhérentes, d'adhésion et de forme contrôlée, et de venir mettre en contact une APC (différentes forces, temps de contact, fréquence de contact). Nous en avons mis en place toutes les étapes séparées, mais la complexité expérimentale

Perspectives et conclusions

de chacune ne nous a pas permis de réaliser plus que des expériences de principe sur le montage complet. Néanmoins, nous avons obtenu des résultats et méthodologies originaux qui nous permettent d'envisager sa réalisation.

Une fois finalisé, un tel système permettrait de jouer sur les paramètres biologiques en exprimant dans notre modèle cellulaire les molécules de COStimulation et les intégrines sur nos APC modèles. On pourra ainsi agir à différents niveaux avec l'expression de marqueurs de surface, en utilisant des traitements pharmacologiques, déstabilisant l'organisation de la membrane plasmique et sa diffusion, en inhibant la polymérisation d'actine et autres molécules du cytosquelette, et en modifiant spécifiquement des protéines de la cascade de signalisation impliquées dans l'activation.

Il restera ensuite à passer à des systèmes de cellules primaires pour disséquer finement l'implication des forces, intégrées de l'échelle moléculaire à l'échelle cellulaire, au cours de l'activation initiale des lymphocytes T.

Bibliographie

1. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124: 783–801.
2. Crinier, A., C. Viant, M. Girard-Madoux, and É. Vivier. 2017. Les cellules lymphoïdes innées. *Medecine/Sciences*. 33: 534–542.
3. Syngeneic, C.A., A. Tumors, R.B. Herberman, M.E. Nu, H.T. Holden, and D.H. Lavrin. 1975. Natural Cytotoxic Reactivity of Mouse Lymphoid. *Building*. 239: 230–239.
4. Kiessling, R., E. Klein, H. Pross, and H. Wigzell. 1975. „Natural” killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur. J. Immunol*. 5: 117–121.
5. Mebius, R.E., P. Rennert, and I.L. Weissman. 1997. Developing lymph nodes collect CD4+CD3-LTβ+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity*. 7: 493–504.
6. Cella, M., A. Fuchs, W. Vermi, F. Facchetti, K. Otero, J.K.M. Lennerz, J.M. Doherty, J.C. Mills, and M. Colonna. 2009. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*. 457: 722–725.
7. Vonarbourg, C., A. Mortha, V.L. Bui, P. Hernandez, A. Elina, T. Hoyler, M. Flach, B. Bengsch, R. Thimme, C. Hölscher, M. Hönig, U. Pannicke, K. Schwarz, C.F. Ware, D. Finke, and A. Diefenbach. 2011. *NIH Public Access*. 33: 736–751.
8. Spits, H., D. Artis, M. Colonna, A. Diefenbach, J.P. Di Santo, G. Eberl, S. Koyasu, R.M. Locksley, A.N.J. McKenzie, R.E. Mebius, F. Powrie, and E. Vivier. 2013. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol*. 13: 145–149.
9. Murphy, Travers, and Walport. 2012. *Janeway’s Immunobiology, 7th Edition*. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* .
10. Clambey, E.T., B. Davenport, J.W. Kappler, P. Marrack, and D. Homann. 2014. Molecules in medicine mini review: The alpha-beta T cell receptor. *J. Mol. Med*. 92: 735–741.
11. Kee Sim, G., J. Yagüe, J. Nelson, P. Marrack, E. Palmer, A. Augustin, and J. Kappler. 1984. Primary structure of human T-cell receptor α-chain. *Nature*. 312: 771.
12. Smith-Garvin, J.E., G.A. Koretzky, and M.S. Jordan. 2009. T Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol*. 27: 591–619.
13. Hewitt, E.W. 2003. The MHC class I antigen presentation pathway: Strategies for viral immune evasion. *Immunology*. 110: 163–169.
14. Miceli, M.C., P.V.O.N. Hoegen, and J.R. Parnes. 1991. Adhesion versus coreceptor function of CD4 and

Bibliographie

- CD8 : Role of the cytoplasmic tail in coreceptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 2623–2627.
15. van Oers, N.S., B. Lowin-Kropf, D. Finlay, K. Connolly, and A. Weiss. 1996. alpha beta T cell development is abolished in mice lacking both Lck and Fyn protein tyrosine kinases. *Immunity*. 5: 429–36.
 16. Iwashima, M., B.A. Irving, N.S.C. Van Oers, A.C. Chan, and A. Weiss. 1994. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science (80-.)*. 193: 4279–4282.
 17. Ngoenkam, J., W.W. Schamel, and S. Pongcharoen. 2018. Selected signalling proteins recruited to the T-cell receptor–CD3 complex. *Immunology*. 153: 42–50.
 18. Rossy, J., D.J. Williamson, and K. Gaus. 2012. How does the kinase Lck phosphorylate the T cell receptor? Spatial organization as a regulatory mechanism. *Front. Immunol.* 3: 1–6.
 19. Boggon, T.J., and M.J. Eck. 2004. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*. 23: 7918–7927.
 20. Kim, P.W., Z.J. Sun, S.C. Blacklow, G. Wagner, and M.J. Eck. 2003. Lck to T Cell Coreceptors CD4 and CD8. *Science (80-.)*. 301: 1725–1728.
 21. Nika, K., C. Soldani, M. Salek, W. Paster, A. Gray, R. Etzensperger, L. Fugger, P. Polzella, V. Cerundolo, O. Dushek, T. Höfer, A. Viola, and O. Acuto. 2010. Constitutively active lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity*. 32: 766–777.
 22. Philipsen, L., A. V. Reddycherla, R. Hartig, J. Gumz, M. Kästle, A. Kritikos, M.P. Poltorak, Y. Prokazov, E. Turbin, A. Weber, W. Zuschratter, B. Schraven, L. Simeoni, and A.J. Müller. 2017. De novo phosphorylation and conformational opening of the tyrosine kinase Lck act in concert to initiate T cell receptor signaling. *Sci. Signal*. 10.
 23. Salles, A., C. Billaudeau, A. Sergé, A.-M. Bernard, M.-C. Phélipot, N. Bertaux, M. Fallet, P. Grenot, D. Marguet, H.-T. He, and Y. Hamon. 2013. Barcoding T cell calcium response diversity with methods for automated and accurate analysis of cell signals (MAAACS). *PLoS Comput. Biol.* 9: e1003245.
 24. Chouaki-Benmansour, N., K. Ruminski, A.M. Sartre, M.C. Phelipot, A. Salles, E. Bergot, A. Wu, G. Chicanne, M. Fallet, S. Brustlein, C. Billaudeau, A. Formisano, S. Mailfert, B. Payrastre, D. Marguet, S. Brasselet, Y. Hamon, and H.T. He. 2018. Phosphoinositides regulate the TCR/CD3 complex membrane dynamics and activation. *Sci. Rep.* 8: 1–16.
 25. Sanchez-Lockhart, M., M. Kim, and J. Miller. 2011. Cutting Edge: A Role for Inside-Out Signaling in TCR Regulation of CD28 Ligand Binding. *J. Immunol.* 187: 5515–5519.
 26. Feske, S. 2007. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 690–702.
 27. Hünig, T., N. Beyersdorf, and T. Kerkau. 2015. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *ImmunoTargets Ther.* : 111.
 28. Smith, A., P. Stanley, K. Jones, L. Svensson, A. McDowall, and N. Hogg. 2007. The role of the integrin

Bibliographie

- LFA-1 in T-lymphocyte migration. *Immunol. Rev.* 218: 135–146.
29. Evans, R., I. Patzak, L. Svensson, K. De Filippo, K. Jones, A. McDowall, and N. Hogg. 2009. Integrins in immunity. *J. Cell Sci.* 122: 215–25.
 30. Balkow, S., S. Heinz, P. Schmidbauer, W. Kolanus, B. Holzmann, S. Grabbe, and M. Laschinger. 2010. LFA-1 activity state on dendritic cells regulates contact duration with T cells and promotes T-cell priming. *Blood.* 116: 1885–94.
 31. Benard, E., J.A. Nunès, L. Limozin, and K. Sengupta. 2018. T Cells on Engineered Substrates: The Impact of TCR Clustering Is Enhanced by LFA-1 Engagement. *Front. Immunol.* 9: 2085.
 32. Chakraborty, A.K., and A. Weiss. 2014. Insights into the initiation of TCR signaling. *Nat. Immunol.* 15: 798–807.
 33. Ritter, A.T., S.M. Kapnick, S. Murugesan, P.L. Schwartzberg, G.M. Griffiths, and J. Lippincott-Schwartz. 2017. Cortical actin recovery at the immunological synapse leads to termination of lytic granule secretion in cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114: E6585–E6594.
 34. Huse, M., L.O. Klein, A.T. Girvin, J.M. Faraj, Q.J. Li, M.S. Kuhns, and M.M. Davis. 2007. Spatial and Temporal Dynamics of T Cell Receptor Signaling with a Photoactivatable Agonist. *Immunity.* 27: 76–88.
 35. Rink, T.J., C. Montecucco, T.R. Hesketh, and R.Y. Tsien. 1980. Lymphocyte membrane potential assessed with fluorescent probes. *BBA - Biomembr.* 595: 15–30.
 36. Fraser, J.D., J.D. Fraser, B.A. Irving, and G.R. Crabtree. 2007. Regulation Interleukin-2 Cell by Activity Gene Enhancer of the T Accessory Molecule CD28. 313: 313–317.
 37. Vig M. 2010. Calcium signaling in immune cells Monika. 10: 21–27.
 38. Barreira, M., S. Rodríguez-Fdez, and X.R. Bustelo. 2018. New insights into the Vav1 activation cycle in lymphocytes. *Cell. Signal.* 45: 132–144.
 39. Hogan, P.G. 2017. Calcium-NFAT transcriptional signalling in T cell activation and T cell exhaustion HHS Public Access. *Cell Calcium.* 63: 66–69.
 40. Dayel, M.J., and R.D. Mullins. 2004. Activation of Arp2/3 complex: Addition of the first subunit of the new filament by a WASP protein triggers rapid ATP hydrolysis on Arp2. *PLoS Biol.* 2: 476–485.
 41. Pollard, T.D., and J.A. Cooper. 2009. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science (80-).* 326: 1208–1212.
 42. Andrés-Delgado, L., O.M. Antón, F. Bartolini, A. Ruiz-Sáenz, I. Correas, G.G. Gundersen, and M.A. Alonso. 2012. INF2 promotes the formation of deetyrosinated microtubules necessary for centrosome reorientation in T cells. *J. Cell Biol.* 198: 1025–1037.
 43. Gomez, T.S., K. Kumar, R.B. Medeiros, Y. Shimizu, P.J. Leibson, and D.D. Billadeau. 2007. Formins Regulate the Actin-Related Protein 2/3 Complex-Independent Polarization of the Centrosome to the

Bibliographie

- Immunological Synapse. *Immunity*. 26: 177–190.
44. Heinisch, J.J., P.N. Lipke, A. Beaussart, S. El Kirat Chatel, V. Dupres, D. Alsteens, and Y.F. Dufrêne. 2012. Atomic force microscopy - looking at mechanosensors on the cell surface. *J. Cell Sci.* 125: 4189–95.
 45. Dupré, L., R. Houmadi, C. Tang, and J. Rey-Barroso. 2015. T lymphocyte migration: An action movie starring the actin and associated actors. *Front. Immunol.* 6.
 46. Babich, A., S. Li, R.S. O'Connor, M.C. Milone, B.D. Freedman, and J.K. Burkhardt. 2012. F-actin polymerization and retrograde flow drive sustained PLC γ 1 signaling during T cell activation. *J. Cell Biol.* 197: 775–87.
 47. Sedzinski, J., M. Biro, A. Oswald, J.-Y. Tinevez, G. Salbreux, and E. Paluch. 2011. Polar actomyosin contractility destabilizes the position of the cytokinetic furrow. *Nature*. 476: 462–6.
 48. Bretscher, A., K. Edwards, and R.G. Fehon. 2002. ERM proteins and merlin: Integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 586–599.
 49. Liu, Y., N. V. Belkina, C. Park, R. Nambiar, S.M. Loughhead, G. Patino-Lopez, K. Ben-Aissa, J.J. Hao, M.J. Kruhlik, H. Qi, U.H. Von Andrian, J.H. Kehrl, M.J. Tyska, and S. Shaw. 2012. Constitutively active ezrin increases membrane tension, slows migration, and impedes endothelial transmigration of lymphocytes in vivo in mice. *Blood*. 119: 445–453.
 50. Charrin, S., and A. Alcover. 2006. Role of ERM (ezrin-radixin-moesin) proteins in T lymphocyte polarization, immune synapse formation and in T cell receptor-mediated signaling. *Bioscience*. : 1987–1997.
 51. Fehon, R.G., A.I. McClatchey, and A. Bretscher. 2010. Organizing the cell cortex: The role of ERM proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 276–287.
 52. Shcherbina, A., A. Bretscher, D.M. Kenney, and E. Remold-O'Donnell. 1999. Moesin, the major ERM protein of lymphocytes and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain. *FEBS Lett.* 443: 31–36.
 53. Brodovitch, A. 2014. Détection et première analyse des antigènes par les lymphocytes T. .
 54. Delon, J., K. Kaibuchi, and R.N. Germain. 2001. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor Moesin. *Immunity*. 15: 691–701.
 55. Even-Ram, S., A.D. Doyle, M.A. Conti, K. Matsumoto, R.S. Adelstein, and K.M. Yamada. 2007. Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat. Cell Biol.* 9: 299–309.
 56. Babich, A., and J.K. Burkhardt. 2013. Coordinate control of cytoskeletal remodeling and calcium mobilization during T-cell activation. *Immunol. Rev.* 256: 80–94.
 57. Kupfer, B.A., S.L. Swain, and S.J. Singer. 1987. THE SPECIFIC DIRECT INTERACTION OF HELPER II .

Bibliographie

- Reorientation of the Microtubule Organizing Center and the Bound Helper T Cells T CELLS AND ANTIGEN-PRESENTING B CELLS Reorganization of the Membrane-associated Cytoskeleton inside Th cells form a major branch. 165.
58. Combs, J., S.J. Kim, S. Tan, L.A. Ligon, E.L.F. Holzbaue, J. Kuhn, and M. Poenie. 2006. Recruitment of dynein to the Jurkat immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 14883–14888.
 59. Scherson, T., B. Geiger, Z. Eshhar, and U.Z. Littauer. 1982. Mapping of distinct structural domains on microtubule-associated protein 2 by monoclonal antibodies. *Eur. J. Biochem.* 129: 295–302.
 60. Shevchenko, A., and K. Simons. 2010. Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. .
 61. Van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 112–124.
 62. Colin R. F. Monks, Benjamin A. Freiberg, Hannah Kupfer, N.S.& A.K. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. 340: 764–766.
 63. Grakoui, a, S.K. Bromley, C. Sumen, M.M. Davis, a S. Shaw, P.M. Allen, and M.L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science.* 285: 221–227.
 64. Zumerle, S., B. Molon, and A. Viola. 2017. Membrane rafts in T cell activation: A spotlight on CD28 costimulation. *Front. Immunol.* 8: 1–7.
 65. Valitutti, B.S., M. Dessing, K. Aktories, H. Gallati, and A. Lanzavecchia. 1995. Sustained Signaling Leading to T Cell Activation Results from Prolonged T Cell Receptor Occupancy. *Role.* 181: 577–584.
 66. Campi, G., R. Varma, and M.L. Dustin. 2005. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J. Exp. Med.* 202: 1031–6.
 67. Jacobelli, J., S.A. Chmura, D.B. Buxton, M.M. Davis, and M.F. Krummel. 2004. A single class II myosin modulates T cell motility and stopping, but not synapse formation. *Nat. Immunol.* 5: 531–538.
 68. Hsu, C.J., W.T. Hsieh, A. Waldman, F. Clarke, E.S. Huseby, J.K. Burkhardt, and T. Baumgart. 2012. Ligand mobility modulates immunological synapse formation and T cell activation. *PLoS One.* 7.
 69. Birnbaum, M.E., R. Berry, Y.-S. Hsiao, Z. Chen, M. a Shingu-Vazquez, X. Yu, D. Waghay, S. Fischer, J. McCluskey, J. Rossjohn, T. Walz, and K.C. Garcia. 2014. Molecular architecture of the $\alpha\beta$ T cell receptor-CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* : 1–6.
 70. Sloan-Lancaster, J., B.D. Evavold, and P.M. Allen. 1993. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature.* 363: 156–159.
 71. Aleksic, M., O. Dushek, H. Zhang, E. Shenderov, J. Chen, V. Cerundolo, D. Coombs, and P.A. Van Der Merwe. 2010. Article Dependence of T Cell Antigen Recognition on T Cell Receptor-Peptide MHC Confinement Time. *Immunity.* 32: 163–174.
 72. Miller, M.J., A.S. Hejazi, S.H. Wei, M.D. Cahalan, and I. Parker. 2004. T cell repertoire scanning is

Bibliographie

- promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. 101.
73. Bousoo, P., and E.A. Robey. 2004. Dynamic behavior of T cells and thymocytes in lymphoid organs as revealed by two-photon microscopy. *Immunity*. 21: 349–355.
 74. Brodovitch, A., P. Bongrand, and A. Pierres. 2013. T lymphocytes sense antigens within seconds and make a decision within one minute. *J. Immunol.* 191: 2064–71.
 75. Brodovitch, A., E. Shenderov, V. Cerundolo, P. Bongrand, A. Pierres, and P.A. van der Merwe. 2015. T lymphocytes need less than 3 min to discriminate between peptide MHCs with similar TCR-binding parameters. *Eur. J. Immunol.* : n/a-n/a.
 76. Sykulev, Y., M. Joo, I. Vturina, T.J. Tsomides, H.N. Eisen, and P.C. Required. 1996. Evidence that a Single Peptide–MHC Complex on a Target Cell Can Elicit a Cytolytic T Cell Response. 4: 565–571.
 77. Irvine, D.J., M.A. Purbhoo, M. Krogsgaard, and M.M. Davis. 2002. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature*. 419: 845–849.
 78. Stone, J.D., A.S. Chervin, and D.M. Kranz. 2009. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology*. 126: 165–176.
 79. Matsui, K., J.J. Boniface, P. Steffner, P.A. Reay, and M.M. Davis. 1994. Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91: 12862–12866.
 80. Weber, S., A. Traunecker, F. Oliveri, W. Gerhard, and K. Karjalainen. 1992. Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature*. 355: 717–719.
 81. He, H., and P. Bongrand. 2011. Membrane dynamics control TCR-generated signaling. .
 82. Huppa, J.B., M. Axmann, M. a Mörtelmaier, B.F. Lillemeier, E.W. Newell, M. Brameshuber, L.O. Klein, G.J. Schütz, and M.M. Davis. 2010. TCR-peptide-MHC interactions in situ show accelerated kinetics and increased affinity. *Nature*. 463: 963–7.
 83. Huang, J., V.I. Zarnitsyna, B. Liu, L.J. Edwards, N. Jiang, B.D. Evavold, and C. Zhu. 2010. The kinetics of two-dimensional TCR and pMHC interactions determine T-cell responsiveness. *Nature*. 464: 932–936.
 84. Robert, P., M. Aleksic, O. Dushek, V. Cerundolo, P. Bongrand, and P.A. van der Merwe. 2012. Kinetics and mechanics of two-dimensional interactions between T cell receptors and different activating ligands. *Biophys. J.* 102: 248–57.
 85. Puech, P.H., D. Nevoltris, P. Robert, L. Limozin, C. Boyer, and P. Bongrand. 2011. Force measurements of TCR/pMHC recognition at T cell surface. *PLoS One*. 6: e22344.
 86. McKeithan, T.W. 1995. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 5042–5046.

Bibliographie

87. Jansson, A. 2011. Kinetic proofreading and the search for nonself-peptides. *Self/Nonsel - Immune Recognit. Signal.* 2: 1–3.
88. Dushek, O. 2011. Elementary steps in T cell receptor triggering. *Front. Immunol.* 2: 91.
89. Varma, R., G. Campi, T. Yokosuka, T. Saito, and M.L. Dustin. 2006. T Cell Receptor-Proximal Signals Are Sustained in Peripheral Microclusters and Terminated in the Central Supramolecular Activation Cluster. *25: 117–127.*
90. Dushek, O., and P.A. Van der Merwe. 2014. An induced rebinding model of antigen discrimination. *Trends Immunol.* 35: 153–158.
91. Demotz, S., H.M. Grey, and A. Setre. 1990. The Minimal Number of Class II MHC-Antigen Complexes Needed for T Cell Activation. 249.
92. Harding, C. V, and E.R. Unanue. 1991. Modulation of antigen presentation and peptide-MHC-specific, LFA-1-dependent T cell-macrophage adhesion. *J. Immunol.* 147: 767–773.
93. Valitutti, S., and A. Lanzavecchia. 1997. Serial triggering of TCRs: A basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunol. Today.* 18: 299–304.
94. Valitutti, S. 2012. The serial engagement model 17 years after: Fromtcr triggering to immunotherapy. *Front. Immunol.* 3: 1–7.
95. Rachmilewitz, J., A. Lanzavecchia, and R. J. 2002. A temporal and spatial summation model for T-cell activation: signal integration and antigen decoding. *Trends Immunol.* 23: 592–595.
96. Kalergis, A.H., N. Boucheron, M.A. Doucey, E. Palmieri, E.C. Goyarts, Z. Vegh, I.F. Luescher, and S.G. Nathenson. 2001. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nat. Immunol.* 2: 229–234.
97. Huang, J., C. Meyer, and C. Zhu. 2012. T cell antigen recognition at the cell membrane. *Mol. Immunol.* 52: 155–164.
98. Cochran, J.R., T.O. Cameron, and L.J. Stern. 2000. The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity.* 12: 241–250.
99. Janeway, C.A. 1992. The T Cell Receptor as a Multicomponent Signalling Machine: CD4/CD8 Coreceptors and CD45 in T Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 645–674.
100. Jiang, N., J. Huang, L.J. Edwards, B. Liu, Y. Zhang, C.D. Beal, B.D. Evavold, and C. Zhu. 2011. Two-stage cooperative T cell receptor-peptide major histocompatibility complex-CD8 trimolecular interactions amplify antigen discrimination. *Immunity.* 34: 13–23.
101. Gascoigne, N.R.J. 2008. Do T cells need endogenous peptides for activation? *Nat. Rev. Immunol.* 8: 895–900.
102. Krogsgaard, M., Q.-J. Li, C. Sumen, J.B. Huppa, M. Huse, and M.M. Davis. 2005. Agonist / endogenous

Bibliographie

- peptide – MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nat. Immunol.* 11: 90–96.
103. Davis, M.M., J.J. Boniface, Z. Reich, D. Lyons, J. Hampl, B. Arden, and Y. Chien. 1998. Ligand Recognition By $\alpha\beta$ T Cell Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 523–544.
104. Stone, J.D., and L.J. Stern. 2006. CD8 T Cells, Like CD4 T Cells, Are Triggered by Multivalent Engagement of TCRs by MHC-Peptide Ligands but Not by Monovalent Engagement. *J. Immunol.* 176: 1498–1505.
105. Krogsgaard, M., J. Juang, and M.M. Davis. 2007. A role for “self” in T-cell activation. *Semin. Immunol.* 19: 236.
106. Ma, Z., K. a Sharp, P. a Janmey, and T.H. Finkel. 2008. Surface-anchored monomeric agonist pMHCs alone trigger TCR with high sensitivity. *PLoS Biol.* 6: e43.
107. Van Der Merwe, P.A., and O. Dushek. 2011. Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 47–55.
108. Van der Merwe, P.A. 2001. The TCR triggering puzzle. *Immunity.* 14: 665–668.
109. Malissen, B., and P. Bongrand. 2015. Early T Cell Activation: Integrating Biochemical, Structural, and Biophysical Cues. *Annu. Rev. Immunol.* 33: 539–561.
110. Ma, Z., and T.H. Finkel. 2010. T cell receptor triggering by force. *Trends Immunol.* 31: 1–6.
111. Levin, S.E., and A. Weiss. 2005. Twisting tails exposed: Figure 1. *J. Exp. Med.* 201: 489–492.
112. Davis, S.J., and P.A. van der Merwe. 2006. The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nat. Immunol.* 7: 803–809.
113. He, H.-T., and P. Bongrand. 2012. Membrane dynamics shape TCR-generated signaling. *Front. Immunol.* 3: 90.
114. Merkel, R., P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, and E. Evans. 1999. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature.* 397: 50–53.
115. Marshall, B.T., M. Long, J.W. Piper, T. Yago, R.P. McEver, and C. Zhu. 2003. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature.* 423: 190–3.
116. Feng, Y., E.L. Reinherz, and M.J. Lang. 2018. $\alpha\beta$ T Cell Receptor Mechanosensing Forces out Serial Engagement. *Trends Immunol.* 39: 596–609.
117. Chen, Y. 2006. Receptor-mediated cell mechanosensing Authors: Yunfeng Chen. .
118. Upadhyaya, A. 2017. Mechanosensing in the immune response. *Semin. Cell Dev. Biol.* : 1–9.
119. Li, F., S.D. Redick, H.P. Erickson, and V.T. Moy. 2003. Force measurements of the $\alpha 5\beta 1$ integrin-fibronectin interaction. *Biophys. J.* 84: 1252–1262.
120. Marshall, B.T., M. Long, J.W. Piper, T. Yago, R.P. McEver, and C. Zhu. 2003. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature.* 423: 190–193.

Bibliographie

121. Kim, S.T., K. Takeuchi, Z.Y.J. Sun, M. Touma, C.E. Castro, A. Fahmy, M.J. Lang, G. Wagner, and E.L. Reinherz. 2009. The $\alpha\beta$ T cell receptor is an anisotropic mechanosensor. *J. Biol. Chem.* 284: 31028–31037.
122. Li, Y.C., B.M. Chen, P.C. Wu, T.L. Cheng, L.S. Kao, M.H. Tao, A. Lieber, and S.R. Roffler. 2010. Cutting Edge: Mechanical Forces Acting on T Cells Immobilized via the TCR Complex Can Trigger TCR Signaling. *J. Immunol.* 184: 5959–5963.
123. Liu, B., W. Chen, B.D. Evavold, and C. Zhu. 2014. Accumulation of dynamic catch bonds between TCR and agonist peptide-MHC triggers T cell signaling. *Cell.* 157: 357–68.
124. Pi, F., P. Dillard, L. Limozin, A. Charrier, and K. Sengupta. 2013. Nanometric protein-patch arrays on glass and polydimethylsiloxane for cell adhesion studies. *Nano Lett.* 13: 3372–3378.
125. Pi, F., P. Dillard, R. Alameddine, E. Benard, A. Wahl, I. Ozerov, A. Charrier, L. Limozin, and K. Sengupta. 2015. Size-Tunable Organic Nanodot Arrays: A Versatile Platform for Manipulating and Imaging Cells. *Nano Lett.* 15: 5178–5184.
126. Dillard, P., F. Pi, A.C. Lellouch, L. Limozin, and K. Sengupta. 2016. Nano-clustering of ligands on surrogate antigen presenting cells modulates T cell membrane adhesion and organization. *Integr. Biol.* 8: 287–301.
127. Cai, H., J. Muller, D. Depoil, V. Mayya, M.P. Sheetz, M.L. Dustin, and S.J. Wind. 2018. Full control of ligand positioning reveals spatial thresholds for T cell receptor triggering. *Nat. Nanotechnol.* 13: 610–617.
128. Dillard, P., R. Varma, K. Sengupta, and L. Limozin. 2015. Ligand-mediated friction determines morphodynamics of spreading T cells. *Biophys. J.* 107: 2629–2638.
129. Judokusumo, E., E. Tabdanov, S. Kumari, M.L. Dustin, and L.C. Kam. 2012. Mechanosensing in T Lymphocyte Activation. *Biophysj.* 102: L5–L7.
130. Saitakis, M., S. Dogniaux, C. Goudot, N. Bufi, S. Asnacios, M. Maurin, C. Randriamampita, A. Asnacios, and C. Hivroz. 2017. Different TCR-induced T lymphocyte responses are potentiated by stiffness with variable sensitivity. *Elife.* 6: 1–29.
131. Bashour, K.T., A. Gondarenko, H. Chen, K. Shen, X. Liu, M. Huse, and J.C. Hone. 2014. CD28 and CD3 have complementary roles in T-cell traction forces. *111: 2241–2246.*
132. Wahl, A., C. Dinet, P. Dillard, P.-H. Puech, L. Limozin, and K. Sengupta. 2017. Biphasic mechanosensitivity of TCR mediated adhesion of T lymphocytes. .
133. Bufi, N., M. Saitakis, S. Dogniaux, O. Buschinger, A. Bohineust, A. Richert, M. Maurin, C. Hivroz, and A. Asnacios. 2015. Human primary immune cells exhibit distinct mechanical properties that are modified by inflammation. *Biophys. J.* 108: 2181–2190.

Bibliographie

134. O'Connor, R.S., X. Hao, K. Shen, K. Bashour, T. Akimova, W.W. Hancock, L.C. Kam, and M.C. Milone. 2012. Substrate rigidity regulates human T cell activation and proliferation. *J. Immunol.* 189: 1330–9.
135. Brodovitch, A., L. Limozin, P. Bongrand, and A. Pierres. 2015. Use of TIRF to Monitor T-Lymphocyte Membrane Dynamics with Submicrometer and Subsecond Resolution. *Cell. Mol. Bioeng.* 8: 178–186.
136. Husson, J., K. Chemin, A. Bohineust, C. Hivroz, and N. Henry. 2011. Force generation upon T cell receptor engagement. *PLoS One.* 6: e19680.
137. Sawicka, A., A. Babataheri, S. Dogniaux, A.I. Barakat, D. Gonzalez-Rodriguez, C. Hivroz, and J. Husson. 2017. Micropipette force probe to quantify single-cell force generation: application to T-cell activation. *Mol. Biol. Cell.* 28: 3229–3239.
138. Guillou, L., A. Babataheri, M. Saitakis, A. Bohineust, and S. Dogniaux. 2016. T-lymphocyte passive deformation is controlled by unfolding of membrane surface reservoirs. .
139. Neves, S.R., P. Tsokas, A. Sarkar, E.A. Grace, S.M. Taubenfeld, C.M. Alberini, J.C. Schaff, D. Robert, I.I. Moraru, and R. Iyengar. 2009. Cell shape and negative links in regulatory motifs together control spatial information flow in signaling networks. *Cell.* 133: 666–680.
140. Versaevel, M., T. Grevesse, and S. Gabriele. 2012. Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells. *Nat. Commun.* 3: 1–11.
141. Negulescu, P. a., T.B. Krasieva, A. Khan, H.H. Kerschbaum, and M.D. Cahalan. 1996. Polarity of T Cell Shape, Motility, and Sensitivity to Antigen. *Immunity.* 4: 421–430.
142. Wei, X., B.J. Tromberg, and M.D. Cahalan. 1999. Mapping the sensitivity of T cells with an optical trap: Polarity and minimal number of receptors for Ca²⁺ signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 8471–8476.
143. Anvari, B., J.H. Torres, and B.W. McIntyre. 2004. Regulation of pseudopodia localization in lymphocytes through application of mechanical forces by optical tweezers. *J. Biomed. Opt.* 9: 865.
144. Nowosad, C.R., K.M. Spillane, and P. Tolar. 2016. Germinal center B cells recognize antigen through a specialized immune synapse architecture. *Nat. Immunol.* 17: 870–877.
145. Spillane, K.M., and P. Tolar. 2016. B cell antigen extraction is regulated by physical properties of antigen presenting cells. *J. Cell Biol.* 2: 1–19.
146. Spillane, K.M., and P. Tolar. 2018. Mechanics of antigen extraction in the B cell synapse. *Mol. Immunol.* 101: 319–328.
147. Comrie, W.A., S. Li, S. Boyle, and J.K. Burkhardt. 2015. The dendritic cell cytoskeleton promotes T cell adhesion and activation by constraining ICAM-1 mobility. *J. Cell Biol.* 208: 457–473.
148. Comrie, W.A., A. Babich, and J.K. Burkhardt. 2015. F-actin flow drives affinity maturation and spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse. *J. Cell Biol.* 208: 475–491.
149. Comrie, W.A., J.K. Burkhardt, and J.K. Burkhardt. 2016. Action and Traction : Cytoskeletal Control of

Bibliographie

- Receptor Triggering at the immunological Synapse. 7: 1–25.
150. Basu, R., B.M. Whitlock, J. Husson, J. Lieberman, L.C. Kam, M. Huse, R. Basu, B.M. Whitlock, J. Husson, A. Le, W. Jin, and A. Oyler-yaniv. 2016. Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing. *Cell*. 165: 100–110.
 151. Legant, W.R., J.S. Miller, B.L. Blakely, D.M. Cohen, G.M. Genin, and C.S. Chen. 2010. Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices. *Nat. Methods*. 7: 969–971.
 152. Doh, J., and D.J. Irvine. 2006. Immunological synapse arrays: patterned protein surfaces that modulate immunological synapse structure formation in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 5700–5.
 153. Alameddine, R., A. Wahl, F. Pi, K. Bouzalmate, L. Limozin, A.M. Charrier, and K. Sengupta. 2017. from transfer mechanism to cell mechanosensing Printing functional protein nano-dots on soft elastomers : from transfer mechanism to cell mechanosensing Abstract Living cells sense the physical and chemical nature of their micro / nano environment. .
 154. Cazaux, S., A. Sadoun, M. Biarnes-pelicot, and M. Martinez. 2016. Ultramicroscopy Synchronizing atomic force microscopy force mode and fluorescence microscopy in real time for immune cell stimulation and activation studies. *Ultramicroscopy*. 160: 168–181.
 155. Dutta, P.K., Y. Zhang, A.T. Blanchard, C. Ge, M. Rushdi, K. Weiss, C. Zhu, Y. Ke, and K. Salaita. 2018. Programmable Multivalent DNA-Origami Tension Probes for Reporting Cellular Traction Forces. *Nano Lett.* 18: 4803–4811.
 156. Lim, T.S., A. Mortellaro, C.T. Lim, G.J. Hammerling, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2011. Mechanical Interactions between Dendritic Cells and T Cells Correlate with T Cell Responsiveness. *J. Immunol.* 187: 258–265.
 157. Hoffmann, S., B.H. Hosseini, M. Hecker, I. Louban, N. Bulbuc, N. Garbi, G.H. Wabnitz, Y. Samstag, J.P. Spatz, and G.J. Hämmerling. 2011. Single cell force spectroscopy of T cells recognizing a myelin-derived peptide on antigen presenting cells. *Immunol. Lett.* 136: 13–20.
 158. Puech, P.-H., K. Poole, D. Knebel, and D.J. Muller. 2006. A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM. *Ultramicroscopy*. 106: 637–44.
 159. Lim, T.S., and P. Ricciardi-Castagnoli. 2012. Single-cell force spectroscopy: mechanical insights into the functional impacts of interactions between antigen-presenting cells and T cells. *Immunol. Res.* 53: 108–14.
 160. Lim, T.S., J.K.H. Goh, A. Mortellaro, C.T. Lim, G.J. Hämmerling, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2012. CD80 and CD86 Differentially Regulate Mechanical Interactions of T-Cells with Antigen-Presenting Dendritic Cells and B-Cells. *PLoS One*. 7: 1–8.
 161. Glass, D.G., N. McAlinden, O.R. Millington, and A.J. Wright. 2017. A minimally invasive optical trapping system to understand cellular interactions at onset of an immune response. *PLoS One*. 12: 1–13.

Bibliographie

162. Chen, J., A. Ganguly, A.D. Mucsi, J. Meng, J. Yan, P. Detampel, F. Munro, Z. Zhang, M. Wu, A. Hari, M.D. Stenner, W. Zheng, P. Kubes, T. Xia, M.W. Amrein, H. Qi, and Y. Shi. 2017. Strong adhesion by regulatory T cells induces dendritic cell cytoskeletal polarization and contact-dependent lethargy. : 1–14.
163. Sung, L.A., M. Crimmins, S.J. Burakoff, and S.H.U. Chien. 1986. Dynamic changes in viscoelastic properties in cytotoxic T-lymphocyte- mediated killing. .
164. Sung, K.-L.P., L. a Sung, M. Crimmins, S.J. Burakoff, and S. Chien. 1986. Determination of junction avidity of cytolytic T cell and target cell. *Science* (80-.). 234: 1405–1408.
165. Xu, C., E. Gagnon, M.E. Call, J.R. Schnell, C.D. Schwieters, C. V. Carman, J.J. Chou, and K.W. Wucherpennig. 2008. Regulation of T Cell Receptor Activation by Dynamic Membrane Binding of the CD3 ϵ Cytoplasmic Tyrosine-Based Motif. *Cell*. 135: 702–713.
166. Bridgeman, J.S., A.K. Sewell, J.J. Miles, D.A. Price, and D.K. Cole. 2012. Structural and biophysical determinants of $\alpha\beta$ T-cell antigen recognition. *Immunology*. 135: 9–18.
167. Perez-jimenez, R., R. Liu, P. Roca-cusachs, J.M. Fernandez, and M.P. Sheetz. 2009. Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding. 323: 638–641.
168. Tozeren, A., K.L. Sung, and S. Chien. 1989. Theoretical and experimental studies on cross-bridge migration during cell disaggregation. *Biophys. J*. 55: 479–487.
169. Suetsugu, S., K. Murayama, A. Sakamoto, K. Hanawa-Suetsugu, A. Seto, T. Oikawa, C. Mishima, M. Shirouzu, T. Takenawa, and S. Yokoyama. 2006. The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation. *J. Biol. Chem*. 281: 35347–35358.
170. Kumari, S. 2014. T cell antigen receptor activation and actin cytoskeleton remodeling. *Biochim Biophys Acta*. 29: 997–1003.
171. Liu, Y., H. Su, B.D. Evavold, and K. Salaita. 2016. Ratiometric Tension Probes for Mapping Receptor Forces and Clustering at Intermembrane Junctions. .
172. Carson, R.T., K.M. Vignali, D.L. Woodland, and D. a a Vignali. 1997. T cell receptor recognition of MHC class II-bound peptide flanking residues enhances immunogenicity and results in altered TCR V region usage. *Immunity*. 7: 387–399.
173. Allen, P.M., and E.R. Unanue. 1984. Processing and Presentation of Hen Egg-White Lysozyme by Macrophages. *Immunobiology*. 168: 182–188.
174. Kappler, B.J.W., B. Skidmore, J. White, and A.N.P. Marrack. 1981. Recognition* By JOHN W. KAPPLER, BARRY SKIDMORE, JANICE WHITE,. 153: 1198–1214.
175. Kozono, H., J. White, J. Clements, P. Marrack, and J. Kappler. 1994. Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptide. *Nature*. 3676: 19.

Bibliographie

176. Velazquez, C., R. DiPaolo, and E.R. Unanue. 2001. Quantitation of Lysozyme Peptides Bound to Class II MHC Molecules Indicates Very Large Differences in Levels of Presentation. *J. Immunol.* 166: 5488–5494.
177. Salles, A. 2010. INFLUENCE DE L'ORGANISATION LATÉRALE DE LA MEMBRANE SUR L'ACTIVATION LYMPHOCYTAIRE T. .
178. Sergé, A., N. Bertaux, H. Rigneault, and D. Marguet. 2008. Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nat. Methods.* 5: 687–694.
179. Hamon, Y., D. Trompier, Z. Ma, V. Venegas, M. Pophillat, V. Mignotte, Z. Zhou, and G. Chimini. 2006. Cooperation between engulfment receptors: The case of ABCA1 and MEGF10. *PLoS One.* 1.
180. Chang, J.C., G.J. Brewer, and B.C. Wheeler. 2003. A modified microstamping technique enhances polylysine transfer and neuronal cell patterning. *Biomaterials.* 24: 2863–2870.
181. Binnig, G., and C.F. Quate. 1986. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56: 930–933.
182. Franz, C.M., A. Taubenberger, P.-H. Puech, and D.J. Muller. 2007. Studying integrin-mediated cell adhesion at the single-molecule level using AFM force spectroscopy. *Sci. STKE.* 2007: pl5.
183. Helenius, J., C.-P. Heisenberg, H.E. Gaub, and D.J. Muller. 2008. Single-cell force spectroscopy. *J. Cell Sci.* 121: 1785–1791.
184. Wojcikiewicz, E.P., M.H. Abdulreda, X. Zhang, and V.T. Moy. 2006. Force spectroscopy of LFA-1 and its ligands, ICAM-1 and ICAM-2. *Biomacromolecules.* 7: 3188–95.
185. Taubenberger, A. V., D.W. Hutmacher, and D.J. Muller. 2014. Single-Cell Force Spectroscopy, an Emerging Tool to Quantify Cell Adhesion to Biomaterials. *Tissue Eng. Part B Rev.* 20: 40–55.
186. Chalovich, J.M., and E. Eisenberg. 2013. NIH Public Access. *Magn Reson Imaging.* 31: 477–479.
187. Roca-Cusachs, P., V. Conte, and X. Trepast. 2017. Quantifying forces in cell biology. *Nat. Cell Biol.* 19: 742–751.
188. Schillers, H., and P. Parot. 2017. Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy Procedure (SNAP) for Measuring Soft and Biological Samples Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy Procedure (SNAP) for Measuring Soft and Biological Samples. .
189. Jaschke, M. 1995. Calculation of thermal noise. 6: 1–7.
190. Photoresist, N.T. 2002. Nano™ su-8 2000. Exposure. .
191. Chalmeau, J., C. le Grimellec, J. Sternick, and C. Vieu. 2012. Patterned domains of supported phospholipid bilayer using microcontact printing of Pll-g-PEG molecules. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 89: 188–95.
192. von Post, F. 2007. Microcontact printing of antibodies in complex with conjugated polyelectrolytes. .
193. Graber, D.J., T.J. Zieziulewicz, D. a. Lawrence, W. Shain, and J.N. Turner. 2003. Antigen binding

Bibliographie

- specificity of antibodies patterned by microcontact printing. *Langmuir*. 19: 5431–5434.
194. Fink, J., M. Théry, A. Azioune, R. Dupont, F. Chatelain, M. Bornens, and M. Piel. 2007. Comparative study and improvement of current cell micro-patterning techniques. *Lab Chip*. 7: 672–680.
195. Wu, Y.I., D. Frey, O.I. Lungu, A. Jaehrig, I. Schlichting, B. Kuhlman, and K.M. Hahn. 2009. A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature*. 461: 104–8.
196. Cazaux, S., A. Sadoun, M. Pélicot-Biarnes, M. Martinez, S. Obeid, P. Bongrand, L. Limozin, and P.H. Puech. 2016. Synchronizing atomic force microscopy force mode and fluorescence microscopy in real time for immune cell stimulation and activation studies. *Ultramicroscopy*. 160: 168–181.
197. Cazaux, S. 2013. Stimulation mécanique de cellules immunitaires et suivi de leur activation par fluorescence. .
198. Harris, A.R., and G.T. Charras. 2011. Experimental validation of atomic force microscopy-based cell elasticity measurements. *Nanotechnology*. 22: 345102.
199. Franz, C.M., A. Taubenberger, P.-H. Puech, and D.J. Muller. 2007. Studying integrin-mediated cell adhesion at the single-molecule level using AFM force spectroscopy. *Sci. STKE*. 2007: pl5.
200. Théry, M., and M. Piel. 2009. Adhesive micropatterns for cells: A microcontact printing protocol. *Cold Spring Harb. Protoc*. 4: 1–12.
201. Rigato, A., F. Rico, F. Eghiaian, M. Piel, and S. Scheuring. 2015. Atomic Force Microscopy Mechanical Mapping of Micropatterned Cells Shows Adhesion Geometry- Dependent Mechanical Response on Local and. *ACS Nano*. 9: 5846–5856.
202. Lam, K., and A. Upadhyaya. 2017. Dynamic microtubules regulate cellular contractility during T-cell activation. .
203. Santos, A.M., A. Ponjavic, M. Fritzsche, R.A. Fernandes, J.B. De La Serna, M.J. Wilcock, F. Schneider, I. Urbančič, J. McColl, C. Anzilotti, K.A. Ganzinger, M. Aßmann, D. Depoil, R.J. Cornall, M.L. Dustin, D. Klenerman, S.J. Davis, C. Eggeling, and S.F. Lee. 2018. Capturing resting T cells: The perils of PLL. *Nat. Immunol*. 19: 203–205.
204. Sherman, E., V. Barr, S. Manley, G. Patterson, I. Akpan, C.K. Regan, R.K. Merrill, C.L. Sommers, J. Lippincott-schwartz, and L.E. Samelson. 2011. Functional nanoscale organization of signaling molecules downstream of the T cell antigen receptor. 35: 705–720.
205. Cordoba, S.-P., K. Choudhuri, H. Zhang, M. Bridge, A.B. Basat, M.L. Dustin, and P.A. van der Merwe. 2013. The large ectodomains of CD45 and CD148 regulate their segregation from and inhibition of ligated T-cell receptor. *Blood*. .
206. Hornung, A. 2016. Two-dimensional migration of human effector T-cells : Integrin-dependent motility studies under shear stress. .

Bibliographie

207. Zhao, Y., and Y.L. Marcel. 1996. Serum albumin is a significant intermediate in cholesterol transfer between cells and lipoproteins. *Biochemistry*. 35: 7174–7180.
208. Ha, J.S., C.E. Ha, J.T. Chao, C.E. Petersen, A. Theriault, and N. V. Bhagavan. 2003. Human serum albumin and its structural variants mediate cholesterol efflux from cultured endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1640: 119–128.
209. Clark, A.G., K. Dierkes, and E.K. Paluch. 2013. Monitoring actin cortex thickness in live cells. *Biophys. J.* 105: 570–580.
210. Paluch, E.K., C.M. Nelson, N. Biais, B. Fabry, J. Moeller, B.L. Pruitt, C. Wollnik, G. Kudryasheva, F. Rehfeldt, and W. Federle. 2015. Mechanotransduction: Use the force(s). *BMC Biol.* 13: 1–14.
211. Sadoun, A., and P.-H. Puech. 2017. Quantifying CD95/cI-CD95L implications in cell mechanics & membrane tension by atomic force microscopy based force measurements. *Methods Cell Biol.* .
212. Rico, F., C. Chu, M.H. Abdulreda, Y. Qin, and V.T. Moy. 2010. Temperature modulation of integrin-mediated cell adhesion. *Biophys. J.* 99: 1387–96.
213. Webster, K.D., W.P. Ng, and D. a Fletcher. 2014. Tensional homeostasis in single fibroblasts. *Biophys. J.* 107: 146–55.
214. Canovi, E.P., A.J. Zollinger, S.N. Tam, M.L. Smith, D. Stamenovi, Z. Aj, T. Sn, and S. MI. 2016. Tensional homeostasis in endothelial cells is a multicellular phenomenon. : 528–535.
215. Dejardin, M.-J., A. Hemmerle, A. Sadoun, Y. Hamon, P.-H. Puech, K. Sengupta, and L. Limozin. 2018. Lamellipod reconstruction by three dimensional reflection interference contrast nanoscopy (3D-RICN). *Nano Lett.* : acs.nanolett.8b03134.
216. Richelme, F., A. Benoliel, and P. Bongrand. 2000. Dynamic Study of Cell Mechanical and Structural Responses to Rapid Changes of Calcium Level. 105: 93–105.
217. Joseph, N., B. Reicher, and M. Barda-Saad. 2014. The calcium feedback loop and T cell activation: how cytoskeleton networks control intracellular calcium flux. *Biochim. Biophys. Acta.* 1838: 557–68.
218. Al-Aghbar, M.A., Y.S. Chu, B.M. Chen, and S.R. Roffler. 2018. High-affinity ligands can trigger T cell receptor signaling without CD45 segregation. *Front. Immunol.* 9.
219. Chakraborty, A.K., and A. Weiss. 2014. Insights into the initiation of TCR signaling. *Nat. Immunol.* 15: 798–807.
220. Zamoyska, R. 2007. Why Is There so Much CD45 on T Cells? *Immunity.* 27: 421–423.
221. McNeill, L., R.J. Salmond, J.C. Cooper, C.K. Carret, R.L. Cassady-Cain, M. Roche-Molina, P. Tandon, N. Holmes, and D.R. Alexander. 2007. The Differential Regulation of Lck Kinase Phosphorylation Sites by CD45 Is Critical for T Cell Receptor Signaling Responses. *Immunity.* 27: 425–437.
222. Zhou, Z., E. Hartwig, and H.R. Horvitz. 2001. CED-1 Is a Transmembrane Receptor that Mediates Cell

Bibliographie

- Corpse Engulfment in *C. elegans*. *Cell*. 104: 43–56.
223. MacDonald, J.M., M.G. Beach, E. Porpiglia, A.E. Sheehan, R.J. Watts, and M.R. Freeman. 2006. The *Drosophila* Cell Corpse Engulfment Receptor Draper Mediates Glial Clearance of Severed Axons. *Neuron*. 50: 869–881.
224. Chung, W.S., L.E. Clarke, G.X. Wang, B.K. Stafford, A. Sher, C. Chakraborty, J. Joung, L.C. Foo, A. Thompson, C. Chen, S.J. Smith, and B.A. Barres. 2013. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*. 504: 394–400.
225. Morizawa, Y.M., Y. Hirayama, N. Ohno, S. Shibata, E. Shigetomi, Y. Sui, J. Nabekura, K. Sato, F. Okajima, H. Takebayashi, H. Okano, and S. Koizumi. 2017. Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nat. Commun.* 8: 1–14.
226. Holterman, C.E., F. Le Grand, S. Kuang, P. Seale, A. Michael, C.E. Holterman, F. Le Grand, S. Kuang, and M.A. Rudnicki. 2007. Megf10 Regulates the Progression of the Satellite Cell Myogenic Program. *J. Cell Biol.* 179: 911–922.
227. Logan, C. V., B. Lucke, C. Pottinger, Z.A. Abdelhamed, D.A. Parry, K. Szymanska, C.P. Diggle, A. V. Van Riesen, J.E. Morgan, G. Markham, I. Ellis, A.Y. Manzur, A.F. Markham, M. Shires, T. Helliwell, M. Scotto, C. Hübner, D.T. Bonthron, G.R. Taylor, E. Sheridan, F. Muntoni, I.M. Carr, M. Schuelke, and C.A. Johnson. 2011. Mutations in MEGF10, a regulator of satellite cell myogenesis, cause early onset myopathy, areflexia, respiratory distress and dysphagia (EMARDD). *Nat. Genet.* 43: 1189–1193.
228. Suzuki, E., and M. Nakayama. 2007. MEGF10 is a mammalian ortholog of CED-1 that interacts with clathrin assembly protein complex 2 medium chain and induces large vacuole formation. *Exp. Cell Res.* 313: 3729–3742.
229. Iram, T., Z. Ramirez-Ortiz, M.H. Byrne, U.A. Coleman, N.D. Kingery, T.K. Means, D. Frenkel, and J. El Khoury. 2016. Megf10 Is a Receptor for C1Q That Mediates Clearance of Apoptotic Cells by Astrocytes. *J. Neurosci.* 36: 5185–5192.
230. Te Riet, J., J. Helenius, N. Strohmeyer, A. Cambi, C.G. Figdor, and D.J. Müller. 2014. Dynamic coupling of ALCAM to the actin cortex strengthens cell adhesion to CD6. *J. Cell Sci.* 127: 1595–606.
231. Wu, H.W., T. Kuhn, and V.T. Moy. 2006. Mechanical properties of L929 cells measured by atomic force microscopy: Effects of anticytoskeletal drugs and membrane crosslinking. *Scanning*. 20: 389–397.
232. Schmitz, J., M. Benoit, and K. Gottschalk. 2008. The Viscoelasticity of Membrane Tethers and Its Importance for Cell Adhesion. 95: 1448–1459.
233. Preira, P., M.-P. Valignat, J. Bico, and O. Théodoly. 2013. Single cell rheometry with a microfluidic constriction: Quantitative control of friction and fluid leaks between cell and channel walls. *Biomicrofluidics*. 7: 24111.
234. Hanke, J.H., J.P. Gardner, R.L. Dow, P.S. Changelian, W.H. Brissette, E.J. Weringer, B.A. Pollok, and P.A.

Bibliographie

- Connelly. 1996. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *J Biol Chem.* 271: 695–701.
235. Carlomagno, F., D. Vitagliano, T. Guida, F. Basolo, M.D. Castellone, R.M. Melillo, A. Fusco, and M. Santoro. 2003. Efficient inhibition of RET/papillary thyroid carcinoma oncogenic kinases by 4-amino-5-(4-chloro-phenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 1897–1902.
236. Yoshizumi, M., J.I. Abe, J. Haendeler, Q. Huang, and B.C. Berk. 2000. Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 275: 11706–11712.
237. Chen, J.K., J. Capdevila, and R.C. Harris. 2000. Overexpression of C-terminal Src kinase blocks 14,15-epoxyeicosatrienoic acid-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *J. Biol. Chem.* 275: 13789–13792.
238. Guillou, L., A. Babataheri, P.-H. Puech, A.I. Barakat, and J. Husson. 2016. Dynamic monitoring of cell mechanical properties using profile microindentation. *Sci. Rep.* 6: 21529.
239. Hassani, H. 2007. Singular Spectrum Analysis: Methodology and Comparison. *J. Data Sci.* 5: 239–257.
240. Lim, T.S., A. Mortellaro, C.T. Lim, G.J. Hämmerling, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2011. Mechanical interactions between dendritic cells and T cells correlate with T cell responsiveness. *J. Immunol.* 187: 258–65.
241. Huang, X., H. Guo, C. Wang, J. Mu, H. Zhang, Z. Liang, J. Cai, and C. Zhou. 2016. Detection of CD28/CD86 co-stimulatory molecules and surface properties of T and dendritic cells: An AFM study. *Scanning.* 38: 365–375.
242. Wojcikiewicz, E.P., X. Zhang, and V.T. Moy. 2004. Force and Compliance Measurements on Living Cells Using Atomic Force Microscopy (AFM). *Biol. Proced. Online.* 6: 1–9.
243. Piel, M., S. Scheuring, A. Rigato, and F. Rico. 2015. Atomic Force Microscopy Mechanical Mapping of Micropatterned Cells Shows Adhesion Geometry-Dependent Mechanical Response on Local and Global Scales. .
244. Wu, A. 2016. Développement de cellules présentatrices modèles de géométrie et mécanique contrôlées pour l'étude de l'activation T. .
245. Ghesquiere-Dierickx, L. 2015. Comment imposer une forme à une cellule immunitaire? .
246. Dejardin, M. 2016. Caractérisation par microscopies quantitatives des lamellipodes de cellules présentatrices modèle pour l'étude de l'activation des lymphocytes T. : 0–42.
247. Limozin, L., and K. Sengupta. 2009. Quantitative reflection interference contrast microscopy (RICM) in soft matter and cell adhesion. *ChemPhysChem.* 10: 2752–2768.
248. Dejardin, M.-J. 2017. No Title. .
249. Fouqué, A., L. Debure, and P. Legembre. 2014. The CD95/CD95L signaling pathway: a role in

Bibliographie

- carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1846: 130–41.
250. Edmond, V., F. Dufour, G. Poiroux, K. Shoji, M. Malleter, A. Fouqué, S. Tazuin, R. Rimokh, O. Sergent, A. Penna, A. Dupuy, T. Levade, N. Theret, O. Micheau, B. Ségui, and P. Legembre. 2015. Downregulation of ceramide synthase-6 during epithelial-to-mesenchymal transition reduces plasma membrane fluidity and cancer cell motility. *Oncogene.* 34: 996–1005.
251. Ndao, O. 2017. Etudes des propriétés mécaniques des lymphocytes T par pinces optiques. .
252. Chang, V.T., R.A. Fernandes, K.A. Ganzinger, S.F. Lee, C. Siebold, J. McColl, P. Jönsson, M. Palayret, K. Harlos, C.H. Coles, E.Y. Jones, Y. Lui, E. Huang, R.J.C. Gilbert, D. Klenerman, A.R. Aricescu, and S.J. Davis. 2016. Initiation of T cell signaling by CD45 segregation at “close contacts.” *Nat. Immunol.* 17: 574–582.
253. Wawrezinieck, L., H. Rigneault, D. Marguet, and P.F. Lenne. 2005. Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization. *Biophys. J.* 89: 4029–4042.
254. Quintana, A., C. Kummerow, C. Junker, U. Becherer, and M. Hoth. 2009. Cell Calcium Morphological changes of T cells following formation of the immunological synapse modulate intracellular calcium signals. 45: 109–122.
255. Heinrich, V., and C. Ounkomol. 2007. Force versus axial deflection of pipette-aspirated closed membranes. *Biophys. J.* 93: 363–72.

Glossaire

Microscopie à force atomique : technique de microscopie n'utilisant pas la lumière blanche et est donc affranchie des problèmes de diffraction. Son principe repose sur le mouvement d'une pointe très fine sur l'objet que l'on veut étudier. L'AFM pour atomic force microscopy peut être utilisé en deux modes : un mode imagerie permettant d'obtenir une image en très haute résolution (nm) obtenue grâce au scan de la pointe sur l'objet étudié ou un mode force spectroscopy permettant de mesurer diverses caractéristiques biophysiques telles que : l'élasticité, l'adhésion, la tension de membrane etc... La gamme de force pouvant être utilisée varie de 5 à 10000 pN et permet de mesurer des interactions allant de l'échelle la molécule unique à l'échelle de la cellule/tissu.

Biomembrane force probe : Technique utilisée pour mesurer des forces en biologie qui repose sur un système de micropipettes dont la pression est contrôlée par un système de colonnes à eau ou air (aspiration). Elle repose sur le déplacement, le plus souvent, d'une bille accrochée à un globule rouge de rigidité connu qui agira comme ressort. Le déplacement suivant l'axe des abscisses x permettra de mesurer diverses propriétés biophysiques identiques à celle de l'AFM. Toutefois, la gamme de force que l'on peut utilisée est plus faible et plus restreinte allant de 0.5 à 1000 pN.

Pinces optiques : Technique aussi appelée optical tweezers et utilisée pour mesurer des forces en biologies. Cette technique repose sur la formation d'un piège optique grâce à un laser dans lequel on peut attraper une bille ou une cellule que l'on va déplacer au contact de l'objet étudié. C'est le déplacement de l'objet par rapport au centre du piège qui va permettre de mesurer diverses propriétés biophysiques. La gamme de force utilisable varie de 0.1 à 150pN.

Microcontact printing : Technique d'impression protéique ou patterning sur une surface. Cette technique permet de transférer une encre ou ink d'un tampon sur une surface permettant ainsi de créer des motifs de l'ordre du micromètre à la surface.

Tampon : Structure présentant les motifs que l'on veut imprimer à la surface. Ils sont réalisés en PDMS.

PDMS : Le polydiméthylsiloxane est un polymère organominéral de la famille des siloxanes. L'amodiméthicone est un dérivé du diméthicone.