

Reconnaissance, adhesion et mecanique cellulaire A l'interface entre la physique et la biologie

Pierre-Henri Puech

▶ **To cite this version:**

Pierre-Henri Puech. Reconnaissance, adhesion et mecanique cellulaire A l'interface entre la physique et la biologie . Interactions cellulaires [q-bio.CB]. AMU, 2009. tel-01105061

HAL Id: tel-01105061
https://hal.science/tel-01105061

Submitted on 19 Jan 2015

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

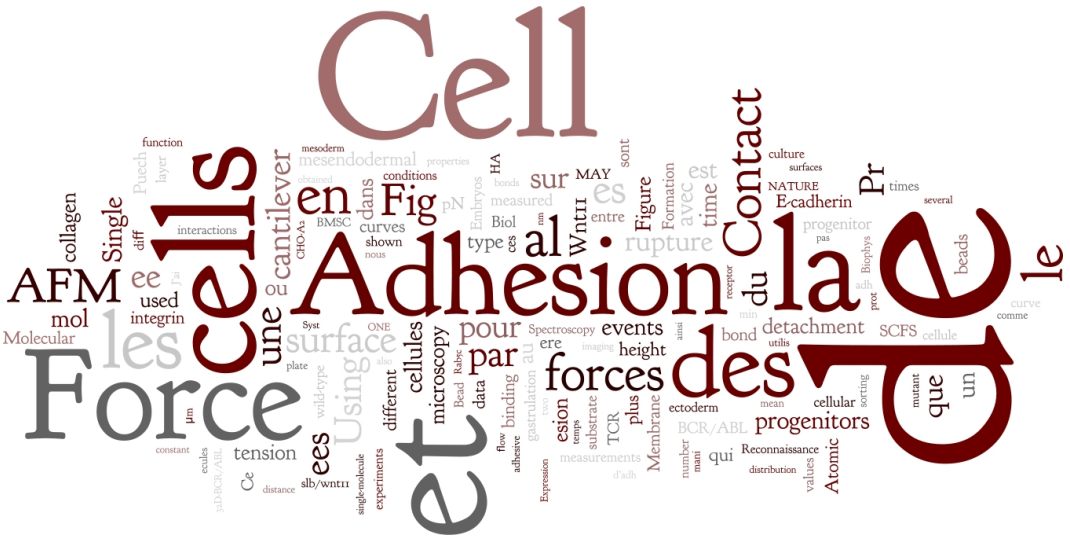
Aix-Marseille Université
Faculté des sciences de Luminy

Habilitation à diriger des recherches

Reconnaissance, adhésion et mécanique cellulaire

A l'interface entre la physique et la biologie

Pierre-Henri Puech


Cell
Adhesion
Force
cells
et
de
la
des
les
une
en
Contact
Fig
AFM
Single
collagen
cantilever
surface
pour
par
forces
Using
microscopy
cellules
different
tension
ees
al
sur
rupture
progenitors
detachment
bond
events
Spectroscopy
height
Membrane
TCR
BCR/ABL
Atomic
Reconnaissance
E-cadherin
NATURE
progenitor
SCFS
beads
Pr
le
que
un
qui
ou
du
dans
avec
est
time
Figure
Formation
MAY
sont
mesendodermal
conditions
curves
shown
BMSC
Biol
type
measured
Embryos
pN
Wnt11
entre
mol
Molecular
used
integrin
ee
Syst
ONE
plate
wild-type
Bead
Rabc
data
binding
substrate
plus
ectoderm
cellular
mutant
sorting
mean
culture
surfaces
times
several
receptor
Biophys
prot
curve
comme
utilis
ainsi
imagery
two
gastrulation
flow
adhesive
Expression
measurements
number
distribution
values
Ce
distance
slb/wnt11
single-molecule
experiments
constant
cellules
slb-BCR/Abl
function
Puech
layer
diff
interactions
CHO-A5
nous
HA
bonds
sont
Biol
ces
entre
Figure
Formation
avec
time
NATURE
E-cadherin
progenitor
pas
receptor
Biophys
prot
beads
curve
comme
min
utilis
ainsi
imagery
two
gastrulation
flow
adhesive
Expression
measurements
number
distribution
values
Atomic
Reconnaissance
qui
BCR/ABL
ectoderm
mean
cellular
sorting
mutant
que
un
SCFS
cellule
bond
detachment
Spectroscopy
events
height
Membrane
TCR
plus
substrate
binding
data
Bead
Rabc
microscopy
cellules
different
Using
wild-type
plate
Syst
ONE
une
surface
pour
par
forces
des
de
la
le
Contact
Pr
Adhesion
Cell
Force
les
cells
en
Fig
AFM
Single
collagen
cantilever
mesendodermal
conditions
curves
shown
BMSC
CHO-A5
Biol
type
measured
Embryos
pN
Wnt11
entre
Figure
Formation
avec
time
sur
MAY
sont
HA
bonds

Nul n'a jamais écrit ou peint, sculpté, modelé, construit, inventé,
que pour sortir en fait de l'enfer.

Antonin Artaud

Aucun peintre, sculpteur, écrivain ou scientifique
n'a été blessé ou malmené intentionnellement
et aucun personnage n'est de fiction
dans ce qui suit...

Toute ressemblance avec des personnages
existants ou ayant existé
n'est pas fortuite...

Table des matières

1 Notice **6**
- 1.1 Données personnelles . . . 6
- 1.2 Curriculum vitae . . . 7
  - 1.2.1 Formation et expérience de recherche . . . 7
  - 1.2.2 Encadrement et enseignement . . . 7
  - 1.2.3 Domaines de recherche . . . 8
  - 1.2.4 Prix et bourses obtenues . . . 8
  - 1.2.5 Implication dans des instances nationales . . . 9
  - 1.2.6 Implication dans le laboratoire . . . 9
  - 1.2.7 Séminaires invités (2005 – . . .) . . . 9
  - 1.2.8 Participation à des conférences (2005 - . . .) . . . 9
- 1.3 Publications . . . 10

2 Travaux de recherche antérieurs **12**
- 2.1 Doctorat (2000-2003) . . . 12
- 2.2 Stage post doctoral (2003-2005) . . . 15

3 Travaux de recherche **21**
- 3.1 Pourquoi (et comment) mesurer des forces en biologie ? . . . 21
- 3.2 Imagerie AFM . . . 24
- 3.3 *Single Cell Force Spectroscopy* . . . 24
  - 3.3.1 Adhésion des intégrines $\alpha_2\beta_1$ sur du collagène de type I . . . 25
  - 3.3.2 Expression de BCR/ABL et adhésion via des intégrines β_1 . . . 25
  - 3.3.3 Organisation de l'embryon, adhésion et forces de tension . . . 26
  - 3.3.4 Traitement des données . . . 27
- 3.4 Mort et mécanique cellulaires . . . 27
- 3.5 Glycocalyx et AFM / RICM / Chambre à flux . . . 28
- 3.6 Reconnaissance pMHC / TCR . . . 29
  - 3.6.1 Le complexe peptide / MHC est la carte d'identité du soi . . . 29
  - 3.6.2 Cette carte d'identité est lue par le TCR . . . 30
  - 3.6.3 Physique de la reconnaissance TCR/pMHC *vs.* activation . . . 31
  - 3.6.4 Système cellulaire utilisé . . . 33
  - 3.6.5 Utilisation du Biomembrane Force Probe (BFP) . . . 34
  - 3.6.6 Utilisation de l'AFM . . . 37
  - 3.6.7 Application "molécule / molécule" . . . 40
  - 3.6.8 Quelques pistes... . . . 41

4 Projet de recherche **44**
4.1 Contexte . . . 44
4.2 Description du projet . . . 45
4.3 Méthodologie proposée . . . 48
4.3.1 Obtenir des informations sur la reconnaissance moléculaire TCR / pMHC et les paramètres la contrôlant . . . 48
4.3.2 Dévelopement de sondes de FRET permettant de suivre les phosphorylations post-reconnaissance par le TCR . . . 51
4.3.3 Couplage mesures de forces de reconnaissance et suivi de la signalisation "sous" le TCR . . . 51
4.3.4 Quelques mots sur les systèmes biologiques envisagés. . . . 53
4.4 Conclusion . . . 53

Bibliographie **55**

A Articles AFM **60**

Chapitre 1

Notice

1.1 Données personnelles

Nom : Puech
Prénom : Pierre-Henri
Date de naissance : 23 août 1975

Contact
Tél. professionnel : 04 91 82 88 68
e-mail : pierre-henri.puech@inserm.fr

Données administratives

Recruté CR2 en CSS7 (maintenant CSS3), prise de fonctions le 1er décembre 2005
Nommé CR1 en CSS3 en février 2009, avec effectivité au 1er décembre 2009

Laboratoire d'affectation

Laboratoire Inserm : UMR 600 "Adhésion et Inflammation"
Directeur : Pierre Bongrand, Professeur - Praticien Hospitalier
e-mail : pierre.bongrand@inserm.fr
INSERM UMR 600 - CNRS UMR 6212
Parc Scientifique de Luminy ; Case 937
13288 Marseille Cedex 09
Tél. (33) 491 82 88 50 - Fax (33) 491 82 88 51
URL : http ://www.marseille.inserm.fr/u600/

Appartenance administrative du laboratoire

Inserm / CNRS / Université de la Méditerranée / AP-HM

Domaines d'expertise

Physique de la matière molle, biophysique, systèmes biomimétiques, adhésion cellulaire, mécanique cellulaire, mesures de forces *in vitro* ou avec cellule unique, microscopie à force atomique (AFM), micromanipulations, imagerie AFM — biologie : du développement, cellulaire, immunologie.

1.2 Curriculum vitae

1.2.1 Formation et expérience de recherche

Depuis Dec. 2005 : Chargé de recherches à l'Inserm – UMR 600 (Marseille, France) directeur : Pr. P. Bongrand - http ://www.marseille.inserm.fr/u600/
Déc. 2003 – déc. 2005 : Stage post-doctoral dans le groupe du Pr. D. J. Müller (Dresden, Allemagne) ; labor atoires : Biotec, TU-Dresden et Max Planck for Cell Biology and Genetics
Oct. 2000 – Oct. 2003 : Thèse en Physico-Chimie, Université Paris VI – soutenance : 10/20/03, mention très honorable, avec félicitations du jury ; effectuée dans le groupe du Pr. F. Brochard-Wyart ; laboratoire : UMR 168 CNRS / Institut Curie (Paris, France)
Oct. 2000 : Diplôme d'ingénieur de l'Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielle de la ville de Paris (ESPCI, Paris, France – http ://www.espci.fr/)
Oct. 1999 – Juin 2000 : Diplôme d'Etudes Approfondies (Matière condensée) mention très bien, rang : 1er - Université Paris VI

1.2.2 Encadrement et enseignement

Avril 2009 : Cours en Mastère Biologie cellulaire et Immunologie - université de médecine de Marseille
Mars 2009 / Avril 2009 : Encadrement d'un stage d'ingénieur (D. Nevoltris, ESIL Marseille, 2ème année)
Août 2008 : cours à l'AFM BioMed Summer School Marcoule 2008
Juin 2008 / Août 2008 : Encadrement d'un stage d'ingénieur (T. Biederman, Ecole Centrale Marseille, 2ème année)
Avril 2008 / Mai 2008 : Encadrement d'un stage d'ingénieur (M. Seillier, ESIL Marseille, 2ème année)
Avril 2008 : Cours en Mastère Biologie cellulaire et Immunologie - université de médecine de Marseille
April 2008 : Cours pour une Formation Permanente de l'Inserm, "workshop # 183" (théorie et pratique)
Mai 2007 : Cours en Mastère Biologie cellulaire et Immunologie - université de médecine de Marseille
Déc. 2003 / Déc. 2005 : Responsable du projet CellHesion en collaboration avec JPK Instruments http ://www.jpk.com/
Depuis Nov. 2005 : Co-supervision d'une thèse (avec Dr. CP Heisenberg, Pr. DJ Müller) - (M. Krieg, TU-Dresden)
Depuis Sept. 2004 : Co-supervision d'une thèse (avec Dr. C.M. Franz, Pr. DJ Müller) - (A. Taubenberger, TU-Dresden)
Sept. 2005 / Juin 2005 : Encadrement d'un master 2 (M. Krieg, TU-Dresden)
Sept. 2004 / Juin 2004 : Encadrement d'un master 2 (A. Taubenberger, TU-Dresden)
Sept. 2000 / Sept. 2003 : Responsable de la partie "assemblées de molécules" d'un programme PIC "Adhesion" de l'Institut Curie, entre les départements de physique et de biologie.
Avril 2003 / Juin 2003 : Encadrement d'un master 1 (V. Askovic, Paris VI)
Oct. 2001 / Juin 2002 : Encadrement d'un master 2 (N. Borghi , Paris VI)

1.2.3 Domaines de recherche

Depuis 2005 (UMR 600 Inserm, Marseille, France) : (1) reconnaissance, adhésion et mécanique des cellules T, de l'échelle de la molécule unique jusqu'à l'intégration du signal au niveau cellulaire - techniques de micropipettes (MP), de *biomembrane force probe* (BFP) et d'AFM. Collaborations avec le Dr. C. Boyer (Centre d'Immunologie de Marseille Luminy (CIML), Marseille, France – http ://www.ciml.univ-mrs.fr/), les laboratoires du Pr. E. Evans (UBC, Vancouver, Canada) et du Pr. A. van der Merwe (Oxford, UK). (2) Mécanique cellulaire et mort cellulaire. Collaboration avec le groupe du Dr. P. Golstein (CIML).
Techniques : imagerie de surfaces par AFM, fluorescence - mesures de forces (MP, BFP, AFM), FACS.

Depuis 2003 (MPI-CBG / Biotec, Dresden, Germany et U600 Inserm) : Adhésion cellulaire étudiée par AFM en mode force (1) Biologie du dévelopement : adhésion et mécanique cellulaires et gastrulation du Zebrafish - mise au point d'un nouveau type d'AFM pour les mesures d'adhésion entre cellules ou entre cellule et substrat. Collaborations avec le Dr. C.-P. Heisenberg (MPI-CBG, Dresden) et l'entreprise JPK Instruments (Berlin). (2) Etude de l'adhésion sur des substrats nano-texturés. Evolution de l'adhésion entre la molécule individuelle et la cellule unique, avec recrutement des molécules d'adhésion. Collaboration avec le Dr. C. M. Franz (Université de Karslrühe, Allemagne) (3) Corrélation entre les propriétés adhésives et mécaniques à l'échelle de la cellule unique.

2000-2003 (Institut Curie UMR 168, Paris, France) : Adhésion de vésicules lipidiques géantes décorées par des protéines. (1) Etude par microscopie interférentielle de leur adhésion sur des bicouches supportées via une colle forte (biotine/streptavidine) ou une colle faible (fragments de cadhérines). (2) Modélisation analytique de la dynamique d'adhésion (3) Etude des propriétés mécaniques de ces membranes par formation de tubes lipidiques attachés à un substrat, sous flux (4) Etude de l'influence de molécules tensioactives sur la dynamique de fermeture de pores géants dans les vésicules et impact sur les propriétés mécaniques de la bicouche. Collaborations avec le Dr. H. Feracci (UMR 144, Institut Curie) et le Pr. P.-G. de Gennes (Collège de France / Institut Curie)

1999-2000 (Institut Curie et Laboratoire de Physico-Chimie Théorique, ESPCI, Paris) : Adhésion sur substrats modifiés de spores de champignons et de billes d'élastomères. Micromanipulations de spores uniques. Etudes d'adhésion sous flux, en RICM. Mise au point d'un micro-"karscher" afin de mesurer des énergies d'adhésion sur particule unique. Collaboration avec le laboratoire de physico-chimie théorique (ESPCI, Paris) et Rhône-Poulenc.

1.2.4 Prix et bourses obtenues

Déc. 2005 : "Initiative Post-doc" - bourse de voyage, Ministère de la Recherche
Juin 2006 : Participant dans une "ANR Jeune Chercheur" (50%) - ADHEKON
Mai 2007 : Bourse d'installation de la ville de Marseille
Avril 2007 : Bourse Human Frontier Science Program Short Term
Mars 2008 : Bourse "Prise de risques", CNRS
Avril 2009 : Coordinateur d'une "ANR Jeune Chercheur" sélectionnée - DISSECTION

1.2.5 Implication dans des instances nationales

Depuis janvier 2009 : Membre de l'Observatoire des micro et nanotechnologies (OMNT : `http ://www.omnt.fr/`) "Micro Nano Systems for Biology"

1.2.6 Implication dans le laboratoire

Depuis janvier 2008 : Correspondant Formation pour l'Inserm
Depuis janvier 2009 : Correspondant Communication pour l'Inserm et le CNRS

1.2.7 Séminaires invités (2005 – . . .)

1. "Using AFM to investigate cell adhesion and mechanics" , LPN, Marcoussis - Invité par C. Gosse, déc. 2008.
2. "Molecular forces at cell surface : Measuring cellular adhesion and mechanics using AFM", AFM BioMed Summer School Marcoule, août 2008
3. "Molecular forces at cell surface : Measuring cellular adhesion and mechanics using AFM", Conférence de la Société Française de Biologie Cellulaire, Montpellier, juin 2008
4. "Molecular forces at cell surface : Measuring cellular adhesion and mechanics using AFM", Inserm Workshop 183, St Raphael, avril 2008
5. "Molecular forces at cell surface : Measuring cellular adhesion and mechanics using AFM", Institut Gustave Roussy, Paris - Invité par l'INSERM U753, avril 2008
6. "Molecular forces at cell surface : Measuring cellular adhesion and mechanics using AFM", Invité par l'Unité des Rickettsies, UMR 6020, La Timone, Marseille, mai 2007
7. "Atomic force microscopy in cellular adhesion and mechanics", JPK Seminar - INRA Versailles, mars 2007
8. "Les membranes : du modèle au vivant, une approche physique" - 3e Journée BCP – déc. 2006
9. "Atomic force microscopy in cellular adhesion and mechanics", Seminaire interne CIPBM, Marseille, 2006
10. "Gastrulation of Zebrafish Embryos, A Study of Cell Adhesion using Atomic Force Microscopy" Institut Pasteur de Paris / département de Biologie Cellulaire et Infection – avril 2006 Invité par Dr. Spencer Shorte
11. "Gastrulation of Zebrafish Embryos, A Study of Cell Adhesion using Atomic Force Microscopy" MPI-PKS (Dresden, Allemagne) – déc. 2005 Invité par Pr. F. Jülicher

1.2.8 Participation à des conférences (2005 - . . .)

1. EMBO Workshop "Visualizing Immune System Complexity" (Marseille, janvier 2009)
2. Conférence de la Société Française de Biologie Cellulaire (Montpellier - juin 2008)
3. Workshop Inserm 183 "Molecular interactions" (St. Raphael - avril 2008)
4. Conférence "De Gennes days" (Collège de France, Paris - avril 2008)
5. Conférence internationale Scanning Probe Microscopy, Sensors & Nanostructures, Montpellier, juin 2006

6. Ecole d'été de physique des Houches (Colloïdes et Biologie, avril 2006)
7. Symposium sur les mesures de forces en biologie (Molecular Forces of Life, Heidelberg, sept. 2006)

1.3 Publications

Les plus marquantes sont précédées de ★, celles référencées par Faculty of 1000 par ♡, celles avec page de couverture par Ⓢ

1. Ⓢ Atomic Force Microscopy : A Versatile Tool for Studying Cell Morphology, Adhesion and Mechanics Franz CM, **Puech PH**[*] CELLULAR AND MOLECULAR BIOENGINEERING 1(4) :1865-5025 2008

2. Tuning the formation and rupture of single ligand-receptor bonds by hyaluronan-induced repulsion Robert P, Sengupta K, **Puech PH**, Bongrand P, Limozin L BIOPHYSICAL JOURNAL Volume : 95 Issue : 8 Pages : 3999-4012 Published : OCT 15 2008

3. ★ BCR/ABL expression of myeloid progenitors increases beta 1-integrin mediated adhesion to stromal cells Fierro FA, Taubenberger A, **Puech PH**, et al. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY Volume : 377 Issue : 4 Pages : 1082-1093 Published : APR 4 2008

4. ★, ♡, Ⓢ Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish Krieg M, Arboleda-Estudillo Y, **Puech PH**, et al. NATURE CELL BIOLOGY Volume : 10 Issue : 4 Pages : 429-U122 Published : APR 2008

5. Studying integrin-mediated cell adhesion at the single-molecule level using AFM force spectroscopy. Franz CM, Taubenberger A, **Puech PH**, Muller DJ. SCIENCE STKE. 2007 Oct 2 ;2007(406) :pl5.

6. ★ Revealing early steps of alpha(2)beta(1) integrin-mediated adhesion to collagen type I by using single-cell force spectroscopy Taubenberger A, Cisneros DA, Friedrichs J, et al. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL Volume : 18 Issue : 5 Pages : 1634-1644 Published : MAY 2007

7. A new perspective on cell-cell adhesion Poole K, **Puech PH**, Muller D CYTOMETRY PART A Volume : 71A Issue : 1 Pages : 53-53 Published : JAN 2007

8. ★ A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM **Puech PH**, Poole K, Knebel D, et al. ULTRAMICROSCOPY Volume : 106 Issue : 8-9 Pages : 637-644 Published : JUN-JUL 2006

9. ★, ♡ Measuring cell adhesion forces of primary gastrulating cells from zebrafish using atomic force microscopy **Puech PH**, Taubenberger A, Ulrich F, et al. JOURNAL OF CELL SCIENCE Volume : 118 Issue : 18 Pages : 4199-4206 Published : SEP 15 2005

10. ★, ♡ Wnt11 functions in gastrulation by controlling cell cohesion through Rab5c and E-cadherin Ulrich F, Krieg M, Schotz EM, et al. DEVELOPMENTAL CELL Volume : 9

Issue : 4 Pages : 555-564 Published : OCT 2005

11. Dynamics of vesicle adhesion : spreading vs. dewetting coupled to binder diffusion **P.-H. Puech** ; V. Askovic ; P. -G. De Gennes ; F. Brochard-Wyart BIOPHYSICAL REVIEWS AND LETTERS, Volume 1, Issue 1 Pages : 85 - 95 ; 2006

12. Membrane tensiometer for heavy giant vesicles **Puech PH**, Brochard-Wyart F EUROPEAN PHYSICAL JOURNAL E Volume : 15 Issue : 2 Pages : 127-132 Published : OCT 2004

13. Adhesion between giant vesicles and supported bilayers decorated with chelated E-cadherin fragments **Puech PH**, Feracci H, Brochard-Wya F LANGMUIR Volume : 20 Issue : 22 Pages : 9763-9768 Published : OCT 26 2004

14. ★ Adhesion induced by mobile stickers : A list of scenarios de Gennes PG, **Puech PH**, Brochard-Wyart F LANGMUIR Volume : 19 Issue : 17 Pages : 7112-7119 Published : AUG 19 2003

15. Interaction of polyelectrolyte coated beads with phospholipid vesicles Fery A, Moya S, **Puech PH**, et al. COMPTES RENDUS PHYSIQUE Volume : 4 Issue : 2 Pages : 259-264 Published : MAR 2003

16. ★ Cascades of transient pores in giant vesicles : Line tension and transport Karatekin E, Sandre O, Guitouni H, et al. BIOPHYSICAL JOURNAL Volume : 84 Issue : 3 Pages : 1734-1749 Published : MAR 2003

17. ★ Line thermodynamics : Adsorption at a membrane edge **Puech PH**, Borghi N, Karatekin E, et al. PHYSICAL REVIEW LETTERS Volume : 90 Issue : 12 Article Number : 128304 Published : MAR 28 2003

18. ★ Giant vesicles under flows : Extrusion and retraction of tubes Rossier O, Cuvelier D, Borghi N, et al. LANGMUIR Volume : 19 Issue : 3 Pages : 575-584 Published : FEB 4 2003

Proceedings

1. Tethered Giant Vesicles under Flows : Extrusion of Tubes Borghi, N ; Rossier,O ; **Puech PH** ; Buguin, A ; Brochard-Wyart, F Proceedings of the First International Congress on Bio-Nanointerfaces (2003) – Tokyo (Japan)

Chapitre 2

Travaux de recherche antérieurs

Depuis mon DEA et ma thèse, je me suis intéressé à l'adhésion d'objets mous et biologiques d'un point de vue expérimental et théorique. J'ai tout d'abord suivi le chemin de la matière molle, en étudiant l'adhésion d'objets modèles : des vésicules géantes lipidiques mimant la membrane plasmique des cellules. Par suite, je me suis tourné de plus en plus vers la biologie au travers d'un stage post-doctoral à l'interface physique / biologie cellulaire et développement. Je me suis donc placé, de manière graduelle, à l'interface entre la physique et la biologie, où se situent mes centres d'intérêt actuels. Les quelques pages qui suivent résument, brièvement, les domaines de recherches abordés lors de ma thèse et de mon stage post-doctoral, et tenteront d'illustrer le virage d'un physicien de la matière molle vers la biologie, et maintenant l'immunologie.

2.1 Doctorat (2000-2003) - Physico-chimie / Biophysique

J'ai effectué ma thèse de doctorat dans le groupe du Pr. F. Brochard-Wyart (Institut Curie, Paris, France - `http ://www.curie.fr/`). Ce groupe est internationalement reconnu dans les domaines du mouillage et de l'adhésion en physique de la matière molle. Ma thèse a pérénisé l'introduction dans ce groupe des thématiques plus orientées vers la biologie, en particulier les phénomènes liés à l'adhésion et à la mécanique cellulaire.

Son texte, en intégralité, est disponible sur le serveur de "Thèses en ligne", à l'adresse suivante : `http ://tel.archives-ouvertes.fr/`.

J'y ai approché expérimentalement et théoriquement les mécanismes régissant l'adhésion de systèmes biomimétiques composés de membranes artificielles. J'ai développé la décoration de surfaces planes par des bicouches supportées fluides et la préparation de vésicules géantes (de diamètre entre 10 et 100μm) portant différents systèmes récepteur / ligand (Fig. 2.3A). L'interaction entre vésicules et entre vésicule / bicouche supportée a été étudiée. Deux types de colles moléculaires ont été examinées durant cette thèse : une colle "ultra-faible" (des fragments terminaux de E-cadhérine, une protéine d'adhésion cellule / cellule) et une "super-glue" (le couple streptavidine / biotine). Ces deux systèmes nous ont ainsi permis d'observer des scénarios d'adhésion variés et de les modéliser.

Grâce aux biologistes de l'UMR 144 de l'Institut Curie (directeur : J.-P. Thiery), des fragments de E-cadhérine ont été produits et rendus accessibles au travers de projets interdisciplinaires incitatifs de l'Institut Curie (IC-PCC) au département de physique. Ces fragments sont composés des deux domaines terminaux nommés EC1 et EC2 (Fig. 2.3B), censés être responsables des capacités adhésives de ces protéines au coeur de la cohésion des tissus(Perret et al., 2002). Leur adhésion est homophile (la clef et la serrure sont deux molécules du même type) et dépendante de la présence d'ions calcium. De

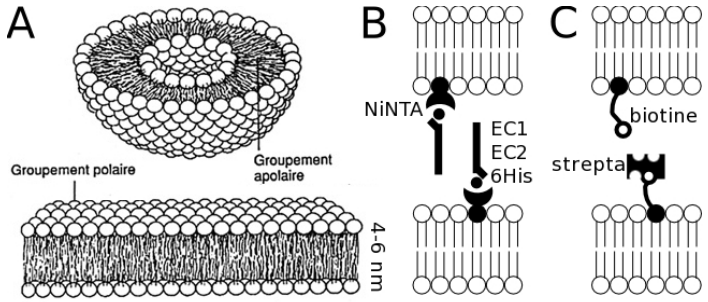


FIG. 2.1 – A : Schéma d'une vésicule et d'une bicouche lipidique supportée. B : utilisation de membranes décorées pour observer l'adhésion homophilique entre fragments de cadhérines immobilisés via un tag 6His sur des ions nickels capturés par des lipides à tête NTA. C : utilisation pour l'adhésion hétérophilique entre streptavidine (bas) et biotine (haut).

plus, une protéine portant une mutation ponctuelle rendant l'adhésion impossible a été produite et utilisée comme contrôle (W2A, pour tryptophane remplacé par alanine). Pour des raisons de purification et en vue de leur immobilisation orientée sur des surfaces (lames, billes de verre), ces deux protéines ont été produites avec un tag 6His lié au EC2. Afin d'utiliser celà, j'ai construit des vésicules géantes (GUVs) par électroformation et des bicouches supportées (SB) sur des lamelles de verre, par dépôt de Langmuir ou fusion de petites vésicules. Ces assemblages présentent en surface des lipides ayant une tête NTA(Ni), capables d'immobiliser le tag 6His, orientant ainsi les fragments perpendiculairement au plan de la bicouche de lipides, leur extrémité EC1 vers l'extérieur (Fig. 2.3B).

La chélation de la protéine a été caractérisée sur ces deux types d'objets par microscopie de fluorescence (à un ou deux photons, GUVs et SB) et par microscopie à force atomique (SB). Alors que l'adhésion entre vésicules géantes n'a pas montré d'une influence significative du calcium (peu de différences entre les cas avec et sans calcium), l'adhésion entre vésicule et bicouche supportée a montré l'existence d'une adhésion d'intensité très faible. Nous avons étudié ce phénomène par microscopie de contraste interférentiel (RICM, Fig. 2.2) qui permet de n'imager que la zone intime de contact entre les deux objets. La topologie de la zone d'adhésion est composée de petits points d'adhésion montrant, dans leur fréquence d'apparition, une forte dépendance quant à la présence dans le milieu de calcium et quant à la fonctionnalité de la protéine (E-cad WT pour *wildtype* par rapport au mutant W2A). Ces résultats ont été la première démonstration qu'un système d'adhésion faible peut être caractérisé de manière convaincante en utilisant ces systèmes de membranes modèles (Puech et al., 2004).

En parallèle de ceci, j'ai étudié l'interaction forte entre une bicouche supportée, contenant des lipides biotinylés et fonctionnalisés par de la streptavidine, et des vésicules géantes contenant des lipides biotinylés et/ou des lipides à tête PEG (pour créer une répulsion stérique) (Fig. 2.3C). Je me suis particulièrement intéressé aux facteurs gouvernant la morphologie et la dynamique de l'adhésion et de l'étalement des vésicules, comme par exemple la densité de ligands, leurs propriétés de diffusion latérale dans le plan de la membrane ainsi que la compétition entre adhésion récepteur / ligand et une répulsion stérique (lipides PEG), ainsi que l'effet de la tension de la membrane (Fig. 2.2). Les objets très mous (peu tendus) adhèrent via de petites zones d'adhésion qui grandissent rapidement (secondes) et fusionnent en zones plus grandes. Les objets les plus tendus ne présentent qu'une zone d'adhésion unique qui se développe lentement (minutes). Avec l'aide de P.-G. de Gennes et F. Brochard-Wyart, j'ai proposé plusieurs scénarios permettant d'expliquer

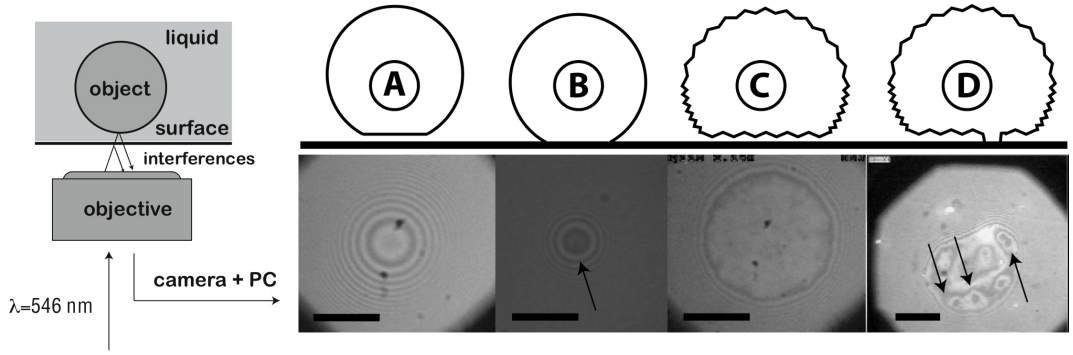


FIG. 2.2 – Principe de la microscopie en contraste interférentiel (RICM) et images de l'interface entre une vésicule géante et une surface fonctionnalisée dans différents cas. Vésicules tendues, très sphérique, non adhérente (A) et adhérente (B). On note l'existence d'une seule zone d'adhésion circulaire. Vésicules très molles, non adhérente et par conséquent fluctuante (C) et adhésive (D). On note l'apparition de petites zones d'adhésion, circulaires tant qu'elles ne fusionnent pas entre elles. Barres = 10μm.

les phénomènes observés et leur cinétique avec des approches inspirées de situations de mouillage tout en prenant en compte la diffusion des ligands et des récepteurs (de Gennes et al., 2003; Puech et al., 2006a). J'ai aussi introduit, à cette occasion, une méthode simple permettant de mesurer la tension de la membrane qui est un paramètre crucial contrôlant ces phénomènes, en même temps que les étalements sont observés (Puech and Brochard-Wyart, 2004).

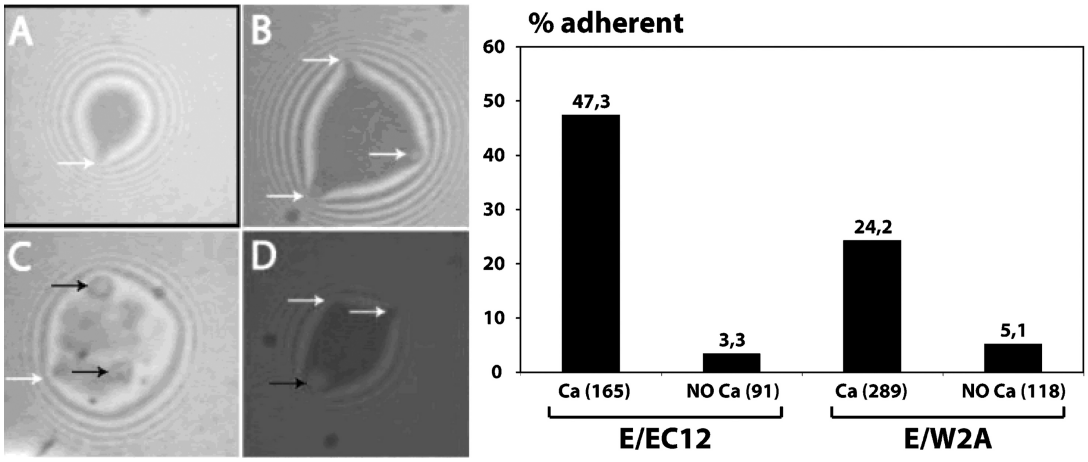


FIG. 2.3 – Différents types de zones de contact caractéristiques en présence de calcium, pour les fragments natifs de E-cadhérine. A : forme de contact la plus fréquente, ne présentant qu'un point unique ; B-D : différentes zones multi-adhérées présentant des points (flèches blanches) et des zones plus larges (flèches noires) – Quantification de l'occurence d'adhésion, en fonction de la présence ou non de calcium et de la mutation portant sur un tryptophane essentiel.

De plus, j'ai étudié les propriétés de transport au travers de la membrane ainsi que les propriétés mécaniques de celle-ci (Karatekin et al., 2003; Puech et al., 2003) en encadrant un stagiaire de DEA. En particulier, une méthode innovante de mesure de la tension de ligne de la membrane grâce à l'observation de pores géants (Fig. 2.4) apparaissant au sein de celle-ci lorsque mise sous tension a été utilisée. Nous avons pu non seulement mesurer ce paramètre, mais aussi jouer sur celui-ci en ajoutant des molécules tensioactives : du

Tween 20 et du Tween 80(Puech et al., 2003). Ces molécules diminuent la tension car elles cicatrisent le bord du pore (Fig. 2.4). Le cholestérol, qui lui rigidifie la membrane, s'exclue du bord du pore(Karatekin et al., 2003).

J'ai aussi contribué au développement de techniques novatrices de micromanipulation et de microfluidique afin d'extraire des tubes membranaires à partir de vésicules géantes, permettant d'en observer la dynamique d'extraction et de retraction (Rossier et al., 2003). Ces systèmes sont utilisés maintenant de manière routinière pour étudier la mécanique de membranes cellulaires au sein du groupe de l'Institut Curie.

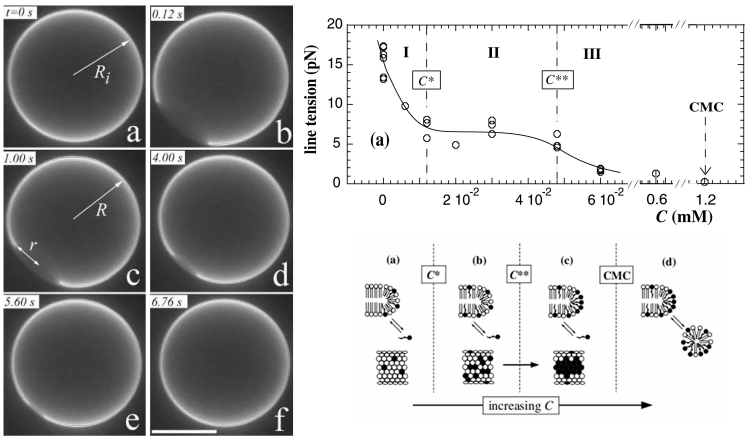


FIG. 2.4 – Gauche : pore géante transitoire apparaissant dans une vésicule géante, puis se refermant. Droite, isotherme d'adsorption du Tween 20 et mécanismes d'auto-organisation proposés pour rendre compte des différents régimes observés.

2.2 Stage post doctoral (2003-2005) - Biophysique / Biologie du développement / Biologie cellulaire

J'ai choisi par la suite d'effectuer un stage post-doctoral de deux ans au sein du groupe du Professeur Daniel J. Müller, à Dresden (Allemagne), tout d'abord au Max-Planck de Biologie Cellulaire et de Génétique (`http ://www.mpi-cbg.de/`) puis au Centre de Biotechnologie de université de Dresden (`http ://www.biotec.tu-dresden.de/`) que le Pr. Müller créait de toutes pièces. Le challenge supplémentaire de devoir "monter" un laboratoire de biologie fonctionnel (en particulier avec une plateforme de culture cellulaire) m'a guidé dans mon choix de rester en Europe.

Mon but premier a été d'apprendre la microscopie à force atomique (AFM), tant en mode imagerie qu'en mode de mesures de forces. Cette technique est de plus en plus présente en biologie et le laboratoire du Pr. Müller est internationalement connu pour être un des pionniers de l'imagerie très haute résolution de protéines crystallisées à deux dimensions, ainsi que de la mesure des forces mises en jeu lors de leur dépliement forcé. S'étant interessé à l'imagerie de cellules par AFM, le laboratoire s'est tourné lors de mon arrivée vers la mesure de force sur et avec des cellules vivantes. J'ai donc du apprendre les bases de la biologie cellulaire et des techniques afférentes. La technique que j'ai mise en place est maintenant au coeur des thèmes de recherche de ce laboratoire.

Lors de mon post-doc, j'ai été amené à encadrer deux étudiants de DEA, qui ont par la suite débuté leur thèse au laboratoire. J'ai pris en charge la logistique autour des AFM de marque JPK, ainsi que l'organisation matérielle du laboratoire pour les mesures

de forces (commandes de matériel spécifique, développement de fonction de traitement de données, organisation des salles pour optimiser les mesures et diminuer le bruit des mesures (acoustique, mécanique, électrique), encadrement d'étudiants et de techniciens). J'ai aussi formé à l'AFM de nombreuses personnes, ainsi que donné des cours à l'université de Dresden sur tes thématiques concernant les nanotechnologies et biotechnologies. J'ai formé en particulier personnellement le post-doctorant biologiste (J. Helenius) qui a pris en main la continuation de ces projets.

Je présenterai donc dans les paragraphes qui suivent les bases de l'AFM et l'utilisation de cette technique en biologie. Les composants principaux de tout AFM, commercial ou non, sont présentés sur la Fig. 2.5.

L'AFM, en mode imagerie, permet d'obtenir des informations structurales concernant la topologie de surface d'échantillons biologiques, dans des conditions physiologiques (milieu tampon), comme de l'ADN, des protéines, des membranes ou des cellules (voir par exemple l'ouvrage de revue (Collectif, 2002)). Cette technique issue de la physique a été transférée au laboratoire de biophysique et de biologie grâce au développement crucial de certains points techniques (contrôle de température, chambres permettant de maintenir l'échantillon en milieu liquide).

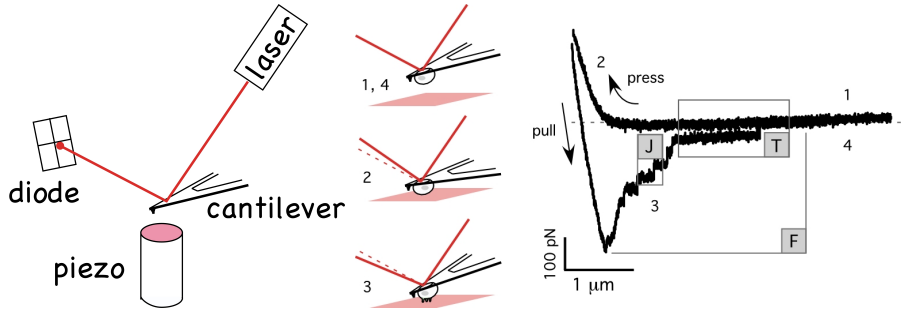


FIG. 2.5 – Gauche : composants élémentaires d'un AFM. Un laser est utilisé pour détecter à l'échelle nanométrique le mouvement d'un levier (ou *cantilever*) extrêmement souple (quelques pN/nm). Une cale piézoélectrique est utilisée pour contrôler son mouvement à l'échelle nm-μm. Une fois le système calibré, ce levier peut être utilisé pour appliquer ou mesurer des forces faibles, de l'ordre de quelques pN ou dizaine de pN. A droite, exemple de l'utilisation d'une cellule adhérée sur un cantilever pour mesurer des forces d'adhésion à l'échelle d'une cellule unique (ou *Single Cell Force Spectroscopy* - SFCS). Le collage de la cellule est ferme mais délicat et permet de conserver la cellule vivante : on utilise des leviers décorés avec des lectines capables de capturer certains résidus de sucres présents dans le glycocalyx de la cellule. La courbe de force correspondante est présentée : la cellule est pressée sur une surface décorée, par exemple avec de la FN, pour un temps donné une fois atteinte une force de contact de l'ordre de quelques dizaines ou centaines de pN (position 2). Puis la cellule est rétractée de la surface et les forces de ruptures (F : globale ; J : adhésion moléculaire) sont enregistrées (position 3). Quand la cellule et la surface sont loin l'une de l'autre, aucune force ne s'exerce et cela donne la ligne de base de la mesure (positions 1 et 4).

La déflection du cantilever (Fig. 2.5A) permet de mesurer les forces qui s'exercent sur leur extrémité. Ces leviers commerciaux de 100 à 300 microns de long répondent (pour une gamme de déflections faibles) comme des ressorts linéaires de constante k (pN/nm). Les forces mesurables de manière commune peuvent être aussi faibles que la dizaine de pN (10^{-12} N) et sont limitées par le bruit thermique du système, ainsi que par la gamme de k que l'on peut obtenir commercialement. A l'heure actuelle, les plus basses constantes nominales proposées par divers fournisseurs sont 6 et 10 pN/nm (en réalité, ces valeurs sont rarement atteintes, ce sont souvent des bornes inférieures). Malgré ces limites, la gamme de

forces accessibles fait de l'AFM une technique relativement bien adaptée à la mesure d'interactions à l'échelle de la molécule unique, en particulier dans le cas d'interactions ligand / récepteur (entre autres systèmes caractérisés on trouve les couples streptavidine/biotine, anticorps/antigène, cadherine/cadherine ; (Franz and Puech, 2008)).

Il faut souligner que les forces mesurées le sont *hors équilibre* et donc qu'elles ont une origine stochastique. Elles dépendent donc des conditions de la mesure, en particulier, de la rampe de force que l'on exerce lors de la retraction du levier par exemple à vitesse constante, v. La mesure de la distribution de forces mesures, via la mesure de la force la plus probable, en fonction du *loading rate* (taux de charge, $r = k \times v$), permet de déterminer les paramètres caractérisant le profil énergétique de la liaison : la position et la hauteur des diverses barrières énergétiques. Ceci demande d'utiliser le formalisme décrit par Evans (Evans and Ritchie, 1997) sur les bases des travaux de Bell et Kramers (Bell, 1978) et permet aussi d'obtenir des informations sur les caractéristiques cinétiques de la liaison considérée, à force nulle (son k^0_{off}). C'est ce que l'on nomme la *spectroscopie dynamique de force* (ou *Dynamic Force Spectroscopy* - DFS). Cette technique est maintenant bien établie et appliquée par de nombreux groupes à l'étude de molécules uniques en AFM en mode force, et nous l'avons étendu, comme on le verra par la suite, à l'étude de l'adhésion de cellules uniques.

En collaboration avec le groupe du Dr. C.-P. Heisenberg[1] et avec l'entreprise JPK Instruments (Berlin) [2] , nous avons développé une nouvelle technique afin de pouvoir mesurer, directement, de manière simple et *user friendly*, les forces d'adhésion d'une cellule *vivante* sur des substrats décorés ou d'autres cellules : la *Single Cell Force Spectroscopy* (Franz and Puech, 2008; Franz et al., 2007; Krieg et al., 2008; Puech et al., 2005; Taubenberger et al., 2007; Ulrich et al., 2005), revue (Helenius et al., 2008).

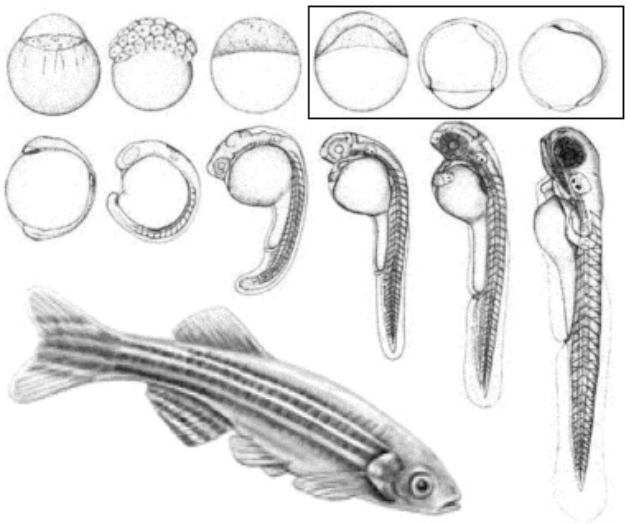


FIG. 2.6 – Les différentes étapes de la morphogénèse du poisson zèbre. La gastrulation (voir texte) est encadrée.

J'ai pris personnellement part à la conception et à la réalisation d'expériences utilisant des cellules primaires mésendodermales provenant d'embryons de poisson zébré. J'ai étudié l'adhésion de ces cellules sur des surfaces de verre décorées par de la fibronectine (FN) ou

[1] biologistes du développement, travaillant sur le poisson zèbre - MPI-CBG, Dresde

[2] commercialisant un AFM "orienté biologie", combiné avec les microscopies optiques courantes - `http ://www.jpk.com`

des dimères de E cadhérine (Ecad) greffés de manière orientée (Fig. 2.7). J'ai caractérisé ces surfaces par imagerie AFM et microscopie de fluorescence (après avoir marqué les protéines avec des molécules fluorescentes *ad-hoc*). J'ai aussi pris activement part au développement du nouveau logiciel nécessaire pour réaliser ces expériences ainsi que les fonctions de calcul permettant d'extraire les données intéressantes des courbes de force et d'en étudier les distributions. J'ai aussi mis en place les études statistiques des données.

Les cellules mésendodermales sont de première importance lors de la *gastrulation de l'embryon*, une étape cruciale lors du développement d'un organisme multicellulaire. Cette étape est la troisième du développement des métazoaires et la première de la morphogenèse. Elle consiste en la mise en place des tissus fondamentaux de l'embryon (ou feuillets), par migration cellulaire, avec éventuellement la différenciation d'un troisième feuillet cellulaire, le mésoderme, entre les deux feuillets embryonnaires préexistants, l'endoderme et l'ectoderme. Au début de la gastrulation, l'embryon possède une symétrie quasiment sphérique. A la fin, la symétrie fondamentale du groupe animal (radiaire, bilatérien) est mise en place. La façon dont se déroule la gastrulation aura donc des conséquences sur la morphologie de l'adulte et elle permet de différencier les quatre grands phylum animaux.

La famille des protéines Wnt, en particulier Wnt11, a été identifiée par nos collaborateurs comme étant une protéine clef régissant les mouvements dynamiques des cellules *in vivo* et leurs propriétés de réarrangement lors de tests *in vitro*. Une hypothèse proposée est que Wnt11 pourrait jouer sur les propriétés adhésives des cellules progénitrices, soit en perturbant la localisation de la β-caténine soit en perturbant le renouvellement de protéines à la surface des cellules en changeant les capacités d'endo / exocytose liées aux protéines de la famille Rab. Comme il sera vu par la suite, la mesure de forces d'adhésion m'a permis de montrer de manière directe et simple, l'influence de Wnt11 et d'une protéine Rab, rab5c, sur les propriétés d'adhésion des cellules concernées, établissant ainsi la voie de signalisation la plus probable d'action de Wnt11. J'ai aussi mis en évidence l'existence d'une intégrine dans ces stades précoces du développement (Fig. 2.7).

Nous avons ainsi montré, en effectuant des mesures à des temps de contact intermédiaires entre ceux permettant de n'observer que des molécules uniques (msec-sec) et ceux permettant aux cellules de s'immobiliser (min), que l'adhésion des progéniteurs mésendodermaux sur la FN est affectée par la mutation éliminant l'expression de Wnt11 (Puech et al., 2005) (Fig. 2.7A) àl'image de ce qui a été observé chez le Xénope. Par la suite, nous avons montré que l'adhésion médiée par les Ecad est (a) bien spécifique à ces molécules (Fig. 2.7B) et (b) aussi fortement affectée par la même mutation ainsi que par l'abscence / présence de Rab5 (Ulrich et al., 2005) (Fig. 2.7C). En parallèle nous avons procédé à des expériences de réaggrégation des cellules obtenues à partir d'embryons gastrulants qui montrent des redistributions ainsi que des mouvements dynamiques des cellules corrélables aux mesures de force. Nous avons ainsi pu attribuer l'influence similaire de Wnt11 et de rab5c à une voie de signalisation "non canonique", illustrée sur la Fig. 3.1.

En parallèle des mesures de forces, j'ai utilisé l'AFM pour nano-indenter les cellules à l'aide de la pointe du cantilever ou avec des cantilevers sur lesquels on a collé une bille micrométrique par micromanipulation pour augmenter la surface de contact, la rendre plus lisse et plus facilement modélisable. Cela permet d'extraire facilement des courbes de force obtenues des paramètres mécaniques de la cellule, comme le module de Young, E, ou la tension de surface, τ (Krieg et al., 2008) en utilisant des fonctions de calcul que j'ai programmé. L'idée était de tenter de décorréler la contribution de la mécanique de la cellule, qui potentiellement pourrait être perturbée par des mutations ou des *knock-out* de molécules, des mesures d'adhésion réalisées. Nous avons en particulier montré que la mutation de Wnt11 n'entraine pas de modification notable des propriétés mécaniques

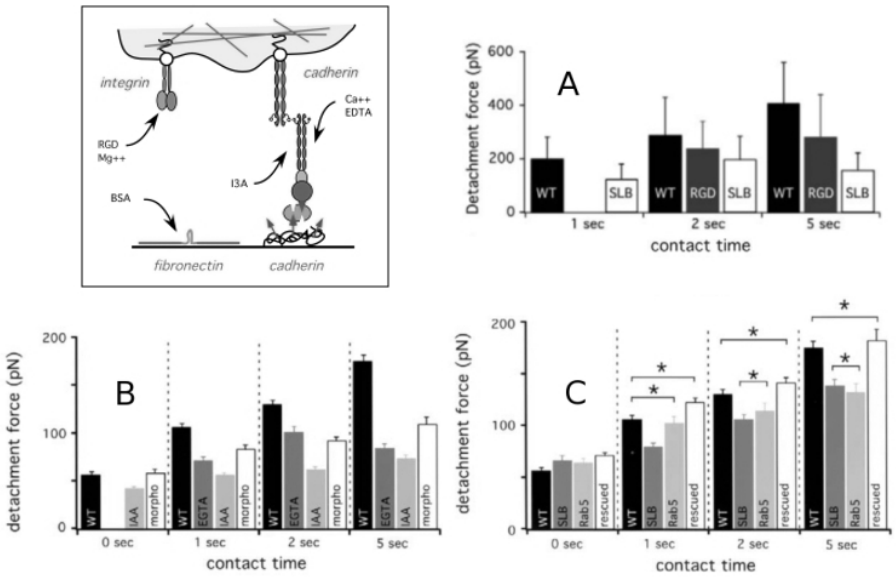


FIG. 2.7 – Schéma des systèmes cellule / surface utilisés, ainsi que les contrôles visant à rendre inactive ou active chaque molécule. Forces moyennes d'adhésion obtenues sur des populations de cellules mésendodermales de poisson zébré, sur des surfaces de fibronectine (FN ; A) et de E-cadhérine orientée (Ecad ; B,C), en fonction du temps de contact de la cellule sur la surface. WT : cellules sauvages ; SLB : cellules provenant d'un individu $wnt11^{-/-}$. A : l'adhésion sur la FN est contrôlée par des intégrines sensibles au groupe RGD présent sur la FN. L'adhésion est en effet réduite par la présence en solution de RGD cyclique. La mutation sur Wnt affecte aussi cette adhésion. Ce travail a mis en évidence l'existence de telles intégrines chez le Zébrafish à des états de développement précoces (Puech et al., 2005). B : l'adhésion sur la cadhérine montre la dépendance attendue envers la présence de calcium et est bloquée par un compétiteur du tryptophane (similaire à la mutation utilisée lors de ma thèse). C : la mutation sur Wnt influence l'adhésion, de la même manière qu'une désactivation d'une protéine Rab liée à l'endocytose. L'adhésion est rétablie par une surexpression de Rab5c. Cette étude a été la première à identifier, grâce à une mesure physique "extérieure" à la cellule, un chemin de signalisation interne non canonique (Ulrich et al., 2005). Chaque barre correspond à au moins une centaine de courbes, sur plusieurs dizaines de cellules différentes. Les étoiles signalent les moyennes *non* significativement différentes (ANOVA + post test, p>0.05).

locales des cellules utilisées (Puech et al., 2005; Ulrich et al., 2005), mais que chaque type de progéniteur possède des propriétés mécaniques propres, un paramètre clef dans le tri cellulaire s'effectuant dans l'embryon (Krieg et al., 2008).

Pour finir, j'ai étendu ces études en mettant au point de nouvelles méthodes permettant, grâce à un module nommé CellHesion, devenu depuis commercial[3] , de mesurer des forces de séparation *entre cellules*. Ceci est rendu possible car les distances d'étirement accessibles ont été augmentées d'un facteur 10 (de la dizaine de microns pour les expériences décrites précédemment à la centaine de microns ici par utilisation d'un dispositif spécial, une platine de déplacement vertical utilisant des piézos de grande course). J'ai ainsi pu réaliser des expériences pilotes mesurant [4] l'interaction entre des cellules uniques de mélanome et une couche compacte de cellules endothéliales (Puech et al., 2006b). J'ai aussi ouvert la voie à des expériences similaires sur les cellules de poisson zébré, en couplant l'AFM avec une reconnaissance des cellules en microscopie de fluorescence (voir le chapitre

[3] `http ://www.jpk.com`

[4] dans une configuration cellulaire proche des expériences courantes de transmigration de cellules tumorales qui permettent de, qualitativement, juger de l'aggressivité de cellules tumorales

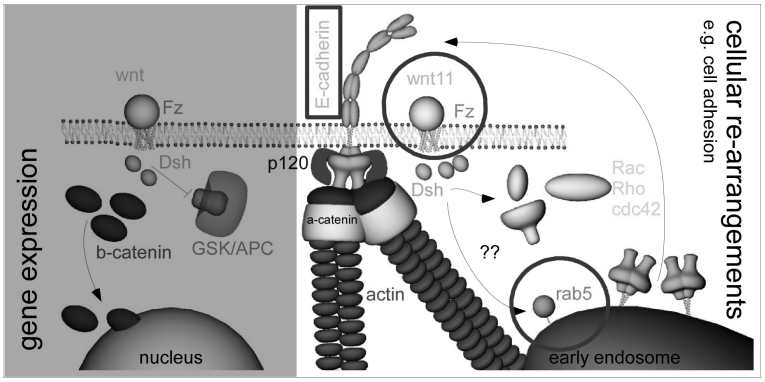


FIG. 2.8 – Voies de signalisation proposées pour l'action de Wnt11 sur l'adhésion des cellules lors de la gastrulation. La voie classique (à gauche) met en cause la délocalisation de la β-caténine. La voie non classique (à droite) met en jeu des changements de relocalisation des molécules d'adhésion, en particulier les E-cadhérines, à la surface des cellules. Les mesures effectuées et montrées sur la Fig. 2.7C permettent de proposer que c'est cette dernière qui est la plus probable car Rab5c modifie l'adhésion de manière comparable à l'absence de Wnt11.

suivant). J'ai développé certaines méthodes de cartographie d'adhésion et de mécanique sur des problématiques liées au fadeaux lipidiques (collaboration avec K. Simmons, MPI-CBG, Dresde) et mis en lumière les difficultés de ces techniques, tout en montrant la faisabilité.

Les principaux articles afférents à cette partie de mon travail se trouvent en intégralité en annexe de ce document. La suite de mes travaux de post-doc sont détaillés ci-après, car j'ai continué à m'investir, une fois recruté à l'Inserm, dans ces thématiques d'AFM "bio", au travers de deux thèses co-encadrées et d'une collaboration toujours existante avec la société JPK.

Chapitre 3

Travaux de recherche

Ce chapitre présente les thématiques sur lesquelles j'ai travaillé depuis mon recrutement en décembre 2005 en tant que chargé de recherche deuxieme classe à l'Inserm. Ces travaux ont été effectués au sein de l'UMR 600 de l'Inserm à Marseille, le laboratoire Adhésion et Inflammation, dirigé par le Pr. P. Bongrand. Ils se sont placés naturellement à l'interface entre la physique et la biologie, cette fois-ci avec une coloration immunologique.

Depuis cette date, j'ai été amené à collaborer avec différents groupes, à l'échelle nationale et internationale, et j'ai pris part à l'écriture de nombreuses demandes de financement (entre autres : 2 EURYI, sélectionnées par l'Inserm, 1 ERC jeune chercheur, 4 ANR, 2 ANR jeune chercheur, 2 HFSP, 1 HFSP courte durée, 1 prise de risque CNRS). Certaines d'entre elles ont été couronnées de succès (2 ANR jeune chercheur (coordinateur (2009) ; participant (2006)), 1 HFSP courte durée (demandeur), 1 prise de risque CNRS (demandeur)). J'ai encadré, à distance, deux thèses dans le laboratoire où j'ai effectué mon post-doc, ainsi que trois étudiants d'école d'ingénieurs de Marseille. J'ai participé à des cours à la faculté de médecine de Marseille, ainsi qu'à des formations nationales et internationales (SFBC, CEA, Inserm) autour de l'utilisation en biologie de l'AFM en imagerie et pour la mesure de force.

3.1 Pourquoi (et comment) mesurer des forces en biologie ?

Les interactions spécifiques et réversibles entre molécules sont un phénomène universel en biologie. Par exemple, les interactions entre antigène et anticorps sont centrales en immunologie. Le transport du signal au travers des membranes biologiques et au sein du cytosol repose sur des cascades d'évènements qui mettent en jeu la reconnaissance et la fixation de constituants cellulaires. Ainsi, les interactions entre protéines, hormones, drogues ou d'autres ligands et des protéines de la matrice extracellulaire ou des récepteurs membranaires contrôlent une large variété d'évènements cellulaires comme la coagulation du sang, les réponses hormonales et l'activation lymphocytaire.

Ces interactions sont inter ou intra moléculaires, non covalentes et souvent de faible énergie. La manière classique de qualifier et de quantifier leur "force" ou leur "magnitude" est de mesurer les constantes cinétiques qui régissent l'équilibre attachement / détachement (par exemple par BIAcore). Mais ces paramètres ne sont pas les seuls permettant de décrire et comprendre la façon dont cette reconnaissance moléculaire, hautement spécifique, le plus souvent réversible, fonctionne, car (a) les molécules sont souvent présentes aux interfaces cellulaires, ce qui amène des limitations que j'aborderais par la suite et (b) par la même, elles sont soumises à des forces qui perturbent l'équilibre, souvent dans le sens de la dissociation des complexes moléculaires formés.

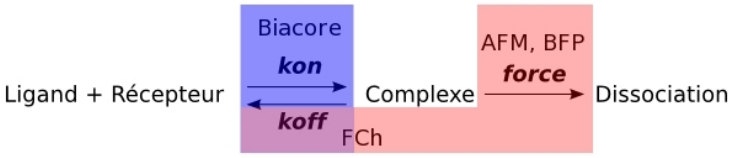


FIG. 3.1 – Paramètres et techniques (en bleu, non disponible au laboratoire ; en rouge, existantes ou en cours de montage - FCh = chambre de flux ; BFP : voir texte) pouvant être utilisés pour décrire la formation ou la rupture d'une interaction moléculaire.

Les paramètres cinétiques, bien sûr, mais aussi thermodynamiques des liaisons formées doivent être mesurés et corrélés aux fonctions cellulaires auxquelles elles sont associées *in vivo*, comme la prolifération, l'activité cytotoxique des cellules T ou leur activation en réponse à une aggression. De nombreuses études récentes mettent en lumière le fait que les mesures de propriétés physiques de molécules d'adhésion et de reconnaissance à l'aide de technique où l'un des partenaires au moins est en solution ont atteint leur limite. Elles sont certes informatives, mais demeurent pour la plupart difficiles à corréler avec les propriétés cellulaires qui leur sont associées (ce qui est particulièrement flagrant pour ce qui est de la reconnaissance entre pMHC et TCR dans le cadre de l'immunologie, voir section 3.6).

Afin de dépasser ces limitations, des techniques mesurant certaines des caractéristiques physiques des molécules *directement à la surface de cellules*, ou directement à l'intérieur de celles-ci, apparaissent comme une avancée majeure. Pour les molécules présentes sur la partie extracellulaire de la membrane plasmique des cellules, les *mesures de forces* permettent d'accéder de manière relativement aisée à des paramètres à la fois thermodynamiques et cinétiques (Leckband, 2000). On peut ainsi, et c'est sur quoi je porterai mon attention dans ce qui suit, observer et quantifier l'effet de la mobilité des molécules, de leur réarrangement, de leur géométrie sur les forces qu'elles sont capables de supporter ou, ce qui peut être équivalens, sur leur durée de vie sous force. On peut citer comme exemple frappant la démonstation par mesures de forces en AFM de l'existence de *catch bonds* pour les sélectines, liaisons dont la durée de vie augmente pour une gamme de force appliquée correspondant à celle appliquée par le flux sanguin dans les étapes de freinage des leucocyte au voisinage d'une inflammation (Marshall et al., 2003). La combinaison de telle mesures avec des données structurales permettent de mettre en lumière des caractéristiques moléculaires *fonctionnelles*, qui parfois sont nivellées dans des approches d'ensemble comme les plasmons de surface (Biacore) ou la calorimétrie.

Ainsi, la plupart des projets présentés ici reposent sur la quantification de *propriétés moléculaires* (cinétique ou thermodynamique de la reconnaissance, propriétés mécaniques...), par mesure ou application de force sur des systèmes moléculaires ou cellulaires, en vue de les corréler à des *phénomènes actifs cellulaires* auxquels ils sont associés (prolifération, cytotoxicité, apoptose...). Les techniques de mesure de force en biologie sont à ce jour nombreuses, je ne vais décrire brièvement dans ce qui suit que celles que j'ai utilisées ou que j'utilise au cours de mes travaux de recherche. Chacune a sa résolution en force propre (ainsi qu'une forme de résolution spatiale de cette même mesure) et elles sont souvent plus *complémentaires* qu'adversaires.

La *microscopie à force atomique* (AFM) a été décrite de manière exhaustive dans le chapitre précédent. Elle permet d'avoir accès à une gamme de forces entre 10 pN et 100 nN suivant la raideur du levier choisi afin de rester dans des gammes de déflection mesurables

par l'appareillage. Cette raideur détermine aussi la résolution en force de la technique car elle conditionne sa réponse aux fluctuations thermiques du levier. Les plus souples commercialement disponibles ont à l'heure actuelle des raideurs de l'ordre de quelques pN/nm (et sont relativement coûteux, $\geq$ 20 euros). L'AFM a été utilisée pour mesurer des forces de rupture de complexes ou de dépliement de molécules uniques (Florin et al., 1994), et plus récemment de détachement de cellules uniques (Benoit and Gaub, 2002; Wojcikiewicz et al., 2004; Puech et al., 2005). C'est une technique disponible commercialement, possédant dans ce cas une interface *user friendly* ce qui en a accéléré le déploiement dans les laboratoires à l'interface entre la biologie et la physique. Elle permet aussi, avec le même appareillage, d'obtenir des images en conditions physiologiques de surfaces biologiques (cellules, protéines, substrats décorés) avec une résolution nanométrique en (x, y) et subnanométrique en z. Autre avantage pour l'application à la biologie cellulaire, l'AFM peut désormais être couplée de manière simple à divers types de microscopies optiques, comme du DIC, de la fluorescence, du TIRFM, du confocal, du RICM...

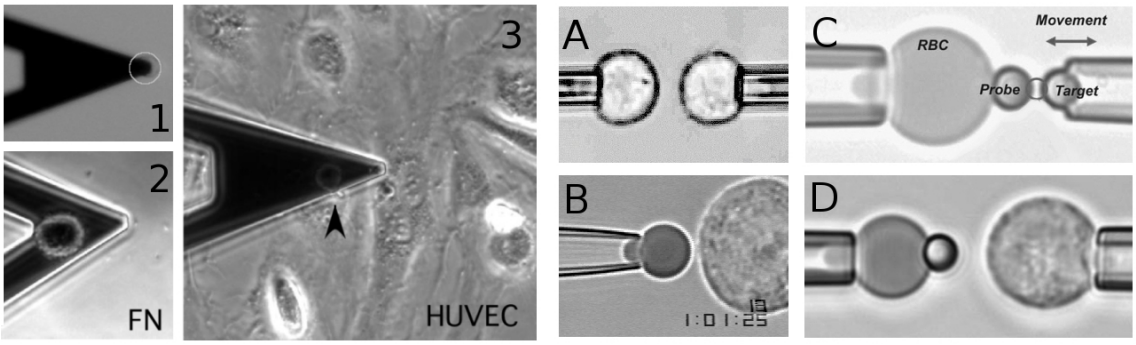


FIG. 3.2 – 1-3 : AFM, mode force ; A-D : micropipettes
Ces images montrent les différentes versions utilisables et publiées de ces deux techniques. 1 : une pointe décorée de protéines d'intérêt est utilisée pour mesurer des forces à la surface d'une cellule immobilisée sur une lamelle de verre. 2 : une cellule immobilisée sur le cantilever est présentée à une surface décorée de protéines d'intérêt (situation symétrique de 1). 3 : une cellule immobilisée sur le levier est présentée à une couche cellulaire (ici compacte, endothéliale) pour mesurer les forces d'interaction entre cellules. A : adhésion cellule /cellule, mesure d'une force de rupture. B : mesure de la fraction d'adhésion entre un globule rouge décoré de molécules d'adhésion pressé sur une cellule, permettant d'obtenir les paramètres cinétiques de l'interaction. C : BFP en molécule unique, entre molécules "in vitro". D : BFP version cellulaire. Pour les détails, voir texte et références. Les cellules sur les leviers font une dizaine de microns, les globules rouges gonflés aux alentours de 5 microns, et les cellules de A une vingtaine de microns de diamètre.

Les *micropipettes* (MPs) sont une technique de micromanipulation reposant sur l'utilisant de pipettes en verre de diamètre inférieur à la taille d'une cellule, donc d'une taille typique de 1 à 10 μm de diamère (certaines techniques qui ne seront pas détaillées ici utilisent des diamètre tels que les cellules peuvent entrer entièrement). La Fig. 3.4A-D présente les méthodes les plus utilisées (d'après la littérature). Elles peuvent être utilisées pour mettre en contact deux cellules, et, en mesurant la pression qu'il faut appliquer pour séparer le couple par traction à vitesse constante dont une des deux cellules est tenue très fermement, ainsi que la taille de la zone de contact, on peut évaluer la force d'adhésion (A, (Chu et al., 2006)). On peut utiliser un globule rouge décoré de molécules d'adhésion, se déformant à la retraction si une adhésion a eu lieu : cela permet d'évaluer les paramètres cinétiques de l'interaction moléculaire lors de contacts répétés à divers temps de contact (B, (Chesla et al., 1998)). Le *Biomembrane Force Probe* (C-D, BFP) utilise aussi

un globule rouge pressurisé comme ressort extrêmement souple (0.2 – 2 pN/nm) sur lequel on greffe une bille, décorée de molécules d'intérêt, qui sert à mesurer des forces dans la gamme du pN à quelques centaines de pN (Merkel et al., 1999). La résolution fine en force de cette technique, avec le fait que les composantes hydrodynamiques réduites agissant sur le système sont réduites par rapport à l'AFM, son coût plus faible que l'AFM et sa versatilité (Fig. 3.4C : molécules in vitro *vs.* Fig. 3.4D : test d'une surface cellulaire) en font une technique de choix pour les thématiques qui m'intéressent. Elle peut appliquer une rampe de force ou utiliser un mode de *force clamp* (mesure du temps de vie lorsque la liaison est soumise à une force donnée, constante). Le BFP a ainsi permis de mieux comprendre les interactions entre cadhérines (Bayas et al., 2006), permettant de décrire le paysage énergétique de la liaison ainsi que ses paramètres cinétiques de rupture.

Lorsque je suis arrivé dans le laboratoire, j'ai restauré et modernisé un montage de micropipettes qui existait depuis une quinzaine d'années. J'ai ainsi mis en place les étireuses de verre et je les ai programmées de façon à obtenir des pipettes de forme et de taille reproductibles. J'ai réparé et amélioré la microforge commerciale utilisée pour permettre d'obtenir des bords francs sur des pipettes allant de 2 à plusieurs dizaines de microns de diamètre. Le système vidéo du montage (caméra, carte d'acquisition + PC) a été renouvellé et une application en Labview utilisant une carte USB permettant de suivre la pression en temps réel grâce à un capteur a été programmée. Depuis lors, les différents éléments nécessaires à la construction d'un BFP ont été acquis grâce à un soutien du CNRS et ce dernier est en cours de réalisation (voir ci-après).

Les sections qui suivent présentent les différents projets, terminés ou en cours, sur lesquels j'ai travaillé au sein de l'UMR600 depuis mon recrutement. Ils ont majoritairement trait à l'adhésion et à la reconnaissance cellulaire, mais certains sortent néammoins un peu de ce cadre. Ces derniers sont rapidement présentés et quelques résultats non publiés sont donnés.

3.2 Imagerie AFM

J'ai utilisé l'AFM en mode imagerie sur différentes surfaces décorées utilisées au sein du laboratoire, pour les mesures de force, pour les mesures en chambre à flux, en RICM, en microfluidique... Etant donné que ceci n'a représenté qu'une petite partie de mon travail, elle ne sera pas détaillée ici. J'ai été amené à faire des formations en imagerie d'échantillons biologiques pour des formations assurées au laboratoire, et j'ai formé un ingénieur de recherche de l'UMR 600 (Z. Mishal, CNRS) à cette technique. Désormais autonome, il assure cette partie de l'utilisation de l'AFM pour le reste du laboratoire. Je n'interviens qu'au niveau du traitement des données et de la mise en place de protocoles d'utilisation du microscope AFM de marque NT-MDT[1] que le laboratoire possédait avant mon arrivée.

3.3 *Single Cell Force Spectroscopy*

Les paragraphes qui suivent concernent les travaux que j'avais débuté au sein de mon laboratoire de post-doc. Ces travaux sont présentés en détail dans les articles présentés en annexe. Tous utilisent des variantes de la technique de *Single Cell Force Spectroscopy* (SCFS) présentée au début de ce manuscrit.

[1] `http ://www.ntmdt.com/`

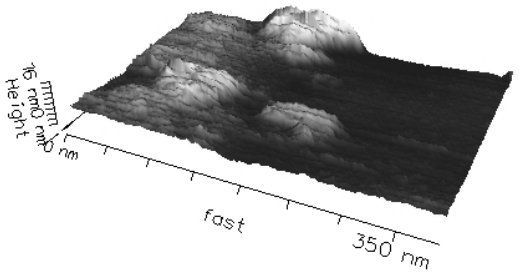


FIG. 3.3 – Imagerie AFM (3D artificielle) d'une surface décorée de protéines pour les mesures de forces, à la limite d'une zone grattée (application d'une force élevée par la pointe de l'AFM) : on voit le verre nu à droite, et les protéines (aggrégées) déposées sur la gauche.

3.3.1 Adhésion des intégrines $\alpha_2\beta_1$ sur du collagène de type I

Nous avons caractérisé les premiers instants de l'adhésion de cellules sur du collagène de type I médié par les intégrines $\alpha_2\beta_1$. Des cellules CHO (*chinese hamster ovary*), transfectées de manière à exprimer ces intégrines (CHO-A2), s'étalent rapidement dans des conditions physiologiques, à 37°C, sur des matrices composées de collagène I, alors que les cellules CHO non transfectées, n'ayant pas de récepteur au collagène adhèrent peu et restent rondes.

En utilisant la technique de SCFS qui permet de mesurer les forces de détachement cellule / surface, nous avons pu observer, à 37°C, pour des temps de contacts allant de la msec à plus de 600 sec, une réponse fortement non linéaire. En deça de 60 sec de temps de contact, les forces d'adhésion mesurées augmentent lentement et les forces mesurées à de temps très courts correspondent à la rupture de liens uniques et spécifiques. On a observé une dépendance forte de l'adhésion en fonction de la température : faible à température ambiante, forte à 37°C. Au dela, une fraction de cellules montre une force d'adhésion qui augmente brusquement d'un facteur plus de 10, suite à une "activation" de ces cellules.

Une adhésion élevée à l'échelle de la cellule entière coïncide avec une augmentation de la force de rupture des évènements unitaires observés dans les courbes de force : celle-ci dépasse la force requise pour rompre une liaison unique intégrine - collagène. Cela suggére des changements d'organisation des intégrines sous forme de petits clusters. La transition vers l'état "activé" des cellules CHO-A2 et l'augmentation de la force des évènements unitaires sont tous deux bloqués par l'inhibition de la contractibilité liée aux complexes acto-myosine.

Nous avons donc proposé un mécanisme en deux étapes pour l'établissement d'une adhésion sur du collagène à l'échelle de la cellule : une adhésion faible initiale, où les interactions entre molécules uniques prédominent, suivie par une réorganisation des intégrines mettant en jeu la contractibilité active de la cellule.

⇒ Taubenberger A, et al. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL Volume : 18 Issue : 5 Pages : 1634-1644 2007

3.3.2 Expression de BCR/ABL et adhésion via des intégrines β_1

La protéine BCR/ABL est impliquée dans la leucémie myéloïde chronique. C'est une tyrosine kinase qui influence la prolifération cellulaire, l'apoptose et la différentiation.

Il existe actuellement une controverse quant aux mécanismes par lesquels elle affecte l'adhésion de cellules leucémiques aux cellules stromales de la moelle épinière (BMSC).

Nous avons caractérisé l'adhésion de cellules 32D exprimant cette protéine (32D-BCR/ABL) sur la lignée de cellules stromales M2-10B4 en utilisant des techniques d'application de flux (*washing essays*) et la SCFS.

Comparées aux cellules contrôles (32D-V), les cellules exprimant BCR/ABL présentent des forces d'adhésion trois fois supérieures. En utilisant de l'imatinibe mesylate (IM) qui bloque l'activité de BCR/ABL de manière spécifique, cette différence d'adhésion disparait. La SCFS utilisant des cellules 32D-BCR/ABL a montré que l'adhésion de ces cellules était plus élevée que les cellules contrôle sur de la fibronectine et sur du collagène I, suggérant un rôle des intégrines β_1 dans l'intéraction des cellules leucémiques sur des BMSC. En effet, un anticorps bloquant ces intégrines élimine l'adhésion des cellules 32D-V et -BCR/ABL sur les BMSC.

Les cellules transfectées montrent un taux d'expression des intégrines β_1, mais sans que ne soit détecté un taux de mRNA correspondant, ce qui indique un rôle de régulation transcriptionnelle de BCR/ABL.

Nous avons ainsi montré que les interactions entre les intégrines β_1 et les composants de la matrice extracellulaire sont fonctionnellement importantes dans les cellules leucémiques, ce qui pourrait constituer une cible pour des thérapies dirigées.

⇒ Fierro FA, al. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY Volume : 377 Issue : 4 Pages : 1082-1093 2008

3.3.3 Organisation de l'embryon, adhésion et forces de tension

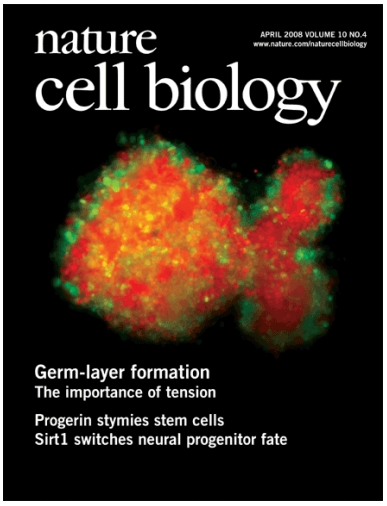


FIG. 3.4 – Couverture du volume de Nature Cell Biology paru le 1er avril 2008

.

La compréhension des facteurs dirigeant l'organisation des tissus lors des étapes du développement est un des buts les plus fondamentaux en biologie du développement. De nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer le tri cellulaire se faisant et créant des structures complexes, basées sur des propriétés cellulaires d'adhésion et de mécanique. Néammoins, valider ces hypothèses s'est toujours révélé difficile et limité par le manque d'outils appropriés pour mesurer de manière robuste les paramètres adéquats.

Nous avons utilisé le SCFS (en mode cellule / cellule) pour mesurer les propriétés d'adhésion de cellules individuelles de progéniteurs d'ecto-, de meso- et d'endoderme extraits d'embryon gastrulants de poisson zébré. Nous avons, à l'aide de cantilevers sur lesquels ont été collées des billes, mesuré les proprétés mécaniques des différents types cellulaire et mesuré la tension corticale, τ, de ces cellules.

En combinant ces données avec des expériences de tri cellulaire *in vitro* et de mesures de mouvements de cellules réimplantées *in vivo*, nous avons montré que la tension corticale relative de ces types de cellules constitue le facteur clef qui contrôle le tri des différents types de progéniteurs à l'intérieur de l'embryon, et non les propriétés d'adhésion seules comme beaucoup le postulaient.

Ces résultats ont été confirmés par des simulations numériques dans lesquelles ont été réinjectés les paramètres mesurés.

⇒ Krieg M et al. NATURE CELL BIOLOGY Volume : 10 Issue : 4 Pages : 429-U122 2008

3.3.4 Traitement des données

J'ai développé de nouvelles fonctions de traitement des courbes de forces qui permettent, d'une manière plus *user friendly*, de traiter plus rapidement les courbes de force que l'AFM produit (500 courbes peuvent être traitées en une demi-journée) ce qui améliore le rendement et la capacité réactionnelle de l'expérimentateur sur les expériences de SCFS.

3.4 Mort et mécanique cellulaires

Au travers d'un "stage" effectué au Centre d'Immunologie de Marseille Luminy (CIML) dans le groupe du Dr. P. Golstein, je me suis intéressé au phénomène de mort cellulaire. Ce groupe utilise l'amibe *Dictyostelium* comme système modèle (Golstein et al., 2003; Laporte et al., 2007). Dictyostelium peut vivre de manière unicellulaire (amibe) ou peut (sous certains conditions de restriction de nourriture) s'aggréger en *slugs* motiles. Ce système est d'un intérêt particulier car sa génétique est entièrement connue et relativement facile à manipuler.

Il a été montré par P. Golstein que certains sucres peuvent protéger Dictyostelium d'une mort cellulaire programmée lorsqu'elle est engagée (par présence de conditions adéquates : cAMP, DIF et privation de nourriture) (Levraud et al., 2003, 2001; Laporte et al., 2007). Le glucose en étant un, il s'agissait de prime abord de savoir si ce sucre agissait au niveau de la membrane ou devait la traverser pour avoir son effet protecteur.

La première idée était d'immobiliser ce sucre sur des surfaces pour éviter la pénétration au travers de la membrane de l'amibe. Il s'est avéré que des dérivés du glucose utilisés *en solution* et portant de faibles modifications de groupes sur le cycle du sucre se sont révélés inactifs ie. ne protégeant pas les cellules comme le glucose le fait (Golstein et al. non publié). Ceci invalidait la possibilité de greffer de quelque manière que ce soit le glucose, sur des billes ou sur des lames de verre. Etant donné que la mort de la cellule passe par la rupture de la membrane, j'ai alors tenté de montrer que l'on pouvait ralentir la dynamique de la rupture en utilisant des milieux très visqueux à base de glycerol, en suivant une méthodologie que j'avais utilisée lors de ma thèse (Karatekin et al., 2003; Puech et al., 2003). J'ai utilisé pour cela le FACS suivant (Laporte et al., 2007) pour quantifier la proportion de cellules mortes dans différentes conditions de viscosité et montré que le glycérol n'affectait en rien la mort cellulaire. Une faible réduction du taux de mort à faible concentration de glycérol ($\leq$ 1% v/v) révélait sans nul doute un effet osmotique de

"ramollissement" de la cellule.

En parallèle de ceci, P. Golstein a pu montrer que le sorbitol, un sucre non impliqué dans les voies métaboliques de la cellule, protége de manière similaire, avec un effet dépendant de la dose, les cellules engagées dans une voie de mort.

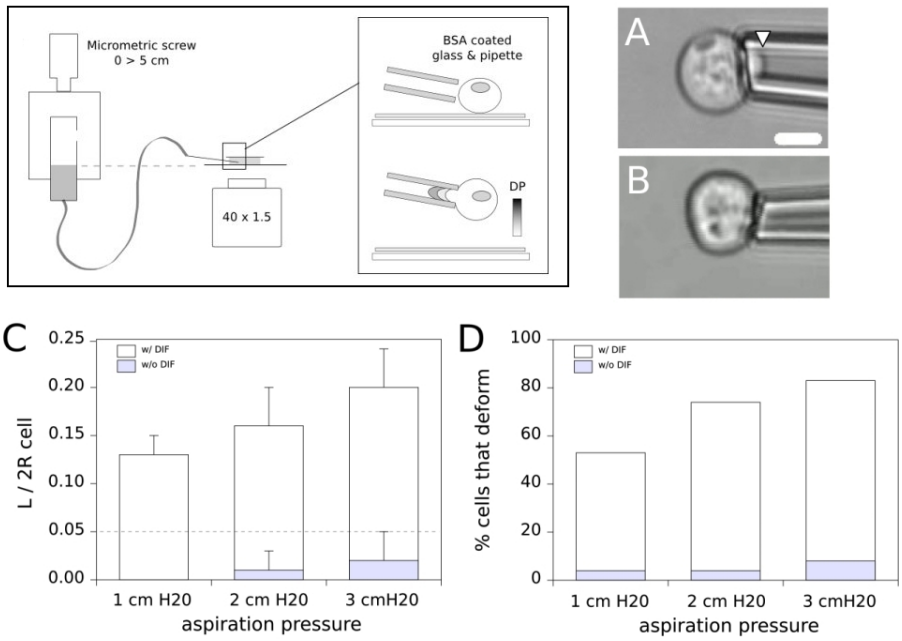


FIG. 3.5 – Schéma : Système utilisant une micropipette unique pour appliquer des déformations contrôlées sur des cellules. Ce système est le plus simple possible, afin de pouvoir tester le plus grand nombre de cellules en un temps le plus court possible. L'aspiration est réalisée grâce à un réservoir mû par une vis micrométrique. Le zéro est réalisé avant chaque expérience en se plaçant à la position où une poussière présente dans la suspension cellulaire ne bouge pas. La micropipette, passivée avec de l'albumine, est utilisée pour attraper et déformer, avec différentes pression croissante, mesurées en cmH_2O par rapport à la position de référence. (A-D, barre = 5μm) : Utilisation des micropipettes pour démontrer l'existence de perturbations précoces de la mécanique de cellules placées dans un étét de mort métastable. Lorsque protégées par du sorbitol, mais engagées dans un processus de mort (+DIF, + sorbitol ; A), elles sont capables de se déformer pour des pressions d'aspiration faibles. Lorsque non mourantes (-DIF, + sorbitol ; B), elles ne se déforment pas et restent sphériques pour les mêmes pressions d'aspiration. C : quantification de la taille de la langue aspirée dans la pipette. D : quantification du nombre de cellules présentant une déformation notable suivant le cas de figure. Le diamètre des pipettes a été gardé constant $\simeq 4\mu$m et la taille des cellules est peu influencée par les conditions expérimentales.

Grâce au montage de micropipettes que j'ai remis en route, j'ai pu appliquer des aspirations contrôlées sur des cellules vivantes, engagées dans une voie de mort cellulaire contrôlée, afin d'observer les modifications de la mécanique de la cellule lorsqu'elle est protégée ou non par le sorbitol (Fig. 3.5). Nous avons ainsi observé que les cellules "mourantes" peuvent se déformer sous de très faibles aspirations, ce qui pourrait être attribué à des modifications du cytosquelette d'actine induites par les signaux de mort, comme par exemple par les caspases.

3.5 Glycocalyx et AFM / RICM / Chambre à flux

J'ai participé au sein de l'UMR600 à une étude où nous avons utilisé une combinaison de chambre à flux et microscopie interférentielle (RICM) pour étudier la formation et la

rupture de liaisons uniques entre Fc-ICAM1 attachées sur un substrat et des anticorps anti-ICAM1 portés par des billes micrométriques, en présence ou non d'une couche répulsive d'acide hyaluronique (HA).

La distance absolue entre les colloïdes et la surface a été mesurée sous flux avec une précision de quelques nm. Nous avons utilisé l'AFM en mode *colloidal force probe* (avec une bille collée au bout du cantilever) et la RICM pour calibrer cette distance.

Nous avons pu ainsi vérifier les prédictions de la théorie de la lubrification pour une sphère au voisinage d'un substrat, sous flux.

La couche de HA exerce une répulsion à grande distance sur les billes mais ne modifie pas de manière notable l'hydrodynamique. Nous avons pu réaliser des couches de HA d'épaisseur entre 20 et 200 nm et mesuré par RICM cette épaisseur par évaluation directe de la hauteur la plus probable des billes. La fréquence de formation des liaisons uniques est ainsi diminuée par plus qu'un ordre de grandeur lorsque l'épaisseur de HA augmente, alors que le temps de vie de ces liaisons n'est pas perturbé.

Cette étude ouvre ainsi la possibilité d'utiliser la chambre en mode "3D" (flux + RICM) pour des études fines des effets de l'environnement moléculaire et de la distance entre espèces sur la reconnaissance entre ligand et récepteur, tant sur la formation de complexes que sur leur rupture sous force faible.

⇒ Tuning the formation and rupture of single ligand-receptor bonds by hyaluronan-induced repulsion Robert P et al. BIOPHYSICAL JOURNAL Volume : 95 Issue : 8 Pages : 3999-4012 Published : OCT 15 2008

3.6 Reconnaissance pMHC / TCR

Ce sujet est celui sur lequel j'ai investi le plus de temps et d'efforts au sein de l'UMR600. Il est au cœur des projets que je présente dans le chapitre suivant. J'ai donc choisi d'en effectuer une présentation un peu plus détaillée que pour les projets précédents. Cette thématique est centrée sur des problématiques immunologiques et repose sur des interactions fortes avec plusieurs groupes de recherche nationaux et internationaux.

3.6.1 Le complexe peptide / MHC est la carte d'identité du soi

Une des fonctions clefs des lymphocytes T durant la réponse immunitaire adaptative est de scanner la surface des cellules qu'ils rencontrent en utilisant leur récepteur spécialisé appelé récepteur des cellules T (*T cell receptor*; TCR). Leur but est de détecter la présence de peptides (p) du non-soi, présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (*major histocompatibility complex*; MHC). L'interaction TCR-pMHC est requise pour l'activation des cellules T et les subséquentes prolifération et différentiation en différentes sous-classes de lymphocytes effecteurs, comme les cellules T cytotoxiques dont le rôle est de détruire les cellules infectées. De plus, cette interaction est nécessaire afin de maintenir une population stable de cellules "mémoires" d'une infection donnée, qui constitue l'immunité à long terme des individus (Murphy et al., 2008).

Le MHC est un récepteur hétérodimérique présent à la surface des cellules et est encodé par les gènes les plus diversifiés connus chez les vertébrés. Les MHC de classe I, qui vont nous intéresser plus particulièrement par la suite, sont exprimés de manière ubiquitaire sur les cellules de tous les tissus et possèdent la capacité de présenter des peptides courts (8-11aa) afin d'être reconnus par des cellules T cytotoxiques (dites CD8+ [2]). Chaque individu

[2] CD8 est un corécepteur présent à la surface de ces lymphocytes stabilisant l'interaction TCR / pMHC

ne possède qu'un nombre limité de MHCs différents, mais chaque MHC est capable de lier une grande variété de peptides produits par dégradation enzymatique de protéines intracellulaires (van der Merwe and Davis, 2003).

Pour chaque peptide, 2-3 acides aminés servent à ancrer celui-ci dans le MHC, alors que ceux qui restent contribuent à former la structure qui sera reconnue par le TCR. Ainsi, une grande diversité de complexes peptide / MHC (pMHC) peuvent être formés de manière à "publiciser" le contenu de l'intérieur de la cellule au reste du système immunitaire (Rudolph et al., 2006). Ces peptides sont pour leur plus grande partie représentatifs de la population de protéines existant à l'intérieur de la cellule, c'est à dire des antigènes du soi (*self antigens*). Si une cellule est infectée par un virus ou s'est transformée malignement, les MHC de cette dernière vont aussi présenter un nombre limité de peptides dérivés de protéines n'appartenant pas au soi (aussi peu que 10 à 300 copies du peptide - c'est le *non self*) qu'il faut détecter au milieu des miliers de peptides du soi présentés.

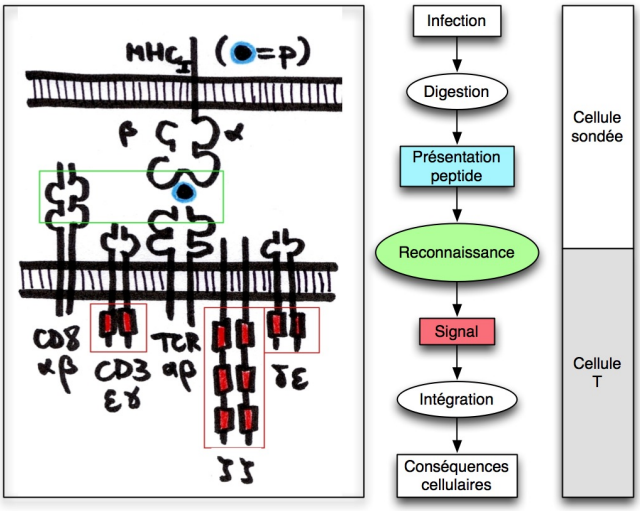


FIG. 3.6 – Schéma de la reconnaissance entre p / MHC de classe I et TCR / CD3 en présence de la molécule compagnon CD8, avec les interactions moléculaires pouvant exister entre les différents partenaires *à l'extérieur des cellules* (cadre vert). Les domaines ITAM relayant le signal extérieur aux voies *internes* ont été mis en évidence (cadres rouges).

3.6.2 Cette carte d'identité est lue par le TCR

La reconnaissance des pMHC via le TCR doit être rapide, sensible de façon à détecter la présence d'un nombre faible de peptides étrangers et en même temps d'être capable de filter le bruit de fond généré par les peptides du soi de façon à ne pas détruire les cellules saines. La manière dont les interactions entre TCR et pMHC contrôlent les voies de signalisation du lymphocyte reste une question importante et centrale pour comprendre le développement et le fonctionnement de la réponse immune adaptative (van der Merwe, 2001).

Le TCR est un récepteur membranaire porté par les lymphocytes composé de deux chaînes α et β capables de se lier au pMHC. Ces deux chaînes sont exprimées à la surface de la cellule en conjonction avec les sous unités CD3 $2 \times \varepsilon, \gamma, \delta$ et $2 \times \zeta$ (Fig. 3.6). A la différence des chaînes α et β, les sous unités CD3 possèdent des domaines ITAM capables

de phosphoryler des tyrosines dans leurs domaines cytoplasmiques. Ces motifs sont responsables de l'initiation des cascades de signalisation conduisant à la "prise de décision" d'un lymphocytes après lecture d'un peptide du non-soi (Kersh et al., 1998a) : lorsqu'un[3] tel peptide est détecté par le TCR, une phosphorylation rapide de multiples résidus tyrosine au sein des parties cytoplasmiques de CD3 par les protéines de la famille Src, en particulier Lck s'effectue. La phosphorylation de CD3 ζ crée des sites d'attachement pour la protéine Zap70 de la famille Syk, afin qu'elle puisse devenir activée à son tour. Ceci entraine la formation de complexes multi-protéiques autour de LAT (*Linker for Activation of T-cells*) qui est un point de convergence initiant plusieurs voies de signalisation importantes, en particulier l'induction de flux calciques par le biais de l'activation de PLCγ-1, l'activation de MAP kinases via les petites GTPases (par exemple Ras) et l'activation de PI3 Kinase (Murphy et al., 2008) (Fig. 3.7).

Ainsi, en fonction du signal reçu et lu au travers du TCR, la cellule T peut être activée et initier différents processus contrôlés de manière transcriptionnelle comme proliférer, se différencier ou *up*-réguler la production de cytokines. Alternativement, des évènements biochimiques rapides, initiés dans le cytoplasme, peuvent avoir lieu : libération de granules cytotoxiques, de médiateurs lipidiques ou d'autres effecteurs protéiques pré-synthétisés (Murphy et al., 2008).

3.6.3 Physique de la reconnaissance TCR/pMHC *vs.* activation

A la différence de certaines classes de récepteurs des tyrosines kinases (eg. la famille de récepteurs de l'EGF), il y a peu d'évidence à l'heure actuelle que la liaison d'un pMHC au TCR cause un changement conformationnel au sein de ce dernier pouvant rendre compte de ses propriétés de signalisation transmembranaire. Les différences de signalisation sont plus vraisemblablement à rechercher dans le comportement de combinaisons de phénomènes biochimiques initiés par la liaison TCR/pMHC. Il apparait néanmoins évident que les capacités d'activation initiales de différents pMHC doivent être sous le contrôle de certaines propriétés physiques de leur reconnaissance par un TCR donné, qu'elles soient thermodynamiques ou cinétiques (Kersh et al., 1998b).

Grâce à la disponibilité de formes solubles de TCR et de pMHC recombinants, il a été possible de déterminer la structure tridimentionnelle de chaque molécule séparément et/ou sous forme de complexe de reconnaissance. La mesure de leur cinétique d'interaction par Biacore ou SPR, ainsi que par calorimétrie (voir par exemple (Mazza et al., 2007)) a été réalisée. L'utilisation de ces techniques a permis de montrer que l'interaction TCR/pMHC possède une affinité faible ($K_d = 1/K_a \sim 0.1$–500 μM) et est caractérisée, de manière générale, par une cinétique d'attachement plutôt lente (van der Merwe and Davis, 2003) avec des k_{off} dans la gamme 0.01–5 s^{-1}.

De nombreuses études publiées ont tenté de démontrer l'existence d'une corrélation entre les paramètres obtenus ainsi et la capacité des mmes pMHC de générer une réponse cellulaire donnée (van der Merwe, 2001). Les premières études ont montré qu'il existait une corrélation, bien qu'imparfaite, entre le temps de demi-vie (ou temps de résidence, relié directement au k_{off} : $k_{\text{off}} \sim 1/t_{1/2}$) de l'interaction et l'efficacité à activer des cellules (Kalergis et al., 2001). Une loi gaussienne a été observée, impliquant l'existence d'une gamme optimale de temps de résidence au sein de laquelle le TCR peut donner naissance à un signal efficace, et par conséquence à des processus à plus long terme révélateurs de l'activation de la cellule T (production d'IL-2 ou cytotoxicité). Des temps de résidence hors

[3] Un au sens "si *le* peptide activateur est présenté et détecté". La question du nombre minimal d'évènements de reconnaissance "positifs" nécessaire à engendrer une réponse cellulaire est encore ouverte. Le chapitre suivant propose des méthodes pouvant permettre de répondre à cette problématique.

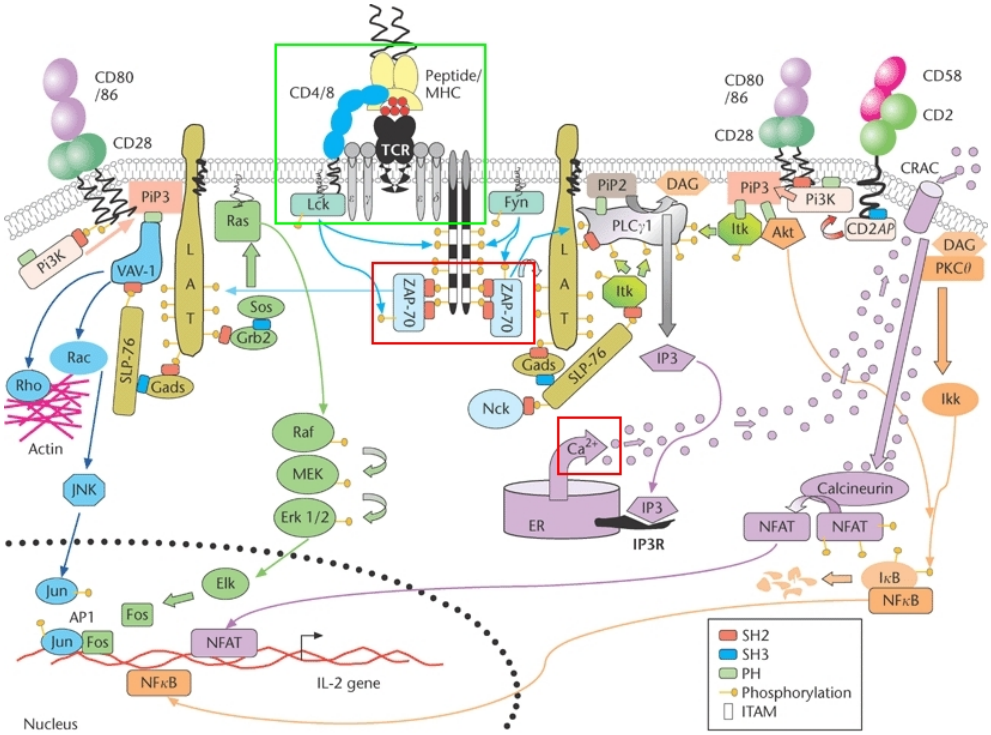


FIG. 3.7 – Schéma des différentes voies de signalisation consécutive aux évènements de reconnaissance TCR / pMHC (cadre vert) en surface de la cellule. Nous nous intéressons dans la partie projet (chapitre suivant) plus particulièrement à l'activation de Zap70 et aux flux de calcium (cadres rouges).

de cette gamme (plus courts, plus longs) se révèlent inefficaces. Des travaux plus récents portant sur le TCR P14 et sur des nombres plus grands de peptides présentés que dans les études précédemment citées ont montré que la meilleure corrélation avec des réponses cellulaires (sécrétion d'IFN-γ ou cytotoxicité) était obtenue non pas avec avec k_{off}, mais avec la constante de dissociation, K_d (Tian et al., 2007). Dans ces travaux, la corrélation prend la forme d'une réponse sigmoïdale, indiquant qu'en deça d'une certaine affinité seuil, la cellule ne s'active pas de manière notable alors qu'elle s'active et devient effectrice au dessus.

En conclusion, il apparait n'y avoir pas de vrai consensus quant au paramètre physique le plus efficace pour caractériser l'interaction pMHC / TCR et qui soit corrélable de manière continue et non ambigüe à une réponse cellulaire donnée.

Une grande part du problème est liée à la complexité intrinsèque de ce système moléculaire (et de son intégration au sein de la cellule T) mais aussi et surtout, lorsque l'on analyse la littérature existante, au fait que les conditions expérimentales (lignées cellulaires, chimies de surface des systèmes BIAcore) et les molécules (tétramères, dimères, monomères de MHC) varient considérablement d'un article à l'autre. Cela rend les comparaisons ou aggrégations de résultats difficiles sinon impossibles.

De plus, il faut souligner ici que bon nombre de ces études ont été menées *avec au*

moins une des protéines en solution. Elles ont tenté de relier leur intéraction avec les voies de signalisation internes complexes *downstream* et leurs *conséquences tardives* (prolifération, production de cytokines, cytotoxicité), qui se mettent en place avec des échelles de temps bien plus longues, de l'ordre de plusieurs minutes ou heures post reconnaissance moléculaire. Dans le cas où une corrélation existerait entre l'affinité du couple mesurée par Biacore et la production de cytokines par la cellule, il est très difficile, sinon impossible, d'en tirer quelque information que ce soit quant au mécanisme de signalisation mis en jeu pour obtenir cela.

Ainsi, les buts premiers de mes projets de recherche ont été de tenter de

- réexaminer l'interaction entre TCR et pMHC en utilisant des techniques *de surface*, comme l'AFM et le BFP [4] , afin d'obtenir plus de détails, au travers des forces de l'interaction, sur le paysage énergétique présidant à cette interaction (*ceci sera présenté dans la suite de ce chapitre*) ;
- relier l'interaction des protéines à la surface de la cellule T, lors d'un évènement de reconnaissance TCR / pMHC, avec l'activité enzymatique déclenchée par le TCR et conduisant à l'activation des cellules T. Ceci sera observé en utilisant des sondes fluorescentes capables de changer de signal FRET lorsqu'une telle activité, ici une phosphorylation ou un flux de calcium, apparait (*ceci sera au cœur du projet présenté dans le chapitre suivant*).

Les sections qui suivent présentent les expériences de mesures de force entre TCR et pMHC menées, ainsi que les conclusions auxquelles nous sommes arrivées à l'heure actuelle quant à la faisabilité, reproductibilité et implications. Les détails expérimentaux nécessaires à la compréhension de la réalisation pratique des mesures seront donnés à chaque fois dans le corps du texte ou en légende des figures principales.

3.6.4 Système cellulaire utilisé

Grâce à une collaboration étroite avec le Dr. C. Boyer (CIML, Marseille, France), j'ai pu travailler sur des cultures d'hybridomes T de souris exprimant ou non un TCR appelé BM3.3 capable de reconnaitre certains peptides connus dans le contexte de leur présentation par un MHC de classe I de type $H2K^b$. Les lignées utilisées, ainsi que les peptides, sont présentés rapidement dans la Table 3.1 (Auphan-Anezin et al., 2006).

Ce système de reconnaissance est très efficace, car il apparait que la molécule compagnon CD8 n'est pas requise pour qu'un signal d'activation soit généré en présence du peptide pBM1 qui est un agoniste fort. pBM8 est un agoniste plus faible et OVA un peptide qui n'entraine aucune réaction de la part des cellules.

Afin de présenter ces peptides, nous avons décoré les différentes sondes de force de l'AFM (cantilever) et du BFP (billes) avec une chimère commerciale composée de deux MHC couplés à un domaine Fc. Les types de couplage utilisés seront détaillés plus loin. La présence (ou l'absence) des récepteurs de surface ont été testés de manière continue en FACS au CIML, et les lignées ont été triées toutes les trois semaines pour prévenir la perte du TCR. Le FACS a aussi permis de montrer que le dimère ne se fixait sur C3CD8 que s'il présente pBM1, et non pas s'il présente OVA, et que les cellules C3CD8 ne possèdent pas de FcR (pour les expériences en BFP décrites ci-après cette information est importante).

[4] mais aussi, par d'autres au sein de l'UMR 600, par chambre de flux (Robert, 2009)

Cellules			
Nom	TCR BM3.3	CD8	Utilisation
C3CD8	+	+	○●
4C898	+	–	○●
BW	–	–	●
Peptides / DimerX H2K^b			
Nom	Formule	Action	Utilisation
pBM1	H-INFDFNTI-OH	agoniste fort	○●
pBM8	H-SQYYYNSL-OH	agoniste faible	●
OVA	H-SIINFEKL-OH	nul	○●
(vide)	(aucune)	nul	○●

Tab. 3.1 – Systèmes cellulaires et peptides utilisés pour les études de la reconnaissance entre TCR porté par des hybridomes de souris BM3.3 et des peptides portés par le DimerX H2K^b (BD Biosciences) H2K^b en BFP (○) et AFM (●).

3.6.5 Utilisation du Biomembrane Force Probe (BFP)

Apprentissage de la technique

Grâce à une *Human Frontier Science Program Short Term Grant*, j'ai eu l'oppotunité de réaliser un séjour de deux mois (nov./dec. 2007) au sein du laboratoire du Pr. E. Evans. Il est celui qui a mis au point la technique du BFP à la fin des années 90 et un des pionniers, tant au point de vue expérimental que théorique, de l'étude de la spectroscopie de force sur molécules d'adhésion.

Ce séjour s'est passé à l'hôpital de Vancouver, Canada, dans une unité de recherche dépendant de l'université de Colombie Brittanique (UBC). J'y ai appris les différentes étapes de la préparation d'une expérience de BFP, le traitement des données obtenues. J'ai pu y observer à loisir les systèmes fonctionnels présents afin de pouvoir m'en inspirer pour construire un montage similaire à Marseille, dans l'UMR600 (voir ci-après).

De telles expériences, en molécule unique, avec des cellules et des protéines délicates, requièrent une bonne maîtrise de différents domaines, allant de la chimie des surfaces jusqu'à la compréhension des modèles physiques utilisés pour interpréter les données. La description générale d'un BFP ne sera pas reprise ici car elle a fait l'objet d'un paragraphe et de figures détaillées (Section 3.1 ; Fig. 3.4 et 3.8)

Application au système d'intérêt

En suivant les protocoles utilisés au sein du laboratoire d'accueil, nous avons couplé de manière covalente la chimère DimerX sur les billes de verre micrométriques utilisées comme sondes par la technique de BFP (Evans et al., 2005) (Fig. 3.8A, B). Les protéines sont couplées avec des polymères longs bifonctionnels (polyéthylèneglycol, PEG) ayant un groupe capable de réagir avec des groupes NH_2 (NHS) et un autre avec des groupes SH (VS). Ce dernier est utilisé pour immobiliser les protéines sur des billes de verre modifiées par un thiosilane.

Ce mode de couplage donne aux molécules d'intérêt une mobilité suffisante pour trouver leurs partenaires sur les surfaces qui sont présentées aux billes. Néammoins, il est difficile de s'assurer qu'aucun groupe NH_2 crucial pour la fonction de la protéine n'est perturbé (s'il est en surface) et que la protéine n'est pas trop décorée par ces longs PEG. Ceux-ci

pourraient constituer une chevelure répulsive, à l'image de ce qui se fait en physicochimie des colloides. Ce dernier point peut aussi être vu de manière positive : cela peut réduire les interactions non spécifiques entre les surfaces, en éloignant la protéine de la surface de verre, mais aussi réduire les interactions parasites avec la surface de la cellule.

En même temps qu'on couple la protéine, on introduit un PEG de même longueur, présentant un groupe VS et un groupe biotine. Les billes présentent donc à la fin de la fonctionnalisation des protéines DimerX, des biotines ainsi que des PEG dont le NHS a été inactivé par les conditions de réactions.

Des globules rouges humains sont gonflés de manière osmotique et modifiés avec un PEG plus court, portant à la fois un groupe NHS et un groupe biotine. Ils sont ensuite fonctionnalisés avec de la streptavidine.

Cellules, billes et globules rouges sont introduits dans une chambre de micromanipulation ouverte, à température ambiante, dans du milieu de culture CO_2 indépendant.

On colle, par micromanipulation, une bille sur un globule rouge aspiré dans une pipette de petit diamètre connu (de l'ordre de 2 microns). On obtient ainsi le capteur de force de la BFP, représenté à gauche sur la Fig. 3.8A. On aspire alors une cellule en suspension (à droite sur l'image) qui va venir contacter la bille, avec un mouvement linéaire, contrôlé par un piézo.

A cause de la durée relativement courte du séjour, nous n'avons examiné que l'interaction entre pBM1, OVA et (vide) vs. C3CD8, et nous avons choisi d'introduire le peptide après le greffage du dimère sur les billes et suivi les recommandations de la compagnie nous le fournissant. Les billes sont conservées jusqu'à une semaine en présence d'un excès de peptide. Les expériences sont effectuées dans du milieu de culture en présence d'un excès de peptide d'intérêt. On a vérifié au bleu de trypan que les cellules micromanipulées ne mourraient pas malgré le choc osmotique qu'elles subissent, du moins pendant l'heure que dure une expérience.

Nous [5] avons ainsi obtenu plusieurs centaines de courbes de force pour les trois cas, présentant majoritairement des adhésions qualifiables d'évènements de molécules uniques (Fig. 3.8C) ou pas d'adhésion. Des cas d'adhésion plus complexes, qualifiés d'adhésions multiples (voir la partie sur l'AFM) ou d'extraction de tubes (Heinrich et al., 2005b,a), ont aussi été observés.

Grâce à un logiciel développé à l'UBC, nous avons quantifié les interactions en mesurant (a) la fraction d'évènements adhésifs en molécule unique (b) la force de rupture correspondante et (c) la fraction d'adhésion totale ("adhésion / tubes").

Dans la Table 3.2 sont résumés les cas testés en BFP, dont les histogrammes sont présentés sur la Fig. 3.8. La vitesse, pour créer le contact comme pour le rompre a été fixée à 2 μm/sec, ce qui conduit à appliquer des taux de charge de l'ordre de quelques centaines de pN/sec. Le temps de contact a été optimisé entre quelques msec et la sec afin d'obtenir une fraction d'évènements adhésifs dans le cas positif raisonnable, mais faible, de façon à pouvoir affirmer que l'on avait bien à faire à des séparations de molécules uniques (ca. 10–20% ce qui implique que 95% des évènements rentrent dans ce cas de figure (Tees et al., 2001)). Il s'est avéré que 100 msec correspondait à ces prérequis. La force de contact a aussi été variée entre 10 et 25 pN pour finalement être maintenue entre 15 et 17 pN suivant les niveaux de bruit (apparent) du système [6] . Il faut que cette force soit faible pour éviter de trop déformer la cellule cible qui est extrèmement souple, créant

[5] J'ai bénéficié tout au long de ce processus de l'aide de K. Kinoshita et A. Leung (Evans' Lab, UBC Vancouver) pour manipuler, obtenir et traiter les courbes.

[6] entre min. 5 et max. 15 pN, provenant en partie du centrage de la bille sur le globule rouge, car c'est l'interface bille / globule qui est détectée par le logiciel de pilotage de l'expérience, dans le setup de l'UBC

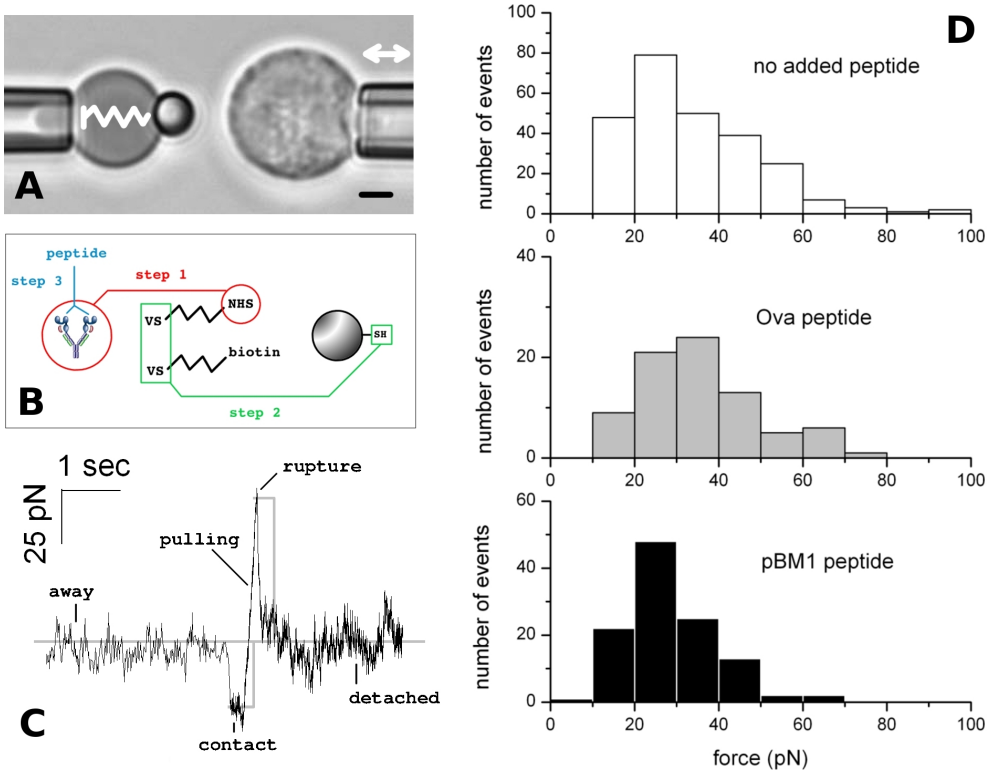


FIG. 3.8 – A. Système de BFP utilisé dans une configuration bille / cellule. La pipette de gauche maintient un globule rouge sous une aspiration constante, et donc impose une constante de ressort, $k \sim$ pN/nm. La bille utilisée comme sonde de force est couplée avec le globule rouge par le sandwich streptavidine / biotine. La pipette de droite tient une cellule cible (un lymphocyte T) et bouge de manière contrôlée (vitesse, temps de contact) car elle est couplée à une céramique piézoélectrique. Barre $= 2$ μm. B. Chimie de couplage des DimerX sur les billes de verre micrométriques utilisées comme sonde (voir texte) . C. Courbe de force (force vs. temps) montrant les différentes étapes de la mesure : approche, contact, maintient de ce contact à une force faible, puis traction avec une rampe de force linéaire à v constante. La ligne de base de la courbe démontre que le bruit thermique s'appliquant sur le système est très faible, de l'ordre de quelques pN. D. Histogrammes de forces des évènements uniques obtenus avec les différents peptides présentés à des cellules C3CD8. Les forces médianes et moyennes ne sont pas statistiquement différentes, modulo le bruit apparent de la mesure (~ 5 pN) (voir Table 3.2). Données acquises avec l'aide de A. Leung (groupe de E. Evans, UBC)

ainsi une zone de contact étendue, mais elle doit être suffisante pour que les boucles de rétroaction du système puisse la détecter et la maintenir, modulo le bruit de la détection.

Cellules	Peptide	Adh. simple	Force (pN)	Adh. multiple / tube
C3CD8	pBM1	24%	28.5 ± 10.7	41%
C3CD8	Ova	13%	36.2 ± 14.2	9%
C3CD8	none	19%	33.7 ± 15.4	16%

TAB. 3.2 – Mesures de reconnaissance TCR / pMHC utilisant le BFP (voir texte).

On observe, à conditions constantes, (Table 3.2 et Fig. 3.8) que les forces de rupture ne

sont pas statistiquement différentes pour les trois conditions de peptide, ce qui est de prime abord surprenant, car OVA ne s'attache pas en FACS sur ces cellules, et encore plus pour le cas où il n'y a pas de peptide présenté [7]. Par contre, nous avons observé des fractions d'évènements adhésifs uniques et d'évènements adhésifs complexes plus importants pour le peptide agoniste que pour les autres cas.

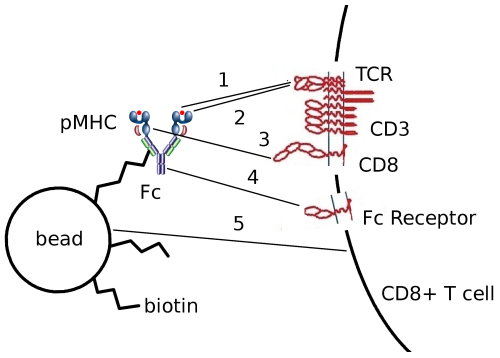


FIG. 3.9 – Résumé des différentes interactions pouvant exister dans le système du BFP. Interactions entre TCR et p (1) et/ou MHC (2). (3) Interactions MHC / CD8. (4) Interactions entre le Fc du DimerX et un FcR de la surface de la cellule (interactions éliminiées par les expériences en FACS menées au CIML (voir texte). (5) Interactions non spécifiques / autres entre la sonde et la surface cellulaire.

A ce stade, la question restante est : qu'observe-t-on (Fig. 3.9) ? Une certaine quantité des interactions vues semble spécifique au peptide présenté (si l'on suit le % d'adhésion) mais peut-on distinguer des interactions majoritairement TCR / MHC qui semblent de magnitude suffisamment proches des interactions TCR / pMHC et/ou des interactions CD8 / (p)MHC (en termes de force) ?

Au retour de cette résidence, j'ai donc commencé à developper un BFP au laboratoire (voir ci-après) et continué ce type d'expériences en utilisant l'AFM disponible au laboratoire. Même si la résolution de force de l'AFM est moins bonne que celle du BFP, cela permettait d'augmenter notre connaissance de ce système.

Instrumentation

J'ai reçu en 2008 une bourse "prise de risque CNRS" afin de monter un BFP à Marseille à partir du système de micropipettes déjà existant. Les différents composants principaux ont été achetés et mis en place (caméra rapide faible coût, piézo, système anti vibration, carte d'acquisition...). Un système "customisé" d'aspiration multipipettes, inspiré d'un système du laboratoire du Pr. Evans vient d'être réalisé par les ateliers du CiNaM. Il ne reste plus qu'à réaliser le logiciel de commande, *user friendly*, en utilisant LabView (National Instruments) qui est un langage de programmation nouveau pour moi.

3.6.6 Utilisation de l'AFM

Modification des protocoles précédents

Nous avons utilisé les leviers les plus souples dont nous disposions[8]. Leur constante de ressort nominale est de 10 pN/nm soit 10 à 100 fois plus rigide que le globule rouge du

[7] il est plus exact de dire que l'on a pas "chargé" le MHC avec un peptide connu

[8] qui sont les moins chers parmi les leviers ultrasouples disponibles sur le marché afin de pouvoir en utiliser plus...

BFP. Ce sont des leviers très grands (320 μm de long) ce qui entraine l'existence de forces hydrodynamiques importantes pour des vitesses de déplacement supérieures à 1 μm/sec, dans un tampon biologique ou dans du PBS.

J'ai choisi d'utiliser une fonctionnalisation non covalente permettant d'orienter les DimerX par rapport à la surface des pointes d'AFM, de les éloigner un peu de celles-ci pour diminuer les interactions non spécifiques potentielles. C'est une méthode peu coûteuse comparativement à celle utilisant les polymères bifonctionnels et assez rapide.

Les DimerX sont attachés aux surfaces via un bras protéique fabriqué "par couches" en utilisant le sandwich BSA-biotine / streptavidine / biotine-proteine G ce qui permet de capturer le fragment Fc du DimerX (Fig. 3.10) et donc d'orienter ce dernier pour améliorer sa reconnaissance par la cellule. Cela aussi l'avantage de ne pas modifier le DimerX comme lors du couplage des PEG pour le BFP (voir ci-dessus). Le levier est alors incubé avec le peptide, suivant les indications du fabricant du DimerX, en large excès, sur une nuit, et conservés à 4°C (au maximum trois jours) en présence de ce peptide sauf pour les expériences. En effet, ces dernières ont montré que la présence ou l'absence de peptide en excès dans la solution ne modifiaient pas notablement les fractions ou les forces d'adhésion observées, ni le comportement du cantilever au cours du temps : il ne semble pas se désactiver, c'est-à-dire perdre le peptide lorsque plongé dans un milieu n'en contenant pas, pendant l'heure que dure l'acquisition des courbes de force.

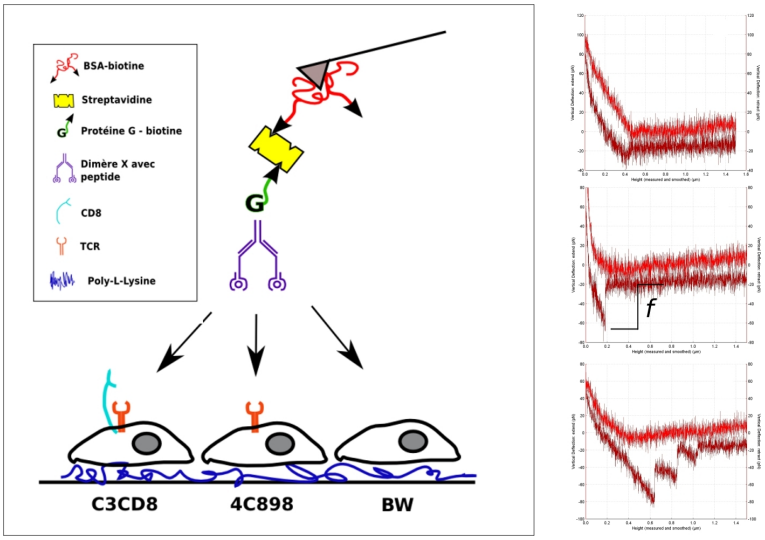


FIG. 3.10 – Schéma du couplage utilisé pour présenter de manière orientée des DimerX sur les leviers d'AFM. Le milieu est du RPMI modifié et l'expérience se passe à température ambiante. On immobilise les hybridomes de manière douce, mais ferme, en utilisant de la poly-L-lysine. Pour des temps de contacts courts entre le levier et la cellule, on observe généralement trois types de courbes de force (du haut vers le bas) : pas d'adhésion, adhésion dite unique, adhésion dite multiple. On quantifie alors la proportion d'adhésion unique et multiple (adhésion totale = unique + multiple) ainsi que la force de rupture correspondant au cas d'adhésion unique, f. Cette dernière sert à construire des histogrammes dont (a) on vérifie le caractère gaussien (b) on détermine les moyenne et SD et (c) on détermine la médiane. Ces valeurs servent alors à effectuer des tests statistiques de significativité des différences observées.

Afin d'immobiliser les cellules T sans les activer, on les fait adhérer sur des lames de verre recouvertes de poly-L-lysine. Cette fixation est suffisante pour que les cellules ne se déplacent pas pendant les expériences, lorsque le levier appuie sur elles ou tire, et n'est pas trop forte pour tuer les cellules ou les activer (C. Boyer, communication personnelle

et P.-H. Puech, observations).

Nous avons caractérisé la réponse des leviers (force hydrodynamique, bruit...) et déterminé les conditions les plus douces possibles (forces de contact entre 50 et 100 pN, temps de contact réduits) afin de se rapprocher des conditions obtenues avec le BFP. De plus, nous avons caractérisé les propriétés mécaniques des lignées cellulaires qui ne diffèrent pas significativement et donc n'introduisent pas de biais sur les conditions de contact entre la pointe du levier et la cellule, donc sur le temps effectif et l'aire de contact.

Les configurations utilisant les différents peptides montrent une force de détachement identique (Fig. 3.11A et 3.12A), tout comme lorsqu'il n'y a pas de peptide. Néammoins, la fraction d'évènements adhésifs varie sensiblement (Fig. 3.11B et 3.12B). La vitesse de traction ne semble pas amener de différenciation notable entre les différents cas [9].

Les fractions d'adhésion relatives ainsi que les valeurs des forces enregistrées apparaissent comme en bon accord avec les données observées en BFP avec une méthode greffage différente : ceci permet de répondre, du moins partiellement, aux soupçons de rupture Fc / protéine G qui amèneraient toujours la même force (dans le BFP, le greffage est covalent).

Les données présentées ici ont été acquises avec deux étudiants de l'Ecole Supérieure d'Ingénieurs de Luminy (Marseille) et un étudiant de l'Ecole Centrale de Marseille.

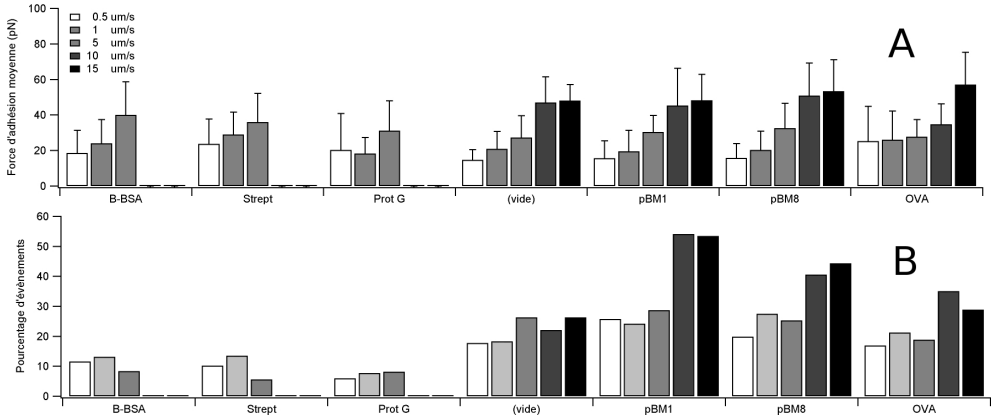


FIG. 3.11 – Interaction des leviers avec les C3CD8. A : force moyenne (± SD) de rupture des évènements uniques, en fonction de la vitesse de traction. B : proportion d'évènements adhérents, en fonction de la vitesse de traction. A : les forces, mêmes non spécifiques, sont toutes similaires, et varient seulement en fonction de la vitesse comme prédites par (Evans and Ritchie, 1997). B : Lorsque le levier ne présente pas de DimerX, la fraction d'adhésion est très faible et quasi indépendante de v. Dès lors que le DimerX est présent, avec ou sans peptide, cette fraction augmente et devient dépendante de v. Il apparait que le peptide pBM1 est toujours plus "adhésif" que les autres. En particulier, DimerX sans peptide est toujours le moins adhésif. Ces observations sont similaires à celles faites en BFP. Les valeurs de la fraction d'adhésion pour les deux vitesses les plus élevées sont à prendre avec précaution car il existe une composante d'adhésion "de succion hydrodynamique" possible.

Afin d'étudier le rôle de CD8 dans cette interaction (en particulier suite à (Huang et al., 2007) où tout semble en place pour effectuer la mesure TCR / pMHC mais où seul la reconnaissance de CD8 est présentée), nous avons d'abord tenté de comparer les cas C3CD8 *vs.* C3CD8 + antiCD8 mais sans grand succès.

[9] les tracés de $f^* = \ln(k_{\text{eff}} \times v)$, une fois les forces corrigées pour les forces hydrodynamiques, suivant Evans n'amènent pas de mesures de k_{off} notablement différentes (non montrés ici pour éviter d'alourdir la présentation)

Nous nous sommes alors portés vers l'étude de trois lignées cellulaires exprimant ou non le TCR et /ou CD8 (Fig. 3.12), afin de vérifier une fois de plus la spécificité des forces mesurées. Nous avons observé que la lignée BW qui ne présente aucun des deux récepteurs a une fraction d'évènements adhésifs bien plus faible que les deux autres qui présentent ou bien l'un ou les deux. Ces résultats, datant de mai 2009, sont encore à prendre avec quelques précautions et leur interprétation est délicate (voir ci-après).

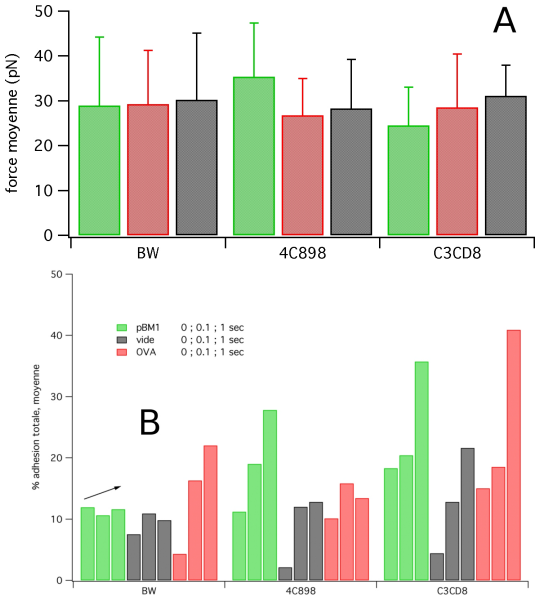


FIG. 3.12 – Interaction des leviers présentant différents peptides sur trois types cellulaires. A : force moyenne (± SD) de rupture des évènements uniques. Elles ne sont pas significativement différentes. B : pourcentage d'adhésion totale en fonction du peptide et du temps de contact (0, 0.1 et 1 sec) : les types de cellules C3CD8 et 4C898 sont difficiles à comparer car on ne connait pas les densités relatives de TCR à leur surface, ni la densité relative TCR *vs.* CD8 pour C3CD8. Néammoins, on observe que BW est toujours moins adhésif que les cellules portant le TCR, pour pBM1. Les données pour OVA sont à confirmer, en particulier dans le cas de C3CD8 à 1 sec de temps de contact.

3.6.7 Application "molécule / molécule"

L'équipe du Pr. A. van der Merwe (Oxford, UK) nous a fourni deux couples TCR-pMHC humains. Ces molécules sont solubles et possèdent soit un tag 6His soit un tag biotine que l'on peut utiliser pour les immobiliser de manière spécifique et orienté, l'un sur la surface de la lame de verre et l'autre sur la pointe des cantilevers. Nous avons étudié deux TCR : 1G4 qui est spécifique d'un peptide tumoral présenté par HLA I A2 et g10 qui est spécifique de la protéine Gag du VIH porté par le même HLA. Ils sont taggés biotine. Nous avons utilisé deux HLA I A2 avec peptide, spécifiques de 1G4, qui eux sont taggés 6His. g10 peut donc être utilisé ici comme contrôle de spécificité des interactions.

Des essais préliminaires, utilisant comme surface des lamelles de mica fraichement clivées et incubées avec des ions nickel que le 6His peut chélater, se sont révélés infructueux à cause d'un niveau d'adhésion bien trop élevé pour être spécifique, malgré la passivation de la surface avec de la BSA. Nous nous sommes tournés vers l'intercalation d'un anti-6His, permettant d'allonger le bras protéique et donc potentiellement de décroitre les interactions non spécifiques tout en permettant une meilleure mobilité de la molécule présentée.

Pour ne pas alourdir la présentation, le greffage, similaire à celui utilisé dans les parties

précédentes pour fixer le DimerX et semblable aussi à celui utilisé lors d'expériences de chambre à flux au laboratoire (Robert, 2009), est décrit schématiquement sur la Fig. 3.13. Les mesures ont été conduites à la température ambiante pour des raisons de facilité de mise en place des expériences pilotes. Ces expériences n'ont été menées qu'en petit nombre (grand nombre de courbes de forces mais peu de répétitions) et donc sont à prendre avec les précautions d'usage. Nous avons tenté d'inverser les modes de présentation (TCR sur cantilever ou sur lame...) pour vérifier la cohérence de nos résultats.

De manière similaire aux résultats précédents (AFM sur cellules, BFP sur cellules), les forces mesurées sont identiques, seule la fraction d'adhésion varie et est influencée par le temps de contact. Pour les temps de contacts très courts, on retrouve un temps de contact nécessaire de l'ordre de 100 msec pour observer une différence entre les contrôles et cas positifs.

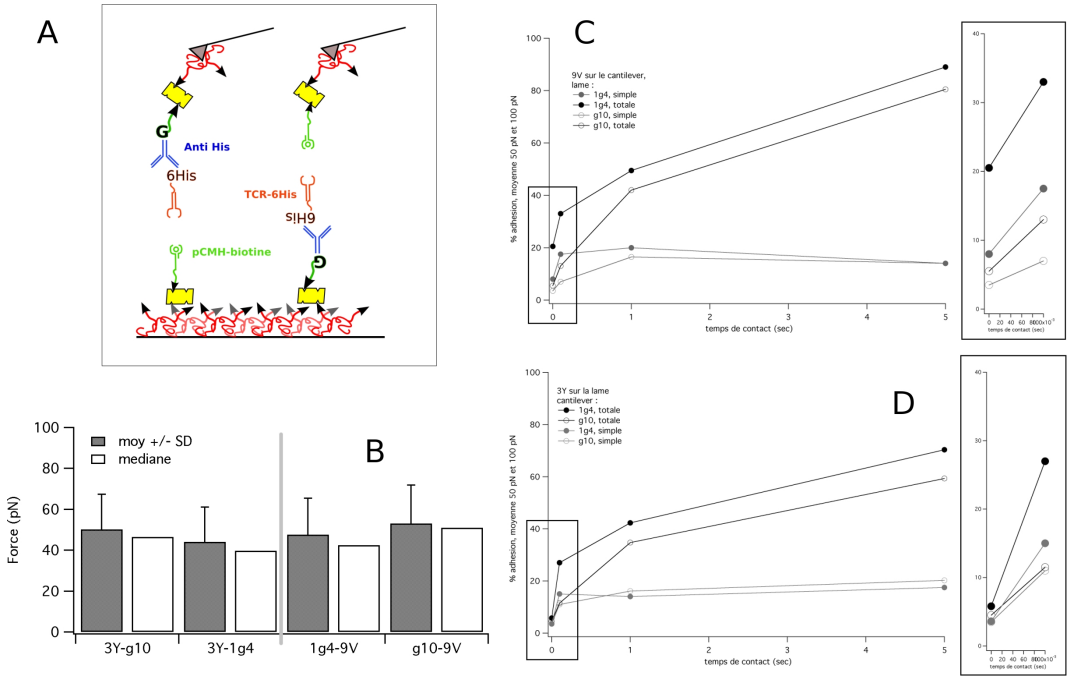


FIG. 3.13 – Premiers essais de mesures de forces sur molécules uniques, in vitro, à partir des systèmes humains provenant du laboratoire du Pr. A. van der Merwe (Oxford, UK). A : schéma des deux greffages symétriques utilisés lors de cette étude. B : forces de rupture pour les évènements uniques - de manière semblable à ce qui a été présenté précédemment, elles sont toutes similaires, que ce soient en moyenne ou en médiane. C, D : évolution de la fraction d'évènements adhésifs uniques ou totale, en fonction du temps de contact. On note pour les temps les plus courts (inserts) une différence entre les cas positifs et les contrôles, dont l'importance décroit avec le temps de contact, sûrement à cause de la fraction de plus en plus grande d'évènements adhésifs complexes (la fraction d'évènements uniques sature, en gris sur C et D).

3.6.8 Quelques pistes...

En conclusion des expériences de BFP et d'AFM réalisées au cours des deux dernières années, il apparait que les forces mesurées sont toujours les mêmes, indépendamment du peptide présenté pour un couple TCR / MHC donné, que ce soit dans une situation cellulaire ou *in vitro*.

Par contre, la fraction d'évènements adhésifs augmente avec l'activité liée au peptide

(il faut garder à l'esprit que les résultats avec OVA et C3CD8 sont encore à prendre avec précaution ; les conclusions apportées ici reposent sur la comparison entre BW et 4C898). L'implication de CD8 est difficile à comprendre avec les données obtenues[10]. La difficulté première a donc été de prouver la spécificité de l'interaction mesurée, ce qui semble relativement établi aujourd'hui : les mesure contiennent une partie d'interactions spécifiques.

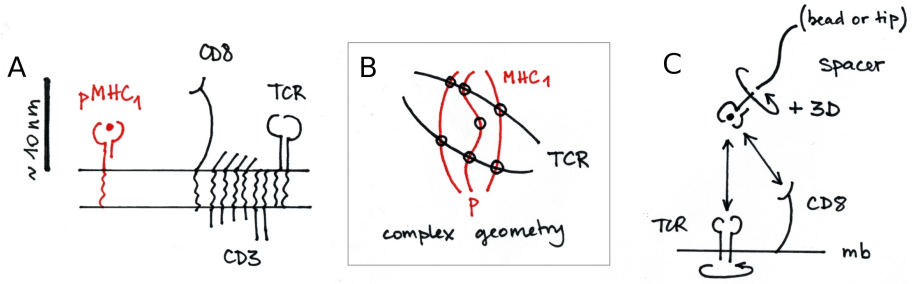


FIG. 3.14 – Le système étudié, en surface des cellules. A : tailles relatives des différentes molécules. B : géométrie optimale du contact TCR / pMHC, d'après la cristallographie. C : contraintes géométriques de la reconnaissance dans nos expériences de mesures de force (voir texte).

La Fig. 3.14 présente schématiquement quelques raisons à celà. La molécule CD8 a une extension bien plus grande que le TCR et peut donc participer à un contact avant que le MHC ne recontre le TCR (Fig. 3.14A). De plus sur les hybridomes C3CD8 une estimation de 1 TCR our 100 à 1000 CD8 semble raisonnable (C. Boyer) : sans pouvoir atttribuer 100% de l'adhésion observée à CD8, une part notable doit provenir de cette molécule. Lorsqu'absente, dans le cas de C3CD8, la sensibilité au peptide est exacerbée (en relatif à C3CD8).

On peut donc, en choisissant un type cellulaire donné, donner la prévalence à une interaction de reconnaissance donnée, mais la comparaison croisée des cellules (sauf BW) est difficile.

En ce qui concerne les forces mesurées, elles sont au voisinage de la limite de détection pour notre AFM, les mesures de BFP montrent que l'on n'est pas réellement limités par cela. De plus, l'absence de différence ne peut provenir d'un effet parasite de "démontage" des différentes couches moléculaires composant les bras protéiques, car les deux techniques montrent des résultats similaires avec des chimies de surfaces fort différentes (le BFP ayant un greffage covalent). Il est vrai que l'on aurait pu utiliser la même chimie sur les pointes d'AFM mais du fait de leur très faible extension (rayon de l'ordre de 10nm) la chimie sur ces substrats est souvent délicate et nécessite une longue mise au point (Y. Dufrêne, communication personnelle et PH. Puech, exprience personnelle).

Le contact lui-même entre un TCR et un complexe pMHC est subtil : il y a une collection d'interactions faibles (liaisons H) et une géométrie complexe (Fig. 3.14B) qui doivent se mettre en place pour que le contact soit entièrement effectif. Comme nous avons des degrés de liberté (à cause des espaceurs, de la construction des DimerX et des protéines taggées (Fig. 3.14C), de la rotation et du mouvement de celles-ci dans la membrane cellulaire), des interactions "complètes" (comme celles montrées par la cristallographie) peuvent ne pas se mettre en place pendant le temps de contact limité à quelques

[10] voir la comparaison entre 4C898 et C3CD8 : la situation est compliquée par la non connaissance des ratios d'expression de TCR et/ou de CD8 sur les différentes cellules - la seule densité connue est pour BW où ni l'un ni l'autre n'est présent

centaines de msec. En effet, si l'on augmente le temps de contact, pour laisser "mûrir" les liaisons, on augmente aussi la proportion de liaisons multiples, ce qui complique l'analyse.

Toutefois, les forces à plusieurs temps de contact, pour les interactions en molécule unique, ne semblent pas différer de manière notable, du moins pour les mesures faites avec l'AFM (Fig. 3.12). Ces mesures n'ont pas été faites avec le BFP qui a une meilleure résolution de forces, mais une différence de l'ordre du pN paraitrait peu significative au vu des énormes écarts comportementaux des cellules en fonction du peptide présenté. Il faut donc rester prudents...

Chapitre 4

Projet de recherche

Dissecting T cell recognition : from forces and kinetics to signalling ; Quantifying the molecular interactions - Physiological significance and links to cellular activation

Il a été proposé à l'ANR Jeune Chercheur en 2008 et vient d'être annoncé comme retenu (Projet DISSECTION ; avril 2009). La présentation qui suit sera somme toute condensée car elle reprend tout ou partie du texte de la soumission. Les paragraphes introductifs à la problématique biologique pourront, pour la partie la plus générale, être trouvés dans le chapitre précédent, à partir de la section 3.6.

Ce projet porte sur la détermination entre le soi et le non soi par les cellules T du système immunitaire. Son but est de déterminer comment les propriétés physiques intrinsèques (thermodynamiques ou cinétiques) des molécules de reconnaissance et d'adhésion influencent les première étapes de la signalisation intracellulaire comme les phosphorylations et les flux calciques, ces évènements étant des étapes cruciales vers des processus plus tardifs comme la prolifération ou la cytotoxicité. L'idée centrale est d'utiliser des méthodes fines de biophysique, permettant de mesurer, directement en surface des cellules, des forces d'interaction / de rupture, des durées de vie de liaison et de les corréler simultanément avec l'apparition d'une activation par le biais de sondes de fluorescence. Ces méthodes sont basées sur l'AFM, le BFP et la chambre de flux, techniques qui ont été abondamment décrites dans les chapitres précédents.

4.1 Contexte

Cinétique / thermodynamique de la reconnaissance vs. activation T Il y a peu d'évidences que l'attachement du pMHC au TCR induise suffisamment de changements conformationnels pouvant induire une capacité de signallisation transmembranaire : la reconnaissance d'un peptide par le TCR initie plus probablement des cascades complexes d'évènements biochimiques (Fig. 3.7). Il est ainsi clair que cet capacité initiatrice est dictée en grande partie par les propriétés physiques de la reconnaissance / de la liaison TCR / pMHC, thermodynamiques et/ou cinétiques (Kersh et al., 1998b).

Comme il l'a déjà été précisé (Section 3.6.3), l'utilisation de protéines recombinantes et de techniques de type SPR / Biacore ont permis de caractériser certains des paramètres cinétiques (durée de vie, constante de formation, constante d'association) de certains complexes TCR / pMHC mais il n'existe aucun consensus quant au paramètre pouvant être corrélé de manière non ambigüe à l'activation des cellules T, mesurée par exemple par une capacité cytotoxique, une production de cytokine ou une prolifération.

Ces évènements sont néanmoins des marqueurs tardifs de l'activation des cellules T : la reconnaissance ayant lieu sur des échelles de temps de l'ordre de la msec à la sec, ces derniers ont lieu sur des échelles de l'ordre de la min à quelques heures...

Buts de ce projet Il s'agit de (1) ré-examiner l'interaction TCR / pMHC en utilisant des techniques fines de biophysique comme la chambre à flux laminaire, l'AFM et le BFP dans lesquelles la géométrie des molécules utilisées, attachées à des surfaces cellulaires ou non, permet d'obtenir de nombreux détails sur le profil énergétique décrivant l'interaction ; (2) coupler ceci à des techniques de microscopie utilisant des sondes de FRET nouvellement dévelopées permettant de visualiser des évènements enzymatiques, signes précoces d'activation, en temps réel, dans des lymphocytes fonctionnels, stimulés de manière contrôlée à l'aide des sondes de forces citées ci dessus.

Ceci doit permettre d'obtenir une meilleure corrélation entre les évènements de reconnaissance et les évènements *précoces* de la signalisation comme les phosphorylations (Fig. 3.7, cadres rouges).

4.2 Description du projet

Bon nombre de travaux ont montré que la thermodynamique et les propriétés cinétiques de la reconnaissance TCR / pMHC affectent fortement les conséquences cellulaires de l'interaction La variation systématique des peptides portés par un MHC donné a montré que l'interaction avec le TCR adéquat porté par des cellules donnait ensuite lieu à une activation totale ou partielle de celles-ci, ou même une "paralysie". Cela a permis de définir des peptides agonistes, agonistes partiels et antagonistes (van der Merwe and Davis, 2003; Tian et al., 2007; Davis and van der Merwe, 2006).

Certaines questions restent ouvertes, malgré l'énorme quantité de littérature existante (Pubmed, 11 octobre 2009 : T cell receptor = 44545 hits ; MHC = 46037 hits) :

1. alors que les conséquences cellulaires de l'interaction sont hautement dépendantes de paramètres physiques comme la demi-vie de la liaison TCR/pMHC, la corrélation n'est jamais parfaite pour les paramètres proposés jusqu'alors. Il est important d'intégrer à l'analyse d'autres paramètres (en incluant des paramètres physiques comme l'affinité, la stabilité cinétique du complexe pMHC,...) et des propriétés biologiques supplémentaires de la cellule considérée (comme son état de différenciation...) ;
2. plus délicat, ces paramètres ont été mesurés avec au moins un des deux partenaires moléculaires en solution, et il existe de plus en plus d'évidences quant à l'imperfection de la caractérisation de systèmes moléculaires, naturellement présents sur des surfaces cellulaires, par des paramètres en solution (Nguyen-Duong et al., 2003a) ;
3. d'où la question cruciale qui suit : la détermination entre soi et non soi est elle déterminée par des propriétés thermodynamiques du complexe TCR / p / MHC (par ex. la résistance / force des liaisons formées) ou par des propriétés cinétiques (par ex. la demi-vie du complexe) ? Comment la reconnaissance moléculaire est-elle corrélée, en temps et en espace, avec les évènements de signalisation précoces (juste "sous" la membrane) comme les phosphorylations ou les flux calciques qui déterminent les conséquences à long terme comme la prolifération et la cytotoxicité ? Il n'existe aucun concensus sur quel paramètre ou quel jeu de paramètres est corrélable à l'activation cellulaire à court et long terme. En effet, les paramètres utilisés jusqu'alors (durée de vie, demi-vie...) apparaissent relativement mal définis et souvent sources de confusion entre différents résultats obtenus par différentes équipes.

Il apparait immédiat qu'il est difficile de corréler de manière simple des évènements de signalisation à long terme avec les phénomènes de reconnaissance de par la *complexité* des voies de signalisation mises en jeu et les *couplages* entre différents signaux qui peuvent avoir lieu, dans le temps mais aussi dans l'espace (Fig. 3.7). Il apparait donc naturel de se concentrer sur les *étapes initiales de la signalisation* en regard de la reconnaissance effectuée à la membrane.

Il est donc nécessaire d'introduire tout d'abord des méthodes de caractérisation moléculaire aux interfaces. Il est ici crucial de comprendre pourquoi les techniques de quantification de la reconnaissance en solution ou avec un des deux partenaires en solution (par ex. le Biacore) ont atteint leur limite. Les résultats obtenus ont été difficiles, sinon impossibles, à corréler de manière sûre aux propriétés d'activation des cellules car les surfaces (les membranes cellulaires par exemple) auxquelles les molécules sont liées en réalité jouent sur les forces et durées de création / de vie des complexes de reconnaissance et d'adhésion (Nguyen-Duong et al., 2003b). En effet, cela implique une orientation préférentielle, une extension spatiale donnée, une restriction des mouvements à 2D - dans le plan de la membrane plasmique, et donc des degrés de libertés réduits et des conséquences énergétiques et entropiques fortes. En conséquence, il apparait clair pourquoi les comparaisons entre données "à 3D" et conséquences cellulaires "à 2D" sont difficiles à relier pleinement.

Les méthodes que je propose d'utiliser permettent de s'affranchir des difficultés évoquées en mesurant des propriétés intrinsèques de molécules présentées par des surfaces, cellulaires ou non : la chambre de flux (Robert et al., 2007, 2008), l'AFM (Franz and Puech, 2008) et le BFP (Merkel et al., 1999). Cela permet non seulement de remplir la condition que les molécules soient en surface mais aussi permet de faire que les molécules d'intérêt soient entourées par un environnement natif ou proche, dont les molécules peuvent interagir de manière complexe et extrêment précise dans le temps et l'espace avec le TCR et/ou le pMHC (par ex. CD8 ou le glygocalyx). Ces contraintes, que l'on peut qualifier de géométriques mais dont les conséquences sont en fait énergétiques et cinétiques, peuvent ainsi être analysées de manière précise.

On peut ainsi proposer d'accéder à des paramètres physiques mieux définis (comme une force de rupture ou une durée de vie pour des conditions de contact ou de déplacement contrôlées) afin de mieux décrire l'intégralité des profils énergétiques de la reconnaissance (formation / rupture) avec des molécules proches de leur état et envionnements natifs. L'approche proposée ic sera partiellement basée sur des techniques analysant des molécules uniques afin d'observer plus finement, sans effet de moyenne, leurs comportements (cette approche a été particulièrement productive dans le cas des *catch bonds* (Marshall et al., 2003) par exemple).

Ensuite, quels évènements d'activation précoces peut-on observer et comment ? La question de la façon dont la machinerie de signalisation intègre les évènements de reconnaissance ayant lieu via le TCR lorqu'un lymphocyte T rencontre une cellule présentatrice d'antigène (APC) est cruciale pour comprendre le fonctionnement de la réponse immune adaptative. De nombreuses hypothèses ont été formulées pour essayer d'expliquer la vitesse et la sensibilité avec laquelle une cellule T fait la différence entre les antigènes rencontrés, surtout modulo leur faible densité. Certaines incluent une notion de contrôle spatial et temporel de certaines étapes biochimiques par lequel le système doit transiter (revue par (Burroughs and van der Merwe, 2007)).

La microscopie de fluorescence, en utilisant des anticorps marqués ou des protéines de fusion fluorescentes (marquées GFP par ex.), est devenue un outil incontournable qui

permet de cartographier la distribution, la redistribution et la translocation de molécules de signalisation lors de l'activation des cellules T. Cela a permis d'obtenir des informations inédites quant à la dynamique des processus cellulaires avec une résolution spatiale et temporelle inaccessible aux techniques classiques de biochimie (par ex. Western blots). Néanmoins, la microscopie de fluorescence bien que puissante ne permet pas d'avoir une compréhension approfondie et en temps réel de l'*activité enzymatique* des molécules suivies.

Jusqu'à présent, l'évènement dynamique le plus précoce et facile à observer et quantifier en temps réel et dans des cellules vivantes était lié aux flux calciques (Fig. 3.7). Alors que les stratégies classiques utilisant des réactifs comme FURA ou Indo continuent à donner des informations pertinentes pour ces signaux, des stratégies élégantes utilisant des biosenseurs qui connaissent des changements de ratio de FRET [1] lorsqu'ils sont phosphorylés par une enzyme adéquate et pour laquelle ils sont spécifiques ont été mises en place avec succès (Randriamampita et al., 2008).

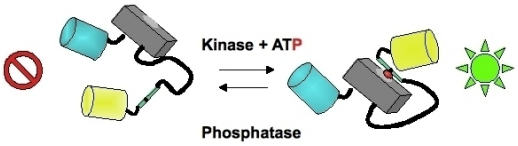


FIG. 4.1 – Le principe de ROZA : le signal FRET est conditionnée par le changement de conformation de la sonde sous l'effet d'une phosphorylation : (gauche, inactive) ⇒ ligne de base de FRET vs. (droite, active = phosphorylée) ⇒ ratio de FRET accru

De telles molécules peuvent donc être utilisées pour observer en temps réel la distribution spatiale et temporelle des évènements liés à une protéine kinase donnée au sein d'une cellule par vidéo microscopie (Sato et al., 2002; Ting et al., 2001). Une chercheuse de notre laboratoire (Dr. A. Lellouch, CNRS) a récemment mis au point une telle sonde permettant de suivre l'activité de Zap70 appellée ROZA (pour *Reporter Of ZAP-70 Activity* (Randriamampita et al., 2008) ; Fig. 4.1). ROZA est la première sonde fonctionnelle obtenue afin de suivre une tyrosine kinase dont l'activité dépend intimement des évènements de reconnaissance au niveau du TCR. Elle permet en outre de suivre des évènements reconnus comme participant à l'initiation de la réponse cellulaire, et surtout des évènements *précoces*. Cette sonde ouvre la voie à l'obtention de données intéressantes quant à la transmission et à l'intégration du signal recueilli par le TCR, avec la simplicité et la résolution de la microscopie optique.

Avoir le bon *timing* Un problème non trivial dans l'examen de la relation entre des évènements de reconnaissance moléculaire (rencontre TCR / pMHC) et leurs conséquences biochimiques à court terme sur les voies de signalisation est d'établir quand et comment un tel évènement a eu lieu de manière efficace. Dans la plupart des expériences, le "$t = 0$" est considérée comme étant l'instant de mélange entre les composants, sans avoir aucune preuve, autre que la mesure d'un flux de calcium par exemple, que l'interaction source de l'activation a eu lieu. La seule exception à cela est une étude publiée utilisant un pMHC activable par UV (Huse et al., 2007) mais avec ses propres limitations (une activation résiduelle due aux UV peut exister, JT Groves, communication personnelle).

Les techniques et approches qui sont proposées dans ce projet, en particulier l'AFM, permettent d'obtenir un contrôle physique de l'efficacité de l'interaction, *indépendant* de

[1] Förster Resonance Energy Transfer

la mesure de l'activation, grâce à la mesure simultanée de la force exercée par / sur le cantilever. Cela permet d'avoir ainsi un "t=0" de la mise en contact intime des molécules devant interagir plus finement et précisément défini grâce à la connaissance précise de l'instant de mise en contact de la surface stimulante macroscopique. A la connaissance des partenaires de ce projet, aucune approche de ce type n'a été réalisée (publiée) jusqu'alors pour l'étude de l'activation du lymphocyte T.

Trois directions seront suivies. Mêmes si toutes ne sont pas de mon ressort personnel, je les présenterais à des fins pédagogiques, pour la complétude de ce projet.

1. Détermination avec des techniques fines biophysiques de surface (AFM, BFP, flux) les caractéristiques physiques, moléculaires de la reconnaissance TCR / pMHC avec des systèmes dont on connait les conséquences cellulaires ;
2. Créer des sondes innovantes des évènements biochimiques précoces de l'activation, basées sur le principe des sondes de FRET décrites précédemment ;
3. Utiliser des techniques de micromanipulation pour corréler les propriétés moléculaires de la reconnaissance à des évènements biochimiques révélés par les sondes fluorescentes, qu'elles soient classiques (calcium) ou non (ROZA ou calcium, FRET).

4.3 Méthodologie proposée

4.3.1 Obtenir des informations sur la reconnaissance moléculaire TCR / pMHC et les paramètres la contrôlant

On peut caractériser la reconnaissance entre deux molécules en interaction en connaissant le paysage énergétique décrivant les intéractions complexes (à longue et courte portée) que ces molécules ressentent avant de se rencontrer (Merkel et al., 1999). Il a été souligné récemment que la connaissance de la cinétique de cette reconnaissance (les constantes de formation et de rupture) est nécessaire pour mieux comprendre et décrire l'interaction (Robert et al., 2007). En conséquence, une idée naturelle est de caractériser le comportement complet de la rupture (qui est aisée à déterminer, bien plus que la formation) des liaisons de reconnaissance à la fois en termes de résistance à l'application d'une rampe de force et en termes de durée de vie du complexe.

Les données concernant la rupture des liaisons entre TCR et pMHC seront obtenues en utilisant, comme précédemment décrit, l'AFM, le BFP et la chambre de flux dans des configurations soit "molécules *in vitro*", soit "molécule *vs.* cellule unique" à l'image de ce qui a été décrité dans le chapitre précédent (Section 3.6). Les systèmes moléculaires que l'on se propose d'utiliser seront précisés plus loin.

En particulier, les k_{off} obtenus seront comparés de manière directe à ceux obtenus sur les mêmes systèmes (disponibles via nos collaborateurs ou au travers de travaux publiés) par des méthodes plus "classiques" dans le domaine, comme le Biacore, afin d'observer l'effet de la présence et de l'attachement à une surface des molécules étudiées, en particulier la spécificté des interactions mesurées.

La détermination des k_{on} et k_{off} lorsque possibles permettra de répondre à une question intrigante dont la résolution même théorique n'a pas été abordée qui consiste à proposer une définition du k_{on} reliée aux propriétés géométriques du système moléculaire, aux portées des interactions en jeu, spécifiques ou non, au guidage moléculaire à quelque distance que ce soit, et son lien avec les forces de ruptures et le k_{off} de la liaison. La formation d'une liaison est une question intrinsèquement difficile qui rejaillit immédiatement sur la

définition du k_{on} et liée à la définition des sa rupture (et donc de la définition du k_{off}) car... trivialement une liaison doit se former avant que de rompre ou d'être rompue.

Quelques observations ont donné l'indication séminale que la résistance d'une liaison dépend de manière intime de la manière et du temps qu'elle met à se former (une forme de mûrissement) (Pincet and Husson, 2005), mettant en lumière le rôle de l'*histoire* complète de la liaison (formation, renforcement vs. rupture) pour comprendre ses propriétés (Marshall et al., 2005). La caractérisation simultanée et continue de la formation et de la rupture doit permettre une compréhension quantitative, unifiée des données publiées jusqu'alors et qui ont souvent faussement conduit à l'idée que des situations paradoxales peuvent exister (Pincet and Husson, 2005).

Utilisation de la chambre de flux [2]

La chambre de flux classique sera utilisée pour faire passer, à flux faible donc force faible, des billes décorées ou des cellules T au voisinage de surfaces décorées par des pMHC complémentaires avec une géométrie contrôlée (Robert, 2009; Robert et al., 2007, 2008). Le substrat portera une densité faible de molécules actives pour mimer une cellule présentant des antigènes. Ceci a pour conséquence de permettre la détection d'interactions moléculaires uniques. La durée des arrêts transitoires et leur fréquence seront enregistrées, permettant de construire les courbes de détachement (%(adhesion) vs. ln(durée de vie)) dont sera tiré le k_{off} de l'interaction. La fraction d'évènements adhésifs obtenus pour une condition donnée et des conditions comparables en densités moléculaires donneront des indications sur le k_{on} (Robert et al., 2009).

Différentes chimies de surface seront utilisées pour déterminer l'influence de la géométrie de la présentation des molécules, de leurs degrés de liberté, de leur accessibilité et de leur mobilité sur l'efficacité de la reconnaissance : utilisation de multicouches de protéines, d'anticorps ou d'espaceurs PEG bifonctionnels de longueurs variables.

En utilisant des cellules portant le TCR BM3.3 et des MHC $H2K^b$, par exemple, avec une gamme de peptides dont les capacités activatrices sont connues, la cinétique de la reconnaissance sera caractérisée dans une situation porteuse de sens au niveau biologique. Les données obtenues seront comparées aux données du Biacore sur les mêmes couples lorsque disponibles (Mazza et al., 2007). Nous utiliserons en parallèle de ceci un nouveau système de chambre "à double flux" (Robert, 2009) permettant un examen détaillé (par spectroscopie de durée de vie des liaisons à différents états de maturation) des états intermédiaires de liaison du profil énergétique de la reconnaissance. Le traitement des données ayant été automatisé et validé, utilisant des logiciels et fonctions de calcul et de tri développées au laboratoire par P. Bongrand et L. Limozin, permettront d'obtenir de grandes quantités de données ouvrant une analyse statistique fine des comportements observés.

Utilisation de l'AFM comme moyen de caractériser la partie la plus interne du paysage énergétique. A la suite des expériences présentées dans le chapitre précédent et dans (Franz et al., 2007), les distributions des forces de rupture et les probabilités d'interaction entre TCR / pMHC en utilisant des leviers décorés de diverses manières avec

[2] Cette technique utilise un flux de liquide pour amener, au voisinage d'une surface décorée, des objets, cellules ou billes et leur appliquer des forces faibles, de l'ordre du pN. Dans des conditions expérimentales *ad hoc* des interactions à l'échelle de la molécule unique peuvent être enregistrées sous la forme d'arrêts transitoires des objets. A partir de la distribution de la durée et de la fréquence de ces arrêts, les caractéristiques cinétiques de la liaison peuvent être obtenues de manière simple. Cette technique est complémentaire de l'AFM ou du BFP car elle ne sonde que les parties les plus externes du paysage énergétique des liaisons. Pour une revue pédagogique, voir (Robert, 2009).

des pMHC I (voir ci-dessus pour les différentes possibilités) et présentés à des cellules T BM3.3 adhérées (par exemple via de la poly-L-lysine) seront déterminées avec une grande quantité de données.

Les cellules doivent être fermement adhérentes et peu mobiles pour pouvoir supporter la traction imposée par le levier sur ses récepteurs et que l'on puisse prendre plusieurs courbes de forces par cellule, sur la même zone de cette dernière afin d'obtenir des infos statistiques *et* résolues spatialement si nécessaire. Leur adhésion ne doit surtout pas activer les cellules ce qui modifierait les expressions de protéines et l'état mécanique de la cellule et ne doit pas les fait mourir [3].

Le levier peut aussi être décoré avec une bille micrométrique pour obtenir un *colloidal force probe* (Robert et al., 2008) avec une surface plus lisse sur laquelle on peut mieux contrôler la chimie par rapport à une pointe de quelques nm de rayon, et qui fournit une zone de contact mieux définie avec la cellule (Krieg et al., 2008; Robert et al., 2008; Robert, 2009) [4].

En adaptant les paramètres de la mesure (temps de contact, force de contact et densité des molécules présentées, voir section 3.6), les forces de ruptures seront dans un premier temps mesurées à l'échelle de la molécule unique, à différents temps de contact, pour explorer une possible maturation des liaisons, avec différentes vitesses de mise au contact et de traction afin d'extraire le paysage énergétique préférentiel de la liaison suivant le modèle de Evans/Kramer/Bell (Evans and Ritchie, 1997) *à température physiologique* (grâce au système Biocell de chez JPK Instruments).

Des fonctions de calcul et de traitement de données existent déjà (voir chapitre précédent). Les données obtenues seront mises en perspectives de celles obtenues en chambre à flux.

Néammoins, il semble que le setup d'AFM du laboratoire ne permette pas encore d'accéder à des mesures plus fines, comme celles de la formation des liaisons (PH. Puech, L. Limozin, observations personnelles). Suivant la stratégie proposée très récemment par Chen et al. (2008), le BFP apparait comme la technique de choix complémentaire à mettre en oeuvre.

Utilisation du BFP comme moyen d'améliorer la précision de la mesure des paramètres caractérisant la reconnaissance moléculaire. J'ai obtenu un financement pour monter un BFP au laboratoire. Les parties principales sont en place et la programmation du logiciel dédié(utilisant Labview) a commencé.

Une fois le système fonctionnel[5], cette technique sera utilisée pour mesurer les forces de rupture de molécules uniques / cellule unique. Des billes présentant un ou plusieurs (co)récepteurs seront utilisées suivant (Schütz et al., 2008).

Il faut rappeler que le resssort du BFP étant un globule rouge pressurisé, il est un à deux ordres de grandeur plus souple que le levier d'AFM et par conséquent la mesure de force se fait avec des résolutions de l'ordre de quelques pN contre 10 à plus pN pour l'AFM.

Nous étudierons l'étape de formation de la reconnaissance en suivant la modification de la fluctuation de la sonde force au voisinage d'une surface complémentaire lorsqu'une interaction à lieu, suivant (Chen et al., 2008). L'utilisation d'un mode de *force clamp*

[3] ce qui a été vérifié in situ lors d'expériences préliminiaires par marquage avec du bleu trypan, mais qui peut être visualisé aussi par des marquages de type *live / dead*

[4] il faut aussi noter que des tels montages seront aussi utilisés pour mesurer les propriétés mécaniques des cellules sondées, afin d'en mesurer les variations, en fonction du nombre de contacts de reconnaissance "réussis" ou de l'état d'activation des cellules (voir ci-après).

[5] il sera testé avec des couples connus comme strepatavidine / biotine, à l'aide des protocoles fournis par l'équipe du Pr. Evans, avec les mêmes réactifs

permettra de mesurer les temps de vie des liaisons, en fonction de la force appliquée, de manière directe.

Ceci nous permettra de corréler, directement, les constantes cinétiques de formation et de rupture de la reconnaissance, en parallèle de la durée de vie de la liaison, pour étudier l'influence de l'histoire de celle-ci sur les paramètres accessibles. Un point essentiel sera de réaliser une chambre de micromanipulation thermalisable à 37°C : certains prototypes ont déjà été réalisés par mes soins au laboratoire.

4.3.2 Dévelopement de sondes de FRET permettant de suivre les phosphorylations post-reconnaissance par le TCR

Cette partie sera développée par A. Lellouch au sein du laboratoire et donc ne sera pas détaillée plus avant, car elle sort de mon champ de compétences.

Afin de mimer le type de rencontres en série qu'un lymphocyte effectue lorsqu'il scanne les cellules recontrées, des cellules exprimant ROZA subiront des cycles contact-retraction comme décrit dans la section précédente, en utilisant des leviers d'AFM décorés ou non avec des billes micrométriques et portant des densités contrôlées de pMHC connu et/ou des corécepteurs.

En plus des améliorations que l'on apportera à la sonde ROZA elle-même afin d'améliorer la gamme dynamique de sa réponse FRET et afin d'explorer plus finement sa phosphorylation par les substrats endogènes, d'autres sondes de FRET visant à observer Lck de la famille Src seront développées. Dans les expériences publiées, ROZA répond rapidement (< 1 min) à une stimulation de la cellule par des drogues, des anti-CD3 ou des superantigènes. Ceci est cohérent avec la biochimie connue jusque là de la phosphorylation de LAT.

En parallèle, des sondes FRET calciques seront utilisées pour suivre, pour des stimulations contrôlées, les flux calciques et serviront de référence (voir paragraphe suivant).

4.3.3 Couplage mesures de forces de reconnaissance et suivi de la signalisation "sous" le TCR

Le laboratoire possède un AFM intégré dans un dispositif de microscopie optique qui sera utilisé de manière intensive pour observer les liens entre les évènements membranaires de reconnaissance et les premiers instants de la signalisation intracellulaire. Cet AFM possède un mode de mesure de forces bien adapté au contrôle des différents paramètres évoqués précédemment (Puech et al., 2006b). Nous l'utiliserons, ainsi que la chambre à flux, pour stimuler manière contrôlée les cellules en même temps que le niveau d'activation sera suivi en microscopie de fluorescence. Ce type d'approche est dans la droite ligne des travaux du groupe du Pr. MA Horton (Charras and Horton, 2002).

Utilisation de la chambre à flux pour établir le $t = 0$ de l'interaction entre cellules et ligand. La configuration classique pour la détection de molécules uniques (Robert, 2009) sera modifiée comme suit : les densités de pMHC greffées de manière covalente sur la surface de la chambre à flux seront accrues. L'utilisation de sondes fluorescentes (protéines marquées, anticorps ou Q-dots) permettront de quantifier de manière précise la densité et la distribution spatiale des molécules. L'imagerie AFM sera utilisée en complément pour caractériser la topologie de ces surfaces à l'échelle du nm.

Des cellules ayant une sonde de FRET pour le calcium ou ROZA seront amenées par un flux de faible vitesse, à une force permettant aux cellules de s'arrêter après qu'un évènement de reconnaissance ait eu lieu. L'imagerie de fluorescence sera faite au cours du

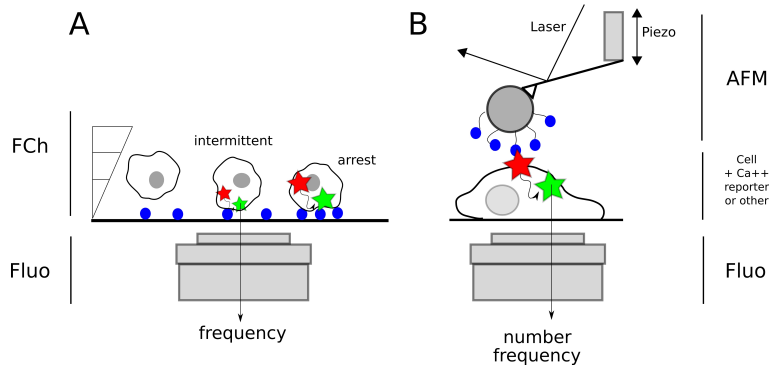


FIG. 4.2 – Stimulation contrôlée d'une cellule T avec enregistrement simultané du niveau d'activation – A : Utilisation d'une chambre à flux classique pour établir le $t = 0$ du contact entre la cellule T et des pMHC. B : Utilisation de l'AFM pou stimuler une cellule possédant ou exprimant un marqueur fluorescent d'activation, avec ou sans bille sur le levier. Le marqueur sert donc à suivre la réponse d'activation à une stimulation mécanique et de reconnaissance contrôlée. Cette dernière peut être intermittente ou continue, à faible force de contact, avec des densités connues de ligand. Ces deux situations miment le procédé naturel de "palpage" de la surface d'une cellule présentant des antignes par une cellule T.

déplacement des cellules le long de la surface, au cours des arrêts transitoires éventuels et après l'arrêt "définitif" s'il existe.

Cela permettra d'observer si (a) un arrêt transitoire ou une succession d'arrêts de ce type peut générer un signal intracellulaire (à différents niveaux de "profondeur", Fig. 3.7) ou si seulement un contact prolongé permet à la cellule d'intégrer le signal (la taille de la zone de contact pourra être imagée en RICM par exemple, ou en TIRFM) ; (b) comment ce signal est allumé / maintenu /éteint quand un contact, transitoire ou final est accompli. Les cellules seront C8+ ou CD8- pour évaluer l'influence de ce corécepteur sur ces phénomènes, et les surfaces pourront porter d'autres (co-)récepteur adhésifs (anti-TCR, molécules d'adhésion...) (Schütz et al., 2008).

Utilisation de l'AFM pour stimuler de manière contrôlée, périodique ou non, des cellules T. Nous utiliserons pour les premières expériences de hybridomes BM3.3 de souris transfectés avec des sondes FRET-calcium ou ROZA. La méthode pour présenter les pMHC et la fixation des cellules sur les lames suivront les méthodes déjà présentées. Les conditions de température, de sérum seront analysées en détails pour éviter toute activation parasite, toute inactivité ou trop plein d'activité après la stimulation locale. Nous comparerons des familles de peptides proches en structure mais avec des conséquences cellulaires connues.

Un premier type d'expérience utilisera des pointes sans bille afin de stimuler de manière très locale, à l'échelle de la molécule unique, la cellule. Les cycles de force seront synchronisés avec la mesure de l'activation par fluorescence. Le nombre exact d'évènements de reconnaissance positive sera mesuré et comparé au profil d'activation mesuré par fluorescence.

Divers scénarios sont envisageables : une augmentation graduelle du signal en fonction du nombre de contact positifs, des pulses d'activation qui s'accumulent, augmentant le signal global ou la présence d'un seuil à dépasser en nombre, avant que le signal n'apparaisse, directement à saturation (procédé on/off).

Le deuxième type d'expérience utilisera plutôt des leviers avec bille et densité contrôlée (par exemple par FACS sur des billes similaires), et visera à indenter avec une force connue des cellules dont on connait [6] les propriétés mécaniques. On créera ainsi une zone de contact contrôlée contenant une densité connue de ligands et/ou corécepteurs. Pour un contact donné, continu ou de période donné, on suivra alors par fluorescence l'établissement de l'activation. La mesure de la force totale d'adhésion dans le cas continue renseignera directement sur la qualité de la reconnaissance et potentiellement sur le nombre de partenaires s'étant trouvés avec succès.

Tout délai, cut-off, accumulation, saturation ou décroissance de la signalisation pourra ainsi être détecté et analysé en fonction du type de contact très contrôlé que l'on aura établi entre ces surfaces "APC" artificielles et la cellule T.

De même que précédemment, les cellules seront C8+ ou CD8- pour évaluer l'influence de ce corécepteur sur ces phénomènes, et les surfaces pourront porter d'autres (co-)récepteur adhésifs (anti-TCR, molécules d'adhésion...) (Schütz et al., 2008).

4.3.4 Quelques mots sur les systèmes biologiques envisagés.

Nous utiliserons le TCR BM3.3 (hybridomes et/ou clones) (Mazza et al., 2007; Auphan-Anezin et al., 2006; Guimezanes et al., 2003, 2001) qui reconnait, de manière CD8 indépendante (du moins pour les conséquences à *long* terme de l'activation), un peptide activateur nommé pBM1 portés par des MHC H2K^b. Des agonistes partiels existent et seront de première importance pour disséquer les mécanismes de la reconnaissance. Ces cellules existent avec ou sans CD8 [pour les hybridomes, C3CD8 (TCR+, CD8+), 4C8 (TCR+, CD8-)], et une lignée "contrôle" [BW (TCR-, CD8-)] qui a servi à construire les hybridomes. Le savoir faire quant à la culture et manipulation de ces cellules existe déjà (Section 3.6). Des dimères MHC H2K^b commerciaux existent, ainsi que les peptides utilisés. Nous préparerons éventuellement des monomères de ces MHC en suivant la littérature avec l'aide du CIML. Une collaboration existe déjà avec le Centre d'Immunologie de Marseille Luminy (CIML, C. Boyer) autour de ces cellules.

Pour pousser plus loin cette étude, le deuxième TCR envisagé est P14 (Pircher et al., 1989). Il reconnait des peptides présentés dans le contexte de MHC H2D^b, et plus d'une cinquantaine de peptides d'activité connue ont été décrits et les propriétés de la reconnaissance moléculaire en Biacore sont disponibles dans la littérature (affinité, demi-vie) (Boulter et al., 2007; Tian et al., 2007). Les relations entre paramètres 3D vs 2D seront étudiées avec ce système, ainsi que la relation stimulation / activation. Le nombre important de peptides disponibles offre la possibilité incomparable d'une vue semi-continue de cette dernière (Tian et al., 2007). A la différence de BM3.3, P14 est sensé être CD8 dépendant (à long terme) et donc permettra aussi d'étudier l'influence de ce corécepteur sur l'activation à court terme (van der Merwe, 2002). De plus, des dimères MHC H2D^b commerciaux existent.

4.4 Conclusion

Malgré l'énorme quantité de littérature publiée, très peu d'études ont caractérisé de manière continue l'interaction entre récepteur et ligand, depuis les paramètres obtenus des études en molécules uniques, *in vitro* ou *in vivo*, jusqu'à leur intégration dans les phénomènes de signalisation et les phénomènes actifs de la cellule.

[6] car mesurées par AFM avec ou sans bille

En particulier, aucune approche n'a cherché à relier précisément les paramètres moléculaires comme la durée de vie d'une liaison ou sa capacité à engendrer / résister à des forces aux phénomènes *précoces* de signalisation que sont les phosphorylations au voisinage du TCR dans le cas de figure qui nous intéresse ici.

Il faut encore une fois souligner l'imperfection des corrélations proposées jusqu'ici, entre paramètres moléculaires et conséquences à *long* terme de l'activation T que sont la prolifération, la cytotoxicité.

En effet, la reconnaissance cellulaire, ici immunologique, ne se limite pas à l'interaction entre deux molécules complémentaires mais met en jeu différentes échelles de forces, d'espace (localisation de la molécule, formation de sur-structures adhésives (comme la synapse immunologique), morphologie de la surface mais aussi de temps (reconnaissance, réorientation, diffusion, engagement de co-récepteur(s), recrutement actifs, détachement...) (van der Merwe and Davis, 2003). Ceci entraine que les mécanismes donnant naissance aux différents comportements des cellules T, en particulier l'activation, sont encore à détailler avec précision.

Il est crucial de se souvenir que les mesures moléculaires effectuées jusqu'alors sur des systèmes TCR / p / MHC (par exemple par Biacore) ont montré leur limite quant à la possibilité de les corréler aux propriétés d'activation des cellules T et de leurs conséquences. Ces molécules sont des protéines *de surface* ce qui influence de manière forte leurs propriétés (forces, temps de vie) (Nguyen-Duong et al., 2003b).

Le projet présenté ici propose de repousser cette barrière en utilisant des méthodes et des concepts qui ont été récemment appliqués à bon nombre de protéines d'adhésion : des techniques de surface fines et résolutives en temps et en force comme la chambre à flux, l'AFM et le BFP. Elles permettent d'accéder à des propriétés *mieux définies*, mécaniques, thermodynamiques et cinétiques *directement à la surface des cellules*, dans un environnement moléculaire natif ou proche.

Pour cela, des systèmes cellulaires et moléculaires de la reconnaissance T (TCR, peptides, MHC, cellules) dont les propriétés d'activation sont connues par ailleurs seront étudiées afin d'examiner l'effet des forces appliquées, de la restriction de mobilité due à la présence du greffage sur des surfaces et des renforcements / compétitions dus à la présence de cet environnement complexe. On cherchera ainsi dans un premier temps à mesurer des paramètres *intrinsèques* à l'échelle de la molécule unique. Nous les comparerons au mesures déjà effectuées et aux conséquences cellulaires de l'activation à court et long terme.

Par la suite, des outils de visualisation (sondes moléculaires) de FRET seront utilisées et/ou développées pour finalement être utilisées en combinaison avec les techniques citées pour comprendre comment s'initie la signalisation *sous le TCR* en créant des contacts *définis, dans le temps et dans l'espace.*

Nous espérons ainsi obtenir des résultats utiles pour la compréhension de l'activation T par le TCR et mettre en place des outils et méthodologies applicables à d'autres systèmes de reconnaissance moléculaire et de transduction de signal au travers de la membrane, comme par mécanotransduction.

Bibliographie

Auphan-Anezin, N., Mazza, C., Guimezanes, A., Barrett-Wilt, G. A., Montero-Julian, F., Roussel, A., Hunt, D. F., Malissen, B., and Schmitt-Verhulst, A.-M. (2006). Distinct orientation of the alloreactive monoclonal cd8 t cell activation program by three different peptide/mhc complexes. *Eur J Immunol*, 36(7) :1856–1866.

Bayas, M. V., Leung, A., Evans, E., and Leckband, D. (2006). Lifetime measurements reveal kinetic differences between homophilic cadherin bonds. *Biophys J*, 90(4) :1385–1395.

Bell, G. I. (1978). Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200(4342) :618–627.

Benoit, M. and Gaub, H. E. (2002). Measuring cell adhesion forces with the atomic force microscope at the molecular level. *Cells Tissues Organs*, 172(3) :174–189.

Boulter, J. M., Schmitz, N., Sewell, A. K., Godkin, A. J., Bachmann, M. F., and Gallimore, A. M. (2007). Potent t cell agonism mediated by a very rapid tcr/pmhc interaction. *Eur J Immunol*, 37(3) :798–806.

Burroughs, N. J. and van der Merwe, P. A. (2007). Stochasticity and spatial heterogeneity in t-cell activation. *Immunol Rev*, 216 :69–80.

Charras, G. T. and Horton, M. A. (2002). Single cell mechanotransduction and its modulation analyzed by atomic force microscope indentation. *Biophys J*, 82(6) :2970–2981.

Chen, W., Evans, E. A., McEver, R. P., and Zhu, C. (2008). Monitoring receptor-ligand interactions between surfaces by thermal fluctuations. *Biophys J*, 94(2) :694–701.

Chesla, S. E., Selvaraj, P., and Zhu, C. (1998). Measuring two-dimensional receptor-ligand binding kinetics by micropipette. *Biophys J*, 75(3) :1553–1572.

Chu, Y.-S., Eder, O., Thomas, W. A., Simcha, I., Pincet, F., Ben-Ze'ev, A., Perez, E., Thiery, J. P., and Dufour, S. (2006). Prototypical type i e-cadherin and type ii cadherin-7 mediate very distinct adhesiveness through their extracellular domains. *J Biol Chem*, 281(5) :2901–2910.

Collectif (2002). *Methods in Cell Biology*, volume 68. Springer.

Davis, S. J. and van der Merwe, P. A. (2006). The kinetic-segregation model : Tcr triggering and beyond. *Nat Immunol*, 7(8) :803–809.

de Gennes, P., Puech, P., and Brochard-Wyart, F. (2003). Adhesion induced by mobile stickers : A list of scenarios. *Langmuir*, 19 :7112–19.

Evans, E., Heinrich, V., Leung, A., and Kinoshita, K. (2005). Nano- to microscale dynamics of p-selectin detachment from leukocyte interfaces. i. membrane separation from the cytoskeleton. *Biophys J*, 88(3) :2288–2298.

Evans, E. and Ritchie, K. (1997). Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J*, 72(4) :1541–1555.

Florin, E. L., Moy, V. T., and Gaub, H. E. (1994). Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 264(5157) :415–417.

Franz, C. M. and Puech, P.-H. (2008). Atomic force microscopy : a versatile tool for studying cell morphology, adhesion and mechanics. *accepted to Cellular and Molecular Bioengineering*.

Franz, C. M., Taubenberger, A., Puech, P.-H., and Muller, D. J. (2007). Studying integrin-mediated cell adhesion at the single-molecule level using afm force spectroscopy. *Sci STKE*, 2007(406) :pl5.

Golstein, P., Aubry, L., and Levraud, J.-P. (2003). Cell-death alternative model organisms : why and which ? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(10) :798–807.

Guimezanes, A., Barrett-Wilt, G. A., Gulden-Thompson, P., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D. F., Schmitt-Verhulst, A. M., and Engelhardt, V. H. (2001). Identification of endogenous peptides recognized by in vivo or in vitro generated alloreactive cytotoxic t lymphocytes : distinct characteristics correlated with cd8 dependence. *Eur J Immunol*, 31(2) :421–432.

Guimezanes, A., Montero-Julian, F., and Schmitt-Verhulst, A.-M. (2003). Structural and kinetic basis for low affinity cross-reactivity in t cell allorecognition. *Eur J Immunol*, 33(11) :3060–3069.

Heinrich, V., Leung, A., and Evans, E. (2005a). Nano- to microscale dynamics of p-selectin detachment from leukocyte interfaces. ii. tether flow terminated by p-selectin dissociation from psgl-1. *Biophys J*, 88(3) :2299–2308.

Heinrich, V., Leung, A., and Evans, E. (2005b). Nano-to-microscale mechanical switches and fuses mediate adhesive contacts between leukocytes and the endothelium. *J Chem Inf Model*, 45(6) :1482–1490.

Helenius, J., Heisenberg, C.-P., Gaub, H. E., and Muller, D. J. (2008). Single-cell force spectroscopy. *J Cell Sci*, 121(Pt 11) :1785–1791.

Huang, J., Edwards, L. J., Evavold, B. D., and Zhu, C. (2007). Kinetics of mhc-cd8 interaction at the t cell membrane. *J Immunol*, 179(11) :7653–7662.

Huse, M., Klein, L. O., Girvin, A. T., Faraj, J. M., Li, Q.-J., Kuhns, M. S., and Davis, M. M. (2007). Spatial and temporal dynamics of t cell receptor signaling with a photoactivatable agonist. *Immunity*, 27(1) :76–88.

Kalergis, A. M., Boucheron, N., Doucey, M. A., Palmieri, E., Goyarts, E. C., Vegh, Z., Luescher, I. F., and Nathenson, S. G. (2001). Efficient t cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the tcr and the pmhc complex. *Nat Immunol*, 2(3) :229–234.

Karatekin, E., Sandre, O., Guitouni, H., Borghi, N., Puech, P.-H., and Brochard-Wyart, F. (2003). Cascades of transient pores in giant vesicles : line tension and transport. *Biophys J*, 84(3) :1734–1749.

Kersh, E. N., Shaw, A. S., and Allen, P. M. (1998a). Fidelity of t cell activation through multistep t cell receptor zeta phosphorylation. *Science*, 281(5376) :572–575.

Kersh, E. N., Shaw, A. S., and Allen, P. M. (1998b). Fidelity of t cell activation through multistep t cell receptor zeta phosphorylation. *Science*, 281(5376) :572–575.

Krieg, M., Arboleda-Estudillo, Y., Puech, P.-H., Käfer, J., Graner, F., Müller, D. J., and Heisenberg, C.-P. (2008). Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish. *Nat Cell Biol*, 10(4) :429–436.

Laporte, C., Kosta, A., Klein, G., Aubry, L., Lam, D., Tresse, E., Luciani, M. F., and Golstein, P. (2007). A necrotic cell death model in a protist. *Cell Death Differ*, 14(2) :266–274.

Leckband, D. (2000). Measuring the forces that control protein interactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29 :1–26.

Levraud, J. P., Adam, M., Cornillon, S., and Golstein, P. (2001). Methods to study cell death in dictyostelium discoideum. *Methods Cell Biol*, 66 :469–497.

Levraud, J.-P., Adam, M., Luciani, M.-F., de Chastellier, C., Blanton, R. L., and Golstein, P. (2003). Dictyostelium cell death : early emergence and demise of highly polarized paddle cells. *J Cell Biol*, 160(7) :1105–1114.

Marshall, B. T., Long, M., Piper, J. W., Yago, T., McEver, R. P., and Zhu, C. (2003). Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature*, 423(6936) :190–193.

Marshall, B. T., Sarangapani, K. K., Lou, J., McEver, R. P., and Zhu, C. (2005). Force history dependence of receptor-ligand dissociation. *Biophys J*, 88(2) :1458–1466.

Mazza, C., Auphan-Anezin, N., Gregoire, C., Guimezanes, A., Kellenberger, C., Roussel, A., Kearney, A., van der Merwe, P. A., Schmitt-Verhulst, A.-M., and Malissen, B. (2007). How much can a t-cell antigen receptor adapt to structurally distinct antigenic peptides ? *EMBO J*, 26(7) :1972–1983.

Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K., and Evans, E. (1999). Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397(6714) :50–53.

Murphy, K., Travers, P., and Walport, M. (2008). *Janeway's Immunobiology 7th Edition*.

Nguyen-Duong, M., 2, K. W. K., and 3, R. M. (2003a). Surface anchoring reduces the lifetime of single speci[U+FB01]c bonds. *Europhysics Letters*, 61 :845–851.

Nguyen-Duong, M., Koch, K., and Merkel, R. (2003b). Surface anchoring reduces the lifetime of single specific bonds. *Europhysics Letters*, 61(6) :845–851.

Perret, E., Benoliel, A.-M., Nassoy, P., Pierres, A., Delmas, V., Thiery, J.-P., Bongrand, P., and Feracci, H. (2002). Fast dissociation kinetics between individual e-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *EMBO J*, 21(11) :2537–2546.

Pincet, F. and Husson, J. (2005). The solution to the streptavidin-biotin paradox : the influence of history on the strength of single molecular bonds. *Biophys J*, 89(6) :4374–4381.

Pircher, H., Bürki, K., Lang, R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1989). Tolerance induction in double specific t-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature*, 342(6249) :559–561.

Puech, P.-H., Askovic, V., Gennes, P. G. D., and Brochard-Wyart, F. (2006a). Dynamics of vesicle adhesion : spreading vs. dewetting coupled to binder diffusion. *BIOPHYSICAL REVIEWS AND LETTERS*, 1 :85–95.

Puech, P.-H., Borghi, N., Karatekin, E., and Brochard-Wyart, F. (2003). Line thermodynamics : adsorption at a membrane edge. *Phys Rev Lett*, 90(12) :128304.

Puech, P.-H. and Brochard-Wyart, F. (2004). Membrane tensiometer for heavy giant vesicles. *Eur Phys J E Soft Matter*, 15(2) :127–132.

Puech, P.-H., Feracci, H., and Brochard-Wyart, F. (2004). Adhesion between giant vesicles and supported bilayers decorated with chelated e-cadherin fragments. *Langmuir*, 20(22) :9763–9768.

Puech, P.-H., Poole, K., Knebel, D., and Muller, D. J. (2006b). A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by afm. *Ultramicroscopy*, 106(8-9) :637–644.

Puech, P.-H., Taubenberger, A., Ulrich, F., Krieg, M., Muller, D. J., and Heisenberg, C.-P. (2005). Measuring cell adhesion forces of primary gastrulating cells from zebrafish using atomic force microscopy. *J Cell Sci*, 118(Pt 18) :4199–4206.

Randriamampita, C., Mouchacca, P., Malissen, B., Marguet, D., Trautmann, A., and Lellouch, A. C. (2008). A novel zap-70 dependent fret based biosensor reveals kinase activity at both the immunological synapse and the antisynapse. *PLoS ONE*, 3(1) :e1521.

Robert, P. (2009). *Etude dynamique de l'adhésion leucocytaire avec une chambre à flux lanminaire : de la physique à la médecine*. PhD thesis, université Aix Marseille II.

Robert, P., Benoliel, A.-M., Pierres, A., and Bongrand, P. (2007). What is the biological relevance of the specific bond properties revealed by single-molecule studies ? *J Mol Recognit*, 20(6) :432–447.

Robert, P., Limozin, L., Pierres, A., and Bongrand, P. (2009). Biomolecule association rates do not provide a complete description of bond formation. *Biophysical Journal*, accepté.

Robert, P., Sengupta, K., Puech, P.-H., Bongrand, P., and Limozin, L. (2008). Tuning the formation and rupture of single ligand-receptor bonds by hyaluronan-induced repulsion. *Biophys J*, 95(8) :3999–4012.

Rossier, O., Cuvelier, D., Borghi, N., Puech, P., Derenyi, I., Buguin, A., Nassoy, P., and Brochard-Wyart, F. (2003). Giant vesicles under flows : Extrusion and retraction of tubes. *LANGMUIR*, 19 :575–584.

Rudolph, M. G., Stanfield, R. L., and Wilson, I. A. (2006). How tcrs bind mhcs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol*, 24 :419–466.

Sato, M., Ozawa, T., Inukai, K., Asano, T., and Umezawa, Y. (2002). Fluorescent indicators for imaging protein phosphorylation in single living cells. *Nat Biotechnol*, 20(3) :287–294.

Schütz, C., Fleck, M., Mackensen, A., Zoso, A., Halbritter, D., Schneck, J. P., and Oelke, M. (2008). Killer artificial antigen-presenting cells : a novel strategy to delete specific t cells. *Blood*, 111(7) :3546–3552.

Taubenberger, A., Cisneros, D. A., Friedrichs, J., Puech, P.-H., Muller, D. J., and Franz, C. M. (2007). Revealing early steps of alpha2beta1 integrin-mediated adhesion to collagen type i by using single-cell force spectroscopy. *Mol Biol Cell*, 18(5) :1634–1644.

Tees, D. F., Waugh, R. E., and Hammer, D. A. (2001). A microcantilever device to assess the effect of force on the lifetime of selectin-carbohydrate bonds. *Biophys J*, 80(2) :668–682.

Tian, S., Maile, R., Collins, E. J., and Frelinger, J. A. (2007). Cd8+ t cell activation is governed by tcr-peptide/mhc affinity, not dissociation rate. *J Immunol*, 179(5) :2952–2960.

Ting, A. Y., Kain, K. H., Klemke, R. L., and Tsien, R. Y. (2001). Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(26) :15003–15008.

Ulrich, F., Krieg, M., Schötz, E.-M., Link, V., Castanon, I., Schnabel, V., Taubenberger, A., Mueller, D., Puech, P.-H., and Heisenberg, C.-P. (2005). Wnt11 functions in gastrulation by controlling cell cohesion through rab5c and e-cadherin. *Dev Cell*, 9(4) :555–564.

van der Merwe, P. A. (2001). The tcr triggering puzzle. *Immunity*, 14(6) :665–668.

van der Merwe, P. A. (2002). Do t cell receptors do it alone ? *Nat Immunol*, 3(12) :1122–1123.

van der Merwe, P. A. and Davis, S. J. (2003). Molecular interactions mediating t cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol*, 21 :659–684.

Wojcikiewicz, E. P., Zhang, X., and Moy, V. T. (2004). Force and compliance measurements on living cells using atomic force microscopy (afm). *Biol Proced Online*, 6 :1–9.

Annexe A

Articles AFM

1. Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish Krieg M, Arboleda-Estudillo Y, **Puech PH**, et al. NATURE CELL BIOLOGY Volume : 10 Issue : 4 Pages : 429-U122 Published : APR 2008
2. Revealing early steps of alpha(2)beta(1) integrin-mediated adhesion to collagen type I by using single-cell force spectroscopy Taubenberger A, Cisneros DA, Friedrichs J, et al. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL Volume : 18 Issue : 5 Pages : 1634-1644 Published : MAY 2007
3. A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM **Puech PH**, Poole K, Knebel D, et al. ULTRAMICROSCOPY Volume : 106 Issue : 8-9 Pages : 637-644 Published : JUN-JUL 2006
4. Measuring cell adhesion forces of primary gastrulating cells from zebrafish using atomic force microscopy **Puech PH**, Taubenberger A, Ulrich F, et al. JOURNAL OF CELL SCIENCE Volume : 118 Issue : 18 Pages : 4199-4206 Published : SEP 15 2005
5. Wnt11 functions in gastrulation by controlling cell cohesion through Rab5c and E-cadherin Ulrich F, Krieg M, Schotz EM, et al. DEVELOPMENTAL CELL Volume : 9 Issue : 4 Pages : 555-564 Published : OCT 2005