

Université PARIS 7 – DENIS DIDEROT

THESE DE DOCTORAT

UFR de Physique

Ecole doctorale : Constituants élémentaires – systèmes complexes
Spécialité : Interfaces Physique-Biologie

présentée par :

Manuel THERY

sujet de la thèse :

**CONTROLE DE LA POLARITE DES
CELLULES ADHERENTES**

Utilisation de micro-patrons adhésifs pour la manipulation de l'architecture cellulaire
et l'analyse quantitative de l'organisation des cellules en interphase et en mitose

Thèse dirigée par Michel BORNENS

Soutenue le 24 Janvier 2006 devant un jury composé de :

M. François GALLET	Président
M. Bertrand FOURCADE	Rapporteur
M. Pierre GONCZY	Rapporteur
M. Alexander BERSHADSKY	Examineur
M. Dennis BRAY	Examineur
M. Michel BORNENS	Directeur de thèse

Remerciements

Ces travaux ont été réalisés en association avec de nombreux chercheurs, physiciens, chimistes, informaticiens ou biologistes, qui ont participé aux développements des techniques expérimentales et à la réflexion générale sur les mécanismes cellulaires impliqués dans les comportements observés. Ces échanges chaleureux entre des communautés scientifiques différentes furent très enrichissants. Les questions soulevées sur la forme des cellules et l'architecture du vivant ont également intrigué quelques personnes en dehors de ces communautés scientifiques et je tiens à remercier celles et ceux qui ont participé et soutenu tous ces projets.

Peu après mon arrivée au laboratoire, Michel Bornens m'a donné carte blanche et un important budget à gérer comme si j'étais un vrai chercheur alors que j'avais encore les marques des bancs de l'école. J'ai été très touché par une telle confiance et cette responsabilisation fut un encouragement tout aussi important que l'enthousiasme dont il a toujours fait preuve en regardant mes résultats. Au-delà de ses qualités scientifiques reconnues, j'ai beaucoup apprécié la retenue dont Michel a su faire preuve pour me laisser une grande liberté de fonctionnement et la capacité de m'exprimer de façon personnelle dans mon travail.

Je suis également très redevable à Matthieu Piel pour les heures qu'il a passé à me décrire ses observations et sa compréhension des propriétés physiques et biochimiques du centrosome. Sur son nuage, Matthieu partage toutes ses idées pour le plaisir de la discussion et de la science. Son goût pour l'exhaustivité et la rigueur dans l'argumentation m'ont permis de me familiariser avec les questions qui l'intéressaient à la fin de sa thèse.

Pierre Nassoy et Damien Cuvelier furent les expérimentateurs fous à l'origine des techniques employées. Ce fut un grand plaisir de pouvoir à la fois déjancer avec eux et discuter sérieusement des finesses expérimentales et théoriques de nos expériences. Patricia Bassereau accepta généreusement que j'emploie leurs techniques barbares à l'acide sulfurique et l'eau oxygénée dans son laboratoire.

Ce fut un spectacle assez original de voir Matthieu présenter le centrosome selon Théodore Boveri (1885) au goût de la microfluidique à Anne Pépin et Yong Chen du laboratoire de photonique. Ils ont tout de même accepté de faire des microstructures pour les cellules, c'est alors que j'ai réalisé que le chercheur était vraiment quelqu'un de libre.

Jean-Baptiste Sibarita a fait preuve d'une patience remarquable lorsqu'il m'a appris à manier tous ses microscopes, à saturer tous ses calendriers de réservations et tous ses disques durs. J'ai alors pu avoir le plaisir de travailler avec Victor Racine. Son efficacité, pour venir à bout de toutes les automatisations nécessaires à l'analyse des milliers de cellule filmées ou photographiées sur les microscopes de Jean-Baptiste, a donné une autre dimension à ces travaux. Grâce au temps gagné, nous avons pu discuter longuement, de cellules rondes ou carrées, en buvant du café et fumant des cigares.

Je me réjouis qu'Andrea Jimenez-Dalmaroni et Franck Julicher aient accepté d'entreprendre les calculs nécessaires pour valider les hypothèses auxquelles nous avons abouti en observant les divisions. Il semble qu'ils soient déjà en train dépasser largement notre modèle initial et je suis convaincu qu'avec leurs calculs, ils finiront par nous faire découvrir de nouvelles propriétés des cellules.

Les nombreux conseils de Pascal Martin nous ont permis de commencer à mettre en place une expérience de micromanipulation de cellules en cours de cytotinèse avec une fibre de verre sur laquelle nous avons passé quelques très bons moments avec Jean-Yves Tinevez. J'espère que nous aurons l'occasion de poursuivre cette étude car les premières observations étaient tout simplement fascinantes.

Je tiens à saluer les contributions expérimentales d'Ariane Dimitrov et d'Emilie Dressaire à l'ensemble de ces travaux. Elles ont évidemment souffert, au cours de leur stage, d'un encadrement assez peu professionnel de ma part mais j'espère qu'elles y ont tout de même appris des choses intéressantes. Jenny Fink s'est laissée convaincre de s'engager en thèse pour prendre la suite de ces travaux. Après avoir rétabli l'ordre dans ce laboratoire je suis persuadée qu'elle fera une très bonne directrice de cellule.

J'ai beaucoup apprécié de travailler avec Claude Celati, Annie Rousselet, Annie Delouée, Guy Keryer, Anne-Marie Tassin et Nicole Bordes qui ont passé du temps à m'enseigner les techniques de biologie cellulaire et à discuter les résultats obtenus. Je tiens à remercier sincèrement Josette Gigon-Désormerie qui s'assure quotidiennement que le matériel est disponible et Sylvie Milley qui pris en charge toutes nos démarches administratives. Elles nous rendent le travail tellement plus agréable. Merci aussi à Pascal Silberzan et Axel Buguin qui consacrent beaucoup de temps à mettre leur salle blanche à la disposition de tout le monde.

Les discussions avec Emmanuelle Rivals, Anne Paoletti, Valerie Doye, Armand Ajdari, Franck Perez, Yohanns Bellaiche, Philippe Chavrier et Matthew Morgan ont largement contribué à la compréhension que nous avons aujourd'hui des observations faites au cours de ces travaux. Monique Arpin et Marina Glukhova m'offrirent leurs précieux anticorps et nous firent ainsi découvrir comment les cellules sentaient le patron adhésif.

Les déjeuners avec Christophe et Damien, comme les apéros avec Juliette et Bobo, étaient l'occasion de râler sur le dos de nos chefs, de discuter de science et de se motiver pour la suite. Des étapes essentielles pour le bon équilibre du thésard. Je tiens d'ailleurs à saluer les actions menées au sein de l'ADIC par Nathalie Delgehyr, Aurélie Lebel, Séverine Morizur et Marc Dugast pour le soutien des thésards ainsi que la reconnaissance de leur travail de chercheur. Cette association fut également l'occasion d'organiser quelques rassemblements plus ou moins scientifiques dont je garde quelques souvenirs impérissables. Il faut dire qu'avec James, Bruno, Ewa, et les cochons atomiques, Siau, Anabelle, Isabelle, Benoit, Michela, Stephanie et Katerina, l'ambiance au quatrième étage était déjà très chaleureuse et il suffisait de peu pour que les manips du jour finissent en soirées endiablées.

Mon frère Mathias m'a fait le grand plaisir de regarder de près les cellules et la vie du labo. Son regard d'artiste m'a fait prendre conscience que le travail du chercheur était à la frontière entre le réel et l'imaginaire. Une frontière qui nous a beaucoup intéressés et a guidé plusieurs de ses grandes réalisations.

La vie des cellules est si fascinante qu'il est facile de s'y engouffrer et de perdre tout contact avec la vraie vie. Marianne m'a souvent sorti la tête de l'eau pour me ramener sur terre. Je n'aurais certainement pas fait long feu si elle n'avait été à mes côtés. Sa patience, sa compréhension et ses attentions me donnaient sans relâche toute la force nécessaire.

TABLE DES MATIERES

PREAMBULE	6
INTRODUCTION GENERALE	8
CHAPITRE 1 - FABRICATION ET UTILISATION DES MICRO-PATRONS ADHESIFS	13
I- Procédé de micro-fabrication du tampon.	14
I-1 Fabrication du masque de chrome	15
I-2 Lithographie UV	16
I-3 Fabrication du tampon	17
II- Utilisation du tampon	19
II-1 La technique classique de traitement du substrat	19
II-2 La technique Nassoy	21
II-3 Impression de la fibronectine et dépôt des cellules	23
II-4 Alternatives : le substrat en PDMS, l'Agar, le substrat en polystyrène.	24
III- Les connaissances actuelles de l'effet des micro-patrons sur les cellules adhérentes	25
III-1 Surface d'étalement, surface d'adhérence	25
III-2 Nature du substrat	27
III-3 Géométrie, angles	28
III-4 Différenciation	32
IV- Conclusion sur les micro-systèmes	34
CHAPITRE 2 - ORGANISATION INTERNE DES CELLULES ET POLARITE EN INTERPHASE	37
I- Polarité cellulaire	38
I-1 Adhésion focales.....	42
I-2 Actine.....	49
I-3 Cortex et Membrane plasmique.....	54
I-4 Microtubules.....	57
I-5 Interaction actine-microtubules	66
I-6 Mécano-sensibilité.....	72
II- L'organisation du cytosquelette d'actine et de la membrane plasmique dépend du patron adhésif	77
II-1 Etalement des cellules sur les micro-patrons	77
II-2 Distribution spatiale des fibres de stress et des adhésions- ARTICLE	78
II-3 Critiques et discussion sur l'étude des fibres de stress.....	81
III- La position du noyau, du centrosome, de l'appareil de Golgi et l'organisation du réseau de microtubules en réponse au patron adhésif	89
III-1 contrôle de la polarité cellulaire par la géométrie du patron adhésif – ARTICLE	89
III-2 Discussion sur la polarité des cellules	93

CHAPITRE 3 - BIPOLARISATION DES CELLULES AU COURS DE LA DIVISION	103
I- Introduction à l'étude de la division.	105
I-1 L'effet du confinement sur la géométrie des cellules et les contacts inter-cellulaires au cours de l'embryogenèse	105
I-2 Divisions asymétriques et rôle des marques corticales	110
I-3 Définition du plan de division	117
II- Une mère, deux filles, un patron.	120
II-1 De la cellule étalée en interphase à la cellule ronde en mitose	123
II-2 Orientation du fuseau face aux fibres de rétraction.	127
III- Contrôle de l'axe de division des cellules avec les micro-patrons.	129
III-1 contrôle de l'orientation du fuseau - ARTICLE	129
III-2 Discussion sur l'orientation des divisions.	133
III-3 Effet de la taille et de la surface du patron adhésif	139
III-4 Effet de l'inhibition de la polymérisation de l'actine, de l'activité des myosines II, des tyrosines kinases et celles de type Src.	140
III-5 Un mouvement asymétrique du fuseau avant l'anaphase	144
IV- Modèle physique pour l'orientation du fuseau	148
IV-1 Les modèles actuels	148
IV-2 Modèle théorique d'orientation du fuseau - ARTICLE.	150
IV-3 Effet de la densité corticale des fibres de rétraction et divisions asymétriques.	159
V- Conclusion sur les divisions.	170
CONCLUSION GENERALE.	171
ANNEXE 1 – ARTICLE MICROTAS 2005	175
ANNEXE 2 – BREVET WO2005/26313 A1	179
ANNEXE 3 - MOVIES LEGENDS	183
REFERENCES	195

Préambule

Il est probable que les jeunes chercheurs qui auront ce manuscrit en main n'en liront pas la moitié. S'il est une seule chose qui puisse leur être utile ce serait éventuellement l'état d'esprit dans lequel ont été réalisés ces travaux plus que les résultats en eux même qui je l'espère seront périmés rapidement, signe que les voies ouvertes auront été empruntées.

Luc Valentin a eu cette phrase pour accueillir les étudiants du DEA : « *Ceux qui mettent au point de nouveaux systèmes expérimentaux sont ceux qui verront les choses sous un angle original. Les systèmes classiques conforteront la vision classique. Soyez fous et vous ferez des découvertes.* » Après trois ans de thèse, ces propos qui n'étaient au départ qu'un encouragement pour nous donner confiance face à la dure tâche qui nous attendait, me semblent aujourd'hui empreints d'une profonde vérité.

On ne sait pas toujours exactement la question que l'on souhaite poser et il est souvent difficile de s'approprier la question précise que votre directeur ou votre directrice vous a proposé. Cela peut sembler évident mais il faut commencer par prendre le temps de regarder les cellules. Jamais un chercheur ne retrouvera son premier regard sur les cellules et c'est pourtant celui qui lui ouvre le plus de portes. Plus tard il est difficile de conserver un regard clair, exempt d'idées préconçues. Pourtant Claude Bernard explique très justement dans *l'Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* que c'est la seule façon de faire de la science expérimentale. Il s'interroge : « *Où donc se trouve [...] la différence entre l'observateur et l'expérimentateur ? La voici : on donne le nom d'observateur à celui qui applique les procédés d'investigation simples ou complexes à l'étude des phénomènes qu'il ne fait pas varier et qu'il recueille, par conséquent, tels que la nature les lui offre. On donne le nom d'expérimentateur à celui qui emploie les procédés d'investigation simples ou complexes pour faire varier ou modifier, dans un but quelconque, les phénomènes naturels et les faire apparaître dans des circonstances ou dans des conditions dans lesquelles la nature ne les lui présentait pas. Dans ce sens, l'observation est l'investigation d'un phénomène naturel, et l'expérience est l'investigation d'un phénomène modifié par l'investigateur.* »

L'expérience est effectuée dans un certain but. Mais finalement peu importe le but car celui-ci devra être mis de côté au moment où il faut observer le résultat. En effet « *dès le moment où le résultat de l'expérience se manifeste [...] l'expérimentateur doit [...] disparaître ou plutôt se transformer instantanément en observateur. [...] L'expérimentateur doit forcer la nature à se dévoiler [...] mais il ne doit jamais répondre pour elle ni écouter incomplètement ses réponses en ne prenant dans l'expérience que la partie des résultats qui favorisent ou confirment l'hypothèse.* » Il faut donc nécessairement expérimenter avec une idée préconçue mais ensuite observer sans idée préconçue. L'expérience ne cherche pas à confirmer une idée mais à en faire naître une autre.

Ce qui était très original dans cette conception du schéma déjà bien connu expérience-conclusion-hypothèse-expérience, c'est le détachement dont Claude Bernard fait preuve par rapport à son idée originale. Loin du plaisir qu'on peut éprouver en validant une intuition originale, il valorise l'apparition d'une nouvelle idée. Toutes les idées sont envisageables, dans la mesure où elles naissent à partir d'une observation juste du résultat expérimental. Cela ouvre un champ immense à l'imagination du chercheur.

Il ajoute, « *nous pouvons suivre notre sentiment et notre idée, donner carrière à notre imagination, pourvu que toutes nos idées ne soient que des prétextes à instituer des expériences nouvelles qui puissent nous fournir des faits probants ou inattendus et féconds.* » Il propose là une vision moderne de la science qui utilise le sentiment et

l'imaginaire. Ainsi, pour construire une expérience, il faut « *avoir une foi robuste et ne pas croire* ».

Mais dans quelle direction chercher ? L'imagination nous emmène parfois sur de multiples chemins que nous voudrions tous emprunter. Nicolas Borghi m'expliquait que c'était cet éventail des possibles qui, pour l'écrivain Milan Kundera, teintait notre démarche expérimentale de son insoutenable légèreté. Nous cherchons pourtant tous dans une même direction et c'est encore Claude Bernard qui l'énonce clairement : « *L'expérimentateur veut arriver au déterminisme, c'est à dire qu'il cherche à rattacher à l'aide du raisonnement et de l'expérience, les phénomènes naturels à leurs conditions d'existence, ou autrement dit, à leurs causes prochaines. Il arrive par ce moyen à la loi qui lui permet de se rendre maître du phénomène. Toute la philosophie naturelle se résume en cela : Connaître la loi des phénomènes. Tout le problème expérimental se réduit à ceci : Prévoir et diriger les phénomènes.* » Un chercheur devrait donc être philosophe et expérimentateur. Nous avons pu commencer à diriger et à prévoir le plan d'organisation des cellules. Espérons que, plus tard, nous pourrons en connaître les lois.

Introduction générale

Ce manuscrit présente une étude expérimentale des mécanismes d'organisation des compartiments intracellulaires au sein des cellules adhérentes de mammifères.

La cellule est un système complexe. En effet, les constituants sont très nombreux. Ils s'associent pour former des assemblages multi-protéiques. Ces assemblages ont plusieurs partenaires dans la cellule de telle sorte que la cartographie de l'ensemble des interactions ne saurait être représentée en série mais nécessite l'utilisation d'un plan en réseau. De plus, les différentes dynamiques qui régissent la formation des assemblages multi-protéiques sont parfois non-linéaires. Et enfin, les conditions dans lesquelles ces interactions ont lieu sont extrêmement variables.

Les physiciens s'intéressent de près à la complexité des lois d'organisation des architectures du vivant. Cependant, dans les cellules, l'expression de cette complexité est masquée par la multiplicité des interactions et à la variabilité des conditions expérimentales. Une approche consiste donc à tenter de réduire cette variabilité. Deux stratégies sont possibles et complémentaires. La première consiste à étudier séparément les constituants élémentaires de la cellule puis à les assembler en des structures de plus en plus compliquées jusqu'à refaire une cellule. C'est la biomimétique car on mime artificiellement des réactions qui ont lieu dans la cellule. On l'appelle aussi "*bottom-up*" puisqu'elle propose de partir du simple pour aller vers le compliqué. La seconde, la stratégie "*top-down*", relève d'une démarche inverse. Elle part du système dans son intégralité et tente de le simplifier. Pour cela, il est possible de réduire le nombre de constituants, de supprimer des mailles du réseau d'interactions ou de réduire la variabilité des conditions limites. Le jour où ces deux approches se rencontreront, nous serons à même de pouvoir décrire les lois physiques régissant l'organisation interne des cellules.

Nous avons choisi de garder la cellule dans son intégralité et de réduire la variabilité des conditions externes. En effet, les cellules en culture dans une boîte de Pétri sont dans un environnement qui, à leur échelle, semble homogène et sans limite. La dynamique d'assemblage et de désassemblage de leur cytosquelette est telle que les cellules sont en permanence en train de modifier leur forme et le plan d'organisation de leurs compartiments intracellulaires. A l'inverse, dans un tissu, non seulement elles sont limitées spatialement et ne peuvent pas migrer mais en plus elles ne peuvent établir de contacts qu'à des endroits bien précis. Dans de telles conditions, leur forme et la disposition spatiale de leurs compartiments deviennent très reproductibles d'une cellule à l'autre. Cette comparaison illustre bien le fait que l'organisation interne des cellules est régie par des lois qui ne sont manifestes et donc analysables que lorsque les conditions limites de leur expression sont strictes et stationnaires.

Les techniques actuelles de traitement de surface et de micro-fabrication permettent d'imposer à la cellule un patron adhésif. Les expériences présentées dans ce manuscrit montrent que l'organisation interne des cellules répond à la géométrie des adhésions que les cellules peuvent établir avec leur environnement.

Le grand nombre de mesures et la reproductibilité des conditions expérimentales permettent de faire des tests statistiques afin de comparer avec précision les réponses cellulaires dans les conditions imposées. Cette analyse quantitative de la réponse cellulaire permet de mesurer le comportement moyen d'une cellule et la variabilité de ce comportement.

Dans un premier temps, cela permet de corrélérer finement une réponse cellulaire à une géométrie adhésive donnée et donc de rendre le système prévisible. Puis cette prévisibilité devient un outil pour l'analyse et la dissection des mécanismes impliqués à l'échelle sub-cellulaire. C'est alors que des modélisations des lois physiques responsables des comportements observés peuvent être formulées mathématiquement et qu'il devient possible de confronter les mesures expérimentales aux simulations numériques. Ces approches n'étaient possibles que dans les systèmes vivants qui offrent une grande reproductibilité comme les levures ou les embryons. Les techniques de micro-fabrication permettent non seulement de créer les conditions de cette reproductibilité mais aussi de manipuler ces conditions, ce qui procure un avantage expérimental considérable.

Chapitre 1

Fabrication et utilisation des micro-patrons adhésifs

Chapitre 1 - Fabrication et utilisation des micro-patrons adhésifs

Introduction : En quoi les micro-systèmes contribuent-ils à l'étude des systèmes vivants ?

Au sein d'un organe un ensemble de cellules possède une certaine intégrité. Cette réponse collective, cette cohérence des organisations individuelles, est essentielle au bon fonctionnement de l'organe. Comment les cellules interagissent-elles pour assurer l'homéostasie du tissu ? De quelle nature sont les signaux qu'elles échangent ? Existe-t-il une hiérarchie des informations ? Comment l'ensemble de ces informations est-il intégré au sein de la cellule pour produire une réponse ? Ces questions fondamentales continuent de faire l'objet d'intenses recherches et de nouveaux outils, les micro-systèmes, de taille micrométrique, permettent aujourd'hui d'apporter des réponses expérimentales à ces questions.

On peut distinguer deux classes de signaux reçus par la cellule : les signaux qui diffusent dans le système humoral et ceux qui ne sont présents que très localement. A l'échelle de la cellule les premiers sont homogènes et proviennent parfois d'une source très éloignée, ces molécules –des hormones (facteurs de croissance, déclencheurs apoptotique,...)- vont donner une information globale. Leurs interactions avec des récepteurs spécifiques sur l'ensemble de la surface de la cellule déclenchent des voies de signalisation qui modulent l'état général de la cellule (quiescence, division, différenciation, apoptose). Les seconds proviennent d'une source très proche voir même de contacts directs que la cellule établit avec ces voisines ou avec la matrice fibrillaire qui l'entoure. Ils donnent une information locale subcellulaire. En plus de la nature de ces contacts leur localisation procure une information spatiale à la cellule. Ces informations permettent à la cellule d'organiser le positionnement de ces composants dans l'espace et de diriger certaines de ces activités (sécrétion, migration). Cette organisation spatiale qui différencie certaines zones par rapport à d'autres polarise l'activité de la cellule. La cellule est alors orientée en réponse aux inhomogénéités externes. Cette capacité à sentir les différences dans l'espace et à agir de façon dirigée est déterminante, aussi bien au cours de l'ontogenèse (de l'embryon à l'organisme) que lors du fonctionnement et du renouvellement du tissu différencié.

Les micro-systèmes sont des outils issus des technologies de la micro-électronique. La fabrication de circuits et de composants électroniques miniatures a été détournée pour produire des chambres, des canaux, des capteurs, des manipulateurs de cellules. En réalisant des outils dix à cent fois plus petits que la cellule on peut recréer l'ensemble des inhomogénéités de l'environnement que la cellule rencontre au sein d'un tissu (Li Crit Rev Biomed Eng 03 et autres papiers de Folch A). Ceci ouvre un champ d'étude immense, celui des mécanismes participant à la polarité des systèmes vivants. Les mécanismes moléculaires impliquées dans la polarité sont étudiés depuis longtemps mais à l'échelle de toute la cellule. Les micro-systèmes permettent des stimulations locales. C'est donc la façon dont la cellule sent et s'organise dans l'espace que l'on peut étudier. Ce paramètre, l'espace, manque cruellement à une grande partie des modélisations numériques utilisées pour la compréhension des interactions moléculaires à l'échelle de l'ensemble de la cellule (la « system biology »).

I- Procédé de micro-fabrication du tampon.

La méthodologie employée est très simple. A son bureau, on se saisit d'un tampon, on l'imbibe d'encre et on applique le tampon sur une feuille de papier pour transférer l'encre qui s'est déposé sur le relief du tampon. La méthode employée est la même avec un relief microscopique et des protéines d'adhésion à la place de l'encre. Le principe utilisé lors de la fabrication du tampon nécessaire à l'impression des micro-patrons tient en **trois étapes**. Tout d'abord la réalisation d'un **masque optique**, une plaque de quartz transparente sur laquelle des motifs opaques ont été dessinés avec un faisceau d'électrons. Puis l'utilisation de ce masque pour insoler une couche de résine photosensible aux ultra-violets (UV) et permettre la fabrication d'un **moule** en relief. Enfin la fabrication d'un **tampon** en coulant un gel sur le moule et en le faisant réticuler à chaud. Le tampon ainsi fabriqué est imbibé de protéines qui peuvent être alors imprimées sur une surface préalablement traitée (voir II). Ce procédé, l'impression par micro-contact ou « micro-contact printing » permet de déposer des protéines uniquement sur les zones du substrat en contact avec la partie haute du relief du tampon. Il est alors possible de laisser s'accrocher des cellules sur les zones tamponnées et ainsi de contrôler leur position (sur un réseau de micro-patrons par exemple) et leur forme (Singhvi et al., 1994). L'ensemble des procédés de micro-fabrication pour le dépôt sélectif de protéines a fait l'objet d'une récente revue très complète (Whitesides et al., 2001). Une autre se concentre tout particulièrement sur l'impression par micro-contact, ses variantes et ses applications (Quist et al., 2005). Le processus de photolithographie pour la fabrication de micro-patrons adhésifs a plus de 10 ans (Singhvi et al., 1994; Jackman et al., 1995; Xia et al., 1996).

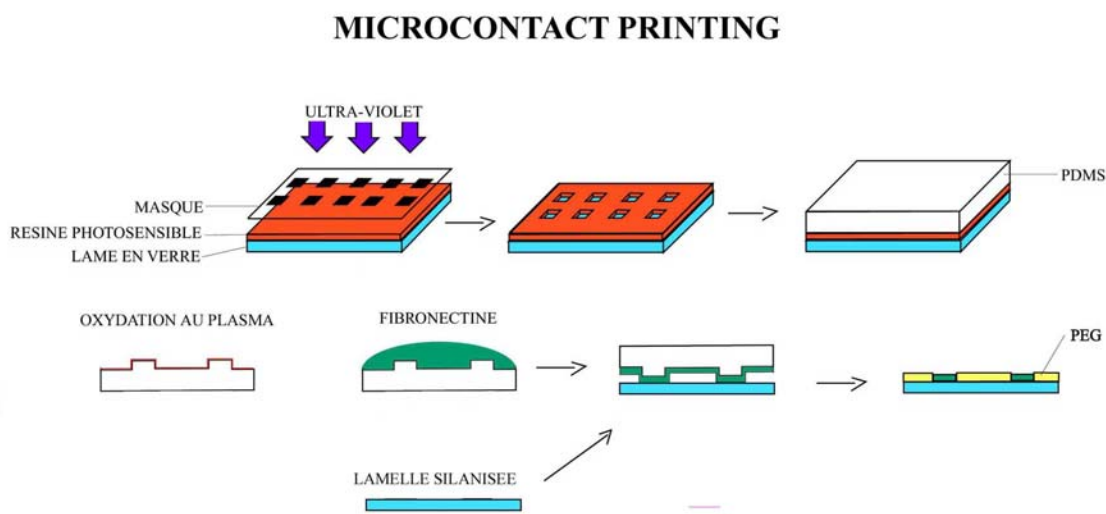


Figure 1.1, la technique d'impression par microcontact.

Sur la figure 1.1 on peut voir de haut en bas et de gauche à droite : l'insolation de la résine photosensible aux UV à travers le masque de chrome, la résine gravée après révélation, le PDMS coulé sur la résine, puis l'oxydation du tampon en PDMS, l'adsorption de la fibronectine, l'impression de la fibronectine sur la lamelle silanisée et enfin le greffage du PEG dans les zones sans fibronectine.

I-1 Fabrication du masque de chrome

Les motifs sont gravés sur une plaque de quartz transparente avec un faisceau d'électrons. La résolution des motifs dépend de la largeur du faisceau. Le dessin d'un nombre élevé (plusieurs milliers) de grands motifs (plusieurs dizaines de microns) peut nécessiter plusieurs jours. En augmentant la puissance du faisceau, et donc sa largeur, le dessin est plus rapide mais moins bien résolu. Pour les masques fabriqués au cours de ces travaux, la gravure d'un réseau de motifs de quelques dizaines de microns espacés de 100 microns sur une surface de 10cmx10cm nécessite une dizaine d'heures avec un faisceau de 2 à 3 μm de large. Cette étape a été réalisée en collaboration avec Anne Pépin et Yong Chen du laboratoire de photonique et nanostructures (LPN) de Marcoussis.

Protocole expérimental : Lithographie aux électrons d'un masque de quartz couvert de chrome.

- Les motifs ont été dessinés sous le logiciel L-Edit et transférés dans un format propre à la machine de pilotage du faisceau d'électron (Leica EBPG 5000+ nanowriter).
- Un masque optique de quartz est couvert de chrome puis d'une résine sensible aux électrons.
- Le faisceau d'électron bombarde les zones correspondantes au motifs dessinés sous L-Edit ce qui stabilise ces zones.
- Le masque est révélé 30 secondes dans du développeur pur (AZ-Developer, Clariant, Frankfurt, Allemagne) ce qui degage les zones non-bombardées et révèle le chrome sous-jacent.
- Puis les zones de chrome ainsi découvertes sont détruites (alors que les autres sont protégés par la résine) par 1 minute de traitement au 3144 Puranal (Honeywell).
- Enfin la résine restante est dissoute dans l'acétone ce qui révèle les motifs de chrome.

Cette étape doit être réalisée en salle blanche pour éviter les poussières dont la taille se rapproche de celle des motifs gravés.

Ce type de masque est également disponible commercialement (CompuGraphics Inc. www.cgi.co.uk). Il suffit de fournir le dessin désiré. La suite des opérations étant réalisable dans n'importe quelle salle blanche ou grise comportant un minimum d'équipement (hotte, spin-coater, plaque chauffante, lampe UV).

I-2 Lithographie UV

L'éclairement aux UV d'une résine photosensible à travers ce masque permet de créer des zones fragilisées ou renforcées par les UV (selon que la résine est positive ou négative). La révélation de ces différences par dissolution des zones les plus fragiles dans un révélateur fait apparaître le relief attendu.

Protocole expérimental : Gravure d'une couche de résine photosensible sur un « wafer » de silicium.

- Laver éventuellement le wafer à l'acétone.
- « Spin-coater » quelques millilitres de résine AZ100 (positive) à 6000 tour/minute pendant 30s pour obtenir une épaisseur de 10 μ m.
- Cuire la résine 2' à 95°C puis 2' à 105°C. Laisser refroidir.
- Placer, à la main, le masque en contact avec la résine. Appuyer fort. Insoler aux UV (450nm) pendant 30s.
- Révéler avec un mélange eau/AZ400 (3/1) pendant 1'30".
- Laver rapidement la résine à l'eau en agitant. Sécher à l'azote gazeux.
- Placer le wafer dans une enceinte fermée avec un récipient contenant 2mL de trichloro-méthoxysilane afin que les vapeurs se déposent sur la résine créant ainsi une couche d'anti-adhésive.

La résine SPR220-7.0, spin-coatée à 2000t/min pendant 1', cuite 3' à 115°C, insolée 45s et révélée 1'30" avec du LDD26W pur donne le même résultat.

Il faut diminuer la vitesse au cours de l'étalement de la résine, augmenter le temps d'insolation et de révélation pour faire des motifs plus hauts.

Cette insolation est l'étape limitante pour la résolution des motifs. En effet la diffraction des UV à 450nm sur les motifs élargi le dessin de plusieurs centaines de nanomètres. Et plus la couche de résine photosensible est épaisse plus la zone insolée s'élargit. Par conséquent il devient difficile de bien contrôler les motifs dont la hauteur dépasse les 50 à 100 μ m (selon les résines), à moins bien sûr de prendre en compte l'élargissement du motif au cours de l'insolation profonde dans le dessin initial sur le masque. Les motifs créés au cours de ces travaux font 10 μ m de haut.

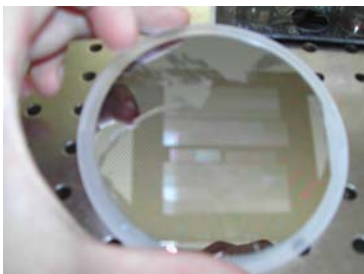


Figure 1.3
Sur cette image on voit le moule (la résine photosensible) gravée.

I-3 Fabrication du tampon

Le tampon s'obtient en coulant un gel sur le relief de la résine gravée pour en obtenir un négatif. Une fois polymérisé le gel est décollé de la résine et prêt à être utilisé. La plupart du temps le gel est en poly-diméthyle-siloxane (PDMS).

Protocole expérimental : fabrication d'un tampon en PDMS sur une résine gravée.

Les étapes suivantes nécessitent toujours une bonne propreté (idéalement en salle blanche sous une hotte stérile sinon) pour que les poussières ne se déposent ni sur le moule ni dans le PDMS.

- Mélanger le gel non réticulé avec 1/10 de réticulant (kit Sylgard184, Dow Corning, distribué par Arrow Electronics) dans un bécher.
- Retirer sous vide les bulles d'air créées au cours du mélange : placer le bécher dans une cloche à vide et aspirer. Ouvrir pour faire exploser les bulles en surface ou simplement stopper l'aspiration et attendre.
- Verser le mélange sur le moule et éventuellement, si les motifs sont très fins, aspirer sous vide pour dégager l'air emprisonné dans les motifs.
- Mettre le tout à cuire 2 à 3h à 60°C (ou 1h à 100°C). *Il paraît que 12h à l'ambiante fonctionne également.*
- Décoller la semelle de PDMS.

Il est possible d'accroître le module élastique du PDMS en augmentant la proportion de réticulant et le temps de cuisson.

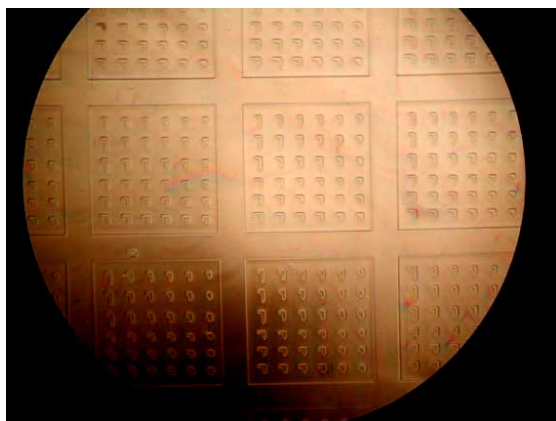


Figure 1.4
Sur cette image on peut voir le relief sur le dessus du tampon en PDMS. Les motifs, ici des [L] de tailles variées sont entourées de cadres permettant une bonne tenue mécanique de l'ensemble au cours de l'impression.
Il y a 100 μm entre chaque motif.

Il est possible de faire une copie du moule en PDMS en en faisant le négatif du négatif. En effet si le tampon en PDMS est silanisée (en le mettant 1 heure dans une cloche sous vide avec quelques gouttes de *tridécafluoro-trichlorométhyl-silane*) il est possible de lui couler du PDMS dessus et d'en faire le négatif. Grâce à la silanisation les deux morceaux de PDMS seront aisément séparables. Ces copies en PDMS du moule initial ont non seulement l'avantage de permettre de garder une version supplémentaire du moule en cas de casse mais aussi de supporter le moulage de liquide chaud comme l'agar liquide coulé à 70°C qui détériorerait la résine. En effet le tampon en agar est une alternative au tampon en PDMS, il est hydrophile car gonflé d'eau ce qui permet une impression beaucoup plus homogène

qu'avec un tampon en PDMS. Cependant l'humidité de la zone de contact limite la résolution des motifs imprimés. Les résolutions de l'ordre du micron nécessaires à l'impression des motifs utilisés au cours de ces travaux semblent à la limite des capacités de la technique telle que nous l'avons mise en oeuvre.

II- Utilisation du tampon

A partir de cette étape l'utilisation d'une salle blanche (sans poussière) n'est plus indispensable si l'on suit le procédé décrit en II-2, la propreté d'une hotte de culture est suffisante.

Au cours de cette étape il faut traiter la surface du substrat de façon à ce qu'elle puisse recevoir les molécules imprimées dans les motifs et les molécules répulsives autour des motifs. Le groupe de Georges Whitesides qui a développé l'ensemble de cette technologie utilise un traitement non trivial à mettre en oeuvre qui permet une précision supérieure à ce qu'il a semblé nécessaire pour réussir les motifs désirés. Pierre Nassoy, Institut Curie, a mis au point une silanisation du verre permettant un couplage au PEG plus simple d'utilisation.

II-1 La technique classique de traitement du substrat

Dans les règles de l'art le substrat est un wafer de silicium sur lequel on dépose une fine couche de titane puis d'or (Mrksich et al., 1996). L'or a l'avantage de créer une liaison covalente avec le soufre. Le tampon de PDMS est donc imbibé d'un alcanethiol (thiol = groupe SH), une molécule hydrophobe et linéaire fonctionnalisable aux deux extrémités, et mis en contact avec la couche d'or. Les groupes thiols réagissent avec l'or et les alcanethiols forment une monocouche auto-assemblée sur la surface d'or. Dans un deuxième temps, le substrat imprimé est immergé dans une solution contenant un deuxième alcanethiol contenant, à l'opposé du groupe thiol, un groupe répulsif à l'adsorption des protéines et des cellules comme le poly-éthylène-glycol (PEG) (Prime and Whitesides, 1991; Mrksich et al., 1997). Ces alcanethiols forment à leur tour une monocouche sur la surface d'or restante autour des motifs imprimés. Enfin de la fibronectine est déposée sur le substrat, elle se lie au premier alcanethiol et pas au second du à l'effet répulsif du PEG. La fibronectine s'accroche donc sur les motifs imprimés uniquement. Ceci permet de contrôler l'endroit et la façon dont les cellules vont pouvoir s'accrocher (Singhvi et al., 1994; Mrksich, 1998) (Ostuni ColloidsSurfacesB Biointerfaces 99)

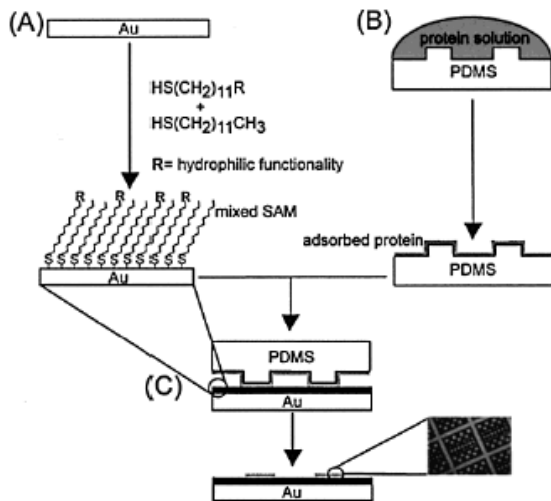


Figure 1.5
Microcontact sur couche d'or.
Tan et al., Langmuir, 2002.

Figure 1. (A) Schematic of the formation of a two-component mixed SAM, (B) adsorption of proteins onto a PDMS stamp, and (C) μ CP of protein from the stamp onto the mixed SAM with a sample micrograph of fluorescently labeled protein printed onto a 100% COOH SAM substrate.

La fabrication de monocouches auto-assemblées d'alcanethiols ou de silanes sur des films d'or ou de SiO_2 pour le dépôt de protéines par impression par μ CP est un procédé long qui nécessite l'utilisation d'une salle blanche pour chaque lame imprimée. La nature de la monocouche et le traitement du tampon de PDMS permettent de maîtriser finement la qualité de l'impression (Tan Langmuir 02). Une telle précision n'est pas toujours nécessaire et il est possible d'imprimer directement la fibronectine avec le tampon sur un film lui-même en PDMS puis d'ajouter la molécule répulsive (BSA, pluronic) autour des zones imprimées (Nelson Langmuir 02). Dans les deux cas, impression d'alcanethiols ou de fibronectine, il est nécessaire d'oxyder le tampon de PDMS au cœur d'un plasma à air ou à oxygène afin de rendre le tampon hydrophile (Xiao Nanotechnology 02, Jan Langmuir 99). Cette étape ne dénature pas les protéines imprimées (Flounders et al., 1997).

Alternativement, il est possible de déposer les cellules directement sur la surface gravée par lithographie à plasma puis greffée d'un répulsif très efficace qui dure deux semaines (tetraéthylèneglycol diméthyl ether, tetraglyme) (Goessl et al., 2001). Cependant cela demande toujours de refaire une gravure pour chaque expérience. On peut également utiliser le moule pour faire un film troué en y étalant une très fine couche de PDMS (de hauteur inférieure à celle des motifs). On dépose alors le film troué sur un substrat plan puis on y dépose soit la molécule adhésive soit directement les cellules (Wang et al., 2002a)(Ostuni Langmuir 00).

II-2 La technique Nassoy

Le protocole utilisé au cours de nos travaux est inspiré des méthodes publiées par Nishizawa et al. et par Cuvelier et al. (Nishizawa M., 2002; Cuvelier et al., 2003). Les premiers impriment de la fibronectine avec un tampon de PDMS sur du plastique silanisé sans utiliser d'or et de monocouche d'alcanethiols, les seconds utilisent une silanisation sur du verre permettant un accrochage covalent du PEG.

Protocole expérimental : la silanisation du verre ou du PDMS.

- Laver soigneusement les lamelles de verre dans un mélange méthanol/chloroforme 50/50 pendant 12h de chaque côté. Les rincer au méthanol puis les stocker dans de l'éthanol pur.
- Relaver les lamelles pendant 10' avant utilisation. Les sécher en soufflant de l'air filtré (ou de l'azote) pour éviter la formation de gouttes au milieu de la lamelle. Les cuire 15' à 60°C pour achever l'évaporation des solvants nettoyants et retirer une éventuelle couche d'eau superficielle.
- Préparer le mélange de silanisation : 10mL méthanol + 450µL eau milliQ + 86µL acide acétique glacial. Ne pas y ajouter le silane.
- Placer les lamelles dans l'enceinte à plasma et les oxyder pendant 3' avec une légère entrée d'air visible par la couleur violet-rose dans l'enceinte : Ouvrir le vide, allumer le courant au max, observer que la couleur de l'air ionisé vire au violet-rose. Si la couleur s'estompe rouvrir un peu l'arrivée d'air pour alimenter le réacteur en air à ioniser *Pour une impression sur PDMS étaler à la tournette une goutte de PDMS mélangé à son réticulant sur une lamelle de verre propre et cuire 3h à 60°C puis insérer la lamelle avec le PDMS dans l'enceinte à plasma.*
- Ajouter le silane : 250 µL de mercapto-propyltriméthoxy silane (Roth Sochiel, SIM6476.0, 96%, ou Fluorochem, S10475, 99%) au mélange de silanisation au dernier moment. Répartir le mélange dans les réacteurs (boîte de Pétri).
- Plonger les lamelles dans le mélange de silanisation. Fermer le réacteur hermétiquement (parafilm). Laisser 2 à 3 heures à l'ambiante ou la nuit à 4°C. *Pour une silanisation de PDMS 15' à l'ambiante suffisent.*
- Laver les lamelles silanisées dans deux bains successifs de méthanol. Les sécher en soufflant de l'air filtré (ou de l'azote) pour éviter la formation de gouttes au milieu de la lamelle.
- Cuire les lamelles 15' à 60°C pour retirer toute l'eau résiduelle car l'eau inhibe le silane.

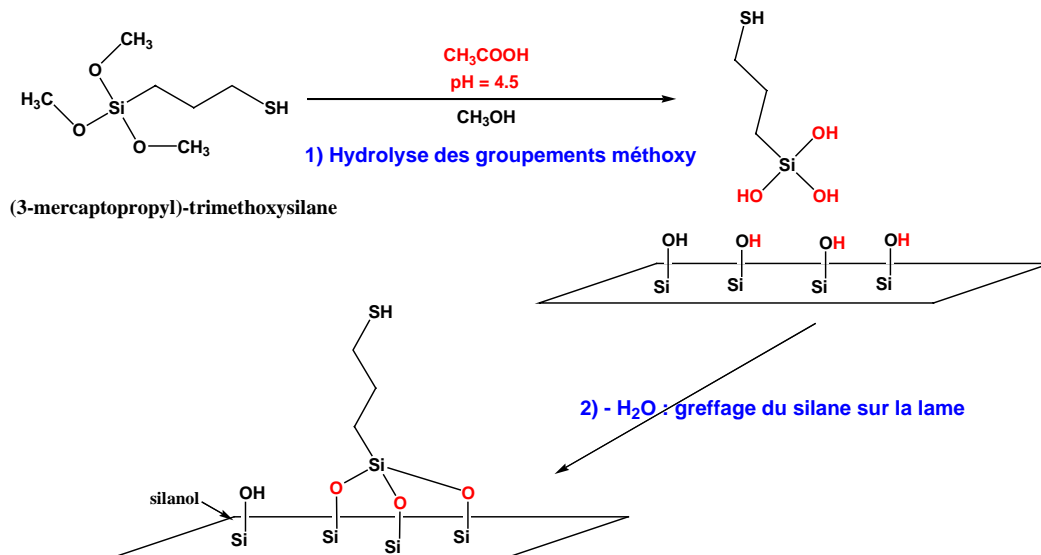


Figure 1.6 Greffage du silane sur le verre activé au plasma (Genescore)

L'eau et l'acide acétique facilitent le départ des groupes méthoxy du silane pour permettre la liaison du Si du silane avec le Si-OH du verre pour former des liaisons siloxane (Si-O-Si) très stables. Il est envisageable d'améliorer/modifier ce protocole notamment en essayant de changer le méthanol en éthanol et de réduire la quantité d'eau.

Ce protocole remplace celui qui a été utilisé pendant la première partie des travaux et cité dans l'article intitulé « *The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis* ». Celui-ci ne comportait pas une activation du verre au plasma mais au piranha. Les lamelles de verres, lavées comme précédemment sans être chauffées à 60°C (à tort), étaient immergées dans un mélange eau oxygénée/acide sulfurique (30/70), nommé piranha à cause de sa capacité à brûler et ronger tout ce qui est organique, pendant 5' puis lavées dans de l'eau milliQ puis immergées dans du méthanol avant d'être plongées dans le mélange de silanisation. Ce protocole était beaucoup plus dangereux, plus long et l'activation du verre avant la silanisation semblait moins efficace.

Une autre silanisation avec 2% de mercaptotriméthoxysilane dans du trichloréthylène pendant 12h à température ambiante et stockage sous argon à -20°C pour protéger les groupes SH (Liu Colloids and Surfaces B :Biointerfaces 96) semble aussi très efficace mais n'a pas été testée au laboratoire.

II-3 Impression de la fibronectine et dépôt des cellules

Ce protocole est également inspiré des méthodes publiées par Nishizawa et al. pour l'impression et par Cuvelier et al. pour la PEGylation (Nishizawa M., 2002; Cuvelier et al., 2003). La fibronectine est adsorbée sur le tampon de PDMS oxydé (hydrophile) puis imprimée sur la lamelle silanisée (hydrophobe). L'adsorption de la fibronectine est plus efficace sur un substrat hydrophile qu'hydrophobe mais c'est sur un substrat hydrophobe qu'elle est la plus efficace pour l'adhérence des cellules (Grinnell and Feld, 1982).

Protocole expérimental : impression de la fibronectine et PEGylation du silane.

- Utiliser un tampon propre. L'oxyder pendant 5 à 10 secondes dans une enceinte à plasma.
- Déposer la solution de fibronectine (50µg/mL dont 1/10 de fibro-Cy3 dans de l'eau) sur la surface oxydée.
- Laisser la fibronectine s'adsorber pendant au moins 10 minutes à l'ambiante.
- Aspirer le liquide. Sécher en soufflant de l'air propre ou en aspirant sous vide jusqu'à ce que les traces d'humidité disparaissent mais pas plus longtemps.
- Retourner le gel sur la lamelle silanisée (froide) en l'inclinant pour ne pas emprisonner d'air. Si un front d'adhésion laissant apparaître les cadres-soutiens du gel n'est pas visible, appuyer délicatement sur le gel d'un bord vers l'autre.
- Laisser la fibronectine se transférer pendant 10 minutes.
- Peser le PEG : pour faire une solution PEG-maléimide (Shear Water mPEG-MAL MW : 5000, ref 2D2MOH01, ce produit a disparu et est maintenant remplacé par le 2E2MOH01) à 20mg/mL dans du PBS. Compter 100µL pour une lamelle de 25mm et 50µL pour une lamelle de 18mm. Ajouter le PBS au PEG au dernier moment. Déposer les gouttes sur du parafilm.
- Retirer délicatement le tampon de la lamelle et mettre le tampon dans de l'eau. Retourner la lamelle sur la goutte de PEG. Laisser réagir 1h à l'ambiante.
- Passer les tampons aux ultrasons puissants avec une sonde. Rincer à l'eau propre. Sécher à l'éthanol absolu. Sécher à l'air. Stocké le tampon sec à l'abri de la poussière.
- Rincer délicatement la lamelle avec du PBS deux fois 10 minutes. Déposer les cellules dessus dans du milieu avec le moins de sérum possible (0,1% de sérum suffit à les garder en vie). Ou stocker à sec, si possible sous argon, et si possible à – 20°C dans un récipient hermétique.

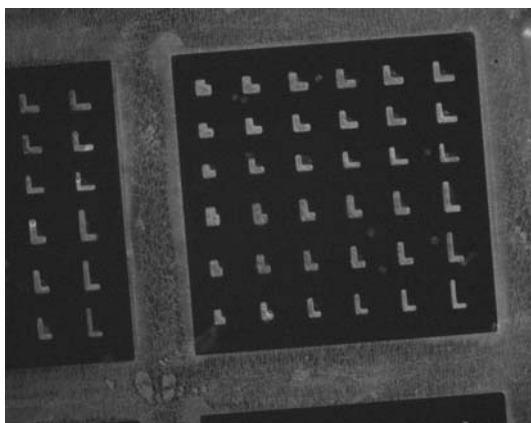


Figure 1.7

Cette image montre la fibronectine-Cy3 imprimée sur une lamelle de verre silanisée. Il y a 100 µm entre chaque patron.

II-4 Alternatives : le substrat en PDMS, l'Agar, le substrat en polystyrène.

Les tampons hydrophiles, Hydrogels, fait d'acryloyl-methylglactopyranoside (AMA) réticulés par du methylenebisacrylamide (ME) ou de l'éthylène-glycol-diméthylacrylate (EG) permettent de tamponner des produits hydrophiles (Martin Langmuir 2000). De même les tampons en agar permettent de faire des impressions répétées et plus homogènes que les tampons en PDMS. Seulement ces tampons sèchent à l'air et donc ne peuvent être conservés.

Le substrat en PDMS s'est montré très efficace pour les cellules HeLas mais aussi pour les MEFs (fibroblastes embryonnaires de souris). Il est silanisable après activation au plasma. Est-ce parce que le PDMS s'oxyde bien avant la silanisation la rendant ainsi très efficace ou parce que ce substrat est plus mou qu'une lamelle en verre ce qui n'aide pas les cellules à forcer dessus et donc à sortir des patrons (voir le chapitre mécano-transduction) ?

L'impression de fibronectine sur des boîtes de culture de bactérie (poly-styrène non traité pour l'adhésion des cellules) c'est révélée très efficace au laboratoire (citer le papier de J Neuroscience). Ce procédé a l'avantage d'être très rapide car il ne nécessite ni silanisation ni greffage de PEG. Il est également moins coûteux. Le seul inconvénient vient de la légère opacité et l'autofluorescence du plastique. L'imagerie classique en vidéomicroscopie à l'aide d'un microscope inversé n'est alors possible qu'en contraste de phase et à faible grossissement. Pour des marquages fluorescents il faut éclairer les cellules par au-dessus pour éviter que le chemin optique ne passe par le plastique.

III- Les connaissances actuelles de l'effet des micro-patrons sur les cellules adhérentes

Les micro-patrons adhésifs n'ont été que peu utilisés au regard de leur potentiel. Quelques groupes utilisent cette technique. Aucun produit fini n'est disponible commercialement et peu d'équipes en biologie ont accès à des laboratoires de micro-fabrication. Seules les collaborations entre les groupes de Georges Whitesides et Donald Ingber à Harvard ont donné lieu aux premières observations de cellules sur micro-patrons adhésifs. D'autres groupes commencent à s'y intéresser. Dans toutes ces expériences les micro-patrons ont servi de contrainte géométrique, imposant à la cellule une surface d'étalement donnée. L'intérêt de Donald Ingber pour la mécano-transduction a souvent amené ces équipes à étudier la modulation de la signalisation biochimique en réponse à une surface imposée.

III-1 Surface d'étalement, surface d'adhérence

Bien que le lien entre la forme des cellules due à leur étalement/ancrage et leur rythme de prolifération était déjà connu (Folkman and Moscona, 1978), les micro-patrons ont permis de démontrer cette corrélation de manière quantitative et de distinguer les différents signaux pouvant participer à cet effet. La surface d'étalement et donc la forme de la cellule influe sur le devenir des cellules (prolifération, quiescence ou apoptose) indépendamment de la surface d'adhérence (Chen et al., 1997). Pour cette démonstration les auteurs ont comparé ce qu'il advenait de cellules étalées sur des surfaces complètement adhésives et des cellules couvrant une aire équivalente sur un substrat fait de petits disques adhésifs séparés de zones non-adhésives.

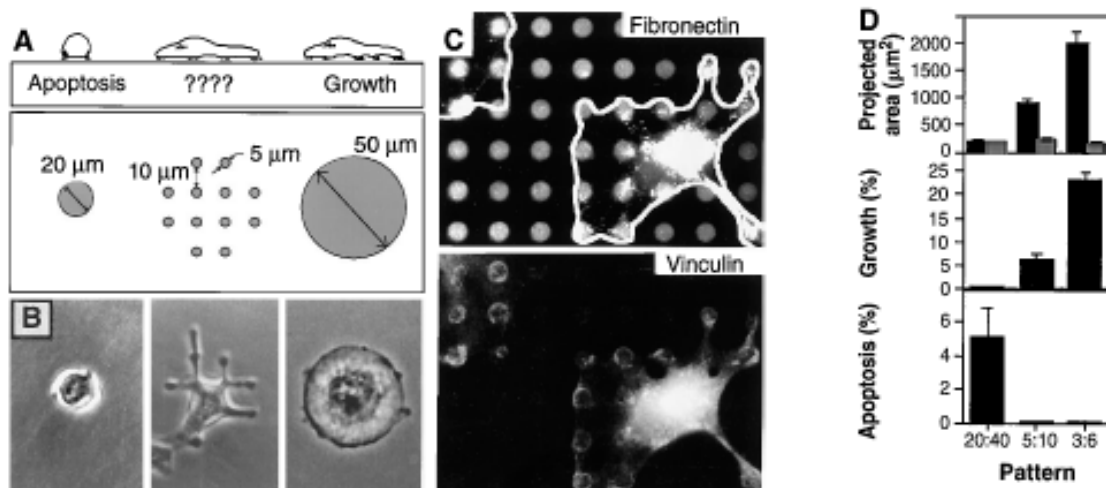


Figure 1.8 A droite on mesure le taux de croissance et de mort cellulaire des cellules ayant des surfaces projetées de plus en plus grandes mais des surfaces d'adhérence constantes. C'est la surface projetée qui est le paramètre critique influençant la mort ou la division des cellules. (Chen et al., 1997).

Cet effet de la forme de la cellule sur le cycle semble corrélé à l'absence d'augmentation du taux de cyclin D1, qui devrait normalement avoir lieu à la transition G1/S, et l'absence d'inactivation du répresseur du cycle p27^{Kip1} chez les cellules réduites à un faible

étalement. Cet effet de l'étalement sur les cyclines peut être mimé par une destruction du cytosquelette ou de sa contractilité (Huang et al., 1998). Cet effet de la forme sur la prolifération est un moyen indirect d'étude de l'inhibition de contact. Au delà d'une certaine densité, des cellules saines arrêtent de se diviser. Est-ce du à la réduction de leur étalement ou aux contacts avec leur voisines ? Les micro-patterns ont également permis de démontrer l'effet de l'aire de contact cellule-cellule sur la prolifération des cellules. L'inhibition de la voie PI3K et la séparation physique des cellules à taille égale affecte cette prolifération. Cet effet vient effectivement du contact cellule-cellule car un flux empêchant la diffusion humorale ne perturbe pas les effets observés (Nelson and Chen, 2002).

Il semble bien que ce soit la surface d'étalement et non la surface d'adhérence qui influe sur la quantité d'adhésions focales et leur contenu en vinculine et phosphotyrosine (Chen et al., 2003). La quantité de vinculine et de taline recrutée au niveau des adhésions dépend linéairement de la surface de contact pour de faibles surfaces (inférieure à $300\mu\text{m}^2$) puis atteint un plateau (Gallant et al., 2005). En parallèle, la contractilité et la phosphorylation des chaînes légères des myosines sont également dépendant de l'étalement des cellules et de l'engagement des intégrines (Polte et al., 2004). Le niveau d'activation de ROCK, révélé par la phosphorylation de MYPT1, est corrélé avec le degré d'étalement des cellules déposées sur des patrons carrés de différentes tailles (voir Figure 1.9) (McBeath et al., 2004).

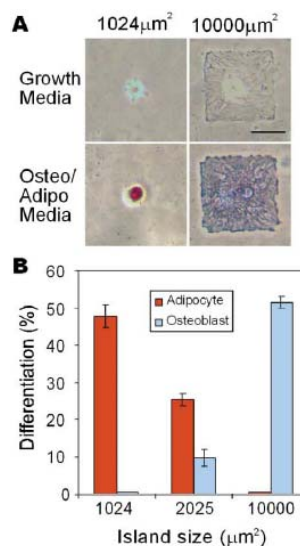
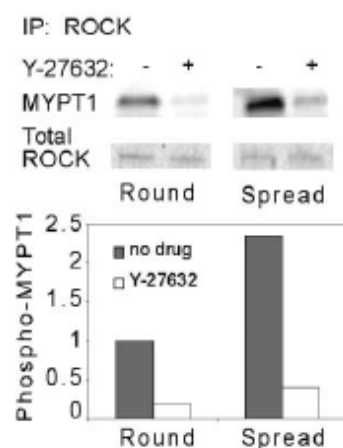


Figure 1.9

Les cellules « round » sont petites ($1024\mu\text{m}^2$), les cellules « spread » sont grandes ($10\,000\mu\text{m}^2$).

Gauche

MYPT1, qui témoigne du niveau de contractilité de la cellule, est plus exprimé chez les grandes que chez les petites cellules.

Y27632 est une drogue qui sert de contrôle car elle inhibe la contractilité : sans contractilité il n'y plus de différence entre les expressions de MYPT1 selon les étalements (McBeath et al., 2004).

Droite

Selon leur étalement les cellules vont se différencier en adipocyte ou en ostéoblastes.

Les surfaces utilisées sont toujours assez isotropes (disques et carrés) et les effets sont toujours attribués à la **surface** d'étalement. On peut toutefois supposer que le paramètre critique est la **longueur** et non la surface de la cellule. En effet, des cellules allongées sur des lignes ont la même longueur qu'étalées librement à deux dimensions (Levina et al., 2001). Ce qui suggère qu'elles possèdent un mécanisme interne de régulation de leur longueur plutôt que de leur surface. Les études précédentes suggèrent qu'il faut rester à étalement constant pour que les cellules soient dans des états identiques. Cependant il faut garder à l'esprit l'hypothèse selon laquelle ce serait plutôt certaines longueurs qu'il serait critique de conserver. Il ne serait pas surprenant de constater que la quantité d'adhésions (nombre, taille et intensité) d'une cellule filiforme est plus importante que celle d'une cellule étalée sur un disque de même surface.

III-2 Nature du substrat

La géométrie n'est pas le seul paramètre qui influence la cellule. La nature du substrat et donc le type de molécules engagées dans les adhésions modifie également le comportement de la cellule.

Des cellules étalées sur de fins rectangles de **fibronectine** développent des fibres de stress dans la direction de leur allongement. Ce champ de contrainte mono-directionnel sur le substrat modifie la distribution des contraintes corticales dans les trois dimensions et des mesures de rigidité sur l'ensemble du cortex cellulaire montre une anisotropie générale le long de la direction du rectangle. Si les cellules sont contraintes de s'étaler sur des rectangles de poly-lysine, qui ne lie pas spécifiquement les intégrines contrairement à la fibronectine, les fibres de stress sur le substrat disparaissent ainsi que l'anisotropie de la contraction tridimensionnelle du cortex cellulaire. La nature biochimique du substrat joue donc un rôle déterminant sur la réponse cellulaire aux contraintes géométriques (Hu et al., 2004).

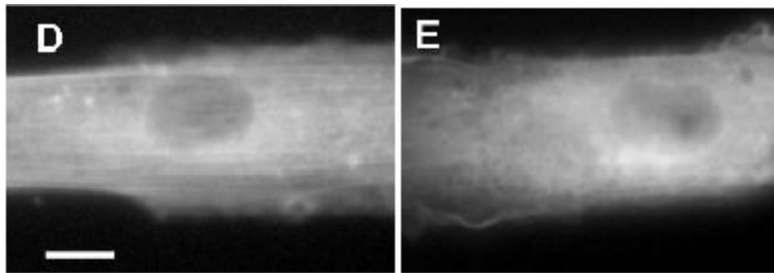


Figure 1.10

A gauche une cellule sur un rectangle de collagène faisant des fibres de stress le long du rectangle, à droite une cellule sur un rectangle de poly-lysine sans fibre de stress (Hu et al., 2004).

III-3 Géométrie, angles

Une des observations majeures est que les cellules contraintes d'organiser leur cytosquelette sur des micro-patterns développent des fibres de stress le long des bords des carrés et le long des bords les plus long des rectangles (Goessl et al., 2001).

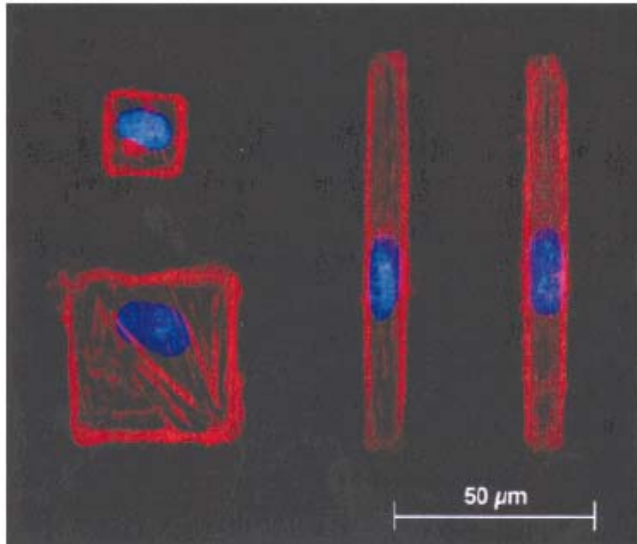


Figure 1.11
Cytosquelette d'actine (rouge) et noyau (bleu) de cellules musculaire. (Goessl et al., 2001)

Une autre observation très importante est que les cellules épithéliales confinées dans des carrés et stimulées avec des facteurs de croissance (PDGF) forment des lamellipodes préférentiellement dans les angles (Parker et al., 2002).

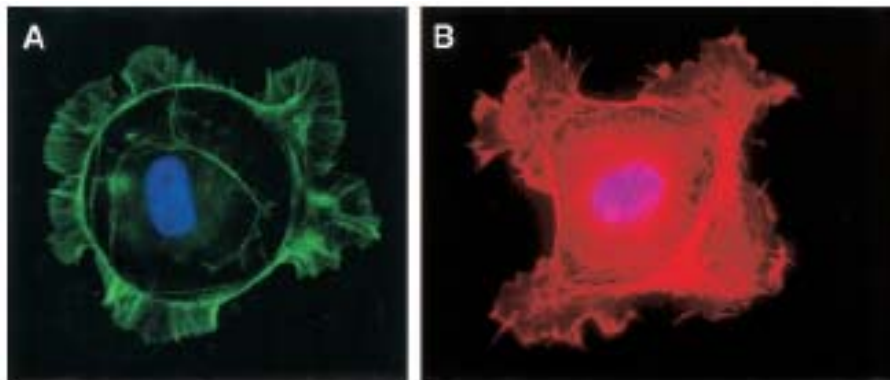


Figure 1.12
Cellules sur un rond faisant des protrusions partout et cellules sur un carré n'en faisant que dans les coins. (Parker et al., 2002)

Ces angles, où les cellules font des protrusions, sont également les zones où les cellules tirent le plus fort sur le substrat (Figure 1.13) (Wang et al., 2002a).

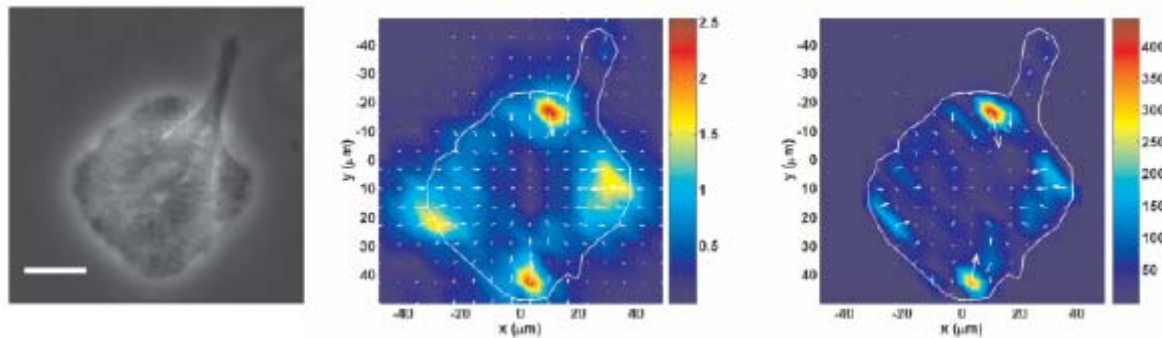


Figure 1.13
 Une cellule immobilisée dans un carré sur un substrat contenant des billes tire dans les coins comme le montre le déplacement des billes (au centre, en microns) dont on peut déduire la contrainte locale (à droite, en Pascal).(Wang et al., 2002a)

Parker et ses collègues proposent une intéressante discussion sur la relation existant entre forme, adhérence, force et protrusion. L'allongement des cellules produirait une orientation préférentielle des fibres de stress le long de l'allongement et par conséquent une augmentation de la tension au niveau des coins. Cette tension serait à l'origine du renforcement des adhésions et donc de l'activation des protrusions (voir chapitre 2). Cette étude utilise la première quantification statistique de la morphologie cellulaire sur micro-patron pour montrer la localisation des extensions membranaires hors du patron adhésif après stimulation. Pour se faire les images de l'actine fluorescente de 30 cellules furent binarisées pour rendre compte des pixels dont l'intensité est supérieure au fond puis moyennées.

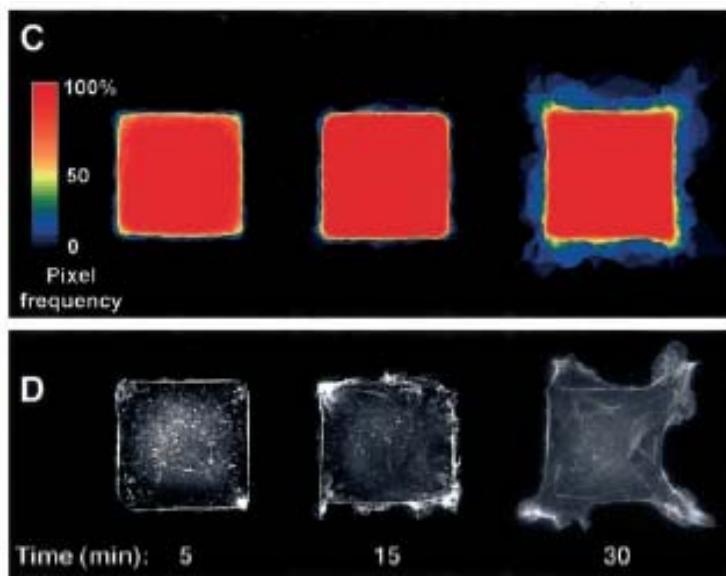


Figure 1.14
 Première quantification utilisant l'avantage de la reproductibilité de la morphologie des cellules sur micro-patrons adhésifs. En haut on peut voir une quantification de la fréquence des pixels. Après 30 minutes de stimulation au LPA des protrusions sortent dans les coins (Parker et al., 2002).

La corrélation entre la traction sur le substrat et l'extension membranaire avait déjà été observée sur des substrats flexibles (Pelham and Wang, 1997) et sera discutée plus en profondeur dans le deuxième chapitre.

Les angles ne provoquent pas seulement une augmentation locale de contrainte dans une cellule individuelle mais également au sein d'une population de cellule contrainte dans un grand carré. Les cellules se multiplient plus vite dans les angles et plus généralement dans les zones de tension du feuillet (Nelson et al., 2005).

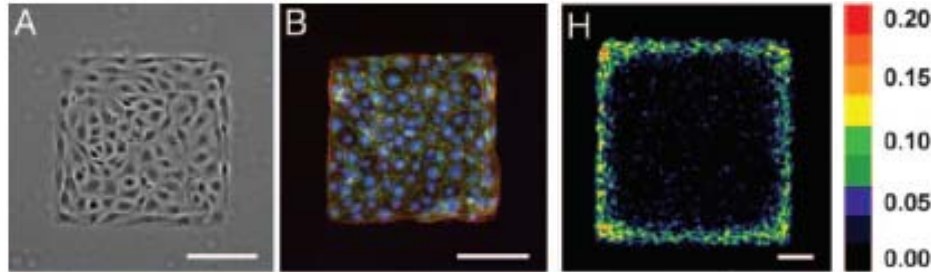


Figure 1.15
De gauche à droite on voit les cellules, un marquage des noyaux et de l'actine, et une quantification de l'incorporation de BrdU qui témoigne du rythme de prolifération plus élevé dans les coins (Nelson et al., 2005).

Un modèle mathématique basé sur le renforcement des adhésions par la tension et la disponibilité des intégrines prévoit effectivement que les adhésions s'accumulent dans les coins, là où la tension est grande et où le coefficient de diffusion des intégrines est faible (Novak et al., 2004). De surcroît les cellules développent préférentiellement des protrusions dans les coins les plus aigus et y déposent de la nouvelle fibronectine (Brock et al., 2003). Ces observations laissèrent penser que l'angle le plus aigu correspondrait donc à l'"avant" de la cellule si elle était en train de migrer puisqu'on y trouvait les protrusions, les adhésions et le dépôt de fibronectine. Cependant grâce à un ingénieux système permettant de décoller la matrice répulsive autour des patrons par une impulsion électrique (Jiang et al., 2003) il fut observée qu'une cellule allongée sur un triangle isocèle avec un angle très aigu n'en sortait pas par l'angle aigu mais par la base opposée du triangle (Jiang et al., 2005).

Curieusement deux cellules tournent l'une autour de l'autre si elles sont contraintes spatialement. Ce mouvement est favorisé chez les cellules qui ont une grande longueur de persistance dans leurs trajectoires libre (Brangwynne et al., 2000; Huang et al., 2005a).

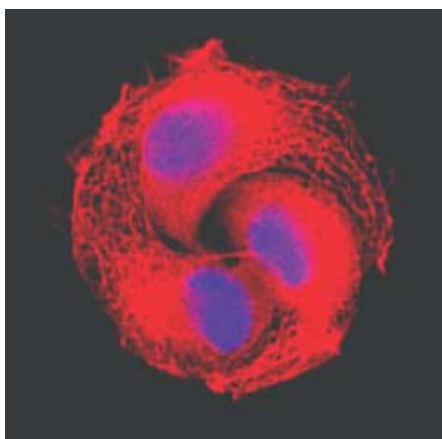


Figure 1.16
Trois cellules migrant sur un patron discoïdal. Elles tourneront d'autant plus longtemps dans le même sens qu'elle ont tendance à avancer tout droit sur un substrat sans contrainte géométrique (Huang et al., 2005a).

Ces effets géométriques à **deux dimensions** sont ils pertinents pour des cellules qui évoluent en temps normal dans un espace à **trois dimensions** ? Il semble en effet que les formes étalées et les protrusions comme les lamellipodes disparaissent rapidement si l'on couvre les cellules avec un film de PDMS leur procurant des contacts adhésifs sur la surface normalement libre (Beningo PNAS 04). Les cellules font alors des prolongements filiformes et prennent des formes qui ressemblent à celle des neurones avec un corps cellulaire en ballon de rugby et des longues et fines protrusions comme elles le font dans des matrices tridimensionnelles (Grinnell, 2003). Donc il est possible que, selon l'échelle considérée, toutes ces observations et ces quantifications sur la morphologie des cellules à deux dimensions (et celles faites au cours de cette étude) ne trouvent aucune correspondance dans des situations physiologiques.

III-4 Différenciation

L'effet de la géométrie sur l'organisation du cytosquelette est la première réaction intracellulaire. Mais en aval de cette modification des transformations plus profondes vont avoir lieu et l'ensemble de l'état de la cellule va être modifié. Ces transformations deviennent manifestes chez des cellules non-différenciées qui vont voir leur devenir guidé par la géométrie de leur environnement et les modifications que cela induit dans leur cytosquelette.

Des cellules non-différenciées cultivées sur des lignes d'une largeur de 100µm se différencient en cordes néovasculaires en quelques jours ce qui n'est pas le cas si la largeur des lignes est de 200µm et plus (Spargo et al., 1994). Ceci semble un raffinement des capacités plus générales des micro-patrons à induire la prolifération ou la mort cellulaire selon leur taille (Chen et al., 1997). Ce type d'effet de la géométrie sur le devenir des cellules est particulièrement remarquable et surprenant. Donald Ingber décrit cet effet comme l'émergence d'un comportement due à l'influence de l'adhésion et de l'étalement sur l'activation de certaines kinases ayant des capacités déterminantes sur l'engagement des cellules dans des cascades de signalisation pré-existantes (Ingber, 2003b). De façon intéressante, Huang et Ingber représentent cet effet sur la signalisation cellulaire comme une grande surface énergétique assez plane mais comportant quelques puits de potentiel correspondant à l'apoptose, la prolifération ou différent état de différenciation. L'état de chaque cellule serait au départ assez loin de ces puits et l'action de nombreuses kinases dirigerait leur chemin vers l'un ou l'autre des puits dont la proximité rend critique le rôle de seulement quelque-unes. La géométrie aurait un effet sur ces kinases (Huang and Ingber, 2000).

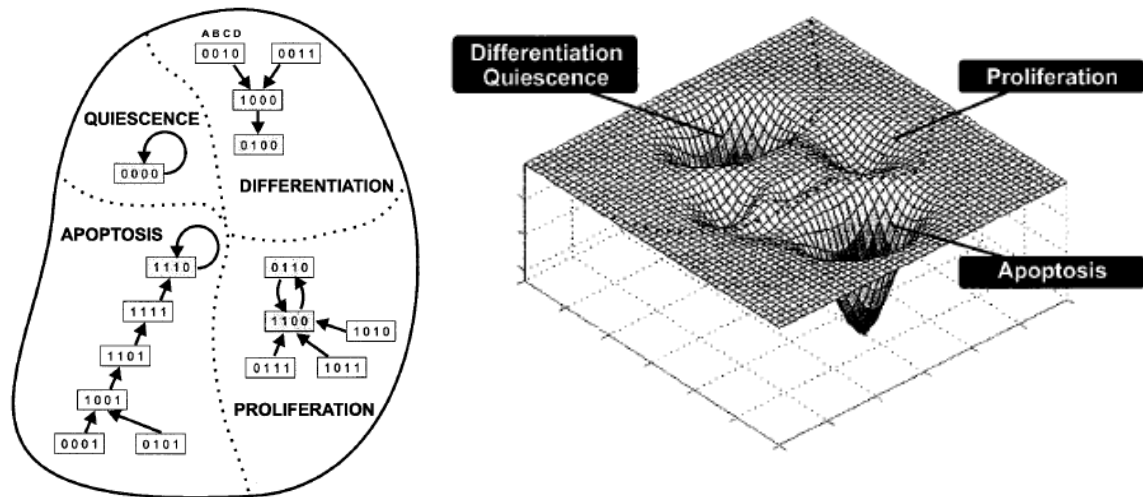


Figure 1.17 L'état de la cellule (décrit par la valeur du niveau d'expression d'un grand nombre de protéines mais schématisé ici par quatre chiffres) est entre autre sous l'influence de la forme de la cellule, son étalement, la quantité d'adhésion, son étirement. L'état va donc évoluer mais pas n'importe comment : il existe des états stables comme la prolifération, l'attente ou la mort cellulaire. Selon sa forme la cellule peut basculer dans l'un ou l'autre de ces états quelque-soit son état antérieur. (Huang and Ingber, 2000)

La surface d'étalement, par exemple, a un effet direct sur la tension corticale et le niveau d'activation de RhoA. Ce niveau est un paramètre critique qui dirige la différenciation de cellule souches mésenchymateuses en adipocytes ou en ostéoblastes (McBeath et al., 2004) (Figure 1.9). Pour tester cette hypothèse de puits énergétiques attracteurs des états de différenciation, Sui Huang et ses collègues ont induit la différenciation de neutrophiles par différentes voies et suivi l'évolution de l'état d'activation de certaines kinases avec des puces à ADN. Ils observent qu'en dépit des différents modes de différenciation imposés les trajectoires décrivant l'évolution interne de l'état d'activation convergent vers un état stationnaire unique ce qui confirme leur modèle de travail selon lequel il existe des états prédéterminés pour les cellules et qu'il n'y a pas autant d'états que de conditions expérimentales (Huang et al., 2005b).

Cette découverte importante illustre bien le fait que la reproductibilité des comportements sur micro-patrons adhésifs permet une compréhension des fonctionnements cellulaires qui dépassent largement le cadre de la lecture directe de l'effet de la contrainte géométrique sur la forme de la cellule.

IV- Conclusion sur les micro-systèmes

L'augmentation actuelle de l'utilisation des micro-systèmes pour l'étude des systèmes vivants ne pourra que progresser pendant les années à venir. D'un côté de nombreux micro-systèmes se mettent en place pour ne plus travailler avec des millions de cellules de façon assez grossière mais pour n'en utiliser que des milliers voire des centaines et pouvoir à volonté détecter puis isoler une cellule avant de l'emmener à un endroit donné. Ainsi des trieurs de cellules, des pompes associées à des micro-canaux et des micro-chambres de culture sont en train d'être mis au point sur des puces en PDMS (Chen Electrophoresis 01, Sia Electrophoresis 03, Hung Labchip 05). Bientôt viendront les micro-électroporateurs, les micro extracteurs pour récupérer l'ADN ou le contenu protéique d'une seule cellule, les micro-spectros pour lire ce contenu, et tous les outils qui permettront de miniaturiser à l'échelle de la cellule unique les techniques actuelles du laboratoire appliquées à des millions de cellules. C'est ce qui s'appelle le lab-on-chip, le laboratoire dans une puce. Et d'un autre côté d'autres techniques utiliseront le fait qu'en manipulant les cellules on ne fait pas que les déplacer ou leur imposer des formes on leur donne aussi des informations spatiales qui guident leur comportement. C'est le début de la programmation de la cellule. Une cellule souche peut donner n'importe quel type cellulaire, en utilisant les micro-systèmes on va pouvoir guider cette différenciation. On va être capable de contrôler la multiplication de cette cellule différenciée ainsi que l'architecture de l'assemblage qu'elle va former. C'est l'ingénierie cellulaire. La conception des micro-systèmes n'est limitée que par l'imagination expérimentale des biologistes cellulaire car aujourd'hui la précision de fabrication en micro-électronique est bien au-delà des résolutions nécessaires à l'usinage des micro-outils pour cellules. Les orfèvres à la pointe de la technologie sont aujourd'hui tournés vers les nanotechnologies qui concerneront la biologie cellulaire mais surtout la biologie moléculaire puisque aujourd'hui existe déjà des systèmes intégrés de PCR sur puce (Thorsen et al., 2002). Même si les nano-systèmes sont prometteurs, les micro-systèmes actuels n'ont trouvé que peu d'utilisateurs au regard de l'étendue de leurs capacités. Les applications en recherche fondamentale (biologie cellulaire) et appliquée (clinique, diagnostique et pharmacologie) n'attendent que les chercheurs en biologie.

Chapitre 2

Organisation interne des cellules et polarité en interphase

Chapitre 2 - Organisation interne des cellules et polarité en interphase

Dans ce chapitre nous nous proposons de décrire l'architecture du cytosquelette des cellules et la disposition de leurs compartiments dans l'espace en réponse à la géométrie de l'adhésion. Notre approche expérimentale consiste à utiliser les micro-patrons adhésifs pour modifier les contraintes spatiales de cette organisation afin de révéler les lois qui dirigent sa mise en place.

Dans un premier temps, nous présenterons ce que nous entendons par **polarité** cellulaire. Nous décrirons ensuite les éléments du cytosquelette qui composent la cellule et que nous avons manipulés à l'aide des micro-patrons adhésifs. Cette présentation, rendue forcément linéaire par les contraintes de l'écriture, ne pourra pas rendre compte de l'enchevêtrement des structures. Nous avons donc arbitrairement choisi de les présenter dans l'ordre de leur implication dans le processus de mise en place de la polarité. Ainsi nous décrirons d'abord les **adhésions** de la cellule, puis les filaments d'**actine** et la **membrane** plasmique et enfin les **microtubules**. Cette introduction, tout comme les expériences présentées ensuite, se concentrera moins sur la nature des molécules impliquées que sur les règles qui guident les assemblages qui se construisent dans la cellule. Ainsi, un paragraphe sera consacré aux **interactions entre l'actine et les microtubules**. Ces deux éléments du cytosquelette sont complètement dépendants l'un de l'autre car ils se sont adaptés ensemble au cours de l'évolution. Nous finirons cette présentation en décrivant la capacité des cellules à sentir les propriétés physiques de leur environnement et le système de **mécano-transduction** qui leur permet de transformer ces sensations en informations biochimiques.

Dans un deuxième temps, nous présenterons notre étude de l'organisation des **adhésions** et de l'**actine** en réponse à la géométrie des contraintes adhésives imposées par les micro-patrons. L'**article** intitulé « *Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment* » montre que les cellules établissent des fibres de stress plus épaisses, et donc plus tendues, au-dessus des zones non-adhésives. Ce mécanisme leur confère la propriété de compenser une asymétrie mécanique externe par un réajustement interne des tensions et d'adopter une forme convexe.

Enfin, nous décrirons la façon dont la disposition dans l'espace du **noyau** et du **centrosome** répond à l'asymétrie du système actine établie à la périphérie de la cellule dans l'**article** intitulé « *Adhesive control of cell polarity* ». Cette étude révèle également la capacité du centrosome à se placer systématiquement au centre de la cellule en dépit de l'asymétrie périphérique.

Ces deux études, menées sous la contrainte d'un temps limité, souffrent d'une absence de recul et donc de compréhension mais révèlent des propriétés du cytosquelette qui nous semblent importantes.

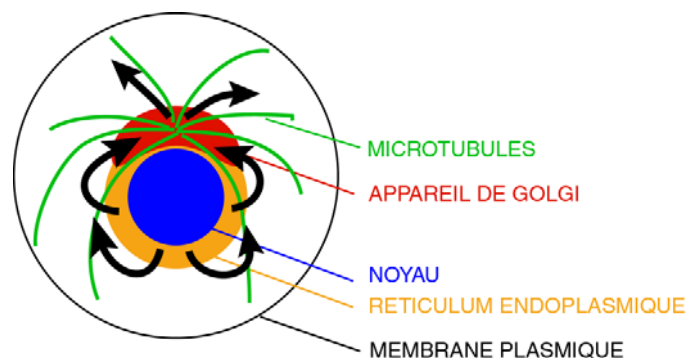
I- Polarité cellulaire

La polarité cellulaire désigne l'ensemble des mécanismes qui participent à l'anisotropie architecturale et fonctionnelle de la cellule. La polarité est une propriété constitutive de la cellule. Qu'elle soit en suspension, étalée sur une boîte de Pétri, insérée à la surface ou au sein d'un tissu une cellule est toujours polarisée au sens où le cytosquelette et le transport intracellulaire à un instant donné sont non isotropes. Et quand des cellules sont dites non-polarisées elles sont en fait polarisées mais individuellement, ce qui produit une absence de polarité globale dans l'ensemble de la population observée.

La cellule est polarisée

Dès 1883 Van Beneden observa que le centre du noyau et le centrosome établissait un axe qui conférait à la cellule une organisation polarisée (van Beneden, 1883). Cette anisotropie constitutive est intrinsèque à la cellule. En effet, la morphologie des composants de la cellule s'est adaptée depuis le début de l'évolution, au besoin de la cellule d'établir un transport orienté des protéines qu'elle synthétisait.

Le noyau représente un volume connexe qui reste inaccessible au cytosquelette et aux autres organites. Les ARN messagers sortent du noyau de façon isotrope. Ces ARN sont ensuite traduits en protéines par les ribosomes du réticulum endoplasmique. Puis les protéines destinées à être sécrétées sont collectées dans l'appareil de Golgi. L'appareil de Golgi est un empilement de membranes dans lesquelles des moteurs moléculaires interagissent avec le réseau de microtubules et se dirigent vers leurs extrémités « - ». Or le réseau de microtubules est organisé autour d'un centre organisateur, le centrosome, qui regroupe les extrémités « - ». Ce réseau n'est pas isotrope car il n'a pas accès au noyau. Donc l'appareil de Golgi par lequel transitent les protéines est organisé autour d'un point qui est exclu de la zone d'émission des ARN messagers. Les protéines semblent donc produites de façon isotrope autour du noyau et collectées vers un centre à partir duquel elle sont transportées vers leur compartiment cible ou exportées. Donc le transport des protéines et l'architecture du réseau de microtubules sont intrinsèquement asymétriques et polarisés.



En dirigeant le transport des ARNm et des protéines et le trafic membranaire vers certaines zones de la cellule l'anisotropie interne peut guider l'architecture du cytosquelette. En effet, ce transport fournit des lipides dans les zones où l'actine polymérise et forme des protrusions membranaires. Ailleurs l'actine s'organise en filaments contractiles. Cette hétérogénéité du réseau d'actine affecte la croissance et la stabilité des microtubules ce qui polarise le réseau de microtubules. Le cytosquelette, servant lui-même de guide pour les moteurs assurant le transport des protéines, dirige en retour l'orientation du trafic intracellulaire. Il existe donc des interactions à double sens entre le transport des protéines et l'architecture du cytosquelette.

L'hétérogénéité de l'espace dirige l'établissement la polarité

Le cytosquelette, présent dans tout l'espace cellulaire, est sensible à la moindre hétérogénéité externe pouvant influencer sa dynamique. De plus, les cellules possèdent des systèmes enzymatiques de rétroaction positive locale et d'inhibition globale qui lui permettent l'amplification de fluctuations aléatoires de la dynamique de son cytosquelette et par conséquent une polarisation spontanée du système. L'association de ces deux propriétés confèrent aux cellules une grande sensibilité à l'hétérogénéité des signaux externes qui peuvent ainsi facilement biaiser leur capacité de polarisation spontanée (Sohrmann and Peter, 2003; Wedlich-Soldner and Li, 2003; Wedlich-Soldner R., 2003). La détermination de l'orientation de la polarité cellulaire résulte donc d'un ensemble de boucles de rétroactions internes en interaction avec l'environnement.

Bien que le processus d'établissement et de maintien de la polarité ne puisse être réductible à une vision hiérarchique, il est possible de décrire la succession temporelle des événements que l'on retrouve dans un grand nombre de systèmes, des levures aux cellules de vertébrés (Nelson, 2003).

D'après James Nelson on peut décrire la cascade des processus impliqués dans l'établissement de la polarité comme cela :

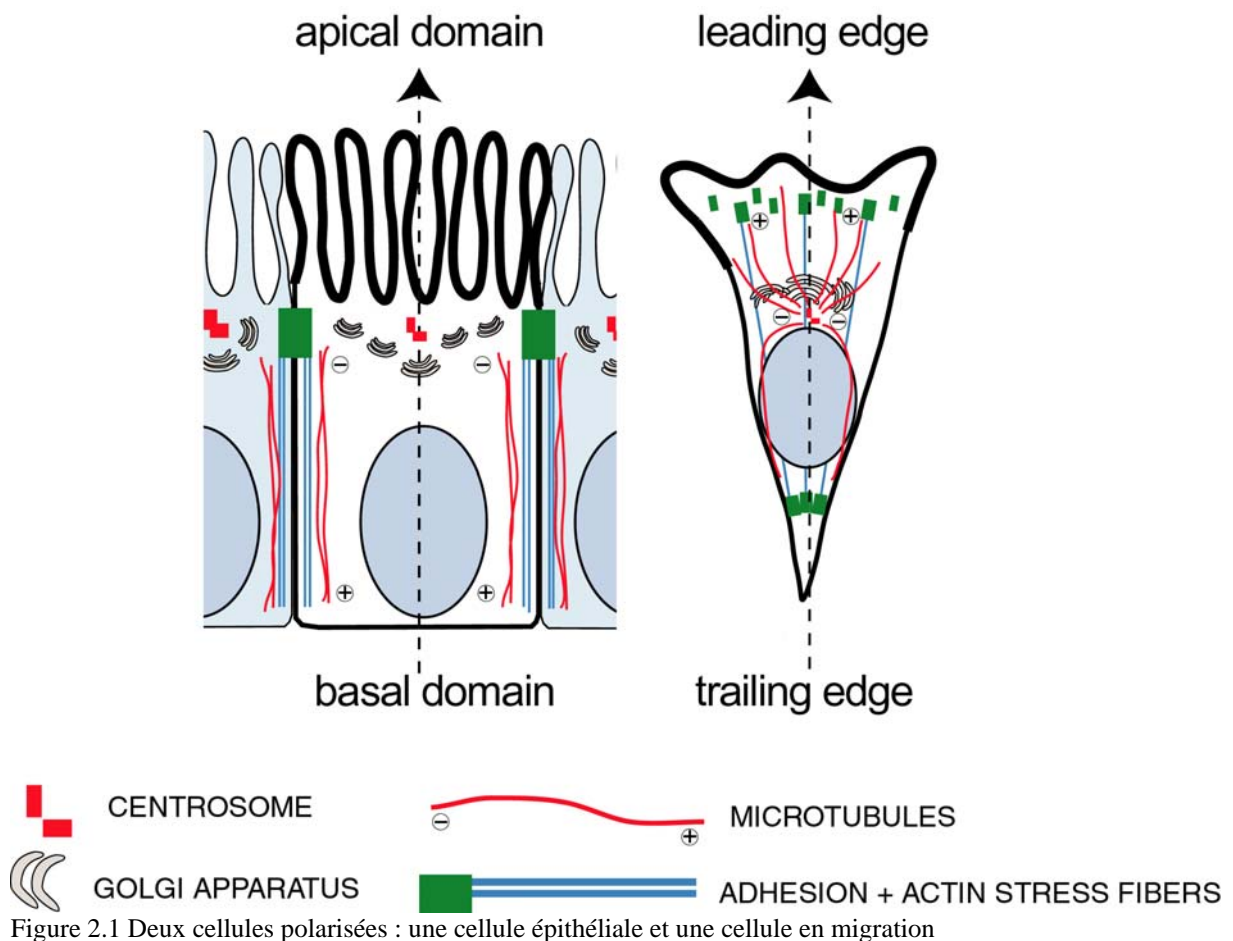
- 1- Apparition d'une marque sur le cortex de la cellule. Cette marque peut provenir d'un signal externe (sécrétion humorale, blessure, nouveau contact cellulaire) ou d'un processus interne (division précédente, polarité antérieure, fluctuation locale élevée).
- 2- Accumulation, sur cette marque, de complexes de signalisation (Src, PAK, RhoGTPases,...).
- 3- Agglomération de certains lipides et des protéines transmembranaires associées (raft, glycosylphosphoinositides, intégrines, cadhérines).
- 4- Recrutement des protéines impliquées dans l'assemblage et le remodelage du cytosquelette d'actine, du cytosquelette d'actine (actinine, profiline, Arp2/3,...).
- 5- Mobilisation de protéines du pool cytosolique, notamment celles impliquées dans l'ancrage des microtubules, vers le site cortical par la distribution orientée de vésicules (APC, IQGAP, formines, ...).
- 6- Stabilisation et ancrage des microtubules par les complexes recrutés sur le site cortical.
- 7- Réorientation du ou des complexes organisateurs de microtubules (nucléation et ancrage aux bouts moins par le centrosome) et de l'appareil de Golgi. Organisation de l'ensemble des processus polarisés (transport interne, sécrétion, endocytose, distribution des forces internes et de celles exercées sur l'environnement) selon le nouvel axe de polarité.

Cependant il est important de garder à l'esprit que l'établissement de la polarité n'est pas une succession linéaire d'événements. En effet, les composants qui structurent la cellule sont aussi des senseurs qui activent des voies de signalisation. La construction du cytosquelette est en réalité une succession permanente d'assemblages et de désassemblages influencés par des jeux de signalisation croisés. Les boucles de signalisation-assemblage ne sont pas propres à chaque constituant du cytosquelette. Les assemblages sont dynamiques et inter-dépendants (Etienne-Manneville, 2004a). Ces interactions se stabilisent finalement autour de positions d'équilibres dynamiques. Ces états stationnaires sont asymétriques. La cellule consomme en permanence de l'énergie pour entretenir un état polarisé et temporellement stable bien que hors équilibre, au sens thermodynamique du terme.

La cellule polarisée est composée de domaines structurellement associés mais mutuellement exclusifs

La polarité est manifeste dans des cellules épithéliales mais aussi dans des cellules en migration (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Nous commencerons par décrire succinctement l'organisation spatiale des cellules épithéliales et fibroblastiques en migration. La polarité embryonnaire sera discuté dans le chapitre 3.

De manière générale, si deux zones de la cellule ont des compositions biochimiques proches mais distinctes et que cette distinction les rend mutuellement exclusives, elles créent deux domaines dans l'espace cellulaire. Les positions relatives de ces deux domaines définissent à la fois une direction et un sens et par conséquent un axe de polarité.



Dans une cellule épithéliale, plusieurs assemblages partagent le même axe de polarité (Rodriguez-Boulant et al., 2004; Rodriguez-Boulant et al., 2005). La **membrane plasmique** basale ne comporte pas les mêmes lipides ni les mêmes protéines transmembranaires et submembranaires que la membrane apicale ce qui définit une polarité périphérique. Le cytosquelette d'**actine** est formé de fibres assemblées en fagot le long des parois latérales et de fibres assemblées en un réseau branché dans les protrusions membranaires du pôle apical. Ceci constitue une seconde forme de polarité périphérique. L'association de la membrane plasmique et des filaments d'actine constitue le **cortex** de la cellule et la polarité de l'ensemble est désigné sous le terme de **polarité corticale**.

Le **noyau**, d'où proviennent les ARN messagers, est proche de la membrane basale alors que le **centrosome**, qui centralise l'organisation des microtubules et du transport des protéines, est proche de la membrane apicale. Ceci définit une **polarité interne**, celle de la synthèse puis de la maturation et enfin du transport des protéines, parallèle à la polarité corticale.

La connexion entre ces deux systèmes polarisés se fait, entre autre, par l'intermédiaire des **microtubules** qui sont eux-mêmes des structures polaires, issues de la polymérisation de monomères asymétriques. Leur polarité guide les moteurs moléculaires. L'architecture du cytosquelette guide ainsi l'ensemble du **transport intracellulaire** le long de la membrane latérale vers le pôle apical ou le pôle basal.

En effet, les cellules épithéliales sont une interface entre le milieu extérieur et le milieu intérieur par lequel transitent les nutriments ingérés par l'organisme. L'internalisation de composants du milieu externe s'effectue au pôle apical. Le tri s'effectue dans l'appareil de Golgi et les composants retenus sont envoyés vers le pôle basal où ils sont externalisés vers le milieu intérieur. Le transport des protéines participe à la mise en place de la polarité cellulaire mais en est également un des aboutissements fonctionnels (Nelson, 2003). Cependant notre étude se limitera à l'observation et l'expérimentation de l'architecture du cytosquelette. Le transport intracellulaire des protéines n'a malheureusement pas pu être analysé au cours de ces travaux et, par conséquent, ne sera pas présenté plus en détail dans cette introduction.

Les **adhésions** n'ont pas d'homologue fonctionnel privilégié et ne forment pas de domaines polarisés mais elles sont les senseurs de l'hétérogénéité de l'environnement et leur présence à la limite entre la membrane latérale et la membrane apicale sert de frontière entre les pôles antagonistes. Elles sont donc les bases physiques de l'établissement et du maintien de la polarité.

Dans la cellule en migration, la plupart de ces anisotropies fonctionnelles sont conservées. La composition de la membrane du bord avant diffère de celle des côtés ou de l'arrière. L'actine forme des fibres contractiles le long de la direction de migration et des protrusions au niveau du bord avant. L'axe noyau-centrosome est orienté vers l'avant de la cellule. Les microtubules distribuent et organisent l'anisotropie des protéines synthétisées et internalisées. Les adhésions focales servent de senseurs de la rigidité externe et séparent le bord avant du corps cellulaire, jouant ainsi leur rôle dans l'établissement et le maintien de la polarisation migratoire.

Les paragraphes suivants sont une introduction à la présentation des résultats obtenus sur l'organisation interne des cellules en interphase sur micro patrons adhésifs. Ils regroupent des études expérimentales et des revues décrivant les mécanismes d'organisation de l'architecture interne des cellules. Les adhésions, l'actine, les microtubules et les voies de signalisation orchestrant leurs constructions seront présentés successivement mais il convient de garder à l'esprit que tous ces assemblages sont inter-dépendants.

I-1 Adhésion focales

Les adhésions sont des complexes transmembranaires qui connectent la matrice extracellulaire (MEC) avec le cytosquelette (Abercrombie et al., 1971; Burridge and Fath, 1989). Leur composition moléculaire est extrêmement riche et variée (Zamir and Geiger, 2001). Elles sont le lien physique entre le cytosquelette d'actine et le milieu fibrillaire extérieur. Servant d'attache intracellulaire aux fibres d'actine contractiles, les fibres de stress, elles sont soumises à la tension développée dans ces fibres. Parallèlement, elles sont les capteurs des tensions externes transmises par la MEC sur la cellule. Leur état dépend donc de ces deux connections. En réponse à ces stimulations, elles modulent l'activation de nombreuses voies de signalisation dans la cellule. En fonction des voies activées les adhésions vont soit servir de support à la nucléation d'actine branchée et à la formation de protrusions membranaires soit d'ancrage aux fibres de stress et de support au développement de la traction sur le substrat.

Deux revues permettent d'avoir une compréhension globale des interactions MEC-adhésion et adhésion-cytosquelette (qui sont toutes les deux des inter-actions et non des liens unidirectionnels) et des signaux qui orchestrent ces échanges : (Geiger et al., 2001; DeMali et al., 2003)

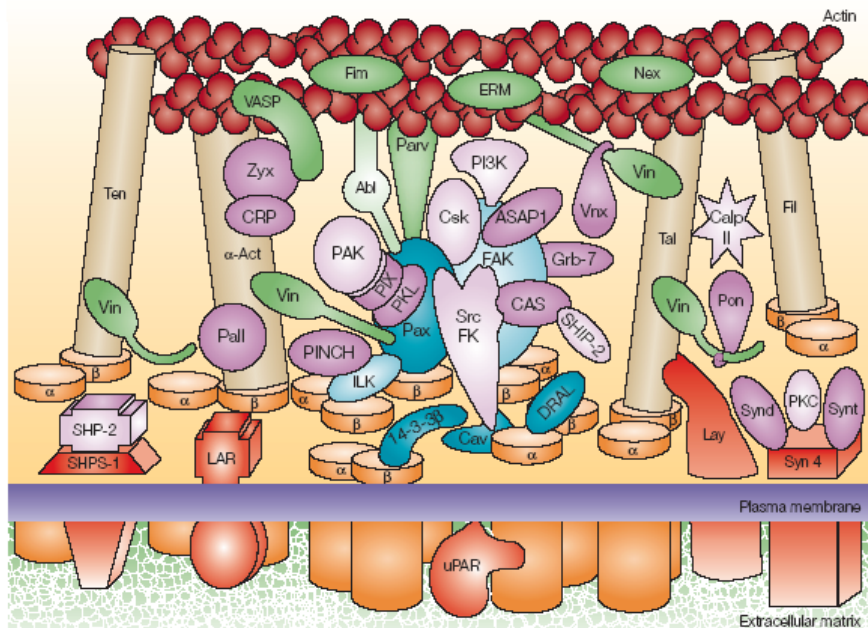


Figure 2 | Schematic depicting the complexity of the main molecular domains of cell-matrix adhesions. The primary

Figure 2.2 Représentation schématique des composants d'une adhésion. α et β désignent les intégrines qui sont des molécules transmembranaires, Vin la vinculine, ERM les protéines de la famille ezrin/radixin/moesin, Zyx la zyxine, FAK les kinases des adhésions focales, les filaments rouges représentent les filaments d'actine (Geiger et al. NatRevMolCelBiol 01).

Mise en place des adhésions focales et les premiers signaux intra-cellulaires

La taille, la forme et la composition des adhésions dépend de leur temps de vie et des stimulations reçues. L'assemblage élémentaire et initial est un complexe focal, puis, selon le type de stimulation interne (signalisation, tension) et externe (composition et propriété mécanique de la MEC), le complexe focal peut mûrir en adhésion focale ou en adhésion fibrillaire (Miyamoto et al., 1995; Katz et al., 2000). Le complexe focal apparaît près du bord avant, derrière le lamellipode de la cellule en migration ; il est alors de petite taille et composé d'intégrine de paxiline et de vinculine et peut subir de très fortes tensions (Beningo et al., 2001). Cette tension et l'effet des GTPases de type Rho transforment le complexe focal qui grossit en adhésion focale. S'y ajoutent ensuite séquentiellement des molécules de zyxine, de taline et de FAK (focal adhesion kinase). L'apparition de tensine signe finalement sa maturation en adhésion fibrillaire (Zaidel-Bar et al., 2003). L'ensemble du processus de maturation dépend largement des contraintes mécaniques supportées par les adhésions (Geiger and Bershadsky, 2001).

La signalisation par les adhésions : Src, FAK et les Rho GTPases

Les adhésions sont les premiers senseurs de l'environnement cellulaire. De nombreuses kinases et GTPases sont recrutées et/ou activées au niveau des adhésions. La maturation des adhésions se traduit ensuite en activation biochimique dans la cellule par le recrutement et l'activation de nombreuses enzymes. Ces enzymes vont changer de conformation et de potentiel chimique après leur activation. Ceci va se répercuter sur d'autres enzymes localisées près des adhésions et induire une cascade de signalisation. Les premières concernées sont les kinases de la famille Src (Playford and Schaller, 2004) et les FAK (focal adhesion kinases) (Cary and Guan, 1999; Parsons, 2003) (Figure 2.3).

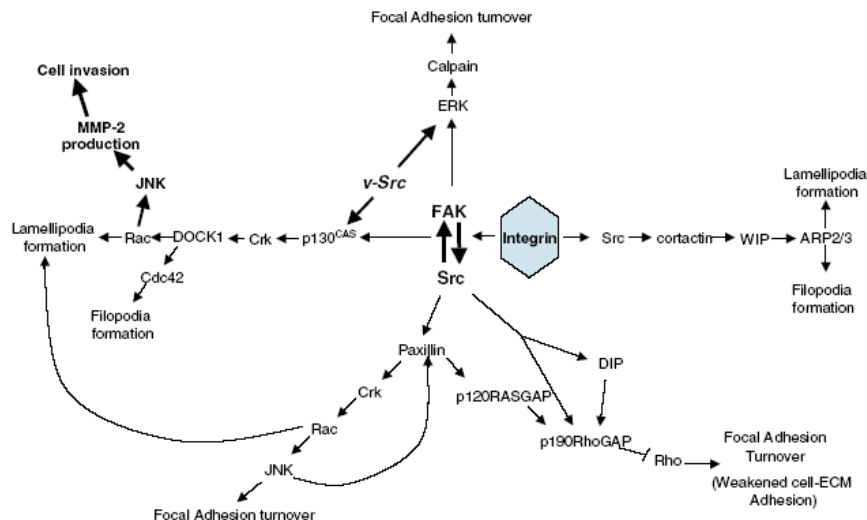


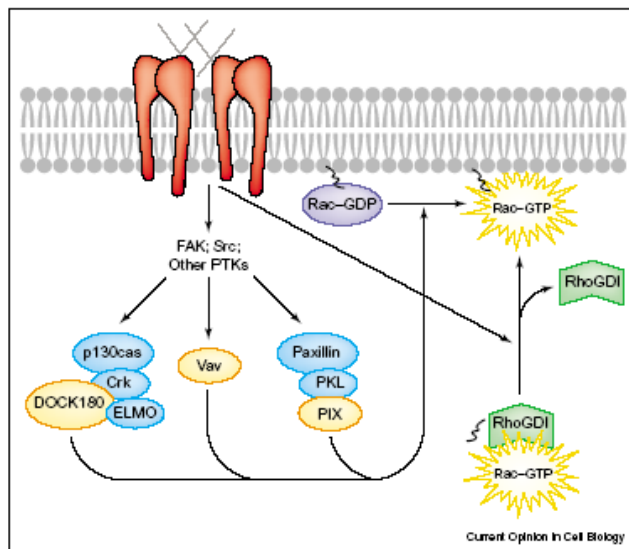
Figure 2. 3

Src et FAK sont au cœur des signaux générés par les adhésions Playford et al., Oncogene, 2004.

Prenons l'exemple d'une cellule qui commence à s'étaler sur un nouveau substrat. Après l'engagement des intégrines avec la MEC, les adhésions activent Src et FAK ce qui active Rac et Cdc42. Ces jeunes adhésions induisent en même temps une baisse transitoire de

RhoA (Figure 2.4). Ensuite elles activent RhoA, ce qui réduit l'activité de Rac et de Cdc42 et augmente la contraction du cytosquelette (DeMali et al., 2003) (Figure 2.4). Ces activations/inactivations dépendent notamment des tyrosines kinases de la famille Src mais aussi des protéines tyrosines phosphatases PTP α . Les différentes étapes au sein de ces voies de signalisation peuvent varier en fonction des types cellulaires. Les intégrines recrutent et activent ainsi la machinerie nécessaire à la nucléation de l'actine et la formation de protrusions (voir la description de l'actine plus tard). Les RhoGTPases, qui modulent l'activité de l'actine, ne se lient pas directement aux adhésions mais sont sous leur influence. En retour le devenir des adhésions (désassemblage, maturation) dépend de l'état des RhoGTPases qui est modulé par le cytosquelette (Ridley, 2001).

Au tout début



Après quelques minutes

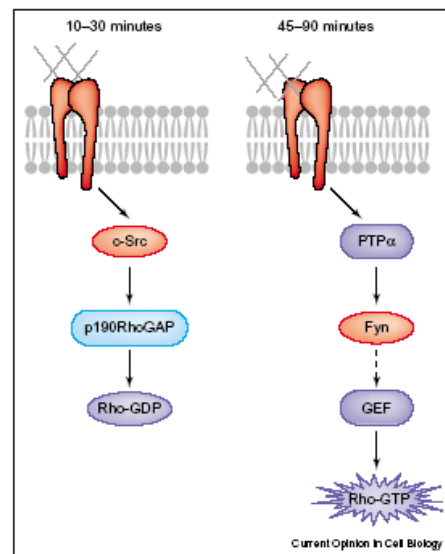


Figure 2.4 Activation des voies de signalisation suite à l'engagement des adhésions.

Au tout début : les intégrines activent Rac et Cdc42.

Après quelques minutes : les adhésions inhibent Rho (tout en activant Rac) puis activent Rho (DeMali et al., 2003).

La signalisation interne dépend aussi de la **nature de l'engagement des adhésions avec la MEC**. Sur de faibles quantités de fibronectine, Cdc42 et Rac sont activées, ce qui induit la formation de protrusions et la migration des cellules. Alors que sur des quantités plus élevées, ces GTPases sont inhibées. RhoA, au contraire, est d'autant plus activée qu'il y a de fibronectine, ce qui augmente la contractilité cellulaire et réduit la motilité, notamment si RhoA est activé au delà du seuil qui déclenche l'inhibition de Cdc42 et Rac (Cox et al., 2001).

L'effet du lien entre adhésion et signalisation dans l'**établissement de la polarité** a été étudié d'une façon remarquable par Miguel A. del Pozo et ses collègues. Au terme de trois études, ils montrent que les intégrines engagées dans des adhésions ségrèguent certains rafts lipidiques (voir plus tard la présentation de la membrane) et que ces rafts, riches en cholestérol, recrutent Rac et p21-activated kinase (PAK) (del Pozo et al., 2000; del Pozo et al., 2002; del Pozo et al., 2004). Les rafts lipidiques sont un intermédiaire entre l'activation des FAK, par les intégrines, et la stabilisation des microtubules à cet endroit de la membrane (Palazzo et al., 2004). Ces découvertes illustrent le rôle initiateur des adhésions dans

l'établissement de la polarité de la membrane et de l'organisation spatiale des cascades de signalisation

Après l'établissement du premier contact et la définition de la polarité, les kinases de types Src jouent un rôle catalytique aux niveau des intégrines nécessaire à la **migration** (Cary et al., 2002). L'activation des substrats de Src participent à la **réorganisation du cytosquelette** (Arthur et al., 2000; Obergfell et al., 2002). L'activité des kinases de type FAK est elle aussi impliquée dans la motilité. Les FAK modulent la rigidité du lien entre les adhésions et les fibres de stress. Elles recrutent certains phospholipides facilitant ainsi la formation de protrusions. Elles sont un intermédiaire de signalisation entre les adhésions et les RhoGTPases qui sont, elles, directement impliquées dans la migration (Mitra et al., 2005).

Enfin, les signaux générés au niveau des adhésions focales (Src, FAK) se transmettent jusqu'aux cyclines et participent au choix de la cellule de **se diviser, attendre ou mourir** (Giancotti and Tarone, 2003). Le dysfonctionnement de ces régulations témoigne d'une incapacité des cellules à adapter leur forme, leur croissance ou leur déplacement aux informations externes collectées au niveau des adhésions et constitue un signe majeur de **transformation** (cancérogenèse) (Jones et al., 2000).

Tension et adhésion

Les propriétés de **mécano-transduction** des contacts focaux sont certainement un de leurs aspects les plus fascinants. La tension externe ou interne va moduler leur composition chimique et la nature des signaux qu'ils génèrent (Geiger and Bershadsky, 2001; Bershadsky et al., 2003). La capacité de certaines molécules, comme la vinculine, de changer de conformation en fonction de la tension et donc de faire apparaître de nouveaux sites d'interaction, pourrait être impliquée dans cette propriété de mécano-transduction (Gilmore and Burridge, 1996). La **vinculine** est spécifiquement recrutée sur les contacts soumis à une tension (Galbraith et al., 2002). La **zyxine**, initialement sur les adhésions focales déjà sous tension, se relocalise sur toute la fibre de stress et participe directement à l'augmentation de sa tension suite à une stimulation externe de la contractilité (Yoshigi et al., 2005). En effet, les constantes d'affinités de certaines protéines pour les complexes d'adhésion dépendent directement de la tension. Si la tension augmente, la zyxine s'en va et la vinculine reste (Lele et al., 2005). La zyxine décolle ainsi des adhésions pour aller dans le noyau où elle module l'expression de certains **gènes mécano-sensibles** (Cattaruzza et al., 2004).

La **contractilité** des fibres de stress est directement corrélée à la **taille des adhésions** focales (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). Plus précisément, la taille de l'adhésion, son orientation et l'intensité du marquage par la vinculine sont directement proportionnels à la contrainte exercée sur le substrat au niveau de cette attache et le temps de réponse est inférieur à la seconde (Figure 2.5) (Balaban et al., 2001; Tan et al., 2003).

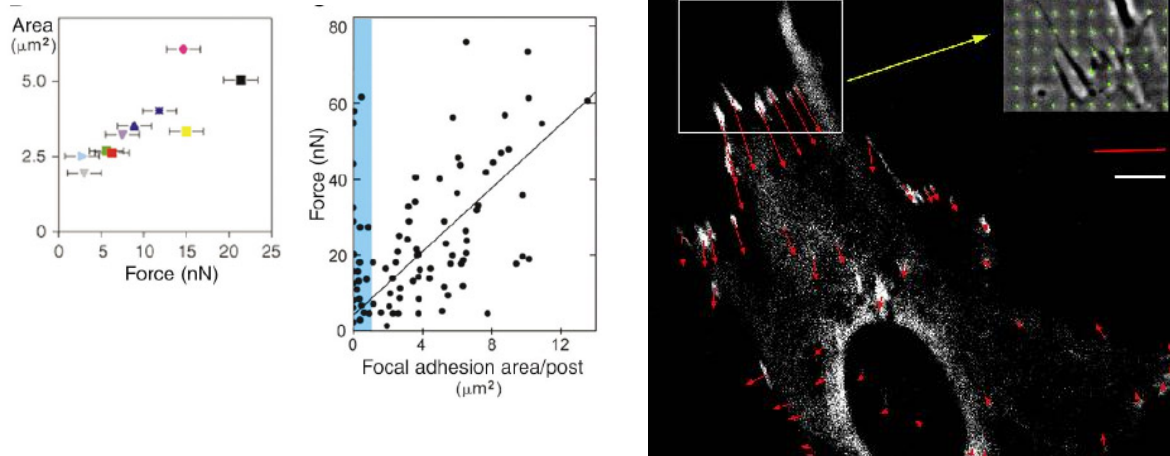


Figure 2.5

La taille des adhésions focales est proportionnelle à la tension qu'elle supporte, mesurable par la déformation d'un substrat flexible (image à droite, (Balaban et al., 2001)) chez des fibroblastes (à gauche (Balaban et al., 2001)) et chez des cellules musculaires (à droite (Tan et al., 2003)), sauf pour les petites (celles de moins d'un μm^2 en bleu à droite) cf (Beningo et al., 2001).

Si une tension externe est appliquée sur la cellule, les adhésions grossissent grâce à un mécanisme dépendant de mDia et non de ROCK, qui ne sert apparemment qu'à produire la tension lorsque la cellule exerce elle-même cette tension de façon interne (Riveline et al., 2001) (Figures 2.6 et 2.7).

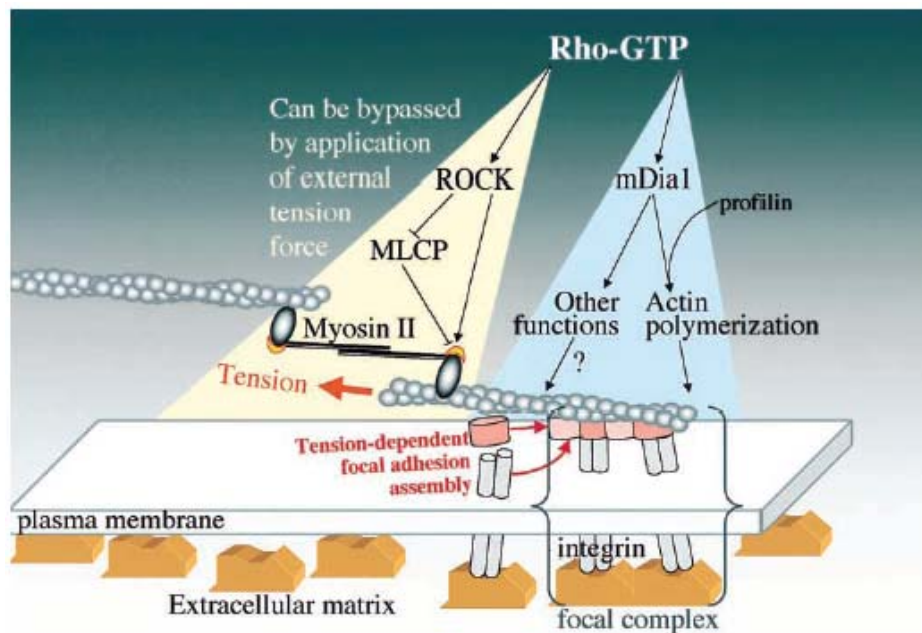


Figure 2.6 L'augmentation de la tension dans la fibre de stress fait grossir les fibres de stress (flèches rouges) par un mécanisme impliquant les RhoGTPases (Riveline et al., 2001)

Les adhésions semblent donc se comporter comme des senseurs qui répondent à la tension. La tension régule le passage de complexe focal à adhésion focale via Rho (Geiger and Bershadsky, 2001). La tension influe sur les adhésions qui se transforment et modifient les liens avec leur ligands. Ce mécanisme est à la base d'une propriété essentielle des adhésions, le **renforcement**. Si l'on tire sur une adhésion, elle renforce l'attache avec le point d'application de la tension par une boucle de rétroaction positive (Choquet et al., 1997). La maturation des adhésions permet donc à la cellule de moduler l'intensité de la tension développée sur les contacts (Galbraith et al., 2002). Le mécanisme de renforcement de l'énergie d'adhésion, en réponse à une contrainte externe, est certainement à l'origine de la **durotaxie**, cette capacité des cellules à se diriger vers les zones les plus rigides (Lo et al., 2000). Si les cellules palpent leur environnement de façon isotrope elles se dirigeront vers les zones offrant le plus de résistance et favorisant le renforcement des contacts.

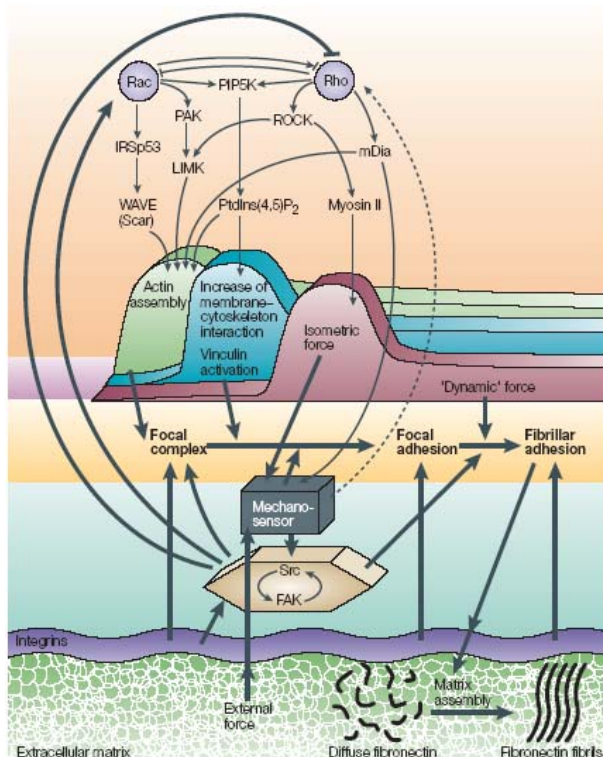


Figure 3 | Cells probe, respond to, and remodel the extracellular matrix (ECM) using integrin-actin cytoskeleton adhesion complexes. A highly schematic representation of

Figure 2.7

Représentation schématique de la signalisation impliquée dans le mécanisme de mécano-sensation.

1- activation de Rac et inhibition de Rho favorisent l'assemblage d'actine.

2- le recrutement et l'activation de vinculine participe à la maturation de l'adhésion.

3- la mise en tension de l'actine à l'intérieur de la cellule ou par des forces externes fait grossir l'adhésion via ROCK et Src.

(Geiger et al., 2001)

Adhésion cellule-cellule

Les contacts cellule-cellule (cadhérines), comme les contacts cellule-matrice (intégrines), induisent l'activation des RhoGTPases Rac et Cdc42, le recrutement de Par6/aPKC et du complexe APC/EB1 (Jamora, 2002). Pourtant les adhésions cellule-cellule ne répondent pas aux mêmes stimuli que les contacts cellule-matrice. Les cadhérines forment des clusters lorsque la membrane est tendue alors que les intégrines forment des clusters lorsque la contractilité acto-myosine est augmentée (Delanoe-Ayari et al., 2004). Les deux systèmes sont même découplés au cours de la mise en place de la polarité des MDCK en épithélium (Wang et al., 1990; O'Brien et al., 2002), bien que les deux participent à l'établissement de la polarité (Drubin and Nelson, 1996; Yeaman et al., 1999). Des molécules différentes sont impliquées dans le contact transmembranaire en lui-même mais beaucoup de composants associés à la face cytoplasmique du complexe et à l'actine sont identiques (vinculine, alpha-actinine). Les voies de signalisation finalement activées se ressemblent beaucoup (RhoGTPases, Src, ERK) (Braga, 2002; Guo and Giancotti, 2004).

Comment l'organisation interne de la cellule peut-elle distinguer ces deux types de contacts avec l'extérieur ?

I-2 Actine

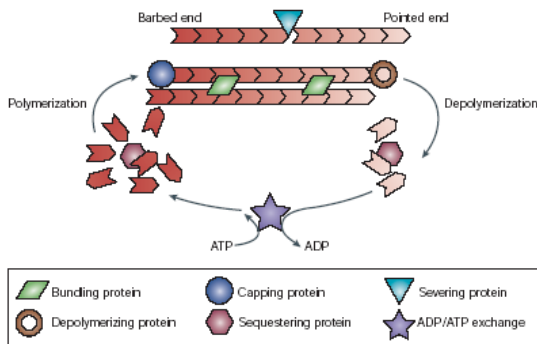


Figure 2.8 Les monomères d'actine sont polarisés. Ils s'associent pour former des polymères linéaires ou branchés. Ces polymères sont dynamiques, ils s'assemblent et se désassemblent en permanence. De nombreuses protéines s'associent à l'actine pour moduler ou guider cette dynamique.

(Revenu et al., 2004)

La polymérisation de l'actine (Figure 2.8) permet la formation de **diverses structures intracellulaires**. Les fibroblastes et les cellules épithéliales en culture développent deux types de structures basées sur les filaments d'actine : un réseau branché, dans les protrusions membranaires (lamellipodes et filopodes), et des câbles, alignés parallèlement dans les fibres de stress. Si les protrusions semblent être générées dans un espace plutôt fluide et déformable de la cellule, les fibres de stress témoignent d'une contractilité élevée et sont le support de toute la traction que la cellule développe sur le substrat. Les premières sont stimulées par l'action de Rac alors que les secondes par celle de RhoA, ces deux types de RhoGTPases s'inhibant mutuellement les protrusions et les fibres de stress sont deux assemblages antagonistes et exclusifs (Wadsworth, 1999; Waterman-Storer and Salmon, 1999). Parallèlement, les filaments d'actine forment une sorte de gel, réticulé par des moteurs, le long de la membrane plasmique dans laquelle il est ancré. L'ensemble forme ce que l'on appelle le cortex cellulaire. Cette coque d'actine sert d'ancrage et de stabilisation pour de nombreuses protéines près de la membrane.

LES DIFFERENTES STRUCTURES DE L'ACTINE

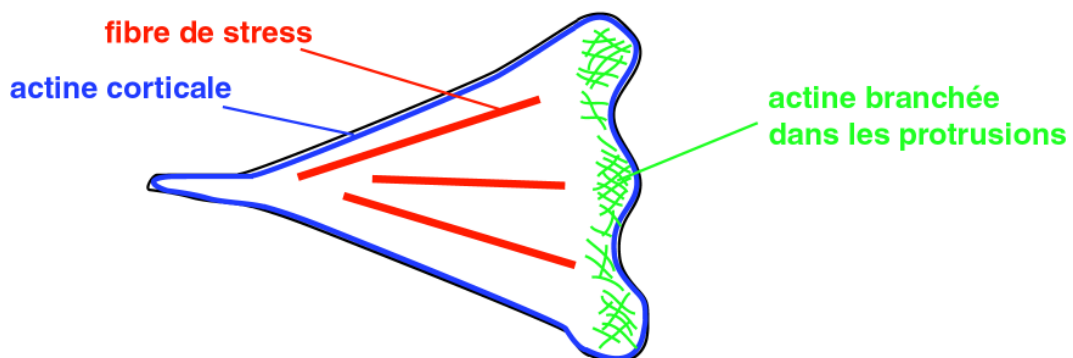


Figure 2.9 Les polymères d'actine s'associent pour former différents type d'assemblages.

Fibre de stress et contractilité

Les fibres de stress sont ancrées sur le substrat à leur deux extrémités par des adhésions focales comme des tendons relient les muscles aux os (Sastry and Burridge, 2000).

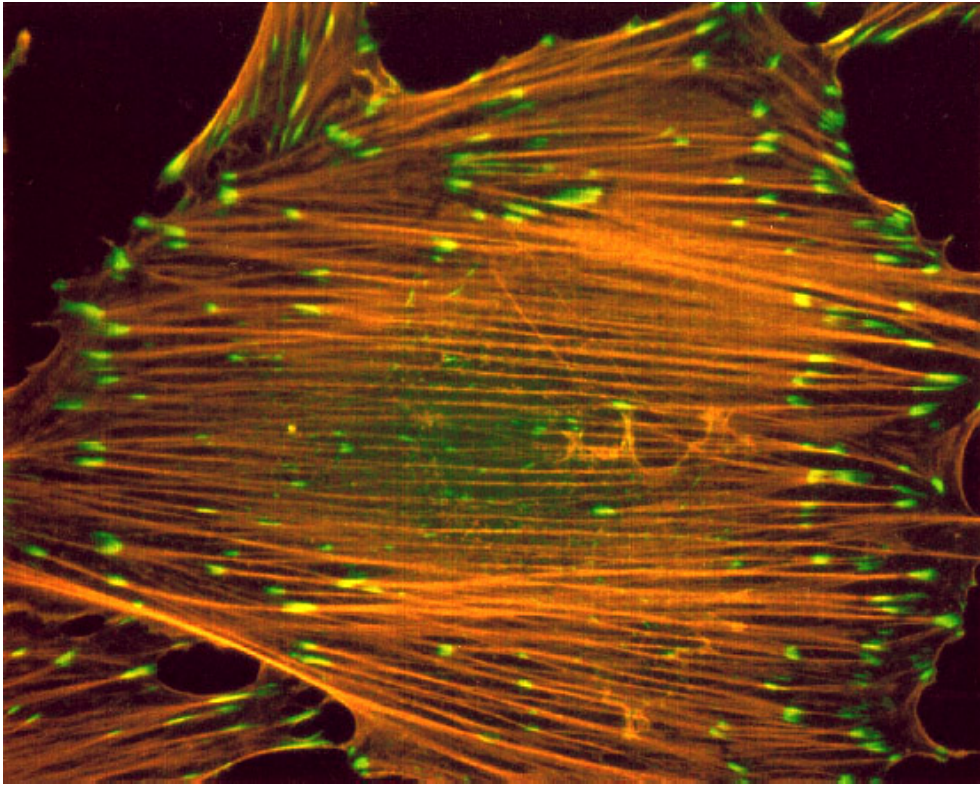


Figure 2.10 Fibres de stress. Fibroblaste d'embryon de rat. Actine en rouge, vinculine (adhésions focales) en vert (Sastry and Burridge, 2000).

Au cours de l'étalement des cellules sur un nouveau substrat, les structures d'actine et de vinculine se construisent ensemble en une boucle rétroactive (Bershadsky, 1995). Le réseau adhésions-fibres de stress s'établit par des mouvements de translation des adhésions et de mise bout à bout de petits complexes actine-adhésion (Zimmerman et al., 2004).

La fibre de stress est un **élément contractile** (Burridge Nature 81). Les **myosines** pontent les filaments entre eux et les font glisser les uns par rapport aux autres ce qui contracte l'ensemble de la fibre. Si on augmente pharmacologiquement l'activité des myosines, la fibre se contracte de façon non homogène sur toute sa longueur et les adhésions grossissent en se déplaçant de façon centrifuge. Les extrémités de la fibre où les myosines sont plus nombreuses se rétrécissent. Dans sa partie centrale les myosines et l' α -actinine (localisée sur les adhésions et sur la fibre) s'échangent plus rapidement avec le cytoplasme, l'espacement entre les zones riches en actinine et en myosine devient plus large et la fibre s'allonge (Peterson et al., 2004). L'inhomogénéité de la distribution des contraintes au sein d'une fibre et le mouvement centrifuge des adhésions sont prédictibles par des théories basées sur le frottement visqueux le long de la fibre et la diffusion des intégrines libres (Kruse and Julicher, 2000; Novak et al., 2004).

L'activité des myosines est sous le contrôle de **ROCK**, la Rho kinase, qui peut inhiber l'enzyme qui réduit l'activité des myosines, la phosphatase des myosines (Ridley and Hall, 1992). L'inhibition de ROCK fait disparaître la contractilité et réduit fortement le diamètre des fibres de stress, alors que son activation l'augmente (Katoh et al., 2001; Etienne-Manneville and Hall, 2002). Une tension externe stimule ROCK et l'activité des myosines, ce qui a pour effet d'augmenter la contractilité des fibres de stress et la taille des adhésions focales (Sastry and Burridge, 2000). Il existe donc une **rétroaction positive** entre la tension externe et la contraction des fibres de stress qui dépend donc de Rho.

En permanence, la cellule palpe son environnement (Dunn et al., 1997; Giannone et al., 2004) : En fonction de la rigidité rencontrée la cellule se contracte ou se détend. Par ce mécanisme, la cellule adapte sa rigidité à celle de son environnement (Wang et al., 1993; Wang and Ingber, 1994; Zhelev and Hochmuth, 1995; Brown et al., 1998). **Sur une boîte de Pétri, la cellule est donc dans son état de contractilité maximal.** Ces conditions sont donc très particulières et ont certainement des conséquences importantes sur la dépense énergétique de la cellule. Au sein des tissus la rigidité est bien moindre que sur une boîte en plastique, les adhésions sont donc moins grosses, les fibres de stress moins proéminentes et la forme des cellules plus dendritique (Grinnell, 2003). **Cette contractilité en culture amplifie le niveau d'activation de Rho ce qui augmente le rythme de division des cellules** (Rosenfeldt and Grinnell, 2000; Graf et al., 2002). Les tumeurs sont des amas cellulaires très durs. Cette rigidité va de pair avec l'élévation de la quantité d'adhésion. La rétroaction positive entre adhésion, contractilité et croissance a certainement facilité l'obtention des premières cellules en culture, celles d'Henrietta Lacks (photo), à l'Hopital John Hopkins en 1951, car leur capacité à coller leur a permis de s'accrocher au verre des tubes à essais (voir le film *La fabuleuse histoire d'Henrietta Lacks*). En plus des facteurs de croissance présents dans le milieu de culture, l'adhésion et la contraction stimulent la division et conditionnent la survie des cellules qui autrement entreraient en apoptose. Ce mécanisme contribue certainement à la croissance des tumeurs car leur rigidité amplifie la fréquence des division des cellules saines environnantes (Paszek et al., 2005). La stimulation inopinée de la division de cellules autour d'une cellule anormalement sur-contractée pourrait même participer à l'apparition des tumeurs.



Protrusions membranaires, lamellipodia

Une protrusion est produite par la polymérisation des monomères d'actine en un réseau branché, le bout "-" étant fixe sur le substrat ou l'adhésion et le bout "+" en train de recevoir de nouveaux monomères et de déformer la membrane (Theriot, 2000). La polymérisation de l'actine en un réseau branché pousse et déforme la membrane. Ceci donne lieu soit à des protrusions filiformes (filopodes) soit à des feuillettes ou volants nommés « *ruffles* ».

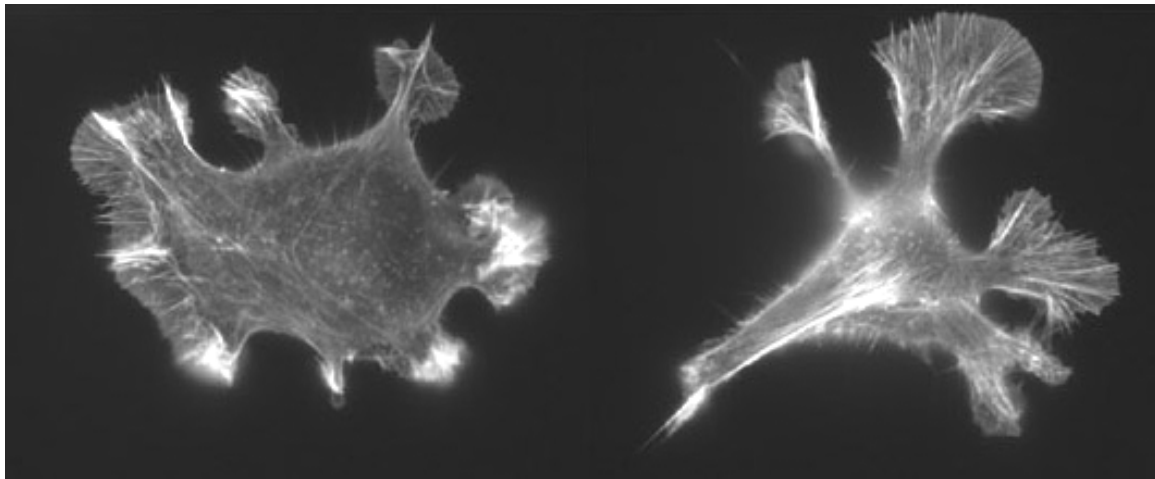


Figure 2.11 Fibroblastes de souris, L929, formant de nombreuses « ruffles ».

La formation de ces protrusions est gouvernée par l'activation de la GTPase **Rac** (Ridley et al., 1992). **La localisation des protrusions est associée à celle des adhésions.** En effet, il existe un lien moléculaire direct entre la vinculine (adhésion focale) et Arp2/3 qui pontent les filaments d'actine au niveau des branchements du réseau et stimule sa croissance (DeMali et al., 2002; DeMali and Burridge, 2003). De plus, les adhésions naissantes activent Rac et donc stimule la croissance des protrusions (DeMali and Burridge, 2003). Une boucle de rétroaction locale semble, là aussi, impliquée car même lorsque Rac est activé partout il ne peut lier ses effecteurs qu'au niveau des intégrines (del Pozo et al., 2002). Cette association adhésion-protrusion est également argumentée dans la discussion de Parker et ses collègues après leur observation des protrusions dans les angles des cellules carrées (Parker et al., 2002). Ils y décrivent également qu'il faut envisager un couplage entre protrusion et tension puisque si la contractilité est inhibée la migration disparaît (Bourguignon et al., 1999; Itoh et al., 1999; Kishi et al., 2000) bien que Rac soit amplifié (Moorman et al., 1999; Rottner et al., 1999; Cox et al., 2001).

L'activation de Src par les adhésions engendre aussi directement la polymérisation de l'actine et la formation de protrusions (Angers-Loustau et al., 2004). En effet la **cortactine**, qui est impliquée dans la formation des protrusions, est un des substrats de Src (Weed and Parsons, 2001; Daly, 2004). De manière plus générale, la cortactine est impliquée dans le remodelage du cytosquelette une fois activée par Src (Figure 2.12) (Lua and Low, 2005).

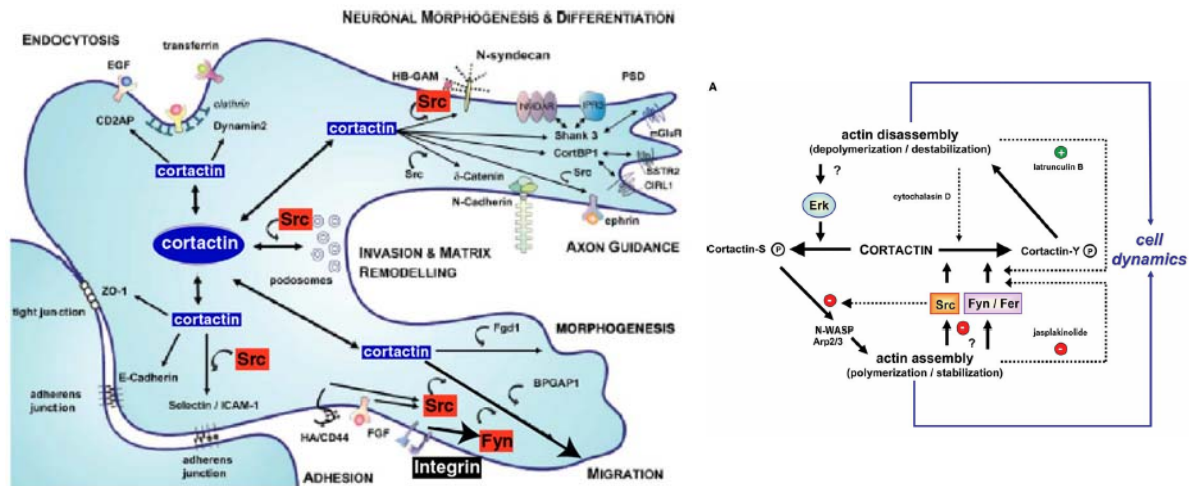


Figure 2.12 La cortactine est impliquée dans le remodelage de l'actine et la formation de protrusions membranaire. Son activité est régulée par les tyrosines kinases de la famille Src (Lua and Low, 2005).

La cortactine active Arp2/3 et WASP (qui est un régulateur d'Arp2/3) (Kowalski et al., 2005). Par ailleurs, elle restreint la localisation spatiale de WASP. Sans cortactine, beaucoup de protrusions apparaissent mais sans aucune restriction spatiale. Ceci suggère que la cortactine est impliquée dans la polarisation de la cellule par le contrôle qu'elle effectue de l'extension de l'activation d'Arp2/3 par WASP et de la stabilisation de l'actine (Kempiak et al., 2005). Cela explique le rôle critique de la cortactine dans la persistance du lamellipode (Bryce et al., 2005).

La contraction des fibres de stress est donc sous le contrôle de Rho et la polymérisation de l'actine dans les protrusions sous celui de Rac. L'exclusion mutuelle de ces deux RhoGTPases polarise la cellule.

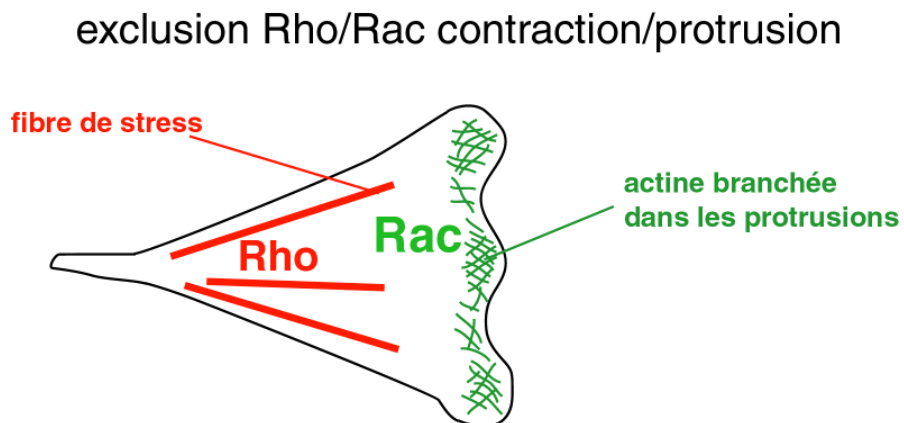


Figure 2.13 Polarité Rho/Rac et polarité contraction/protrusion

I-3 Cortex et Membrane plasmique

La membrane plasmique est une enveloppe de graisses qui sépare le milieu aqueux interne, le cytosol, du milieu aqueux externe. Cette membrane est un **double feuillet de phospholipides**. Elle comporte une centaine de lipides différents et des protéines transmembranaires. Ces composants ne sont pas tous miscibles et la composition de la membrane est proche de certaines **transitions de phase**, ce qui lui confère la possibilité s'organiser en domaines lipidiques à la moindre perturbation (Harder et al., 1998; Mukherjee and Maxfield, 2004). La courbure et la tension de ligne participent à la ségrégation spatiale des lipides (Baumgart et al., 2003). Des phases lipidiques, ou domaines, plus ou moins ordonnées, peuvent favoriser l'ancrage de protéines myristoylées ou plamitoylées comme certaines GTPases de la super famille Ras, ou certaines kinases de la famille Src et ainsi contrôler la localisation spatiale des voies de signalisation (Baird et al., 1999; Resh, 1999; Ritchie et al., 2003). Par exemple, les domaines riches en cholestérol qui s'accumulent près des adhésions recrutent la forme activée de Rac (del Pozo et al., 2004). D'autres protéines notamment celles de la famille ERM (ezrine-radixine-moesine) sont également ségréguées dans certains domaines lipidiques et leurs interactions avec les protéines du cytosquelette participent à l'organisation de la structure de l'actine corticale. Les micro-domaines lipidiques, ou rafts, contribuent donc directement à la polarisation de la cellule.

Membrane, protéines transmembranaires et corticales

Le lien entre l'actine et les glycoprotéines transmembranaires, types CD44, CD43, ou ICAM, se fait par les protéines de la famille **ERM, ezrine, radixine et moesine** (Tsukita et al., 1994; Yonemura et al., 1998; Bretscher et al., 2002). L'ancrage des ERM à la membrane nécessite certains lipides particuliers les phosphatidylinositol 4-5 biphosphate (PIP2) (Barret et al., 2000). PIP2 active les protéines ERM qui changent de conformation, s'insèrent dans la membrane et se lient à l'actine (Figure 2.14).

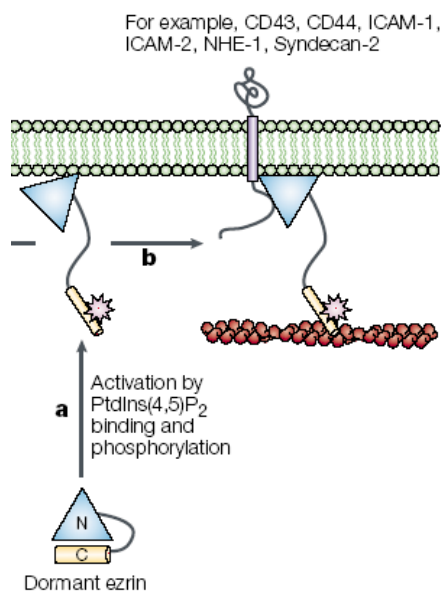


Figure 2.14
Activation de l'ezrine par PIP2 et connexion entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine. (Tsukita et al., 1994; Bretscher et al., 2002; Yonemura et al., 2002)

Une fois liées à la membrane, les ERM sont activés par la **Rho kinase** et lient l'actine (Hirao et al., 1996; Yonemura et al., 2002). Cette activation par Rho régule également leur association avec la vinculine (Kotani et al., 1997) et joue donc un rôle essentiel dans l'assemblage des adhésions focales et de l'actine (Gilmore and Burridge, 1996; Mackay et al., 1997; Ivetic and Ridley, 2004). **PIP2** apparaît donc comme un régulateur de l'énergie du lien entre l'actine corticale et la membrane plasmique (Raucher et al., 2000; Sheetz, 2001). D'autres protéines membranaires comme le cholestérol ou les glycosphingolipides régulent la fonction des intégrines (Pande, 2000). De plus, la régulation spatiale de l'activité des kinases de la famille Src (recrutement, phosphorylation) au cours de l'accrochage et de l'étalement des cellules dépend de la localisation de partenaires dans des rafts lipidiques (Shima et al., 2003). En effet, au cours de l'étalement, l'activation de l'**ezrine** sous la dépendance de Src a lieu avant l'activation des FAK et apparaît comme une des premières signalisations mises en place par l'adhésion (Srivastava et al., 2005). Par ailleurs, la polarisation de l'ezrine en un croissant cortical au stade 8 cellules est la première marque de la polarité au cours du développement de l'embryon de souris (Louvet et al., 1996).



Figure 2.14 La ségrégation de l'ezrine hors des zones de contact cellule-cellule lors de la compaction du stade 8 cellules est une des premières marques de la polarité de l'embryon de souris (Louvet et al., 1996).

La composition lipidique de la membrane joue donc un rôle direct sur les complexes transmembranaires (comme les adhésions décrites précédemment mais aussi des glycoprotéines) et la régulation de leur lien avec l'actine par les **RhoGTPases**.

Membrane et polarité

Les interactions entre les glycoprotéines membranaires et l'actine via les RhoGTPases contribuent à l'établissement de la **polarité corticale**. Par exemple, CD44 se localise sur la membrane apico-basale de MDCK en épithélium et y stabilise l'actine (Oliferenko et al., 1999). Plus généralement, l'interaction de CD44 avec l'acide hyaluronique présent dans la matrice extra-cellulaire provoque l'activation de Rac et la formation de lamellipodes (Oliferenko et al., 2000).

Les **lymphocytes T** se polarisent dans la direction de leur migration en créant un lamellipode à l'avant et un uropode à l'arrière. Cette polarité membranaire est révélée par la présence de rafts lipidiques contenant des gangliosides (un type particulier de sphingolipides) GM3 à l'avant et des GM1 à l'arrière (Gomez-Mouton et al., 2001). L'uropode des lymphocytes, riche en CD44, contient notamment des protéines de la famille **ERM**. La localisation de l'eitrine dans l'uropode dépend de sa phosphorylation en Thr567. Cette activation de l'eitrine sera utilisée comme marqueur de polarité dans les analyses de cellules contraintes sur micro-patterns adhésifs. Y27632, un composé synthétique qui inhibe la Rho kinase, défait l'uropode mais pas le cap de CD44 (Lee et al., 2004). Ce résultat pourra être utilisé pour interpréter certaines des observations sur les effets de Y27632 au cours des divisions.

Chez les **neutrophiles** le cytosquelette d'actine corticale participe à la ségrégation de CD16 à l'avant et CD44 et GM1 à l'arrière (Seveau, 2001). De même les gangliosides GM1 se localisent à l'arrière des cellules endothéliales en migration (Vasanji et al., 2004). Par contre les GM1 ont été observés à l'avant d'adénocarcinome humain MCF-7 (Manes et al., 1999).

En plus d'être ainsi le siège d'une polarité biochimique, la membrane plasmique est **polarisée mécaniquement** (Ghosh et al., 2002). Les coefficients de diffusion de certains lipides (mesurés par FRAP) ne sont pas identiques dans toute la membrane. Cette résistance au mouvement dans la membrane, appelée microviscosité, participe à la stabilisation locale de certaines protéines. La membrane est fluide partout et un peu plus visqueuse à l'avant (Vasanji et al., 2004). Le cholestérol augmente la viscosité de la membrane plasmique. Cette augmentation vers une valeur optimale favorise la formation de protrusions larges (lamellipode) à l'avant par rapport à des protrusions plus fines (filopodes) ailleurs et dirige ainsi la polarisation du mouvement. Cette polarisation peut être réduite voire même inversée par le retrait du cholestérol de la membrane avec la **cyclodextrine**.

Les protéines corticales les plus étudiées pour leur rôle dans la **polarité** sont les **protéines PAR**. Elles furent initialement identifiées dans l'œuf de *Caenorhabditis elegans* où elles se distribuent asymétriquement au cours des premières divisions (cf chapitre3). Elles se distribuent également asymétriquement dans les cellules épithéliales des organes en développement de *C. elegans* (Leung et al., 1999). PAR3 est apical et exclu des contacts cellule-cellule, alors que PAR2 est basolatéral. Sans les protéines PAR les cellules de *Caenorhabditis elegans* au stade 4 cellules ont des défauts de polarité, de contact cellule-cellule et d'asymétrie apico-basale ((Nance et al., 2003) et références). L'homologue de Par1 chez les mammifères organise aussi la polarité des MDCK en épithélium et l'organisation des microtubules (Cohen et al., 2004). L'homologue de Par6 lie Par3 et aPKC avec Cdc42 un acteur majeur de la polarité cellulaire (Joberty et al., 2000). Le complexe Par3/Par6 est donc impliqué dans la polarité par l'intermédiaire de la signalisation par Cdc42/Rac1 et aPKC (Lin et al., 2000). Les protéines PAR affectent la polarité interne en modulant l'activité des **protéines G** qui à leur tour contrôlent la dynamique des microtubules (Labbe et al., 2003).

I-4 Microtubules

Polymérisation polarisée

Les sous-unités de tubuline sont formées d'hétérodimères de tubuline- α et de tubuline- β . Elles sont donc polarisées. Les sous-unités se lient entre elles pour former d'abord un polymère linéaire, le protofilament. Les microtubules sont l'association cylindrique de 13 protofilaments. Les probabilités d'association et de dissociation d'un dimère sont différentes sur l'extrémité α et l'extrémité β , en raison de l'hydrolyse du GTP lié à la tubuline β . Chaque microtubule comporte donc un bout « + » qui croît plus vite que le bout « - » car la probabilité d'association par rapport à celle de dissociation y est plus importante. Les périodes de croissance lentes sont interrompues par des périodes de dépolymérisation rapides nommées catastrophes.

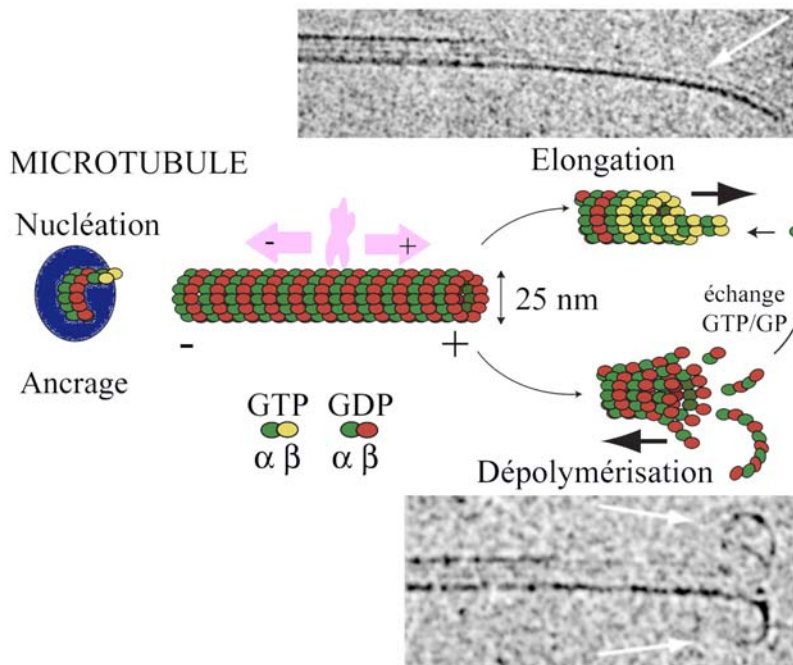


Figure 2.15

Croissance des microtubules. L'association de tubuline GTP est favorisée au bout « + ». La vitesse de dépolymérisation est très rapide par rapport à la polymérisation. Le bout « - » est stabilisé par le complexe d'ancre au centrosome.

La fréquence des catastrophes diffère à chaque extrémité du microtubule. Ce processus de croissance lente ponctuée de dépolymérisations rapides est appelé **instabilité dynamique**. Cette instabilité confère à ce réseau une grande adaptabilité en réponse à la variabilité des conditions géométriques dans lesquelles il se développe et lui permet de sonder efficacement l'espace intracellulaire (Holy and Leibler, 1994).

Les taux de croissance et fréquences de catastrophe dans la cellule sont sous le contrôle de protéines associées spécifiquement aux bouts « + » ou « - ». Ces protéines de bouts « + » ou « - » sont très étudiées aujourd'hui car elles régulent la dynamique du réseau de microtubules (Desai and Mitchison, 1997). Les protéines de **bouts** « + » forment un manchon autour du microtubule permettant de recruter d'autres protéines participant à la croissance du microtubule, de limiter la probabilité d'apparition de catastrophes et de s'accrocher avec d'autres protéines associées à l'actine ou à la membrane plasmique (Akhmanova and Hoogenraad, 2005).

Ces stabilisation/déstabilisation sont influencées par la présence de la paroi cellulaire. Les microtubules s'assemblent régulièrement jusqu'à la membrane où ils rentrent dans une alternance de phase de croissance et de dépolymérisation (Komarova et al., 2002). Cette instabilité de croissance des microtubules n'a pas la même dynamique dans toutes les régions de la cellule. Certaines protéines vont ainsi stabiliser des microtubules à des endroits particuliers comme le bord avant d'une cellule en migration (Cook et al., 1998; Palazzo et al., 2001a; Palazzo et al., 2004). **Le réseau entier est donc lui-même polarisé en zones dynamiques et en zones plus stables.** Ces différences de stabilité sont révélées par des modifications covalente des monomères de tubuline constituant le microtubule. La tubuline α ou β peut être modifiée par des enzymes une fois assemblée en microtubule. Sur la tubuline α par exemple le dernier acide aminé est une tyrosine. Un microtubule jeune est riche en tubuline tyrosinée. La tubuline peut-être détyrosinée et le dernier acide aminé est alors un acide glutamique, signe que le microtubule a été stabilisé. Ce processus de modification sélective de la tubuline participe à la polarisation du réseau de microtubules et à celle de la cellule (Bulinski and Gundersen, 1991; Gundersen and Cook, 1999). D'autres modifications post-traductionnelles de la tubuline participent à la régulation de signaux, à la sélectivité du transport intra-cellulaire, et à la polarisation du réseau de microtubules (Westermann NatRevMolCelBiol 03).

Le centrosome, un centre organisateur du réseau de microtubules

Les microtubules poussent à partir d'un complexe nucléateur, le γ -TURC. Généralement, les nucléateurs sont associés au sein d'un complexe multi-protéique, le centrosome. Le centrosome des cellules de mammifères est constitué de deux centrioles entourés d'une matrice péricentriolaire dans laquelle les microtubules sont nucléés puis ancrés ou relâchés (Bornens, 2002).

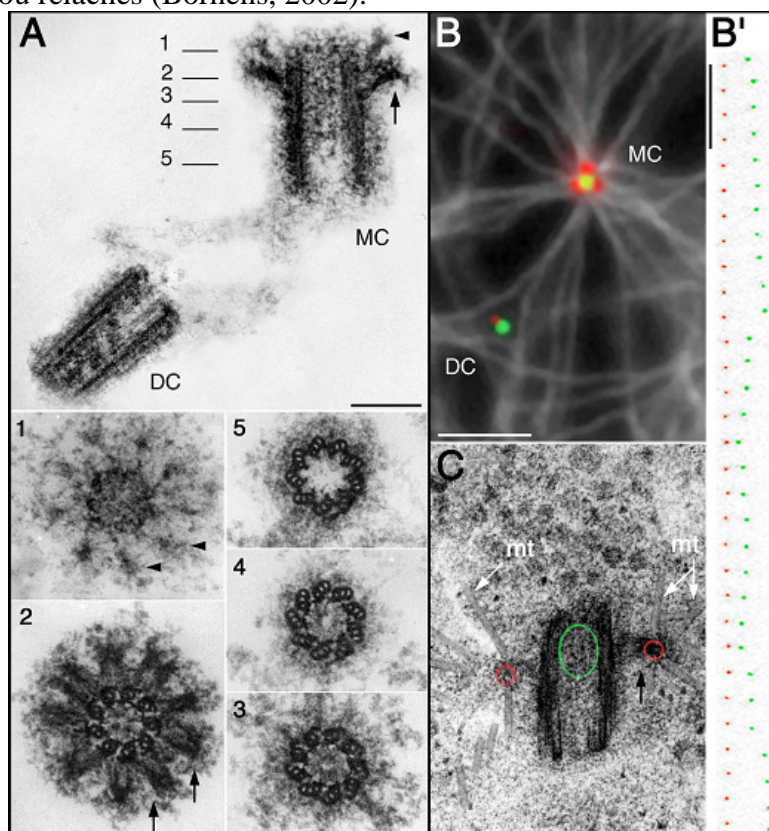


Figure 2.16

Le centrosome est constitué de deux centrioles. Le père et le fils car l'un a été fabriqué à partir de l'autre. Ils sont reliés par une matrice filamenteuse extensible.

Centrosome en microscopie électronique (A et C).

Les images 1 à 5 correspondent au plan indiqué en A. Les centrioles sont des assemblages de 9 triplets de microtubules.

Le centriole père est au centre de l'aster de microtubules (B). Ces appendices sub-distaux comporte de la ninéine (rouge) nécessaire à l'ancrage des microtubules (C). Le centriole fils n'ancrage pas les microtubules, il les relargue. Les deux contiennent de la centrine (vert).

Montage extrait de la thèse de Matthieu Piel, Institut Curie. (Paintrand et al. J Struct Biol 1992)

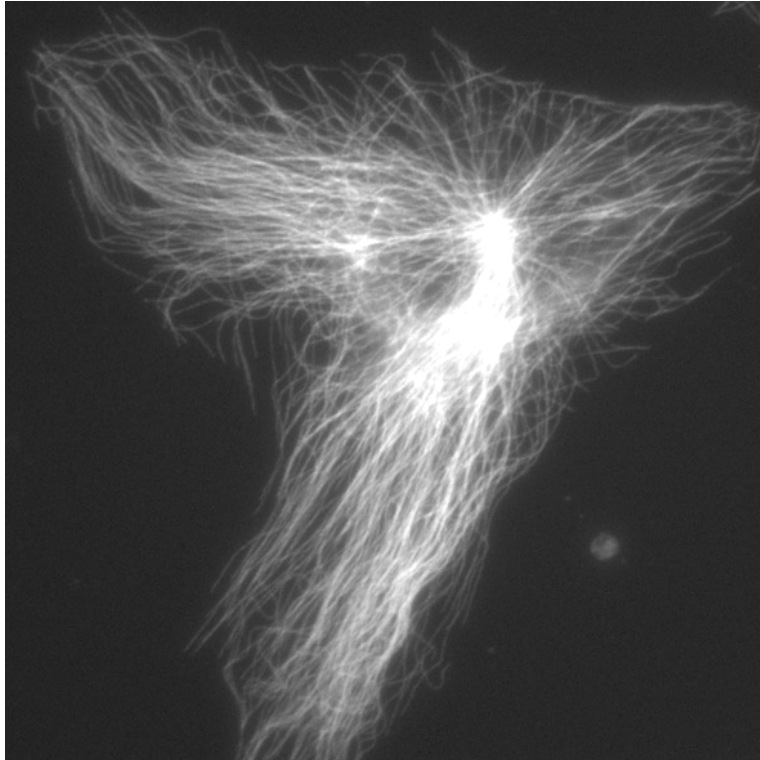


Figure 2.17
Marquage des microtubules d'une cellule RPE1.

Le réseau est organisé autour d'un centre où sont localisés les bouts « - », les bouts « + » sont près de la périphérie.

Le réseau de microtubules est la seule structure centralisée qui remplit tout l'espace intracellulaire. Les microtubules sont des routes pour les moteurs moléculaires. Cette organisation spatiale des microtubules permet une collecte et une centralisation des informations dans toute la cellule. Le centrosome est ainsi le lieu d'intégration des signaux récoltés en périphérie et d'orchestration d'une réponse coordonnée, renvoyée à la périphérie.

Les protéines centrosomiales régulent la nucléation, l'ancrage et la relâche des microtubules (se référer aux thèses de Matthieu Piel, Nathalie Delgehyr et Aurélie Lebel au laboratoire, pour une description détaillée des protéines du centrosome et leur rôle dans la nucléation et l'ancrage de microtubules ainsi que les modes de fabrication des microtubules dans d'autres systèmes vivants). La conséquence morphologique de ce mécanisme de nucléation centralisée est la formation d'un **réseau en aster**, polarisé par les bout « - » accrochés au centrosome et les bouts « + » dirigés vers la périphérie (Figure 2.17). Tous les microtubules ne participent pas à cette structure radiale, certains ont été relâchés par le centrosome dans le cytoplasme (Figure 2.18).

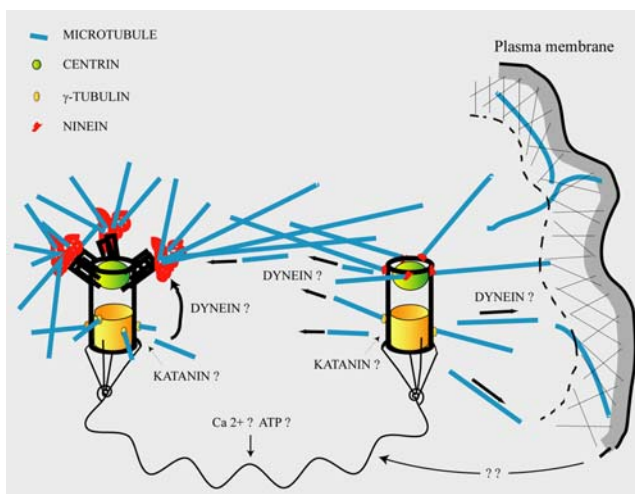


Figure 2.18 Les bras du centriole père contiennent de la ninéine (rouge) qui ancre les microtubules nucléés.

Le centriole fils nucléé largue les microtubules dans le cytoplasme, notamment dans le lamellipode.

Les deux centrioles sont reliés par un lien dont la contraction dépend du calcium.

(Piel et al., 2000)

Les microtubules sont des rails pour le transport intracellulaire. Des moteurs moléculaires s'activent le long de ce réseau en transportant des molécules ou des vésicules. Certains moteurs se dirigent vers les bouts « + » comme la plupart des kinésines, d'autres comme les dynéines, se dirigent vers les bouts « - ». L'association de ces déplacements orientés et de la structure en aster du réseau de microtubules permet une ségrégation de certaines protéines autour du centrosome et d'autres à la périphérie et donc l'organisation d'un tri.

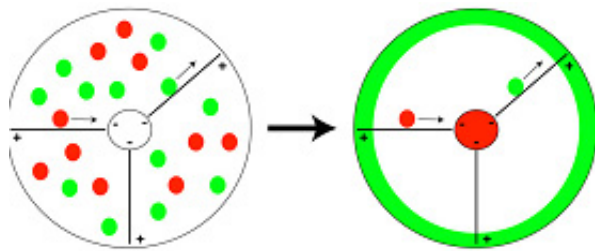


Figure 2.19 La polarité des microtubules et le fait que des moteurs se déplacent sélectivement vers les bouts «+» ou «-» permet de trier des protéines dans la cellule.

Thèse de Matthieu Piel, Institut Curie, 2001.

Cette fonction est indispensable au maintien de la polarité cellulaire (Omelchenko et al., 2002). De plus la capacité de collecter des informations de toute la périphérie cellulaire en un point central et de renvoyer une réponse en périphérie confère au centrosome un rôle majeur dans l'intégration des signaux et la coordination de la réponse cellulaire. L'instabilité dynamique des microtubules offre à ce "**système sensoriel et moteur**" une grande adaptabilité spatiale et un temps de réponse bien supérieur à ce que permettrait un système basé sur la simple diffusion des signaux dans le cytoplasme.

Les expériences réalisées au cours de ces travaux furent entreprises afin de comprendre la façon dont le système centrosome-microtubules était sensible à la morphologie et la composition chimique de la périphérie cellulaire.

Notre but était de révéler les lois de l'intégration des signaux périphériques, en observant son comportement en réponse à des manipulations contrôlées et reproductibles de la composition du cortex cellulaire.

Positionnement du centrosome et polarisation

Comme son nom l'indique, le centrosome se situe au centre du soma, **le centre du corps cellulaire**. Ce centre n'est pas toujours le centre géométrique, le barycentre de la périphérie cellulaire, mais ce type de définition du centre ne fait pas beaucoup de sens pour une cellule. Tant que le centrosome est l'organe organisateur des microtubules, il est au centre de la cellule car sa nature même en fait le centre fonctionnel de la cellule.

Ce positionnement dépend des microtubules (Euteneuer and Schliwa, 1992). La position du centrosome est définie par les interactions que les microtubules ont avec les organites présents dans le cytoplasme et avec les parois délimitant ce cytoplasme, c'est à dire le noyau et la membrane plasmique. Cet espace de déploiement des microtubules n'étant pas topologiquement convexe (car il possède un trou, le noyau) son centre n'est pas simple à déterminer.

Le positionnement du centrosome au centre de la cellule est finement contrôlé dans les cellules. Ce centrage est assuré aussi bien dans des cellules qui migrent (Euteneuer and Schliwa, 1992; Gomes et al., 2005) que dans celles qui ne migrent pas (Burakov et al., 2003). Il nécessite la consommation d'énergie (hydrolyse d'ATP) et le travail de moteurs moléculaires. Bien que les microtubules puissent être mis sous pression simplement par leur polymérisation contre la membrane, ce qui suffit à centrer un aster *in vitro* (Faivre-Moskalenko and Dogterom, 2002) ou dans une levure (Tran et al., 2001), ou par leur interaction avec le flux rétrograde de l'actine en contraction (Salmon et al., 2002), ce sont surtout les **tensions** dans les microtubules qui semblent être les composantes principales du centrage du centrosome (Burakov et al., 2003) (Figure 2.19).



Figure 2.20

Au cours de leur étude du positionnement du centrosome en interphase, Burakov et ses collègues ont dépolymérisé localement le réseau de microtubules et mesuré les déplacements du centrosome avec et sans l'action de certains moteurs moléculaires. Il s'est avéré que le centrage dépendait des dynéines car le centrosome perdait sa capacité de centrage si elles étaient inactivées.

Marquages des microtubules dans des cellules contrôle et des cellules injecté avec un anticorps (74.1) bloquant l'activité des dynéines. (Burakov et al., 2003)

Les dynéines sont des moteurs qui se dirigent vers les bouts « - » des microtubules. Si elles sont accrochées à un substrat elles peuvent tirer sur les microtubules et sur le centrosome. Mais, si on inhibe les dynéines, qui peut encore déplacer le centrosome ?

En dépolymérisant localement les microtubules, le centrosome se déplace vers cette zone sauf si la contractilité acto-myosique est inhibée, ce qui démontre le rôle de cette contractilité dans le positionnement du centrosome. En effet, l'inhibition de la contractilité cellulaire induit un déséquilibre du positionnement du centrosome qui se promène alors le long de la membrane plasmique (Chevrier et al., 2002). Myosines et dynéines produisent donc des forces antagonistes sur les microtubules (Figure 2.20) (Yvon et al., 2001).

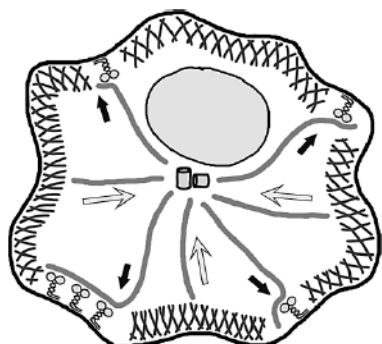


Figure 2.20
Modèle récapitulatif des forces agissant sur le positionnement du centrosome. Les dynéines et les myosines produisent des forces antagonistes (Burakov et al., 2003).

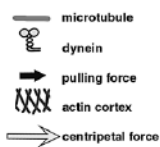
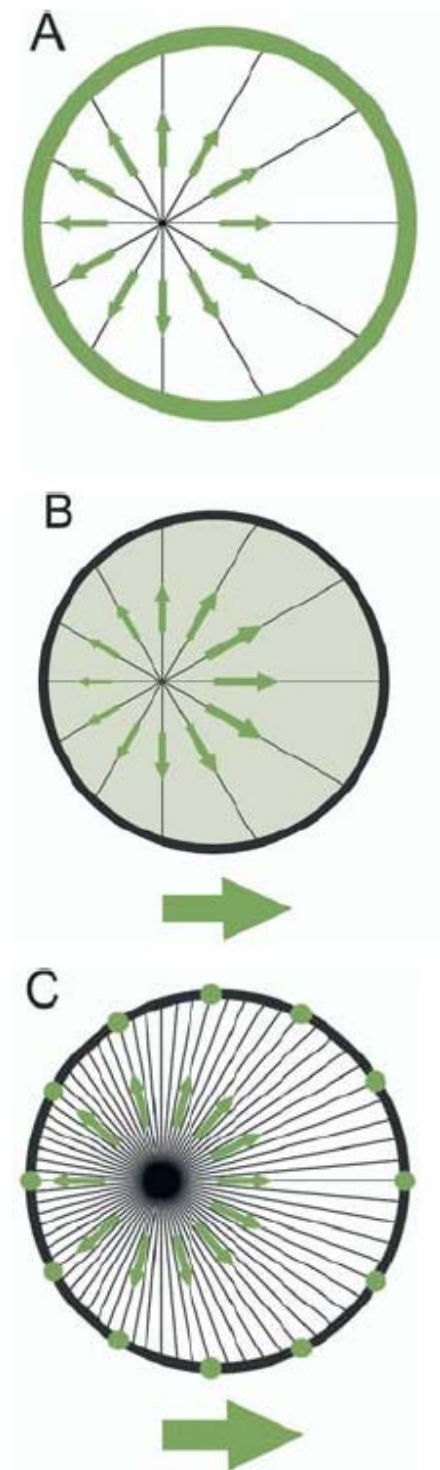


Figure 5. Forces involved in the positioning of the centrosome.

La nature des forces produites par les myosines sur le réseau de microtubules n'a pas été clairement déterminée. Les myosines ne lient pas directement les microtubules. La contraction du réseau d'actine corticale peut influencer les microtubules par l'intermédiaire de connecteurs. La contractilité acto-myosique pourrait, par exemple, avoir un rôle dans la séparation et le positionnement des centrosomes au moment de la formation du fuseau mitotique (Rosenblatt et al., 2004).

Le centrage par traction dépend de l'activité et de la position des dynéines (Vallee and Stehman, 2005). Cette revue propose un inventaire exhaustif des études qui montre que les dynéines participent à la tension dans les microtubules et au centrage du centrosome. On y trouve, néanmoins, des propos contradictoires : les dynéines, positionnées sur toute la périphérie cellulaire, tirent sur les microtubules et mettent systématiquement le centrosome au centre de la cellule, même pendant la migration, alors que dans ce cas elles ne sont localisées que sur le bord avant de la cellule. L'auteur favorise un modèle selon lequel les dynéines, disposées tout le long des microtubules, produiraient une tension proportionnelle à la longueur du microtubule. En effet, si la cellule est ronde et que la distribution de moteurs au cortex est homogène, il faut que la force due aux dynéines soit proportionnelle à la longueur pour que le centre soit la seule position d'équilibre stable. Si le réseau en astère est isotrope et que les dynéines sont uniquement à la périphérie toutes les positions sont équivalentes (Figure 2.21). Une conclusion intéressante de cette revue est que les positions du noyau et des lamellipodes

jouent un rôle critique dans le mécanisme de centrage. Une autre est que le cortex ne doit pas être vu comme une condition limite homogène mais hétérogène.



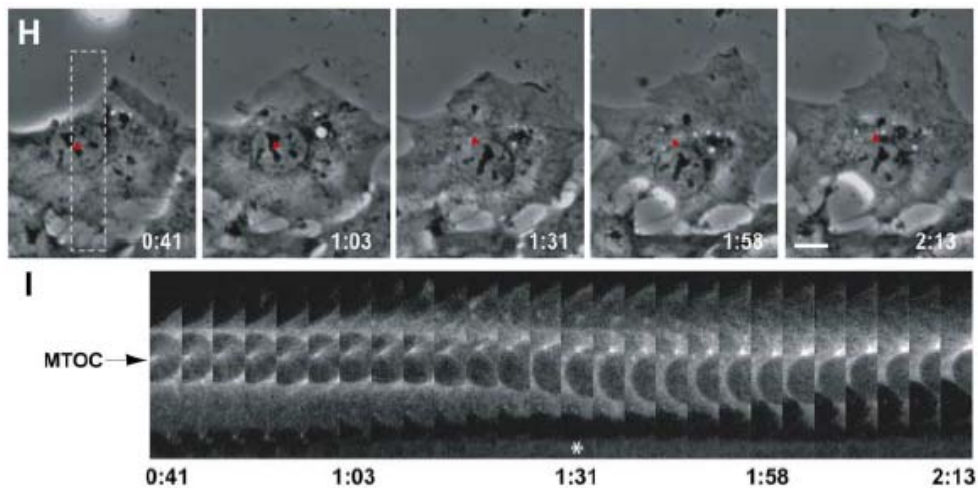
Si les microtubules sont nucléés de façon isotrope et s'ils sont tous mis sous tension une fois en contact avec le cortex alors toutes positions du centrosome dans la cellule sont des positions d'équilibre.

Si par contre, comme le propose Richard Vallee, la tension est proportionnelle à la longueur du microtubule (car il est couvert de dynéines) alors seule la position centrale est une position d'équilibre.

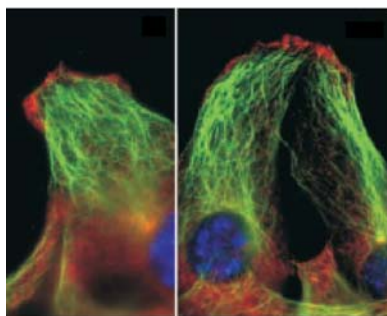
Une hypothèse alternative qui pourrait bien être la plus probable est que le nombre de moteurs sur le cortex est limitant. Auquel cas tous les microtubules en contact avec la périphérie cellulaire ne sont pas mis sous tension. Un secteur angulaire donné contient plus de moteurs si la paroi est loin que si elle est proche ce qui déplace le centrosome vers la paroi éloignée. Seule la position centrale est une position d'équilibre.

Figure 2.21 Centrage du centrosome dans un cortex homogène (Grill and Hyman, 2005).

L'effet de la position du noyau et des lamellipodes peut être révélé dans une expérience classique de brisure de symétrie : le « wound healing » ou réparation de blessure. C'est une façon simple de briser l'homogénéité corticale des cellules en culture. Cela consiste à cultiver des cellules jusqu'à la confluence puis de faire une blessure dans ce pseudo-tissu en tirant un trait avec une aiguille sur le fond de la boîte. Les cellules au bord de la blessure vont avoir une partie de leur périphérie qui sera alors libérée de ses contacts avec les autres cellules. Cette brisure de symétrie va être répercutée dans toute l'organisation interne de la cellule qui va se polariser et migrer vers la zone ouverte par la blessure (Etienne-Manneville and Hall, 2001). Cette polarisation, puis cette migration, se déroule en plusieurs étapes : en premier lieu la cellule procède à une réorganisation spatiale des adhésions et des signaux qu'elles génèrent puis à celle de certaines protéines associées à l'actine corticale et enfin à la « réorientation » du centrosome et de l'appareil de Golgi devant le noyau, vers la zone blessée (Etienne-Manneville and Hall, 2003). La transmission de la polarisation du système actine au positionnement du centrosome se fait par les dynéines (Palazzo et al., 2001b).



Après la libération de l'espace au dessus de la cellule, la cellule oriente son lamellipode vers le haut, le complexe noyau-centrosome s'oriente vers le haut. Ce n'est pas le centrosome qui migre vers l'avant mais au contraire il reste en place et le noyau recule (Gomes et al., 2005).



marquage des dynéines (rouge à gauche) et de la dynactine (rouge à droite) et des microtubules (en vert) de cellules migrant vers le haut après une blessure. Dujardin JCB 2003.

ceci suggère que dans les expériences de Gomes et ses collègues les dynéines sont distribuées de la façon suivante :

état **non polarisé**,
distribution **homogène** de dynéines
position **centrale** du centrosome

état **polarisé**,
distribution **asymétrique** de dynéines
position **centrale** du centrosome



Figure 2.22 Centrage du centrosome alors que le cortex n'est pas homogène.

Néanmoins, il existe un paradoxe à ce sujet : d'un côté on considère que la blessure induit une concentration de dynéines dans le bord avant (Dujardin et al., 2003), ce qui va bien avec le concept de génération d'une force anisotrope qui participe à la « réorientation » du centrosome, mais de l'autre on constate que le centrosome n'est pas déplacé vers l'avant mais, au contraire, qu'il reste au centre (Gomes et al., 2005).

En effet, la « réorientation » du centrosome est un changement d'orientation du complexe noyau-centrosome qui tourne, non pas autour du noyau, mais autour du centrosome. Gomes et ses collègues décrivent en détail la façon dont le centrosome reste au centre de la cellule pendant cette brisure de symétrie et ils suggèrent que les dynéines soient nécessaires pour maintenir cette position centrale. Mais comment une distribution asymétrique de moteurs tirant sur le centrosome peut-elle induire une position centrale ? Les deux expériences ont été réalisées de façon convaincante et les deux observations sont certainement correctes. Ceci montre que l'asymétrie du cortex, qui est interprétée comme un élément polarisant du système centrosome-microtubules, n'induit pas de position asymétrique du centrosome. Cet effet est à nos yeux bien plus intéressant que celui escompté : le centrosome n'est pas pas déporté par l'asymétrie corticale, au contraire, il est capable de l'accommoder et de garder une position centrale dans un cortex asymétrique.

Cependant, cette supposition est basée sur la comparaison de plusieurs études et le positionnement du centrosome n'a pas été étudié finement dans chacun des cas. C'est ce que nous nous proposerons de faire dans l'article intitulé « *Adhesive control of cell polarity* », dans lequel la polarité des cellules n'est pas induite par une blessure dans une monocouche de cellule mais par la géométrie du micro-patron adhésif.

D'une manière générale, la migration cellulaire est souvent utilisée comme un système expérimental pour l'étude de la régulation spatiale de l'activité enzymatique qui installe et maintient la polarité cellulaire (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Ridley, 2001). En effet, une cellule en cours de déplacement doit se définir un pôle avant et un pôle arrière. Elle doit également organiser son architecture mécanique dans l'espace ainsi que l'activation des enzymes qui en assurera la dynamique et le maintien de la polarisation. De fait, la migration est l'une des rares manifestation de la stabilité de l'orientation de la polarité des cellules en culture. **Les micro-patrons adhésifs permettent d'étudier la polarité autrement qu'au cours de la migration, c'est à dire la polarité d'un tissu normal, guidée par la distribution des adhésions.**

C'est l'objet de l'article publiée dans les rapports de la conférence **microTAS** à Boston en octobre 2005 qui est joint en **annexe 1**.

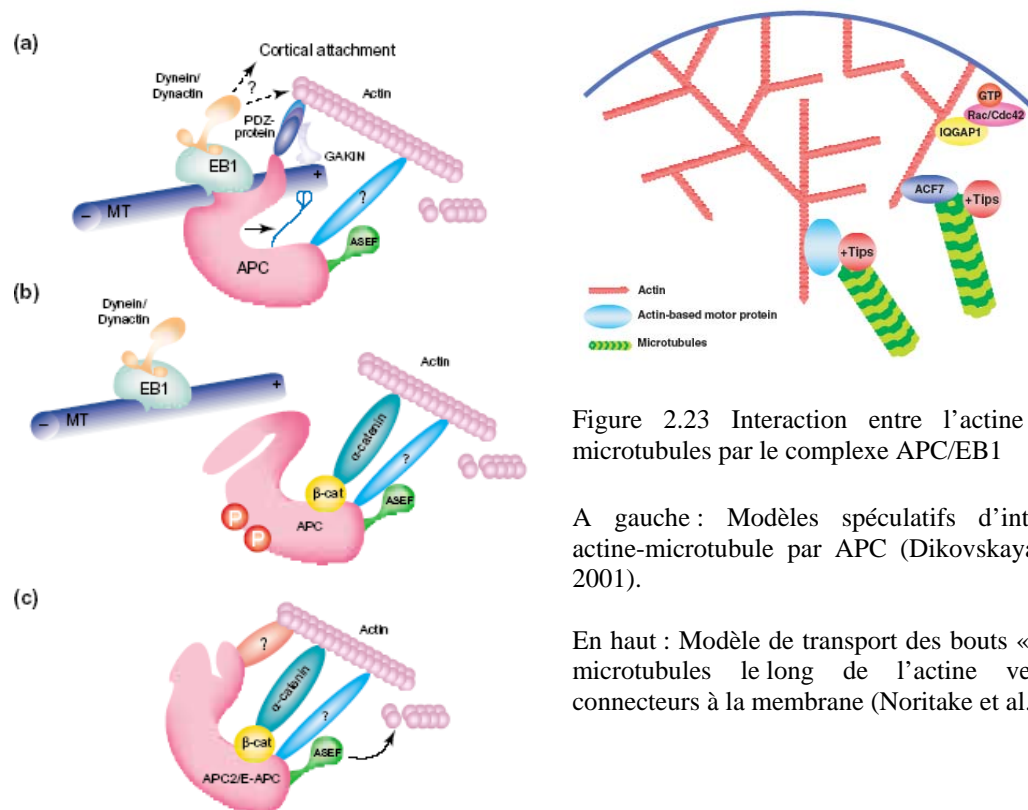
I-5 Interaction actine-microtubules

Comment le réseau de microtubules et celui d'actine peuvent ils se transmettre des informations ? Les monomères d'actine et de tubuline ne peuvent pas former de liaison directe. Nous avons vu que leur dynamiques d'assemblage étaient inter-dépendantes car les deux réseaux sont impliqués dans des boucles d'interactions avec les RhoGTPases (Rodriguez et al., 2003; Etienne-Manneville, 2004a). Par ailleurs plusieurs protéines sont capables de s'attacher aux deux réseaux. Ces **connecteurs** peuvent s'associer plus particulièrement à certaines formes du réseau d'actine (fibres de stress ou protrusions) et à certaines partie des microtubules (bouts « + » et protéines associées, corps du microtubule).

Connecter les deux réseaux

Les protéines associées aux bouts « + » des microtubules et leurs partenaires au cortex permettent l'accrochage et la stabilisation des microtubules (Akhmanova and Hoogenraad, 2005). En influant sur la composition du manchon stabilisateur au bout « + », certaines protéines régulent la stabilité des microtubules. Cette propriété participe à la polarisation des cellules (Gundersen, 2002). Voici un court inventaire des principales protéines impliquées dans la connexion des deux réseaux dans les cellules de mammifères.

APC, pour adenomatous polyposis coli, est clairement impliqué dans ce type d'interaction actine-microtubule (Dikovskaya et al., 2001). APC est recruté sur les zones actives de la membrane au cours de la migration cellulaire (Nathke et al., 1996). Il y stabilise les microtubules (Zumbrunn et al., 2001) grâce à son interaction avec EB1, une protéine associée au bout « + » des microtubules (Nakamura et al., 2001).



Par son interaction avec EB1, APC peut guider la formation du réseau de microtubules dans des MDCK polarisées en épithélium (Reilein and Nelson, 2005). Il a également été montré qu'APC et EB1 se liaient à mDia, une formine, au bord avant de la cellule en migration et que cela avait pour effet de stabiliser les microtubules et permettre la polarisation et la migration de la cellule (Wen et al., 2004).

IQGAP possède un domaine de liaison à l'actine (Briggs and Sacks, 2003) et à Clip170 (Fukata et al., 2002) qui se trouve au bout « + » des microtubules (Perez et al., 1999). Les localisations d'IQGAP et d'APC au bord avant sont inter-dépendantes. IQGAP capture, et APC stabilise les microtubules en réponse à une activation locale de Cdc42 et de Rac dans le bord avant des cellules (Watanabe et al., 2004; Noritake et al., 2005). En leur absence, les cellules ne parviennent pas à se polariser.

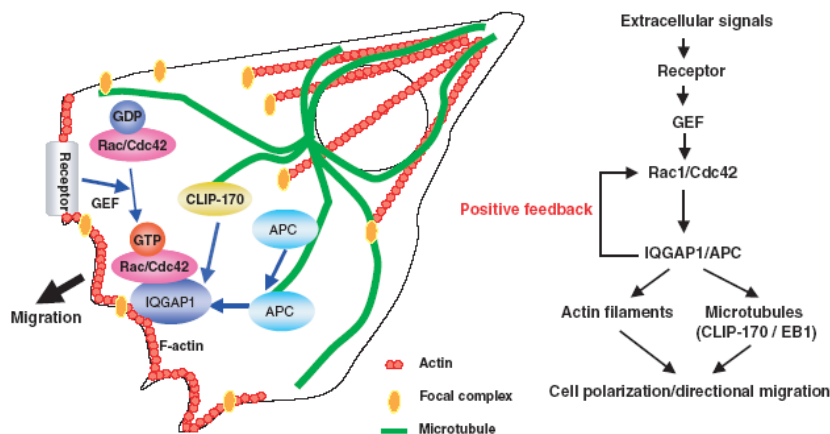


Figure 2.24
APC, Clip 170 et IQGAP sont associés pour interagir avec l'actine et les microtubules (Noritake et al., 2005).

Les **Clasp** lient Clip105 et Clip170 et participent à la régulation de la dynamique des microtubules (Akhmanova et al., 2001).

EB1 se lie également au complexe **dynactine/dynéine** (Berrueta et al., 1999). Ce complexe se lie à la β -cathénine, présente dans les jonctions adhérentes, et se lie aux microtubules (Ligon et al., 2001). Les dynéines, ancrées dans le cortex, tirent sur les microtubules en essayant de se diriger vers les bouts « - » (Vallee and Stehman, 2005). Les complexes β -cathénine-dynéine-EB1 participent ainsi à la structuration du réseau de microtubules (Askham et al., 2002).

L'association entre l'actine et les microtubules par le complexe mDia-APC-EB1 est régulée par Rho et Src, l'association IQGAP-CLASP/APC-Clip170/Clip115, par Rac et Cdc42 (Gundersen et al., 2004).

Certaines molécules sont des **connecteurs qui lient directement et l'actine et les microtubules**. Dans ce cas, ils n'interagissent pas nécessairement avec les bouts « + » mais avec le corps du microtubule ce qui laisse supposer qu'ils affectent plus la localisation et la direction des microtubules que leur stabilité.

Certains moteurs, comme les **myosines V**, lient l'actine et les microtubules (Cao et al., 2004). On pourrait imaginer qu'un couple de deux moteurs, l'un lié à l'actine l'autre au microtubule, pourrait faire le pont entre les deux systèmes. Certaines vésicules couplées à ce type de moteurs pourraient également participer à leur interaction. Ce type d'interaction pourrait guider les microtubules le long des câbles d'actine (Goode et al., 2000).

Les **ERM** contiennent un domaine de liaison à l'actine et un autre aux microtubules (Goode et al., 2000).

ACF7, un membre de la famille des spectraplakines, est une protéine de bouts « + » qui lie les microtubules aux fibres de stress et les dirige vers le bord avant de cellule en migration (Kodama et al., 2003).

Les **formines** sont une famille de protéines qui possèdent un domaine FH1, qui lie l'actine, et un domaine FH2, qui lie les microtubules. Les protéines mDia sont des formines. Elles sont à la fois des effecteurs des RhoGTPases (Waller and Alberts, 2003) et un lien moléculaire entre l'activité de Rho et celle de Src (Tominaga et al., 2000). Ces caractéristiques en font des **acteurs potentiels majeurs de la coordination des microtubules et de l'actine**. La sur-expression de mDia1 provoque l'alignement des microtubules avec les fibres de stress et l'allongement des cellules (Ishizaki et al., 2001; Pruyne et al., 2002). Les interactions de mDia avec l'actine, les microtubules et les RhoGTPases lui permettent de diriger la formation et de stabiliser les Mts (Palazzo et al., 2001a).

Par ailleurs le réseau de **filaments intermédiaires** contient des plakines qui pourraient connecter les trois réseaux ensemble mais cela n'a pas encore été démontré (Leung et al., 2002).

Localisation de l'interaction ; les adhésions, des sites privilégiés

Les microtubules se déploient majoritairement vers les zones où la tension est localement plus élevée (Kaverina et al., 2002). Par exemple, ils se dirigent préférentiellement vers le bord avant d'une cellule polarisée en migration (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Waterman-Storer and Salmon, 1999). Leur transport vers ces zones de protrusions membranaire dépend de la contractilité. Le turn-over des microtubules est deux fois plus important près du bord avant qu'ailleurs. Il semblerait que les microtubules soient dirigés, le long des fibres de stress, vers les adhésions focales (Kaverina et al., 1998; Krylyshkina et al., 2003). Des contacts répétés des microtubules induisent la relaxation et le désassemblage des adhésions (Kaverina et al., 1999). Il semble donc qu'actine et microtubules se rencontrent au niveau des adhésions où ils auraient des effets opposés : les fibres de stress d'actine sous tension effectuent une rétroaction positive sur les adhésions alors que les microtubules guidés vers les adhésions engagent une rétroaction négative (Etienne-Manneville, 2004a).

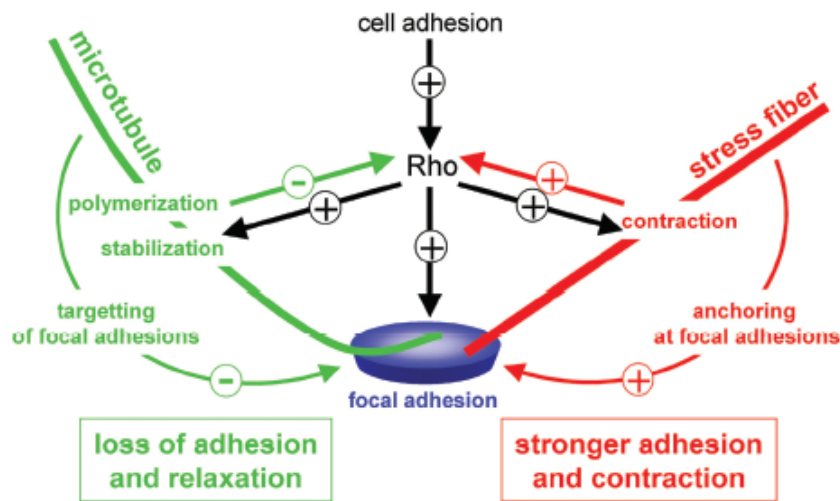


Figure 2.25

Les microtubules et les filaments d'actine sont en compétition au niveau des adhésions. Rho stimule la formation et la maturation des adhésions. La polymérisation des microtubules inhibe Rho et défait les adhésions. Les fibres de stress tirent sur les adhésions quand elles sont stimulées par Rho et font grossir les adhésions (Etienne-Manneville, 2004a).

C'est l'équilibre entre ces deux types de régulation, à différents endroits de la cellule, qui participe au contrôle de la migration et à la définition de la polarité cellulaire (Ridley, 2001; Small et al., 2002; Small and Kaverina, 2003). Cdc42 est impliqué dans cette équilibre.

Cdc42, le chef d'orchestre de la polarité

La GTPase Cdc42 semble être un transmetteur entre le signal reçu en surface et les effecteurs, ou en tous cas les activateurs des effecteurs. Une revue très complète décrit le rôle de Cdc42 dans l'établissement de la polarité (Etienne-Manneville, 2004b). Si les activités de contraction ou de relaxation/protrusion de la membrane, sous le contrôle de Rho et Rac, sont propres aux cellules sans paroi, cellules des organismes multi-cellulaire animaux, le rôle de Cdc42 semble, lui, conservé de la levure aux cellules de mammifères. De manière générale, Cdc42 est activé localement à la périphérie en réponse à un stimulus externe (contact cellule-cellule, cellule-substrat, liaison d'un récepteur avec son ligand, ..). Puis, la forme activée de Cdc42 va stimuler localement des effecteurs comme WASP, qui participe à la formation d'actine branchée, ou IQGAP, qui accroche les microtubules. Cdc42 est donc un médiateur entre le signal et la réponse qui permet le contrôle spatio-temporel de la polarisation de la cellule en réponse à un stimulus externe.

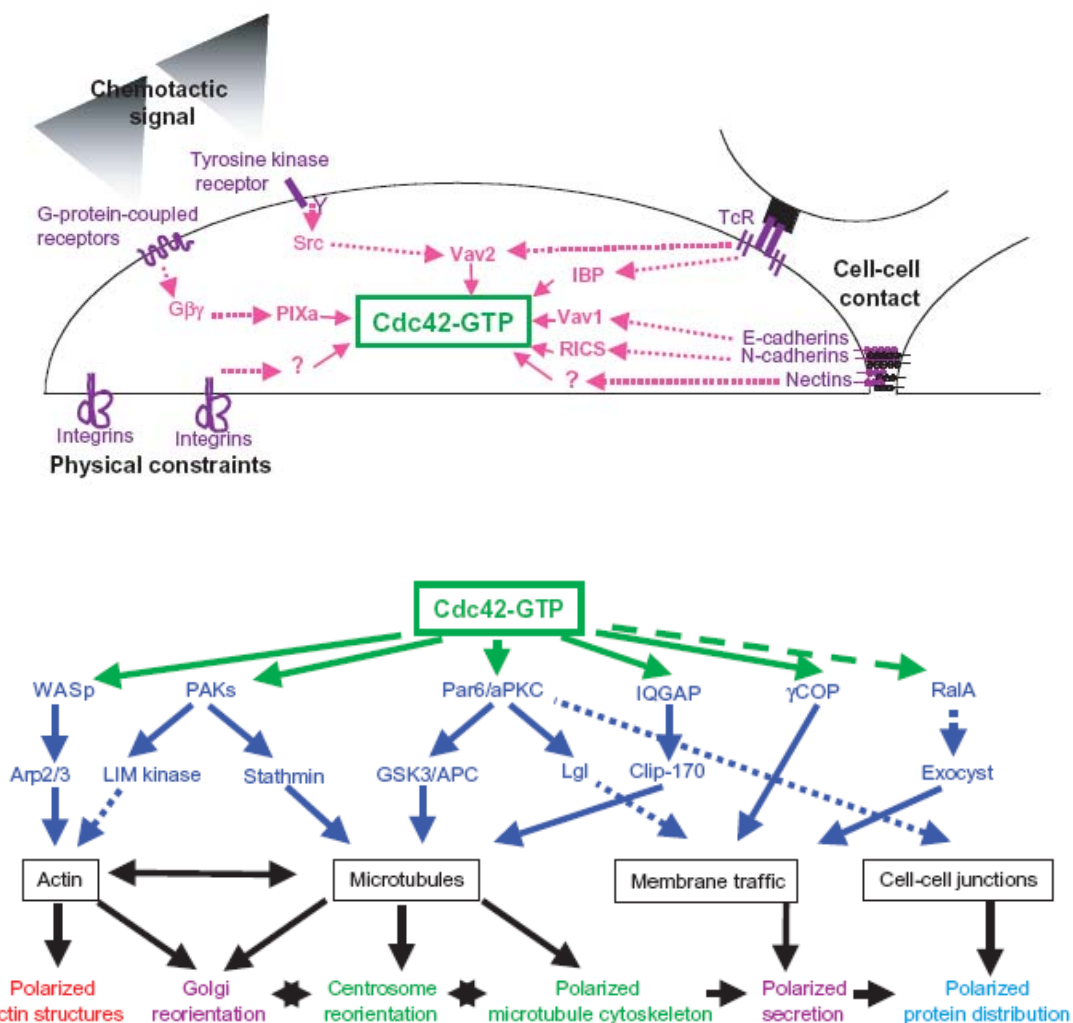


Figure 2.26 Les signaux périphériques activent Cdc42 qui, en retour, organise le recrutement et l'activation des effecteurs, les protéines qui dirigent l'assemblage du cytosquelette comme Arp2/3 ou APC (Etienne-Manneville, 2004b).

Cdc42 reçoit le signal périphérique et recrute les effecteurs, Rho et Rac agissent.

L'activité locale de Cdc42, à l'avant de la cellule en migration par exemple, permet l'initiation du recrutement et le contrôle de l'activité de Rac ainsi que l'inhibition de Rho. Les RhoGTPases régulent le cytosquelette en activant localement, sur le cortex, des effecteurs qui sont présents sur toute la surface de la cellule : les **protéines hétérotrimériques G**. L'effet des RhoGTPases sur ces protéines G déclenche localement le remodelage du cytosquelette. Cette interaction participe directement aux mécanismes polarisés les plus connus comme la migration ou la division asymétrique (Zheng, 2004). Le plus intrigant, au-delà de la façon dont chaque voie de signalisation mène à un type de modification particulière du cytosquelette, est la façon dont toutes ses voies sont régulées dans l'espace pour donner une réponse intégrée puis coordonnée. Des modèles physiques des corégulations spatiales des signaux permettent aujourd'hui de reproduire certains mécanismes de polarisation des systèmes unicellulaire dans un gradient (Parent and Devreotes, 1999). Un champ entier d'investigation est encore ouvert à la modélisation de systèmes plus dynamiques comme les cellules de mammifères. Les micro-systèmes s'y prêtent particulièrement bien.

I-6 Mécano-sensibilité

Un des aspects fonctionnels de ces propriétés du cytosquelette, qui sera omniprésent dans nos réflexions au sujet des expériences présentées, est la capacité des cellules à s'accrocher au substrat et à **traduire les caractéristiques physiques** (taille, énergie) et **chimiques** (nature du ligand) de cet accrochage en une série d'activations enzymatiques spécifiques à l'intérieur de la cellule.

La transduction d'une association entre un ligand et son récepteur en signaux biochimiques intra-cellulaires est connue et étudiée depuis longtemps (transmission synaptique, réaction immunitaire). La **transduction** de l'énergie d'adhésion, de l'intensité et de l'orientation de la tension est aujourd'hui encore mystérieuse. La capacité des cellules de réaliser une mécano-transduction est l'objet d'une active recherche à l'interface physique-biologie. Les bases structurales et biochimiques de cette propriété des cellules ont été décrites précédemment, au cours de la présentation des adhésions et des fibres de stress. Ce paragraphe regroupe quelques observations expérimentales de ce mécanisme chez les cellules adhérentes et les conséquences physiologiques à l'échelle cellulaire.

De nombreuses techniques de micromanipulation ont permis de sonder à différentes échelles la réponse des cellules à des contraintes mécaniques (voir (Hu et al., 2004) pour une revue des techniques utiles à l'étude de la mécanotransduction).

Des cellules non transformées sont sensibles à la rigidité du substrat. Plus le substrat est rigide et plus les cellules s'étalent et se divisent ; un substrat mou au contraire induit l'entrée en apoptose. Par contre des cellules transformées se divisent indépendamment de la rigidité du substrat (Wang et al., 2000). Les cellules ont ainsi la capacité d'**adapter leur rigidité** à celle de leur environnement. Cette propriété est une conséquence de la boucle de rétroaction positive qui existe entre la tension externe, l'élévation de l'activité intracellulaire de Rho et la croissance des fibres de stress et des adhésions focales (Hinz and Gabbiani, 2003). Cette **rétroaction** se manifeste également à des échelles subcellulaires. En tournant des billes magnétiques, accrochées par l'intermédiaire des intégrines à la surface de cellules, on peut observer que la rigidité corticale augmente avec la contrainte appliquée (Wang et al., 1993). La rigidité corticale se renforce suite à l'application de la contrainte et il devient de plus en plus difficile d'imposer un déplacement donné à une bille accrochée aux intégrines (Figure 2.27) (Choquet et al., 1997).

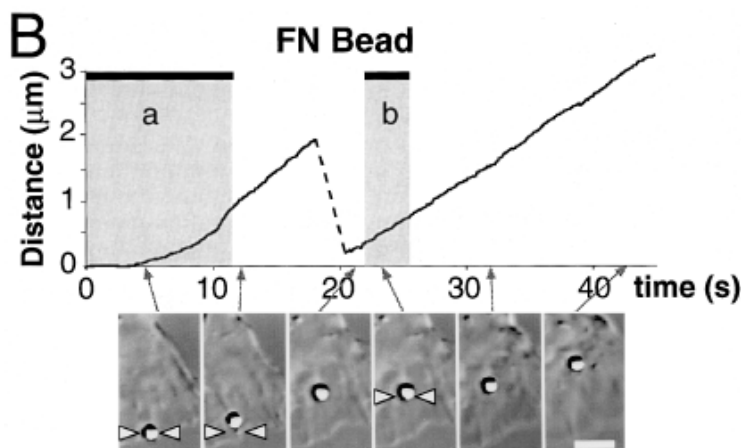


Figure 2.27

En piégeant une bille, recouverte de fibronectine, liée au cytosquelette interne de la cellule par l'intermédiaire des intégrines dans un piège optique, on peut l'empêcher de suivre le flux normal de l'actine vers l'arrière (a).

Mais si on recommence cette expérience un peu plus tard, le lien entre la bille et le cytosquelette s'est renforcé et la bille échappe au piège (b) (Choquet et al., 1997).

Des **canaux ioniques**, sensible à la tension dans la membrane, participent à la réaction de cellule à une contrainte mécanique. En effet, la stimulation mécanique de billes (torsion) ancrées à la surface des cellules induit, quasi-instantanément, une entrée de **calcium** par l'ouverture de ces canaux ioniques. Cette entrée de calcium est suivie d'une accumulation d'actine autour de la zone contrainte et d'une augmentation locale de la rigidité du cortex due à l'action du calcium sur les myosines. Cette réaction à la contrainte est inhibée si les tyrosines kinases ne sont plus fonctionnelles (Glogauer et al., 1997).

Même si les canaux calciques dont la perméabilité est sensible à la tension semblent participer à la stimulation de la réponse intracellulaire, d'autres mécanismes sont impliqués. Le simple étirement de cytosquelette nu, sans membrane, induit le recrutement de FAK et CAS sur les **adhésions** ce qui démontre directement qu'elles sont capables de lier sélectivement certaines protéines selon la contrainte à laquelle elles sont soumises (Sawada and Sheetz, 2002). Ces associations de protéines au niveau des adhésions sont les principales composantes de la transduction biochimique de la contrainte mécanique. Elles induisent des cascades de signalisations qui contrôlent d'autres recrutements locaux et le renforcement du cytosquelette (Geiger and Bershadsky, 2001; Geiger, 2002).

Il semble que ce soit les **tyrosines kinases de la famille Src** qui soient majoritairement responsables de ce type de réponse (voir (Bershadsky et al., 2003) pour une revue très complète des voies de signalisation associées à la sensation des contraintes mécaniques). Des systèmes expérimentaux de stimulation, à l'aide de membrane souples couplées à des moteurs, permettent d'étirer périodiquement des cellules et d'observer leur réponse. En réponse à ce type de stimulation, Src est activé et se lie à l'actine par l'intermédiaire de AFAP (actin filament associated protein) (Han et al., 2004). L'inhibition de Src empêche le recrutement local du cytosquelette près de la zone stimulée (Mack et al., 2004). L'activation locale de Src en réponse à une contrainte mécanique locale se propage en une **vague le long du cortex** sur de grandes distances dans la cellule. Cette translocation sur de grandes distances passe par l'actine et les microtubules (Wang et al., 2005). Src semble donc impliqué à la fois dans le mécanisme sensoriel local mais aussi dans sa propagation dans l'ensemble de la cellule le long du cortex (et non par diffusion dans le cytoplasme).

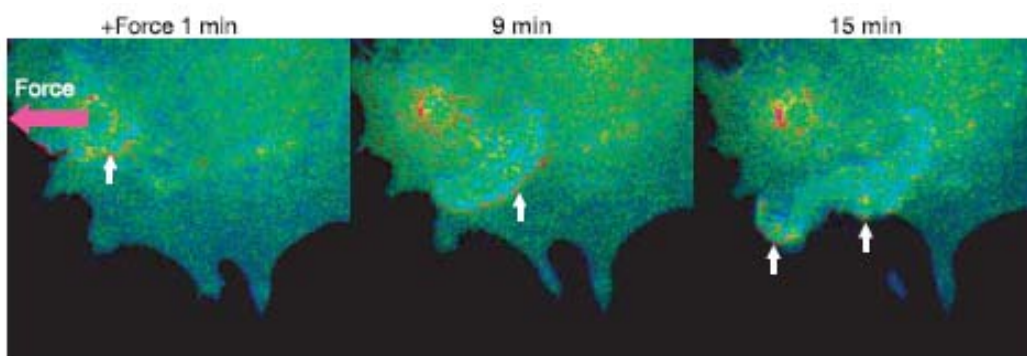


Figure 2.27 Visualisation de l'activation locale de Src par FRET. Une bille est collée à la surface puis tirée (gauche). Cela induit une vague d'activation de Src le long du cortex. Cette vague n'apparaît pas si l'actine est détruite par la cytochalasine ce qui montre que l'actine est impliquée dans cette propagation (Wang et al., 2005).

Tenségrité

L'action des microtubules sur la contractilité peut également être interprétée comme une contribution purement mécanique : la **précontrainte cellulaire** (Ingber, 2003a). Les microtubules, ayant une grande longueur de persistance par rapport à la taille de la cellule (plusieurs millimètres) et une rigidité importante par rapport au reste du cytosquelette, pousseraient sur la membrane ce qui réduirait en apparence la tension acto-myosique. Leur dépolymérisation détruirait cet équilibre et serait visible par l'augmentation de la contrainte sur le substrat (Stamenovic et al., 2002). Ce concept d'équilibre mécanique entre la traction par l'actine et la pression par les microtubules a été proposé par Donald E. Ingber sous le nom de tenségrité.

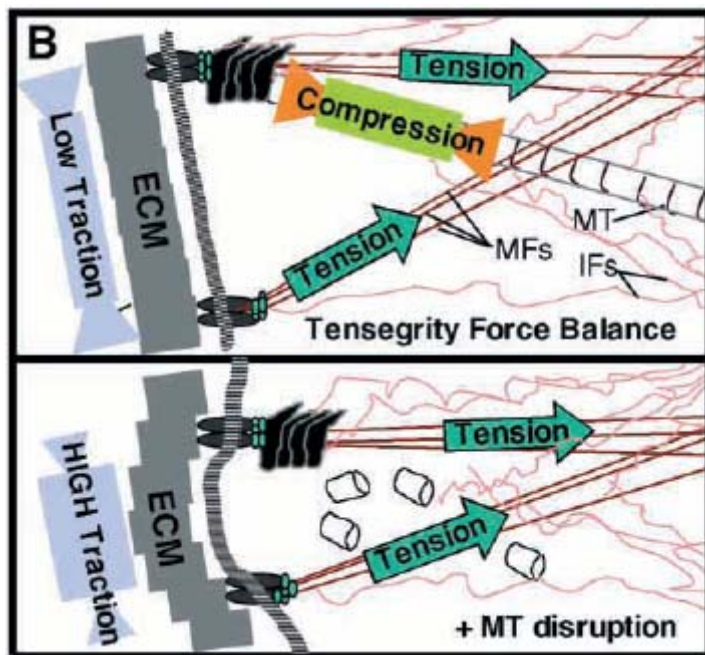


Figure 2.28 Tenségrité selon D.E. Ingber

Les câbles d'actine en tension compense la pression exercée par les microtubules.

Cette dénomination a été emprunté à Buckminster Fuller, architecte constructeur des structures géodésiques ou dômes tensintègres, dans lesquels le poids de la structure qui fait pression sur les bord (rôle des microtubules) est équilibré par des barres internes mise sous tension (rôle de l'actine).

Un tel rôle mécanique pour les microtubules n'a pas été démontré. La dynamique intracellulaire des microtubules ne semble pas permettre à un grand nombre de microtubules de pousser jusqu'au flambage sur la membrane. De plus, dans des cellules en culture comme celles dans lesquelles ont été faites ces expériences, le réseau de microtubules est tridimensionnel, alors que la tension développée dans les fibres de stress accrochées au substrat rigide se fait principalement à deux dimensions (les contraintes corticales mises en jeu en dehors du contact avec le substrat sont quatre fois plus faibles que celles développées par les fibres de stress (Wang et al., 2002b)). Comment un système à deux dimensions peut-il équilibrer la précontrainte exercée dans les trois dimensions ? Le passage dans des cultures cellulaires 3d (gels de collagène ou sandwich de film de polyacrylamide) réduit considérablement la tension corticale et les cellules étalées deviennent allongées (Beningo et al., 2004). Ceci montre que si les deux systèmes, actine et microtubules, deviennent tridimensionnels, les architectures observées à deux dimensions n'ont plus lieu d'être. Le

système expérimental utilisé pour démontrer le rôle de la tenségrité (culture sur substrat rigide) n'est donc pas particulièrement bien adapté.

Toutefois, il est intéressant de remarquer que la contrainte corticale, mesurée par la résistance à la torsion de billes sur l'ensemble de la surface de la cellule, est proportionnelle (Wang et al., 2002b) et parallèle (Hu et al., 2004) à la tension développée par les fibres de stress dans le plan du substrat et mesurée avec des substrats flexibles. Une tension locale se propage donc bien de manière directionnelle, et non isotrope, dans le cortex de la cellule. Le fait que l'ensemble des contraintes évolue de concert et que la pression exercée par les microtubules contrebalance une partie de la force exercée par l'actine (à hauteur de 14%) supporte l'hypothèse de la tenségrité.

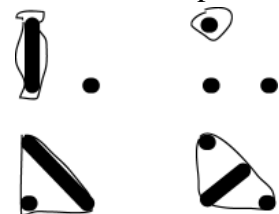
Cependant d'autres modèles, basés sur le niveau d'activation de Rho ou les boucles de rétroaction mise en place au cours de la mécanotransduction, pourraient tout à fait expliquer ces observations. La conclusion la plus intéressante de cette théorie est qu'un changement de contrainte local se répercute dans toute l'organisation de la cellule, puisque tout l'édifice se tient lui-même, et que les contraintes ne se transmettent pas uniquement par dissipation visqueuse à travers le cytoplasme mais également le long des câbles d'actine (Ingber, 2003a). Le concept selon lequel la cellule n'est pas un sac visqueux et répond localement tout en prenant en compte un équilibre mécanique global semble tout à fait réel. La distribution des tensions dans certaines fibres vient certainement équilibrer d'autres contraintes mécaniques dans le cortex. C'est la formulation d'un équilibre mécanique tension-compression joué par actine-microtubule qui semble plus discutable.

II- L'organisation du cytosquelette d'actine et de la membrane plasmique dépend du patron adhésif

II-1 Etalement des cellules sur les micro-patrons

Le système de contrainte adhésive empêche les cellules déposées sur la lame de s'accrocher en dehors des patrons. Sur cette zone non adhésive, elles restent rondes et leur position fluctue au gré de l'agitation du milieu. Si elles viennent toucher directement ou même à seulement passer près d'un patron elles s'y accrochent immédiatement (voir film « *Spreading on micropatterns* » et la légende en annexe). Des études de la dynamique de la formation du contact des cellules avec un substrat homogène, menées conjointement avec Damien Cuvelier, ont révélé le nombre important des filopodes qui poussent à partir du corps cellulaire vers le substrat (voir film « *Spreading R1CM Fibro* » et la légende en annexe). Ces filopodes participent très certainement au mécanisme de sensation qui permet à la cellule de sonder mécaniquement leur environnement. En effet sur la fin du film « *Filopodia* » (légende en annexe) on peut voir une cellule passer à proximité d'un patron adhésif sans être en contact direct avec celui-ci. Seul un filopode atteint le patron. Ce filopode ne se décroche pas et la cellule va immédiatement se diriger vers le patron et s'étaler dessus. Tous les types cellulaires n'ont pas la même capacité à explorer ainsi leur environnement. Il serait intéressant d'étudier en détail le rôle de ces filopodes. Ils contiennent de la myosine X à leur extrémité, et certainement d'autres moteurs, afin d'assurer la sensation puis le relais de l'information depuis l'extrémité en contact avec le substrat jusqu'au corps cellulaire. Là, le signal va vraisemblablement activer Rac et la formation de protrusions supplémentaires et même celle d'un lamellipode vers la zone accrochée. Ce sont sûrement ces filopodes qui permettent aux cellules HeLa de s'étaler sur des patrons adhésifs non connexes comme le [barre-point] présenté en figure S1 de l'article sur les fibres de stress. Ces patrons non connexes, formés de barres et de points non reliés entre eux, seraient utiles pour une étude dédiée à cette sensation de l'environnement par les cellules.

Il est assez surprenant de constater que les cellules HeLa parviennent à s'étaler sur certaines combinaisons de zones adhésives dans une enveloppe convexe donnée mais pas sur toutes. Par exemple, dans une enveloppe convexe en triangle rectangle isocèle, elles peuvent trouver le point dans la combinaison [barre-point] si la barre est l'hypoténuse mais pas si la barre est sur l'un des deux autres côtés. Est-ce une expression d'une distance critique due à la taille des filopodes ? Est ce du à un étalement critique en dessous duquel la cellule n'est pas assez stimulée pour former ces filopodes ? Est ce due à la position du point par rapport au corps cellulaire ? Une combinaison des trois ? Ces facteurs sont propres à chaque type cellulaire. Les cellules RPE1 ont beaucoup plus de difficultés à passer par-dessus une zone non adhérente et ne trouvent jamais le point dans toutes ces combinaisons. Elles ont besoin d'un patron connexe.



Une fois qu'un filopode a atteint la zone adhésive, la cellule peut envoyer d'autres filopodes, les remplir et les fusionner en un lamellipode puis s'étaler sur cette nouvelle zone en quelques dizaines de minutes. A ce stade la forme de la cellule est concave. Elle finira par adopter l'enveloppe convexe du patron après plusieurs heures. Ce phénomène est décrit plus en détail dans l'article sur les fibres de stress.

II-2 Distribution spatiale des fibres de stress et des adhésions-ARTICLE

L'article présenté ici décrit les fibres de stress dans les cellules RPE1 et HeLa. Il présente trois effets importants à nos yeux.

Le premier est la **reproductibilité** des architectures observées. Selon les patrons, les cellules fabriquent systématiquement la même fibre de stress au même endroit. Cette reproductibilité est telle qu'elle permet de mesurer la taille du cable et la taille des ancres d'une fibre donnée dans plusieurs cellules et d'effectuer des statistiques pour comparer les architectures. L'organisation de la tension dans les cellules devient quantifiable à l'échelle d'une population de cellules et non plus à l'échelle de la cellule unique. La possibilité de faire des statistiques donne alors une plus grande fiabilité aux comparaisons effectuées, et même d'évaluer cette fiabilité.

Les deux suivants concernent les réponses des cellules à l'hétérogénéité de leur environnement.

D'une part la cellule montre, pour la première fois dans un essai ex-vivo, la capacité de **renforcer localement** la tension au-dessus d'une zone sur laquelle elle ne peut pas adhérer.

D'autre part le système actine n'a pas seulement une réponse locale mais aussi une **réponse intégrée**. En effet, si localement le substrat n'est pas adhésif la cellule renforcera la tension mais le niveau de ce renforcement va dépendre des tensions que la cellule doit développer ailleurs. De manière intéressante, le niveau total de contraction que la cellule développe semble constant : c'est la distribution spatiale des tensions qui est adapté en fonction de la distribution des zones adhésives.

Cell Distribution of Stress Fibres in Response to the Geometry of the Adhesive Environment

Manuel Théry^{1,3}, Anne Pépin², Emilie Dressaire¹, Yong Chen^{2,4}, Michel Bornens¹

¹Biologie du cycle cellulaire et de la motilité, UMR144, CNRS, Institut Curie, 26 rue d'Ulm 75248 Paris Cedex 05, France.

²Groupe nanotechnologie et dispositifs microfluidiques, UPR20, CNRS, Laboratoire Photonique et Nanostructures, Route de Nozay, 91460 Marcoussis, France.

³Present address, Laboratoire Biopuces, DRDC / CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France.

⁴Present address, Ecole Normale Supérieure, 24 rue Lhomond, 75231 Paris, France.

Keywords : micro-pattern, actin, stress fibres, tension.

ABSTRACT

Cells display a large variety of shapes when plated in classical culture conditions despite their belonging to a common cell type. These shapes are transitory since cells permanently disassemble and reassemble their cytoskeleton while moving. Adhesive micropatterns are commonly used to confine cell shape within a given geometry. In addition the micropattern can be designed so as to impose cells to spread upon adhesive and non-adhesive areas. Modulation of the pattern geometry allows the analysis of the mechanisms governing the determination of cell shape in response to external adhesive conditions. In this study we show that the acquisition of cell shape follows two stages where initially the cell forms contact with the micropattern. Here, the most distal contacts made by the cell with the micropattern define the apices of the cell shape. Then secondly, the cell borders that link two apices move so as to minimise the distance between the two apices. In these cell borders, the absence of an underlying adhesive substrate is overcome by stress fibres forming between the apices, which in turn are marked by an accumulation of focal adhesions. By inhibiting myosin function, cell borders on non-adhesive zones become more concave, suggesting that the stress fibres work against the membrane tension in the cell border. Moreover this suggested that traction forces are unevenly distributed in stationary, non-migrating, cells. By comparing the stress fibres in cells with one, two or three non-adherent cell borders it was reasoned that stress fibre strength is inversely proportional to number. We conclude that cells of a given area can generate the same total sum of tractional forces but that these tractional forces are differently spaced depending on the spatial distribution of its adherence contacts.

INTRODUCTION

Cell adhesion is the basis of tissue architecture [Gumbiner 1996]. Cytoplasmic stress fibres exert forces on cell-cell or cell-extracellular matrix (ECM) contacts [BurrIDGE and Wennerberg 2004; Harris et al. 1981]. These adhesions are essential to coordinate the tension distribution within connective tissues [Hinz and Gabbiani 2003]. To maintain tensional homeostasis, individual cells regulate tractional forces through feedback mechanisms [Brown et al. 1998; Eckes and Krieg 2004]. Forces within the cytoskeleton also govern cell shape and cell movement [Beningo K. 2001; Ingber 2003; Pourati et al. 1998]. At the tissue level, cell tension drives wound healing [Wood et al. 2002], morphogenesis [Belousov et al. 2000; Kiehart et al. 2000; Somogyi and Rorth 2004], and impinge on tumour formation [Paszek and Weaver 2004; Paszek et al. 2005]. The role of local biochemical and mechanical regulations of cell cytoskeleton, in these processes, remains unclear. [Martin and Parkhurst 2004].

Cells in tissue have reproducible shape and cytoskeleton organisation in response to cell-cell or cell-ECM contact [Gumbiner 1996]. The reproducibility of cell cytoskeleton architecture is lost when cells are plated on culture dishes as they provide a homogeneous unlimited adhesive substrate. Under such conditions, the permanent assembly and disassembly of focal adhesions and actin fibres during cell migration prevent the cytoskeleton network dynamics achieving a steady-state structure [Pollard and Borisy 2003]. Therefore, under classical culture conditions, the study of cell tensional equilibrium in response to given boundary conditions appears compromised.

The confinement of cells on micropatterns prevents movement and imposes a reproducible shape [Singhvi et al. 1994]. Fully adhesive micropatterns have been used to manipulate cell shape and study its impact on cytoskeleton organisation [Parker et al. 2002]. Membrane protrusions and cell adhesions were shown to be restricted to the cell apices while stress fibres were situated along the cell borders. The degree to which the cell spread across an area was found to influence Rho kinase activation and the total amount of stress fibres critical for cell differentiation [McBeath et al. 2004]. In contrast, for a given area, less is known about the effect of cell geometry, i.e. the number, length of cell borders, and spatial distribution of apices. Spatial constraints that cells encounter in tissues were reproduced in these studies but the heterogeneity of cell attachment to neighbouring cells or surrounding matrix was not. Fully adhesive patterns do not permit the uncoupling of cell shape and cell adhesion. In this study we manipulated the location of adhesive and non-adhesive zones within a given convex envelope. Thereby we imposed cells to have similar shapes, the convex envelope of the pattern, but distinct and heterogeneous adhesion pattern. We monitored cell spreading and measured the actin cytoskeleton spatial distribution for different geometries of the adhesive environment. This allowed us to analyse the impact of cell adhesion pattern onto cell shape and cytoskeleton architecture.

RESULTS

Cell shape is convex at steady state

RPE1 cells plated on fully adhesive coverslips spread and migrated while displaying contours with both concave and convex edges (Fig. 1A) [Zand and Albrecht-Buehler 1989]. Fibronectin micropatterns printed on glass coverslip were used to study cell mechanical responses to controlled spatial distributions of ECM. Micropatterns had an equilateral triangular envelope whose edges length was $46\ \mu\text{m}$ and area $990 \pm 30\ \mu\text{m}^2$. The area has been chosen to prevent cell movements. Indeed, cells moved on larger micropatterns without reaching a steady-state position. Four micropatterns were used with either [frame], [V], [T] or [tripod] shape (Fig. 1B). The different combinations of adhesive and non-adhesive areas provide stringent and stationary boundary conditions to cell anchoring machinery. Depending on the pattern, the convex triangular envelope showed either three, two, one or no adhesive edges. All of the different micropatterns were printed on the same coverslip in four separate arrays. Two hours after contacting the micropatterns most of the cells were spread across the triangular contour. The cells did not migrate and displayed a stable shape with ruffling activity upon adhesive sides. Remarkably this steady-state was characterised by convex cell shape (i.e. the cell shape occupying the triangular form of the micropattern envelope) even though the non-adhesive zones within certain underlying micropatterns effectively formed a concave edge (Fig. 1B). The fact that the membrane partially overhung the central non-adhesive area during cell spreading on a [V] or a [T], in order to reduce high local membrane curvature, was expected. However the convexity of the contour formed by the cell border suggested the contribution of another active process involving actin edge-bundles [Zand and Albrecht-Buehler 1989].

Cell spreading is followed by reinforcement of cell contractility

To examine cell adhesion more precisely during cell spreading reflection interference contrast microscopy (RICM) was used [Curtis 1964; DePasquale and Izzard 1987]. This technique does not interfere with cell spreading since it requires low light intensity and no internal fluorescent probe. Intimate contacts with the substrate appear black whereas zones without contact appear grey or white. Cell spreading was monitored on a [V] to observe the progression of cell adhesion over time paying specific attention to the cell border membrane curvature upon the non-adhesive area (Fig. 2 and Video 1). After a few minutes wide adhesion zones appeared at cell periphery. Interestingly, during the early phase of spreading, cell membrane upon the non-adhesive area was curved. This progressive movement of the cell border was further revealed by drawing tangential lines from the curved membrane border to the distal part of the completely occupied part of the adhesive micropattern (Fig. 2A, 0h13' and 0h35'). The cell covered the entire adhesive micropattern in half an hour. At this stage, unattached membrane was highly curved and cell attachment zones were wide (0h35'). Then, for the next hour and a half, cell shape undertook a slow transformation during which unattached membrane was brought to a lower curvature and cell adhesion with the micropattern concentrated at the cell apices [Zand and Albrecht-Buehler 1992].

It is known that membrane curvature at these cell borders depends on both surface tension and line tension [Bar-Ziv et al. 1999]. Surface tension corresponds to tension within the membrane. It has been shown to depend mainly on the energy required by the bilayer to adhere to underlying actin cortex [Sheetz 2001]. It is maintained almost constant by membrane area regulation processes [Morris and Homann 2001; Raucher and Sheetz 1999]. Line tension corresponds to tension along the edge of the membrane. We considered that it depended mainly on the tension within the actin cables upholding the membrane. We assumed membrane tension (σ) to be constant, and surface tension energy to compensate the energy of

the line tension (γ) along an edge of curvature radius R . The latter, R , is thus proportional to line tension: $R = \gamma/\sigma$ [Bar-Ziv et al. 1999]. Interestingly, in this experiment, curvature radius increased almost linearly over time during the entire cell spreading (Fig. 2B). This trend was even observed after the complete coverage of the pattern, suggesting that cell convexity is reached after a long period of line tension reinforcement. Under classical culture conditions, cells keep moving and never reach the stationary, fully tensed state observed on micropatterns. This could explain why convex shapes can hardly be seen among these populations [Albrecht-Buehler 1987].

Cell contractility ensures convexity

It seemed that cell contractility ensures the establishment of cell convexity [Zand and Albrecht-Buehler 1989]. After reaching the steady-state shape, the contractile and energy consuming mode associated with cell motility might be abandoned. Indeed cells are able to reorganise attachments and cytoskeleton structures such that they can recover a basal tensional level [Mizutani et al. 2004]. To test this hypothesis, cell contractility was probed at steady state: cells were fixed four hours after reaching convexity either in control conditions or after an additional hour of treatment with the ROCK inhibitor Y27632 to disrupt actomyosin contractility. Interestingly, cells plated on a [frame] with continuously adhesive edges did not undergo dramatic shape changes after Y27632 treatment in contrast to cells plated on concave micropatterns (Fig. 3). On concave adhesive micropatterns, control cells displayed actin cables that appeared larger upon non-adhesive edges than upon adhesive edges, where ruffles were also observed (Fig 3) [Zand and Albrecht-Buehler 1989]. After treatment with Y27632, the membrane border profoundly sagged on the non-adhesive edges but remained anchored on adhesive edges. This revealed that tension was not identical in all edges in spite of shape symmetries within equilateral triangle. Instead it was highly biased and localised to non-adhesive edges as suggested also by F-actin staining. Interestingly curvatures looked similar for all membrane borders above non-adhesive edges. Membrane curvature was measured by fitting a portion of circle along unattached cell edges that were stained with phalloidin to reveal the F-actin fibres (Fig. 3). The average curvature radius of unattached edges was estimated to be around $90\mu\text{m}$ at steady-state, in control conditions. No significant difference could be detected between the curvature measurements on [V], [T] or [tripod]. In spite of the large error associated with this measure (See Material and Methods), the large number of measurements suggested that local tension in the actin cables was almost constant regardless of their number per cell. The relaxed states of membrane curvature were clearly different as a result of Y27632 treatment. The single relaxed membrane edge on [V] was significantly more curved than the two relaxed edges on [T] that were themselves more curved than the three relaxed edges on [tripod]. The relaxed curvature radii were estimated between $20\mu\text{m}$ on [V] and $30\mu\text{m}$ on [tripod]. Notably, this value corresponded to the curvature before reinforcement started (Fig. 2). The observation that membrane borders display similar curvature under myosin generated tension but different curvatures when relaxed suggested that tension generated by the actin fibres may depend on the presence of other actin fibres in the cell – i.e. on the global tension in the cell. This question was further investigated by quantifying actin fibre and focal adhesion sizes.

Stress fibre size depends on local adhesiveness

Cells were plated on micropatterns in order to analyse actin edge-bundles [Zand and Albrecht-Buehler 1989]. Four hours after reaching steady state, they were briefly permeabilised with detergent to remove background effects from the cytoplasmic and then fixed. Focal adhesions, revealed by vinculin immuno-labelling, were distributed around the pattern periphery with a higher concentration at cell apices (Fig. 4). Actin cables, revealed by

phalloidin staining, formed a non-crossing network upon the non-adhesive area connecting adhesive bars. This lattice seemed to reveal the history of cell spreading with progressive co-assembly of adhesions and stress fibres during cell spreading [Bershadsky 1995] (compare the distribution of internal thin stress fibres and their corresponding focal adhesions in Fig. 4 with the tangential lines connecting cell attachments drawn in Fig. 2). Strikingly both focal adhesions and actin cables were systematically much larger upon non-adhesive edges than upon adhesive edges (Fig. 4). The average distributions of vinculin and actin were calculated by averaging the signal intensity of each image over a dozen of cells on each micro-pattern (Fig. 5). It confirmed the reproducibility of the differences of focal adhesion and actin cable sizes within a cell depending on the adhesiveness of the underlying edge. This behaviour was also observed in HeLa cells plated on other micropatterns: [full triangle], [L] and [bar-dot] (Fig. 6). These results firmly confirmed that stress fibre strength along edges depends on local adhesiveness, i.e. whether the cell can form numerous attachments all along the edge or not [Zand and Albrecht-Buehler 1989].

Stress fibre size depends on the length and number of stress fibres per cell

Is the development of stress fibres driven locally by the geometry of adhesive boundary conditions or governed globally by the equal distribution of a limiting amount of contractile elements? If so it could be predicted that the sum signal intensity of the three large stress fibres that cells developed on [tripod]; the two developed on [T], and the one developed on [V] should be equivalent in value. On a given pattern, the reproducibility of cell cytoskeleton organisation permitted the identification and characterising of typical actin cables and the associated focal adhesions. Indeed for non migrating fibroblasts, the size of the focal adhesions on which actin cables are anchored has been shown to be proportional to tension within the cable [Balaban et al. 2001]. Measuring vinculin signal from the focal adhesions should thus provide an estimation of the tension within the fibre adjacent to the membrane border above the non-adherence zone. This tension developed along stress fibre will be referred to as the fibre strength. We also assumed fibre strength to be correlated with the number of F-actin fibres and adhesion molecules constituting the stress fibre. Therefore it was inferred by area and intensity of phalloidin and vinculin labelling. Individual large stress fibres and corresponding focal adhesions were detected as the only structures whose pixel intensity was above a high threshold value identical for all the analysed images (Fig. 7A). Areas and integrated pixel intensities were recorded (see Materials and Methods). Total cell content of F-actin or vinculin was evaluated by integrating pixel intensities above a low threshold value identical for all cases (Fig. 7B).

A comparison was made of two micropatterns of similar envelope area imposing cells to develop a single stress fibre of different length: either a long one in cell plated on a [V] or a shorter one in cells plated on a [C] (Fig. 4). Focal adhesions and actin cables were smaller on [C], which showed that short stress fibres were significantly weaker than long ones. This trend was confirmed by the lower intensity of actin cables on [C] (Fig. 7A). The stress fibre strength appeared correlated to a geometrical parameter, the distance between stress fibre anchoring sites, i.e. the length of the non-adhesive edge.

Quantification of actin and vinculin on triangular micropatterns revealed that individual stress fibres were weaker when they were developed on patterns with more non-adhesive edges (Fig. 7A). It showed that stress fibre strength was not only driven by local boundary condition at the fibre attachments - adhesiveness and edge length - but also by the total number of stress fibres per cell. The total intensity of F-actin and vinculin labelling, above the low threshold, did not appear to vary significantly over the four conditions (Fig. 5B). These measurements supported the hypothesis according to which every cell of a given

area possess a determined amount of F-actin to be involved in contractile structures and rearrange it differently, depending on the overall spatial distribution of adhesive zones.

DISCUSSION

We conclude that stress fibres tension along cell edges depends on both local and global parameters. Locally the distance between fibres attachments sites and the absence of membrane adhesion along the edge contribute to increase stress fibre strength [Zand and Albrecht-Buehler 1989]. In addition, stress fibre strength along webbed edges is also inversely proportional to the number of stress fibres within the cell.

Stress fibre reinforcement upon a non-adhesive edge

As previously suggested, our results indicate that stress fibres resist inward membrane tension [Zand and Albrecht-Buehler 1989; Zand and Albrecht-Buehler 1992]. We suggest that the stress fibre reinforcement upon non-adhesive edge is directly due to the transmission of membrane tension onto stress fibres. The inward pulling of unattached membrane on the underlying actin cables is transmitted to focal adhesions. In response, a positive feedback loop could reinforce tension within actin cables [Riveline et al. 2001] resulting in an outward displacement of the membrane, up to convexity (Fig. 2). On the opposite, the attachment along adhesive edges could reduce membrane inward pulling on actin cables, and also provide local relays reducing cable tension. The parameters that determine the final equilibrium between membrane tension pulling inward and stress fibre tension pushing outward deserve further investigations.

Focal adhesion size and membrane curvature reveal the amount of tension in stress fibre

According to the measurements of tension and focal adhesion size reported by Balaban et al. [Balaban et al. 2001] on human fibroblasts, the average tension corresponding to our three sets of size measurements could be calculated to be approximately 28 nN for [V], 22 nN for [T] and 11 nN for [tripod]. However these values do not take into account the cell types used.

By considering an approximate value of 0,1 mN/m for membrane tension (σ) [Dai et al. 1998], and a curvature radius of 100 μm , tension within actin cable ($\gamma = R \cdot \sigma$) can be calculated to be approximately 10 nN. This value was close to the above calculation based on the size of focal adhesions suggesting that both approaches were valid. However the curvature measurements suggested that tension in all actin cables upholding unattached edges was similar regardless of the total number of cables per cell. In contrast, focal adhesion size measurements suggested they were different. The apparent discrepancy between force/curvature and force/focal adhesions relationships requires further studies. It is worth noting that the curvature radii were measured in the x-y plane and did not take into account the curvature in the z direction. The measurements of focal adhesions size are more reliable since they take into account the actual effect of tension in the cable.

The increase of membrane curvature due to inhibition of myosin activity revealed directly the contribution of the acto-myosin contractility to the upholding of the unattached membrane. Focal adhesions and actin cables were quite large upon the non-adhesive edge of cells plated on [V] and this edge profoundly sagged after inhibition of myosin activity. In contrast focal adhesions and actin cables were much smaller along the non-adhesive edges of cells plated on [tripod] and these edges were less curved after inhibition of myosin activity. Therefore the increase of membrane curvature due to the inhibition of acto-myosin contractility was positively correlated with the size of focal adhesions and actin cables before

treatment. Both sets of data suggested that tension in actin cables upon unattached edges was different on each micro-pattern and depended on the number of such edges per cell. It seems likely that the tension within a stress fibre along unattached edges is reinforced until this edge reached the same final curvature in all cases. But the initial curvature before reinforcement depends on the number of unattached edges. Therefore the differences observed in the final fibre tensions could correspond to the various mechanical efforts necessary to compensate the different curvatures of the initial - non-contracted - states.

Cell internalisation of external adhesive boundary conditions

Our results highlighted the adaptability of cell cytoskeleton to external heterogeneity. The spatial organisation of stress fibres within cells plated on concave adhesive micropatterns revealed an intrinsic ability of cell contractile machinery to self-organise into a mirror picture of the adhesive environment (Fig. 4 and 6). By locally reinforcing actin cable tension over unattached edges, cell traction machinery internally counterbalance external spatial distribution of adhesive boundaries up to the establishment of a stationary and contractile equilibrium.

In vivo, cell ability to sense and respond to the mechanical heterogeneity of its environment is fundamental for tissue homeostasis. For example, in wound epidermis closure or dorsal closure during gastrulation in *Drosophila* embryos cells facing the hole develop a strong actin cable along the unattached edge [Hutson et al. 2003; Kiehart et al. 2000; Wood et al. 2002]. These cables are connected at cell-cell adhesion sites and form a transcellular actin-rich purse-string. The contraction of these cables allows the hole closure [Hutson et al. 2003]. On micropatterns, local tension along unattached cell edges could be the manifestation of the same mechanical behaviour that induces the contraction of the actin purse-string in vivo.

The localisation of contraction versus protrusion zones define the orientation of cell polarity

Spatial organisation of actin network into contractile zones as opposed to polymerising zones is a key feature for the definition of cell polarity by small GTPases [Ridley et al. 2003]. Rho activation induces stress fibres contraction [Kato et al. 2001; Ridley and Hall 1992] whereas Rac activation induces membrane ruffling [Ridley et al. 1992]. These two activities are mutually exclusive [Wadsworth 1999] and this spatial segregation determines cell polarity [Etienne-Manneville and Hall 2002; Xu et al. 2003]. Segregated localisation of membrane ruffles upon adhesive edges and stress fibres upon non-adhesive ones may affect internal cell polarity on micropatterns. Indeed in a previous study we showed that the specific locations of actin dynamics upon adhesive edges guide spindle orientation regardless of cell shape [They et al. 2005].

The ability to control actin dynamics with micropattern adhesiveness should facilitate the investigation of spatial organisation and regulation of actin network. By allowing a fine control of cell traction forces, micropatterns should help unravelling the basic principles of force generation in cells. These devices should also give new insights into tissue engineering.

MATERIALS AND METHODS

Stamp Fabrication

Pattern design was first done via L-Edit CAD software (Tanner EDA) and transferred to a machine-specific format corresponding to the electron beam lithography tool (Leica EBPG 5000+ nanowriter). Electron-beam lithography was then carried out on a blank 4 inch chromium-on-glass optical mask coated with resist (Nanofilm Inc, Westlake Village, CA). Resist development was done in pure AZ-Developer (Clariant, Frankfurt, Germany) for 30 seconds. Chromium etch was then carried in chrome-etchant 3144 Puranal (Honeywell) for 1 minute. The optical mask fabrication was completed after resist dissolution in acetone.

To make the resist mould, SPR220-7.0 photoresist (Shipley, Coventry, UK) was spin-coated at 2000 rotations-per-minute during 1 minute on a silicium wafer and soft-baked for 3 minutes at 115°C resulting in a 9 micron-thick layer. Contact optical lithography was carried out using the fabricated optical mask in a MA750 Süss MicroTec mask aligner (UV source 405 nm, UV power 6mW/cm²) for 45 seconds. The photoresist was then developed 2 minutes in pure LDD26W developer (Shipley). The obtained resist master mould was then exposed to chlorotrimethylsilane (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) in vapour-phase, for PDMS anti-adhesion purposes.

PDMS (Sylgard 184 kit, Dow Corning) was finally cast on the resist mould and cured 3 hours at 60°C. The 2 mm-thick cross-linked PDMS layer was peeled-off and stamps were manually cut out of it.

Microcontact Printing

Glass coverslips were first washed in methanol/chloroform (50/50) during 24h and stored in pure ethanol. After drying (15 minutes at 60°C) a coverslip was oxidised in a plasma chamber (Harrick Plasma, Ithaca, NY) during 3 minutes under a weak flow of air and incubated in a closed reactor containing a silanisation mix of methanol, deionised water 4,5%, acetic acid 0,9%, 3 mercapto-propyltrimethoxy silane (S10475, Fluorochem) 2,5%, overnight at 4°C [Cuvelier et al. 2003]. Coverslips were then washed twice in methanol and dried under filtered air followed by 15 minutes at 60°C.

The PDMS stamp was oxidised in the plasma chamber during 10 seconds under a weak flow of air and inked with a 50 µg/ml fibronectin solution (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) 10% of which was labelled with Cy3 (Amersham Biosciences, Orsay, France) for 10 minutes. After aspiration of the fibronectin solution the stamp was dried with filtered airflow and placed in contact with the silanised coverslip for 5 minutes. After removal of the stamp the printed coverslip was immersed in a 20mg/mL solution of poly(ethyleneglycol)-maleimide (2D2MOH01, Nektar Therapeutics, Huntsville, Alabama) for 1 hour at room temperature. The coverslip was then washed in PBS before cell deposition.

Cell culture, treatment, fixation and labelling

hTERT-RPE1 cells (infinity telomerase-immortalised Retinal Pigment Epithelial human cell line) were cultured in DMEM F-12 (GIBCO). HeLa-B, human adenocarcinoma epithelial cell line were cultured in DME medium (GIBCO). Both medium were supplemented with 10% of foetal calf serum and 2 mM glutamine. Cells were cultured in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Cells were trypsinised, centrifugated, resuspended in 1% foetal calf serum medium (to reduce the deposition around the micropatterns of the ECM present in the serum) and plated on the printed coverslip. For contractility inhibition cells were treated three hours after cell shape reached steady-state with Y27632 at 10 µM during one hour (Calbiochem).

For curvature measurements cells were fixed in paraformaldehyde 3% and glutaraldehyde 0,5% in cytoskeleton buffer [Mitchison 1992] for 10 minutes to preserve cell

shape. Fixed cells were treated with 1% sodium borohydride in PBS for 10 minutes. For stress fibres quantifications cells were permeabilised 15 seconds with Triton X-100 0,5% in cytoskeleton buffer and fixed in paraformaldehyde 3% in cytoskeleton buffer for 10 minutes. Fixed cells were treated with 0,1M ammonium chloride in PBS for 10 minutes.

Fixed cells were stained with FITC conjugated phalloidin at 1 μ M (Sigma Aldrich) and in some cases immuno-labelled with primary anti-vinculin antibodies (1:300, Sigma Aldrich) and secondary Cy5-conjugated goat anti-mouse antibodies (1:500, Jackson Immunoresearch) for stress fibres quantifications. All steps were performed during 1 hour at room temperature in PBS with 3% BSA and 0,1 % Triton X-100. Preparations were mounted in MOWIOL solution.

Pictures acquisitions

For curvature measurements pictures were acquired through a 40x PL APO oil objective using a Leica DMRA microscope and a MicroMax camera (Princeton Instruments). For stress fibre measurements pictures were acquired through a 100x PL APO oil objective using a Leica DMRA2 microscope and CoolSnapHQ camera (Princeton Instruments). Fast z acquisitions of actin fibres were performed over 2 μ m with a 0,2 μ m step with a piezoelectric ceramic. Z-stacks were projected using the average value of each pixels in order to take the fibre thickness in z into account. Metamorph software (Universal Imaging Corp.) was used on both microscopes for pictures acquisition.

Curvature, stress fibres and focal adhesions measurements

A portion of circle was manually drawn along unattached edge on the actin staining. The length l , and the width w , of the arc was automatically measured using Metamorph integrated morphometric analysis. The radius of the corresponding circle was calculated using the trigonometric formula $R = ((l/2)^2 + w^2)/(2w)$. A 10% error on the manual measure of the distances induced a 30% error in the radius calculation.

In order to obtain comparable measurements of stress fibres and focal adhesions all the cells were plated on a single coverslip containing all micro-patterns. Thus they could all be fixed, stained and acquired in the same conditions. Picture background was subtracted on each picture. The same low threshold was then used for all pictures. The intensity of all the pixels above the threshold were integrated to calculate total vinculin and actin intensities. In order to compare fibre sizes and intensities as well as focal adhesion sizes and intensities without the influence of cell to cell variations, total signal pictures were normalised to the same integrated total signal value. Then the same high threshold (three times higher than the low threshold) was applied to all pictures. Metamorph integrated morphometric analysis was used to detect stress fibres or focal adhesion and record areas and integrated intensities.

All the measurement series were compared using a one-way Anova comparison test. Means were considered as significantly different when the P value was below 0,05 (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$).

RICM

Cells on a micro-patterned glass coverslip were mounted in a plastic home made chamber with DMEM and 20mM Hepes. The chamber was hermetically closed and settled on an inverted Olympus IX71 in a plastic box heated at 37°C (Life Imaging Science). Cell bottom was illuminated with a mercury lamp whose light passed through a red interferential filter (to select a monochromatic wave) and was reflected on a 50/50 beam-splitter towards the preparation. After reflection of the light either on the cell bottom or on the glass coverslip interferences passed back through the beam-splitter and were recorded with a CoolSnapHQ camera and Metamorph acquisition software.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Matthieu Piel and Jean-François Joanny for helpful discussions, Damien Cuvelier for technical help on RICM experiments, Matthew Morgan for critical reading of the manuscript and Marina Glukhova for anti-vinculin antibodies and technical advices. Part of this work was carried out in the clean room facility of the UMR168 at the Institut Curie.

REFERENCES

- Albrecht-Buehler G. 1987. Role of cortical tension in fibroblast shape and movement. *Cell Motil Cytoskeleton* 7:54-67.
- Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, Mahalu D, Safran S, Bershadsky A, Addadi L and others. 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol* 3(5):466-72.
- Bar-Ziv R, Tlusty T, Moses E, Safran SA, Bershadsky A. 1999. Pearling in cells: a clue to understanding cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(18):10140-5.
- Belousov LV, Louchinskaia NN, Stein AA. 2000. Tension-dependent collective cell movements in the early gastrula ectoderm of *Xenopus laevis* embryos. *Dev Genes Evol* 210(2):92-104.
- Beningo K. DM, Kaverina I., Small V., Wang Y. 2001. Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *JCB* 153(4):881-887.
- Bershadsky A, Gluck, U., Denisenko, ON., Sklyarova, TV, Spector I. and Ben-Ze'ev A. 1995. The state of actin assembly regulates actin and vinculin expression by a feedback loop. *J. Cell Sci.* 108:1183-1193.
- Brown RA, Prajapati R, McGrouther DA, Yannas IV, Eastwood M. 1998. Tensional homeostasis in dermal fibroblasts: mechanical responses to mechanical loading in three-dimensional substrates. *J Cell Physiol* 175(3):323-32.
- Burrige K, Wennerberg K. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell* 116(2):167-79.
- Curtis AS. 1964. The Mechanism of Adhesion of Cells to Glass. A Study by Interference Reflection Microscopy. *J Cell Biol* 20:199-215.
- Cuvelier D, Rossier O, Bassereau P, Nassoy P. 2003. Micropatterned "adherent/repellent" glass surfaces for studying the spreading kinetics of individual red blood cells onto protein-decorated substrates. *Eur. Biophys. J.* 32:342-354.
- Dai J, Sheetz MP, Wan X, Morris CE. 1998. Membrane tension in swelling and shrinking molluscan neurons. *J Neurosci* 18(17):6681-92.
- DePasquale JA, Izzard CS. 1987. Evidence for an actin-containing cytoplasmic precursor of the focal contact and the timing of incorporation of vinculin at the focal contact. *J Cell Biol* 105(6 Pt 1):2803-9.
- Eckes B, Krieg T. 2004. Regulation of connective tissue homeostasis in the skin by mechanical forces. *Clin Exp Rheumatol* 22(3 Suppl 33):S73-6.
- Etienne-Manneville S, Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420(6916):629-35.
- Gumbiner BM. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84(3):345-57.
- Harris AK, Stopak D, Wild P. 1981. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature* 290(5803):249-51.
- Hinz B, Gabbiani G. 2003. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost* 90(6):993-1002.
- Hutson MS, Tokutake Y, Chang MS, Bloor JW, Venakides S, Kiehart DP, Edwards GS. 2003. Forces for morphogenesis investigated with laser microsurgery and quantitative modeling. *Science* 300(5616):145-9.
- Ingber DE. 2003. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci* 116(Pt 7):1157-73.
- Katoh K, Kano Y, Amano M, Onishi H, Kaibuchi K, Fujiwara K. 2001. Rho-kinase--mediated contraction of isolated stress fibers. *J Cell Biol* 153(3):569-84.

- Kiehart DP, Galbraith CG, Edwards KA, Rickoll WL, Montague RA. 2000. Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in *Drosophila*. *J Cell Biol* 149(2):471-90.
- Martin P, Parkhurst SM. 2004. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* 131(13):3021-34.
- McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. 2004. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 6(4):483-95.
- Mitchison TJ. 1992. Actin based motility on retraction fibers in mitotic PtK2 cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 22:135-151.
- Mizutani T, Haga H, Kawabata K. 2004. Cellular stiffness response to external deformation: tensional homeostasis in a single fibroblast. *Cell Motil Cytoskeleton* 59(4):242-8.
- Morris CE, Homann U. 2001. Cell surface area regulation and membrane tension. *J Membr Biol* 179(2):79-102.
- Parker K, Brock A, Brangwynne C, Mannix R, Wang N, Ostuni E, Geisse N, Adams J, Whitesides GM, Ingber DE. 2002. Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *FASEB J*. 16:1195-1204.
- Paszek MJ, Weaver VM. 2004. The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9(4):325-42.
- Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, Reinhart-King CA, Margulies SS, Dembo M, Boettiger D and others. 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8(3):241-54.
- Pollard TD, Borisy GG. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112(4):453-65.
- Pourati J, Maniotis A, Spiegel D, Schaffer JL, Butler JP, Fredberg JJ, Ingber DE, Stamenovic D, Wang N. 1998. Is cytoskeletal tension a major determinant of cell deformability in adherent endothelial cells? *Am J Physiol* 274(5 Pt 1):C1283-9.
- Raucher D, Sheetz MP. 1999. Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension. *Biophys J* 77(4):1992-2002.
- Ridley AJ, Hall A. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70(3):389-99.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70(3):401-10.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302(5651):1704-9.
- Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 153(6):1175-86.
- Sheetz MP. 2001. Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(5):392-6.
- Singhvi R, Kumar A, Lopez GP, Stephanopoulos GN, Wang DI, Whitesides GM, Ingber DE. 1994. Engineering cell shape and function. *Science* 264(5159):696-8.
- Somogyi K, Rorth P. 2004. Evidence for tension-based regulation of *Drosophila* MAL and SRF during invasive cell migration. *Dev Cell* 7(1):85-93.
- They M, Racine V, Pepin A, Piel M, Chen Y, Sibarita JB, Bornens M. 2005. The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol* 7(10):947-53.
- Wadsworth P. 1999. Regional regulation of microtubule dynamics in polarized, motile cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 42(1):48-59.

- Wood W, Jacinto A, Grose R, Woolner S, Gale J, Wilson C, Martin P. 2002. Wound healing recapitulates morphogenesis in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol* 4(11):907-12.
- Xu J, Wang F, Van Keymeulen A, Herzmark P, Straight A, Kelly K, Takuwa Y, Sugimoto N, Mitchison T, Bourne HR. 2003. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* 114(2):201-14.
- Zand MS, Albrecht-Buehler G. 1989. What structures, besides adhesions, prevent spread cells from rounding up? *Cell Motil Cytoskeleton* 13:195-211.
- Zand MS, Albrecht-Buehler G. 1992. Mechanical perturbation of webbed edges in 3T3 cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 21:15-24.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Cell convexity.

(A) RPE1 cells migrating on an homogeneous fibronectin coating observed by phase contrast microscopy. Cells display concave edges. (B) RPE1 cells (bottom row) constrained on fibronectin micropatterns (top row). From left to right cells are shown on [frame], [V], [T], [tripod] micropatterns. Cells display a similar equilateral triangular convex contour on convex or concave micropatterns. Triangle edge length is 46 μm .

Figure 2. Spreading and reinforcement.

(A) Time lapse acquisition of a cell spreading on a [V] observed in RICM. Black areas reveal intimate contact with the substrate whereas grey or white areas correspond to membrane lying upon the substrate. Cell spreading on the adhesive micropattern lasted 36 minutes (first six pictures). Virtual lines connecting adhesive zones appeared tangent to the unattached membrane. Spreading was followed by a local progressive reinforcement of tension revealed by the increase of the curvature radius of the unattached edge. The portion of circle showing the curvature at $t=39$ min is reported on each of the six last pictures. It is more curved than the portion of circle drawn on at $t=1\text{h}56\text{min}$. Triangle edge length is 46 μm . (B) Curvature radius, measured on the time lapse acquisition, increased almost linearly during the entire process.

Figure 3. Cell contractility ensures cell convexity.

(A) Actin cytoskeleton revealed by phalloidin staining in control conditions (left column) or in the absence of contractility upon 10 μM Y27632 treatment (right column). From top to bottom cells are shown on [frame], [V], [T] and a [tripod]. Cell contour was not affected by the absence of contractility if cells were attached on a convex micropattern such as the [frame], but loosed its convexity if cells were attached on a concave micropattern. Triangle edge length is 46 μm . (B) Curvature measurements of cell unattached edges in control conditions (left, [V]: $n=113$, [T]: $n=242$, [tripod]: $n=266$) and in the absence of contractility (right, [V]: $n=105$, [T]: $n=132$, [tripod]: $n=248$). Error bars correspond to standard deviations. Membrane curvatures on each micropattern appeared undistinguishable in the control conditions whereas they were significantly different in the absence of contractility.

Figure 4. Cell cytoskeleton responds to adhesive micropattern anisotropy.

Actin and vinculin labellings revealed a rather isotropic and scattered organisation of the stress fibres on [frame] (top row). In contrast the spatial distribution of stress fibres was anisotropic on concave micropatterns such as [V], [T], [tripod] or [U] (from top to bottom). Focal adhesions concentrated on cell apices flanking the non-adhesive edges along which actin fibres accumulated more than anywhere else in the cell. As a rule, stress fibres were stronger upon non-adhesive edges. Their spatial distribution corresponded to the mirror image of the external adhesive boundary conditions. Triangle edge length is 46 μm .

Figure 5. Average distributions of vinculin and actin.

Pictures show the average distributions of vinculin (left) and actin (right) of cells plated on [V], [T], [tripod] and [U] from top to bottom. Average distributions were obtained by calculating the average intensity of each pixel over several pictures. The intensities were colour coded as shown on the first row. The two ranges for the colour codes of actin and vinculin average distributions were identical for all the micro-patterns. The range corresponded to the higher and the lower intensity of vinculin and actin of the cells plated on [V]. The average distributions highlighted the reproducibility of the distributions shown in

figure 4 where the stress fibres appeared stronger upon non-adhesive edges. Triangle edge length is 46 μm .

Figure 6. Stress fibres upon non-adhesive edges are stronger than upon adhesive edges in HeLa cells.

HeLa cells were plated on three different fibronectin micropatterns having the same triangular envelope. Cells were fixed in G2. Pictures show fibronectin micro-pattern, vinculin immunolabelling, filamentous actin revealed by a phalloidin staining and a 4x magnification of the bottom right corner of the merge images. Stress fibres along the edges of the fully adhesive micropattern had a rather similar thickness (top row). Stress fibres along non-adhesive edges and the corresponding focal adhesions were thicker and larger than those along adhesive edges on [L] (middle row) and on [bar-dot]. Large and small arrowheads point to thick and thin actin/vinculin structures respectively. Bars represent 5 μm .

Figure 7. Stress fibre strength depends on local and global parameters.

(A) Focal adhesions and stress fibres measurements. Pictures show focal adhesions and actin cables using the high threshold on [V]. Triangle edge length is 46 μm . Graphs show focal adhesions and actin cables areas and intensities on various micropatterns (Focal adhesion, [U]: n=18, [V]: n=20, [T]: n=40, [tripod]: n=72; Stress fibres, [U]: n=9, [V]: n=10, [T]: n=20, [tripod]: n=36). Error bars correspond to standard deviations. Short stress fibres (in cells plated on [U]) are significantly weaker than long stress fibres (in cells plated on [V]). Single stress fibre in a cell plated on [V] was stronger than stress fibres on [T] or [tripod] containing two or three stress fibres respectively. (B) Total actin and vinculin signal measurements. Pictures show focal adhesions and actin cables using the low threshold on [V]. Graphs show integrated pixel intensities. (vinculin and actin, [U]: n=9, [V]: n=10, [T]: n=10, [tripod]: n=12). Error bars correspond to standard deviations.

Video 1. Time-lapse acquisition in RICM of a cell spreading on a [V].

Note the fast spreading on the adhesive edges (black areas correspond to attached membrane) and the slow curvature reduction of the unattached membrane (white areas correspond to unattached membrane) revealing the local increase of membrane tension. Last picture shows the cell in phase contrast. Time is in hours:minutes:seconds. Triangle edge length is 46 μm .

FIGURE 1

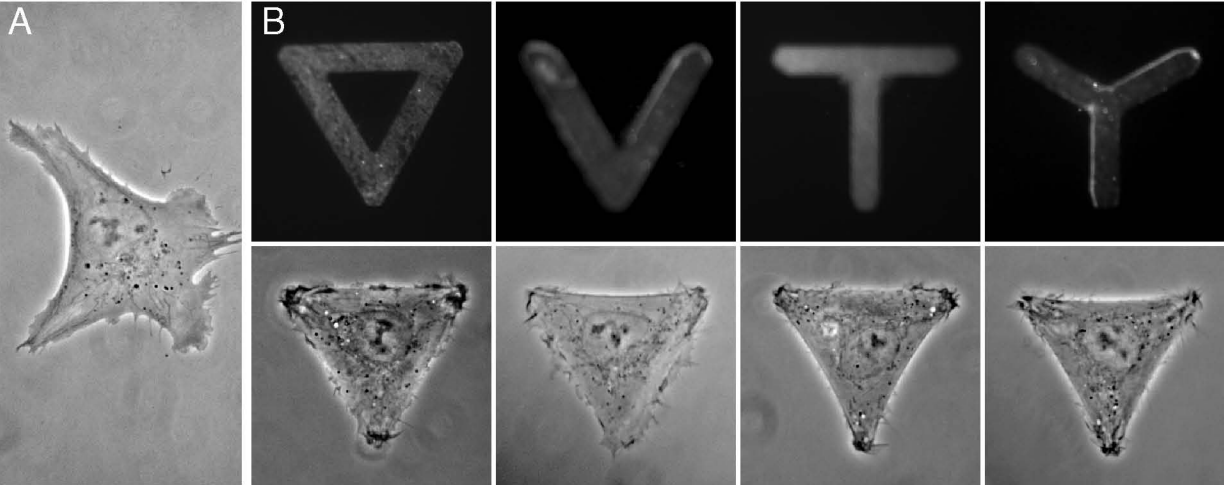


FIGURE 2

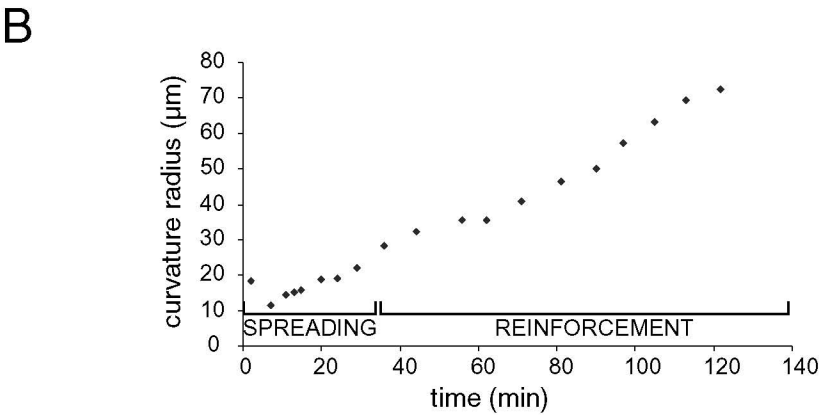
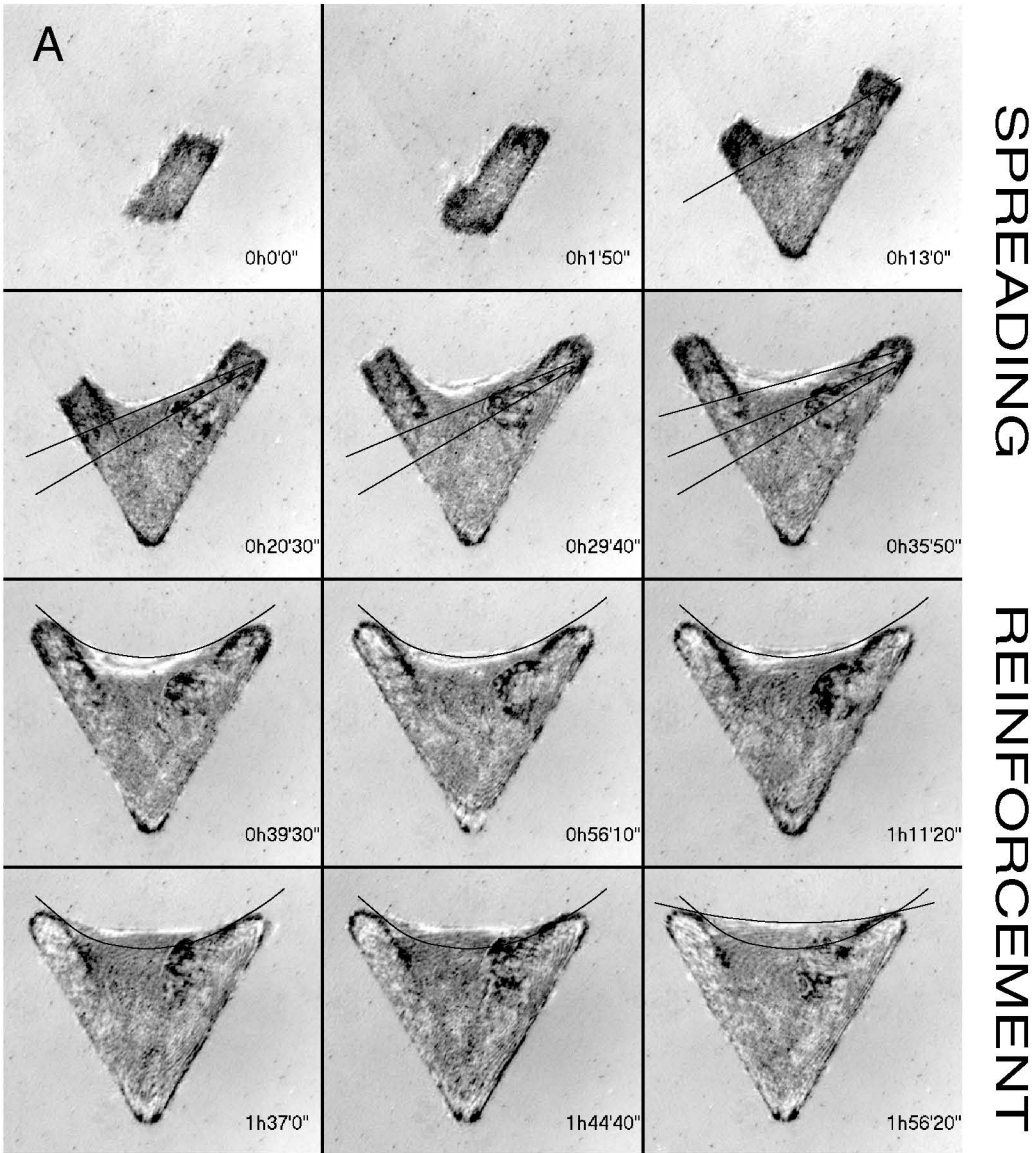
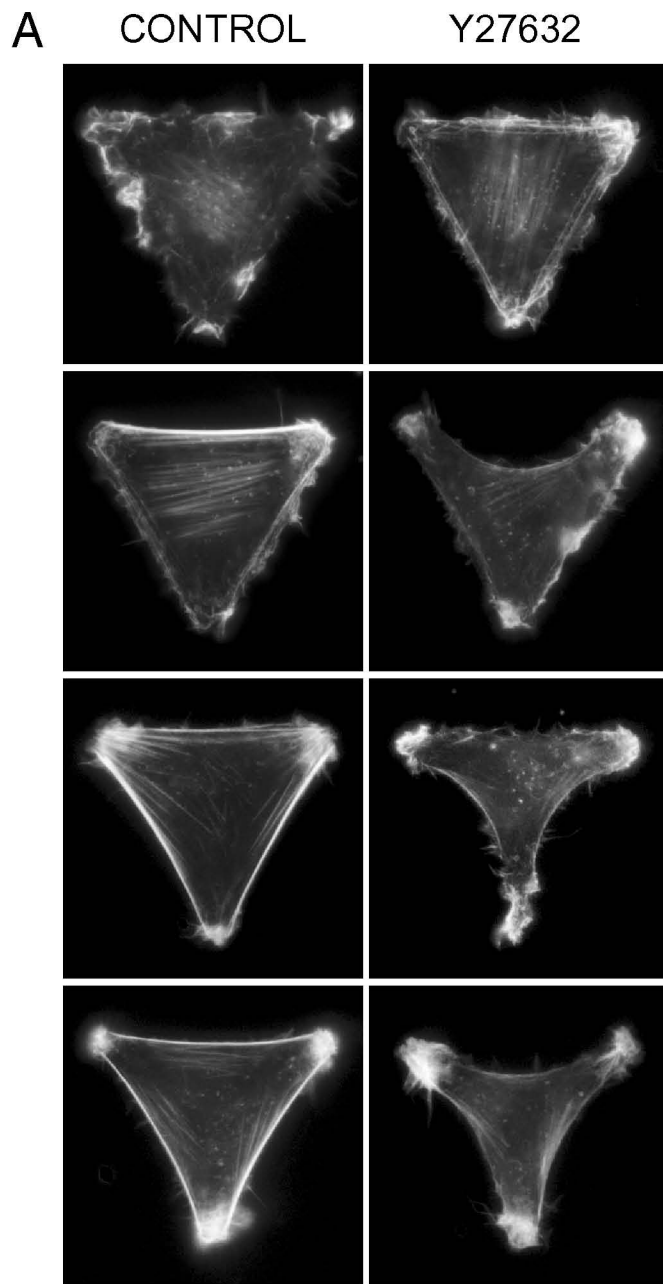


FIGURE 3



B curvature radius of free membrane

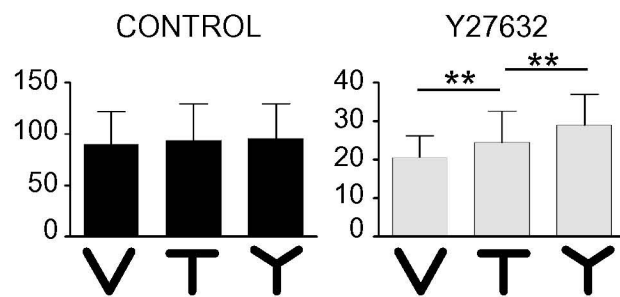


FIGURE 4

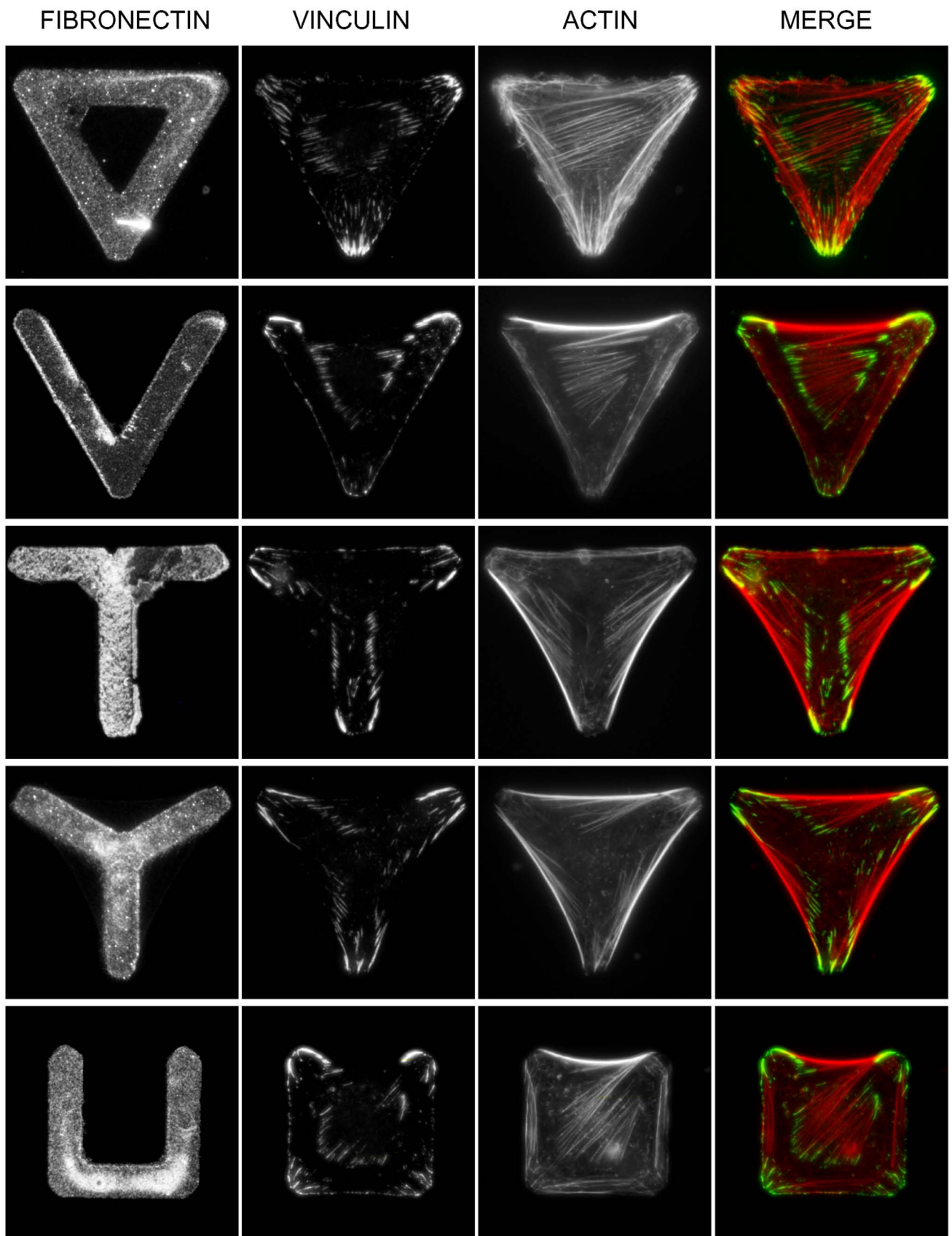


FIGURE 5

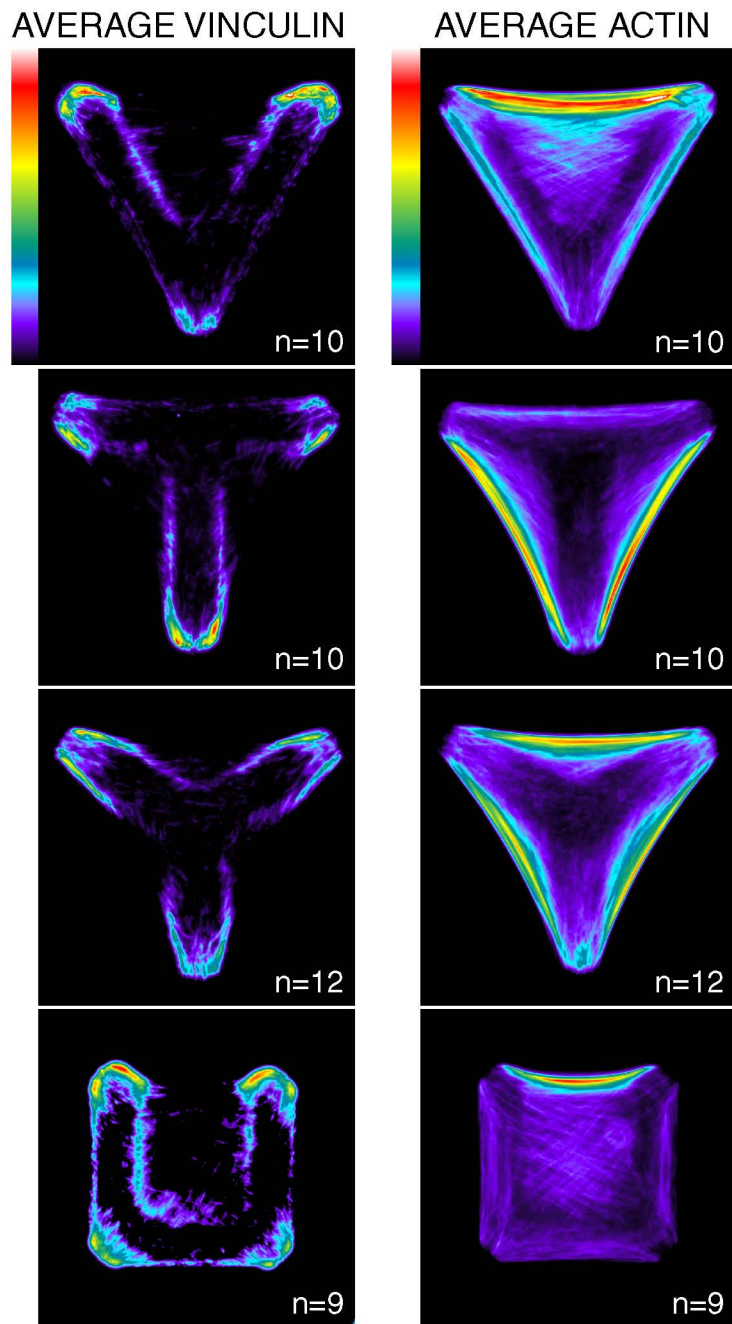


FIGURE 6

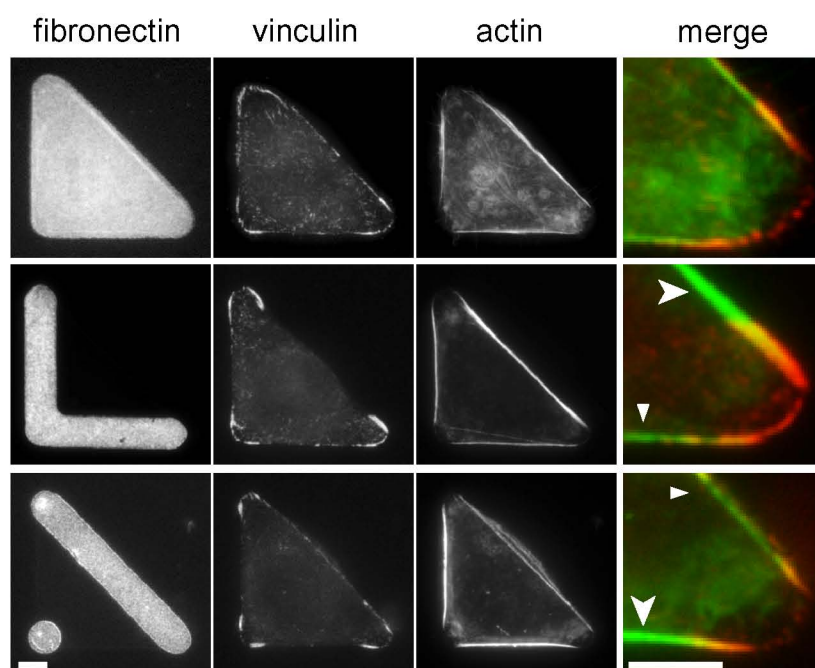
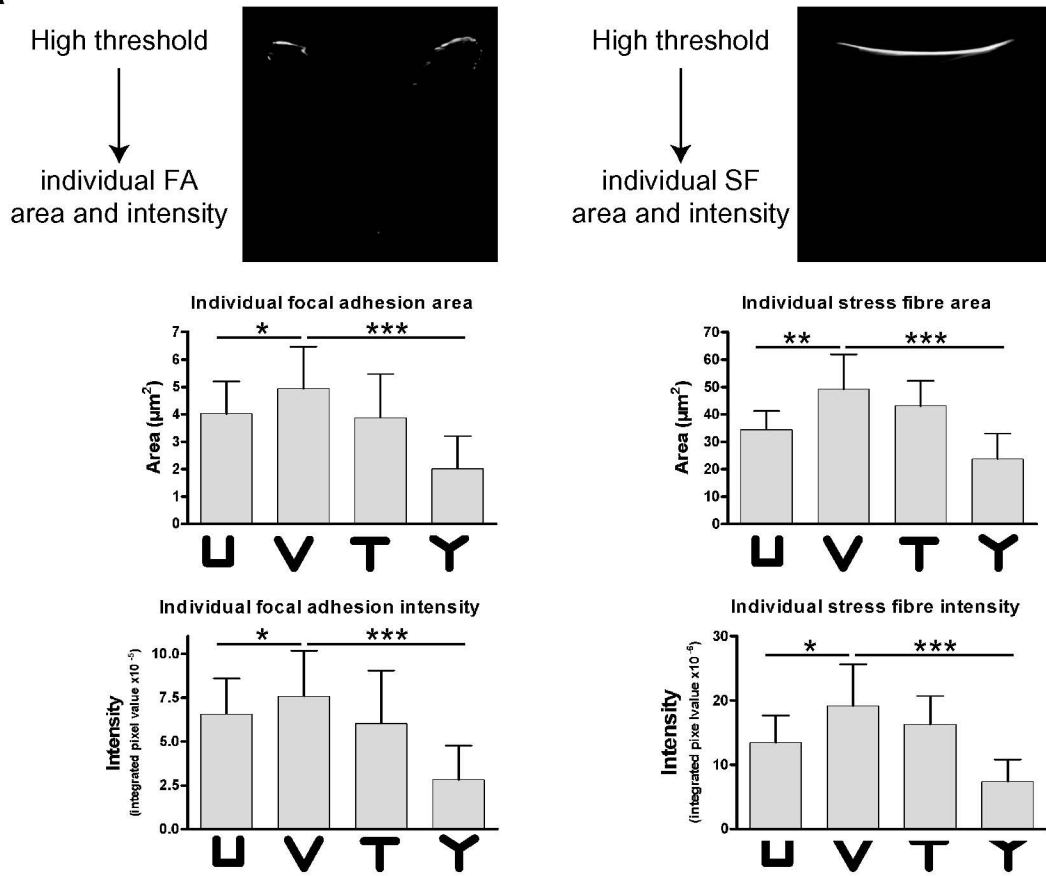
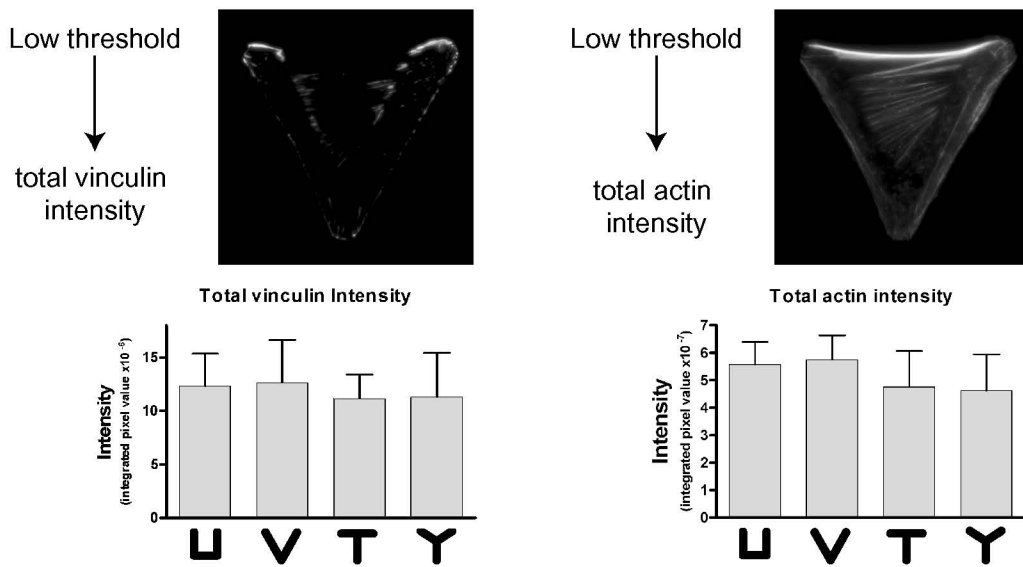


FIGURE 7

A



B



II-3 Critiques et discussion sur l'étude des fibres de stress

Nous ferons d'abord quelques critiques au sujet du contenu de l'article en lui-même, puis nous proposerons quelques réflexions personnelles et suggestions d'études à effectuer.

Certaines observations n'ont pas été commentées dans le manuscrit. Les **réseaux actine-adhésions sont différents** dans les HeLas et dans les RPE1. Comment se l'explique-t-on ? Ce sera l'occasion de montrer que ce réseau est encore différent dans les L929 et donc que ces architectures sont dépendantes de réglages intracellulaires fins propres à chaque type cellulaire et que donc les micro-patrons permettent de phénotyper le réseau d'actine des cellules. De plus seule la partie contractile du réseau d'actine est étudiée ici alors que dans l'introduction nous avons expliqué que le système actine était un ensemble qui comprenait la contraction et les **protrusions**. Par ailleurs, certaines hypothèses sont formulées sur le **lien entre l'actine et la membrane plasmique** qui, pour l'instant, demandent encore à être justifiées, ce qui pourrait faire l'objet de mesures supplémentaires intéressantes. Et enfin, aucun **mécanisme moléculaire** n'est proposé alors que ce système expérimental semble particulièrement bien adapté pour ça.

L'état de contraction observé est assez inhabituel. Dans des cellules en culture le mouvement des cellules empêche d'observer un état stationnaire de l'architecture intracellulaire. Nous nous demanderons alors **comment s'établit et se maintient un tel état de contraction**. L'article montre que les cellules observées, qui s'étalent toutes sur des surfaces égales, ont toutes la même quantité d'actine et de vinculine associée à des fibres de stress et donc qu'elles développent toutes la même contraction. Quel est le facteur limitant ?

La seule situation connue où l'on retrouve un état stationnaire est l'observation des **tissus**. Il est frappant de constater que les mécanismes mis en œuvre y sont très similaires à ceux observés sur les micro-patrons. Lorsqu'on pense aux tissus et aux contraintes mécaniques, il vient immédiatement à l'esprit l'idée de regarder des cellules musculaires et de profiter de ce système expérimental pour étudier le comportement des **myofibrilles**.

Enfin, il semble clair qu'un système aussi reproductible devrait pouvoir servir à faire des tests. En ayant à disposition une architecture cellulaire prédictible il devient possible de d'analyser les effets de certaines substances chimiques ainsi que l'inactivation d'un grand nombre de gènes dans des systèmes de **criblage à haut débit**. C'est dans cette optique que nous avons déposé le brevet publié en Annexe 2.

Structure du réseau d'actine

Il existe une **différence intéressante entre le réseau adhésion-actine** des HeLa et celui des RPE1. Dans les HeLa, les adhésions sont presque toutes à la périphérie de la cellule, alors que dans les RPE1, il y en a beaucoup le long de tous les bords des patrons adhésifs. Dans les RPE1, il semble que les adhésions et les petits câbles internes sont les marques des différentes étapes de l'étalement des cellules. A chaque progression de leur étalement, les cellules installent de nouvelles adhésions sur lesquelles elles tendent de nouveaux câbles. Ces ancrages temporaires semblent maintenus après l'étalement puisqu'on les voit encore plusieurs heures après l'étalement des cellules. Chez les HeLa on peut se demander si la technique d'étalement est différente. On pourrait penser qu'au lieu d'établir de nouveaux ancrages les précédents sont déplacés. En effet, il a été montré que ces assemblages sont mobiles et peuvent fusionner (Zimmerman et al., 2004). Les deux processus ont probablement lieu. On apprendrait beaucoup sur ces mécanismes en filmant le mouvement de ces câbles en TIRF dans des cellules exprimant de l'actine-GFP. En effet un modèle théorique propose que les concentrations d'intégrines libres et la tension exercée sur les adhésions guident les adhésions vers un éloignement maximal (Novak et al., 2004). Ce mécanisme pourrait participer à la concentration des adhésions vers les extrémités de la cellule. On peut également imaginer que les adhésions sont à la périphérie car elles guident la progression de l'étalement et que celles qui sont soumises aux plus grosses contraintes (angles, bords non adhésifs) grossissent du fait de la tension locale.



Les **L929** sont des cellules fibroblastiques de souris issues d'une lignée transformée très agressive. Leur cytosquelette d'actine n'a pas été décrit dans l'article car, contrairement aux HeLa et aux RPE1, il est beaucoup moins reproductible d'une cellule à l'autre. Elles sont très actives. Elles forment beaucoup de protrusions de façon apparemment erratique. Par conséquent, elles bougent beaucoup mais migrent aléatoirement. Sur les patrons adhésifs, elles produisent également de nombreuses protrusions tout autour d'elle. L'organisation de leurs fibres de stress est très différente de celle des HeLa ou des RPE1. Elle est centripète ce qui semble cohérent avec la formation de protrusions dans toutes les directions. Elles répondent beaucoup moins précisément à la géométrie du patron adhésif au cours de leur division que les HeLa ou les RPE1 (voir discussion article division).

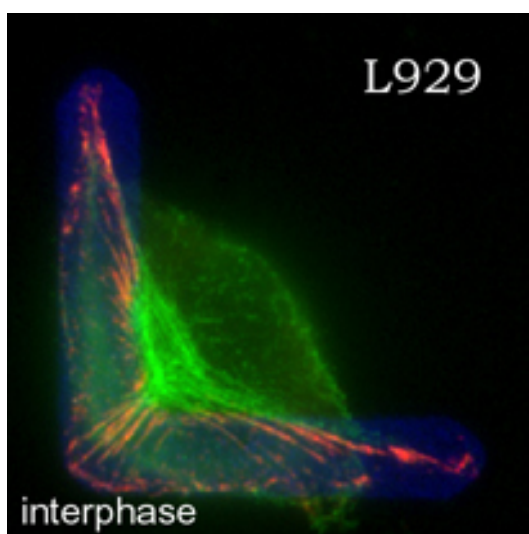


Figure 2.31
Fibres de stress dans une cellule L929. L'actine est en vert et la vinculine (adhésions focales) en rouge. Le patron de fibronectine est en bleu. Les protrusions ne sont pas visibles car la cellule a été perméabilisée avant la fixation afin de ne conserver que l'actine et la vinculine engagée dans les fibres de stress.

Réseau d'actine dans son intégralité

L'organisation spatiale des fibres de stress est établie en parallèle avec celle de l'activité de l'actine au cortex. Dans cet article la description des **protrusions membranaires** n'est pas faite car elle est présentée dans l'article sur les divisions. Il faut toutefois bien réaliser que c'est tout l'ensemble du système actine qui répond à l'environnement adhésif. Les fibres de stress sont présentes dans les zones d'activité de RhoA, partout ailleurs, Rac est actif, et la cellule forme des protrusions. La ségrégation spatiale de ces RhoGTPases, et celle des différents assemblages de l'actine, définissent des domaines dans la cellule. Ces domaines affectent la polymérisation des microtubules et le recrutement sélectif de certaines molécules impliquées dans la polarité cellulaire. On constate donc que l'asymétrie de l'environnement adhésif de la cellule a induit une réorganisation profonde de l'équilibre mécanique de la cellule. Cette réorganisation influe directement sur la localisation des compartiments cellulaires. C'est l'objet de l'article intitulé « *Adhesive control of cell polarity* ».

Actine et membrane

Dans notre article, nous avons supposé que la tension membranaire dépend de l'adhésion du feuillet lipidique avec le cortex d'actine et que la tension de ligne dépendait de la tension de la fibre de stress sous-jacente. Ces hypothèses pourraient être mises à l'épreuve :

- Des mesures par **AFM** permettraient de sonder la rigidité corticale. Il serait ainsi possible de savoir si les tensions dans les fibres de stress sont transmises à la membrane.
- La mesure des **coefficients de diffusion** de petites billes, libres dans le cytoplasme ou attachées à des phospholipides dans la membrane, seraient une évaluation de la **viscosité locale**.

Ces mesures permettraient de mieux caractériser la polarité mécanique de la cellule en réponse à la géométrie de l'environnement.

Mécanisme moléculaire

Un article récent montre que la **zyxine**, initialement présente dans les contacts adhésifs, décore toutes les fibres de stress pendant l'augmentation de la tension (Yoshigi et al., 2005). Elle est directement nécessaire à l'augmentation de la tailles des fibres. Les auteurs suggèrent que cette molécule pourrait être impliquée dans la mécano-sensation au niveau des contacts focaux. Ce type de marquage dans des cellules sur micro-patrons devrait permettre de mieux visualiser les zones de tension et d'analyser en détail la décoration de la fibre au fur et à mesure que la tension augmente en fin d'étalement. La vinculine, sur les images présentées dans notre l'article, mais aussi sur beaucoup d'autres que nous n'avons pas présentées, montre aussi une capacité à décorer la fibre dans sa partie proche des contacts. La formation de ce manchon pourrait bien être, elle aussi, dépendante de la tension.

Etablissement et maintien de la tension

Il est assez intéressant de constater que les cellules atteignent un état stationnaire qui semble demander une importante dépense énergétique. Pourquoi la cellule ne finit-elle pas par relaxer ?

Les expériences de Daniel Riveline montrent qu'il existe une boucle de rétroaction positive entre la tension externe et la tension interne (Riveline et al., 2001). En tirant sur la cellule, les adhésions grossissent et la tension interne monte (on comprend que les cellules n'aient pas développé l'effet inverse auquel cas la moindre contrainte les déformeraient jusqu'à la rupture). Il existe pourtant un **seuil à cette tension**.

Quels sont les paramètres qui définissent ce seuil ? Est-ce le niveau d'activité des myosines ? La résistance des fibres d'actine ? Celle des adhésions ? Que se passe-t-il lorsque le seuil est atteint ? Peut-être que si la tension est trop élevée, les adhésions se détachent du substrat avant que la tension maximale que peut supporter la fibre ne soit atteinte. Il serait intéressant d'imposer une suractivation de Rho et de suivre l'évolution des câbles et des adhésions.

La tension sur le [V] est-elle la tension maximale ? Comment imposer géométriquement une tension encore plus élevée ? Si les autres bords n'étaient pas droits mais courbe (comme l'imposerait une forme en C) la contractilité des bords adhésifs et droits pourrait être déplacée vers l'unique zone de contraction.

En approchant le câble d'actine avec une fibre souple, il devrait être possible de le pousser vers l'intérieur pour voir la réaction de la cellule.

Dans les expériences de Riveline, les adhésions grossissent immédiatement lorsque la tension est exercée mais que se passerait-il ensuite si la tension externe était maintenue (comme dans notre cas où l'hétérogénéité des contraintes externes est constante) ? Les adhésions continueraient-elles de grossir ou faudrait-il pour cela que l'on continue à augmenter la contrainte ?

Par ailleurs, la possibilité de **mesurer l'augmentation** de la tension à l'aide du rayon de courbure, comme c'est le cas au-dessus de la zone non-adhésive sur un [V], devrait apporter aussi beaucoup d'informations sur la dynamique de cette contraction et les cinétiques d'assemblage qui participent à cette augmentation locale de tension. Le profil apparemment linéaire de cette augmentation demanderait d'être étudié plus en détail. Y27632 inhibe la contractilité assez rapidement. Il serait instructif de comparer la cinétique de contraction avec celle de relaxation. L'établissement de la tension et le maintien de cette tension peuvent être deux voies distinctes. La première relève de la sensation locale de la tension et de la réponse immédiate, comme un réflexe, la seconde semble être intégrée à l'échelle de la cellule entière, peut-être par d'autres voies de signalisation.

Quel est le facteur limitant qui fait que toutes les cellules mesurées semblent développer la même tension totale ? Au vu des cellules fixées sans perméabilisation il semble qu'il reste de l'actine libre dans le cytoplasme. Est-ce la quantité de myosines qui est limitante ? Celle de son activateur ? Il serait intéressant de refaire toutes ces mesures sur des cellules à qui on imposerait des surfaces d'étalement plus petites et plus grosses.

Tissus

La structure mécanique établie par les cellules en réponse au patron adhésif est remarquable. Cette façon qu'ont les cellules de **contrebalancer les contraintes externes** par la régulation des tensions internes est une manifestation évidente de la tenségrité du réseau d'actine. Ainsi, la distribution des tensions dans le corps cellulaire vient compenser le soutien mécanique qu'offre l'environnement. L'adhésion induit la polymérisation d'actine dans des protrusions membranaire, le manque d'adhésion induit la contraction de l'actine. Ce mécanisme est certainement fondamental pour l'intégrité mécanique des tissus : un vide va générer des tensions autour de lui qui participe à sa fermeture alors que les cellules vont s'étaler et s'écarter d'une accumulation locale de contacts adhésifs en faisant des protrusions. En effet, à la périphérie d'un feuillet de cellules qui n'est pas attaché à un substrat ou à d'autres cellules on constate un renforcement des cables d'actine (Figure 2.29).

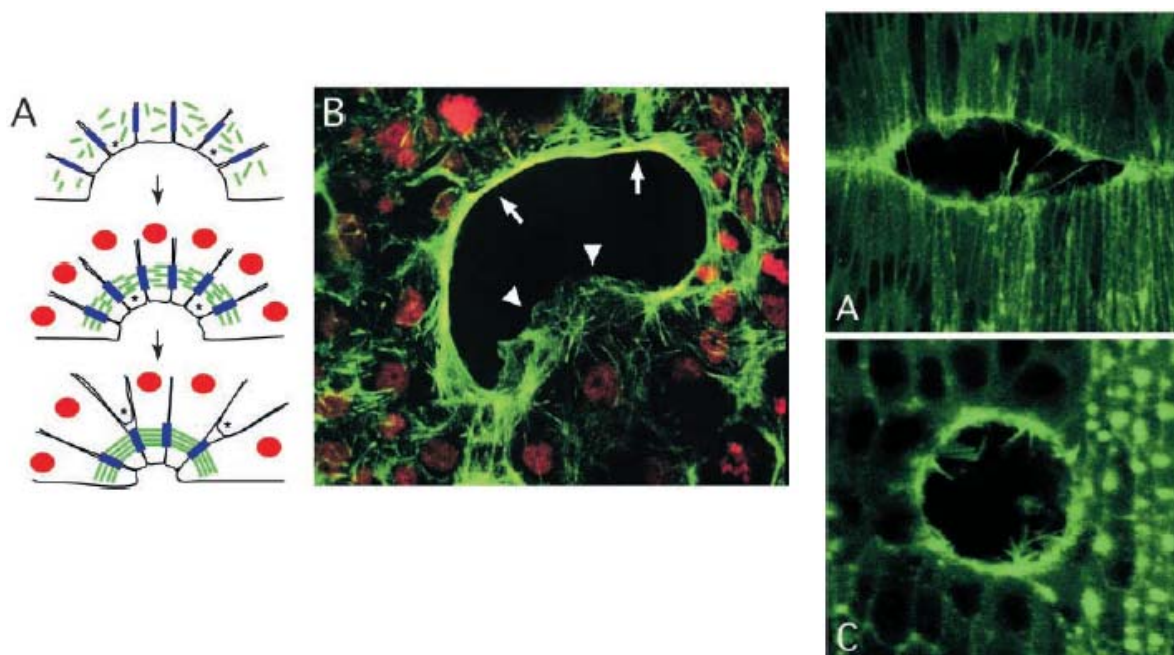


Figure 2.29 Les cellules renforcent la tension autour des trous.

Le mécanisme « actin purse string » permet aux cellules au bord d'un trou d'assembler un gros câble d'actine trans-cellulaire dont la contraction va permettre la fermeture du trou (à gauche). Ce mécanisme se retrouve aussi bien dans la fermeture de l'embryon de drosophile (droite A) que dans la réparation d'une blessure d'un épithélium (droite B) (Martin and Parkhurst, 2004).

Les cellules sentent la contrainte externe et s'alignent le long de cette contrainte sur de grandes distances (Sawhney and Howard, 2004). Ceci procure une **intégrité mécanique au tissu**. Ainsi la réponse observée dans cette étude sur une cellule devrait se propager sur les cellules voisines dans une architecture multi-cellulaire. En effet les tensions se distribuent de façon hétérogène au sein des assemblages multicellulaires qui eux aussi semblent répondre à des contraintes géométriques locales comme des angles (Nelson et al., 2005). Des développements ultérieurs de la technique de micro-patrons adhésifs vers la contrainte de plusieurs cellules devraient apporter beaucoup d'informations sur le rôle des contraintes mécaniques dans la morphogénèse.

Cellules musculaires et myofibrilles

Une fibre de stress n'est pas un ensemble de câbles homogènes. **Les myofibrilles**, qui sont une forme particulière de fibre contractile, sont effectivement inhomogènes. Les monomères d'actine et les myosines s'échangent entre la fibre et le cytoplasme à un rythme plus grand au milieu de la fibre qu'à ses extrémités. L'espacement entre les bandes d'actinine et de myosine est plus court aux extrémités de la fibre accrochées au substrat (Peterson et al., 2004). La dynamique d'assemblage permanent dans ces fibres et leur inhomogénéité pourrait être une des caractéristique qui assurent la capacité de réponse du système à des changements externes. Ces fibres, comme les fibres de stress, pourraient être en permanence en train de se tendre et se détendre de façon à évaluer le module élastique environnant. L'utilisation de substrats flexibles permettrait de mieux comprendre cette dynamique et de mesurer les tractions exercées par les cellules. Les essais d'Emilie Dressaire, en stage de DEA au laboratoire, n'ont pas été concluants. Sur les piliers de PDMS utilisés (Tan et al., 2003; du Roure et al., 2005) les cellules s'enfoncent entre les piliers. Les patrons sont difficiles à réaliser sur des substrat en polyacrylamide car ils sont humides et fragiles (Beningo K., 2002). L'idéal serait d'être capable d'imprimer les patrons sur un film de PDM suffisamment souple pour pouvoir être déformé par les cellules. Les expériences menées dans l'équipe de Kit Parker à Harvard sur des cellules cardiaques contraintes par micro-patrons adhésifs (Figure 2.30) devraient permettre de commencer ce type d'étude. Des patrons inhomogènes pourraient certainement apporter beaucoup d'informations supplémentaires sur l'organisation spatiale et la sensibilité mécanique de ces fibres.

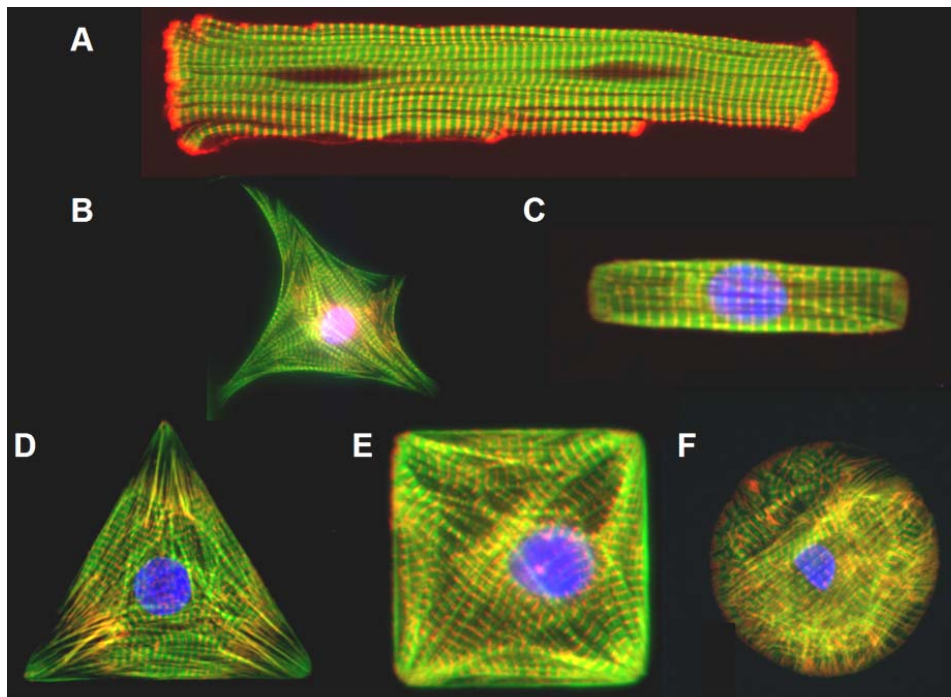


Figure 2.30 Organisation des myofibrilles de cellules musculaires en réponse à la géométrie imposée. La myosine est en rouge et l'actinine en vert.
K.K. Parker website.

Les myofibroblastes sont des systèmes de choix pour l'étude de la mécanotransduction. Le type d'adhésion développé (composition, taille) est directement dépendant de la contrainte

mécanique. Cette contrainte affecte même leur mode de différenciation (Grinnell, 2003; Hinz and Gabbiani, 2003).

Crible haut débit

Ce sont souvent des traitements pharmacologiques (comme l'hyper activation de Rho) qui permettent d'induire la contraction des fibres de stress et l'étude de la contractilité cellulaire. Ici c'est un effet purement géométrique et mécanique. Cela pourrait permettre de tester l'effet de nombreux composés sur la contractilité des cellules. Notamment ceux présent dans des **bibliothèques chimiques** dont on attend, a priori, aucun effet mais qui pourraient être révélés dans ce type de situations. Il suffirait pour cela de déposer les cellules dans des dizaines de puits au fond desquels des patrons en [V] seraient imprimés puis de les fixer trois heures après et de marquer l'actine. Puis, une acquisition et une quantification automatisée suffiraient à deceler les drogues capables d'empêcher la contraction. C'est ainsi que la blebbistatin a été découverte. Le test utilisé était l'asence contraction de l'anneau d'actine en mitose ce que l'on peut détecter par la présence de cellules bi-nuclées. Les micropatterns offrent une lecture plus simple et plus fiable, car plus spécifique de l'exercice de la tension.

III- La position du noyau, du centrosome, de l'appareil de Golgi et l'organisation du réseau de microtubules en réponse au patron adhésif

III-1 contrôle de la polarité cellulaire par la géométrie du patron adhésif – ARTICLE

L'article présenté ici décrit une étude de la polarité des cellules sur micro-patrons adhésifs. Le rôle des adhésions dans la polarité cellulaire au sein des tissus est bien connu. La distribution spatiale des adhésions cellule-cellules joue également un rôle important dans la polarité des MDCK au sein de leur assemblage en épithélium dans des systèmes in vitro de filtres qui leur offrent un espace confiné. Dans une boîte de culture classique, le fond procure aux cellules un substrat homogène et infini. Les cellules bougent en permanence et leur polarité devient aléatoire et imprédictible. La polarité interne indiquée par l'axe noyau-centrosome semble parfois complètement décorrélée de la polarité du système actine. Les micro-patrons adhésifs permettent aux cellules d'atteindre un état stationnaire et un équilibre mécanique dont la simple description permet déjà de mieux comprendre les lois qui régissent l'organisation de leur polarité.

L'article décrit **trois propriétés fondamentales**.

La première est que l'**orientation du vecteur noyau-centrosome** est sensible à la distribution spatiale des zones adhésives de l'environnement. Cet effet est indépendant de la géométrie de la cellule.

La seconde est que même si le cortex est polarisé, et que donc la distribution de ses composants y est asymétrique, **le centrosome se place systématiquement au centre de la cellule**. Le noyau est positionné près des zones non-adhésives où la cellule développe des fibres de stress.

La troisième est que les **microtubules longent les fibres de stress**. Les microtubules sont nucléés de façon isotrope. En périphérie, l'isotropie n'est pas conservée. Les extrémités « + » des microtubules font des pauses en arrivant dans des zones de la cellule accrochées au substrat. Si, par contre, elles arrivent sur une fibre de stress elles vont la longer jusqu'à son attache sur le substrat où elles sont nombreuses à s'accumuler.

Adhesive Control of Individual Non-Migrating Cell Polarity

Manuel Théry^{1,4}, Victor Racine², Matthieu Piel¹, Anne Pépin³, Ariane Dimitrov¹, Yong Chen^{3,4}, Jean-Baptiste Sibarita², Michel Bornens¹

¹Biologie du cycle cellulaire et de la motilité, UMR144, CNRS, Institut Curie, 26 rue d'Ulm 75248 Paris Cedex 05, France.

²Service d'Imagerie, UMR144, CNRS, Institut Curie, 26 rue d'Ulm 75248 Paris Cedex 05, France.

³Groupe nanotechnologie et dispositifs microfluidiques, UPR20, CNRS, Laboratoire Photonique et Nanostructures, Route de Nozay, 91460 Marcoussis, France.

⁴Present address, Laboratoire Biopuces, DRDC / CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France.

⁵Present address, Ecole Normale Supérieure, 24 rue Lhomond, 75231 Paris, France.

ABSTRACT

The establishment of epithelial cell polarity is an essential step of tissue morphogenesis and renewal that depends on positional information provided by the extra-cellular environment (1, 2). Although several lines of evidence have highlighted the importance of molecular interactions with the extra-cellular matrix (ECM) to the establishment of cell polarity (3-7) the hypothesized role of the spatial distribution of these interactions has never been experimentally demonstrated (8). To explore the effect of ECM geometry onto the orientation of cell polarity we used fibronectin micropatterns (9). The use of combinations of adhesive and non-adhesive zones in the imposed area of cell spreading allows us to plate individual epithelial cells within controlled asymmetric adhesive environments. The effect on the overall cell compartmentalization was investigated by quantifying the spatial organization of the actin network and associated proteins, the spatial distribution of microtubules and the positioning of nucleus, centrosome and Golgi apparatus. Thereby we showed that the polarity axis defined by the surface and internal cell asymmetry were oriented relative to the asymmetry of the spatial distribution of the ECM. Eventually the manipulation of ECM geometry allowed us to control and modulate the orientation of individual cell polarity on cell micro-arrays.

RESULTS AND DISCUSSION

Cell polarity is defined by the expression of a morphological and functional asymmetry of cell compartmentalization relative to a polar axis. Cell adhesion regulates many morphogenetic processes during the development and orderly turnover of tissues (10). Epithelial cells orient their polarity in response to cell-cell and cell-ECM interactions (1). Cell-cell contacts, mediated by cadherins, can initiate the segregation of proteins within the plane of the membrane (11, 12). Cell adhesion to ECM, mediated by the super family of integrins, provides a spatial cue for the establishment of the asymmetric distribution of cell surface receptors (7).

Extracellular contact sites induced the local assembly of cytoskeletal and signaling protein at contacting membranes (13, 14). Localized actin cytoskeleton assembly serves as a scaffold for recruitment of signaling proteins such as APC that further guide microtubule growth (15, 16). The crosstalk between cytoskeletal filaments propagates extracellular cues from cell surface to cell interior (17-19). The isotropic astral array of microtubules can reorganize into a polarized array by selective stabilization of Mt plus ends at cell surface cortex (20, 21). Nucleus and centrosome reorient in the cytoplasm along an axis of polarity relative to position of the cue(s) (22, 23).

This led Yeaman *et al.* to the famous proposal that establishment of structural asymmetry in the plasma membrane was the first critical event to the orientation of cell polarity (8). According to them, the extrinsic spatial cues mediated by cell adhesion physically and molecularly define contacting and non contacting surfaces whose asymmetric distribution would be the precursor of membrane and thereby overall cell polarity. Thus far the importance of cell-ECM interactions to epithelial cell polarity has been highlighted by mutations or function-blocking antibodies affecting ECM proteins or their surface receptors (24, 25). The role of the asymmetric geometry of cell-ECM interactions in the orientation of cell polarity has never been directly demonstrated. This issue can be tackled by the use of concave fibronectin micropatterns imposing cells to spread upon both adhesive and non adhesive zones whose spatial disposition can induce a structural asymmetry in the plasma membrane (9, 26).

We first analyzed whether the cell adhesive pattern asymmetry had any effect on cell surface polarity of human Retinal Pigment Epithelial (RPE1) cells. The presence or absence of adhesion along cell edges affects the size of stress fibers which are larger if the edge is not attached to the substratum (9). Furthermore, by testing different fibronectin patterns we observed that a curved and adhesive border could almost prevent the development of stress fibers. Thus it appeared adapted to study cell polarity by plating cells on a [starship] shaped fibronectin micropatterns (Fig. 1A). This pattern imposed a curved adhesive border to one half of the cell and two non-adhesive edges to the other half. Cells were fixed four hours after deposition on the micropatterns.

Focal adhesions were the first cellular structures affected by the external pattern. Their spatial distribution was quantified by averaging the intensity of the labeling of vinculin over several cells (9). Vinculin-positive cell adhesions were asymmetrically distributed all along the cell contour: they were regularly distributed along the curved adhesive border and accumulated at the extremities of the non-adhesive edges from which they were absent (Fig. 1A). We then quantified the average distribution of the two exclusive states of actin dynamics: the stress fibers, revealed by the F-actin staining, and the polymerizing meshwork in membrane ruffles revealed by the labeling of cortactin. Stress fibers were almost absent from the curved adhesive border whereas they were strong upon the non-adhesive edges (Fig. 1A). Actin polymerization in membrane ruffles appeared restricted upon adhesive sides (Fig.

1A). Thus the actin network was reproducibly polarized into a polymerizing meshwork within membrane ruffles upon the adhesive border and contractile stress fibers upon the non-adhesive edges.

APC is an actin-binding protein known to have a higher affinity for protruding regions (15). The average distribution of APC over sixty cells on [starship] showed a clear asymmetric accumulation at the cell periphery in addition to its cytoplasmic localization (Fig. 1B). This peripheral localization was quantified on the average distribution by recording pixel intensities along a 2 μ m-wide line scan over the cell contour. APC was homogeneously distributed all along cell adhesive periphery and absent from non-adhesive edges. The actin network polarization appeared thus associated to an asymmetric cortical distribution of APC which accumulated in membrane ruffling zones (Fig. 1B). In addition, APC is known to participate to the connection between the actin and microtubule networks (15, 16, 27, 28). The microtubule plus end-binding protein EB1 associates with APC, this interaction ensures microtubule plus end capping at the cell cortex (29). Thus the asymmetry of the spatial distribution of APC would be likely to influence microtubule dynamics.

So we examined whether the cortical asymmetry was transmitted to the cell interior and analyzed the spatial organization of the microtubule array. Indeed, the immuno-labelling of tubulin showed that the density of the microtubule array was lower in angular sectors facing the two non-adhesive edges than toward the adhesive apices flanking these edges (Fig. 2C). The polarization of the microtubule array was further confirmed by the analysis of microtubule dynamics. Microtubule plus ends trajectories were visualized by recording EB1-GFP labellings in time-lapse microscopy. Strikingly, microtubules stopped growing when contacting the adhesive border whereas they keep polymerizing along non-adhesive edges up to the next adhesive site (Fig 2A, Video1). This behavior was then quantified by calculating the average spatial distribution of EB1 positive microtubule plus-ends over sixty cells (Fig. 2B). A line scan of pixel intensities along the cell contour showed that although the total amount of EB1 was similar on the upper and lower half of the cell, the density of EB1 was much lower along non-adhesive edges. The variation of intensity along the cell contour confirmed that the low amount of microtubule plus ends in the vicinity of non-adhesive edges was associated to an equivalent accumulation in the next adhesive site flanking these edges. These measures confirmed that the microtubule plus ends were not stabilized when contacting a non-adhesive edge and rerouted along these edges towards cell adhesive apices. Microtubule growth along non-adhesive edges and stabilization of plus ends at cell adhesion sites could possibly be due to the presence of stress fibers along these edges (30).

We finally analyzed whether the asymmetries of the actin and microtubule networks were further propagated to the internal compartmentalization by measuring the positioning of nucleus, centrosome and Golgi network. Nucleus, centrosome and Golgi apparatus of cells plated on [starship] micro-patterns were stained after fixation. Cy3-fibronectin micropattern were automatically detected in the acquired pictures and used as a reference for position measurements. Nucleus, centrosome and Golgi were automatically detected using wavelet segmentation (31). The positions of their centroids in the plane of the coverslip were recorded (Fig. 3A). Interestingly the centrosomes and Golgi were located close to the cell centroid whereas the nuclei were off-centered towards non-adhesive edges. Such a disposition is characteristic of polarized cells (22, 23). The calculation of the coordinates of the nucleus-centrosome vectors (Fig. 3B) and the angular distribution of their directions (Fig. 3B) showed that cells were reproducibly polarized. The nucleus-centrosome polarity axis was orientated relative to the asymmetry of the extracellular adhesive pattern. These results showed that cells were internally and cortically polarized in response to the asymmetry of the ECM.

We further investigated this correlation by specifically manipulating the geometry of cell adhesion and monitoring the orientation of cell polarity. Since the role of ECM asymmetry could be overridden by the influence of the elongation of cell shape (32) we designed adhesive micropatterns that imposed cells to have similar squared shapes but distinct adhesive patterns (Fig. 4). The internal polarity of RPE1 cells plated on fibronectin micropattern having a [cross] shape was compared to the polarity of cells plated on micropatterns with a [C], [K] or [arrow] shape (Fig 4). The four micropatterns had the same squared envelope. The [cross] had several symmetry axes whereas [C], [K] or [arrow] had a single symmetry axis, polarized by non-adhesive edges opposing adhesive edges. Cells plated on [crosses] displayed no preferential orientation of the nucleus-centrosomes vectors (Fig. 4). They appeared randomly polarized in the plane of the coverslip. In contrast, on micropatterns having a single polarized symmetry axis cells were reproducibly polarized. Cell polarity axis was orientated either along a square side on [C] and [K] or along a square diagonal on [arrow] (Fig. 4). In all cases centrosomes were positioned close to the cell centroid and the nucleus faced the non-adhesive edges (Fig S2). These results demonstrated that the internal polarity of individual non migrating cells, as judged by the position of the centrosome with respect to the nucleus, responds to the geometry of the cell adhesive environment.

Altogether these results demonstrated that the overall cell organization was governed by the geometry of external adhesive conditions. The asymmetry of the cell environment, due to the locations of adhesive and non-adhesive zones, biased the polarization process of RPE1 cells. The actin network became polarized in protruding and contracting regions depending on the presence or absence of adhesion. APC accumulated selectively upon adhesive edges. The growth of microtubule appeared modulated by this asymmetric composition of the cortex. Microtubules reaching the cell cortex in adhesive regions stopped growing whereas they keep polymerizing along non-adhesive edges. In addition the respective positions of the nucleus and the centrosome indicated that the internal cell polarity of these non migrating cells was tuned along the polarity axis of the adhesive environment (Fig. 5A)

Interestingly the cortical asymmetry did not affect the centrosome positioning at the cell centroid. Several models have been shown to account for the central positioning of the centrosome in cells having an homogeneous cortex as well as its off-center position when the cell cortex is asymmetric (33). Here the central positioning is ensured in spite of the asymmetry of the cell cortex. We propose that the rerouting of microtubules along non-adhesive cell edges, which guides microtubules towards stabilization areas where the concentration of microtubule is increased, counterbalances the anisotropic distribution of microtubule anchoring sites (Fig. 5B-C). Such a mechanism would generally allow an isotropic nucleation of microtubules to ensure a central position to the centrosome in spite of any cortical heterogeneity. This rerouting of microtubules as well as local actin contractility may be involved in the nucleus positioning at the cell rear (23, 34).

The micropatterns we used, imposing adhesive and non-adhesive area to the cells, allow the control of internal cell organization. It can be finely quantified by the calculation of average distribution of proteins within cells. These polarizing patterns should allow the establishment of standard references for other cell types. With such a device, cells become amenable to controlled modifications and thus to the dissection of the interplay between intrinsic and externally imposed polarity. The control of cell positioning on the coverslip and standardization of their internal organization coupled to the automation of picture acquisition and quantification should prove useful in high throughput screens for the detection of genes or drugs affecting internal cell organization and polarity.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Yohanns Bellaiche and Dr. Matthew Morgan for critical reading of the manuscript and Dr I. S. Näthke (University of Dundee) for providing anti-APC antibody.

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Polarity of adhesions and actin dynamics (*cell surface polarity*).

(A) RPE1 cell plated on a fibronectin [starship] micropattern (left) and visualized in phase contrast (right). (B) Labellings of vinculin, F-actin, and cortactin (top row) were averaged over 16 to 97 cells (bottom row). Actin polymerizes in membrane ruffles upon the curved adhesive edge where small dot-like adhesions accumulate. Actin assembles in contractile stress fibers anchored to fibronectin via large focal adhesions upon non-adhesive edges. (B) Spatial distribution of APC. Immuno-labellings of APC (top left) were averaged over 62 cells (bottom left). On the average picture, a 2 μ m-wide line scan of pixel intensities along cell contour (white line) shows a reduction of APC density upon non-adhesive edges (arrows). This local reduction induces an imbalance in the spatial distribution of APC. Integration of pixel intensities along the contour shows a higher content of APC along the adhesive half of the cell (8800 a.u., red zone) than along the non adhesive one (5900 a.u., blue zone) (bottom right).

Figure 2

Polarisation of the microtubule network.

(A) Microtubules labeled with anti-alpha tubulin in a fixed cell plated on a [starship]. (B) EB1 trajectories. Projection of 100 pictures acquired in time-lapse microscopy at two pictures per second of EB1-GFP in a cell plated on a [starship]. Magnifications of microtubule plus ends trajectories show that microtubules stop growing when contacting adhesive edges (top) and keep growing along non-adhesive edges (bottom). (C) Quantification of the spatial distribution of EB1. Immuno-labellings of EB1 (top left) were averaged over 62 cells (bottom left). Line scan of average pixel intensities along the cell contour (top right) shows reduction of EB1 density along non-adhesive edges and accumulations of EB1 in the area flanking non-adhesive edges. Integration of pixel intensities along the cell contour show identical amounts of EB1 along both the adhesive half border (6300 a.u., red zone) and of the non-adhesive half border (6400 a.u., blue zone) (bottom right).

Figure 3

Measure of cell internal polarity.

(A) Labeling of nucleus (red), centrosome (green) and Golgi apparatus (blue) (top left). The positions of the centroids of these organelles were measured with respect to the underlying micro-pattern. (B) Nucleus centroid and centrosome centroid define the nucleus-centrosome vector (top left). This vector was used as an indicator of internal cell polarity and measured on 75 cells plated on [starship] micropattern (top left). X and Y-axes represent distances in microns. The circular histogram represents the proportions of nucleus-centrosome vectors pointing in each angular sector (bottom) and highlights a clear bias of these orientations relative to the adhesive pattern geometry.

Figure 4

Orientation of cell polarity depends on the adhesive pattern geometry.

RPE1 cells were plated on micropatterns having similar square convex envelopes. Micropatterns are shown on the left. The corresponding cells visualized with phase contrast microscopy are shown in the middle. The corresponding angular distributions of nucleus-centrosome vectors are shown on the right. On [crosses] cells displayed a random distribution

of cell polarity axis. On the others cell polarity axis were preferentially orientated from non-adhesive edges towards adhesive edges. Micropatterns are 33.5 μm wide.

Figure 5

Working model.

(A) From external asymmetric boundary conditions to internal cell polarity. In response to the asymmetric distribution of fibronectin offered by the micropattern (gray) the distribution of adhesions (green) becomes asymmetric and concentrated close to the non-adhesive edges. The actin network (red) becomes polarized in a polymerizing meshwork on adhesive edges and stress fibers on non-adhesive edges. Actin-microtubules connectors such as APC (blue) are segregated in membrane ruffling zones and thereby are asymmetrically distributed at the cell surface. Microtubules stop growing when reaching these regions whereas they keep growing along non-adhesive edges where stress fibers are developed. The nucleus-centrosome-Golgi apparatus axis is oriented from the non-adhesive side towards the adhesive side. The Golgi apparatus is compacted around the centrosome, which sits at the cell centroid. (B) Actin dynamics at the cell cortex are known to induce a selective stabilization of microtubules. Microtubules contacting adhesive areas where ruffles take place are supposed to be stabilized (line and arrows) whereas microtubules contacting non-ruffling area are supposed to have a greater tendency to depolymerize (dotted line). This selective stabilization would induce an imbalance in the tension exerted on microtubules by minus end-directed motors such as dynein. As a consequence centrosome would be off-centered. (C) Microtubule rerouting compensates cortical asymmetry. Microtubules contacting a non-adhesive edge keep on growing along this edge without being capped. They are rerouted towards an adhesive site where they can be capped. Thereby the local absence of microtubule capping on non-adhesive part of the cell cortex is compensated by an increase of microtubule capping in the next adhesive area. This redistribution of microtubules contributes to pull back the centrosome toward the cell center.

Figure S1.

Centrosome sits at the cell center.

Graphs show the micropatterns (in gray in the left column), the corresponding positions of nucleus centroids (gray dots in the middle column) and the positions of centrosome (gray dots in the right columns) on [C] (top row, n=78), on [K] (middle row, n=76) and on [arrow] (bottom row, n=88). The square on the micropatterns (left column) represents the region enlarged in the middle and the right column for position representations. On all graphs the cross represents the centroid of the cell shape contour drawn with a black line. The circle (middle column) figures out the average position of nuclei. The diamond (right column) figures out the average position of centrosomes. On all graphs X and Y axis indicate absolute coordinates in microns with respect to the bottom left corner of the micropattern.

REFERENCES

1. S. Eaton, K. Simons, *Cell* **82**, 5 (Jul 14, 1995).
2. W. J. Nelson, *Nature* **422**, 766 (Apr 17, 2003).
3. G. K. Ojakian, R. Schwimmer, *J Cell Sci* **107** (Pt 3), 561 (Mar, 1994).
4. G. K. Ojakian, D. R. Ratcliffe, R. Schwimmer, *J Cell Sci* **114**, 941 (Mar, 2001).
5. L. E. O'Brien *et al.*, *Nat Cell Biol* **3**, 831 (Sep, 2001).
6. L. E. O'Brien, M. M. Zegers, K. E. Mostov, *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 531 (Jul, 2002).
7. W. Yu *et al.*, *Mol Biol Cell* **16**, 433 (Feb, 2005).
8. C. Yeaman, K. K. Grindstaff, W. J. Nelson, *Physiol Rev* **79**, 73 (Jan, 1999).
9. M. Thery, A. Pepin, E. Dressaire, Y. Chen, M. Bornens, *Cell Motil Cytoskeleton* **in press** (2006).
10. B. M. Gumbiner, *Cell* **84**, 345 (Feb 9, 1996).
11. D. E. Vega-Salas, P. J. Salas, D. Gundersen, E. Rodriguez-Boulan, *J Cell Biol* **104**, 905 (Apr, 1987).
12. B. M. Gumbiner, *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 622 (Aug, 2005).
13. N. A. Hotchin, A. Hall, *J Cell Biol* **131**, 1857 (Dec, 1995).
14. K. A. DeMali, K. Wennerberg, K. BurrIDGE, *Curr Opin Cell Biol* **15**, 572 (Oct, 2003).
15. I. S. Nathke, C. L. Adams, P. Polakis, J. H. Sellin, W. J. Nelson, *J Cell Biol* **134**, 165 (Jul, 1996).
16. A. Reilein, W. J. Nelson, *Nat Cell Biol* **7**, 463 (May, 2005).
17. G. G. Gundersen, T. A. Cook, *Curr Opin Cell Biol* **11**, 81 (Feb, 1999).
18. E. Fuchs, I. Karakesisoglou, *Genes Dev* **15**, 1 (Jan 1, 2001).
19. S. Etienne-Manneville, *Traffic* **5**, 470 (Jul, 2004).
20. M. Kirschner, T. Mitchison, *Cell* **45**, 329 (May 9, 1986).
21. G. G. Gundersen, E. R. Gomes, Y. Wen, *Curr Opin Cell Biol* **16**, 106 (Feb, 2004).
22. S. Etienne-Manneville, A. Hall, *Cell* **106**, 489 (2001).
23. E. R. Gomes, S. Jani, G. G. Gundersen, *Cell* **121**, 451 (May 6, 2005).
24. J. C. Adams, F. M. Watt, *Development* **117**, 1183 (Apr, 1993).
25. K. S. Matlin, B. Haus, A. Zuk, *Methods* **30**, 235 (Jul, 2003).
26. M. Thery *et al.*, *Nat Cell Biol* **7**, 947 (Oct, 2005).
27. J. Zumbunn, K. Kinoshita, A. A. Hyman, I. S. Nathke, *Curr Biol* **11**, 44 (Jan 9, 2001).
28. T. Watanabe *et al.*, *Dev Cell* **7**, 871 (Dec, 2004).
29. Y. Wen *et al.*, *Nat Cell Biol* **6**, 820 (Sep, 2004).
30. J. V. Small, I. Kaverina, *Curr Opin Cell Biol* **15**, 40 (Mar, 2003).
31. J. L. Starck, F. D. Murtagh, A. Bijaoui, *Image processing and data analysis: the multiscale approach* (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1998), pp.
32. X. Jiang, D. A. Bruzewicz, A. P. Wong, M. Piel, G. M. Whitesides, *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 975 (Jan 25, 2005).
33. S. W. Grill, A. A. Hyman, *Dev Cell* **8**, 461 (Apr, 2005).
34. S. Reinsch, P. Gonczy, *J Cell Sci* **111**, 2283 (Aug, 1998).
35. C. Nizak *et al.*, *Traffic* **5**, 284 (Apr, 2004).

FIGURE 1

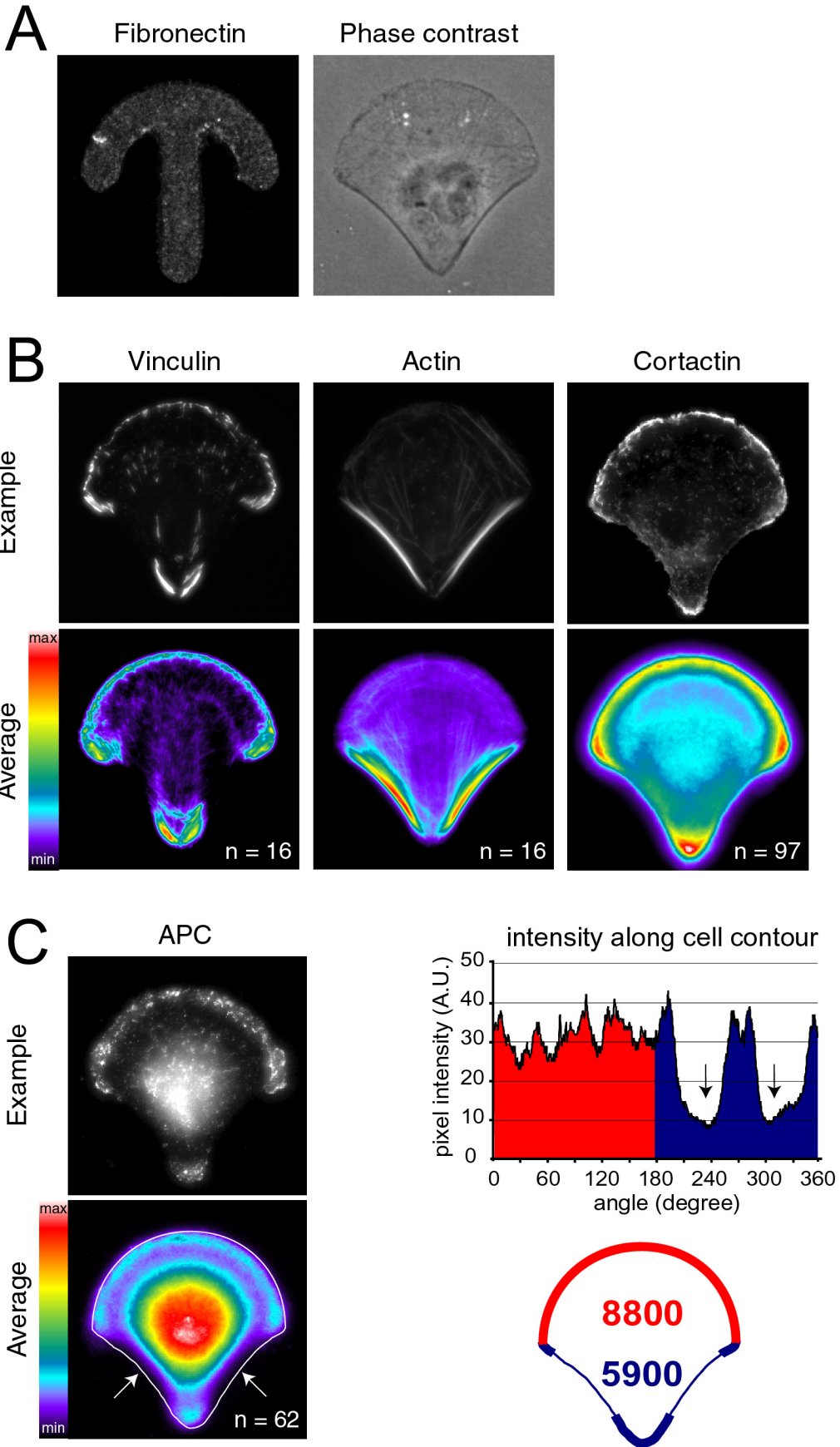
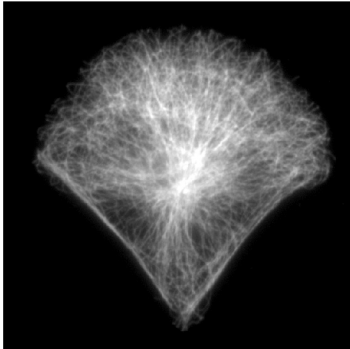
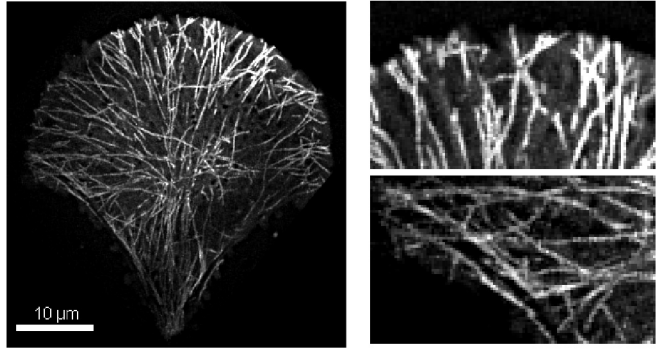


FIGURE 2

A



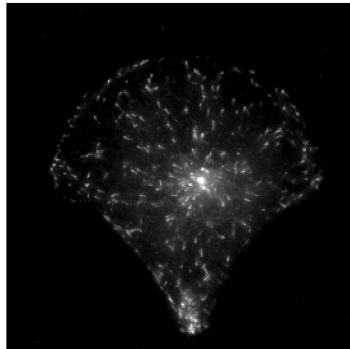
B



C

EB1

Example



Average

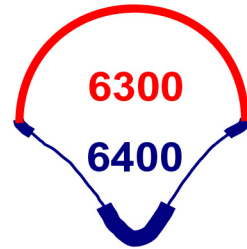
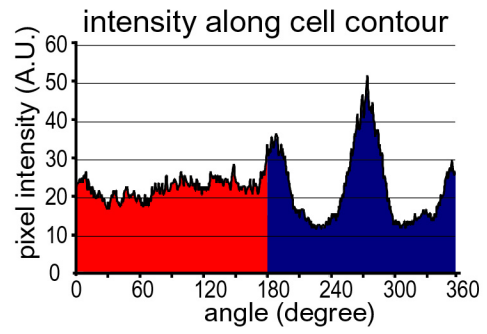
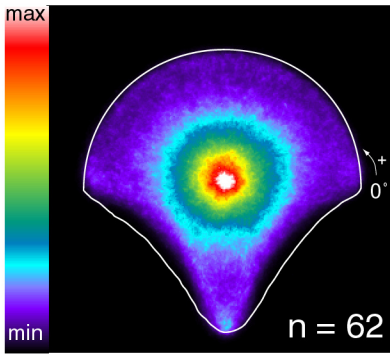
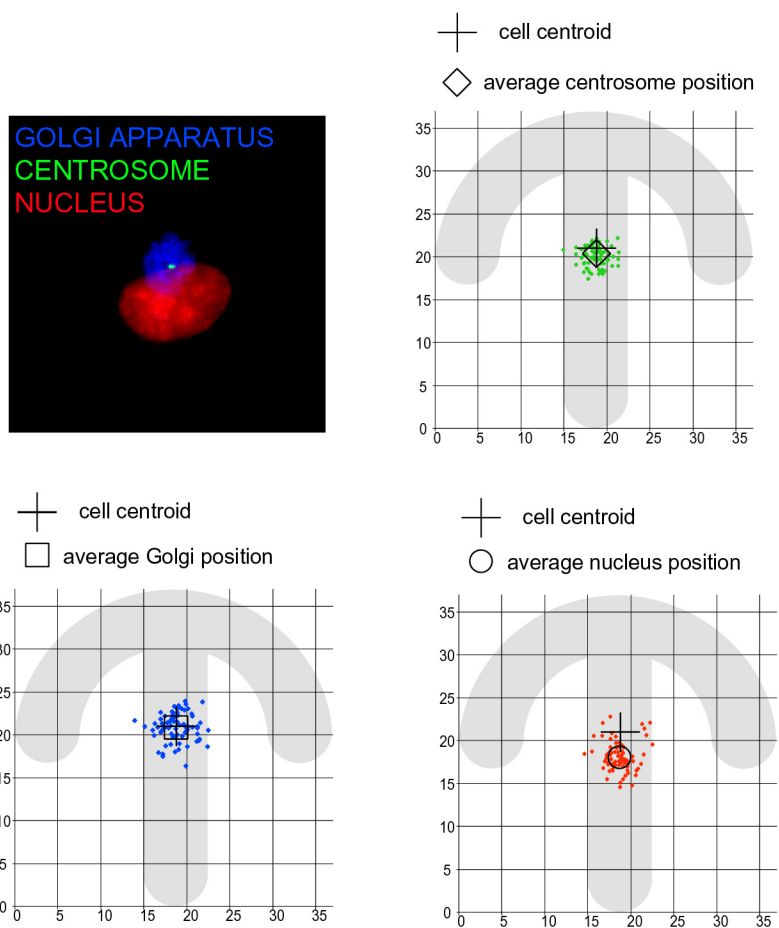


FIGURE 3

A



B

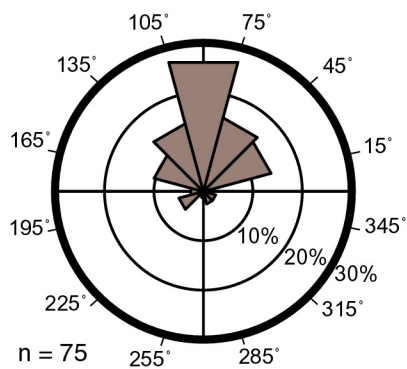
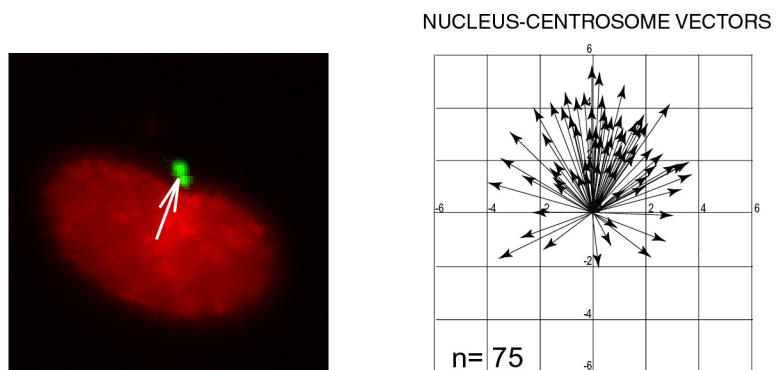


FIGURE 4

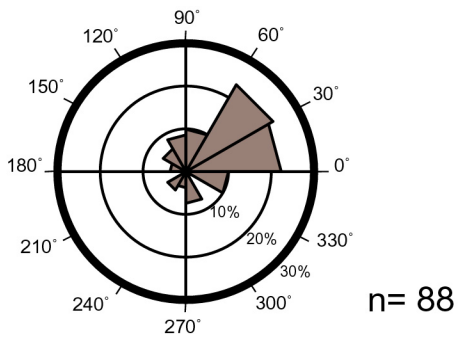
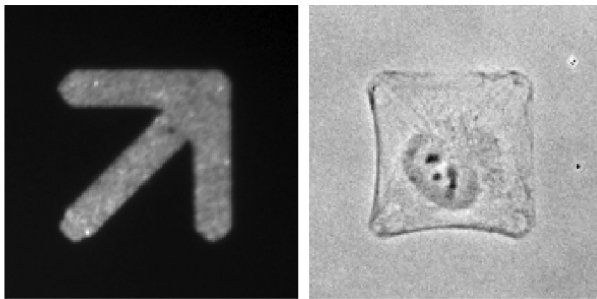
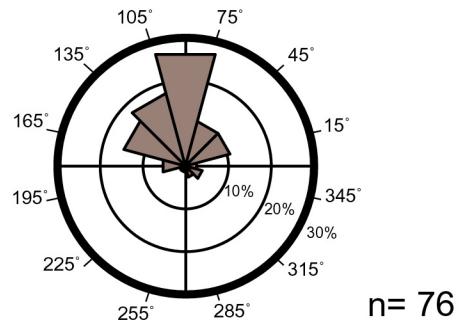
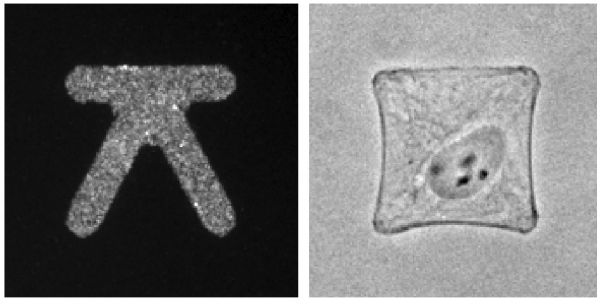
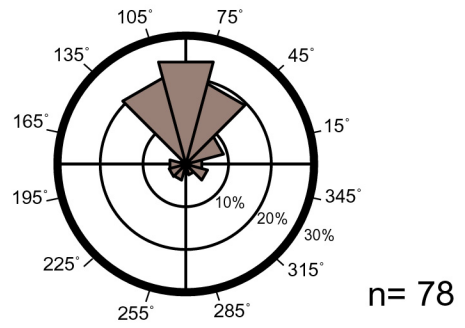
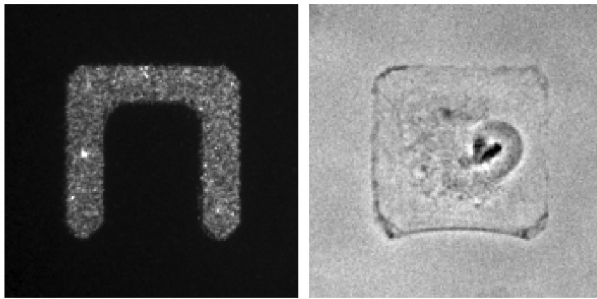
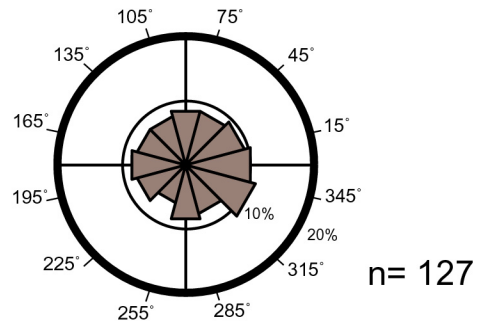
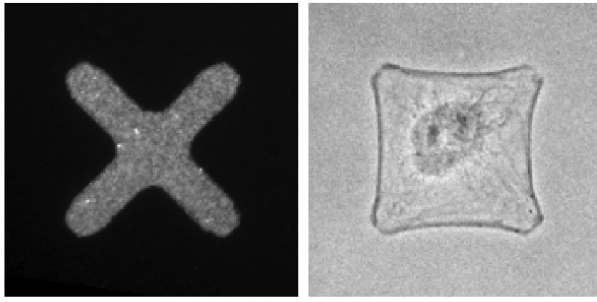
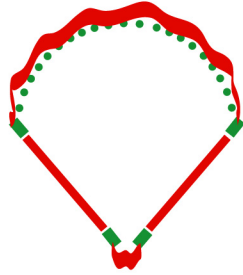


FIGURE 5

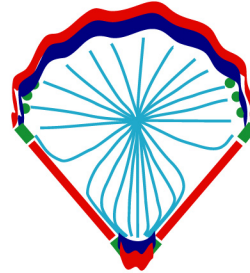
A



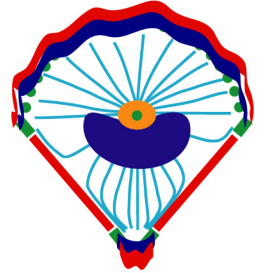
asymmetric
adhesive environment



polarisation of
adhesion and
actin dynamics

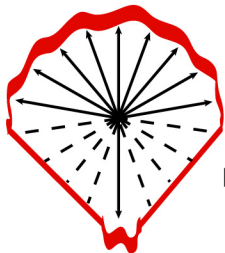


asymmetric distribution
of APC and
microtubules plus ends

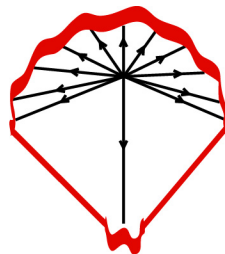


polarisation of the
nucleus-centrosome-Golgi
axis

B

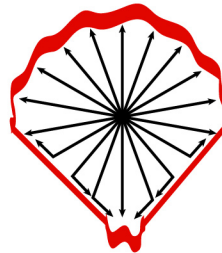


asymmetric stabilisation
of microtubules

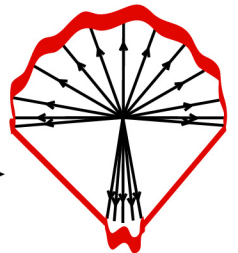


anisotropic tension
centrosome off-centred

C



microtubules rerouting

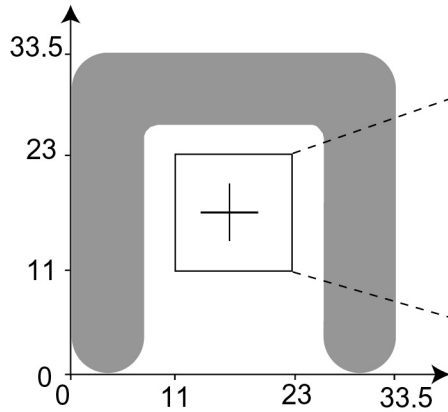


tension equilibrated
centrosome centred

FIGURE S1

PATTERN

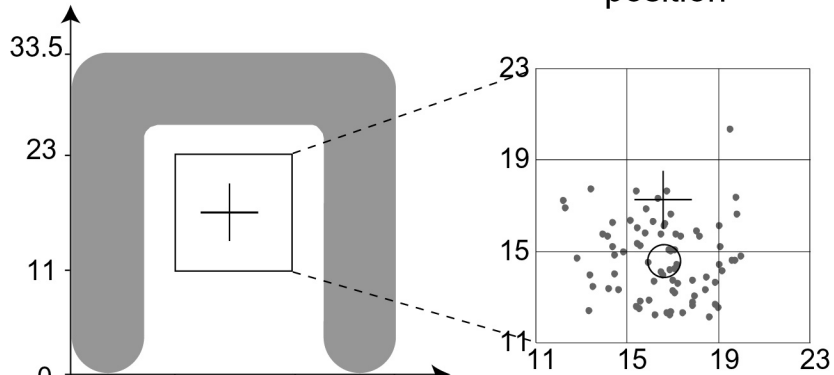
⊕ cell centroid



NUCLEUS

⊕ cell centroid

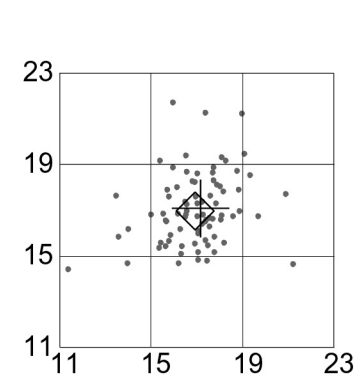
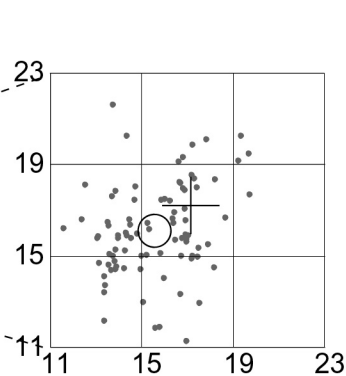
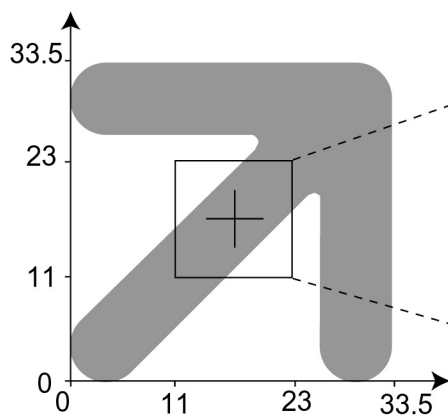
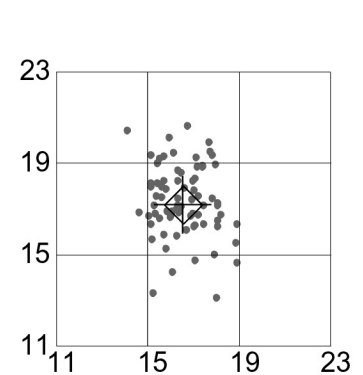
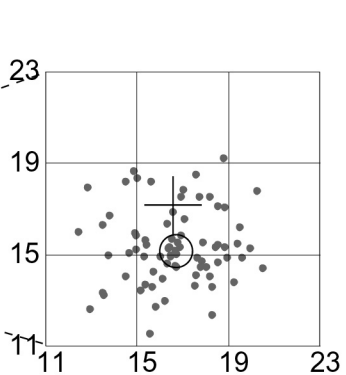
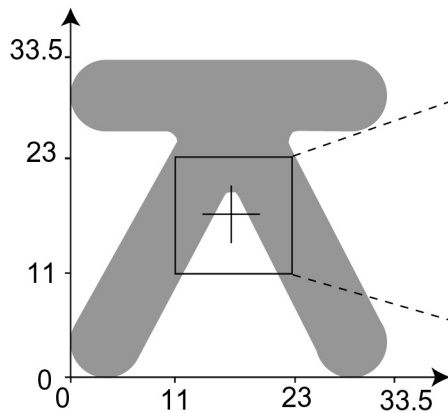
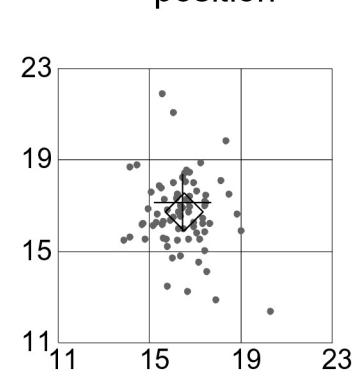
○ average position



CENTROSOME

⊕ cell centroid

◇ average position



MATERIALS AND METHODS

Stamp Fabrication

Pattern design was first done via L-Edit CAD software (Tanner EDA) and transferred to a machine-specific format corresponding to the electron beam lithography tool (Leica EBPG 5000+ nanowriter). Electron-beam lithography was then carried out on a blank 4 inch chromium-on-glass optical mask coated with resist (Nanofilm Inc, Westlake Village, CA). Resist development was done in pure AZ-Developer (Clariant, Frankfurt, Germany) for 30 seconds. Chromium etch was then carried in chrome-etchant 3144 Puranal (Honeywell) for 1 minute. The optical mask fabrication was completed after resist dissolution in acetone.

To make the resist mould, SPR220-7.0 photoresist (Shipley, Coventry, UK) was spin-coated at 2000 rotations-per-minute during 1 minute on a silicium wafer and soft-baked for 3 minutes at 115°C resulting in a 9 micron-thick layer. Contact optical lithography was carried out using the fabricated optical mask in a MA750 Süss MicroTec mask aligner (UV source 405 nm, UV power 6mW/cm²) for 45 seconds. The photoresist was then developed 2 minutes in pure LDD26W developer (Shipley). The obtained resist master mould was then exposed to chlorotrimethylsilane (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) in vapor-phase, for PDMS anti-adhesion purposes.

PDMS (Sylgard 184 kit, Dow Corning) was finally cast on the resist mould and cured 3 hours at 60°C. The 2 mm-thick cross-linked PDMS layer was peeled-off and stamps were manually cut out of it.

Microcontact Printing

Glass coverslips were first washed in methanol/chloroform (50/50) during 24h and stored in pure ethanol. After drying (15 minutes at 60°C) a coverslip was oxidized in a plasma chamber (Harrick Plasma, Ithaca, NY) during 3 minutes under a weak flow of air and incubated in a closed reactor containing the silanisation mix in methanol, deionised water 4,5%, acetic acid 0,9%, 3 mercapto-propyltrimethoxy silane (S10475, Fluorochem) 2,5%, overnight at 4°C. Coverslip were then washed twice in methanol and dry under filtered air followed by 15 minutes at 60°C.

The PDMS stamp was oxidized in the plasma chamber during 10 seconds under a weak flow of air and inked with a 50 µg/ml fibronectin solution (Sigma-Aldrich) 10% of which was labeled with Cy3 (Amersham Biosciences, Orsay, France) for 10 minutes. After aspiration of the fibronectin solution the stamp was dried with filtered airflow and placed in contact with the silanised coverslip for 5 minutes. After removal of the stamp the printed coverslip was immersed in a 20mg/mL solution of poly(ethyleneglycol)-maleimide (2D2MOH01, Nektar Therapeutics, Huntsville, Alabama) for 1 hour at room temperature. The coverslip was then washed in PBS before cell deposition.

Cell culture, treatment, fixation and labeling

hTERT-RPE1 cells (infinity telomerase-immortalized Retinal Pigment Epithelial human cell line) were cultured in DMEM F-12 (GIBCO). Culture medium was supplemented with 10% of fetal calf serum and 2 mM glutamine. Cells were cultured in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Cells were trypsinized, centrifugated, resuspended in 1% fetal calf serum medium (to reduce the deposition of the ECM present in the serum around the micropatterns) and plated on the printed coverslip.

Cells were fixed 5 minutes in methanol at -20°C for nucleus and centrosome positions measurements and for APC labeling. Cells were fixed in paraformaldehyde 3% and Triton X-100 0,5 % in cytoskeleton buffer (1) during 10 minutes for cortactin labeling. Cells were pre-permealized 15 seconds with Triton X-100 0,5% in cytoskeleton buffer and fixed in

paraformaldehyde 3% in cytoskeleton buffer for 10 minutes. Cells were fixed in paraformaldehyde 3% and glutaraldehyde 0,5% in order to preserve cell shape for cell centroid calculation. Cells fixed with paraformaldehyde were post-treated with 0,1M ammonium chloride in PBS for 10 minutes.

For labeling with primary antibodies we used rabbit polyclonal anti-gamma tubulin (1:500,), mouse monoclonal anti-cortactin (1:200, Upstate Biotechnology), rabbit polyclonal anti-APC (1:500, Santa Cruz,), mouse monoclonal anti-vinculin (1:200, Sigma Aldrich) and a mix of his-tagged anti-Giantin TA10 (2) and mouse monoclonal anti-his (1:400, H1029, Sigma Aldrich). For secondary antibodies we used either FITC-conjugated donkey anti-rabbit (1:200, Jackson Immuno Research) or Cy5-conjugated goat anti-mouse (1:500, Jackson Immuno Research). In some cases cells were stained with FITC conjugated phalloïdin at 1 μ M (Sigma Aldrich) to visualize F-actin and/or with DAPI to visualize the DNA. All steps were performed during 1 hour at room temperature in PBS with 3% BSA and 0,1 % Triton X-100. Preparations were mounted in MOWIOL solution.

Pictures acquisitions and processing

Pictures of fixed cells were acquired through a 40x PL APO oil objective using a Leica DMRA microscope and a MicroMax camera (Princeton Instruments) controlled by the Metamorph software (Universal Imaging Corp).

Pictures of nucleus, centrosome and Golgi were filtered using wavelet segmentation (3). The positions of organelles centroid were automatically detected in the filtered pictures using a home-made algorithm.

Cell centroid measurements were performed using the Metamorph morphometric analysis on the contour of average cell shape calculated with the overlay of the average actin and cortactin labeling of cells fixed in paraformaldehyde and glutaraldehyde.

Time-lapse acquisitions of EB1-GFP were performed through a 100X UplanApo objective (NA 1,35) (Olympus) on an inverse IX71microscope (Olympus) heated in a plastic box at 37°C (Life Imaging Science) using CoolSnapHQ camera (Princeton Instruments) controlled by the Metamorph acquisition software.

1. T. J. Mitchison, *Cell Motil. Cytoskeleton* **22**, 135 (1992).
2. C. Nizak *et al.*, *Traffic* **5**, 284 (Apr, 2004).
3. J. L. Starck, F. D. Murtagh, A. Bijaoui, *Image processing and data analysis: the multiscale approach* (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1998), pp.

III-2 Discussion sur la polarité des cellules

Cet article montre que les positions du noyau et du centrosome répondent à la géométrie du patron adhésif. On retrouve la disposition connue du complexe noyau-centrosome des cellules en train de migrer : le centrosome au centre et le noyau à l'arrière. C'est donc à la fois un résultat attendu et surprenant car ces cellules ne sont justement pas en train de migrer. Ceci démontre bien que le patron adhésif impose un avant et un arrière à ces cellules immobiles. La position du noyau, à l'arrière de la cellule en cours de migration, est généralement interprétée comme une réaction passive au mouvement : le noyau étant plus difficile à déplacer, il freine le mouvement et traîne à l'arrière de la cellule. Cette explication ne peut pas s'appliquer à des cellules qui ne migrent pas. Dans ces cellules stationnaires, le noyau ne se met pas là où il aurait le plus d'espace et le centrosome n'est pas excentré vers les zones adhésives où les microtubules sont sensés être stabilisés (voir l'introduction à ce chapitre). Ces positions du noyau et du centrosome sont donc remarquables. Il n'est pas possible aujourd'hui d'en donner la justification.

La principale critique que nous ferons à cet article est qu'il ne démontre pas rigoureusement que la cellule est polarisée par le patron adhésif. Nous proposerons donc quelques expériences qui permettraient de **savoir si effectivement la cellule est polarisée** comme le suggère le vecteur noyau-centrosome. Et quelques expériences pour perturber cette polarité.

La seconde critique est qu'il ne propose pas de vraie modélisation physique basée sur l'hypothèse proposée du détournement de microtubules pour rendre compte du centrage du centrosome.

Nous suggérerons donc quelques mécanismes potentiels qui pourraient participer au **détournement de microtubules**.

Puis, nous discuterons de la façon dont les **microtubules** et les **moteurs** ancrés dans le cortex pourraient être pris en compte dans un modèle décrivant le **mécanisme de centrage**.

Polarité

Les microtubules ne semblent pas stabilisés à l'avant

Il a été montré que les microtubules étaient stabilisés au bord avant de cellule en migration (Gundersen and Bulinski, 1988; Palazzo et al., 2004). Cette stabilisation fut caractérisée par la détyrosination de la tubuline présente dans le microtubule. C'est une modification post-traductionnelle de la tubuline qui retire le dernier acide aminé, une tyrosine, pour faire apparaître un acide glutamique. Toutefois, très peu de microtubules subissent la détyrosination dans les cellules RPE1. Seul le centrosome semble contenir cette forme de tubuline. Par contre de nombreux microtubules acétylés sont présent dans l'appareil de Golgi mais ils ne s'étendent pas jusqu'à la périphérie de la cellule. Ces marquages des microtubules stables ne permettent donc pas de dire si certaines zones contiennent des microtubules plus stables que d'autres. La seule polarité mise en évidence jusqu'ici est l'ancrage sélectif au cortex.

Le noyau est vers l'arrière

Le positionnement préférentiel du noyau près des bords non-adhésifs est plus difficile à expliquer avec les données actuelles de la littérature. Il semble que la contractilité actomyosique puisse influencer cette position (Gomes et al., 2005). Il se pourrait que les myosines tirent sur le noyau ou que, par un mécanisme inconnu, le noyau s'ancre dans l'actine corticale dont le flux vers l'arrière, due à la polymérisation de l'actine dans les protrusions membranaires à l'avant, le déplace.

Plusieurs exemples montrent que les microtubules ont la capacité de guider le noyau (Reinsch and Gonczy, 1998). Dans l'œuf d'oursin les microtubules attirent le pronucleus femelle au pronucleus mâle. Dans notre cas de figure, il se pourrait que les mouvements de microtubules le long des bords non-adhésifs influent fassent glisser le noyau vers l'arrière.

Trouver des marqueurs de polarité

L'orientation préférentielle du vecteur noyau-centrosome témoigne d'une polarité. Mais, c'est la distribution d'APC, plus importante sur la moitié adhésive que sur la moitié peu adhésive qui montre que les cellules sur les [umbrella] sont effectivement polarisées. Il faudrait cependant rechercher d'autres marqueurs de polarité comme Par6 ou GSK3. La distribution spatiale de LGN (équivalent mammifère de Pins, (Du et al., 2001; Du and Macara, 2004)) pourrait elle aussi se révéler polarisée.

Il serait surprenant, mais pas impossible, que des domaines chromosomiques particuliers soient localisés près du centrosome et du Golgi. La distribution des pores nucléaires pourrait elle aussi être biaisée par cette stabilité de la position du centrosome et du Golgi.

La polarité fonctionnelle au sein de la cellule ne sera avérée qu'au vu du **transport des protéines**. Afin de savoir si la production des protéines, depuis le transport des ARN messagers jusqu'à la maturation des protéines, suit une organisation spatiale reproductible, il faudrait quantifier la distribution spatiale du réticulum endoplasmique où sont synthétisées les protéines à partir des ARNm. Puis il faudrait quantifier les transports entre le réticulum, le

Golgi et la membrane plasmique. La structure globale du Golgi provient très certainement du transport des membranes vers les bouts « - » des microtubules qui, étant toujours à la même position, permettent cette structure compacte. Il serait particulièrement instructif d'activer des intermédiaires de transport au niveau du Golgi pour voir où ils vont et ainsi établir une carte du transport dans ces conditions.

Etrangement l'orientation du Golgi peut être indépendante de celle du centrosome (Magdalena et al., 2003). Le rôle de ROCK et de Src dans ce processus pourrait être réétudié sur ces micro-patrons adhésifs. Le couplage centrosome/Golgi devrait être plus simple à étudier dans ces conditions que dans des cellules en cours de migration. Des expériences associant la dépolymérisation des microtubules par le nocodazole ou la dispersion du Golgi par la brefeldine A au suivi, en vidéomicroscopie, du rétablissement et du repositionnement de ces assemblages, en présence de divers inhibiteurs, pourraient révéler l'identité des composants et des enzymes impliqués dans ces processus ainsi que la dynamique de ses réactions.

La polarité de la membrane pourrait être observée par le marquage des raft GM1 avec la Cholera toxine pour voir si comme pour des cellules migrantes (Manes et al., 1999) ces rafts s'accumulent au bord avant où se localise les protrusions. On peut également envisager de marquer le cholestérol avec NBD-cholestérol (Vasanji et al., 2004).

Il serait simple et intéressant, de **perturber le mécanisme** d'établissement et de maintien de la polarité en utilisant quelques composants solubles dans le milieu et connus pour perturber la polarité : par exemple il serait envisageable d'inhiber les dynéines avec du vanadate, d'inhiber GSK3 avec LicL (40mM), d'inhiber Src avec PP2 ou SU6656 (10µM), d'inhiber la contractilité avec Y27632 (10µM). Il serait utile aussi d'observer l'effet de la déplétion du cholestérol avec de cyclodextrine (1%). L'effet des RhoGTPases est plus difficile à caractériser et les résultats ne seraient que des confirmations de leur rôle déjà bien caractérisé.

Enfin, une dernière comparaison intéressante serait celle de l'établissement et du maintien de la polarité qui pourrait être faite en inhibant un composant avant l'étalement des cellules sur les micro-patrons ou une fois l'équilibre atteint.

Détournement des microtubules

L'hypothèse proposée dans l'article pour expliquer le centrage du centrosome est basée sur la réorientation des microtubules. Le système centrosome-microtubules est polarisé par le patron adhésif. Certaines zones du cortex permettent l'ancrage des bouts « + » des microtubules et d'autres non. Quelques films effectués dans les cellules HeLa montraient déjà des accumulations de bouts « + » aux sommets de la cellule (voir les films « *EB1 L* » et « *COS EB1* » ainsi que les légendes en annexe). Plusieurs interprétations de ce détournement des microtubule sont possibles. Les bout « + » des microtubules peuvent **glisser** sur les câbles d'actine. Des moteurs, liés à l'actine, peuvent saisir les microtubules et **tirer** dessus forçant le bout « + » à continuer sa polymérisation de long du câble. Dans cette situation il pourrait même y avoir d'autres moteurs tirant sur le microtubule le long du câble. On pourrait également imaginer des moteurs qui interagiraient avec le bout « + » du microtubule et qui emmèneraient ce bout « + » vers l'extrémité de la fibre. Dans la deuxième et la troisième situation, le détournement du microtubule induirait une **tension** sur le centrosome.

trois façons de rediriger les bouts +

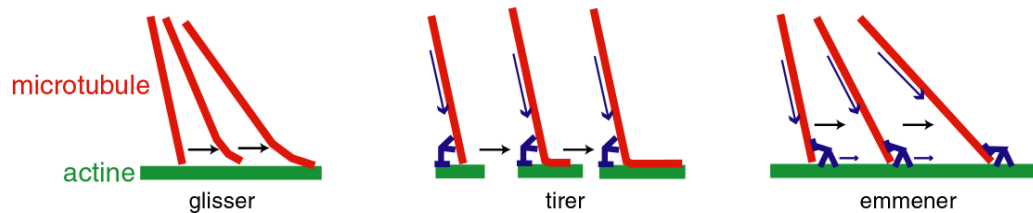


Figure 2.31 Trois hypothèses pour expliquer le détournement des bouts « + » des microtubule.

Soit le microtubule glisse et sa polymérisation le fait tourner, soit il est tiré par un moteur fixe ce qui fait coulisser le bout « + », soit un moteur se déplaçant sur l'actine s'empare du bout « + » et l'emmène à l'extrémité du câble.

Des films de tubuline-GFP devraient permettre de valider la ou les bonnes hypothèses. L'utilisation de tubuline photoactivable serait un très bon outil pour ce type d'étude. L'activation de tubuline, le long d'un rayon dirigé vers une zone non-adhésive, devrait permettre de suivre le comportement de certains microtubules sans être gêné par la présence des autres.

Centrage – la contribution des microtubules

Le centrage du centrosome dans un environnement asymétrique est un fait original, inattendu et dont aucun modèle à l'heure actuel ne peut rendre compte. Au contraire, les mouvements du centrosome témoignent généralement de sa capacité à répondre aux inhomogénéités corticales qui l'attirent ou le repoussent (voir introduction). La position du centrosome au centre de gravité de la cellule avait été quantifiée dans des cellules en interphase, étalées sur des substrats homogènes. Les modèles qui permettent de décrire ce comportement supposent le cortex homogène. Or il y a très peu de chance pour que ce cortex soit effectivement homogène. L'hypothèse proposée dans l'article permet de rendre compte de ce comportement. Elle est basée sur la tension dans les microtubules ce qui semblent justifié dans des cellules très étalées (Burakov et al., 2003). Effectivement, dans des RPE1 très étalées, les microtubules sont peu courbés et donc peu enclins à pousser sur le centrosome (Figure 2.32).

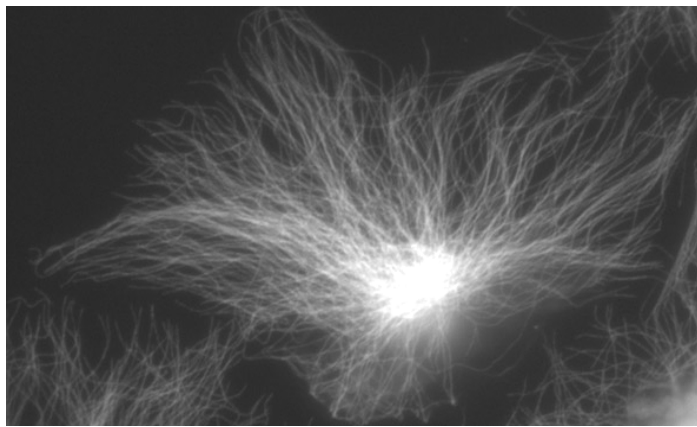


Figure 2.32
Microtubules dans une cellule RPE1 en interphase. Les microtubules ont rarement la courbure régulière et homogène qui suggérerait qu'ils sont en compression.

Par contre, une fois sur les patrons adhésifs, la **surface d'étalement est beaucoup plus petite**. On y voit moins de bouts « + » près des bords. Au contraire, beaucoup de microtubules semblent faire des boucles près des bords et retournent vers l'intérieur. La contribution de la pression pourrait bien devenir plus grande dans ces cellules plus petites. Une **pression** sur l'ensemble des bords de la cellule pourrait tout à fait assurer le centrage du centrosome indépendamment de l'asymétrie corticale. Toutefois, l'hypothèse proposée n'est pas non plus improbable car un grand nombre des boucles de microtubule sont en fait des microtubules relâchés qui n'exercent aucune contrainte mécanique sur le centrosome (Abal et al., 2002).

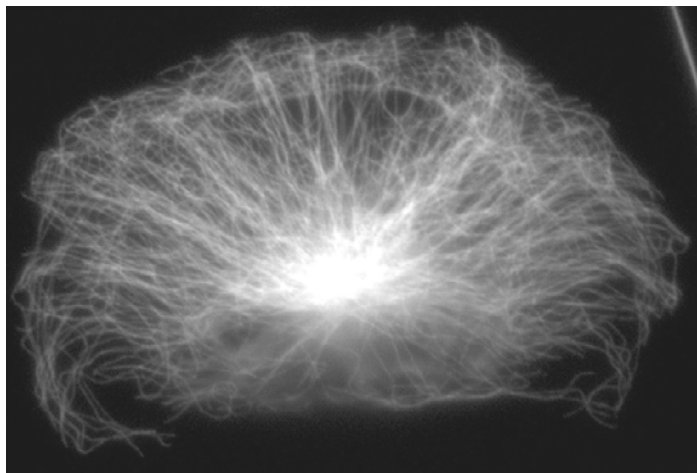


Figure 2.33
Microtubules dans une cellule RPE1 en cours de migration vers le haut. Sur toute la périphérie on voit des microtubules relâchés qui sont parallèle au bord de la cellule.

En effet on peut imaginer que les cellules sur micro-patrons ont des structures qui ressemblent à celle de la cellule polarisée en migration : des microtubules droits interagissent avec le cortex et influencent sur le positionnement du centrosome et beaucoup d'autres sont relâchés et restent près du lamellipode (Figure 2.33).

Cette structure serait plus compacte dans les cellules contraintes spatialement, ce qui donnerait l'impression que les microtubules relâchés sont des microtubules bouclés qui pourraient exercer une pression sur le centrosome alors qu'en fait il ne sont pas reliés au centrosome et n'affecte pas son positionnement (Figure 2.34).

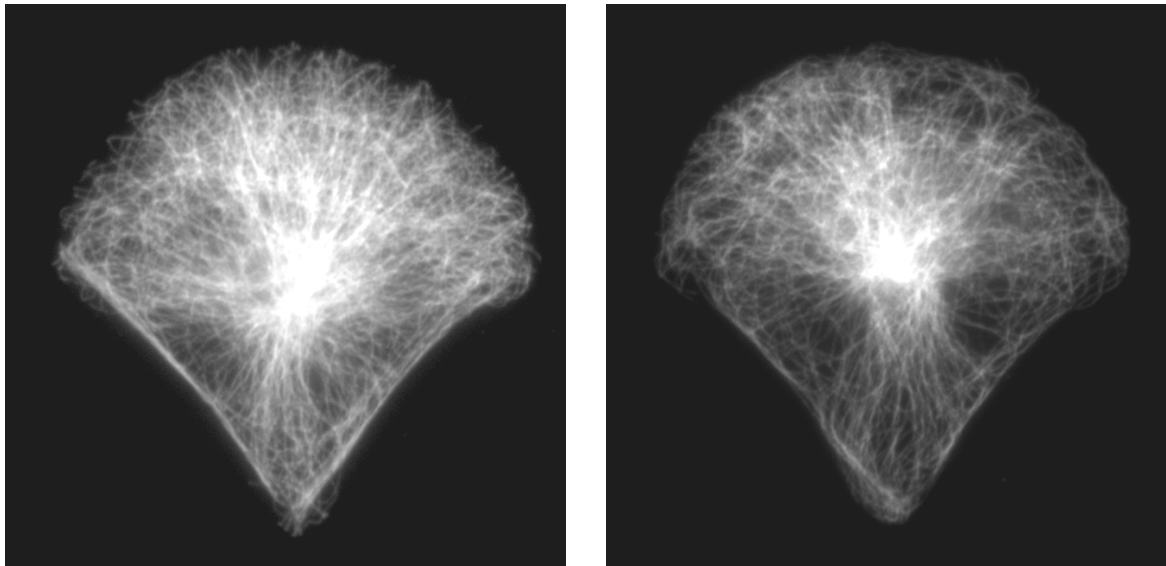


Figure 2.34 Microtubules dans des RPE1 contraintes sur un patron en [umbrella].

Afin de savoir si les microtubules poussent ou tirent il faudrait couper une zone au laser et voir si le centrosome avance vers la zone coupée (microtubule en pression) ou s'en écarte (microtubules en tension) (Grill et al., 2001).

Par ailleurs, l'hypothèse énoncée dans l'article propose une contribution mécanique capable de compenser l'asymétrie corticale mais ne justifie pas le positionnement exact au centre de gravité de la forme. En effet si tous les microtubules réorientés vers les zones adhésives étaient effectivement mis sous tension (figure 5C de l'article) leur alignement créerait une **force qui, certes, contrebalancerait l'asymétrie corticale mais plus que nécessaire**. Ils tireraient tous dans la même direction et le centrosome serait excentré mais cette fois vers le bas. Le centrage exact nécessite probablement des mécanismes de régulation plus complexes que ceux envisagés dans l'article. Cette régulation pourrait passer par l'organisation spatiale de la distribution et de l'activité des moteurs.

Centrage – la contribution des moteurs

Tous les microtubules ne sont pas tirés en même temps et les probabilités pour un moteur d'être en train de tirer sur un microtubule dépendent de régulations enzymatiques locales (Grill et al., 2003; Grill and Hyman, 2005). Un modèle approprié devra prendre en compte plusieurs facteurs supplémentaires : la distribution de moteurs dans les zones adhésives (homogène ou non) ainsi que la fréquence à laquelle ils tirent sur les microtubules et la possibilité que cette fréquence soit modulée différemment selon les zones corticales. Le modèle sera finalement très similaire à celui proposé pour l'orientation du fuseau (voir chapitre suivant).

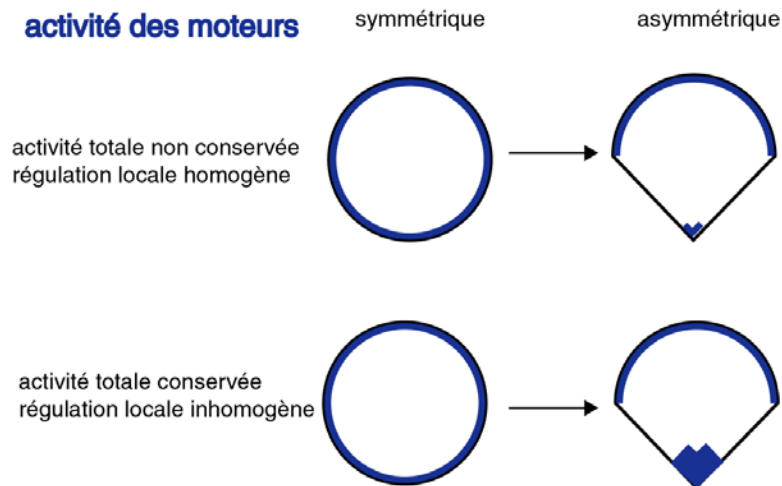


Figure 2.35 Deux hypothèses concernant la répartition de l'activité des moteurs.

Les micro-patrons semblent donc un outil de choix pour l'étude du centrage du centrosome. D'autant plus que les cytoplastes s'y étalent très bien ce qui permet de s'affranchir de la contrainte spatiale due au noyau (Figure 2.36).

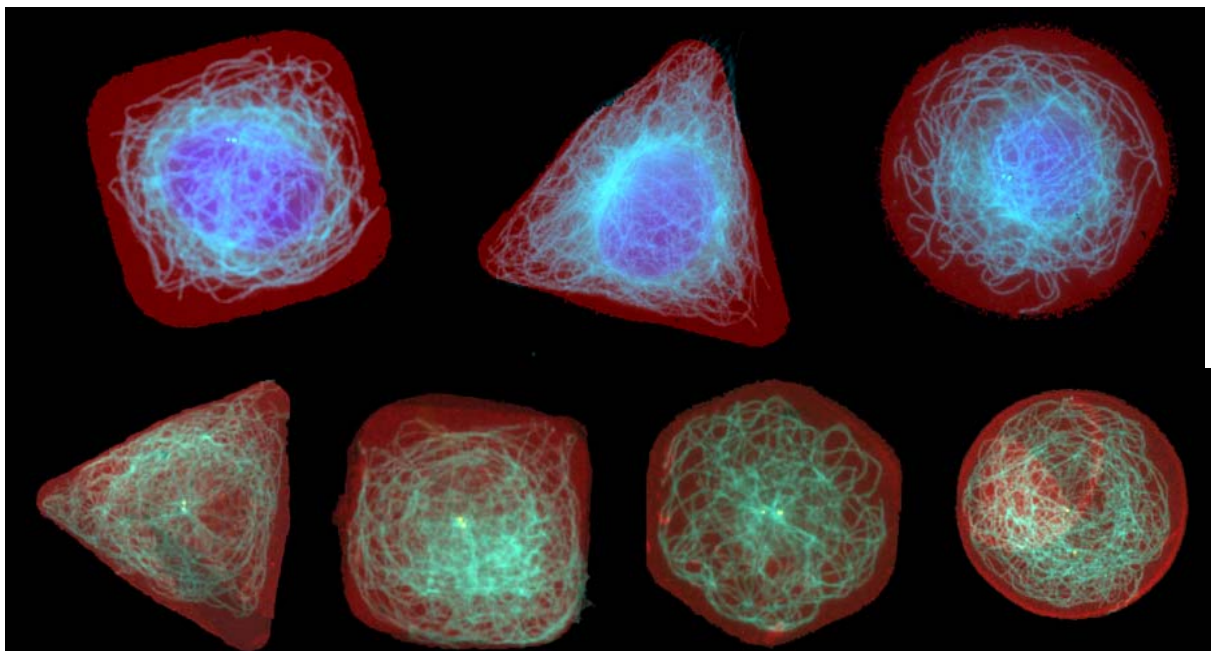


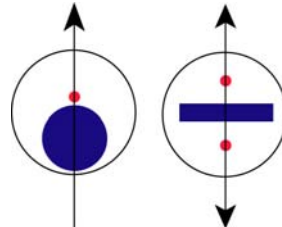
Figure 2.36 Marquage des microtubules (bleu) et des centrosomes (jaunes) dans des HeLa (en haut) et des cytoplastes de HeLa (en bas) contraintes sur des micropatrons de fibronectine (rouge).

Chapitre 3

Bipolarisation des cellules au cours de la division

Chapitre 3 - Bipolarisation des cellules au cours de la division

La division cellulaire, ou mitose, est un processus de transformation propre aux êtres vivants. Au cours de la division, la cellule passe d'un état polaire à un état bipolaire.



L'étude des embryons a permis de décrire avec précision les mécanismes de positionnement de cet axe bipolaire et du plan de division associé car les événements y sont très reproductibles et donc prévisibles. C'est grâce à la prévisibilité des événements qu'il est possible de détecter les erreurs et de corrélater aux perturbations imposées par l'expérimentateur.

Il s'avère que les mécanismes qui guident l'orientation de la bipolarité interne par rapport à la polarité périphérique en mitose sont semblables à ceux qui guident la polarité en interphase. (Ahringer, 2003). En effet Julie Ahringer décrit des mécanismes de définition de la bipolarité mitotique qui sont en tous points semblables à ceux présentés par James Nelson pour décrire la définition de la polarité en interphase (voir l'introduction du chapitre 2):

- 1- Une cellule en interphase reçoit un signal externe anisotrope (contact avec une cellule, accrochage d'un ligand, pression locale, lumière, fertilisation, etc).
- 2- En réponse à ce signal, se crée une asymétrie interne dans la cellule et cette polarisation est maintenue (rôle général des protéines PAR et des microtubules)
- 3- Des composants internes se ségrègent asymétriquement le long de cet axe de polarité.
- 4- Le fuseau est sensible à cette distribution interne et s'aligne avec cet axe (rôle général des protéines G et des dynéines).

Nous étudierons donc le positionnement de l'axe de division avec le même système expérimental que celui utilisé pour l'étude de l'orientation de la polarité afin de manipuler la géométrie de l'environnement dans lequel se met en place la bipolarité au cours de la mitose.

Nous aborderons ainsi deux questions :

La cellule est-elle sensible à la géométrie de son environnement adhésif au cours de sa division ?

Comment le cytosquelette s'organise-t-il en réponse aux contraintes géométriques de l'environnement ?

Pour **introduire la problématique** discutée dans l'article intitulé « *The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis* » nous décrirons quelques-unes des questions générales qui se posent lors de l'étude de la division des cellules.

Dans un premier temps, nous présenterons à l'aide d'exemples le rôle de la **géométrie** et des **contacts** intercellulaires dans la définition du plan de division. Ceci nous permettra de soulever le problème de la nature biochimique de ces contacts et des mécanismes qui dirigent leur répartition à la surface de la cellule. Nous présenterons alors comment l'étude des **divisions asymétriques** montre que des **marqueurs corticaux** sont directement impliqués dans l'orientation des fuseaux mitotiques. Nous décrirons ensuite le rôle de la distribution des **contraintes** sur le positionnement du fuseau. Ensuite nous discuterons à travers la présentation du positionnement du fuseau dans différents organismes les mécanismes impliqués dans le **positionnement du fuseau mitotique** en réponse aux paramètres évoqués précédemment. Enfin nous présenterons brièvement la façon dont le cortex et le fuseau définissent ensemble le plan de division.

Dans un deuxième temps, nous présenterons un ensemble d'**expériences préliminaires** qui illustrent les questions qui seront ensuite abordées dans l'article. Ainsi, nous montrerons qu'une grande partie des observations faites sur les micro-patrons adhésifs avait déjà été réalisée sur des cellules libres de se mouvoir sur une surface homogène.

L'article montrera comment toutes ces observations ont pu être quantifiées et comment certaines des hypothèses formulées ont pu être démontrées grâce à la manipulation des conditions dans lesquelles se divisent les cellules. Ces résultats seront ensuite **critiqués et discutés** à la lumière de quelques expériences supplémentaires.

Enfin, nous présenterons un **modèle théorique** permettant de rendre compte des observations effectuées sur les micro-patrons adhésifs ainsi qu'une nouvelle série d'expériences aux fins d'améliorer ce modèle.

I- Introduction à l'étude de la division.

I-1 L'effet du confinement sur la géométrie des cellules et les contacts inter-cellulaires au cours de l'embryogenèse

Le contrôle de l'orientation des divisions est un processus fondamental pour le développement de l'embryon et la formation d'architectures multicellulaires qui guideront la compartimentation et la croissance de l'organisme.

La géométrie dirige l'orientation des divisions

L'article publié par Philip L. Hertzler et Wallis H. Clark Jr. est un magnifique exemple de la minutieuse chorégraphie des divisions cellulaires dans un embryon (Hertzler and Clark, 1992).

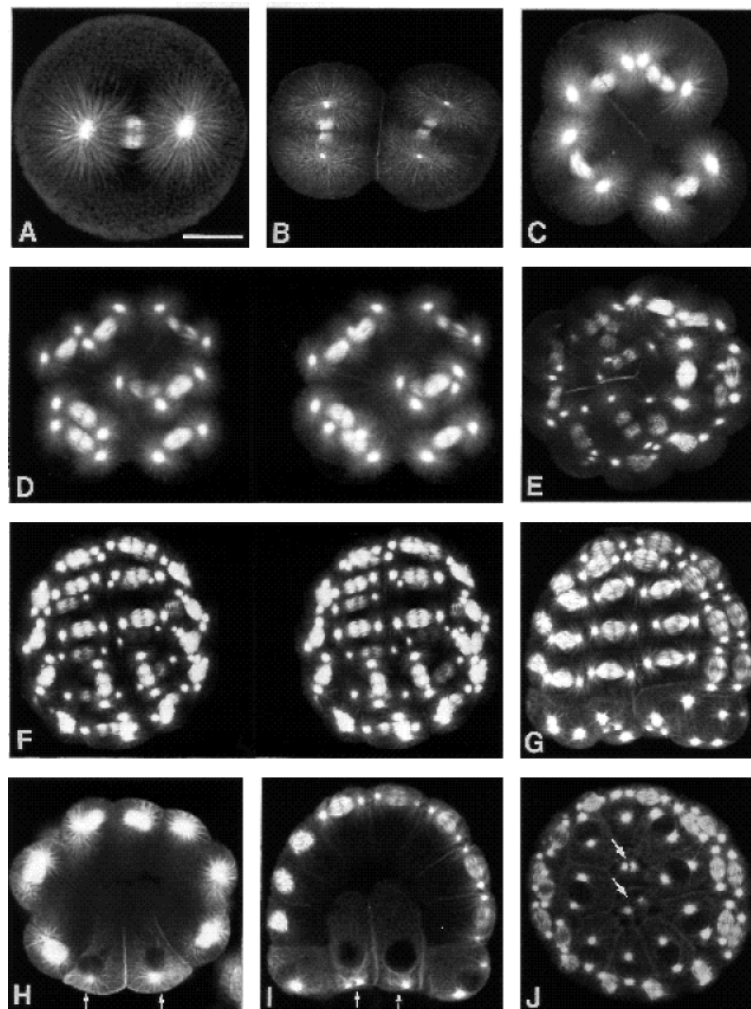


Figure 3.1
Microtubules dans l'embryon de crevette du premier au septième cycle de division. (Hertzler and Clark, 1992)

Sans manipulation génétique ni mécanique, les auteurs observent les divisions et en déduisent le rôle essentiel de l'orientation de certaines d'entre elles dans l'initiation de la gastrulation. En effet, la transparence de l'embryon de **crevette** *Sicyonia ingentis* permet une observation de grande qualité.

L'étude du patron des divisions, d'une remarquable régularité géométrique, est riche d'informations (Figure 3.1). Au cours des premières divisions, **les fuseaux s'orientent selon le plus grand axe dans la cellule** (Figure 3.1 A-E). Cette loi générale fut proposée par O. Hertwig (Hertwig, 1884) et popularisée par Wilson E.B. (Wilson, 1925). Cette règle reste une référence encore actuelle dans de nombreuses études de l'orientation du fuseau.

De la deuxième à la septième division, les fuseaux se positionnent **perpendiculairement à l'orientation qu'ils avaient au cours de la division précédente**. Ce comportement avait été interprété auparavant par Costello comme une propriété intrinsèque des appareils mitotiques, indépendante de l'environnement (Costello Biol.Bull.Mar.Biol.Lab. Woods Hole 120, 285-312, 1961 rappelé par Strome (Strome, 1993)). Il proposa le « *principe centriolaire* » selon lequel, après la duplication, les centrosomes migraient de façon symétrique de parts et d'autres du noyau, ce qui expliquait le positionnement systématique du fuseau à 90° de l'orientation précédente.

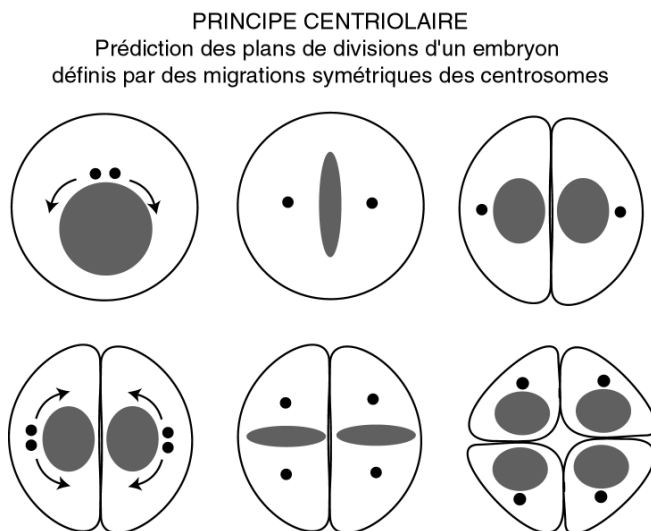


Figure 3.2
Le principe centriolaire. Les fuseaux se positionnent perpendiculairement à leur orientation précédente.

Cinq ans après leur description des divisions dans l'embryon de crevette, l'équipe de Wallis H. Clark Jr. démontre avec élégance l'importance d'un autre paramètre dans l'orientation des divisions: celui des **contacts entre cellules** (Wang et al., 1997). Les auteurs séparent les cellules qui constituent l'embryon de crevette et les manipulent délicatement pour les libérer de la contrainte géométrique de l'enveloppe et les repositionner autrement dans l'espace. Ils assemblent les cellules en lignes pour former des réseaux carrés (Figure 3.3). Dans ce type de configuration il leur est beaucoup plus simple de corrélérer l'orientation du fuseau à la géométrie de la cellule et à celle de son environnement. La manipulation de cellules individuelles et la reconstitution d'assemblages linéaires leur permis de démontrer que **l'orientation des fuseaux et le rythme des divisions n'étaient pas des propriétés intrinsèques** des blastomères mais qu'elles répondaient à la disposition des cellules dans l'espace (Figure 3.3).

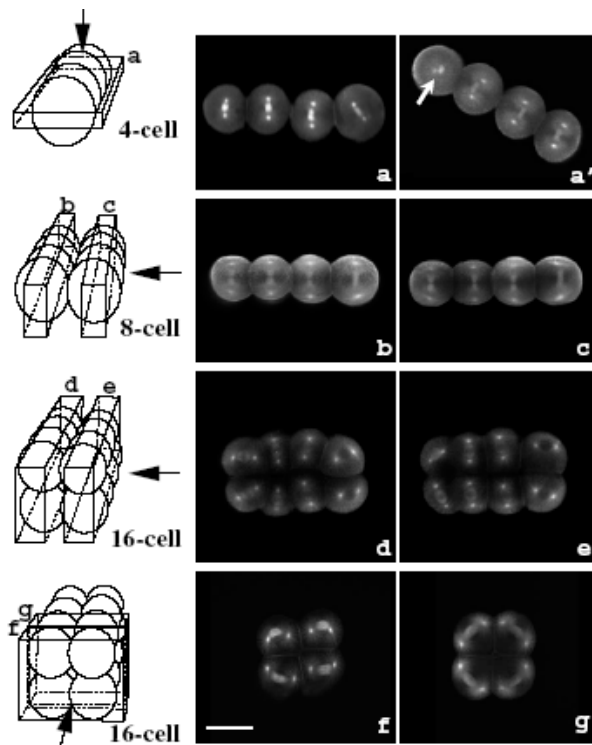


Figure 3.3

La séparation et la réorganisation des cellules de l'embryon de crevette montrent que les pôles des fuseaux se placent vers les zones corticales dépourvues de tout contact avec les cellules voisines. Les flèches montrent l'orientation des vues montrées à droite.

Les divisions du stade 16 cellules montrent effectivement que la position des pôles ne respecte pas le principe centriolaire puisque les fuseaux sont à 45° et non à 90° de leur orientation au cours de la division précédente. (Wang et al., 1997)

L'observation de la rotation du plan de division de 45° seulement entre les stades 16 et 32-cellules contredit le principe centriolaire (Figure 3.3 d et e). Les manipulations et réarrangements de cellules montrent que l'orientation des fuseaux est guidée par les contacts avec les cellules voisines, les pôles se rapprochant des régions corticales dépourvues de tout contact.

Les contacts cellule-cellule guident l'orientation du fuseau

De nombreux exemples confirment que les contacts entre cellules ont un effet déterminant sur l'orientation du fuseau. C'est, par exemple, le cas dans l'embryon de souris au stade 8 cellules (Pickering et al., 1988). De même, dans l'embryon de *Caenorhabditis elegans*, au cours d'une des deux divisions du stade 2 cellules, le fuseau tourne de 90° pour aller toucher la zone de contact avec la cellule voisine (Hyman, 1989; Goldstein, 1995).

Dans l'embryon de poisson-zèbre, les divisions au cours de la formation du tube neural sont d'abord parallèles au plan du neuroépithélium puis perpendiculaires lorsque les deux plaques se rejoignent au cours de la fermeture du tube (Geldmacher-Voss et al., 2003). Ce changement de rotation est corrélé avec le début de la localisation apicale des adhésions cellule-cellules. D'ailleurs dans l'embryon de la mouche *Drosophila melanogaster*, l'orientation des divisions est, elle aussi, contrôlée par des déterminants associés aux adhésions entre cellules, comme APC, qui dirige le fuseau parallèlement au plan du neuroépithélium en interagissant avec EB1 (Figure 3.4) (Lu et al., 2001).

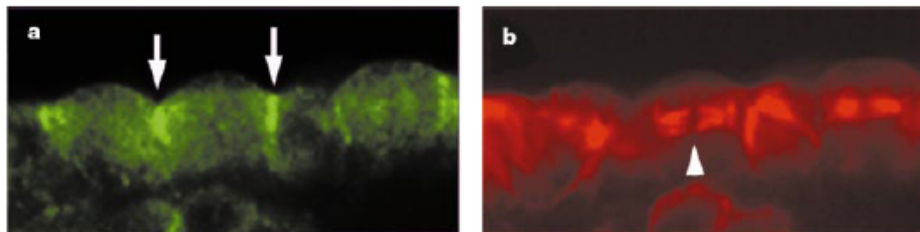


Figure 3.4
Marquage d'APC dans les jonctions adhérentes (a) et des microtubules (b) au cours de la division parallèle plan de l'épithélium de mouche (Lu et al., 2001).

Les contacts cellule-substrat guident l'orientation du fuseau

La fibronectine de la matrice extra-cellulaire et les intégrines dirigent les divisions des cellules de la masse interne de l'embryon de grenouille *Xenopus laevis* (Marsden and DeSimone, 2001). Puis, la fibronectine, les intégrines et la géométrie dirigent ensemble la fermeture du manteau et l'extension du mésoderme au cours de la gastrulation (Davidson et al., 2002). Ces études montrent, qu'en plus de l'importance des contacts entre cellules, les adhésions entre les cellules et la matrice extra-cellulaire guident les divisions et la morphogénèse de l'embryon.

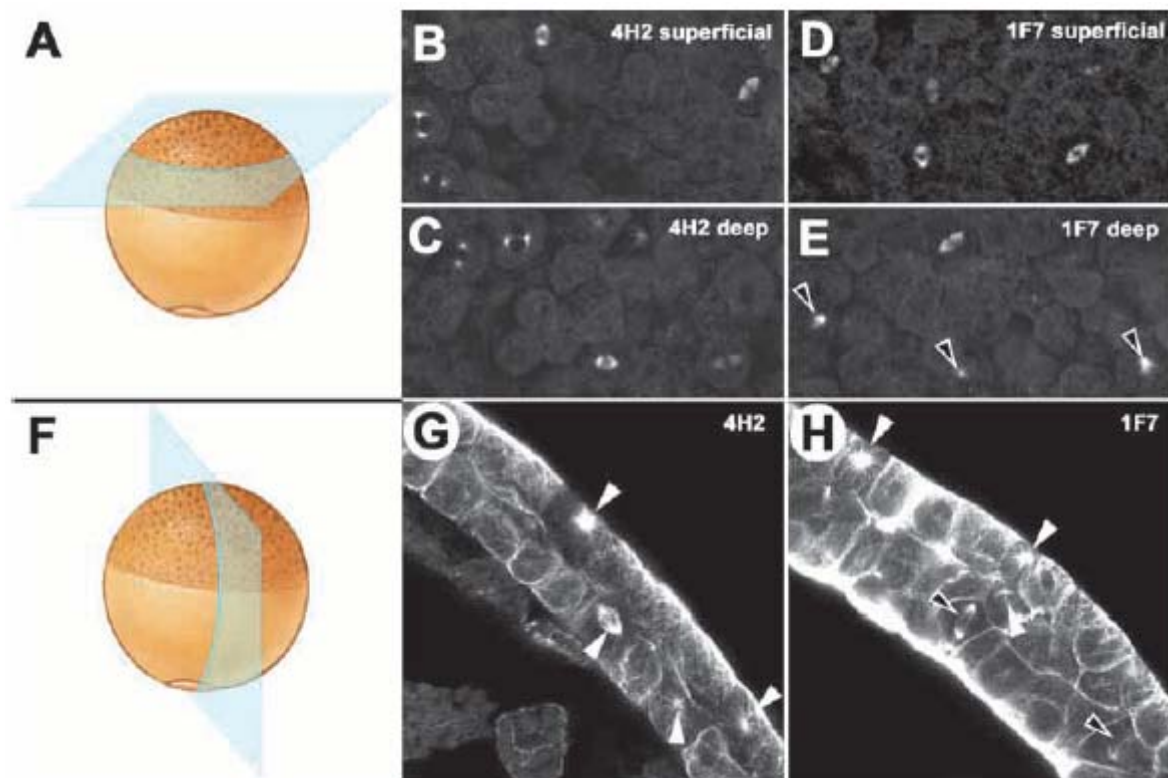


Figure 3.5

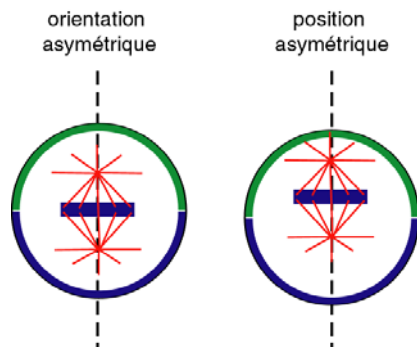
Fuseaux mitotiques dans un embryon de grenouille. A-E : orientation dans un plan tangent à l'embryon ; F-H : orientation dans une coupe de l'embryon. Dans des conditions normales (gauche : B-C et G) les fuseaux sont orientés parallèlement à la surface de l'embryon. Si la fibronectine de la matrice extra-cellulaire ne peut plus interagir avec les intégrines à la surface des cellules à cause de l'injection de l'anti-corps 1F7, l'orientation des fuseaux est fortement perturbée. La matrice extracellulaire participe donc à l'orientation des fuseaux (Marsden and DeSimone, 2001).

I-2 Divisions asymétriques et rôle des marques corticales

Les divisions asymétriques sont indispensables au bon déroulement de l'embryogenèse puisqu'elles permettent la génération de cellules filles différentes. Ce type de division est ainsi à l'origine de la diversité cellulaire au cours de la neurogenèse. Lors d'une division asymétrique, la nature des contacts évoqués précédemment joue un rôle déterminant (Roegiers and Jan, 2004).

De manière générale, une division asymétrique se produit lorsqu'une zone de l'espace attire les pôles du fuseau plus fortement que les autres. Les deux pôles du fuseau peuvent interagir en même temps et de façon symétrique avec cette zone mais cette configuration est instable et un des pôles bascule finalement vers cette zone. Dans certains cas de figure, comme au cours de la neurogenèse chez la mouche ou de la première division de l'embryon précoce de *Caenorhabditis elegans*, ni la forme de la cellule ni la distribution des contacts n'est asymétrique. C'est uniquement la nature biochimique des marques corticales qui influence le positionnement asymétrique du fuseau en créant une zone locale de forte attraction des pôles. Dans d'autres cas de figures, comme chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la forme est asymétrique et c'est l'accumulation locale de certains composants qui crée le site de forte attraction.

Lorsque qu'une cellule est peu allongée toutes les orientations sont possibles, mais si la cellule est allongée, il est rare d'observer un fuseau s'orienter perpendiculairement à la direction d'allongement. Il est donc intéressant de remarquer que, si l'on cherche à le tester expérimentalement, l'effet des marques corticales peut surpasser celui de la géométrie allongée de la cellule et rediriger l'orientation du fuseau (Tsou et al., 2003b).



Il y a plusieurs formes de divisions asymétriques. Le fuseau peut avoir une orientation asymétrique si les deux pôles ne sont pas dans des environnements identiques, c'est-à-dire si l'axe du fuseau est dans le plan de symétrie plutôt que perpendiculaire à ce plan. De plus, le fuseau peut avoir une position asymétrique si un des pôles est plus proche du cortex que l'autre.

Marques corticales et orientation du fuseau chez *Drosophila melanogaster*

Au cours de la neurogenèse de la mouche *Drosophila melanogaster*, les divisions des neuroblastes dans le système nerveux central (Kaltschmidt et al., 2000; Knoblich, 2001), et celles des précurseurs des organes sensoriels dans le système nerveux périphérique (pI) (Bellaïche et al., 2001; Le Borgne et al., 2002) sont asymétriques (Jan and Jan, 2001). Le neuroblaste se divise pour donner deux cellules de taille et de composition différente : une cellule ganglionnaire et un neuroblaste. Au cours de cette division, les protéines corticales Numb sont réparties de façon asymétrique dans le cortex. Numb exclut le complexe Bazooka/PKC/Par6 qui recrute Inscuteable et Pins (Figure 3.6).

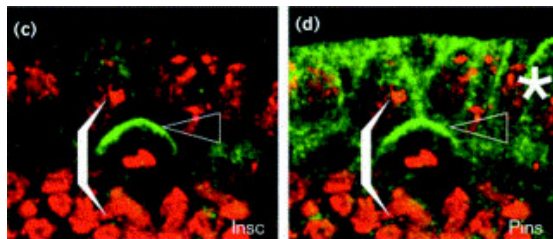
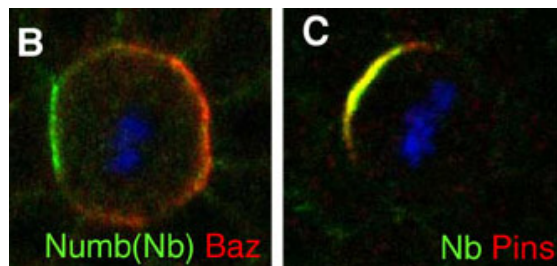


Figure 3.6
Localisation asymétrique des déterminants Inscuteable et Pins au cours de la division des neuroblastes des embryons de mouche.
(Schaefer et al., 2000)



Localisation asymétrique des déterminants Numb, Pins et Bazzoka au cours de la division des pI, précurseurs des organes sensoriels dans le système nerveux des embryons de mouche.
(Bellaïche et al., 2001)

Lors de la division du neuroblaste, la position du fuseau est asymétrique et perpendiculaire au plan de l'épithélium. De plus, la forme du fuseau est asymétrique. Lors de la division des pI, seul le positionnement est asymétrique et parallèle au plan de l'épithélium dans la direction antéro-postérieure de l'embryon (Figure 3.6 et 3.7).

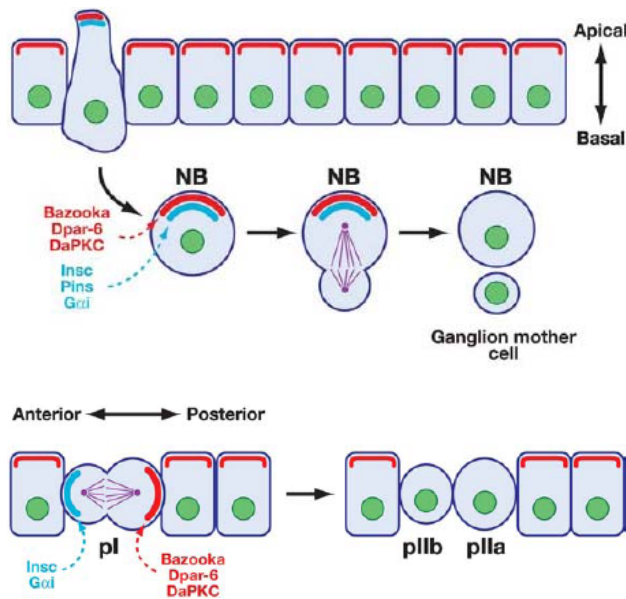


Figure 3.7
Orientation et position asymétrique du fuseau dans la division des neuroblastes.

Orientation et position asymétrique du fuseau dans la division des précurseurs des organes sensoriels.

Zheng AnnuRevCeDevBiol 2004.

Il est intéressant de remarquer que les complexes Bazooka/Par6/aPKC et Gai/Pins/Inscutable en plus de diriger l'orientation du fuseau affectent sa morphologie. Ils le rendent asymétrique lorsqu'ils sont colocalisés comme dans la division des neuroblastes, ou symétrique lorsqu'ils sont diamétralement opposés comme dans la division des précurseurs des organes sensoriels.

Ce système de marque corticale permet donc de contrôler l'orientation du fuseau dans des cellules ayant des formes quasi-sphériques et des contacts sur toute la périphérie. Le fuseau dans les épidermoblastes est parallèle au plan de l'épithélium alors qu'après la délamination des neuroblastes et la disparition des jonction adhérentes, le fuseau va tourner de 90° (Figure 3.8) (Kaltschmidt et al., 2000).

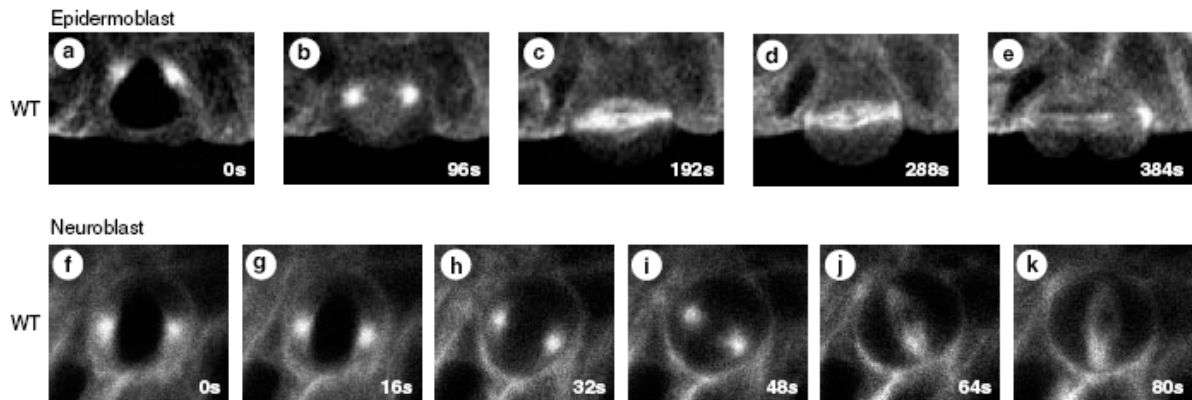


Figure 3.8 Marquage des microtubules au cours d'une division d'épidermoplaste (en haut), parallèle au plan de l'épithélium, et de neuroblaste (en bas), perpendiculaire à ce plan. (Kaltschmidt et al., 2000)

Distribution de la contractilité acto-myosique dans le cortex

La première division dans l'embryon du ver *Caenorhabditis elegans* est asymétrique et les deux cellules filles ont des tailles et des contenus protéiques différents. Les protéines PAR se distribuent asymétriquement dans le cortex de l'embryon et dirigent le positionnement du fuseau (Grill et al., 2001). La distribution asymétrique des protéines PAR est associée à une asymétrie de la distribution des myosines et donc de la contractilité du cortex. L'entrée du spermatozoïde brise la symétrie de l'œuf. Le centrosome apporté par le spermatozoïde provoque l'exclusion du complexe Par3/Par6/PKC du pôle postérieur et facilite ainsi l'expansion de Par2 au cortex. Un flux cortical et la contraction acto-myosique de la moitié contenant Par2 participent à l'exclusion de Par3/Par6/PKC (Lyczak et al., 2002). Une moitié de l'embryon est donc plus contractée que l'autre et cette asymétrie mécanique est indispensable au maintien de la polarité biochimique et au positionnement asymétrique du fuseau en fin de métaphase et au cours de l'anaphase (Munro et al., 2004).

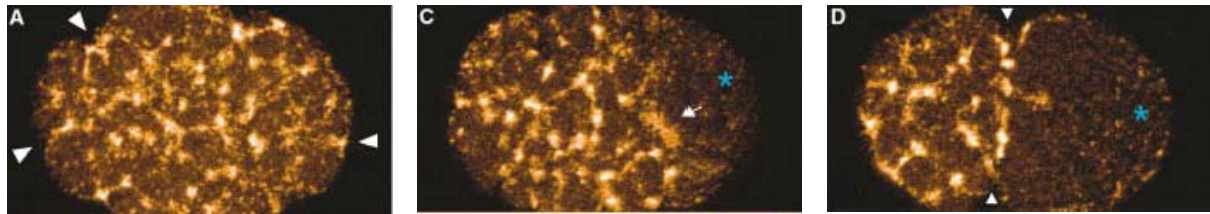


Figure 3.9 Localisation des myosines avant (A) et après (B et C) l'entrée du centrosome associé au spermatozoïde (étoile bleue). La moitié antérieure est plus contractée que la moitié postérieure (Munro et al., 2004).

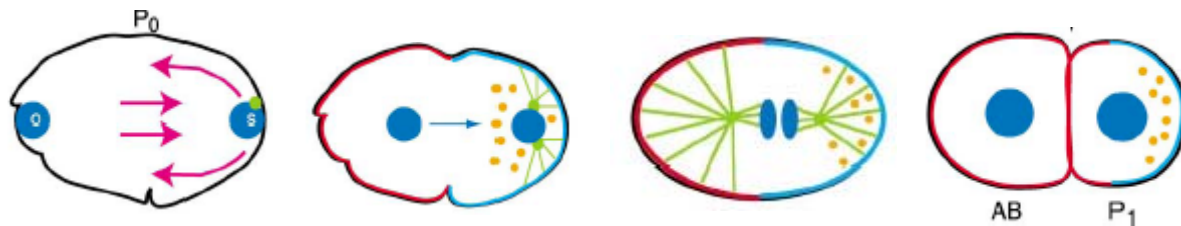


Figure 3.10 Représentation schématique du flux cortical induit par l'effet de l'entrée du spermatozoïde sur l'activité des myosines, puis la ségrégation spatiale de Par3/Par6/PKC (rouge) et Par1/Par2 (bleu) qui s'en suit. Cette distribution asymétrique de protéines Par est à l'origine de la position asymétrique du fuseau et de la génération de deux cellules filles distinctes en taille et en contenu protéique (AB, P1) (Lyczak et al., 2002).

Le rôle des myosines de type V et II dans l'établissement de domaines corticaux asymétriques semble très général car il est conservé de *Caenorhabditis elegans* (Barros et al., 2003) à *Saccharomyces cerevisiae* (Bobola et al., 1996) et aux neuroblastes de *Drosophila melanogaster* (Peng et al., 2000; Barros et al., 2003).

Parallèlement, Concha et Adams proposent une interprétation de leurs observations des divisions dans l'embryon de poisson-zèbre selon laquelle la distribution des forces dans le neuro-épithélium (générées par l'étirement de l'épiblaste au cours de la formation du tube neural) est le facteur qui dirige l'orientation des divisions pendant la gastrula et la neurula (Concha and Adams, 1998).

L'ensemble de ces résultats montrent que la distribution des forces dans une cellule a un impact sur celles de certaines protéines dont la localisation influe sur le positionnement du fuseau.

I-3 Positionnement du fuseau

Comment le fuseau est-il sensible à l'asymétrie corticale ? Plusieurs mécanismes sont connus. Nous verrons que, dans l'embryon de *Caenorhabditis elegans* les moteurs tirent et lâchent les microtubules à des fréquences différentes selon les pôles, alors que chez *Saccharomyces cerevisiae* les microtubules sont emmenés le long des câbles d'actine vers la zone où ils sont ensuite mis sous tension et que dans les cellules de mammifères, des moteurs tirent sur toute la longueur des microtubules ce qui induit une tension plus grande dans les microtubules les plus longs.

Différentes fréquences de mise sous tension des microtubules astraux

Dans l'embryon de *Caenorhabditis elegans*, les tensions exercées sur les pôles par l'intermédiaire des microtubules sont spécifiques des protéines corticales Par2 et Par3. Les localisations de Par2 et Par3 aux pôles respectivement antérieur et postérieur sont à l'origine de l'asymétrie dans la distribution des tensions dans les microtubules astraux. Les protéines Par et les myosines participent à la polarisation des forces et non à leur production qui dépend des dynéines (Gonczy et al., 1999; Severson and Bowerman, 2003). Les forces résultantes sur chaque pôle sont différentes, ce qui induit une position asymétrique du fuseau en métaphase et des mouvements d'oscillations des pôles en anaphase (Figure 3.11) (Grill et al., 2001). Ce n'est ni l'intensité des forces ni la distribution de leurs orientations mais la fréquence à laquelle les moteurs corticaux tirent sur les microtubules qui diffère entre les pôles (Grill et al., 2003; Grill and Hyman, 2005) (pour une revue sur la production de force sur les microtubules en contact avec le cortex voir (Dogterom et al., 2005)). Le temps de résidence des microtubules est plus long au pôle antérieur où les fréquences sont plus faibles, et plus court au pôle postérieur où elles sont plus élevées (Labbe et al., 2003). Ainsi, le centrosome est attiré plus fortement par les zones où les microtubules sont les moins stables. L'asymétrie de ces forces évoluent dans le temps jusqu'en anaphase où elles participent directement à la séparation des chromosomes (Labbe et al., 2004).

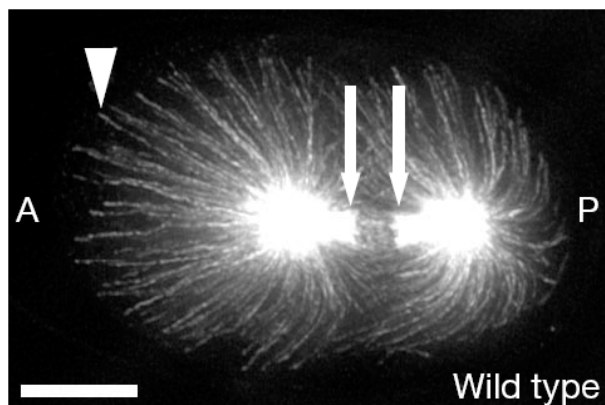


Figure 3.11
Microtubules au cours de la première division de l'embryon de *Caenorhabditis elegans*. Les moteurs tirent plus fréquemment au pôle postérieur (P) qu'au pôle antérieur (A) ce qui induit un déplacement du fuseau vers le pôle postérieur (Grill et al., 2001).

Transport des microtubules astraux vers la zone de mise sous tension

La levure *Saccharomyces cerevisiae* a une forme asymétrique : elle pousse une petite excroissance sphérique (« bud ») qui deviendra la cellule fille. Des câbles d'actine longent le corps de la levure jusque dans le bud. Les microtubules, qui arrivent sur ces câbles sont pris en charge par la myosine IV qui transporte le microtubule le long des câbles vers le bud (Hwang et al., 2003). Là, les microtubules sont mis sous tension, ce qui déplace le fuseau vers le bud et lui donne une position asymétrique (Figure 3.12) (Korinek et al., 2000; Liakopoulos et al., 2003). Il est intéressant de remarquer que dans ce système les microtubules amènent au cortex les moteurs qui, une fois liés aux câbles d'actine, les guideront vers leur cible.

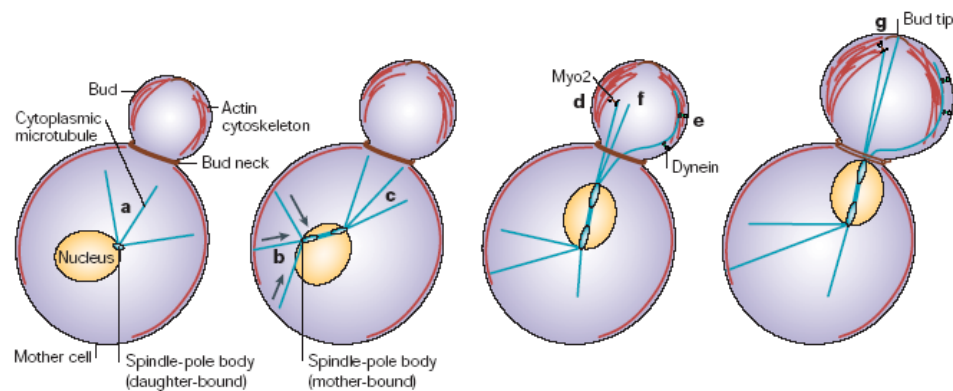


Figure 3.12 Orientation du fuseau chez *S. cerevisiae*. Les microtubules (bleus) chargent des moteurs sur les câbles d'actine (rouges) qui les tirent vers le bud ce qui induit le positionnement asymétrique du fuseau (Pearson and Bloom, 2004).

Traction exercée tout le long des microtubules astraux

Ce mécanisme est original car, contrairement aux deux précédents, le microtubule n'est pas tiré à son extrémité mais sur toute sa longueur. Ce mécanisme n'est toutefois qu'une hypothèse qui a été proposée pour expliquer la capacité des fuseaux à s'orienter selon le grand axe des cellules (O'Connell and Wang, 2000). En manipulant la forme des cellules avec une micropointe, O'Connell et Wang ont montré que le fuseau était systématiquement orienté selon le grand axe des cellules (Figure 3.13).

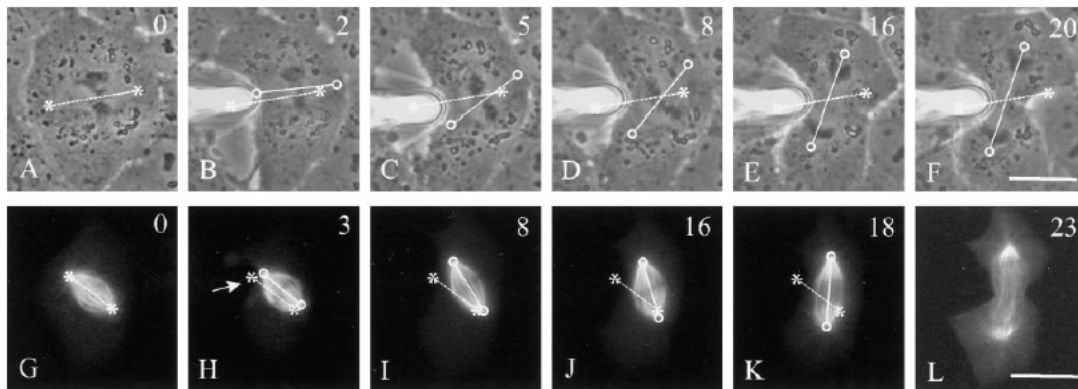


Figure 3.13 En modifiant la forme de la cellule, le fuseau se déplace et se réoriente de telle sorte qu'il est toujours aligné avec le grand axe des cellules (O'Connell and Wang, 2000).

Cette réorientation n'est plus possible si les dynéines sont inhibées. Puisque les dynéines sont présentes sur toute la longueur des microtubules astraux les auteurs proposent un modèle basé sur le fait que les microtubules astraux tirent d'autant plus fort qu'ils sont longs (car ils interagissent avec plus de dynéines) ce qui oriente le fuseau selon le grand axe de la cellule (Figure 3.14).

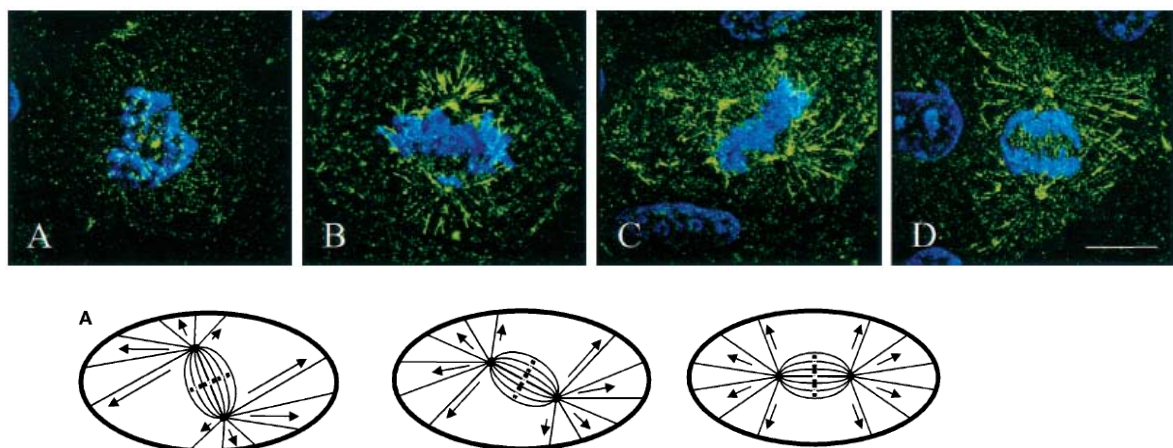


Figure 3.14 Les dynéines (jaunes) décorent les microtubules astraux des cellules NRK sur toute leur longueur. L'accumulation de dynéines augmente la tension sur les microtubules les plus longs ce qui oriente le fuseau. (O'Connell and Wang, 2000)

I-3 Définition du plan de division

Nous avons vu comment la géométrie, les contacts cellule-cellule, les marques corticales et la distribution des contraintes pouvaient induire une hétérogénéité corticale. Nous avons ensuite présenté plusieurs mécanismes permettant au fuseau de sentir et de s'orienter par rapport à cette hétérogénéité. Il reste maintenant à savoir comment le cortex et le fuseau vont définir le plan de division.

Détermination du plan de division par le fuseau

La polarité corticale étant souvent établie en réponse à des signaux externes, on peut donc supposer que le cortex contient dès le début de la mitose et même en interphase, les informations spatiales nécessaires au positionnement du fuseau et du plan de division. Toutefois, plusieurs études, dans lesquelles les auteurs déplacent les fuseaux artificiellement, montrent que le plan de division dans les cellules de mammifères ne dépend que de la distribution spatiale des microtubules astraux. Les microtubules seraient les seuls constituants du fuseau indispensable à l'assemblage de l'anneau contractile (Rappaport, 1961; Alsop and Zhang, 2003). L'hétérogénéité de la distribution des contacts entre les microtubules astraux et le cortex, due à la forme bipolaire du fuseau, suffit à créer des zones plus ou moins riches en microtubules et donc plus ou moins contractées. L'exclusion entre Rho et Rac, ainsi que les boucles de rétroaction positive entre la dépolymérisation des microtubules et contractilité, suffisent pour que les positions des asters définissent le plan de division (White, 1985; Mandato et al., 2000; Yoshizaki et al., 2003). Toutefois, plusieurs modèles sont encore débattus pour savoir comment le fuseau guide l'hétérogénéité corticale et définit le plan de division. La proximité des pôles du fuseau et le fort taux de polymérisation des microtubules peuvent induire une activation locale de Rac et une relaxation du cortex près des pôles qui suffit à induire une contraction de la zone de contact entre les deux zones relaxées : c'est la **relaxation astrale** (Figure 3.15). Les microtubules plus longs ont une plus grande probabilité de dépolymérisation. Donc ceux qui atteignent les zones les plus éloignées des pôles, c'est à dire l'équateur, provoquent la contraction du cortex : c'est la **stimulation équatoriale**. Par ailleurs, la zone intermédiaire du fuseau contient les chromosomes et de nombreuses protéines dont l'accumulation locale provoque la formation d'un disque sur le cortex qui se contracte en télophase : c'est l'hypothèse du **disque télophasique**. Ces trois hypothèses sont encore d'actualité (Oegema and Mitchison, 1997; Glotzer, 2001).

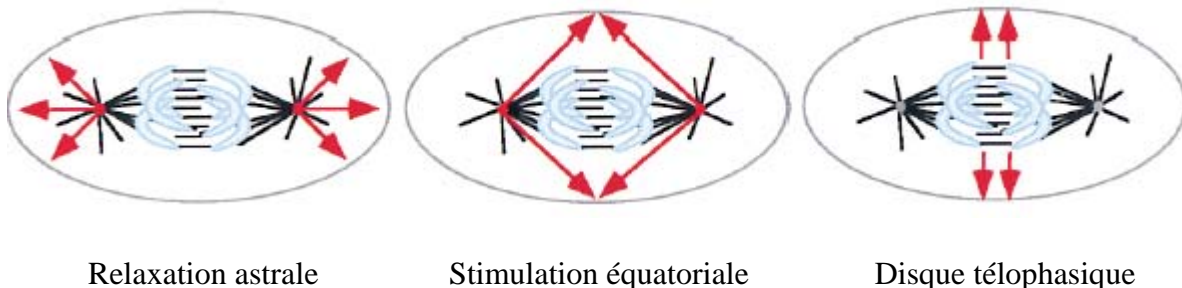


Figure 3.15 Détermination du plan de division par le fuseau mitotique (Oegema and Mitchison, 1997)

Le cortex va se contracter au niveau du plan de division, notamment sous l'action des myosines activées par RhoA. Les microtubules dirigent l'activation de RhoA et ainsi la définition du plan de division dans des embryons d'oursins et de grenouille indépendamment de l'actine (Bement et al., 2005). Dans cette étude les auteurs finissent pas suggérer que la complémentarité des zones d'activités de RhoA sur l'anneau et de Cdc42 en dehors de l'anneau permet d'imposer la finesse de la zone contractile.

Ces diverses hypothèses attribuent toutes un rôle déterminant à la position du fuseau. Ce qui justifie qu'un changement artificiel de cette position change le plan de division (Rappaport, 1985; Canman et al., 2000; Canman et al., 2003; Shannon et al., 2005). Plus précisément le plan de division des cellules de mammifères semble déterminé par les microtubules en contact avec les chromosomes (Canman et al., 2003; Shannon et al., 2005). Ce rôle potentiel des protéines associées aux chromosomes corrobore les observations des divisions de neuroblastes de drosophile sans microtubules astraux dans lesquels le plan de division est correctement positionné autour de la zone centrale du fuseau (Giansanti et al., 2001). Par contre, dans ce cas de figure, certains marqueurs corticaux ne sont plus à la bonne place, ce qui suggère que même si la constriction a lieu au bon endroit, le cortex, lui, n'a pas la bonne distribution de marqueurs. Le débat aux fins de savoir si se sont les microtubules astraux, ceux qui passent par les chromosomes, les chromosomes eux-même, le télophase disque ou le fuseau intermédiaire qui détermine le plan de division est ouvert. Ces hypothèses sont non-exclusives et plusieurs pourraient même se compléter (Murata-Hori and Wang, 2002; Bringmann and Hyman, 2005). En effet il semble que différents mécanismes sont utilisés selon les organismes et que, parfois, plusieurs sont actifs en même temps (Glotzer, 2001; Canman et al., 2003).

Le fuseau et le cortex se coordonnent

Plusieurs mécanismes de définition du plan de division ont été proposés. A priori, ils ne sont pas incompatibles.

Mécanisme 1 : l'asymétrie corticale guide la position fuseau et le plan de division. La composition du cortex est déterminante. Cette hypothèse est soutenue par les observations dans l'embryon de *Caenorhabditis elegans* et de *Drosophila melanogaster*.

Mécanisme 2 : la position du fuseau guide l'asymétrie corticale et le plan de division. La position du fuseau est déterminante. Cette hypothèse est soutenue par les observations chez les cellules de mammifères en culture et des expériences de Raymond Rappaport.

Il est envisageable que les deux mécanismes soient toujours présents mais avec des poids respectifs variables. La polarité corticale influence le positionnement du fuseau. Le fuseau lui-même est bipolaire et capable d'imposer une polarité au cortex par l'effet de la polymérisation des microtubules et de gradients chimiques autour de la plaque métaphasique. Ces deux actions trouvent un point d'équilibre lorsque les deux polarités sont confondues. En temps normal, la liberté de rotation du fuseau permet aux équilibres de se rencontrer. Cette résonance procure une grande stabilité au positionnement du fuseau. Les deux actions, celle du cortex sur le fuseau et celle du fuseau sur le cortex, peuvent induire des profils énergétiques qui désignent chacun des positions d'équilibre plus ou moins stables selon les systèmes (en fonction des tailles respectives du fuseau et du cortex) et les conditions

expérimentales (en fonction de l'effet plus ou moins polarisant de l'environnement sur le cortex). Le rôle du fuseau serait manifeste dans les cellules de mammifères en culture car le cortex est plu mou et donc plus maléable que chez une levure ou un œuf. Le rôle du cortex serait plus visible chez *Caenorhabditis elegans* où le fuseau est petit et le cortex préalablement polarisé par l'entrée du spermatozoïde. Un des effets peut parfois masquer l'autre. Ainsi, en détruisant ou affaiblissant l'un des deux effets, on révèle la contribution de l'autre. Ceci est bien illustré par l'effet de l'inhibition du gène *spn-4* chez *Caenorhabditis elegans* : en condition sauvage le cortex guide le fuseau, mais si le gène *spn-4* est muté le fuseau modifie le cortex et change le plan de division (Figure 3.16) (Gomes et al., 2001). De façon générale les deux effets contribuent ensemble à la définition du plan de division avec des poids spécifiques variables.

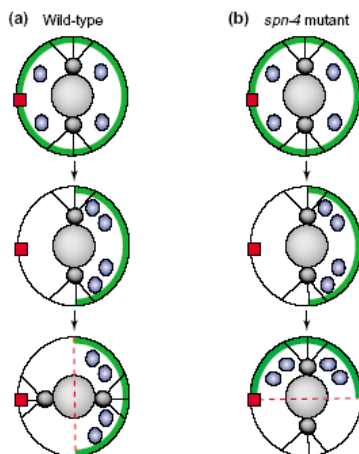


Figure 3.16

Dans l'embryon de *Caenorhabditis elegans* sauvage au stade deux cellules, la ségrégation asymétrique des déterminants précède la rotation du fuseau qui est attiré par la marque corticale rouge. C'est donc le cortex qui guide le fuseau.

Dans l'embryon de *Caenorhabditis elegans* muté pour le gène *spn4* la rotation n'a pas lieu. Le fuseau réorganise la distribution des déterminants. C'est donc le fuseau qui guide le cortex. (Gonczy, 2002)

Les interactions entre le fuseau et le cortex pour définir la position du plan de division dépendent aussi du temps. Quelques études récentes illustrent cette dépendance et suggèrent que ce n'est qu'en prophase que la position du noyau est déterminante pour le positionnement du plan de division chez *Shizosaccharomyces pombe* (Figure 3.14) (Daga and Chang, 2005; Mendoza et al., 2005).

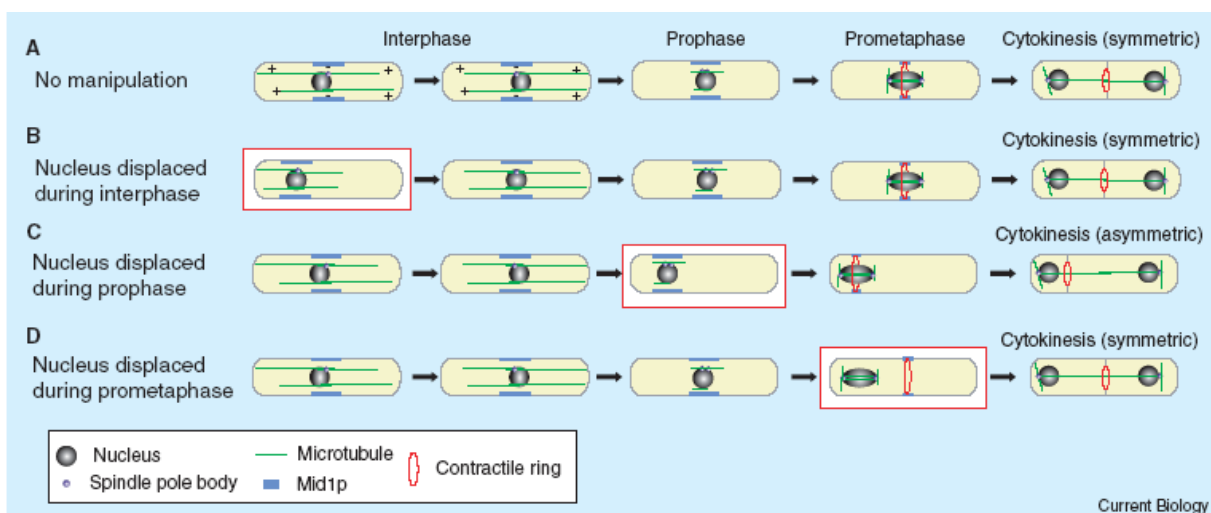


Figure 3.14 Modification de plan de division de la levure *Shizosaccharomyces pombe* par déplacement du noyau. Si le fuseau est déplacé de façon intermittente avant ou après la prophase, cela n'a aucun effet alors que s'il est déplacé en prophase, le plan de division est déplacé. (Mendoza et al., 2005)

II- Une mère, deux filles, un patron

En introduction à l'article publié sur l'orientation des divisions cellulaires, nous présenterons d'abord certaines observations permettant de poser les questions abordées dans l'article.

Au cours de sa division, la cellule adhérente s'arrondit. Les chromosomes dupliqués se compactent (prophase). La membrane nucléaire se désagrège. Le centrosome est dupliqué et les deux copies se positionnent de part et d'autre des chromosomes. Les chromosomes, sous l'action des microtubules, se réunissent et forment une plaque (métaphase). Le réseau de microtubules forme un fuseau. Le fuseau relie les chromosomes aux centrosomes et les centrosomes au cortex cellulaire. Puis, les deux jeux de chromosomes sont séparés (anaphase). La cellule ronde s'allonge et se pince entre les deux jeux de chromosomes (télophase). Les deux cellules encore attachées s'étalent à nouveau. Ce processus dure environ une heure. Puis finalement, le pont qui les relie est coupé (cytocinèse).

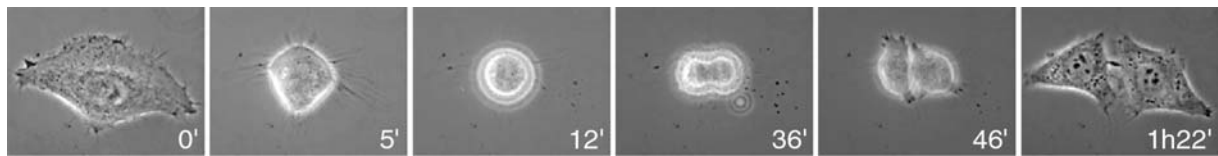


Figure 3.15 Mitose d'une cellule HeLa

L'introduction précédente a souligné la complexité des processus impliqués dans la définition de l'axe de division des cellules et, en particulier, l'importance du rôle joué par les cellules voisines pour les systèmes multicellulaires et l'asymétrie corticale pour les êtres unicellulaires. Si les informations sont si peu nombreuses sur la division des cellules en culture, c'est sûrement que ce système expérimental n'est pas parfaitement adapté à l'étude de la division. En effet, les cellules y sont sur un plan homogène au lieu d'être dans un environnement tri-dimensionnel hétérogène comme dans un tissu. De plus, le substrat est très rigide ce qui modifie leur comportement mécanique. Les cellules ne sont ni vraiment isolées ni vraiment en épithélium par conséquent il est difficile de déterminer exactement les informations qu'elles reçoivent de leur environnement. Ce n'est donc, a priori, pas un très bon système expérimental pour étudier l'orientation des divisions.

Cependant, il est apparu que, dans des conditions bien particulières, la disposition des deux cellules filles ne semblait pas indépendante de la forme de la cellule mère. En entrant en mitose, la cellule s'arrondit. Cette forme sphérique laisse penser qu'à ce stade, les symétries sont telles que la cellule ne possède plus aucune information spatiale. En effet, si les contacts entre cellules sont forts comme dans un épithélium de cellules NRK ou PtK, les cellules restent accrochées à leurs voisines et ne s'arrondissent pas complètement. Dans ce cas, le fuseau s'oriente en fonction de l'allongement de la forme de la cellule (O'Connell and Wang, 2000). Mais la forme parfaitement ronde des HeLa en mitose laisse penser que, dans ces cellules, la symétrie est sphérique (ou cylindrique si l'on considère qu'elles sont au contact de la lamelle et non en suspension). Cependant, nous avons constaté, qu'après la division, les deux cellules filles reprenaient ensemble la forme exacte qu'avait leur cellule mère. Ceci suggère que la cellule mitotique, bien que ronde, conserve des traces de sa forme antérieure (Figure 3.16 et 3.17).

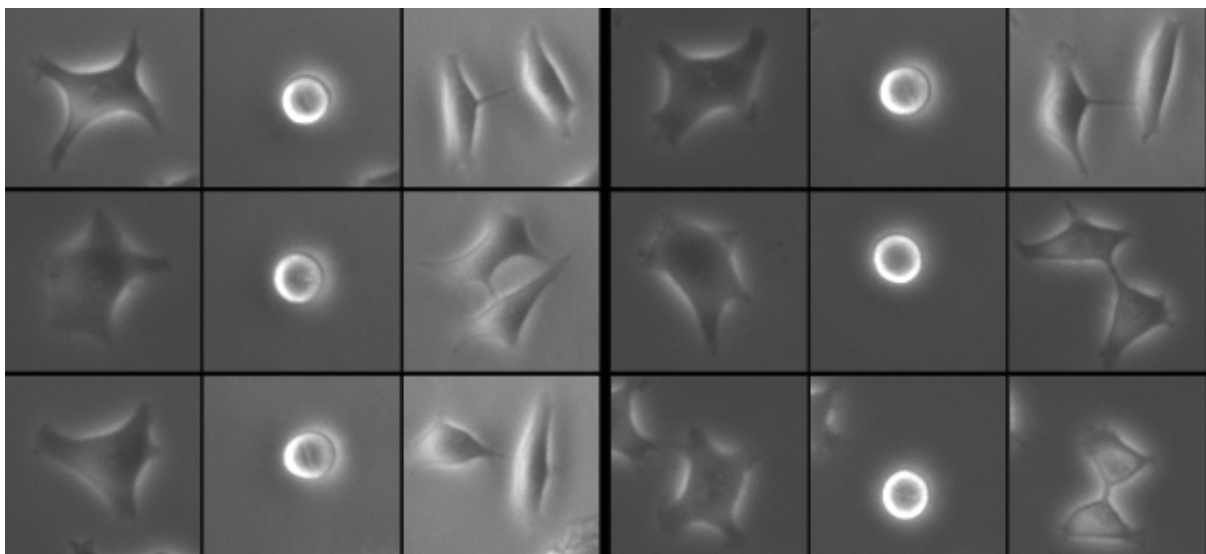


Figure 3.16 Deux panneaux montrant dans la colonne de gauche la cellule, 10 minutes avant l'arrondissement, dans la colonne centrale, la cellule ronde et dans la colonne de droite, les deux cellules filles 15 minutes après le début de l'étalement .

Cette reproductibilité du comportement des cellules filles témoigne d'un mécanisme qui nous semblait important. En effet si un événement cellulaire est reproductible en absence de stimulation particulière c'est que la cellule procède avec une régularité si forte qu'il devient visible même au sein de la variabilité des situations.

En regardant de près, on constate que les cellules filles vont précisément s'attacher sur les anciens ancrages de leur cellule mère et on peut se demander si l'axe de la division n'est pas lui aussi guidé par ces ancrages, ce qui semble envisageable dans des cas simples comme ceux-ci :

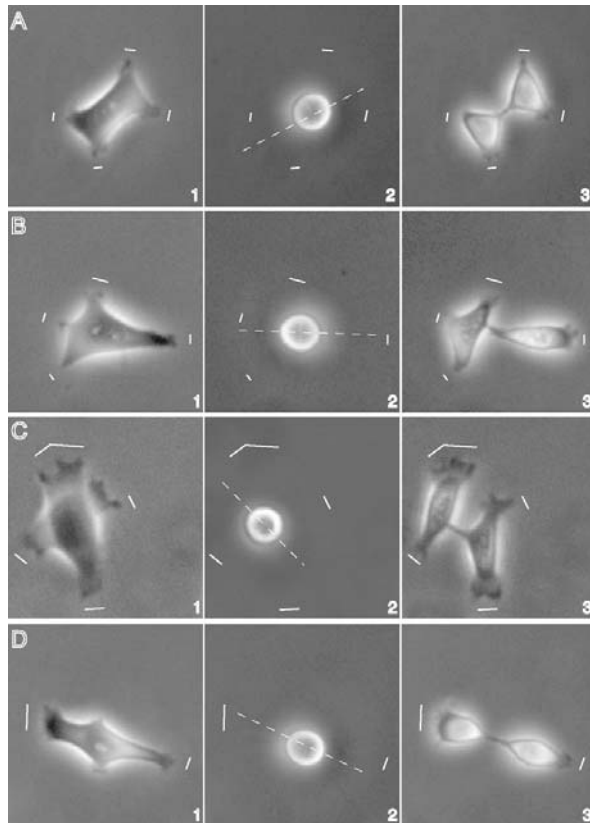
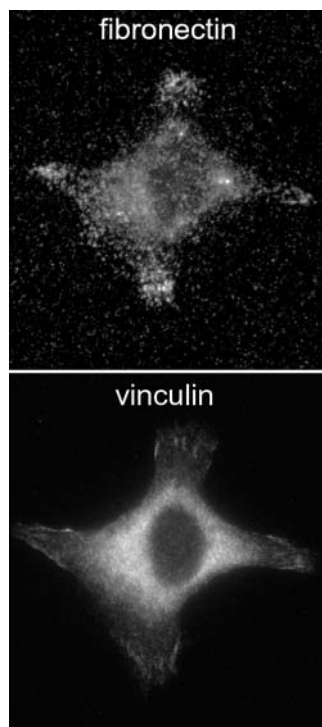


Figure 3.17 Observation en contraste de phase, 10 minutes avant l'arrondissement (1), pendant la métaphase (2) et 15 minutes après le début de l'étalement (3). Les marques blanches dessinées à partir de la forme de la mère sont reportées sur les deux autres images.

Toute la problématique développée dans l'article peut donc être abordée avec un dispositif expérimental extrêmement simple : une lamelle silanisée et un milieu pauvre en sérum. Les micro-patrons adhésifs ne seront finalement qu'un moyen fiable de contrôler ce qui nous est apparu comme étant le facteur déterminant de la reproductibilité observée : une adhésion restreinte.

II-1 De la cellule étalée en interphase à la cellule ronde en mitose

Les milieux de culture contiennent de nombreuses protéines de la matrice extra-cellulaire en plus des facteurs de croissance nécessaires à la survie des cellules. Ces protéines se déposent sur le substrat et sur les cellules qui, par conséquent, se retrouvent dans un environnement uniformément adhésif. Ces conditions adhésives peuvent être rendues beaucoup plus contraignantes. Il suffit, pour cela, de retirer le sérum du milieu de culture et de déposer les cellules sur une lame de verre silanisée et non sur une lame de verre préalablement greffée avec de la matrice extra-cellulaire. Les cellules peuvent alors adhérer légèrement au silane mais ne pourront développer d'ancrages spécifiques (intégrines) qu'avec la matrice qu'elles auront sécrétée. Ainsi, les cellules touchent le substrat, s'étalent un peu, sécrètent de la matrice et s'accrochent à cette matrice. Elles fabriquent ainsi leur propre patron adhésif (Figure 3.18).



Dans des conditions peu adhésives, les cellules sécrètent de la fibronectine et se fabriquent leur patron adhésif.

Figure 3.18 Les cellules sont déposées sur une lamelle silanisée dans un milieu sans sérum. Après fixation au méthanol à -20°C , la fibronectine est révélée par un immuno-marquage, ainsi que la vinculine. On peut voir le patron de fibronectine que la cellule a sécrétée.

Selon les zones dans lesquelles la cellule dépose cette matrice, et la concentration qu'elle dépose, l'activité de l'actine en périphérie est modifiée. En effet, lorsque la cellule dépose de la matrice à un endroit elle y fait des protrusions. Si elle se retire pour aller ailleurs puis revient, elle refait des protrusions sur cette même zone. Sur les autres zones où elle dépose peu ou pas de matrice, elle glisse sans faire de protrusion. Donc, son patron adhésif gouverne son activité membranaire et l'inhomogénéité de son cortex. Cette inhomogénéité est maintenue dans le temps. Puis, en entrant en mitose, la cellule s'arrondit. En se retirant des zones où elle avait développé des adhésions et où elle avait fait des protrusions, la cellule forme des fibres de rétraction (Figure 3.19) (voir les films « *Ruffles RF* », « *Mitotic Pattern* », « *Retraction Fibres* », et la série « *Mother Daughters* » ainsi que leurs légendes en annexe 2). La cellule mitotique ne forme pas de fibre de rétraction à partir des zones où elle n'adhérait pas. Par conséquent, la cellule mitotique est ronde mais elle possède des zones corticales avec fibres et des zones sans fibre. Ces zones sont la projection sur le cortex mitotique de ce qu'était le patron adhésif de la cellule en interphase. La cellule mitotique bien que ronde est donc encore en contact avec son patron adhésif pré-mitotique (Figure 3.20).

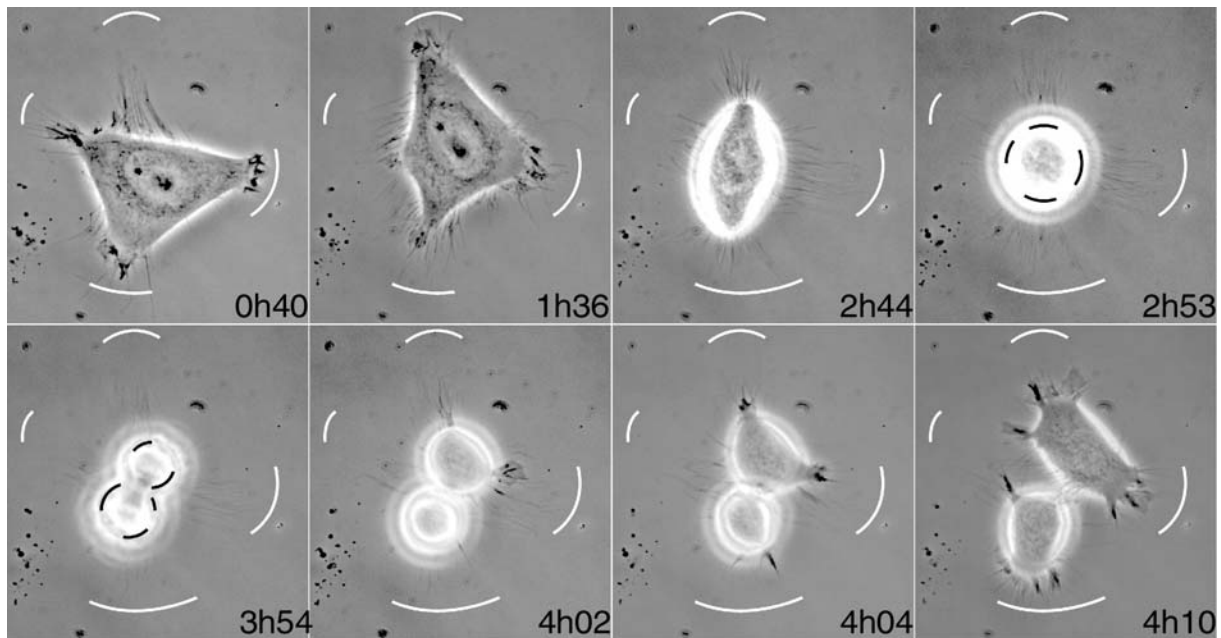


Figure 3.19. En contraste de phase, les protrusions de la cellule sont visibles en noir à la périphérie de la cellule (membrane noire sur 0h40 et 1h36). Les bords lisses et ronds sont blancs en contraste de phase. Les zones de protrusion sont marquées par une portion de cercle blanc. On voit qu'en entrant en mitose, la cellule s'arrondit en formant des fibres de rétraction dans ces zones mais pas dans les autres (2h44). Ces fibres sont arrimées dans le cortex de la cellule mitotique au niveau des zones marquées par une portion de cercle noir (2h53). On voit que ces zones sont la projection sur le cortex des anciennes zones de protrusions (noir = projection du blanc). En s'étalant (4h02 et 4h04), les cellules filles font des protrusions là où sont arrimées les fibres de rétractions qui guident l'étalement des cellules filles vers le patron adhésif de la cellule mère.

Cette hypothèse de l'existence de marques corticales en mitose correspondant à l'activité de l'actine avant l'entrée en mitose est compatible avec l'observation de la complémentarité des distributions des activités de Rho et Rac sur le cortex de cellules mitotique (Yoshizaki et al., 2003).

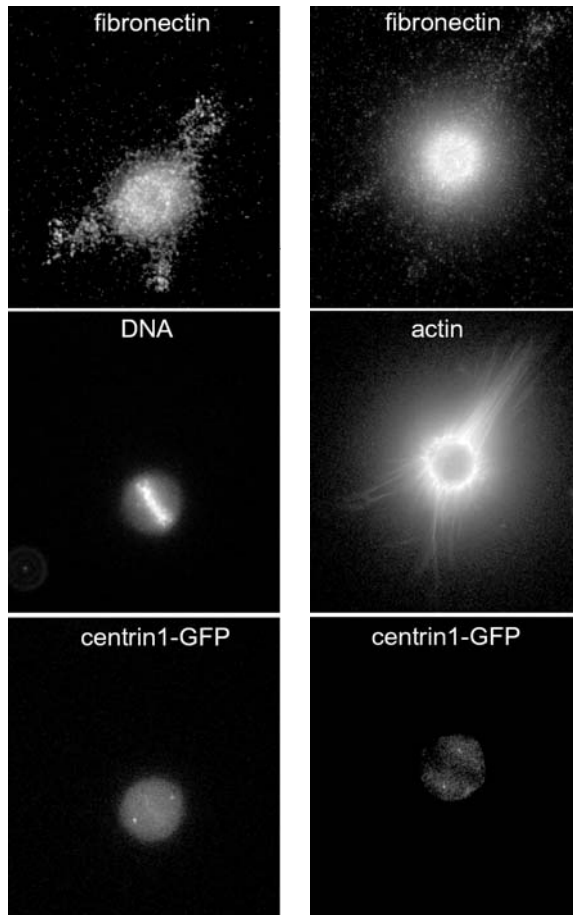


Figure 3.20
Pendant la mitose, le patron adhésif fabriqué par la cellule en interphase est maintenu (marquage fibronectine à gauche) et la cellule reste en contact avec lui par l'intermédiaire des fibres de rétractions qui sont de fins tubes de membrane riche en actine (marquage actine à droite).

La cellule mitotique n'est donc pas homogène puisque son cortex contient des zones avec et des zones sans fibres de rétraction qui correspondent aux zones de protrusion ou de contraction avant l'entrée en mitose (Figure 3.21).

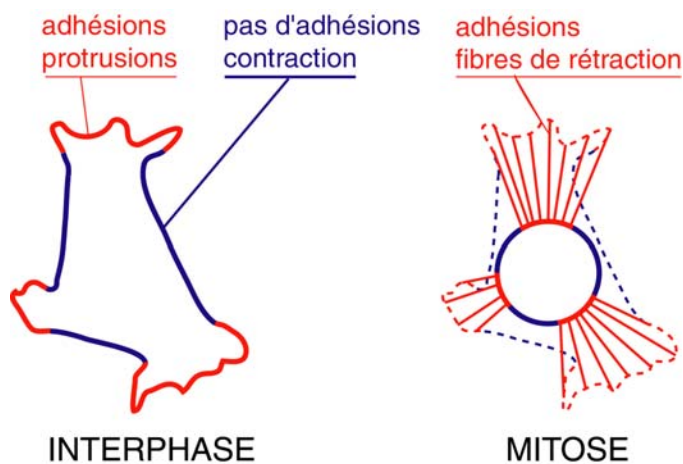
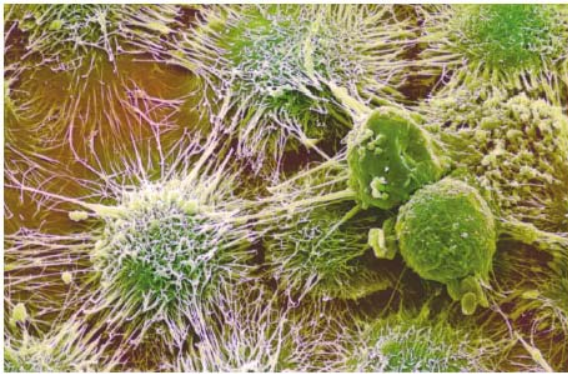


Figure 3.21
Hypothèse de travail : par l'intermédiaire des fibres de rétraction, la cellule mitotique possède sur son cortex une projection de son activité corticale pré-mitotique.

L'arrondissement mitotique fait suite à deux changements physiologiques dans la cellule : la **déadhésion** et la **contraction corticale**.

La déadhésion est un désengagement des adhésions et du cytosquelette d'actine. La phosphorylation des intégrines $\beta 1$ réduit le lien intégrine-actine (Suzuki and Takahashi,

2003). Les nombreuses phosphorylations des sérines et/ou thréonines de la paxiline, de la FAK et de la CAS et la déphosphorylation de leurs tyrosines sont également spécifiques à l'entrée en mitose. En conséquence, le complexe FAK/CAS/Src se détache des adhésions et les FAK lient moins les intégrines. Ceci induit une réduction de la signalisation propre aux intégrines à l'entrée en mitose (Yamaguchi et al., 1997; Yamakita et al., 1999) et une diminution de la traction exercée sur le substrat (Burton, 1997). L'activité de RhoA augmente en mitose, elle ne participe pas à la déadhesion mais à la rétraction corticale pendant l'arrondissement et à sa contraction (Maddox and Burridge, 2003). C'est au cours de cette étape que se forment les fibres de rétraction. Ces fibres ont été décrites depuis longtemps grâce à la microscopie électronique à balayage et les fixations à la glutaraldéhyde (Figure 3.22). Par exemple les BHK21 s'arrondissent complètement en mitose et forment des micro-villosités (une forme de réserve de membrane) et des fibres de rétraction (Erickson and Trinkaus, 1976).



Cancer cells (green) in kidneys: at the centre of a misconduct case involving vaccine trials.

Figure 3.22
Fibres de rétraction révélées en microscopie électronique à balayage.

Les cellules PtK2 s'arrondissent peu en mitose mais forment également beaucoup de micro-villosités et des fibres de rétraction (Sanger, 1984). Plus récemment, des études du groupe de Tim Mitchison ont révélé que ces fibres pouvaient être le lieu de formation de nodules capables de remonter vers le corps cellulaire (Cramer and Mitchison, 1997), qu'elles contenaient des filaments d'actine polarisée et provoquaient des accumulations de myosines dans le cortex de la cellule mitotique (Figure 3.23) (Cramer and Mitchison, 1995). Et enfin, que ces fibres permettaient aux cellules filles de s'étaler (Cramer and Mitchison, 1993).

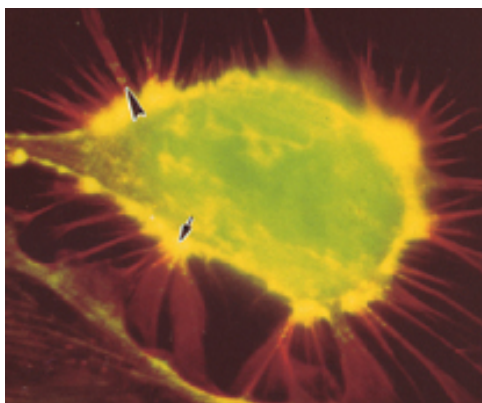


Figure 3.23
Marquage de la myosine (vert) et de l'actine (rouge) au cours de la mitose de cellule PtK2. Ces cellules ne s'arrondissent pas complètement en mitose (Cramer and Mitchison, 1995).

Au cours de cet étalement, les cellules remplissent les fibres qui restent stationnaires. En interphase, en général, les câbles d'actine font du « treadmilling » et reculent par rapport au substrat ; par contre, au cours de l'étalement post-mitotique, ils restent fixes et le bord avant de la cellule avance dessus. Ces études expliquent pourquoi nous avons pu observer un étalement des cellules filles vers le patron adhésif de la cellule mère : c'était la recolonisation des fibres de rétraction formées au cours de l'arrondissement mitotique.

II-2 Orientation du fuseau face aux fibres de rétraction

L'étalement est guidé par les fibres de rétraction. On peut supposer que les fibres ont préalablement guidé le positionnement du fuseau. En effet, si la zone corticale dépourvue de fibres est contractile en mitose comme elle l'était en interphase, elle pourrait correspondre à ce qui deviendra l'anneau de division. De même, les centrosomes pourraient bien faire face aux zones riches en fibres en mitose comme ils faisaient face aux protrusions en interphase (Figure 3.24).

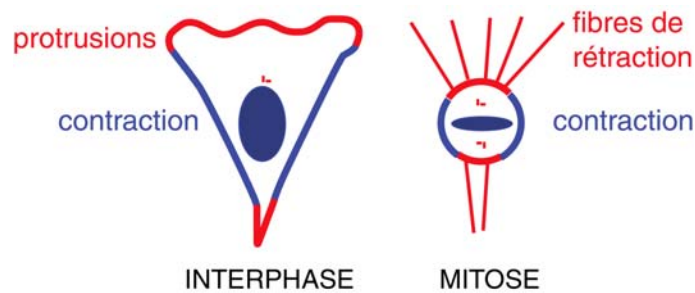


Figure 3.24
Correspondance entre les mécanismes d'orientation de la polarité en interphase et en mitose

En effet, sur l'image suivante où la cellule est encore étalée pendant sa prophase on voit que les microtubules et les centrosomes sont positionnés vers les zones de protrusion (Figure 3.25).

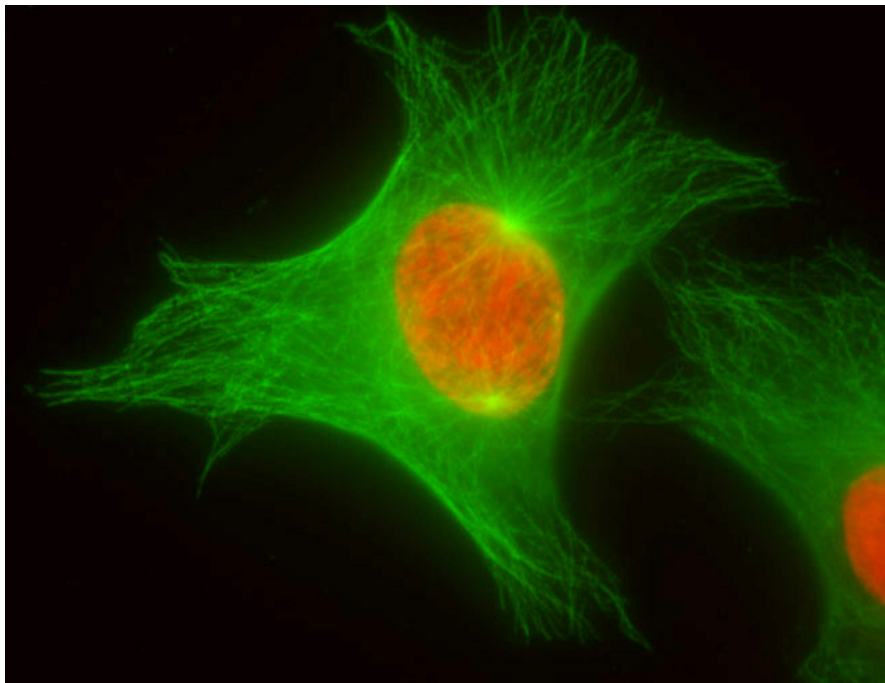


Figure 3.25 Marquage des microtubules (vert) et de l'ADN (rouge) d'une cellule HeLa en prophase.

Une hypothèse alternative en adéquation avec la littérature serait que l'allongement de la cellule est le facteur déterminant pour l'orientation du fuseau. Il est donc nécessaire de tester cette hypothèse. Si l'on observe la formation du fuseau dans des cellules en culture, libres de se mouvoir, on constate que les centrosomes se séparent avant l'arrondissement de la cellule alors que la cellule est encore très allongée (voir l'article sur les divisions). De plus, si l'on mesure l'orientation de l'allongement de la cellule et celle que prend le fuseau, on constate que le fuseau a effectivement tendance à s'orienter le long de l'allongement de la cellule (Figure 3.26)

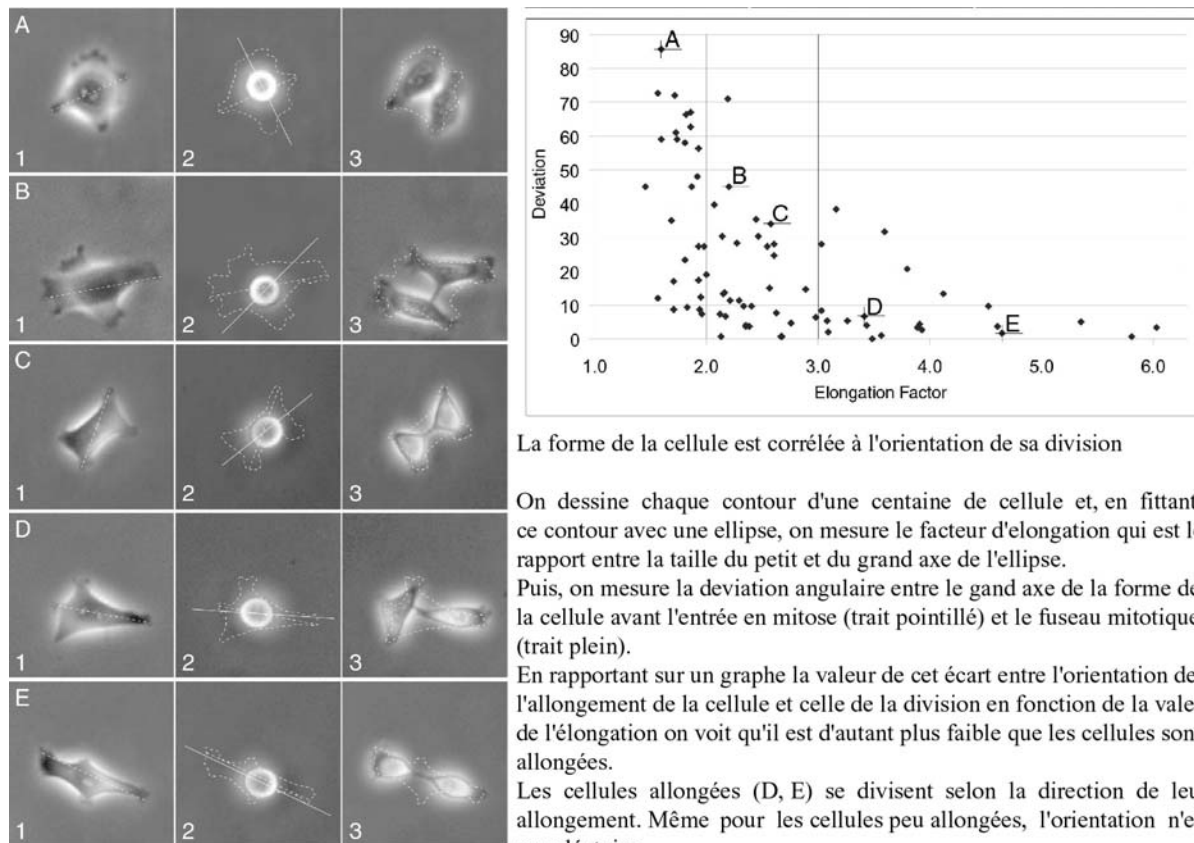


Figure 3.26

Au vu de ces résultats, la forme de la cellule semble effectivement être un facteur déterminant pour l'orientation du fuseau et cela correspond à la compréhension actuelle des mécanismes de l'orientation du fuseau (O'Connell and Wang, 2000).

III- Contrôle de l'axe de division des cellules avec les micro-patrons

III-1 contrôle de l'orientation du fuseau - ARTICLE

Les observations des divisions de cellules non contraintes, à la lumière des mécanismes déjà connus dans d'autres organismes ou dans d'autres situations expérimentales, soulèvent deux hypothèses. La première est que la **forme de la cellule** pré-mitotique et sa transformation au cours de la mitose ont un effet sur l'orientation du fuseau. La seconde est que l'**hétérogénéité corticale**, due à la présence ou l'absence de fibres de rétraction, influence le positionnement du fuseau indépendamment de la forme de la cellule.

Les micro-patrons adhésifs vont être utilisés pour analyser en détail ces deux hypothèses et isoler le rôle de la forme de celui du patron adhésif. Ils seront également utilisés pour tester l'effet de quelques inhibiteurs. Ces expériences vont illustrer l'intérêt d'avoir un système prédictif à partir duquel on peut créer un test sur l'aptitude des cellules à orienter correctement leur axe de division suite à une perturbation (biochimique dans les cas particuliers présentés dans l'article mais qui pourrait être génétique).

The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis

Manuel Théry¹, Victor Racine², Anne Pépin³, Matthieu Piel¹, Yong Chen³, Jean-Baptiste Sibarita² and Michel Bornens^{1,4}

The cell division axis determines the future positions of daughter cells and is therefore critical for cell fate. The positioning of the division axis has been mostly studied in systems such as embryos or yeasts, in which cell shape is well defined^{1,2}. In these cases, cell shape anisotropy and cell polarity affect spindle orientation^{3–5}. It remains unclear whether cell geometry or cortical cues are determinants for spindle orientation in mammalian cultured cells^{6,7}. The cell environment is composed of an extracellular matrix (ECM), which is connected to the intracellular actin cytoskeleton via transmembrane proteins⁸. We used micro-contact printing to control the spatial distribution of the ECM on the substrate⁹ and demonstrated that it has a role in determining the orientation of the division axis of HeLa cells. On the basis of our analysis of the average distributions of actin-binding proteins in interphase and mitosis, we propose that the ECM controls the location of actin dynamics at the membrane, and thus the segregation of cortical components in interphase. This segregation is further maintained on the cortex of mitotic cells and used for spindle orientation.

Differentiating between the influence of cell shape geometry and of cortical cues associated with cell polarity is a recurrent problem in understanding how the spindle is orientated during cell division^{3–5}. In mammalian cultured cells, both factors have been shown to impinge on spindle orientation. O'Connell and Wang performed micromanipulation experiments on NRK cells during mitosis to show that the spindle orients along the long cell axis. They proposed a mechanism by which spindle orientation was driven solely by the anisotropy of cell geometry⁶. However, in MDCK cells that form an epithelium-like structure — in which mitotic spindles lie in the plane of the epithelium, perpendicular to the long cell axis — Reinsch and Karsenti have concluded that either differences in cortical stiffness or the presence of some cortical sites drive spindle positioning⁷. We investigated the influence of cell geometry and cortical cues in individual HeLa cells. These cells completely round up during mitosis, enabling us to distinguish geometry from cortical cues. Cell shape and

cortical heterogeneity were reproducibly manipulated through micro-printing ECM patterns, onto which individual cells adhered.

The micro-contact printing technique was adapted in order to print fibronectin — a major component of the ECM that interacts with integrins⁸ — on glass coverslips and follow cell behaviour with phase-contrast and epifluorescence video microscopy. HeLa cells were synchronized in G2 with a double-thymidine block, and plated on an array of fibronectin micro-patterns. Cell divisions on this array were recorded using automated multi-position time-lapse acquisitions in phase contrast. To analyse these data, we developed an automated numerical tool to detect each micro-pattern in the recorded field and the presence of a single cell attached to it. The position of the round mitotic cell centre and the spindle orientation, as judged by the orientation of the cell elongation at anaphase onset, were automatically detected and recorded (see Supplementary Information, Fig. S1).

We first investigated the role of cell shape by using micro-patterns to experimentally control the cell shape factor (SF), defined as the ratio between the minor and the major axis of an ellipse fitting the cell outline. Cells were plated on rectangular (SF = 0.3), right-angled isosceles triangular (SF = 0.6) and discoid (SF = 1) adhesive micro-patterns. The vast majority of cells grown on rectangular micro-patterns had mitotic spindles aligned along the longest axis (65% in a 30°-wide sector; Fig. 1a). The mitotic spindle orientation of cells plated on discs showed a random distribution (Fig. 1b). With cells grown on triangular micro-patterns, mitotic spindles were mainly orientated parallel to the hypotenuse, although the distribution was broader than on the rectangular patterns (42% in a 30°-wide sector; Fig. 1c). This confirms that the elongation of the cell before mitosis influences the angular distribution of the division axis. The variability allowed by the adhesive boundary conditions imposed by triangular micro-patterns can be reduced by limiting the adhesive area to an [L] shape. In such a situation, cells had the same cell shape as they did on a [triangle]. Strikingly, the orientation of the cell division axis was much more constrained. Indeed, the distribution of the orientation of the division axis around the hypotenuse was as sharp as was found on rectangles (65% in a 30°-wide sector; Fig. 1d and see Supplementary Information, Movie S1, for a series of time-lapse recordings on the four micro-patterns).

¹Biologie du cycle cellulaire et de la motilité, ²Centre d'imagerie, UMR144, CNRS, Institut Curie, 26 rue d'Ulm 75248 Paris Cedex 05, France. ³Groupe nanotechnologie et dispositifs microfluidiques, UPR20, CNRS, Laboratoire Photonique et Nanostructures, Route de Nozay, 91460 Marcoussis, France.

⁴Correspondence should be addressed to M.B. (e-mail: mbornens@curie.fr)

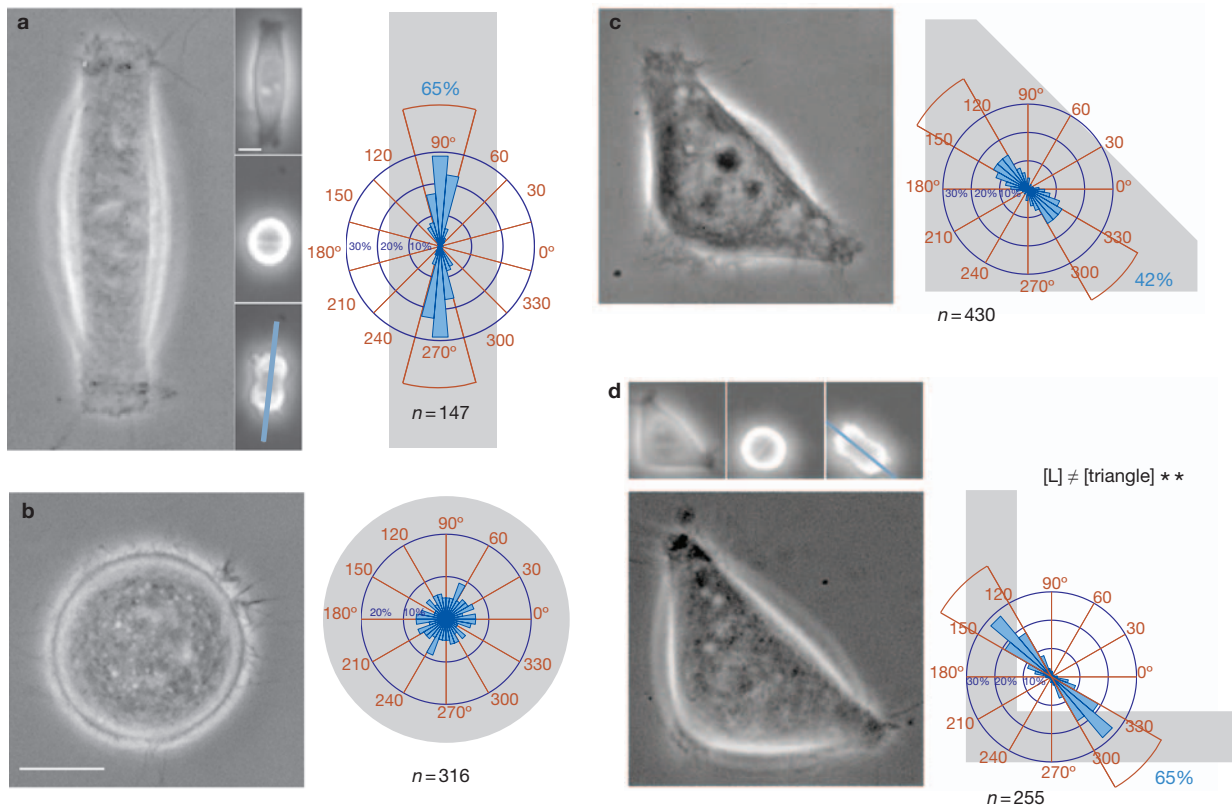


Figure 1 The interphase cell shape is not the only parameter that determines the division axis. (a–d) Large pictures show an interphase cell constrained on different micro-patterns (drawn in grey on the right). Small pictures were extracted from the time-lapse acquisitions used to measure the orientation of cell division (blue line). Circular graphs, superimposed on micro-pattern drawings, show the angular distribution of spindle orientations that were automatically

measured as described in the text and in Supplementary Information, Fig. S1, and counted in 10°-wide sectors for cells plated on [rectangles] (a), [discs] (b), [triangles] (c) and [L] (d). The size (outer circle) and position of the graphs correspond to the actual size and average position of mitotic cells with respect to the corresponding micro-pattern. The distributions of spindle orientation were significantly different on [triangles] and on [L]. Scale bars represent 10 μ m.

This difference shows that the interphase cell shape is not the only parameter that determines the division axis.

The contribution of cell shape to spindle orientation was further analysed. Most cells in culture undergo large morphologic changes during cell rounding in mitosis. The influence of cell shape should be revealed by whether there is a correlation between cell elongation and spindle orientation over time. The HeLa cells we used stably expressed centrin1–GFP¹⁰. This allowed the monitoring of spindle formation in living cells. We performed z-acquisitions of centrin1–GFP in a multi-position time-lapse acquisition on cells plated on micro-patterns (Fig. 2a and see Supplementary Information, Movie S2). Cell rounding and spindle formation were reproducibly coordinated on micro-patterns. Centrosomes separated precisely when cells started to round up and the spindle reached its final length 5–10 min after nuclear envelope breakdown (NEB) (as judged by the disappearance of the nuclear exclusion of centrin1–GFP) and 10–15 min before the end of cell rounding (Fig. 2b). Interestingly, we observed the expected spindle orientation along the hypotenuse after the NEB, but the distribution was rather broad on [L], in spite of the pronounced cell elongation at this stage (Fig. 2c). This distribution became sharper 15–30 min later when cells had rounded up, and these orientations were maintained up to anaphase. The post-NEB reorientation of the spindles in [L] and [rectangles] was more pronounced than on [discs] (see Supplementary Information, Fig. S2). Although this post-NEB fine tuning of orientation occurred during the late stages of cell rounding when the elongated form of the cell was clearly reduced, it could still be due to this residual cell shape anisotropy.

Alternatively, cell cortex heterogeneity could regulate this fine tuning of spindle orientation. To test this hypothesis, mitotic spindles were forced to form in a completely round cell. Centrosome separation was inhibited during cell rounding by treating synchronized G2 cells with 100 nM nocodazole over 1 h. This treatment blocked cells in mitosis with unseparated centrosomes but did not prevent cell rounding (Fig. 2d). Immediately after nocodazole washout, centrosomes separated and formed a bipolar spindle. Even though much broader than for the non-treated cells — perhaps due to the necessarily brief and possibly incomplete nocodazole washout — the distribution of spindle orientations was not random but still preferentially orientated parallel to the hypotenuse of the triangle (Fig. 2d, e and see Supplementary Information, Movie S3). This small preference was significant and the absence of cell geometrical bias indicated that spindles were sensitive to some cortical signal. Therefore we conclude that spindle orientation is not solely driven by cell shape.

How the cortex may influence spindle orientation was then further investigated. The cortex has been viewed as a heterogeneous actin network that regulates the stability of astral microtubules locally⁵. The role of these cytoskeleton components is well established in yeast and embryos^{1,11}, whereas in individual cultured cells it has not been properly defined because spindle orientation has not been predictable. We used the ability of [L] to impose a well defined division axis to investigate the heterogeneity of the cell cortex and the role of actin and astral microtubules in spindle orientation.

Micro-pattern angles have been shown to induce local membrane ruffling¹². The confinement of membrane-associated actin polymerization

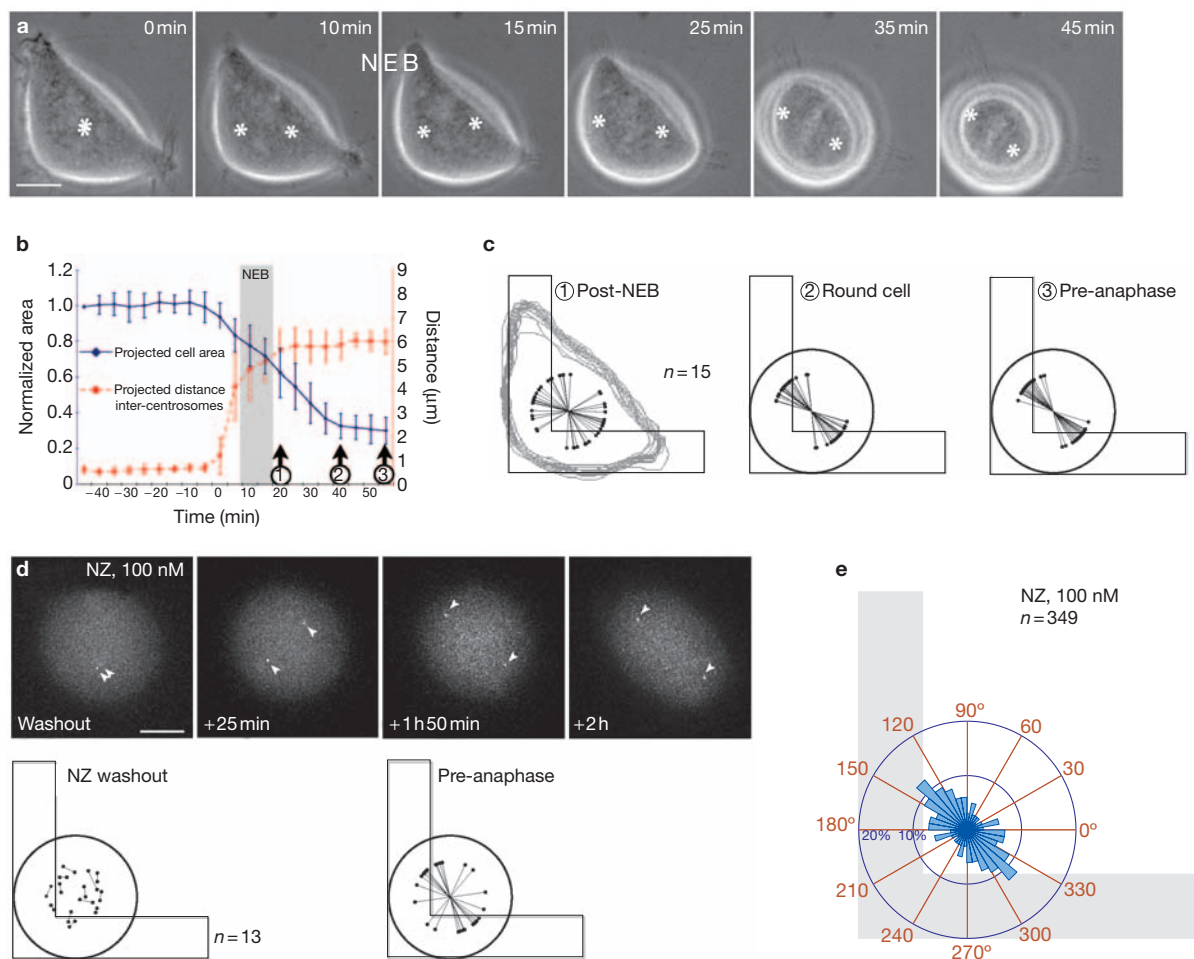


Figure 2 Cell rounding and spindle orientation. (a) Time-lapse sequence of spindle formation on [L]. Centrosomes (white asterisks) were visualized using z-acquisition and projection of centrin1-GFP. Note the late reorientation of the spindle after the NEB. (b) Temporal correlation between spindle assembly and cell rounding. Projected cell area (continuous blue line) and inter-centrosome projected distance (dashed red line) are plotted versus time for cells plated on [L] ($n = 15$). Cell area is normalized with respect to the initial area. Error bars represent the standard deviation. Time 0 corresponds to the beginning of cell rounding. Numbered arrows indicate the time at which the distribution of spindle orientation is shown in c. (c) Progressive modification of cell shapes and the distributions of spindle orientation on [L]. Spindle orientations were measured 5 min after NEB (left; arrow 1 in b), at the end of cell rounding (middle; arrow 2) and

before anaphase (right; arrow 3). (d) Spindle assembly in round cells after complete disruption of microtubules. Cells divided on [L] after a 100 nM nocodazole mitotic arrest and a brief washout. Pictures at the top are extracted from a time-lapse z-acquisition of centrin1-GFP after nocodazole (NZ) washout (as in Supplementary Information, Movie S5). Arrowheads point to centrosomes. Below, distributions of spindle pole positioning ($n = 13$) are shown just before nocodazole washout (left) and before anaphase (right). After washout, spindle poles aligned parallel to the [L] hypotenuse in spite of the spherical geometry of the cell body. (e) Distribution of spindle orientation after nocodazole washout, measured as described in the text and in Supplementary Information, Fig. S1. It confirms the preferential orientation of anaphase elongation along the hypotenuse over 349 cells. Scale bars represent 10 μm .

at these particular locations could thereby induce a cortical segregation of proteins in interphase, which might be maintained up to mitosis. We noted, for example, that these regions contain a subset of actin-binding proteins. Cortactin and ezrin were chosen as two markers of this actin activity. Cortactin is involved in actin polymerization in membrane ruffles¹³, and the activated form of ezrin is an early determinant of cell polarity¹⁴, which links the plasma membrane with cortical actin^{15,16}. G2 cells were plated on [L] and fixed at various stages before and during spindle formation. As expected, cortactin and ezrin were preferentially located in membrane ruffles (Fig. 3a). Interestingly, cortactin and ezrin were found to accumulate in the retraction fibres that formed when cells rounded up¹⁷ (Fig. 3a). Cortactin was present in the retraction fibres and on the mitotic cell cortex. Ezrin was enriched in the more proximal part of the retraction fibres with respect to the cell body. The average location of

ezrin was distributed in a crescent on the cell cortex. Ezrin and cortactin were almost absent from the part of the cortex facing the non-adhesive area. These results demonstrate that the cortex is heterogeneous. This heterogeneity is established in interphase and maintained in mitosis. This was also observed in the nocodazole-treated cells (described above), where the orientation of spindles, assembled in a round cell, was not random (see Supplementary Information, Fig. S3).

Actin was fully depolymerized by treating the cells on [L] with 0.1 μM latrunculin. Because the cells did not elongate upon anaphase onset, mitotic spindle orientation was measured manually on phase-contrast images in which metaphase plates were easily visible (data not shown). Mitotic spindles were almost randomly oriented with latrunculin treatment (Fig. 3b). Therefore membrane-associated filamentous actin is necessary to guide spindle orientation.

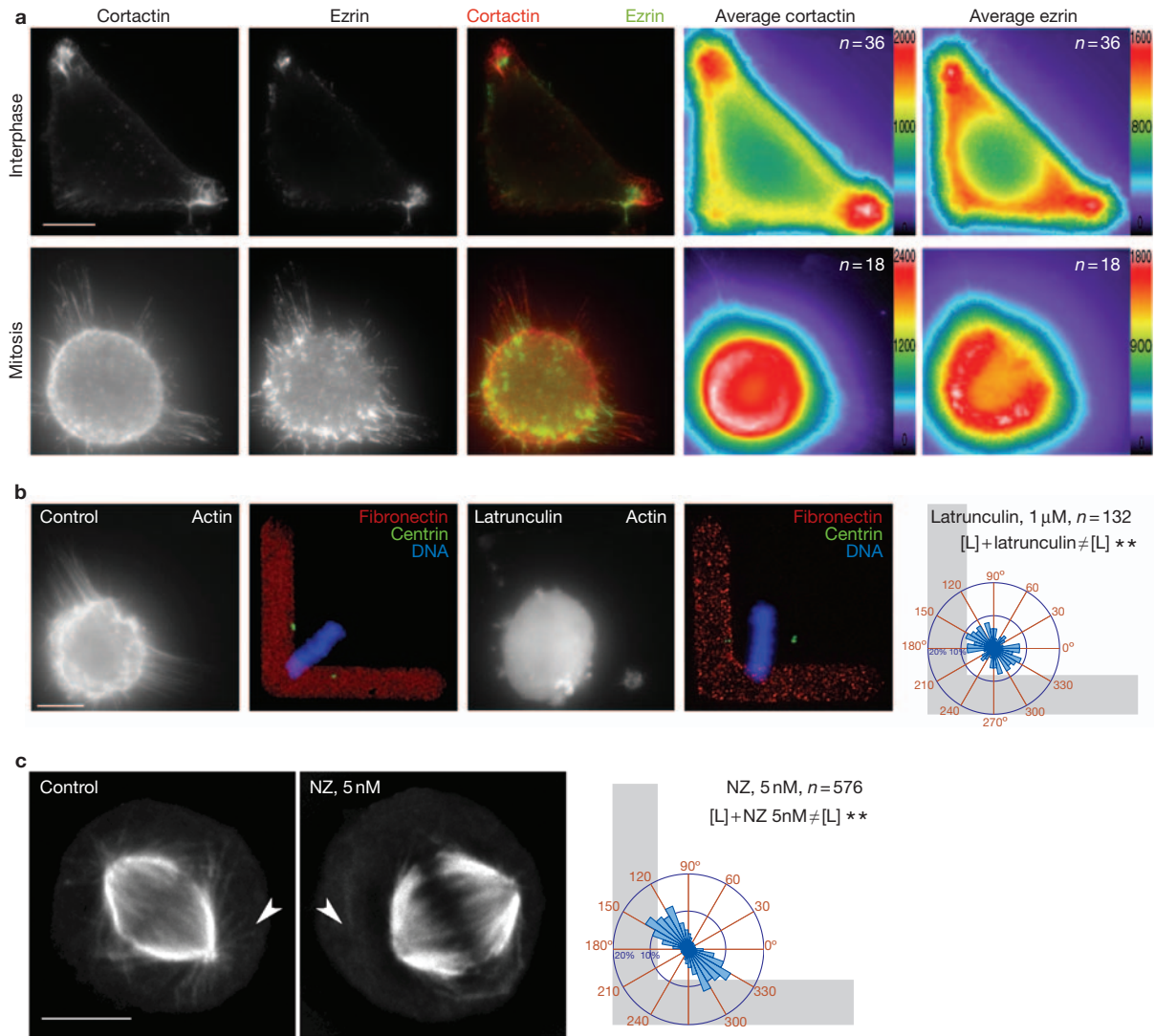


Figure 3 Distributions of actin-binding proteins and the role of actin and astral microtubules for spindle positioning on [L]. (a) Cortactin and activated ezrin distributions in G2 cells (top) and mitosis (bottom). On the left, individual cells fixed and immunolabelled for cortactin and activated ezrin are shown. On the right, the average distribution from several cells is shown. Note the accumulation of both proteins at cell apices in interphase and their specific accumulations in retraction fibres in mitosis. The average cortical distributions in mitosis formed a crescent. (b) Actin disruption affected spindle orientation. Cells were labelled with phalloidin-FITC in control conditions (left) and in the presence of 0.1 μ M latrunculin A (right). Upon treatment, most retraction

fibres were disrupted and spindles were misorientated. The graph shows spindle pole orientation, measured by hand on phase-contrast pictures, as the direction perpendicular to the metaphase plate. (c) Disruption of astral microtubules perturbed spindle positioning. Pre-mitotic cells were treated with 5 nM nocodazole. Pictures show spindles in control (left) and treated cells (right). Note the absence of astral microtubules in treated cells. The graph shows the distribution of spindle orientation, measured as described in the text and in Supplementary Information, Fig. S1. In both cases (b, c) the distributions were significantly broader than in control cells (see Methods for the description of statistical analysis). Scale bars represent 10 μ m.

Most astral microtubules were prevented from reaching the cell cortex by treating cells with 5 nM of nocodazole. At this low concentration the assembly of a bipolar spindle was not disrupted. Cells plated on [L] entered anaphase as in control conditions but the nocodazole treatment significantly broadened the angular distribution of the division axis (Fig. 3c), indicating that astral microtubules interacting with the cell cortex do indeed participate in spindle orientation. Altogether these results show that the round mitotic cell cortex is not homogeneous and contains cortical cues that modulate spindle orientation. These cues are associated with retraction fibres and originate from the cortical heterogeneity of the pre-mitotic cell.

We further investigated whether the cortical heterogeneity affected spindle orientation. To reduce membrane-associated actin dynamics¹⁸ and hopefully disrupt the heterogeneity of the cell cortex, we inhibited

Src family tyrosine kinases with 10 μ M of PP2 (ref. 19) (Fig. 4) or 5 μ M of SU6656 (ref. 20) (see Supplementary Information, Fig. S3). The efficacy of these treatments was confirmed by observing the disappearance of cortactin and ezrin segregation at the cell apices in interphase. The effect of Src tyrosine kinase inhibition on promoting randomization of ezrin and cortactin distribution on the cell cortex was quantified during interphase and mitosis (compare Fig. 4a with Fig. 3a). A strong inhibition of membrane ruffling was also observed during the time-lapse acquisitions performed to measure cell division orientations. During mitosis, the retraction fibres were still present with Src tyrosine kinase inhibition but lacked most of the ezrin that was located at their attachment to the round cell body. Cells were blocked for a long time in metaphase. Some of the spindles were seen to erratically rotate within the round cells (see Supplementary Information,

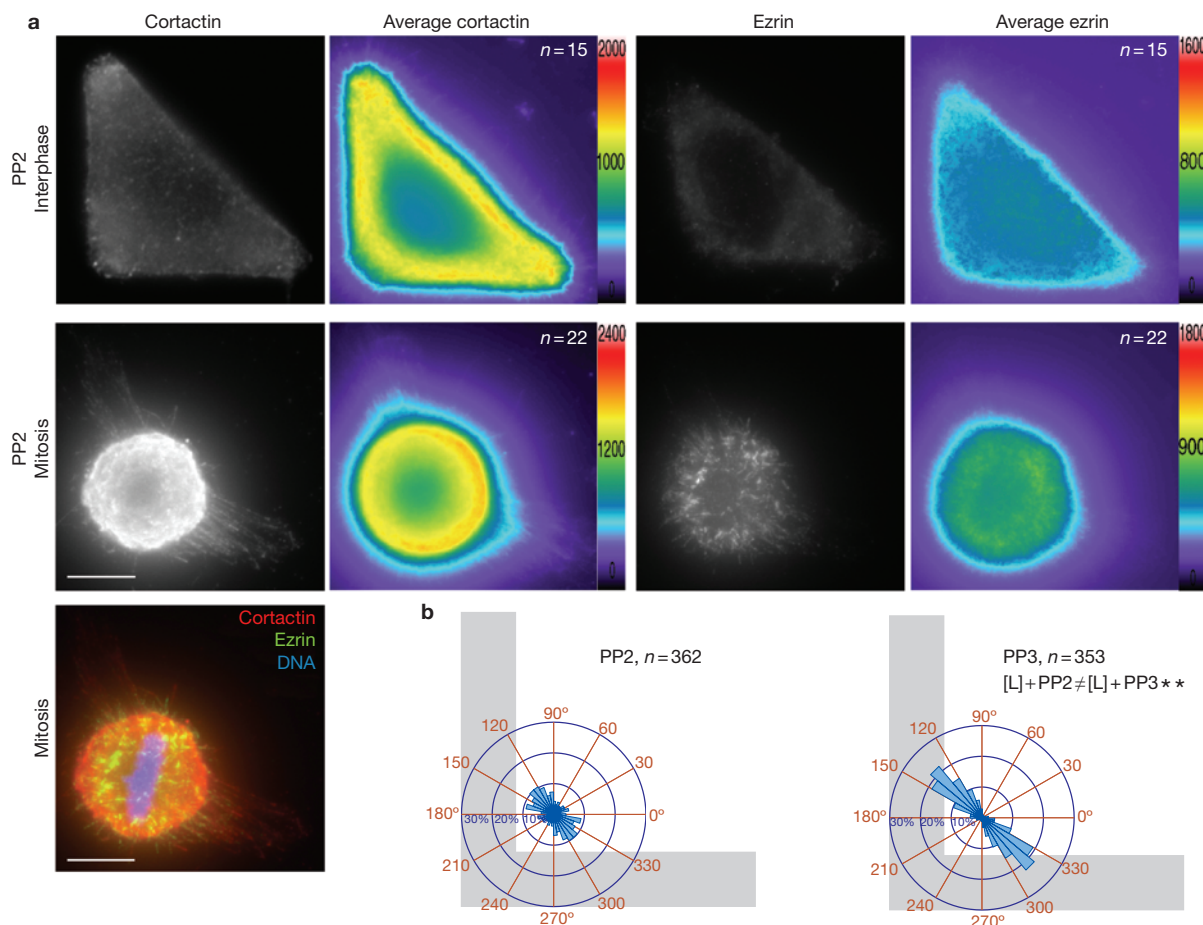


Figure 4 The absence of cortical heterogeneity leads to spindle mis-positioning. **(a)** Cells were treated with 10 μM of PP2. The cortical distributions of cortactin and ezrin were homogeneous in interphase (top) and mitosis (bottom). Note that cell staining was reduced in comparison

Movie S4). Eventually the orientation of cell elongation upon anaphase was strongly impaired (Fig. 4b and see Supplementary Information, Movie S5). Half of the cells showed a defect during the contraction of the actin furrow, leading to cells becoming binucleated. All these effects were not detected after treatment with 10 μM of PP3, a modified and inactive form of PP2. By promoting an apparent homogeneous cortex, Src inhibition supported the hypothesis that cortical marks guide and stabilize spindle orientation. Furthermore, these results also show that retraction fibres are structural components that position these cortical marks but are not sufficient by themselves to guide spindle orientation.

The cues associated with the ezrin cortical patches seemed necessary for the correct positioning of the spindle. Our results also suggested that the spatial distribution of the ECM affects their location in interphase, and thereby spindle orientation in mitosis. Indeed, the ECM directly controls actin polymerization in membrane ruffles via the associated focal adhesions^{21,22}. We therefore questioned whether the distribution of the ECM and hence the cortical heterogeneity could override the effect of cell geometry. We designed a new set of micro-patterns based upon a square template and composed of [cross], [L-dot] and [twin bars]. The cells grown on these patterns had similar square shapes in interphase, but distinct spatial distributions of actin-dependent membrane ruffles. These ruffles were preferentially distributed where the cell membrane attached to fibronectin (Fig. 5a) as judged by the location of focal adhesions (data not shown). These differences

with the control cell (Fig. 3, same intensity scale). **(b)** Distribution of spindle orientations, measured as described in the text and in Supplementary Information, Fig. S1, were strongly impaired in the presence of PP2 but not with PP3, an inactive form of PP2. Scale bars represent 10 μm .

in the distribution of membrane ruffles led to specific distributions of cortical marks during mitosis. Invariably, the cortactin or ezrin-rich domains, in which membrane ruffles were located, were geometrically projected as patches on the mitotic cell cortex through the retraction fibres (Fig. 5b). When the cells were plated on [cross], the ruffles were observed at the four cell apices. During mitosis, four ezrin clusters were observed on the cell body, in two pairs of opposing sites facing the tips of the cross. As expected, the spindle orientated on either one or the other of these axes (Fig. 5c), and because the two pairs of opposed patches of ezrin were equivalent, both corresponded to the longest cell axis of the cell in interphase. On [L-dot], unlike [cross], the two diagonals were no longer equivalent: ezrin clusters on the mitotic cell cortex consisted of a large angular sector forming a crescent, as on [L] (see Fig. 3), and a patch facing the dot (Fig. 5b). In this case, the spindle orientation was biased towards the diagonal connecting the ends of the L in the [L-dot] (Fig. 5c). This demonstrated that the spatial distribution of the ECM can impinge on mitotic cell cortical marks and spindle orientation. The [twin bars] induced the formation of two wide membrane ruffling regions on the bars during interphase, contrasting with the four distinct regions observed on [cross]. During mitosis, retraction fibres had a general orientation toward the bars. The spindle poles aligned perpendicular to the bars rather than along the diagonals (Fig. 5c and see Supplementary Information, Movie S6, for series of time-lapse recordings on the three micro-patterns). This orientation at 45° from the long cell axis in interphase confirmed the

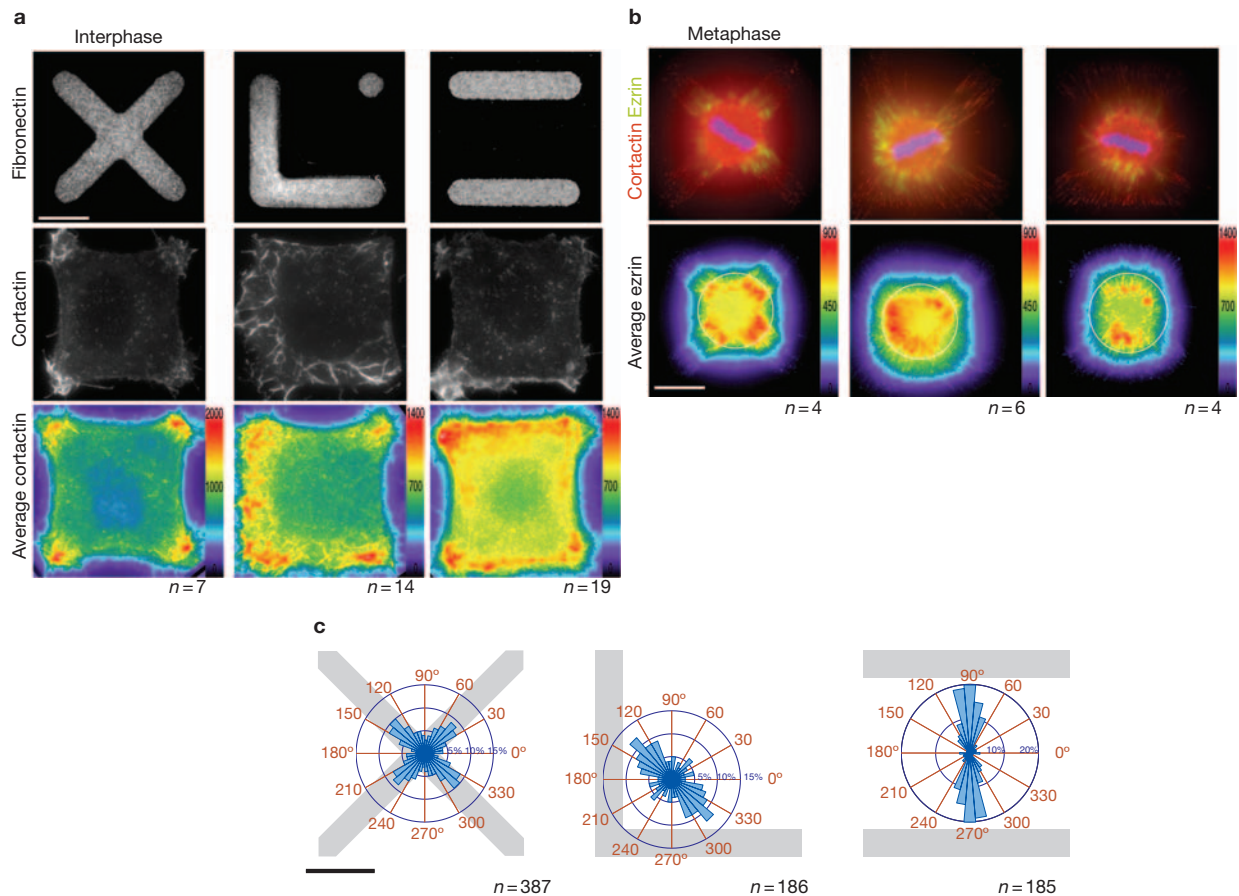


Figure 5 The spatial distribution of ECM governs cortical heterogeneity and the orientation of the spindle. **(a)** Membrane ruffles in interphase, as decorated by cortactin, are located upon the adhesive cell periphery. Cells were plated on [cross] (left column), [L-dot] (middle column) and [twin bars] (right column). Bottom row shows the average staining of cortactin. **(b)** The location of ezrin cortical patches at the point of retraction fibre attachment on the mitotic cell cortex corresponds to the radial projection of membrane ruffles in interphase. Cells were fixed in mitosis, and stained for cortactin and ezrin. Projections of z-acquisitions are shown. Note the local enrichment

of cortactin in the lower part of the retraction fibres and of activated ezrin in the upper part, which form patches on the round cell body. The bottom row shows the average projected staining of ezrin. White circles show the average cell periphery in the middle of the z-acquisitions; retraction fibres contact the cortex below this section. **(c)** Distributions measured as described in the text and in Supplementary Information, Fig. S1, show a preferential spindle orientation along the two diagonals on [cross] (left), along one diagonal on [L-dot] (middle) and along one side of the square envelope on [twin bars] (right). Scale bars represent 10 μm .

dominance of the spatial distribution of the ECM over the geometrical shape of the interphase cell.

In conclusion, the determination of spindle orientation in cultured cells is largely dependent on the spatial distribution of the ECM. Spindle orientation may be influenced by the cell shape anisotropy during cell rounding, but its final orientation is defined by the cortical marks that become associated with the retraction fibres. These cortical marks reflect the segregation of cortical proteins in the ruffles in interphase. Therefore our observations suggest a model in which the actin cytoskeleton associated with the membrane ruffles in interphase predetermines spindle orientation (see Supplementary Information, Fig. S4). Elsewhere it has been found that membrane ruffles contain proteins that stabilize microtubules such as APC²³ and motors that pull on microtubules such as dyneins^{24,25}. The corresponding sectors of the mitotic cell cortex could thus contain these proteins and selectively attract the spindle poles through astral microtubules²⁶. Cell–cell contacts also influence cortical heterogeneity and thereby spindle orientation^{27,28} and such micro-patterning techniques should prove useful to identify what mechanistic similarities and differences exist between cell–cell contacts and cell–ECM adhesion signalling.

The approach we have developed allows quantitative studies of spindle orientation in cultured cells. Other cell types divide reproducibly on [L] micro-patterns such as RPE1, a human infinity telomerase-immortalized cell line that keeps most of the features of primary cells; and L929 cells, a murine transformed cell line (see Supplementary Information, Fig. S1). The reproducibility of cell behaviour in our device also allows us to accurately quantify the spatial distribution of proteins by defining the ‘average cell’ for a specific condition. Our methodology therefore should have a wide range of applications from the fundamental analysis of internal cell organization to the detection of abnormalities in mutated cells and the analysis of the effect of biochemical drugs on individual cells in high-throughput screens.

METHODS

Micro-pattern fabrication. Micro-contact printing has been described in full previously⁹. We made the poly-dimethyl siloxane stamps (Sylgard kit; Dow Corning, Saint Laurent du Pont, France) using a previously described method²⁹. The glass coverslip treatment we used was developed by P. Nassoy³⁰. A stamp was inked with a 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ fibronectin solution (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), 10% of which was labelled with Cy3 (Amersham Biosciences, Orsay, France) or AlexaFluor350 (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) for 5 min,

dried, and placed in contact with a glass coverslip that had been previously coated with mercapto-propyltrimethoxy-silane (SIM6476; Roth Sochiel, Lauterbourg, France) for 5 min. After removal of the stamp, the printed coverslip was immersed in PBS containing 20 mg ml⁻¹ maleimide-poly(ethylene glycol) (2D2MOH01; Nektar Therapeutics, Huntsville, AL) for 1 h at room temperature. The coverslip was then washed in PBS before cell deposition.

Cell culture and deposition. HeLa-B (human adenocarcinoma epithelial cell line) stably expressing centrin1-GFP¹⁰ and L929, a murine fibro sarcoma L-cell strain, were cultured in DME medium with 10% fetal calf serum and 2 mM glutamine at 37 °C. hTERT-RPE1, infinity telomerase-immortalized retinal pigment epithelial human cell line, was cultured in DMEM F-12. HeLa and L929 cells were synchronized at the G1/S transition using a double-thymidine block and then removed from their flask using VERSEN for 10 min at 37 °C. After centrifugation, cells were resuspended in DMEM with 1% FCS and deposited on the printed coverslip at a density of 10⁴ cells per cm².

Inhibitor treatments. Nocodazole was used at 5 and 100 nM, cytochalasin D at 1 µg ml⁻¹ (Sigma-Aldrich), latrunculin A at 0.5 µM (Invitrogen Life Technologies, Cergy Pontoise, France), PP2 and PP3 at 10 µM, SU6656 at 5 µM (Calbiochem, La Jolla, CA). Inhibitors were added 2 h after cell spreading on micro-patterns and about 1 h before entry into mitosis.

Fixations and staining. Interphase cells were fixed in 3% paraformaldehyde, 0.25% glutaraldehyde and 1% Triton X-100 in cytoskeleton buffer¹⁷ for 15 min and treated with 0.1 M ammonium chloride for 10 min. Cells treated with 5 nM of nocodazole were fixed in methanol at -20 °C for 5 min. Round cells in metaphase were fixed using a method described by T. Mitchison¹⁷, which preserves retraction fibres. Actin and DNA were stained using 1 µM phalloidin-FITC (Sigma-Aldrich) and DAPI. Cortactin was immunolabelled with primary mouse antibodies (1:200; Transduction Labs, Lexington, KY) and secondary Cy5-conjugated goat anti-mouse antibodies (1:1,000; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). Phosphorylated ezrin on Thr 567 was immunolabelled with primary rabbit antibodies provided by M. Arpin¹⁵ and secondary Cy3-conjugated goat anti-rabbit antibodies (1:2,000; Jackson Immunoresearch).

Video microscopy. We used an inverted Leica DMIRBE microscope (Leica Microsystems, Reuil Malmaison, France) with a heated and motorized stage combined with a home-made plastic cell chamber to hold the printed glass coverslip, which was covered by a porous membrane allowing CO₂ buffering at pH 7.4. Metamorph software (Universal Imaging, Downingtown, PA) was used for image acquisition. Hundreds of divisions were recorded in a few hours using time-lapse phase-contrast microscopy on a multi-field acquisition at a frame rate of one picture every 3 min with a ×10 magnification objective. Centrosome movements were followed during mitosis with a ×63 apochromat objective lens (Leica Microsystems) using fluorescent z-acquisitions through a green filter and a phase-contrast picture of the cell bottom every 5 min.

Video analysis and processing. We developed a software that was able to automatically recognize a single fluorescent micro-pattern within a field and detect the presence of a single cell attached to it. Individual cell divisions were then extracted from the ×10 phase-contrast time-lapse recordings and every picture was automatically segmented using a wavelet decomposition (V.R., Salamero, J. & J.B.S., unpublished work) and fitted with an ellipse. The moment of cell elongation in anaphase was precisely detected, because the shape factor — defined as the ellipse length ratio — suddenly dropped from more than 0.9 to less than 0.6. The angle between the major axis of the ellipse, corresponding to spindle orientation, and a vertical reference was then recorded. The position of the centre of the round mitotic cell with respect to the pattern was also automatically recorded 6 min before anaphase (see Supplementary Information, Fig. S1).

Distributions were compared using the non-parametric test of Kolmogorov-Smirnov. D_n ($n = n_1 n_2 / (n_1 + n_2)$), the maximal deviation between the two cumulative fraction functions, was compared to the d_n value given by the Kolmogorov-Smirnov table. The distributions were considered as significantly different when $D_n > d_n$. ($*d_n = 1,518/\sqrt{n}$ confers a 2% error probability; $**d_n = 1,628/\sqrt{n}$ confers a 1% error probability).

Note: Supplementary Information is available on the Nature Cell Biology website.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Y. Bellaiche and P. Chavrier for helpful discussions, D. E. Ingber for technical help during preliminary experiments, and M. Morgan and J. Sillibourne for carefully reading this manuscript. Part of this work was carried out in the clean room facility of the UMR168 at the Institut Curie. Supported by CNRS, Institut Curie and by HSPF, grant Ref RGP0064/2004 to M.B.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare that they have no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturecellbiology/>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

- Palmer, R. E., Sullivan, D. S., Huffaker, T. & Koshland, D. Role of astral microtubules and actin in spindle orientation and migration in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **119**, 583–593 (1992).
- Gonczy, P. Mechanisms of spindle positioning: focus on flies and worms. *Trends Cell Biol.* **12**, 332–339 (2002).
- Tsou, M. F., Ku, W., Hayashi, A. & Rose, L. S. PAR-dependent and geometry-dependent mechanisms of spindle positioning. *J. Cell Biol.* **160**, 845–855 (2003).
- Gray, D. *et al.* First cleavage of the mouse embryo responds to change in egg shape at fertilization. *Curr. Biol.* **14**, 397–405 (2004).
- Ahringer, J. Control of cell polarity and mitotic spindle positioning in animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 73–81 (2003).
- O'Connell, C. B. & Wang, Y. L. Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1765–1774 (2000).
- Reinsch, S. & Karsenti, E. Orientation of spindle axis and distribution of plasma membrane proteins during cell division in polarized MDCKII cells. *J. Cell Biol.* **126**, 1509–1526 (1994).
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. & Yamada, K. M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix — cytoskeleton crosstalk. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 793–805 (2001).
- Whitesides, G. M., Ostuni, E., Takayama, S., Jiang, X. & Ingber, D. E. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **3**, 335–373 (2001).
- Piel, M., Meyer, P., Khodjakov, A., Rieder, C. L. & Bornens, M. The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* **149**, 317–330 (2000).
- Hyman, A. A. & White, J. G. Determination of cell division axes in the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **105**, 2123–2135 (1987).
- Parker, K. *et al.* Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *FASEB J.* **16**, 1195–1204 (2002).
- Weed, S. A. & Parsons, J. T. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* **20**, 6418–6434 (2001).
- Louvet, S., Aghion, J., Santa-Maria, A., Mangeat, P. & Maro, B. Ezrin becomes restricted to outer cells following asymmetrical division in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* **177**, 568–579 (1996).
- Fievet, B. T. *et al.* Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J. Cell Biol.* **164**, 653–659 (2004).
- Bretscher, A., Edwards, K. & Fehon, R. G. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 586–599 (2002).
- Mitchison, T. J. Actin based motility on retraction fibers in mitotic PtK2 cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **22**, 135–151 (1992).
- Angers-Loustau, A., Hering, R., Werbowski, T. E., Kaplan, D. R. & Del Maestro, R. F. SRC regulates actin dynamics and invasion of malignant glial cells in three dimensions. *Mol. Cancer Res.* **2**, 595–605 (2004).
- Hanke, J. H. *et al.* Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J. Biol. Chem.* **271**, 695–701 (1996).
- Blake, R. A. *et al.* SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. *Mol. Cell Biol.* **20**, 9018–9027 (2000).
- DeMali, K. A., Barlow, C. A. & Burridge, K. Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J. Cell Biol.* **159**, 881–891 (2002).
- Tilghman, R. W. *et al.* Focal adhesion kinase is required for the spatial organization of the leading edge in migrating cells. *J. Cell Sci.* **118**, 2613–2623 (2005).
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Cdc42 regulates GSK-3β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* **421**, 753–756 (2003).
- Busson, S., Dujardin, D., Moreau, A., Dompiere, J. & De Mey, J. R. Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr. Biol.* **8**, 541–544 (1998).
- Dujardin, D. L. *et al.* A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *J. Cell Biol.* **163**, 1205–1211 (2003).
- Faulkner, N. E. *et al.* A role for the lissencephaly gene *LIS1* in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nature Cell Biol.* **2**, 784–791 (2000).
- Wang, S. W., Griffin, F. J. & Clark, W. H., Jr. Cell-cell association directed mitotic spindle orientation in the early development of the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Development* **124**, 773–780 (1997).
- Goldstein, B. Cell contacts orient some cell division axes in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *J. Cell Biol.* **129**, 1071–1080 (1995).
- Pépin, A. & Chen, Y. in *Alternative Lithography* (ed. Sotomayor Torres, C. M.) 305–330 (Kluwer Academic/Plenum, Boston/Dordrecht/London, 2003).
- Cuvelier, D., Rossier, O., Bassereau, P. & Nassoy, P. Micropatterned “adherent/repellent” glass surfaces for studying the spreading kinetics of individual red blood cells onto protein-decorated substrates. *Eur. Biophys. J.* **32**, 342–354 (2003).

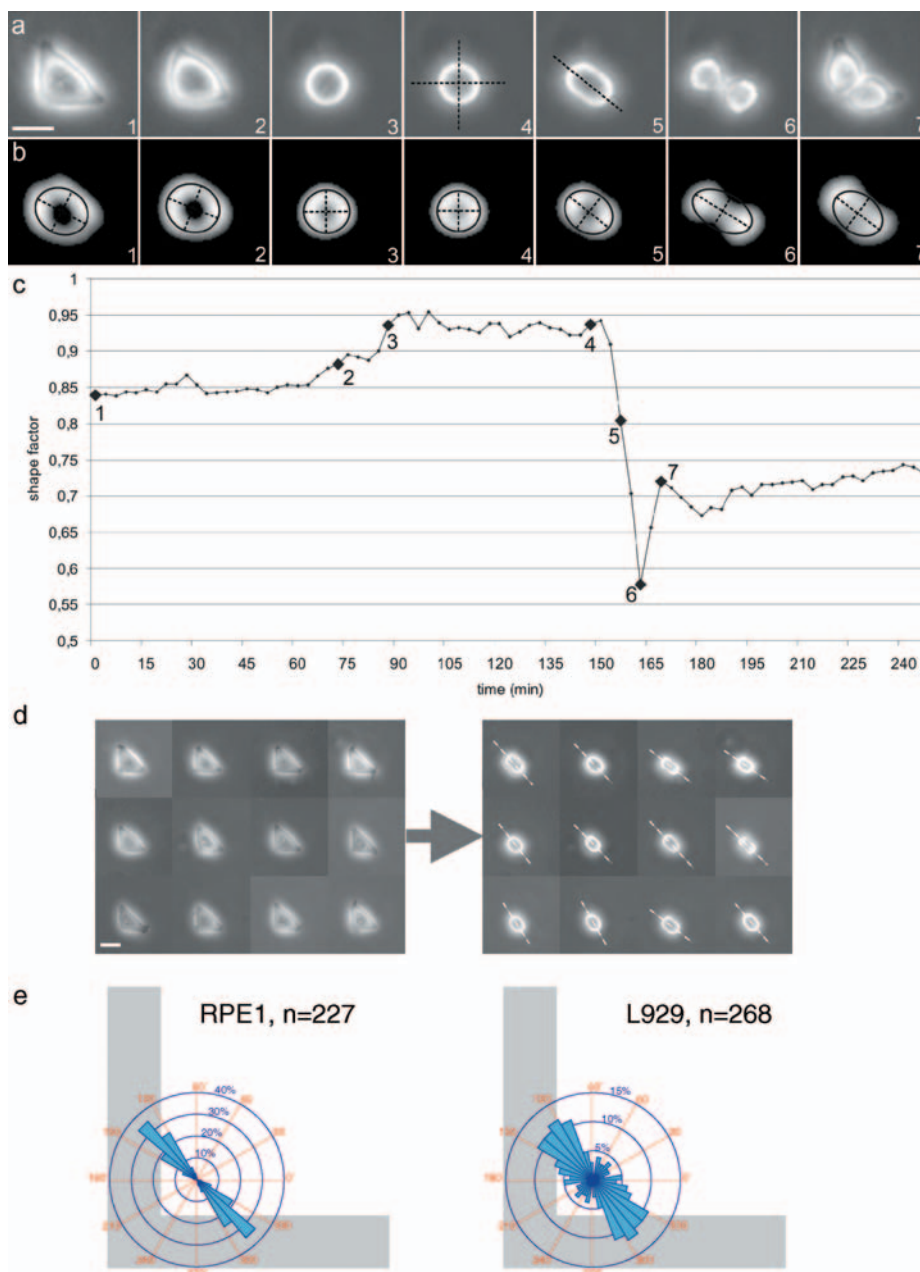


Figure S1 Automated numerical detection of anaphase and spindle orientation of cells plated on [L] micro-patterns. **(a)** Frames extracted from a 3 minutes time-lapse in phase contrast microscopy with a 10x objective. Numbers correspond to those reported on the time-curve in **c**. Mitotic cell centre indicated in frame 4 and anaphase spindle orientation shown in frame 5 are reported from the calculation on segmented pictures **(b)**. **(b)** Wavelet segmentation of the pictures in **a**. Ellipsoidal fits are shown in black. Black dashed lines correspond to the major and minor ellipse axes. Mitotic cell centre is measured in frame 4, six minutes before anaphase in frame 5. The orientation of anaphase elongation is that of the ellipse major axis in frame

5 with respect to a vertical reference considering the pattern oriented as shown in Fig. 2. **(c)** Shape factor versus time. The shape factor is the ratio of the short over the long axis defined in **b**. Anaphase elongation in frame 5 is automatically detected by the shape factor shift from over 0.9 to less than 0.6. **(d)** Examples of detections and measurements of cell divisions on [L]. **(e)** Examples of automatically measured distributions of spindle orientation of RPE1 cells and L929 cells plated on [L]. Both cell types divided preferentially along the [L] hypotenuse, although RPE1 distribution was much more restricted. Bars represent 20 μ m.

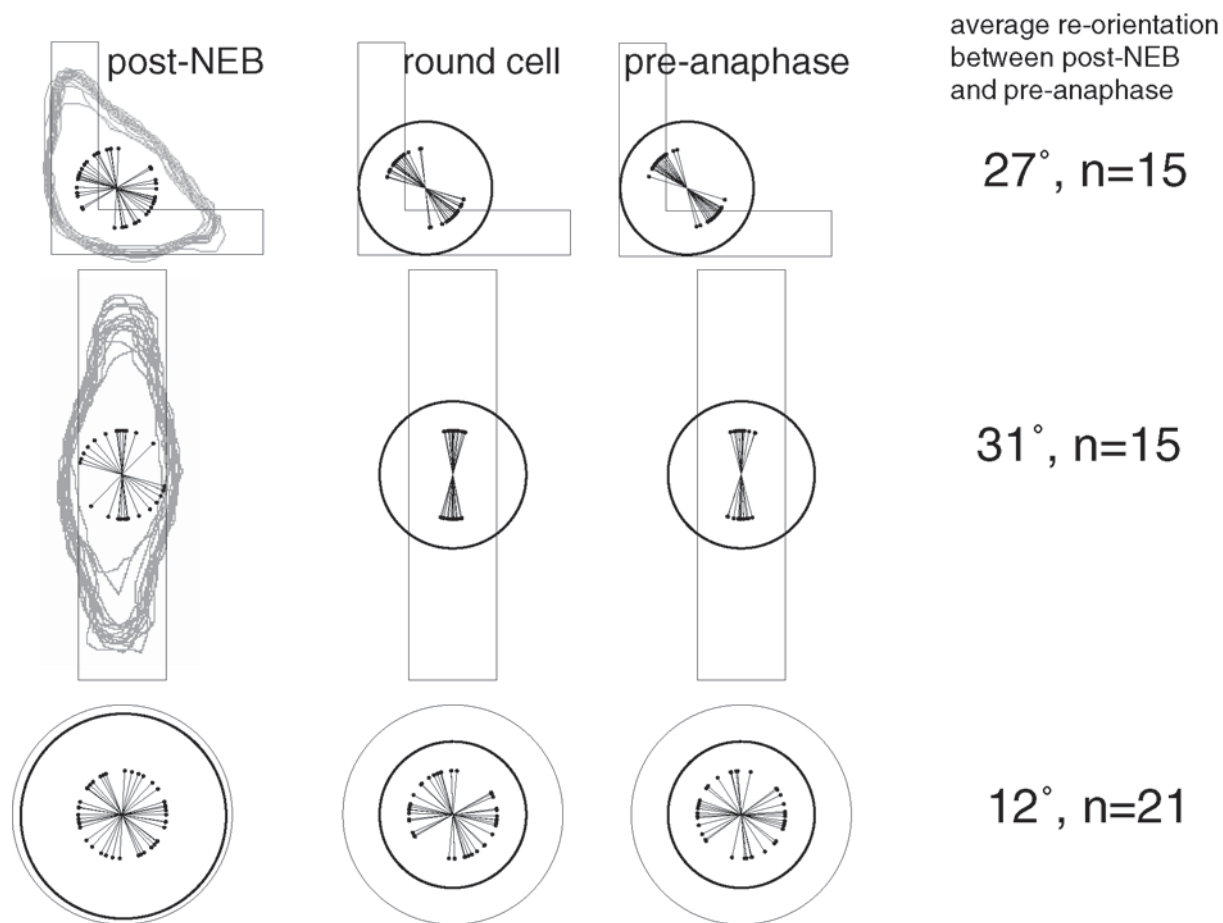


Figure S2 Cell rounding and spindle orientations in [L] (already shown in Fig. 2c), [rectangle] and [disc]. Centrosomes were visualised using z-acquisitions and projections of centrin1-GFP in time-lapse acquisitions every 5 minutes. Graphics show the progressive modification of cell shapes and the distributions of spindle orientation as described in the legend of

Fig. 2c. Spindle orientations were measured 5 minutes after the NEB (left), at the end of cell rounding (middle) and before anaphase (right). The average reorientations between the post-NEB and the pre-anaphase stages were calculated. The reorientation on disc is significantly lower than on [L] or [rectangle] (Student test, $P=2 \cdot 10^{-4}$).

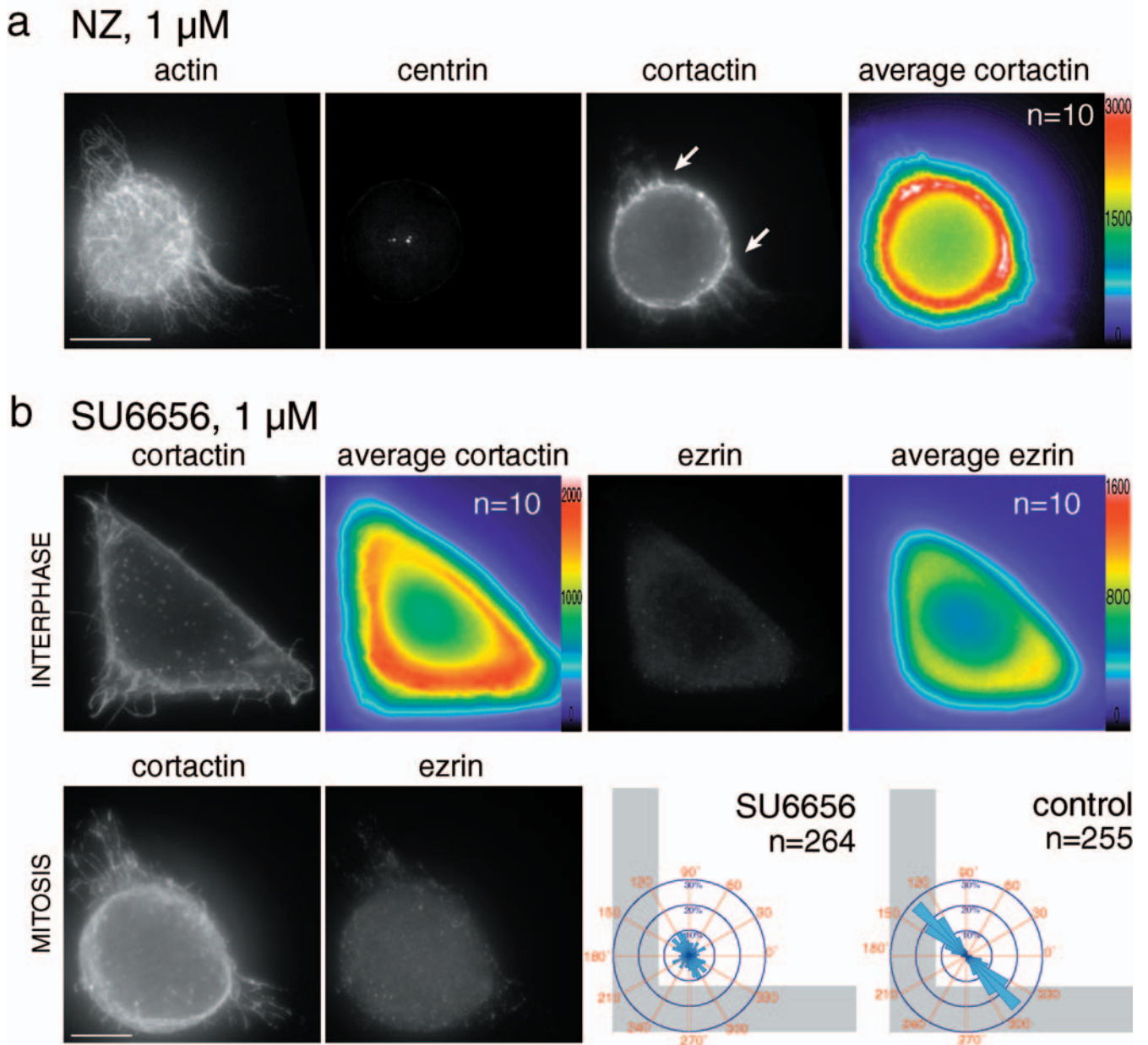


Figure S3 Cortical heterogeneity guides spindle orientation. **(a)** Cortical distribution of cortactin in a round mitotic cell treated with 1 μ M NZ before mitotic entry (as judged by the non-separation of the two centrosomes visualised by centrin1-GFP). The labelling of actin and cortactin showed the RFs and revealed the local accumulation of cortactin on the cell cortex

(arrows). The average location of cortactin on 10 cells demonstrate the existence of a cortical heterogeneity during NZ treatment. **(b)** 1 μ M of SU6656 had the same effect than 10 μ M PP2 on the randomisation of the distributions of cortactin or ezrin in interphase or mitosis and on spindle orientations. See Fig. 4 for a detailed legend. Bars represent 10 μ m.

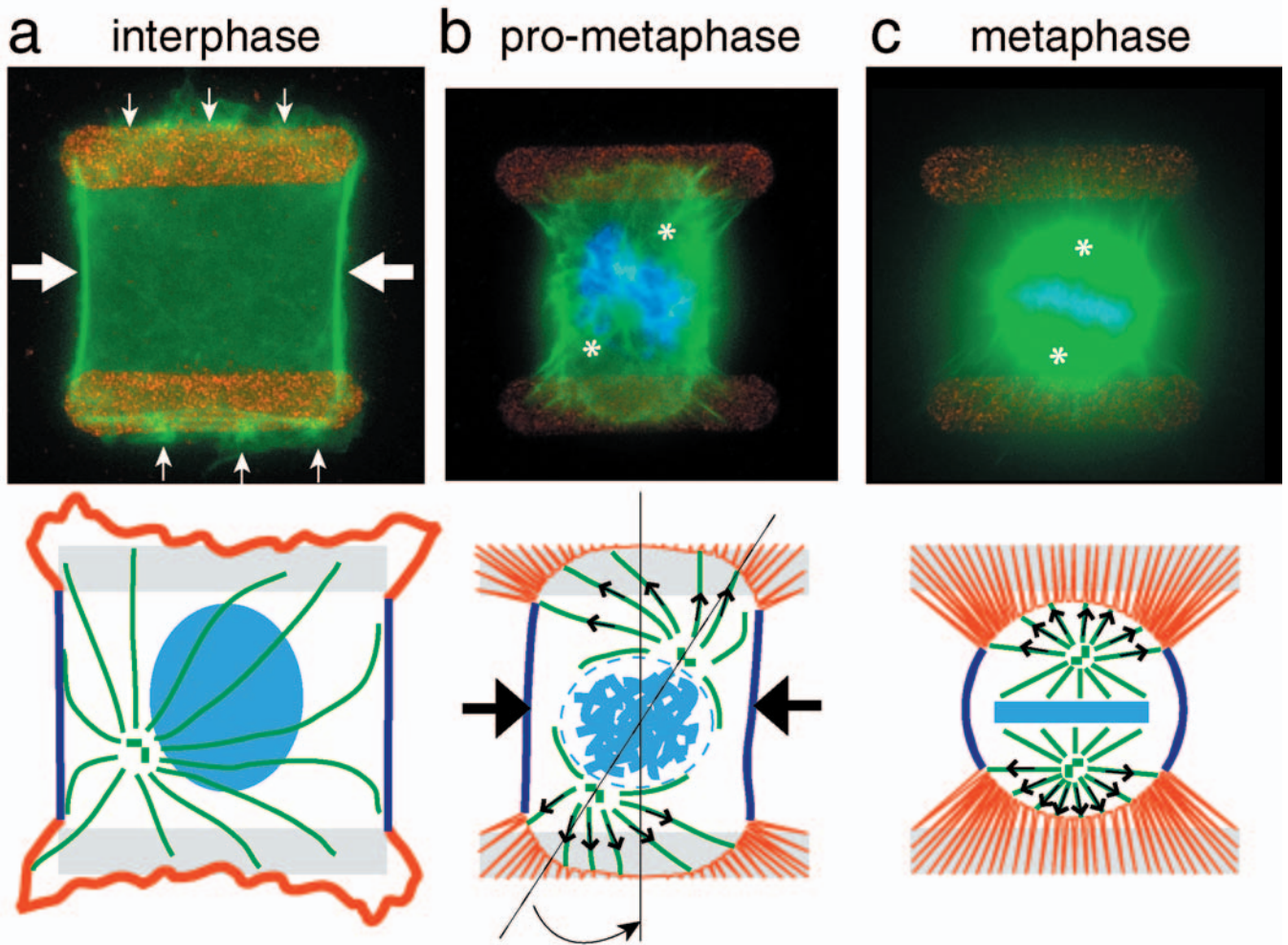


Figure S4 Model for a two-step spindle orientation process. (a) In interphase, the distribution of the ECM induces the segregation of a subset of actin-binding proteins in membrane ruffles upon adhesives zones (small arrows, red outline) which are excluded from non-adhesive zones where stress fibers can be observed (large arrows, blue outline). (b) In the prometaphase cell rounding begins with membrane retraction being greater upon non-adhesive zones (arrows). The influence this has on cell shape anisotropy

may in turn influence the initial orientation of the spindle (asterisks). (c) In the metaphase the membrane further retracts and RFs form on adhesive zones. After NEB spindle poles interact preferentially with the cortical cues associated to RFs via astral microtubules. Selective stabilisation and pulling of microtubules by cortical motors (small black arrows) accurately tune spindle orientation along the direction defined by these cues.

Movie S1 Cell divisions on adhesive micro-patterns. Time-lapse acquisitions in 10x magnification phase contrast. HeLa cells were plated on different adhesive fibronectin micro-patterns after release from a thymidine bloc. Time frame = 3 minutes. Several movies are shown together in each case. Each movie has been chosen and disposed in space in order to illustrate the main behaviour of the entire population. Movies start in order to see anaphase onset on the same picture for each micro-pattern. The first image shows the underlying fibronectin-Cy3 patterns. First line: [rectangle], second line: [disc], third line: [triangles] and fourth line: [L]. Scales: rectangle major length is 56µm, disc diameter is 29µm, triangle horizontal edge is 32µm.

Movie S2 Spindle formation in a cell plated on an [L] adhesive micro-pattern. Time-lapse acquisition in 63x magnification phase contrast focused at cell bottom (left) and z acquisition and projection of the centrin-GFP (right). Centrosome positions have been reported on the phase contrast images with green spots. Time frame = 5 minutes. Note the correlation between centrosomes separation and cell rounding as well as the formation of retracting fibers connecting the adhesive micro-pattern to the round cell body. Scale: triangle horizontal edge is 32µm.

Movie S3 Cells on [L] recovering the proper orientation for division after NZ washout. Time-lapse acquisition in 10x magnification phase contrast. Time frame = 3 minutes. Cells were allowed to spread on micro-patterns in usual conditions then treated with 100 nM NZ. Cells rounded up but failed to assemble a metaphase plate. After NZ washout metaphase plates formed and the majority of them were correctly orientated prior to anaphase. Scale: triangle horizontal edge is 32µm.

Movie S4 Spindle rotations during metaphase upon Src tyrosine kinases inhibition. The acquisition and disposition of the movies are identical to the one for movie S1. Cells were plated on [L] and treated with 1 µM SU6656 before mitosis.

Movie S5 Cell divisions upon Src tyrosine kinases inhibition. Cells were plated on [L] and treated with 10 µM PP2 before mitosis. The acquisition and disposition of the movies are identical to the one for movie S1. Note the mispositioning of metaphase plates and that half of the cells (lower panels) showed defects in cleavage furrow positioning and constriction leading to binucleated cells.

Movies S6: Cell divisions on square adhesive micro-patterns. See detailed legend of movie S1. First line: divisions on [cross], second line: on [L+dot], third line: on [twin bars]. Scale: square edge is 29µm.

III-2 Discussion sur l'orientation des divisions

Ces expériences montrent que le cortex installe en interphase, et maintient au cours de la mitose, les informations spatiales nécessaires au positionnement du plan de division.

Toutefois, plusieurs études montrent que le plan de division dans les cellules de mammifères ne dépend que de la position du fuseau puisque un changement artificiel de cette position change le plan de division (Shannon MBC 05, Canman CurBiol 00, Canman CMC 03, Rappaport, 1985). Cependant, ces manipulations modifient le réseau de microtubules et donc aussi ses capacités de sensation et de maintien de l'hétérogénéité corticale. Le cortex semble donc pouvoir être remodelé ce qui n'exclut pas l'hypothèse de l'existence préalable d'un plan de division cortical.

Carte corticale

Le message principal de cet article est la démonstration qu'il existe sur le cortex de la cellule mitotique une **carte** (en rouge sur la Figure 3.27) de ce qu'était la distribution spatiale des adhésions dans la cellule pré-mitotique et que l'orientation du fuseau y est sensible. Cette carte rapporte la distribution antérieure des adhésions mais aussi celle des diverses activités de l'actine (contraction et protrusions). La cellule en mitose garde donc des traces physique (fibres de rétraction) et biochimique (patch d'ezrine) de sa polarité antérieure qui guident l'orientation du fuseau. Plus exactement, cette carte serait faite des ancrages des fibres dans le cortex (à gauche sur la figure 3.27).

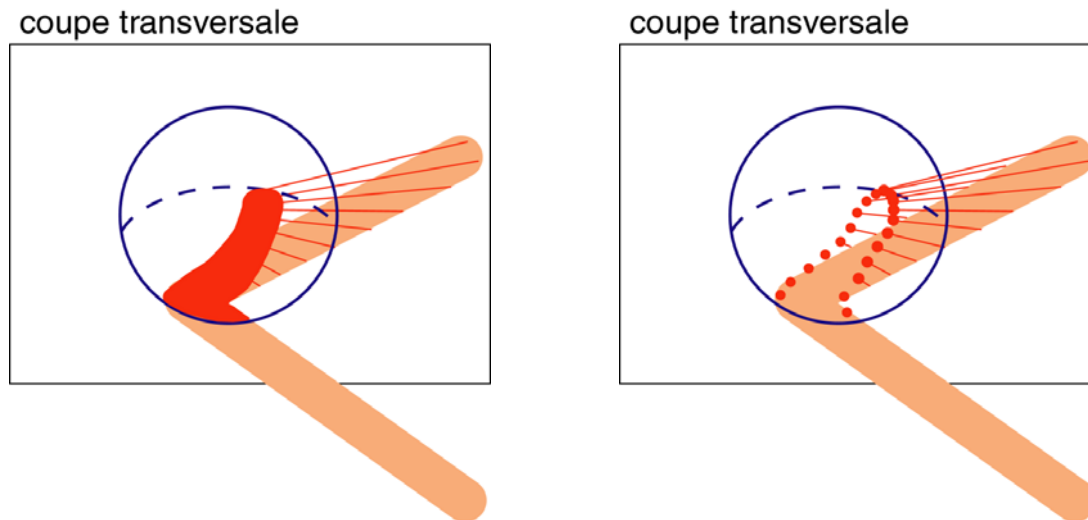


Figure 3.27 Représentation schématique de la carte corticale qui dirige l'orientation du fuseau sur une coupe de cellule en mitose. Les zones rouges sont les ancrages des fibres de rétractions dans le cortex de la cellule mitotique.

Marques corticales et fibres de rétraction

Les fibres ne semblent pas être une structure déterminante mais seulement **un support pour la localisation de déterminant cortical**. En effet, lorsque Src est inhibé, les fibres sont encore présente mais elles ne sont plus associées au patch d'ezrin phosphorylée et le fuseau perd son orientation. Elles ne sont peut être qu'un indicateur de la présence des déterminants corticaux qui ne joue aucun rôle direct dans l'orientation du fuseau. A l'iverse, on peut également imaginer que les protéines qui étaient ségrégées dans les protrusions étaient associées à des lipides ayant une forte affinité pour les membranes très courbées. En effet, dans les filopodes et les ruffles la membrane est beaucoup plus courbée que le long des bords de la cellule qui sont bien tendus. L'ezrine, par exemple, est toujours associée à des membranes très courbées (filopodes, microvilosités). La formation des fibres crée une forte courbure le long de la fibre et au niveau de son ancrage dans la membrane, qui pourrait être impliquée dans la ségrégation des marqueurs. La tension dans la fibre peut également ségréger des lipides particuliers avec lesquels certains déterminants auraient une grande affinité.

Il serait intéressant de regarder plus en détail l'**association du cortex et de la membrane** plasmique au cours de la formation de ces fibres. Si les marques peuvent se détacher de la membrane, la formation de la fibre pourrait avoir un effet de concentration locale des marqueurs (Figure 3.28)

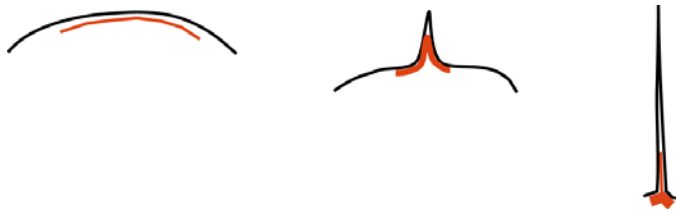


Figure 3.28

En plus de l'effet physique de recrutement par la tension et la courbure de la membrane, la formation des fibres pourrait aussi permettre de concentrer localement des marqueurs corticaux.

Ceci pourrait expliquer pourquoi certains composants, ne se détachant pas du cortex, se retrouvent dans le bas des fibres (près du substrat) alors que d'autres se retrouvent dans le haut des fibres (près du corps cellulaire).

Signalisation

En mettant des anticorps bloquants contre la fibronectine dans le milieu (Marsden and DeSimone, 2001), il serait possible de savoir si les récepteurs de l'adhésion envoient des **signaux** qui guident le fuseau. Les récepteurs spécifiques de l'interaction avec la fibronectine ne pourraient alors plus être activés. Les tentatives expérimentales d'impression de polylysine n'ont pas permis de conclure à ce propos et devraient être refaites car elles apporteraient des informations importantes à ce sujet.

Déterminants corticaux

La **nature des déterminants** qui orientent le fuseau est encore inconnue bien que leur l'existence ait été démontrée. Certains déterminants déjà connus dans les cellules de mammifères (Par, Pins, Numb, ...) pourraient être impliqués (Du and Macara, 2004). Leurs effecteurs pourraient être des moteurs moléculaires capables de tirer sur les microtubules astraux. Les dynéines sont les candidats les plus évidents au regard de la littérature (Gonczy et al., 1999; Faulkner et al., 2000; O'Connell and Wang, 2000). Le marquage de ces moteurs est difficile. Il n'existe pas de bons anticorps commerciaux dirigés contre les dynéines. Encore moins contre la conformation active des dynéines.

Les marquages corticaux sont difficiles à visualiser. La fixation des cellules mitotiques complètement rondes, comme dans le cas des HeLa, est particulièrement délicate. Les cellules sont peu accrochées au substrat, elles peuvent donc très facilement être décollées. Le cytoplasme est dense et contient un important bruit de fond pour tous les marquages. La perméabilisation avant la fixation (qui est la meilleure façon de se débarrasser du signal cytoplasmique) est impossible à cause de la fragilité des fibres qui ne résistent pas aux détergents. La préservation du cortex est peu compatible avec l'extraction du bruit de fond. L'expression d'une protéine marquée à la GFP serait l'alternative à un immuno-marquage.

Il faut cependant noter que l'accumulation d'**eitrine phosphorylée** dans ces marques corticales pourrait être plus qu'un simple indicateur spatial. En effet, dans l'embryon de souris au stade 8 cellules, la forme active de l'eitrine joue un rôle déterminant dans la polarisation des premières divisions asymétriques (Dard et al., 2001; Dard et al., 2004). D'autres ERM comme la radixin s'accumulent en haut de ces fibres de rétraction. Ces marques pourraient bien être directement impliquées dans le recrutement de protéines capables d'interagir avec les microtubules et nécessaires à l'orientation du fuseau.

Carte nucléaire

Nous remarquons dans l'article que le fuseau n'achève son positionnement qu'à la fin de l'arrondissement mitotique. Cependant, nous insistons moins sur le fait qu'**avant la rupture de l'enveloppe nucléaire, la distribution n'est pas aléatoire**. En effet, la distribution des orientations avant la rupture de l'enveloppe est déjà biaisée selon une direction qui correspond à l'orientation finale du fuseau (au moins pour les patrons étudiés ce n'est peut-être pas le cas pour les [twin bars] et ce serait intéressant de le mesurer). La forme de la cellule à ce moment peut influencer ce premier positionnement. Mais il faut prendre en compte que la séparation des centrosomes de part et d'autre du noyau est en fait une migration sur le noyau, qui se fait par l'intermédiaire des dynéines accrochées à la membrane nucléaire (Beaudouin et al., 2002; Salina et al., 2002). Il serait important de savoir comment ces dynéines sont réparties sur le noyau. Il se pourrait que le noyau possède déjà sur son enveloppe la marque de la trajectoire que prendront les centrosomes en migrant et donc la façon dont il va se couper en deux. Cette marque, qui serait une distribution hétérogène de dynéines, pourrait être une conséquence de la position du centrosome et de la dynamique des microtubules en interphase. Ainsi il n'y aurait pas uniquement une carte sur la membrane plasmique mais aussi une carte sur la membrane nucléaire. La membrane nucléaire aurait sur elle le plan de la **karyocinèse** et la membrane plasmique aurait sur elle le plan de la **cytocinèse**, les deux ayant été préalablement définis en interphase par le cytosquelette.

Morphologie de la cellule

Les conclusions finales de l'article ne permettent pas d'exclure le rôle de la forme de la cellule. La formation du fuseau a lieu pendant l'arrondissement et peut donc être sensible à l'allongement de la cellule. Cependant, la stabilité de cette orientation pendant parfois une à deux heures en métaphase, suggère fortement qu'il existe un mécanisme qui maintient le fuseau en place dans la cellule ronde. Ceci est confirmé par la réorientation des fuseaux après le lavage du nocodazole. Cette orientation dans un environnement sphérique démontre qu'il existe une information dans la cellule ronde qui guide le fuseau. Seulement la distribution des orientations mesurées est tout de même beaucoup plus large que dans les conditions normales. Il faut prendre en compte le fait que la récupération après l'arrêt en mitose par le nocodazole ne peut pas être immédiate et complète car la qualité des lavages est limitée par la fragilité des cellules. La sensibilité réelle des cellules aux marques corticales est certainement plus grande que ce que ne révèle la distribution des orientations après le lavage du nocodazole.

Quelques expériences supplémentaires, rapportées plus tard dans ce manuscrit, achèveront de démontrer le rôle de la distribution des fibres indépendamment de la forme de la cellule grâce à des patrons adhésifs imposant un contour circulaire et une orientation préférentielle du fuseau.

Mécanisme

Ces expériences montrent que le fuseau est guidé par le cortex. Mais rien ne permet de savoir comment. Les pôles sont-ils attirés par les zones contenant des fibres ou repoussés par celles n'en contenant pas ? Ou les deux comme dans la figure 3.29 ? Le parallèle avec les expériences sur le temps de pause des microtubules en interphase est tentant. Le modèle proposé ensuite pour les divisions devrait s'appliquer à la polarité en interphase et les deux observations témoignent certainement de propriétés semblables.

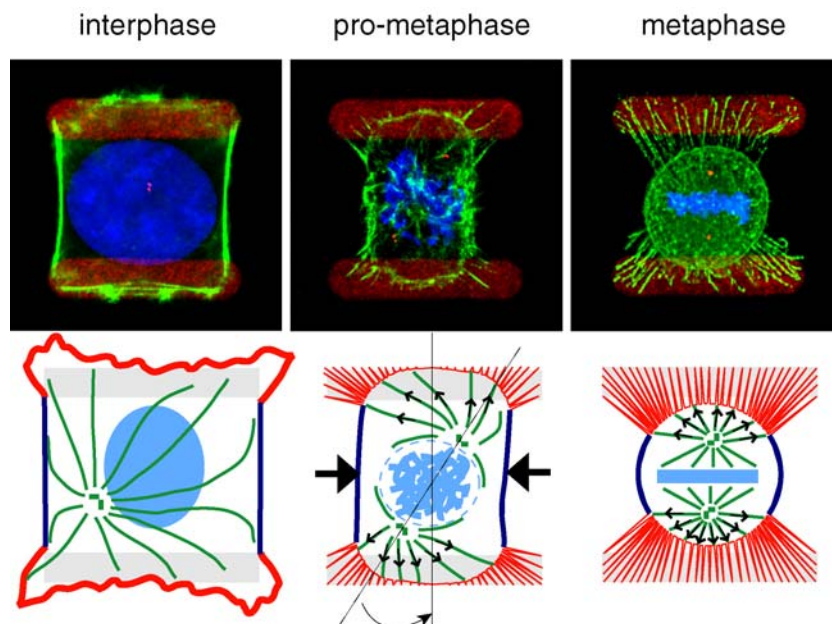


Figure 3.29

Ce schéma suggère que les zones contenant des fibres de rétraction attirent les pôles fuseau et que les chromosomes se placent près des zones contractiles.

C'est exactement le même principe que le schéma d'organisation de la polarité en interphase.

Plan de division cortical

Est-ce que le cortex guide le fuseau qui à son tour dicte le plan de division ou est-ce que le cortex contient déjà l'information permettant la localisation du plan de division et ne fait que mettre le fuseau au bon endroit ?

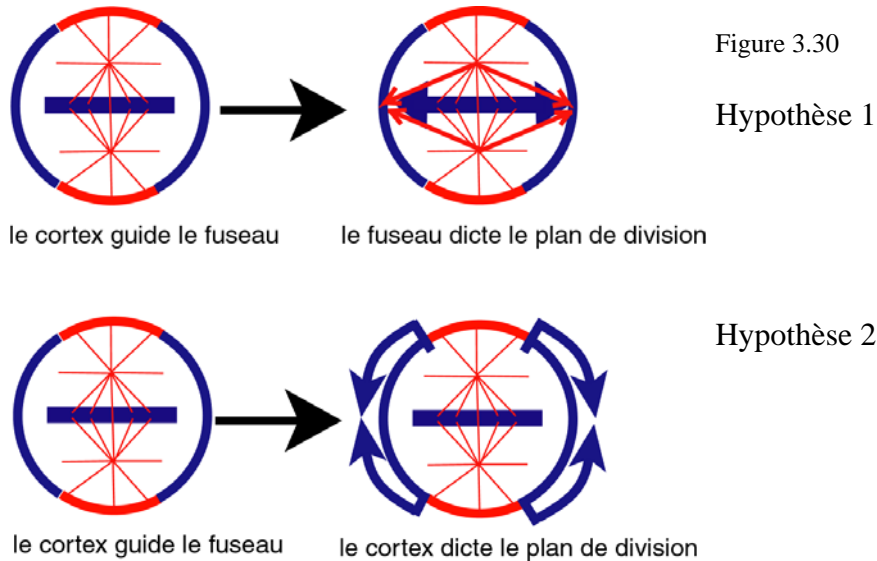


Figure 3.30

Hypothèse 1

Hypothèse 2

La première hypothèse considère les deux systèmes (fuseau et cortex) comme plus distincts qu'ils ne le sont certainement. La deuxième hypothèse confère au cortex un rôle majeur. L'hétérogénéité corticale dirigerait tout le processus de division. Si c'était le cas, il serait envisageable de décorrélérer la position du fuseau de celle du plan de division. Le problème est qu'on peut difficilement toucher au fuseau sans affecter le cortex et vice-versa.. Quelques expériences d'inhibition de la contractilité présentées plus bas détailleront un peu plus cette question. Il est raisonnable de se représenter cette étape comme une association de ces deux phénomènes (voir synthèse de l'introduction précédente). Selon les situations expérimentales, le fuseau et le cortex contribuent plus ou moins fortement à la définition du plan de division. Les deux systèmes tentent de s'accorder et trouvent la position d'équilibre la plus stable lorsqu'ils sont en phase.

D'autres cellules, d'autres réglages

Les expériences réalisées montrent que **différents types cellulaires** sont sensibles au patron adhésif. Cependant, les **L929**, des fibroblastes de souris, le sont moins que les **RPE1**, des cellules épithéliales humaines (Figure S1 de l'article et film « *Division RPE1 L* »). Ces deux types cellulaires ont des comportements très différents en culture. Les L929 forment de nombreuses protrusions, parfois à plusieurs endroits en même temps, et ne migrent pas vite, bien qu'elles soient très agitées. Les RPE1 prennent généralement une forme classique de cellule polarisée en cours de migration avec un bord avant large, un corps allongé dans la direction de migration et le noyau à l'arrière (voir le film « *Migration in a cross road* » et la légende en annexe 2). Elles ne forment que peu de protrusions et l'activité de polymérisation de l'actine est confinée dans le lamellipodium. Dans les RPE1, l'activité corticale semble donc plus intégrée que dans les L929, au sens où elles sont capables de produire une activité coordonnée de l'ensemble du système actine alors que chez les L929 plusieurs zones semblent faire des protrusions assez indépendamment du reste de la cellule. Ce manque de coordination pourrait bien participer à leur difficulté à répondre de façon univoque au patron adhésif.

D'autres paramètres peuvent rendre la cellule plus ou moins sensible à un patron adhésif de fibronectine. Certains types cellulaires ont un système adhésif **cellule-substrat** beaucoup moins développé que le système adhésif **cellule-cellule**. C'est le cas des MDCK qui sont des cellules épithéliales capables de former des épithélium in vitro. Ces cellules forment des jonctions cellule-cellules très fortes et s'organisent sur cette base. En culture, si deux cellules MDCK se touchent, elles ne se lâchent plus ce qui n'est pas le cas des cellules mentionnées plus haut. Sur des micro-patrons adhésif de fibronectine, les cellules MDCK s'étalent normalement mais à l'entrée en mitose les cellules s'arrondissent brutalement. Elles lâchent leurs ancrages sans faire de fibres de rétraction et se retrouvent positionnées n'importe où sur le patron adhésif. En culture ces cellules établissent de forts contacts avec leur voisines (par l'intermédiaire des cadhérines) et donc s'arrondissent peu au cours de la mitose. L'orientation de leur axe de division sur les patrons semble beaucoup plus aléatoire que pour les types cellulaires précédents (voir les films « *MDCK* » et les légendes en annexe 2). Ce comportement rappelle celui des HeLa après inhibition des kinases Src.

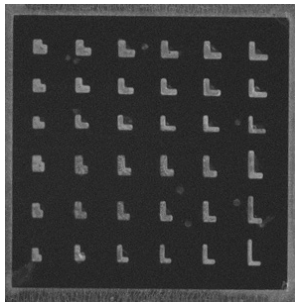
Ces résultats suggèrent qu'il faut adapter la protéine imprimée à la sensibilité adhésive des cellules. Par ailleurs, ce protocole d'étude des cellules individuelles ne convient pas à l'étude des cellules dont la sensation périphérique est dominée par les contacts avec d'autres cellules. Cependant, les voies de signalisation en aval des contact cellule-substrat et des contacts cellule-cellule sont très similaires : APC, Wnt, RhoGTPases, ERK, Src tyrosines kinases, IQGAP et Rho GTPases (Jamora, 2002; Wheelock and Johnson, 2003). Quelle est la différence pour la cellule d'interagir avec des fibres dans une matrice ou avec une autre cellule si les mêmes voies de signalisation sont activées ?

C'est dans ce contexte que l'idée proposée à la fin du chapitre 1 de faire des patrons pour plusieurs cellules qui serviraient à leur tour de patron pour une autre cellule devient intéressante. Il serait utile également d'étudier la possibilité d'imprimer des domaines fonctionnels des cadhérines.

Par ailleurs il est nécessaire d'étudier plus en détail les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation qui permettent aux systèmes adhésifs de sentir la géométrie du substrat et à la cellule d'intégrer les signaux reçus en une réponse coordonnée.

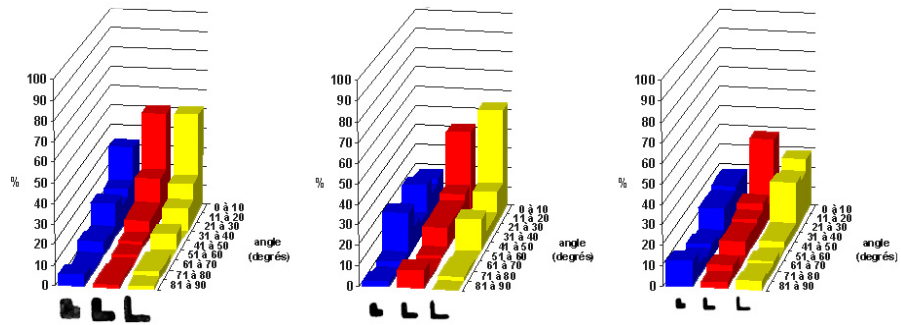
III-3 Effet de la taille et de la surface du patron adhésif

Au cours des expériences servant à définir la bonne taille pour les patrons adhésifs nous avons mesuré l'orientation du fuseau sur de nombreux patrons en L. Les patrons imposant aux cellules d'être les plus étalées étaient les plus efficaces et ce sont ceux qui ont été utilisés par la suite. Cependant, de très petits L, dont l'asymétrie par rapport à un simple carré était minimale tant les branches étaient épaisses, avaient la capacité d'orienter les divisions (Figure 3.31) (voir les films « *Preliminary L* » et les légendes en annexe 2). Cette capacité qu'ont les cellules d'orienter leur axe de division en réponse à une très faible asymétrie illustre bien la sensibilité de ce mécanisme.



[L] de tailles et de géométries variables. Les [L] sont distants de 100 μm .

Figure 3.31



Mesures de l'orientations des divisions par rapport à l'hypoténuse du [L] sur des patrons de tailles et de géométries variables. Les images des [L] correspondant à la distribution sont toutes à la même échelle : le plus grand et le plus fin fait 35 μm de côté, le plus petit fait 10 μm de côté.

Seuls les [L] les plus compacts (bleus) sont peu efficaces. Les petits [L] de la troisième ligne de l'image de gauche parviennent toutefois à orienter les divisions (rouge et jaunes dans le graphe le plus à droite).

En mesurant les orientations sur des croix de tailles différentes, il est apparu une valeur de taille critique en dessous de laquelle les cellules se divisaient aléatoirement (Figure 3.32). Ceci suggère qu'il existe une distance minimum entre les sommets de la cellule étalée et le bord de la cellule arrondie pour que les fibres de rétraction créent un pôle d'attraction suffisamment concentré et accessible pour que l'orientation du fuseau soit biaisée.

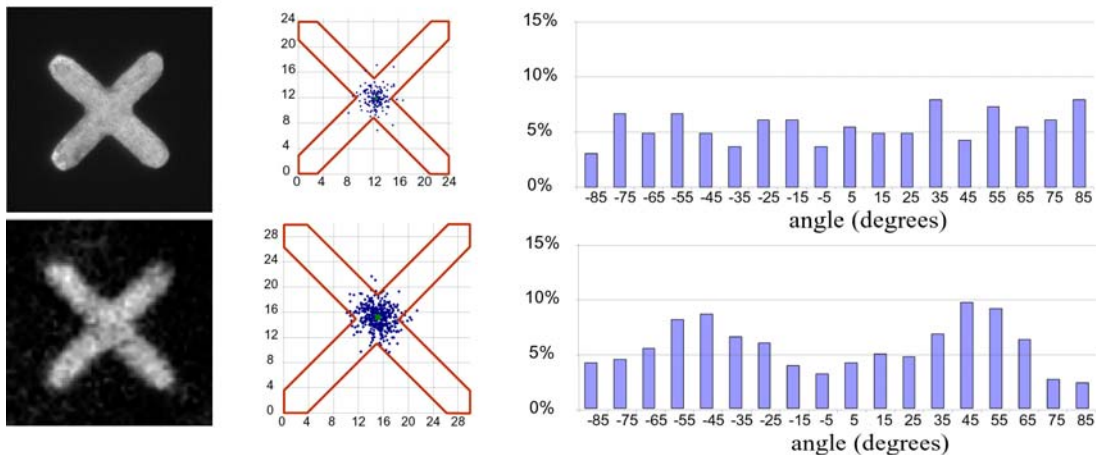


Figure 3.32 Les distributions des orientations des divisions (à droite) sont aléatoires sur les croix de 24 μm de côté et orientées selon les diagonales des croix de 30 μm de côté. Dans les deux cas les cellules s'arrondissent au centre des croix (graphes au centre).

Une étude approfondie de cette transition permettrait certainement de définir des rapports critiques entre certaines longueurs (taille de la cellule, taille des fibres, hauteur d'accrochage des fibres sur le cortex, taille du noyau, distance entre les pôles) caractéristique de la sensibilité du fuseau au patron adhésif. Cela permettrait de mieux comprendre les paramètres déterminants pour l'orientation du fuseau.

III-4 Effet de l'inhibition de la polymérisation de l'actine, de l'activité des myosines II, des tyrosines kinases et celles de type Src

Cytosquelette d'actine

Il était attendu que le **cytosquelette d'actine** soit nécessaire pour une orientation correcte des fuseaux comme dans tous les autres systèmes. Cependant l'inhibition de la polymérisation de l'actine avec la cytochalasine D (1µg/mL) et la latrunculine A (0,1µM) donnent des résultats différents.

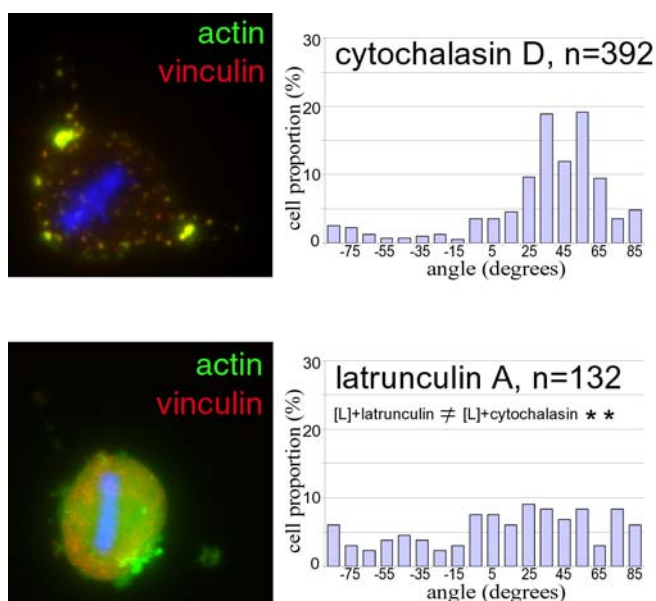


Figure 3.32

Les cellules traitées à la cytochalasine D s'orientent mieux que celles traitées à la latrunculin A. Les premières conservent des formes de marques corticales alors que dans le deuxième cas tout le cytosquelette d'actine est complètement dissout.

Sur les films on peut voir que les cellules s'arrondissent sous l'effet de la drogue mais qu'elles s'arrondissent encore plus en entrant en mitose. La plaque parvient à s'assembler normalement mais elle est souvent instable et tourne ([voir le film « Rocking Metaphase cytochalasin D »](#) et la légende en annexe 2). Les cellules n'entrant pas en anaphase B, l'orientation de la plaque a été directement mesurée manuellement sur les images en contraste de phase ([voir les films « Division without cortical actin integrity »](#)). La cytochalasine induit la formation d'aggrégats d'actine et de vinculine en étoile. Ces petits paquets ne se distribuent pas aléatoirement dans la cellule et sont, le plus souvent, localisés près des anciennes adhésions et protrusions. Et curieusement, la distribution des orientations des fuseaux n'est pas aléatoire, elle est même assez bien orientée. Ceci suggère que ces petits paquets ont encore la possibilité d'influencer la position du fuseau. Par contre, si l'actine est dépolymérisée par la latrunculin, la vinculine et l'actine deviennent complètement diffuses dans le cytoplasme et l'orientation des fuseaux est aléatoire.

Contractilité acto-myosique

Une étude a conclu que la **contractilité acto-myosique** était nécessaire à la formation du fuseau et à son positionnement dans la cellule (Rosenblatt et al., 2004). Les myosines induiraient un mouvement du cortex qui entraînerait les pôles du fuseau et permettrait leur séparation. En effet, l'inhibition de l'activité des Myosines Light Chain Kinases, par micro-injection d'un fragment de la kinase, induit un délai entre la rupture de l'enveloppe et l'anaphase (Fishkind, 1991). Cette hypothèse intéressante qui aurait pu expliquer l'orientation du fuseau sur les patrons adhésifs n'a pas pu être confirmée dans notre système expérimental.

L'inhibition de la contractilité acto-myosique par la blebbistatine (100 μ M, (Straight et al., 2003)) ou Y27632 (10 μ M) n'a pas empêché la formation du fuseau, ni la bonne orientation du plan de division (Figure 3.33). Il a été montré que l'inhibition de la contractilité par Y27632 défaisait l'uropode des lymphocytes mais pas le cap de CD44 due à la phosphorylation Thr567 de l'e-zrin (Lee et al., 2004). Donc ce traitement a vraisemblablement maintenu les marques corticales. Curieusement, l'anneau d'actine a pu se contracter mais la cytokinèse a été inhibée et les cellules ont refusionné.

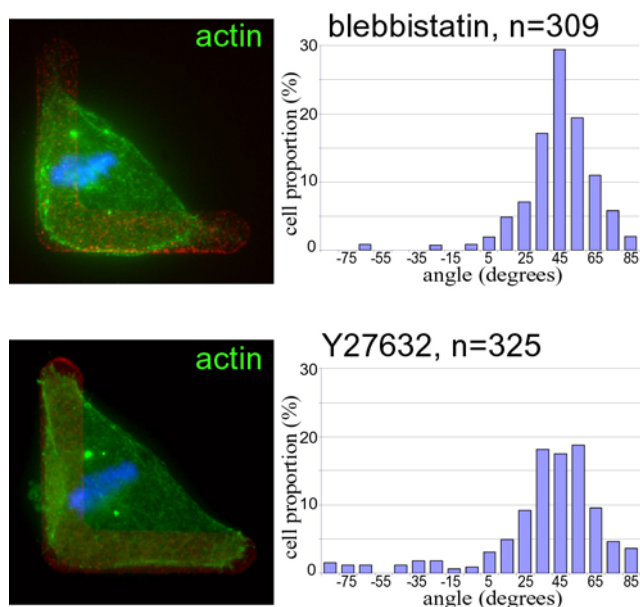
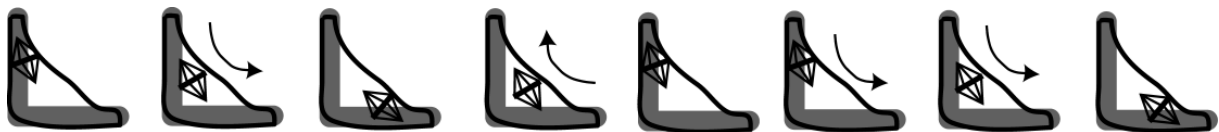


Figure 3.33
Les fuseaux se forment correctement et plan de division se positionne correctement en l'absence de contractilité acto-myosique.

Par contre, les cellules s'arrondissent beaucoup plus lentement et parfois se divisent avant d'avoir fini de s'arrondir ([voir les films « Divisions without Myosin II »](#)). Le fuseau est donc entièrement formé dans une cellule encore étalée. C'est alors qu'il se passe quelque-chose de frappant qui révèle certainement un mécanisme important. Le fuseau bouge dans la cellule, il se déplace d'une extrémité de la cellule vers l'autre puis repart dans l'autre sens.



Un tel mouvement renforce l'hypothèse selon laquelle le fuseau est attiré par quelque-chose au sommet de la cellule. D'autant plus que, suite à l'inactivation de la contractilité, les protrusions sont devenues beaucoup plus importantes à ces endroits. Le fuseau, comme sur

l'image blebbistatine, peut parfois aller très près de ces sommets. Comment se fait-il que dans une situation pareille le plan de division soit correctement positionné au milieu de la cellule et avec la bonne orientation ? Si, comme c'est le cas dans la levure *Saccharomyces pombe*, le fuseau détermine le plan de division à un instant très précis juste avant l'anaphase (voir la fin de l'introduction) alors il faut que le fuseau soit au milieu à ce moment. Peut-être que le fuseau finit par se stabiliser quelques instants à cet endroit et que cela déclenche l'anaphase. Peut-être que le fuseau tente au cours de ces mouvements d'établir un plan de division et que seul le milieu de la cellule répond à la stimulation. Quoiqu'il en soit, il semble que la contractilité acto-myosique soit impliquée dans le maintien du fuseau au centre de la cellule mitotique.

Il a été montré également que les fuseaux de cellules épithéliales surexprimant une forme active de RhoA dans un pseudo-épithélium en culture étaient souvent orientés verticalement au lieu d'être dans le plan de la lamelle (Vasiliev, 2004). Une étude complète de l'effet de la contractilité acto-myosique sur l'orientation du fuseau devra donc étudier l'effet de l'inhibition et également celui de la suractivation des myosines.

Src tyrosine kinases

L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src a un effet spectaculaire sur l'orientation du plan de division. Elle a également un effet sur la position des cellules mitotiques (Figure 3.34). Les cellules s'arrondissent très brusquement comme si l'ancrage du cytosquelette dans les adhésions lâchait soudainement au lieu d'être lentement remodelé. Au lieu d'être dans le coin du L les cellules mitotiques sont dispersées sur toute la zone adhésive. Souvent, la plaque métaphasique n'est que peu désorientée juste après l'arrondissement mais elle se met à tourner doucement pendant que la cellule semble bloquée en métaphase. (voir film « *Divisions without Src tyrosines kinases* »). L'orientation du plan de division au cours de l'allongement en anaphase est quasi-aléatoire. La télophase montrée sur cette la figure 3.34 n'aurait jamais pu être observée dans des conditions contrôle.

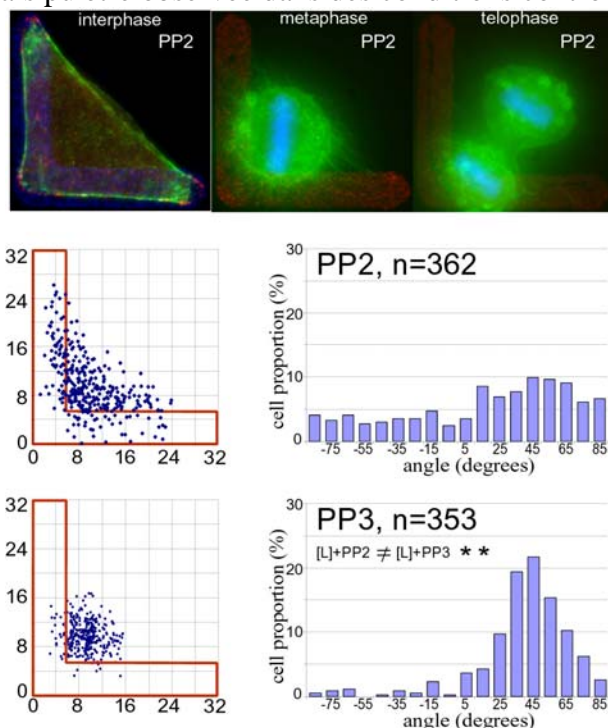


Fig. 3.34

Lorsque Src est inhibé les cellules mitotiques se positionnent et se divisent aléatoirement sur le patron adhésif.

En haut à gauche, l'actine est en vert, les adhésions sont en rouge et la fibronectine est en bleu.

En haut à droite, l'actine est en vert, l'ADN est en bleu et la fibronectine est en rouge.

En bas, les graphes montrent les positions des cellules mitotiques (gauche) et l'orientation des divisions. PP3 est la forme inactive de PP2 qui inhibe les tyrosines kinases de la famille Src.

Src joue un rôle majeur dans la signalisation par les intégrines (Playford and Schaller, 2004). Src a de nombreuses protéines cibles (dont intégrine, paxiline, tensine, vinculine, cortactine, β -catenine, FAK, PI3K). Il est impliqué dans la régulation de l'adhésion, la migration, le cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Tatosyan and Mizenina, 2000). L'inhibition des Src kinases perturbe donc un grand nombre de signaux générés au niveau du cortex cellulaire au cours des modifications du cytosquelette. Src est effectivement une des voies de signalisation principales de la mécanotransduction (Geiger and Bershadsky, 2001; Bershadsky et al., 2003). Son inhibition rend la cellule incapable d'interpréter les contraintes mécaniques qu'elle subit et d'organiser le cytosquelette en conséquence (Mack et al., 2004). Src influence également l'activité des formines comme mDia 1 et 2 qui couplent l'actine et les microtubules. Les inhibitions de Src, de mDia1 et de Rho inhibent la cytocinèse (Tominaga et al., 2000). DIP (mDia interacting partner) régule Rho et Rac en fonction de Src (Meng et al., 2004). Toutes ces interactions entre l'actine, les voies Rho/Rac, et les microtubules sont donc perturbées par l'inhibition de Src.

Cependant, peu d'études avaient rapporté l'effet de l'inhibition de Src sur l'orientation des divisions (Bei et al., 2002; Tsou et al., 2003a). Dans l'embryon de *Caenorhabditis elegans*, les cellules observées (division EMS/P2) n'étaient plus sensibles au contact qu'elles avaient avec leurs voisines.

Dans nos expériences, la variété des substrats de Src nous empêche de conclure sur les causes exactes du désengagement du fuseau avec le cortex : non seulement les adhésions ne sont certainement plus capables d'entretenir les voies de signalisation habituelles aux niveaux des adhésions mais en plus le cytosquelette ne peut se réorganiser correctement au cours de l'arrondissement mitotique. Une étude plus approfondie du rôle de Src entre les adhésions et l'orientation du fuseau est donc nécessaire.

La génistéine est un inhibiteur plus général qui bloque toutes les tyrosines kinases et entre autre les protéines de signalisation associée aux intégrines (Rho, Rac, Ras, ERK, JNK, ...). L'effet de la génistéine est si fort que les cellules ne sortent pas de mitose. Lorsque certaines finissent par se diviser l'orientation est effectivement aléatoire.

III-5 Un mouvement asymétrique du fuseau avant l'anaphase

En observant le comportement des pôles du fuseau au cours de la division, nous avons remarqué un événement singulier. Le fuseau se décentre juste avant l'anaphase et un des pôles se déplace vers le cortex (Figure 3.35). Parfois on voit le pôle toucher le cortex. Sur la séquence ci-dessous on peut voir ce mouvement asymétrique qui précède l'anaphase (voir les films « *Spindle Formation L 3* » et « *Spindle Formation L Asym Metaphase* »).

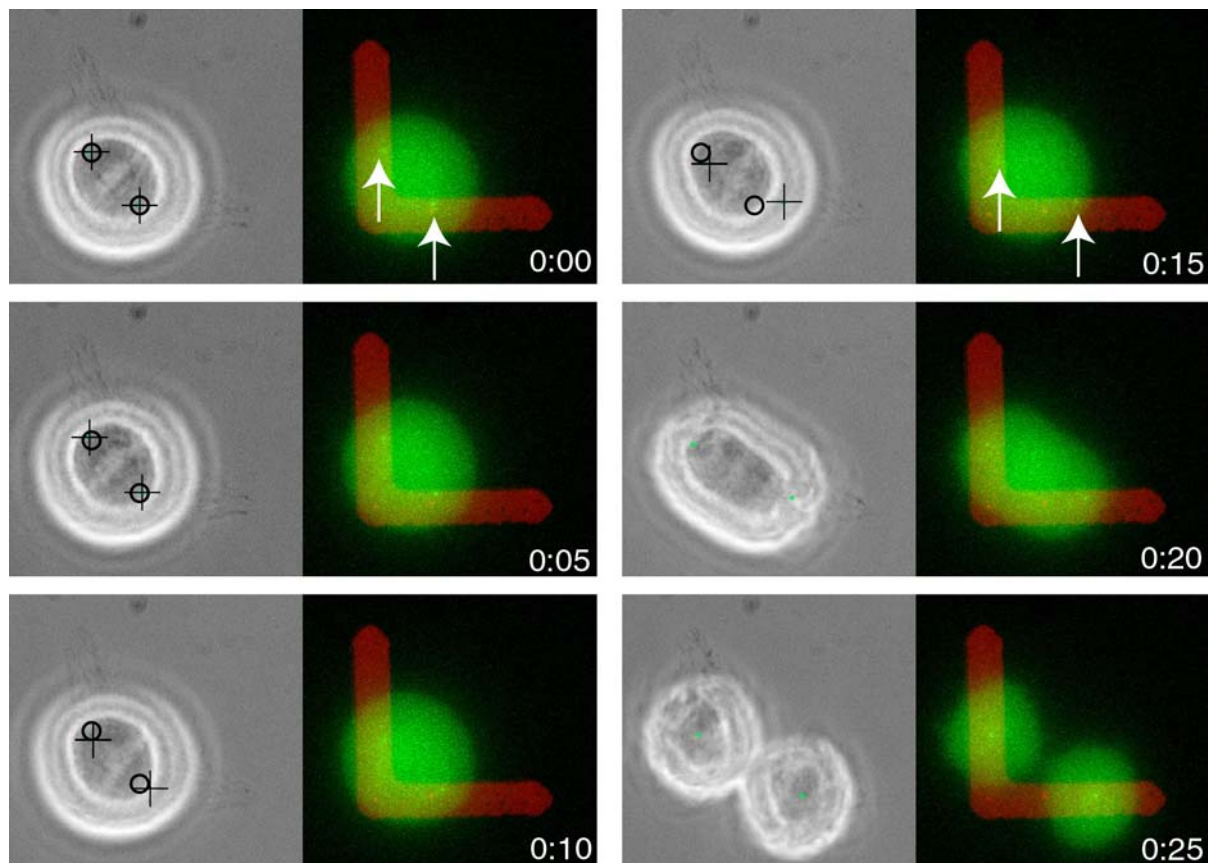


Figure 3.35 Séquence vidéo de la centrin1-GFP montrant la position centrale du fuseau , plaque métaphasique visible en contraste de phase à gauche et pole en GFP à droite (flèches blanches) à t=0:00. A t=0:10 la plaque commence à se décentrer et à t=0:15 un pôle touche le cortex alors que l'anaphase n'a pas commencé. Les ronds montrent la position initiale des pôles et les croix la position sur l'image GFP reportée sur l'image en contraste de phase.

Ces observations ont été limitées par la fréquence d'acquisition des images. Ce mouvement semble durer entre 2 et 5 minutes. Or les films ont été réalisés depuis l'interphase en G2 jusqu'à la fin de la division en prenant une image toutes les 5 minutes. Avec un temps plus court entre les acquisitions, les cellules restaient bloquées en métaphase à cause des effets de l'illumination en fluorescence. C'est en faisant quelques films avec une image toutes les minutes à partir de la métaphase que nous avons pu observer que certains de ces mouvements ne duraient que deux à trois minutes.

Les séquences enregistrées montrent deux types d'asymétrie avant l'anaphase : soit le fuseau se déplace d'un bloc contre le cortex avant l'anaphase et la séparation des chromosomes (métaphase asymétrique), soit c'est la première image de l'anaphase qui est asymétrique, avec un des pôles qui est encore en place et l'autre qui est contre le cortex (anaphase asymétrique) (Figure 3.36).

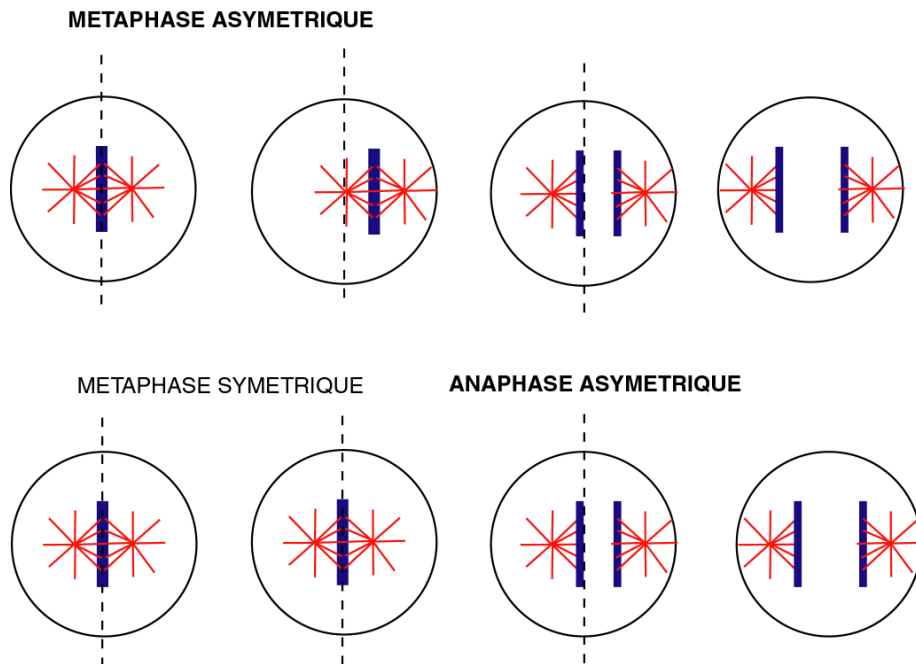


Figure 3.36 Description schématique des mouvements considérés comme des métaphases asymétriques et des anaphases asymétriques.

Nous avons quantifié la proportion de métaphases asymétriques (MA) par rapport à celle de métaphases symétriques (MS) sur différents patrons adhésifs et dans des cellules étalées sur des substrats classiques uniformément greffés de fibronectine. Ces quantifications ont été faites visuellement à partir des positions des centrosomes au cours du temps (centrin-1 GFP). Dans certains cas de figures la métaphase n'est plus vraiment centrée sans pour autant pouvoir être considérée comme ayant une position nettement asymétrique, ces cas intermédiaires (+/-) ont été classés à part.

	MA	MS	+/-	total	MA	MS	+/-
rectangles	6	5	3	14	43%	36%	21%
croix	5	6		11	45%	55%	
disques	10	12		22	45%	55%	
L	13	17	2	32	41%	53%	6%
Libres	10	13	5	28	36%	46%	18%

Il semble donc que ce déplacement asymétrique du fuseau avant l'anaphase soit fréquent. D'autant plus que la fréquence d'acquisition est telle que certains de ces mouvements, ayant pu avoir eu lieu entre deux acquisitions, n'ont pas été détectés. La fréquence calculée est donc une sous-estimation de la fréquence réelle.

Certaines métaphases sont restées en position centrale et ont donc été classées dans MS, cependant parmi ces métaphases certaines ont donné lieu à une anaphase asymétrique avec un des pôles se déplaçant plus vite près du cortex que l'autre (voir Figure 3.36). La proportion d'anaphase asymétrique (AA) et d'anaphase symétrique (AS) au sein de la population de cellules montrant une métaphase symétrique (MS) a été quantifiée à son tour :

	AA	AS	total	AA	AS
L	10	7	17	59%	41%
Rectangle	2	3	5	40%	60%
Disques	5	7	12	42%	58%
Croix	1	5	6	17%	83%
Libres	2	11	17	12%	88%

L'asymétrie de cette étape est donc fréquente. D'autant plus qu'encore une fois, la fréquence d'acquisition des images est telle que certaines n'ont pas été détectées. Les anaphases faisant suite à des métaphases asymétriques montrent elles aussi généralement une asymétrie (voir Figure 3.36).

La proportion totale de positions asymétriques (métaphase et/ou anaphase) est la somme des proportions précédentes :

	A	S	+/-	total	Asymétrie	Symétrie	+/-
L	23	7	2	32	72%	22%	6%
rectangles	8	3	3	14	57%	21%	21%
croix	6	5		11	55%	45%	
disques	15	7		22	68%	32%	
libres	12	11	5	28	43%	39%	18%

Le processus de séparation des deux jeux de chromosomes est donc généralement asymétrique. Pourtant, dans ces cas de figures ([L], [rectangle], [disques]) le cortex n'a pas de raison évidente d'être asymétrique.

De plus, nous aurions pu imaginer que l'asymétrie sur les [rectangles] ou les [L] allait être plus fréquente que sur les [disques] ou les [croix]. En effet, sur les [rectangles] ou les [L], deux groupes de marques corticales se forment alors qu'ils sont plus diffus sur les [disques] ou les [croix]; donc une asymétrie dans la distribution de la tension aurait pu être moins visible. Pourtant les fréquences d'asymétrie sont comparables dans toutes ces situations.

Il semble donc que la brisure de symétrie soit inhérente au fuseau plutôt qu'au cortex. La tension qui apparaît dans les microtubules astraux est sûrement transitoire (Grill and Hyman, 2005). On imagine donc que, si tous les microtubules astraux sont soudainement tirés par intermittence de part et d'autre du fuseau, une asymétrie peut apparaître et s'amplifier. Lorsqu'un des pôles se rapproche du cortex, les microtubules nucléés par ce pôle sont plus nombreux dans cette zone corticale, augmentant localement la probabilité d'apparition d'une tension sur le pôle.

Par ailleurs, il est connu que dans d'autres systèmes, lorsque le cortex est asymétrique l'anaphase est asymétrique (Cowan and Hyman, 2004). Encore une fois, on peut penser que le fuseau a la propriété intrinsèque de se comporter temporairement de façon asymétrique avant l'anaphase ou en début d'anaphase lorsque les microtubules changent de dynamique (Piehl, 2004). Si le cortex est asymétrique alors il peut guider l'asymétrie du mouvement du fuseau.

Dans les expériences qui imposent au cortex de *Caenorhabditis elegans* d'être symétrique au lieu d'être asymétrique (les mutants *par2* ou *par3*), aucune différence entre les deux pôles n'est visible. Si l'on mesure les déplacements des fuseau en anaphase, on observe en moyenne les mêmes vitesses vers l'un ou l'autre des pôles. Mais il serait intéressant de savoir si, dans chaque cas particulier, le fuseau ne va pas toujours un peu plus vite vers un pôle que vers l'autre, ce qui confirmerait l'hypothèse du fuseau intrinsèquement asymétrique.

Dans certaines situations expérimentales, comme dans l'embryon de *Caenorhabditis elegans*, le contact d'un pôle avec le cortex est déclencheur de l'anaphase par une brisure de symétrie mécanique (Cowan and Hyman, 2004). Il est donc envisageable que, dans notre système expérimental, ce soit l'asymétrie observée qui déclenche l'anaphase en modifiant localement le cortex au moment du contact. L'observation de divisions apparemment totalement symétriques dans cette étude ne conforte pas vraiment cette hypothèse pour l'instant, bien qu'elle reste une possibilité. De plus, le fait que ce contact ne soit pas une condition indispensable au déclenchement de l'anaphase ne signifie pas pour autant qu'il ne la déclenche pas lorsqu'il a lieu.

IV- Modèle physique pour l'orientation du fuseau

IV-1 Les modèles actuels

Modèles dynamiques

Plusieurs physiciens essaient de modéliser la formation et le positionnement du fuseau. Un modèle de formation est particulièrement difficile à décrire car c'est un événement long qui implique de nombreux composants (pôles du fuseau, microtubules, différents moteurs, membrane nucléaire, membrane plasmique) et la forme de la cellule qui évolue au cours de la formation du fuseau. Cependant, Cytrynbaum et ses collègues proposent un modèle de formation du fuseau dans le syncytium de drosophile à partir d'observations expérimentales. A ce stade, les cellules ne sont pas séparées par des membranes (syncytium) et les pôles du fuseau interagissent avec le noyau et la paroi plane de l'embryon. Leur modèle de formation du fuseau est basé sur un équilibre entre la tension dans les microtubules astraux, induite par les dynéines au cortex, qui tendent à écarter les pôles en les tirant vers le cortex et des forces inter-microtubules, dues aux kinésines type Ncd, qui tendent à les rapprocher (Cytrynbaum et al., 2003). Ce modèle implique que la distribution des dynéines au cortex soit inhomogène et enrichie sur les parois latérales. Ce modèle a été affiné par l'observation de la déformation du noyau qui résiste, elle aussi, à la séparation des pôles (Cytrynbaum et al., 2005). Ce modèle prédit correctement la façon dont les centrosomes vont longer le cortex en fonction de l'activité des moteurs Ncd entre les microtubules et de la résistance du noyau à la déformation.

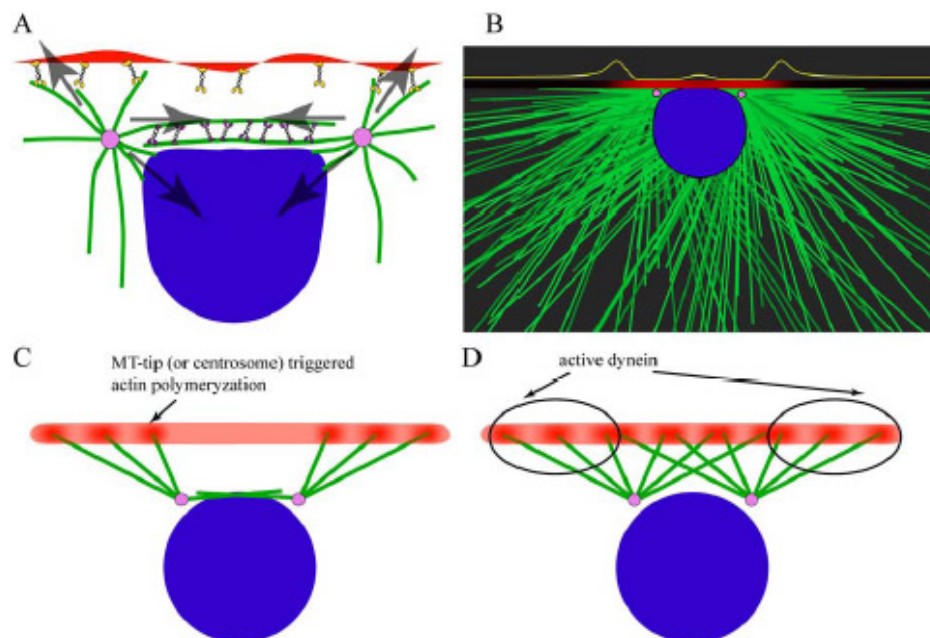


Figure 3.37

Stephan Grill et ses collègues proposent un modèle pour décrire le positionnement asymétrique du fuseau avant l'anaphase et les oscillations des pôles au cours de l'anaphase (Grill and Hyman, 2005). Ce modèle suppose que les microtubules qui touchent le cortex sont mis sous tension. Cette tension est produite par des moteurs, comme les dynéines, qui sont ancrés dans le cortex et qui tirent sur les microtubules en se dirigeant vers les bouts « - ». Les dynéines ne tirent pas en continu. Elles lâchent le microtubule périodiquement. Les fréquences de tension et de relâche sont modulées par les protéines Par et les protéines G. L'asymétrie ne vient ni de l'intensité de la force ni de la distribution des moteurs mais uniquement des différences de fréquence due à l'activation des moteurs par les protéines G. Les moteurs associés au pôle Par2 tirent et relâchent les microtubules plus souvent donc sont plus nombreux à travailler en même temps que les moteurs du côté Par3 qui tirent moins souvent, ce qui crée une force globalement plus importante capable de faire osciller le pôle en question. De plus, la tension sur un microtubule fait flamber les microtubules voisins ce qui crée une force de rappel. Ce modèle reproduit de façon remarquable le comportement des pôles du fuseau avant et au cours de l'anaphase.

Modèles statiques

La prédiction de l'orientation du fuseau peut être abordée d'une façon plus simple car on peut s'affranchir du temps et ne chercher qu'à calculer les positions d'équilibre stables de l'appareil mitotique. Dans un espace confiné, comme une cellule, la géométrie et les symétries de l'appareil mitotique laissent imaginer que le réseau de microtubules est en train de sentir l'espace et d'y placer un axe en touchant les parois. Quelle est la nature des interactions entre les microtubules et les parois ? Plusieurs modèles sont possibles car les microtubules peuvent tirer ou pousser sur le cortex selon la nature des protéines qu'ils rencontrent au cortex (Pearson and Bloom, 2004). De manière générale, en faisant une hypothèse sur la nature des forces on peut sommer toutes les forces transmises par les microtubules sur le dipôle (la partie centrale de l'appareil mitotique : pôles, chromosomes, fuseau). Pour chaque orientation, on peut donc calculer un couple de forces exercées sur les pôles et donc en déduire la ou les positions d'équilibre stables pour lesquelles ce couple est nul.

Ainsi Bjerknes propose un modèle théorique basé sur des critères géométriques pour le cortex et le fait que les microtubules poussent sur le cortex (Bjerknes, 1986). La force due au flambage des microtubules est inversement proportionnelle au carré de leur longueur. Il en résulte que le fuseau s'oriente selon le grand axe des cellules. Ce modèle prévoit également la présence d'une bifurcation du positionnement du fuseau dans un rectangle de taille donnée au-delà d'une certaine taille du fuseau : au lieu d'être dans le sens de l'allongement du rectangle un grand fuseau se mettra selon les diagonales. Dans un carré, le fuseau s'oriente selon les diagonales, quel que soit le rapport de taille entre le fuseau et le cortex.

IV-2 Modèle théorique d'orientation du fuseau - ARTICLE

En collaboration avec Andrea Jimenez Dalmaroni et Frank Julicher (Theoretical Physics, Max Plank Insitute, Dresden) nous avons mis au point un modèle théorique pour décrire les orientations des divisions des cellules dont la géométrie de l'adhérence est contrainte.

Le modèle repose principalement sur les hypothèses suivantes :

- Des moteurs sont activés dans les zones corticales contenant des fibres de rétraction. Ailleurs, les moteurs sont absents ou ne travaillent pas.
- Les moteurs tirent sur les microtubules qui, en conséquence, sont mis sous tension.

Ainsi chaque microtubule qui touche le cortex sur une zone contenant des fibres de rétraction (et donc où se situent les marques corticales associées) est mis sous tension et crée ainsi un couple sur le fuseau dont l'expression du moment, $\tau(\phi)$, est décrite sur le schéma de la figure 3.38 (avec un seul microtubule et une seule fibre de rétraction par souci de clarté) :

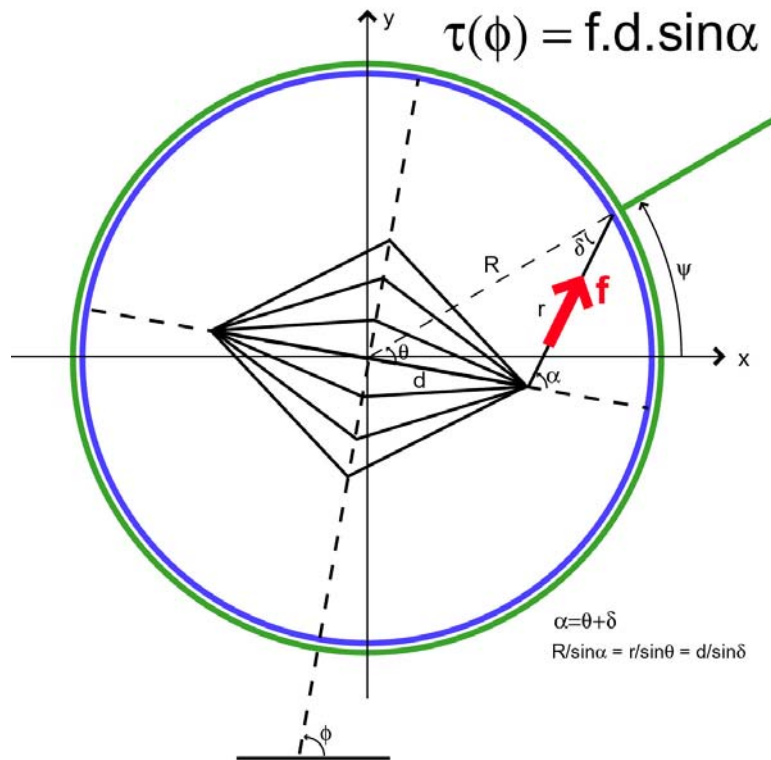


Figure 3.38 Modèle d'application d'une force sur un pôle du fuseau par l'intermédiaire d'un microtubule astral en contact avec une zone du cortex où une fibre de rétraction (vert) est ancrée.

En intégrant les moments exercés par tous les microtubules, on peut calculer le moment résultant pour une orientation donnée (voir le manuscrit décrivant le modèle). On obtient une fonction, $\tau_{\text{motors}}(\phi)$, qui décrit le moment créé par les moteurs sur le fuseau en fonction de l'orientation du fuseau par rapport au cortex. En supposant que cette fonction dérive d'une énergie potentielle, $\omega(\phi)$, on calcule la valeur du profil énergétique en intégrant $\tau_{\text{motors}}(\phi)$ en fonction de l'angle ϕ . Les minima de cette fonction indiquent les positions

d'équilibre pour lesquelles le moment subit par le fuseau est nul. La fonction $\omega(\phi)$ indique également le profil énergétique autour des positions d'équilibre, ce qui nous permettra de calculer la variabilité autour de ces positions. Dans l'exemple ci-dessous, les zones corticales où des moteurs sont capables d'exercer une tension sur les microtubules sont en rouge, ce sont les zones correspondant à l'arrimage des fibres sur le cortex. Les deux schémas correspondent à deux exemples d'orientations possibles du fuseau. Le moment total correspondant à l'orientation de la situation de gauche est non nul, le fuseau va tourner. Le moment total correspondant à l'orientation de la situation de droite est nul et la position est stable.

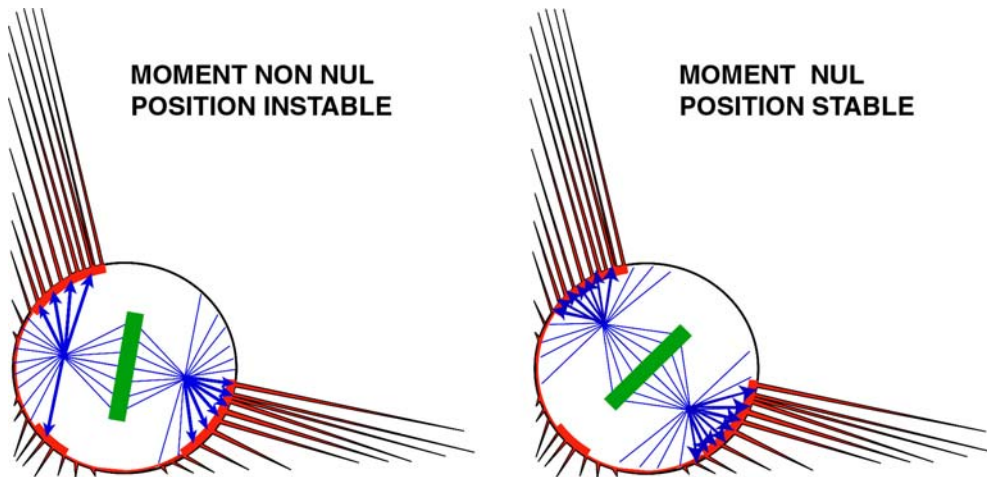


Figure 3.39

A partir de ce modèle de travail nous avons essayé d'ajouter le moins de paramètres possibles.

Pour l'instant le modèle est à deux dimensions et ne prend pas en compte l'organisation des fibres selon l'axe z par exemple. Or, nous avons observé que les fibres ancrées dans le substrat loin de la cellule étaient accrochées plus haut sur le cortex comme le montre les schémas de la figure 3.40.

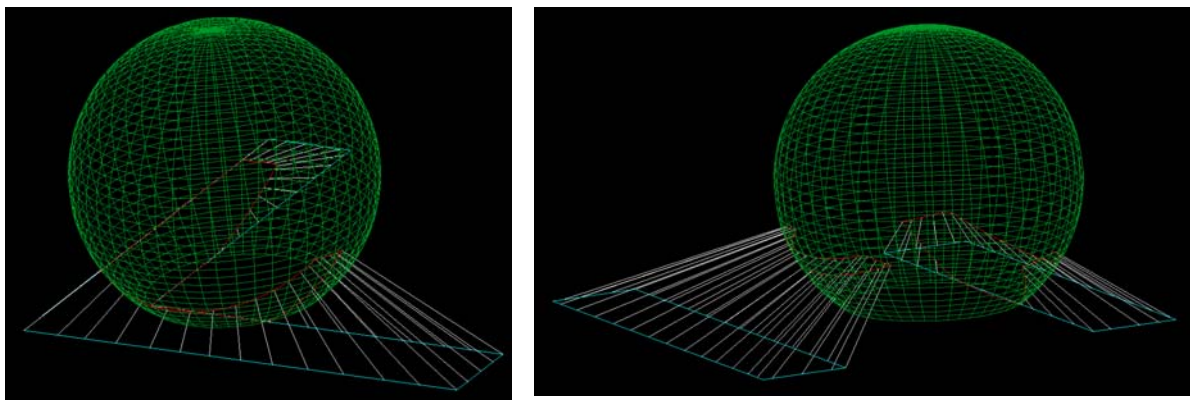


Figure 3.40 Représentation 3D des fibres de rétraction d'une cellule mitotique sur un [L] et sur des [barre parallèles].

De plus, les fibres ne sont pas toujours orientées vers le centre de la cellule et normales aux cortex. Cela signifie qu'elles ne sont pas réellement libres de se déplacer dans le cortex (Figure 3.41). Parfois, le cortex semble s'être arrondi de façon non isotrope : les zones non adhérentes (bleu sur le schéma) se seraient plus contractées que les zones adhérentes (rouge sur le schéma)

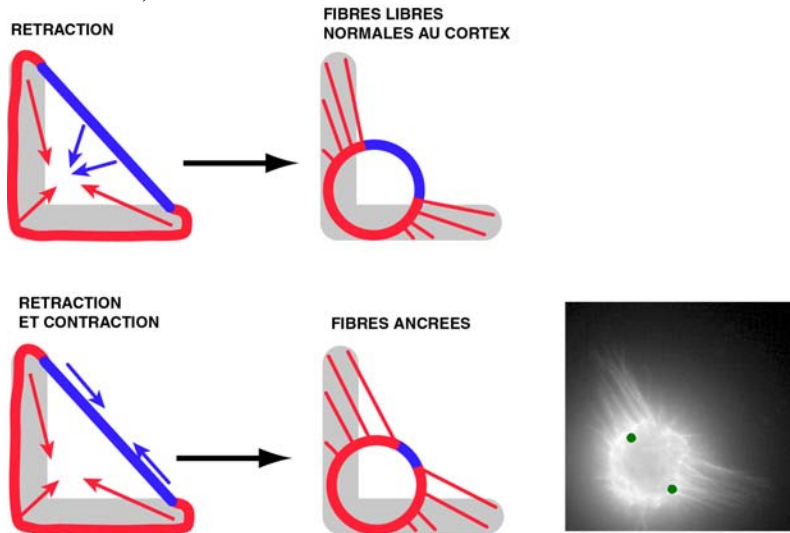


Figure 3.41
Distribution hypothétique et distribution réelle de fibres de rétraction

En première approximation nous considèrerons tout de même que les fibres sont normales au cortex. Donc pour un patron adhésif donné et une position de cellule mitotique donnée (calculée comme étant la moyenne des positions mesurées expérimentalement) on peut déduire la distribution corticale des fibres en supposant que les fibres sont ancrées à la périphérie du patron adhésif et qu'elles sont normales au corps circulaire de la cellule.

Le calcul du couple total va dépendre de deux facteurs

- la **distribution spatiale des fibres** sur le cortex et qui indique les zones exerçant une tension sur les microtubules.
- la **distribution spatiale des microtubules astraux** et de leur contacts avec le cortex.

Nous avons testé plusieurs hypothèses pour la formulation de ces facteurs qui sont les modèles I à III dans le manuscrit inséré après ce chapitre. Pour chaque modèle, nous avons calculé le profil énergétique et comparé les positions d'équilibres stables avec celles mesurées sur quelques micro-patrons : [rectangles], [triangle], [L], [barre-point], [cadre], [croix], [L-point] et [barres parallèles].

Modèle I

distribution spatiale des fibres

La distribution est binaire. La densité des fibres ne compte pas.

distribution spatiale des microtubules astraux

La distribution des interactions des bouts + des microtubules avec le cortex est uniforme.

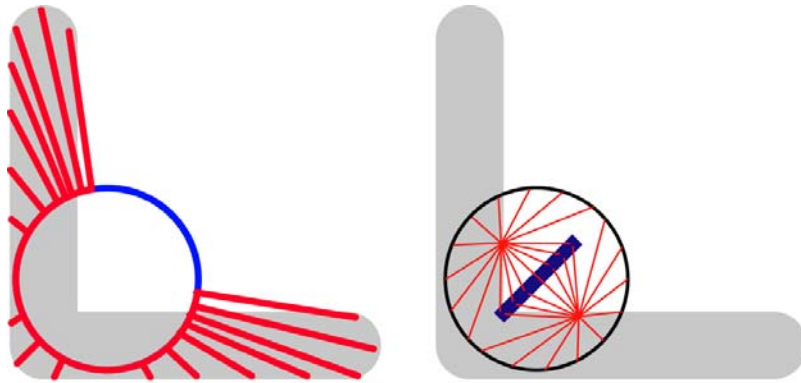


Figure 3.42

Modèle I

modèle 1, cortex binaire, densité linéique uniforme de microtubules

Ce modèle simple prédit correctement les orientations les plus probables pour la plupart des micro-patterns sauf pour la [croix] et le [cadre]. Le modèle prédit des orientations stables le long des côtés de ces patrons alors que les mesures montrent que les orientations les plus probables sont le long des diagonales.

En effet, pour les microtubules qui sont perpendiculaires à l'axe pôle-pôle du fuseau l'intégralité de la tension à laquelle ils sont soumis participe au moment qui fait tourner le fuseau alors que pour les microtubules qui sont parallèles à l'axe pôle-pôle la contribution au moment est nulle. Donc le moment total est gouverné par les microtubules perpendiculaires à l'axe pôle-pôle.

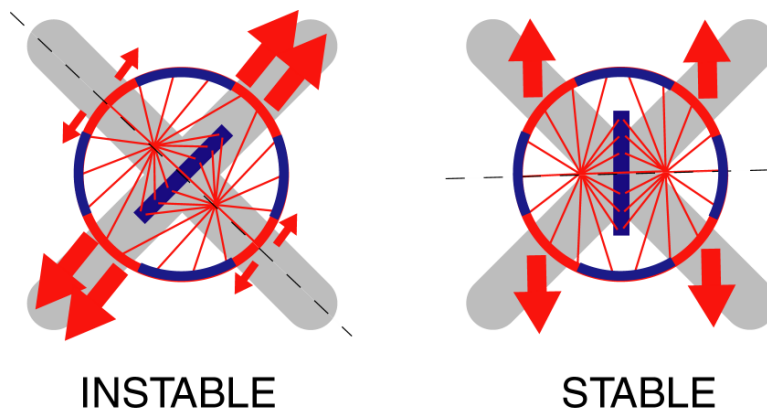


Figure 3.43
Stabilité des orientations des divisions sur des [croix] selon le modèle I

Ceci explique pourquoi les orientations du fuseau le long des diagonales sont instables selon ce modèle (schéma de gauche). Dans cette situation, les zones qui exercent un moment élevé sur le fuseau tirent sur les deux pôles en même temps. Le moindre mouvement du fuseau fait basculer toute la tension exercée par ces zones sur un seul pôle et fait tourner le fuseau. L'équilibre ne peut être stable que lorsque les zones qui exercent un moment élevé sur le fuseau tirent sur un seul pôle à la fois (schéma de droite). Dans ce cas, une petite variation d'angle ne change pas l'équilibre des moments.

L'observation de fuseaux mitotiques montre que les microtubules ne sont pas distribués de façon à ce que leur densité linéique sur le cortex soit uniforme. Au contraire, on observe un plus grand nombre de microtubules en contact avec le cortex près des pôles que près de l'équateur. Nous avons donc testé un deuxième modèle.

Modèle II

distribution spatiale des fibres

La distribution est binaire. La densité des fibres ne compte pas.

distribution spatiale des microtubules astraux

La densité angulaire des microtubules astraux est uniforme.

Avec une distribution angulaire de microtubules uniforme, la densité de microtubules en contact avec un élément de surface décroît en raison inverse de la distance au pôle (voir manuscrit). Par conséquent, la densité de bout + de microtubules au cortex sera plus élevée près des pôles que près de l'équateur.

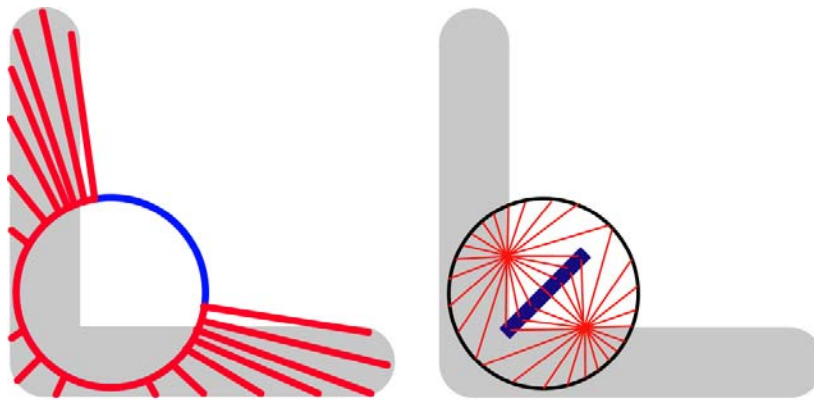


Figure 3.44

Modèle II

modèle 2, cortex binaire, densité angulaire uniforme de microtubules

Effectivement, avec ce modèle, toutes les orientations stables calculées correspondent aux orientations mesurées (voir l'article). Cette fois l'orientation le long des côtés sur la [croix] ou le [cadre] n'est plus un équilibre stable. En effet, la moindre perturbation rapproche les pôles des zones où s'exerce la tension donc un nombre plus important de microtubules est mis sous tension dans cette zone ce qui fait tourner le fuseau. L'orientation selon les diagonales devient un équilibre stable.

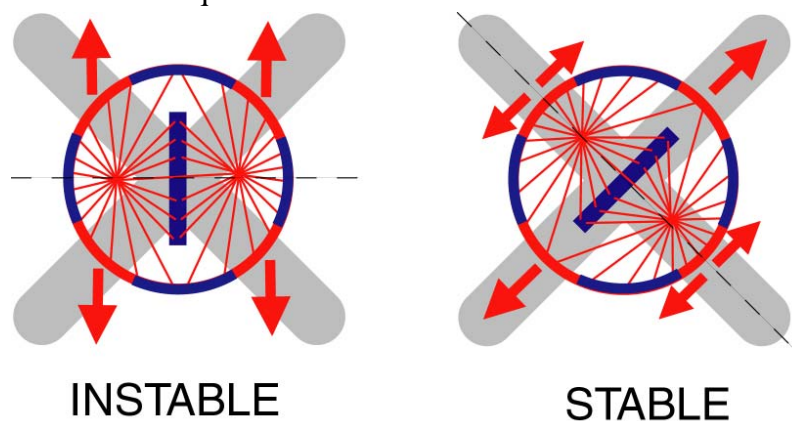


Figure 3.45

Stabilité des orientations des divisions sur des [croix] selon le modèle II.

La simplification qui consiste à considérer le cortex comme binaire masque toutefois quelques nuances qui pourraient bien être critique dans certains cas. Nous avons donc décidé de modifier le modèle I en un troisième modèle dans lequel la densité de fibres sur le cortex serait calculée avec précision au lieu d'être binaire.

Modèle III

distribution spatiale des fibres

La densité linéique d'ancrage des fibres sur la périphérie du patron adhésif est uniforme. Cela induit une distribution hétérogène de fibres sur le cortex.

distribution spatiale des microtubules astraux

La densité linéique des bouts + des microtubules sur le cortex est uniforme.

Dans ce modèle les sommets des patrons adhésifs (éloignés du cortex de la cellule mitotique) créent des augmentations de la densité d'arrimage des fibres dans les zones correspondantes du cortex.

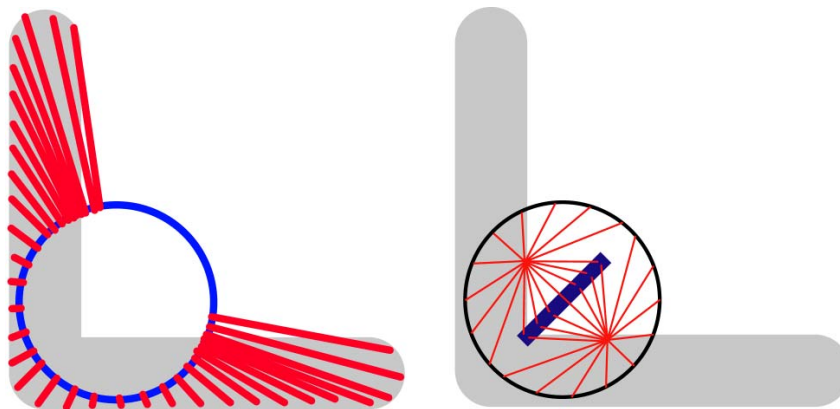


Figure 3.46

Modèle III

modèle 3, densité linéique de fibre uniforme sur le patron,
densité linéique de microtubules uniforme sur le cortex

Toutefois cette nuance n'apporte pas de précision supplémentaire par rapport au modèle I. Ce type de répartition des microtubules est toujours perturbant et les orientations sur les [croix] et les [cadres] sont comme dans le modèle I.

Un **modèle IV** qui associerait la distribution des microtubules du modèle II (distribution angulaire uniforme, densité corticale variable) et la distribution des fibres du modèle III (distribution linéique sur le patron uniforme, densité corticale variable) est en cours de test. Cependant, ce modèle IV ne devrait pas donner des résultats très différents du modèle II dans les cas étudiés ici ([rectangles], [triangle], [L], [barre-point], [cadre], [croix], [L-point] et [barres parallèles]). Il devrait par contre se révéler indispensable pour expliquer d'autres orientations sur des patrons plus « subtiles » présentés un peu plus loin dans ce manuscrit.

Calcul de la distribution angulaire des fuseaux à partir du profil énergétique

Le profil énergétique $\omega(\phi)$ permet de déduire la probabilité du fuseau d'avoir l'orientation ϕ en utilisant une loi de Boltzman $N e^{-\omega(\phi)/D}$. N est un facteur de normalisation (qui assure que la somme des probabilités vaut 1) et D représente ici l'équivalent de l'agitation thermique. De façon inattendue, rien qu'en ajustant le paramètre D , on peut reproduire la distribution expérimentale avec un très bonne fiabilité (voir l'article). Le fait qu'une loi de Boltzman, c'est à dire un simple bruit thermique, appliquée au profil énergétique, permette de reproduire si bien les distributions mesurées expérimentalement, confirme que les profils énergétiques calculés sont très proches de la réalité.

Nous sommes encore en train de travailler sur le paramètre D . Pour l'instant il est élevé sur des patrons carrés et plus faible sur les [L] ou les [rectangles] pour lesquels la distribution de fibre est plus regroupée (voir l'article). Le paramètre D est utilisé pour normaliser le profil $\omega(\phi)$, mais physiquement il ne correspond pas à un paramètre de normalisation mais à une caractéristique de la variabilité cellulaire. Il serait donc préférable que le profil $\omega(\phi)$ soit normalisé par un autre moyen. Alors, la valeur du paramètre D serait une sorte de mesure de la variabilité autour de l'équilibre dans notre modèle. Deux approches sont possibles : soit on considère que pour tous les patrons le travail total fourni par les moteurs est identique et que donc localement le travail fourni est plus ou moins élevé, soit on considère que le travail fourni dans chaque secteur est identique et que donc le travail total dépend du patron (Figure 3.47).

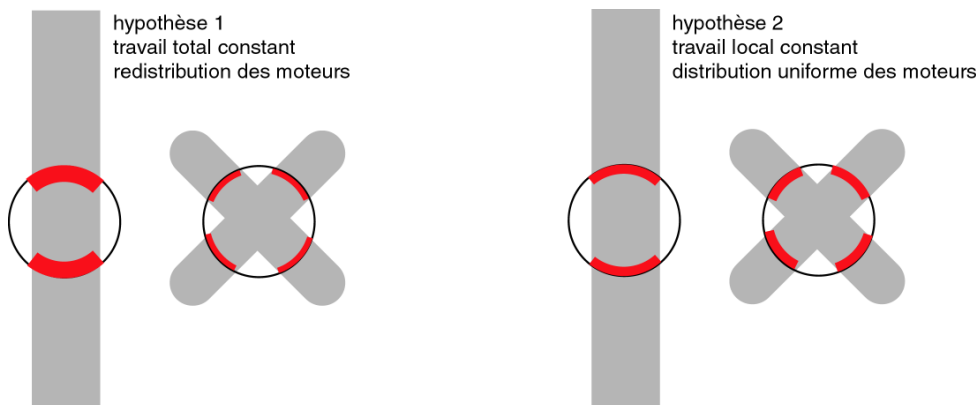


Figure 3.47 Deux hypothèses de la distribution spatiale de l'activité des moteurs.

Les deux hypothèses peuvent être prises en compte par des normalisations différentes de $\omega(\phi)$. Pour la première, il faut que l'intégrale de $\omega(\phi)$ sur ϕ soit identique pour tous les patrons, pour la deuxième il faut que la valeur maximale de $\omega(\phi)$ soit identique pour tous les patrons. Dans chaque cas de figure il faudra ensuite calculer les valeurs de D pour que la distribution des probabilités angulaires corresponde aux mesures. La normalisation pour laquelle les valeurs de D seront les plus proches les unes des autres sera certainement celle qui sera la plus proche de la réalité.

Ce test sur la représentation par notre modèle de la variabilité des mesures va donc nous permettre de distinguer deux modèles possibles de distributions de l'activité des moteurs.

Mitotic spindle orientation in adhering cells

(Dated: July 13, 2005)

PACS numbers:

I. MODEL I

We provide a simple geometric model for the orientation of the mitotic spindle in adhering cells. When cell division starts, cells maintain a spherical shape, although certain membrane prolongations are observed in the cell periphery. These external prolongations remain attached to several sites on the pattern substrate where the cell was previously spread.

We assume that the external membrane tubes are radial to the cell, and their presence activate minus directed molecular motors inside the cell. They are represented by an external force distribution:

$$\mathbf{F}(\psi, \phi) = F(\psi)(\cos(\psi), \sin(\psi), 0). \quad (1)$$

The coordinate system is shown in Fig. (1), where the positive z direction is considered coming out of the paper. The motors, once activated, apply traction forces on microtubules next to the cell membrane. If these microtubules are also connected to the spindle poles, a total torque is applied to the mitotic spindle structure, determining its final orientation.

If we define $\mathbf{f}(\psi, \phi)$ as the distribution of forces made by the motors, the total generated torque τ_{motors} , can be calculated as follows:

$$\tau_{motors}(\phi) = \int d\psi \mathbf{R}(\psi) \times \mathbf{f}(\psi, \phi). \quad (2)$$

Then using the expression

$$\mathbf{R}(\psi) = R(\cos \psi, \sin \psi, 0), \quad (3)$$

and

$$\mathbf{f}(\psi, \phi) = \tilde{f}(\psi)(\cos \gamma, \sin \gamma, 0), \quad (4)$$

where $\psi = \theta + \phi - \pi/2$ and $\gamma = \alpha + \phi - \pi/2$, we obtain

$$\begin{aligned} \tau_{motors}(\phi) &= R \int d\psi \tilde{f}(\psi) \sin(\gamma - \psi) \\ &= R \int d\theta \tilde{f}(\theta + \phi - \pi/2) \sin(\alpha(\theta) - \theta). \end{aligned} \quad (5)$$

Model I, is defined with the force amplitude $\tilde{f}(\psi)$ equal to the distribution of external membrane tube forces $\tilde{f}(\psi) = F(\psi)$.

The work potential w describes the state of the spindle as a function of the orientation angle ϕ . In order to write the relationship between w and the torque produced by the motors, τ_{motors} , we consider an external torque τ_{ext} . If there is a friction force on the system the force balance equation can be written as follows:

$$\xi \dot{\phi} = \tau_{ext} + \tau_{motors}. \quad (6)$$

In a stationary situation, $\dot{\phi} = 0$, the external torque balances the torque made by motors, $\tau_{ext} = -\tau_{motors}$. Note that if τ_{motors} is positive, the angle ϕ increases. Therefore, equation

$$\tau_{motors}(\phi) = -\frac{\partial w}{\partial \phi}. \quad (7)$$

guarantees a stable minimum energy. Using the above relationship, the potential energy w can be determined by means of a numerical integration on the torque τ_{motors} .

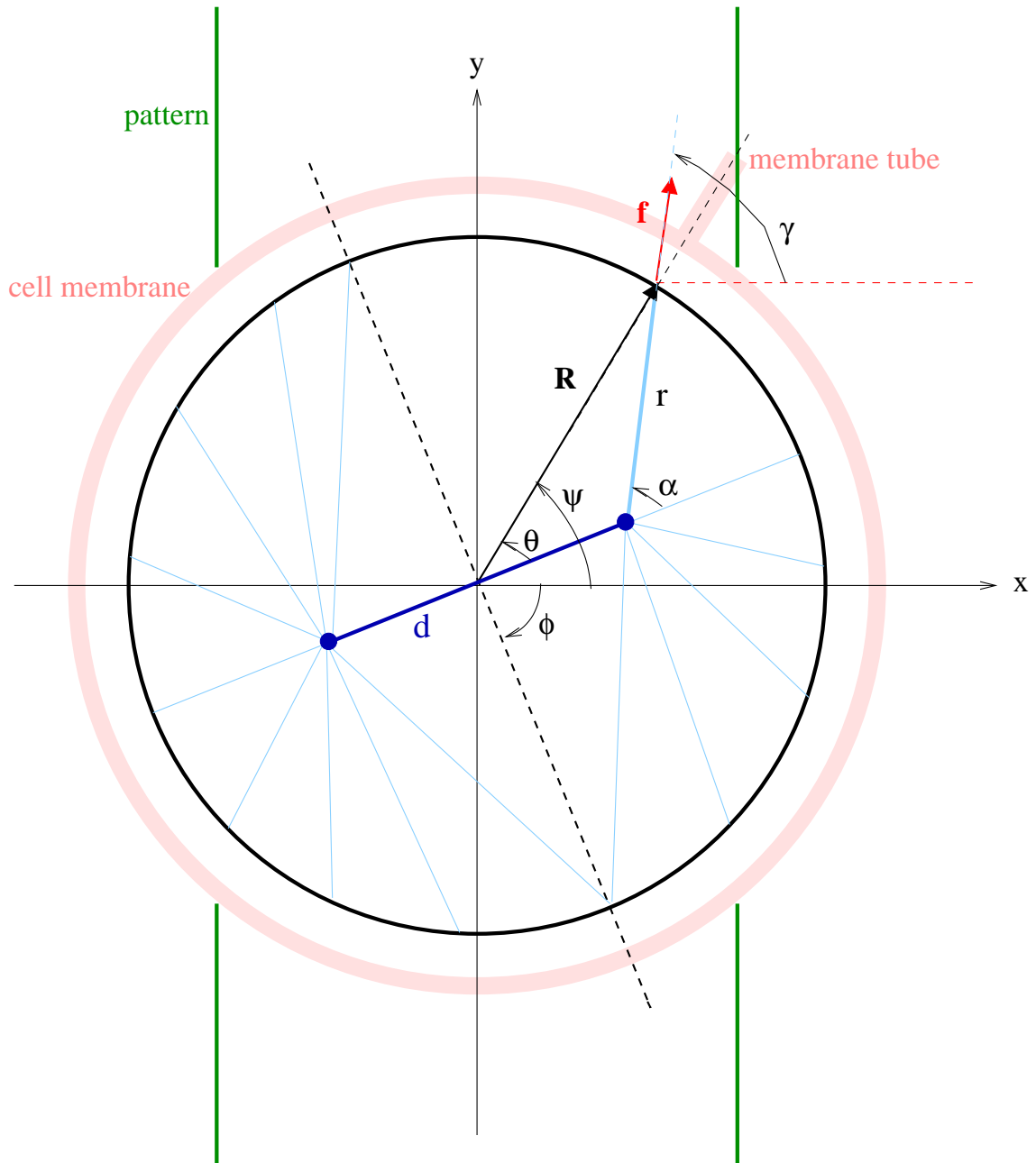


FIG. 1: Diagram of the mitotic spindle for models I.

II. MODEL II

In Model II we take into consideration the non-uniform distribution of microtubules on the cell membrane. In order to do that, we calculate the density of microtubules on the cell membrane, $h(\theta)$, and use it as a weight factor for each angle θ in the integration in Eq. (15). The torque is written now as follows:

$$\tau_{motors}(\phi) = R \int d\theta \tilde{f}(\theta + \phi - \pi/2) \sin(\alpha(\theta) - \theta) h(\theta), \quad (8)$$

where $h(\theta)$ is given by the following expression (see Fig (2)),

$$h(\theta) = \frac{R - d}{R} \frac{\partial \alpha}{\partial \theta}. \quad (9)$$

The microtubule density on the circle around the spindle pole C2, is a constant ρ . The derivative of α is given by:

$$\frac{\partial \alpha}{\partial \theta} = -\frac{\partial}{\partial \theta} \left[\arcsin \left(\frac{R \sin \theta}{r(\theta)} \right) \right], \text{ if } -\frac{\pi}{2} \leq \theta < -\arccos(d/R), \quad (10)$$

$$\frac{\partial \alpha}{\partial \theta} = \frac{\partial}{\partial \theta} \left[\arcsin \left(\frac{R \sin \theta}{r(\theta)} \right) \right], \text{ if } -\arccos(d/R) \leq \theta \leq \arccos(d/R), \quad (11)$$

$$\frac{\partial \alpha}{\partial \theta} = -\frac{\partial}{\partial \theta} \left[\arcsin \left(\frac{R \sin \theta}{r(\theta)} \right) \right], \text{ if } \arccos(d/R) < \theta \leq \frac{\pi}{2}, \quad (12)$$

with

$$\frac{\partial}{\partial \theta} \left[\arcsin \left(\frac{R \sin \theta}{r(\theta)} \right) \right] = \frac{R}{\left[1 - \left(\frac{R \sin \theta}{r(\theta)} \right)^2 \right]^{1/2}} \left(\frac{\cos \theta}{r(\theta)} - \frac{\sin \theta}{r(\theta)^2} \frac{dr(\theta)}{d\theta} \right), \quad (13)$$

where,

$$\frac{dr(\theta)}{d\theta} = -\frac{dR}{r(\theta)} \frac{d}{d\theta} |\cos \theta| \quad (14)$$

III. MODEL III

We modify model I assuming that the retractile membrane tubes are distributed uniformly with respect to the pattern contour. We define the density of external tubes membranes on the cell periphery as $g(\psi)$. We then add $g(\phi)$ as a weight factor in the torque expression, as follows

$$\begin{aligned} \tau_{motors}(\phi) &= R \int d\psi \tilde{f}(\psi) \sin(\gamma - \psi) g(\psi) \\ &= R \int d\theta \tilde{f}(\theta + \phi - \pi/2) \sin(\alpha(\theta) - \theta) g(\theta + \phi - \pi/2). \end{aligned} \quad (15)$$

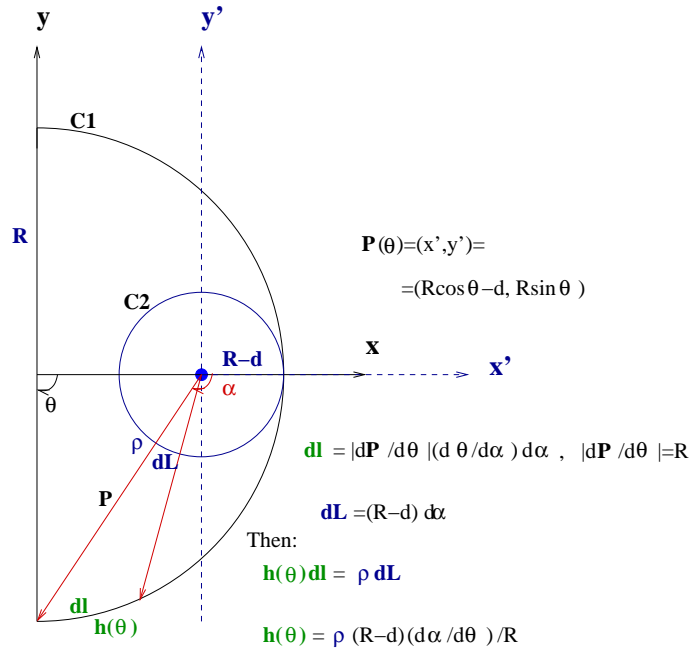


FIG. 2: Calculation of density of MTs on the cell membrane (circle C1). We have drawn an imaginary circle C2 around the spindle pole.

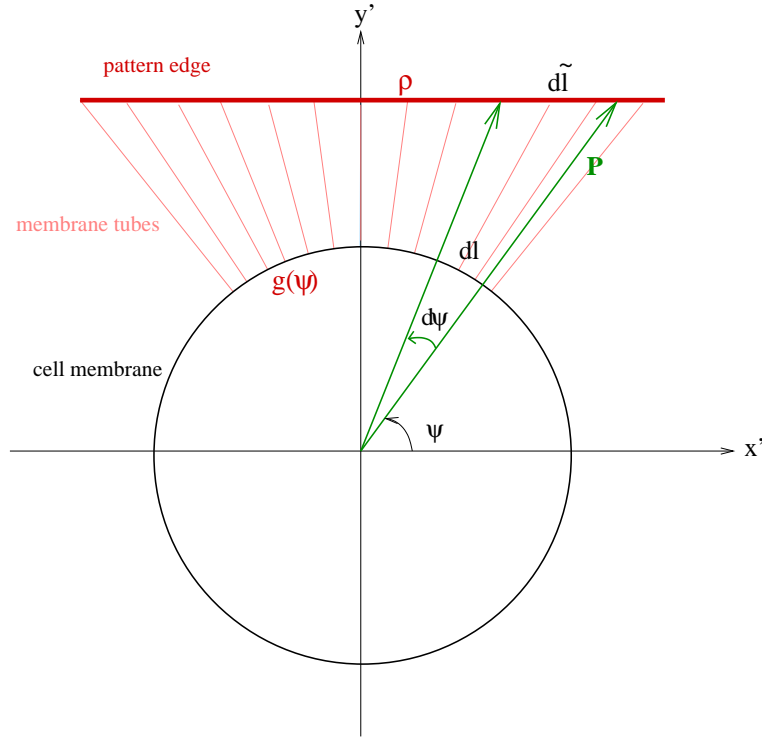


FIG. 3: Calculation of the density $g(\psi)$ of membrane tubes on the cell membrane.

In order to calculate $g(\psi)$, let us assume that dl is a differential arc of the cell membrane, which correspond to a differential length on the pattern, $d\tilde{l}$. The number of membrane tubes in dl should be equal to the number of membranes tubes passing through $d\tilde{l}$. Therefore, if ρ is the constant density of membrane tubes on the pattern, then

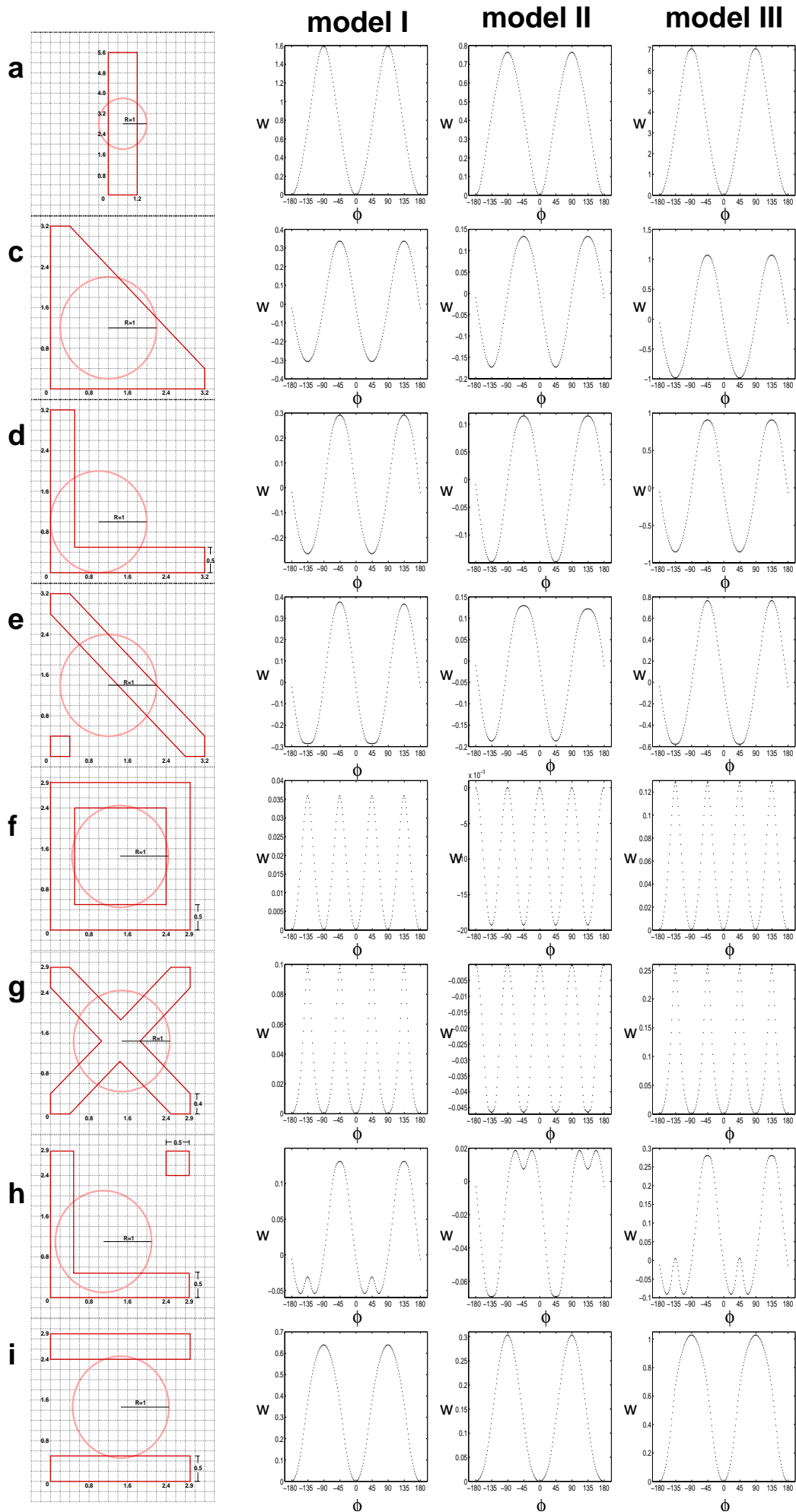
$$g(\psi)dl = \rho d\tilde{l} \quad (16)$$

$$g(\psi)Rd\psi = \rho \left| \frac{\partial \mathbf{P}}{\partial \psi} \right| d\psi \quad (17)$$

If x' and y' are the coordinates of \mathbf{P} measure in the coordinate system with origin in the center of the cell, we obtain that

$$g(\psi) = \frac{\rho}{R} \left[\left(\frac{\partial x'}{\partial \psi} \right)^2 + \left(\frac{\partial y'}{\partial \psi} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (18)$$

In Fig. (4) we compare the results for the work potential w , obtained with the three models. Model II describes well all the experiments. In the case of models I and III, experiments f, g and h are not well described. The results of these two models also do not differ significantly in each experiment, and we conclude that the distribution of membrane fibers on the pattern does not play a crucial role in a definition of an appropriate model. Therefore, Model II is the simplest model to consider. In Fig. (5) we show the experimental data and its fitting to the theory.

FIG. 4: Work potential w for models I, II, and III.

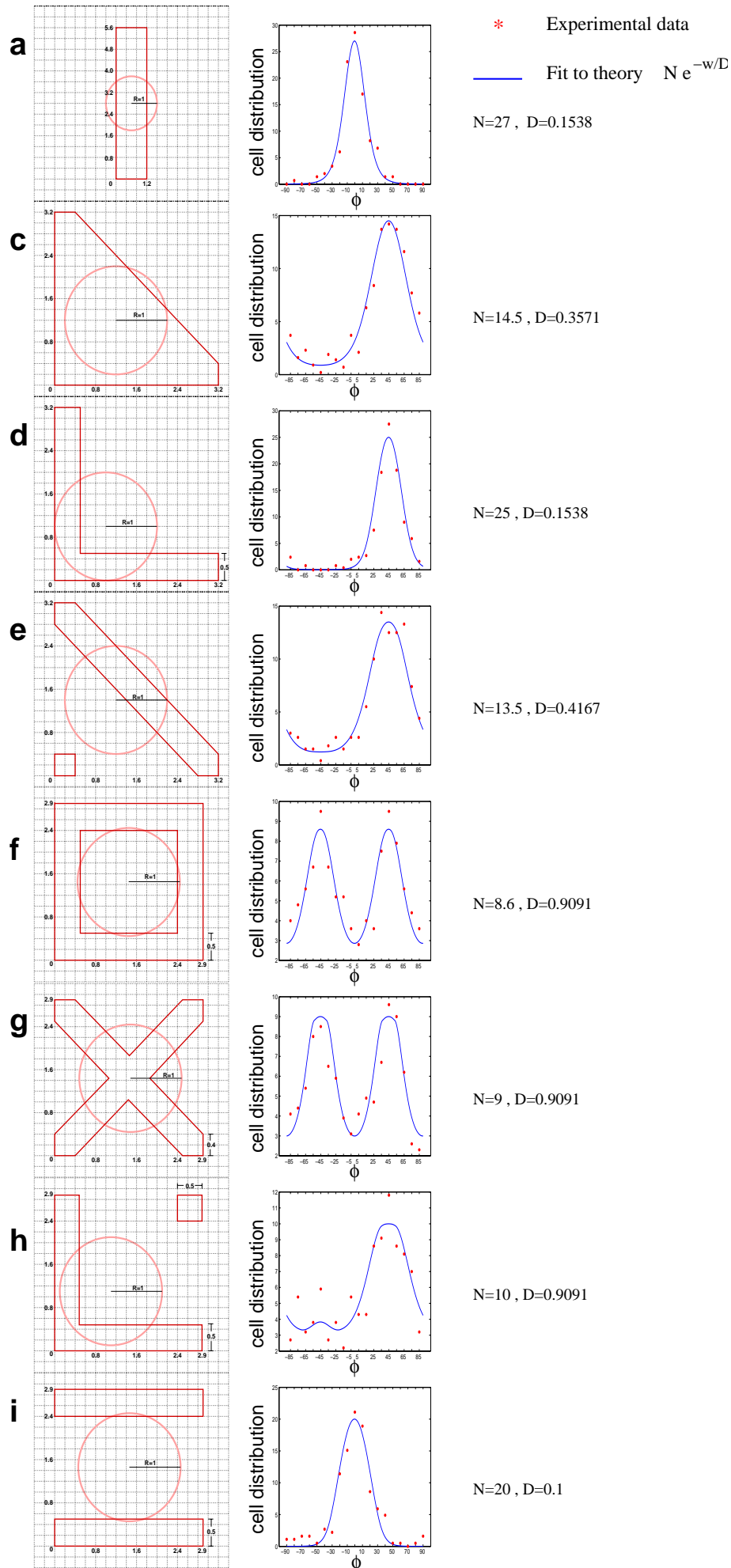


FIG. 5: Fitting to the theory of the experimental data of the cell distribution for each pattern, in function of the spindle orientation ϕ .

IV-3 Effet de la densité corticale des fibres de rétraction et divisions asymétriques

Plusieurs observations, au cours des expériences précédentes, et certaines limites de la forme actuelle de notre modèle théorique nous ont poussés à faire quelques expériences supplémentaires.

Tout d'abord, il semble, d'après les mesures présentées dans l'article intitulé « *The extracellular matrix guides the orientation of the division axis* », que la forme de la cellule et la distribution des fibres de rétraction contribuent tous deux à l'orientation du fuseau. Or notre modèle ne se base que sur le rôle de la distribution spatiale des fibres de rétraction. Il est donc indispensable de faire une démonstration directe du rôle de cette distribution, totalement indépendamment de celui de la forme de la cellule.

Afin de s'affranchir complètement du rôle de la forme de la cellule nous avons conçu des patrons ayant une enveloppe circulaire mais des contours adhésifs hétérogènes. Dans ces cas de figure, seuls les fibres de rétractions pourraient influencer l'orientation du fuseau.

Démonstration du rôle des fibres de rétraction sur l'orientation du fuseau

En imposant aux cellules de s'étaler sur un disque dont un secteur d'environ 30° a été évidé, les cellules adoptent une forme globalement ronde mais n'adhèrent pas sur une petite partie de leur périphérie. En conséquence, elles ne forment pas de fibres de rétraction dans cette zone. Le cortex mitotique est donc globalement homogène excepté qu'une petite zone ne contient pas de fibres. En mesurant automatiquement l'orientation de 436 divisions il apparaît très clairement que l'axe du fuseau (pôle-pôle) évite de passer par le secteur sans fibre. La figure ci-dessous montre la distribution angulaire des divisions (à gauche) et le patron adhésif et la référence pour la mesure d'angle (à droite). Elle montre également une représentation schématique des fibres de rétraction formées en mitose combinée avec un histogramme circulaire de la distribution angulaire des orientations des divisions : on met ainsi en évidence la correspondance entre l'absence d'orientation et l'absence de fibre.

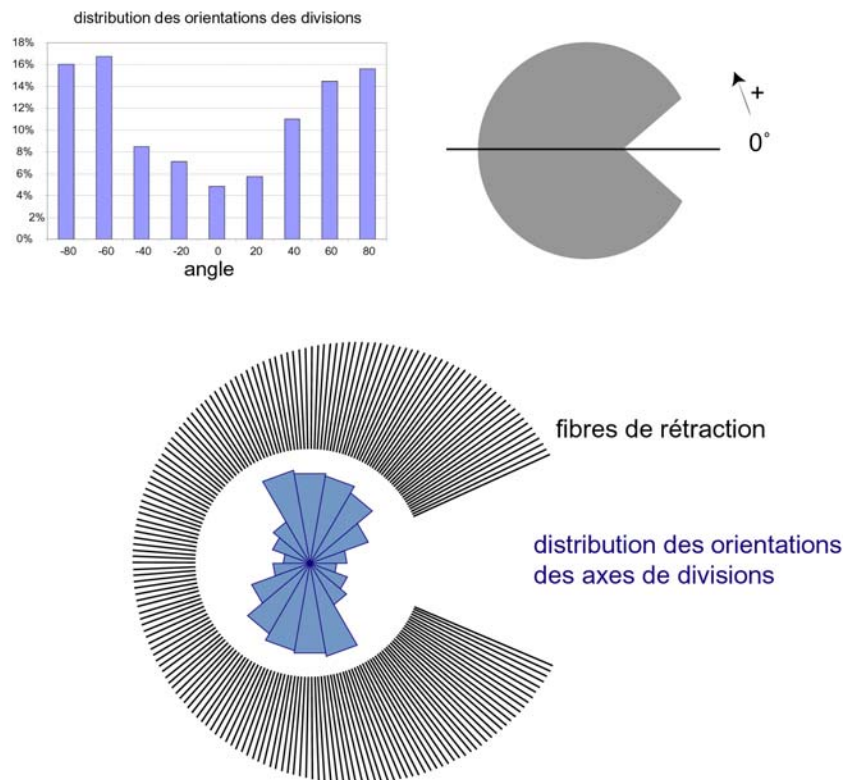


Figure 3.48 Orientation des fuseaux mitotiques et distribution des fibres de rétraction sur un [pac-man]. n=436.

Ces résultats confirment que les pôles du fuseau se positionnent préférentiellement face aux zones corticales dans lesquelles des fibres de rétraction sont arrimées car dans ce cas particulier la forme de la cellule n'a pas pu guider le fuseau.

A travers la littérature sur les divisions asymétriques, il apparaît que la géométrie du cortex cellulaire en mitose est assez typique. Nous nous sommes demandés si notre approche pouvait permettre de reproduire ces situations. Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le neuroblaste de *Drosophila melanogaster* ou l'œuf de *Caenorhabditis elegans*, le fuseau (bipolaire) n'est pas dans un cortex bipolaire mais dans un cortex mono-polaire. Dans toutes ces situations, il existe une zone du cortex qui tire plus fort que les autres sur les pôles du fuseau. Les deux pôles du fuseau ne pouvant interagir de façon stable qu'avec une seule zone corticale, le fuseau tourne et un seul pôle se retrouve face à la zone la plus attractive.

Nous nous sommes demandés si la création d'une unique zone d'accumulation de fibres de rétraction pouvait induire une orientation asymétrique dans les cellules HeLa. Il n'est pas possible de créer une unique zone de formation de fibres de rétraction mais nous pouvons en faire une plus large ou plus concentrée que les autres.

Les cellules ont été contraintes de s'étaler sur une forme en étoile dont un secteur seulement est adhésif, ceci afin de créer une zone localement plus adhésive. La distribution angulaire des orientations de 559 cellules montre clairement un biais vers la plus grande zone adhésive. La figure ci-dessous a été préparée de la même façon que la précédente.

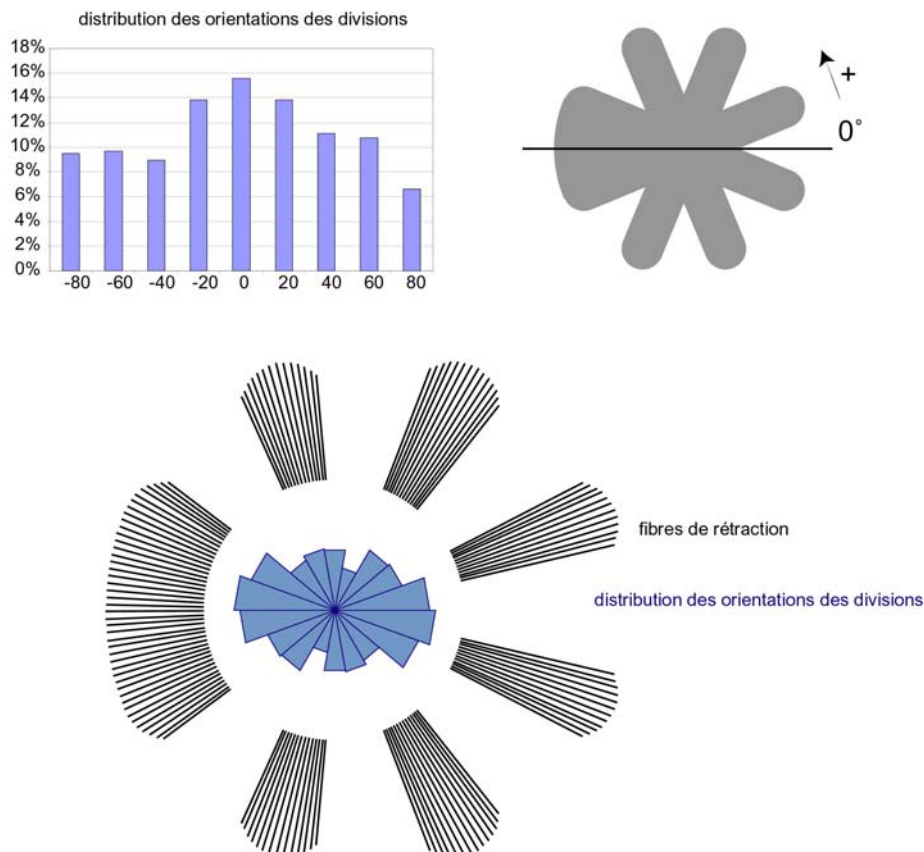


Figure 3.49 Orientation des fuseaux mitotiques et distribution des fibres de rétraction sur une [étoile asymétrique]. n=559.

Une accumulation locale de fibre permet donc d'attirer préférentiellement un des pôles du fuseau et de biaiser la distribution des orientations des divisions. Ce patron est complémentaire du précédent. Ensemble, ils montrent qu'une absence de fibre n'attire pas les pôles et qu'une accumulation de fibres les attire. Le rôle de la distribution spatiale des fibres de rétraction est donc maintenant entièrement démontré.

Division asymétrique

Nous avons ensuite cherché à aller plus loin dans le mimétisme de la division asymétrique, en pensant à l'embryon de *Caenorhabditis elegans*, dans lequel une moitié est plus contractée que l'autre (Munro et al., 2004). C'est en fait dans le but de reproduire cette asymétrie mécanique que nous avons conçu le patron en forme d'ancre (ou de parapluie ou de vaisseau spatial ou d'euro selon les appréciations de chacun) présenté dans l'article « *Adhesive control of cell polarity* ». La moitié de la cellule située sur des bords non adhésifs étant plus contractée que la moitié sur le bord adhésif et circulaire.

Avant d'entrer en mitose la cellule étalée sur l'[ancre] est polarisée (voir article sur la polarité). En effet, sur l'image ci-dessous qui montre le cytosquelette d'actine (à droite) d'une cellule étalée sur un patron adhésif en [ancre] (à gauche), on peut voir que la cellule fait des protrusions sur la partie de gauche qui est sur le bord adhésif et des contractions sur la partie de droite qui est sur les bords non-adhésifs. L'axe de symétrie est horizontal.

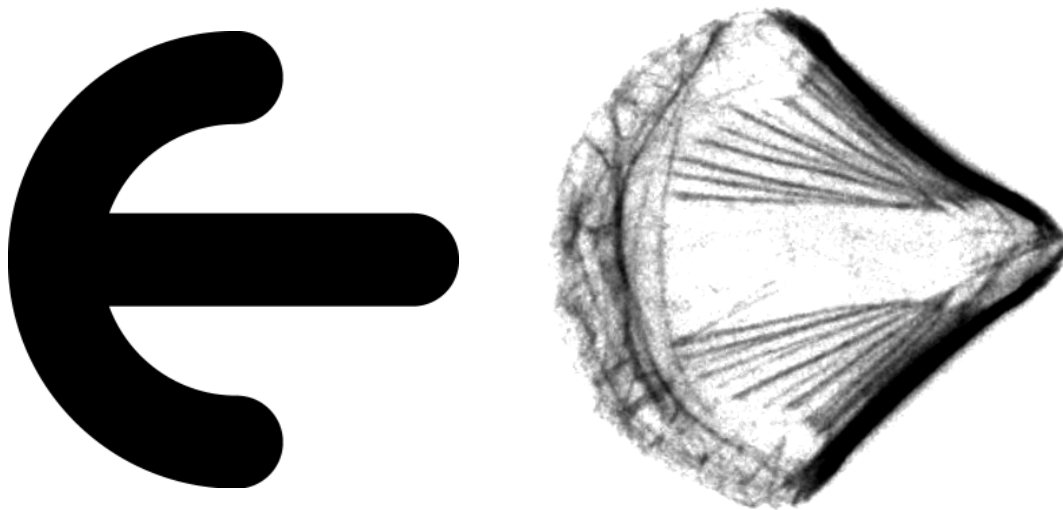


Figure 3.50 Cytosquelette d'actine d'une cellule RPE1 sur un micro-patron adhésifs en forme d'[ancre].

La hauteur et la largeur de la cellule sont identiques. La cellule n'est donc pas biaisée géométriquement.

En mesurant les orientations des divisions de 125 cellules on constate que les orientations sont effectivement biaisées (voir le film « *Division Micropattern Asymmetric* » et la légende en annexe 2).

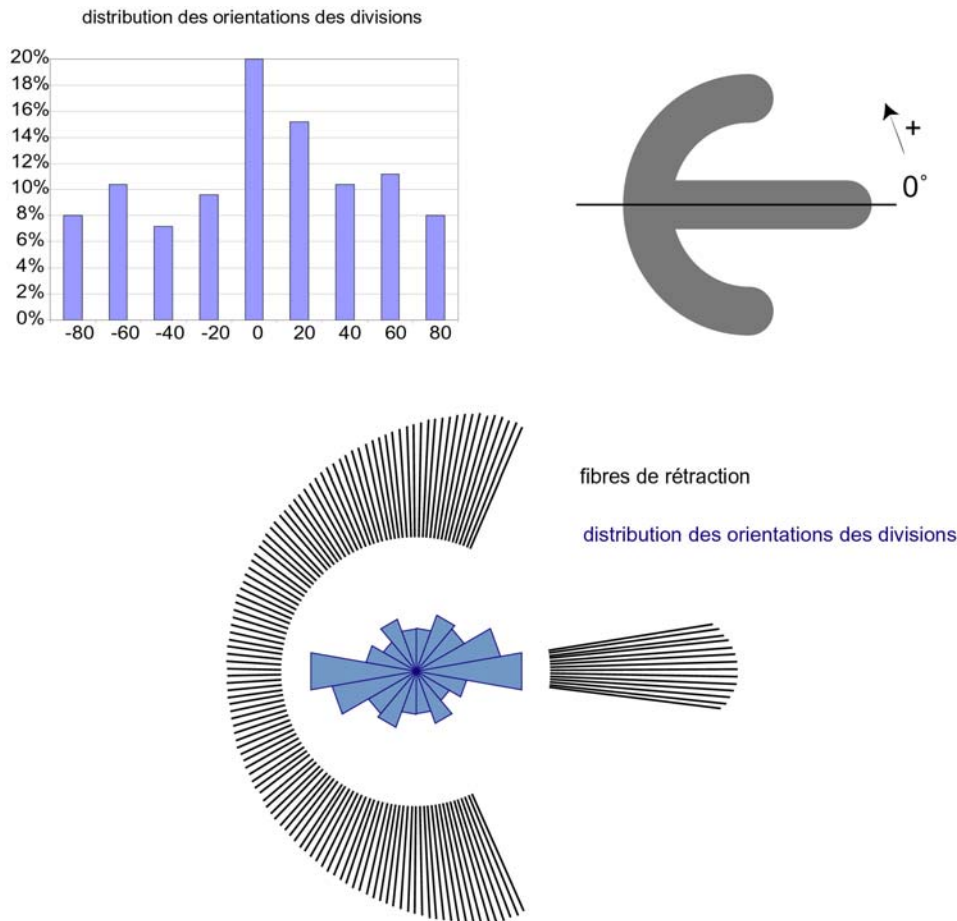


Figure 3.51 Orientation des fuseaux mitotiques et distribution des fibres de rétraction sur une [ancree]. n=125.

Ces dernières expériences, très récentes, n'ont pas encore livré toutes leurs informations. On peut tout de même constater que l'axe de division (pôle-pôle) n'est plus perpendiculaire à l'axe de symétrie comme il l'était jusqu'à présent sur les autres patrons. Il est dans le plan de symétrie, comme c'est le cas pour toutes les divisions asymétriques dans les systèmes expérimentaux habituels. Cela signifie que les deux pôles sont dans des environnements corticaux différents : l'un fait face à un petit paquet concentré de fibre et l'autre à un large éventail de fibres.

Pour l'instant, seule cette asymétrie géométrique a été observée et aucun marquage n'a été effectué qui aurait pu révéler la présence d'une protéine d'intérêt face à un seul des deux pôles du fuseau pendant la mitose. Toutefois, l'image ci-dessous (gauche) révèle une accumulation particulièrement importante de cortactine dans les fibres de rétraction issues du pôle de droite pendant l'arrondissement de la cellule. Ce pôle correspond à la zone où les protrusions étaient les plus nombreuses et la concentration en ezrine phosphorylée la plus grande. Pendant la mitose les centrosomes (en rouge dans l'image de droite) se positionnent préférentiellement vers la zone corticale où les fibres de rétraction (marquée en vert par la cortactine) s'accumulent.

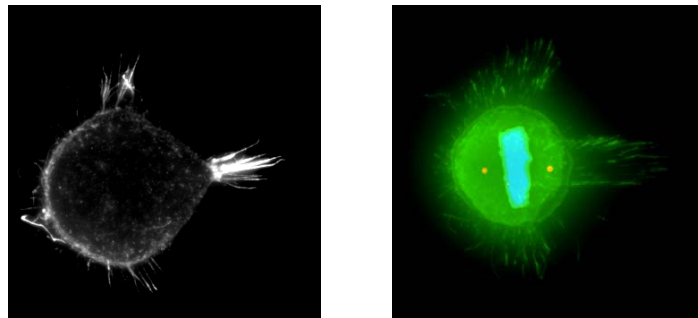


Figure 3.52 Marquage de la cortactine (à gauche, et en vert à droite) sur des cellules mitotiques sur des [ancres]. Les centrosomes sont en rouge et l'ADN en bleu.

Au cours de la cytokinèse, une des cellules filles s'étale rapidement sur la moitié adhésive alors que l'autre est contrainte de rester arrondie sur sa seule barre adhésive pendant un certain temps. Cependant, il y a de fortes chances pour que ces deux cellules occupent exactement le même volume. Il n'est pas possible à l'heure actuelle de pouvoir conclure sur une quelconque distribution asymétrique de protéines qui serait une conséquence de la division. Néanmoins, pendant la cytokinèse, la quantité d'ezrine phosphorylée est plus importante chez la cellule de droite, celle qui ne peut s'étaler. Il n'est pas possible de savoir si cette cellule a reçu une plus grande quantité d'ezrine au cours de la division ou si c'est une conséquence de son faible étalement qui la pousse à former de nombreuses protrusions à l'origine de l'activation de l'ezrine.

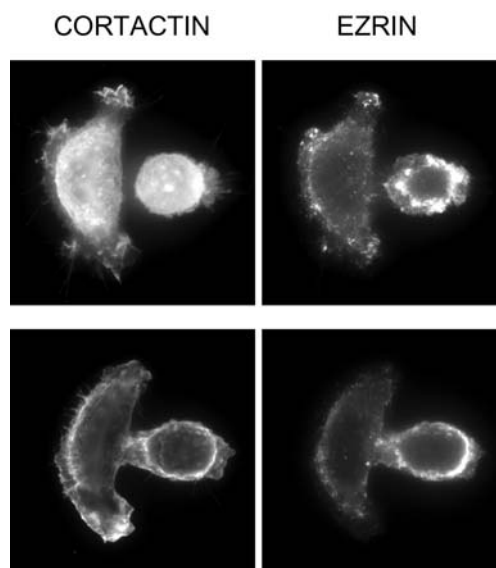


Figure 3.53

Marquage de la cortactin et de l'ezrine phosphorylée au cours de la cytokinèse.

Ces deux exemples de cellules attachées à une [ancres] montrent que l'ezrine est plus concentrée dans la cellule de droite, étalée sur la petite barre.

Nous n'avons pas eu le temps de regarder si le mouvement asymétrique du fuseau avant l'anaphase était biaisé vers l'un ou l'autre des pôles.

Ces divisions asymétriques, tout au moins orientées asymétriquement, sont assez surprenantes dans la mesure où les divisions sur [L-point] dans l'article sur les divisions ou sur une [flèche] (figure 3.54) ne sont pas asymétriques alors que le patron adhésif a les mêmes symétries et le même type de distribution de zones adhésives et non adhésives. Dans ce cas de figure, il y a deux populations dans la distribution dont les proportions ne sont pas équivalentes. La majorité des cellules orientent leur division perpendiculairement à l'axe de symétrie (45°). Une minorité de cellules orientent leur division parallèlement à l'axe de symétrie (-45°).

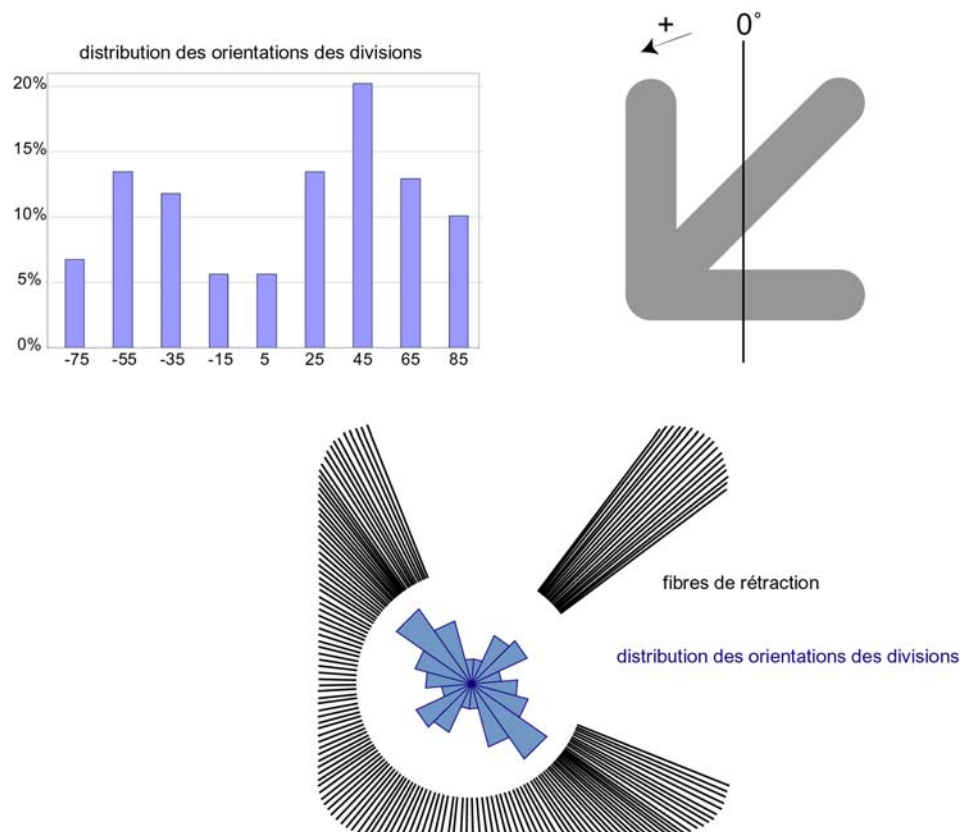


Figure 3.54 Orientation des fuseaux mitotiques et distribution des fibres de rétraction sur une [flèche]. n=178.

La différence entre les divisions sur [flèche] et sur [ancre] pourrait bien s'expliquer par les différences de distribution de fibres de rétraction. En effet, de la [flèche] à la l'[ancre], les accumulations de fibres aux extrémités du bord adhésif ont été très affaiblies car les sommets ne sont plus aussi distants du bord de la cellule adhésive. Cette réduction de l'accumulation de fibres pourrait bien expliquer la disparition de l'orientation préférentielle des fuseaux selon cet axe. Sur la [flèche], les fuseaux pouvaient avoir soit deux pôles symétriques, chacun face à une accumulation moyenne de fibres (orientation verticale sur la figure 3.55), soit deux pôles asymétriques, l'un étant face à une forte accumulation et l'autre face à un cortex pauvre en fibres (orientation horizontale sur la figure 3.55). En terme d'interaction microtubule-cortex (notre modèle théorique) il se pourrait qu'énergiquement la première solution soit favorable. Cette possibilité ayant disparu de la deuxième situation les fuseaux choisissent l'autre orientation.

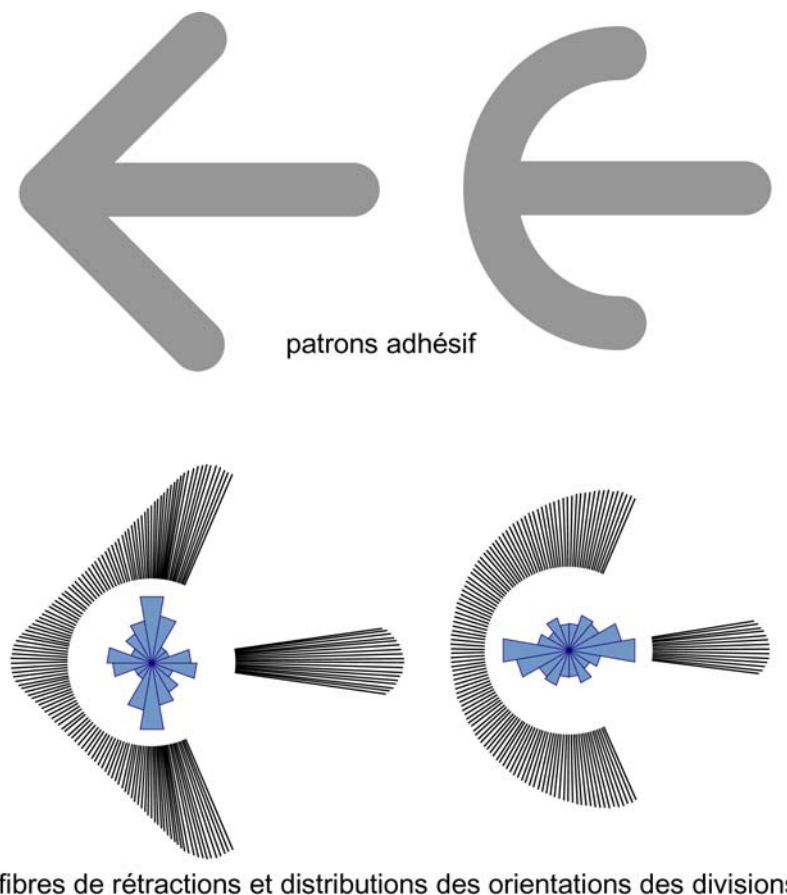


Figure 3.55 Comparaison des orientations des divisions sur la [flèche] et sur l'[ancre].

Nous sommes en train de faire les calculs pour savoir si effectivement un modèle de type IV, associant une distribution hétérogène de fibres de rétraction et de microtubules sur le cortex, pourrait rendre compte d'une telle différence d'énergie entre les deux orientations dans les deux conditions. Auquel cas, ce serait une confirmation de l'hypothèse de l'importance de la densité corticale de fibres de rétraction sur l'orientation du fuseau. Les deux patrons adhésifs sont si semblables qu'il est difficile de justifier une différence d'orientation si importante. La comparaison entre ces deux patrons adhésifs a donc l'avantage de mettre les cellules sur une bifurcation brutale de leur comportement. Si un modèle simple est capable de l'expliquer c'est qu'il a effectivement réussi à prendre en compte les paramètres critiques gouvernant la division de ces cellules.

Transformations continues

Cette recherche de la criticalité nous a conduit à essayer de mettre en évidence d'autres bifurcations. Nous avons donc dessiné des transformations géométriques progressives entre des patrons dont nous savions qu'ils allaient induire des orientations distinctes. Après avoir décrit une bifurcation basée sur des différences de densité locale de fibres, nous avons essayé d'induire une bifurcation basée sur les positions des zones de densité maximales. Pour cela, nous avons dessiné des patrons en [H] dans une enveloppe carrée de surface constante qui progressivement devenait de plus en plus allongée afin de mesurer la transition entre l'orientation verticale des fuseaux sur un [H] carré et horizontale sur un [H] aplati (Figure 3.56).



Figure 3.56 Allongement progressif d'un patron adhésif en forme de H pour détecter le basculement du fuseau d'une orientation verticale vers une orientation horizontale.

Nous avons donc mesuré l'orientation des divisions dans ces conditions. Il s'est avéré que la distribution mono-modale sur le patron en [H] carré s'est élargie sur un [H] plus allongé puis est devenue bi-modale sur un [H] encore plus allongé puis est redevenue mono-modale sur le [H] très allongé mais orienté à 90° de la première (Figure 3.57).

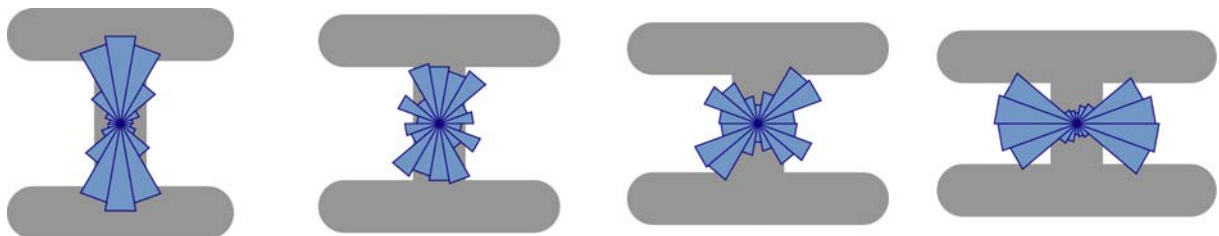


Figure 3.57 Orientations des divisions sur des H de plus en plus allongés (n=309, 257, 306 et 169).

Cette fois encore, il semble que ces résultats soient interprétables grâce à la distribution des fibres de rétraction. En effet, sur un [H] carré (à gauche sur la figure 3.58), les quatre coins induisent la formation de quatre accumulations de fibres. Sur un [H] carré, les deux zones d'accumulations sont suffisamment proches pour qu'un pôle du fuseau mitotique puisse interagir avec les deux en même temps. Sa position d'équilibre est donc entre ces deux zones. Au fur et à mesure que le [H] s'allonge, les deux zones s'écartent jusqu'à ce que cette position à mi-chemin entre les deux zones ne soit plus stable pour le fuseau. A ce moment, il devient moins coûteux en énergie pour le pôle de se tourner vers une des deux zones afin de mettre un maximum de microtubules astraux en contact avec elle. La distribution devient bi-modale. Puis, lorsque le [H] est encore plus allongé (à droite sur la figure 3.58), ce sont les zones séparées par un espace sans fibre qui deviennent suffisamment proches pour que l'interaction du fuseau avec les deux en même temps soit plus favorable que son interaction avec une seule.

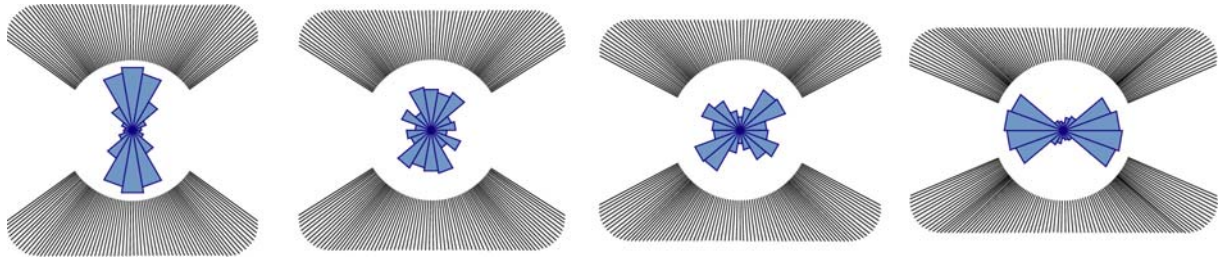


Figure 3.58 Représentation des distributions de fibres de rétractions et des orientations des fuseaux sur les patrons de la figure 3.57.

Si les bouts « + » des microtubules astraux du fuseau étaient répartis de façon homogène sur le cortex, seule l'orientation verticale serait stable quelle que soit la répartition (homogène ou non) des fibres sur le cortex. De même, si la distribution des fibres sur le cortex était homogène seule, l'orientation verticale serait stable quelque-soit la répartition (homogène ou non) des bouts « + » des microtubules sur le cortex. Pour expliquer les comportements observés, il faut une répartition de microtubules hétérogène qui rencontre une distribution de fibres hétérogène de façon à maximiser leurs interactions. Seul un modèle de type IV pourra expliquer ces différences. Ces patrons ont donc révélé des subtilités du positionnement du fuseau qui ne pouvaient pas être mis en évidence avec des patrons dont la bipolarité était trop marquée.

Ces expériences offrent également une information supplémentaire : l'angle critique au-delà duquel deux zones ne peuvent plus interagir ensemble avec un pôle du fuseau. C'est en quelque-sort la capacité résolutive du fuseau, c'est à dire l'angle minimum pour que le fuseau distingue deux zones corticales.

dès que l'angle entre deux zones dépasse 80° les pôles basculent vers l'une ou l'autre

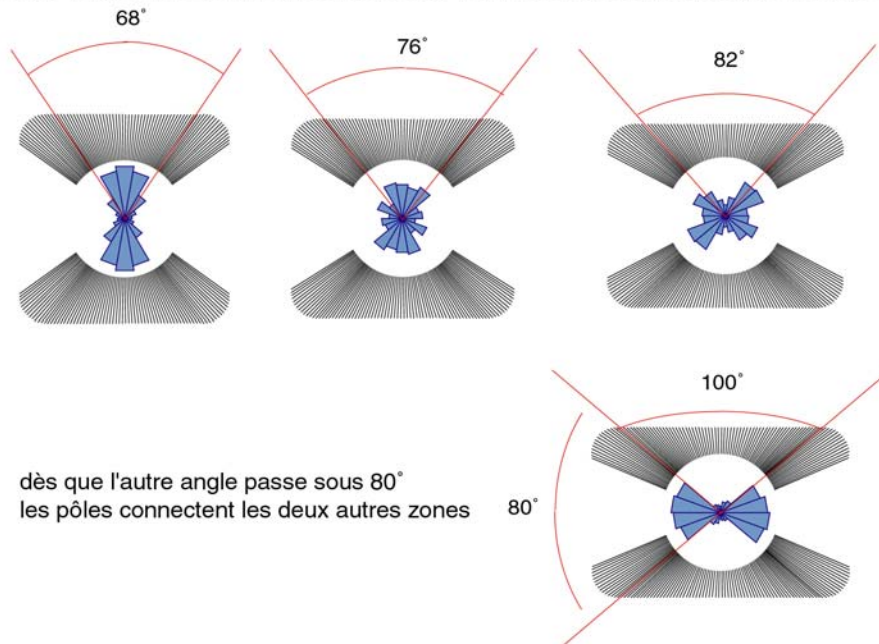


Figure 3.59 L'apparition d'un angle critique révèle la sensibilité angulaire du positionnement du fuseau, c'est à dire l'écart minimal entre deux sites d'attraction pour que le fuseau puisse les distinguer.

Bien que les zones corticales soient de plus en plus denses au fur et à mesure que le [H] est allongé, ce qui affecte la sensibilité du fuseau pour ces zones, on peut tout de même supposer que cette valeur de 80° est une valeur critique au-delà de laquelle un pôle du fuseau ne peut plus interagir avec deux zones corticales en même temps. On peut supposer, à partir de cette mesure, que la densité de microtubules qui touchent le cortex dans un secteur angulaire de 80° est plus élevée. Ainsi, un pôle du fuseau « voit » principalement le cortex non pas sur la moitié de la cellule mais dans un angle plus restreint que l'on peut calculer à partir des dimensions de la cellule mitotique et du fuseau qui sont très reproductibles d'une cellule à l'autre et à partir de cette valeur de 80° . Cet angle vaut 150° (Figure 3.60).

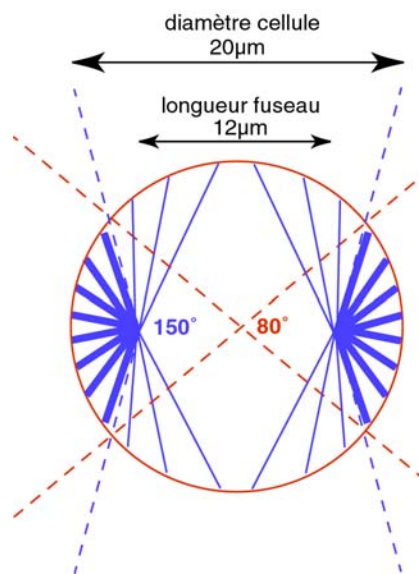


Figure 3.60
Dédution du profil de densité angulaire des microtubules astraux à partir des mesures sur les [H].

Les mesures des orientations principales des distributions angulaires sur des [H] d'allongements variés permettent donc de formuler une hypothèse selon laquelle la densité angulaire de microtubule ne serait pas uniforme (modèle II) mais plus concentrée dans un secteur de 150° . Cette hypothèse peut être ajoutée au modèle théorique afin de vérifier si les prédictions deviennent plus proches des mesures expérimentales. Elle peut également être vérifiée expérimentalement en moyennant la distribution des microtubules sur une vingtaine de cellules pour voir si effectivement ils sont plus nombreux dans ce secteur de 150° .

V- Conclusion sur les divisions

Le modèle théorique, développé avec Andrea Jimenez-Dalmaroni et Franck Julicher, est encore en cours de mise au point. Les premières simulations permettent de penser que les hypothèses fondatrices sont correctes et que le modèle devrait permettre de décrire correctement les mesures des orientations des divisions des cellules HeLa sur tous les micro-patterns adhésifs testés. Certains paramètres comme la densité des fibres de rétraction sur le cortex qui ne semblait pas critiques au regard des premières expériences devraient finalement se révéler indispensables pour pouvoir prédire les orientations mesurées au cours des dernières expériences sur l'[ancrage] ou les différents [H]. D'autres paramètres, comme le secteur angulaire principal dans lequel les microtubules sont plus nombreux, pourront être ajoutés plus tard. Nous essayerons toutefois de garder un modèle qui comporte le moins de paramètres possibles afin qu'il puisse rester très général. Ce modèle devrait être facilement adaptable à l'étude du problème du centrage du centrosome évoqué à la fin de l'article sur la polarité cellulaire.

Les micro-patterns adhésifs ont montré qu'ils permettaient d'avoir un contrôle très précis de la division des cellules. Cette maniabilité et standardisation du comportement des cellules en mitose est un outil expérimental puissant qui va élargir à l'ensemble des cellules adhérentes en culture le champ d'étude de la division qui est aujourd'hui restreint principalement aux levures et aux embryons. La prévisibilité du système le rend compatible avec un système de diagnostic. Des milliers de gènes vont pouvoir être inhibés un par un et l'effet pourra être mesuré automatiquement grâce aux acquisitions vidéo automatisées développées par Jean-Baptiste Sibarita, qui pourront ensuite être analysées numériquement à partir du logiciel mis au point par Victor Racine. Le nombre considérable de mesures que permet ce type d'approche offre une description du comportement de toute une population de cellules. Ainsi il est envisageable de faire un test simple pour savoir si on peut considérer que l'effet, induit par une drogue ou l'inhibition d'un gène, est significatif. Surtout, il devient possible de détecter des modifications plus subtiles du comportement des cellules comme l'apparition de nouvelles tendances : des asymétries ou des élargissements de la distribution autour de la même moyenne.

Il est probable que de nombreuses voies de signalisation biochimique, impliquées dans la division cellulaire, vont pouvoir être caractérisées par ce type de système expérimental, notamment celles régulant les interactions entre les différents composants du cytosquelette. L'utilisation de la micromanipulation, et notamment la microchirurgie intracellulaire pour la compréhension du rôle du cytosquelette au cours de la division telle qu'elle est pratiquée dans certains embryons aujourd'hui, devrait être grandement facilitée dans les cellules en culture grâce à la reproductibilité du comportement cellulaire sur les micro-patterns adhésifs.

CONCLUSION GENERALE

Ces travaux sont une approche de la biologie un peu dépassée au sens où ils sont très descriptifs. Finalement, un biologiste y apprend peu de choses sur le fonctionnement des cellules qu'il ne soupçonnait ou ne connaissait déjà grâce à l'analyse des processus morphogénétiques au cours du développement des embryons. En effet, ces travaux montrent que les cellules organisent les tensions au sein de leur cytosquelette en fonction de la géométrie et des propriétés mécaniques de leur entourage. Mais cela avait été déjà observé dans la fermeture du manteau de l'embryon de mouche. Ils montrent également que les cellules dirigent leurs polarités surfacique et interne en réponse à la disposition des zones d'attache qu'elles trouvent autour d'elles. Il s'agit d'un phénomène bien connu au cours de la migration cellulaire, notamment pendant la formation de la crête neurale dans les embryons ou pendant la fermeture des blessures. Ils démontrent enfin que ces attaches guident l'orientation du fuseau mitotique indépendamment de la forme des cellules, ce que les divisions symétriques des épiblastes et asymétriques des neuroblastes avaient déjà révélé.

L'intérêt de ces travaux réside dans la démonstration des possibilités de manipulation et de quantification qu'offrent les micro-systèmes. La capacité de manipuler ces réponses biologiques permet de distinguer, parmi l'ensemble des paramètres qui modulent l'activité des cellules dans des environnements complexes comme dans un embryon, ceux qui sont critiques pour le phénomène observé. Par exemple, dans la fermeture du manteau de l'embryon de mouche, ce n'est pas l'espace disponible dans le trou qui se ferme mais l'absence d'adhésion au bord de cette zone qui fait que les cellules se contractent à cet endroit. On distingue alors les deux phénomènes qui participent à la fermeture d'une blessure, les cellules qui rampent et s'accrochent sur les parois et remplissent l'intérieur de la zone évidée et celles qui contractent la périphérie de la zone évidée. Une fois que l'on connaît le paramètre critique pour l'effet recherché, on peut imposer à toute une population de cellules, séparées les unes des autres, les mêmes conditions propices à la manifestation de cet effet. Selon ce que l'on cherche à caractériser, on peut imposer aux cellules de développer une unique zone de tension, d'orienter leur polarité et leur protrusions dans une unique direction ou encore de se diviser selon un axe donné. Bien que la réponse cellulaire procède d'un mécanisme connu, la capacité de maîtriser les paramètres qui mènent à cette réponse permet de l'induire de façon reproductible dans des cellules individuelles. Cette reproductibilité est le point central de ces travaux. La reproductibilité permet la quantification et la comparaison.

La reproductibilité et les possibilité de quantification et de manipulation d'un grand nombre de cellule nous ont amenés à déposer un **brevet** sur l'utilisation des micro-patrons adhésifs pour le contrôle de l'organisation interne des cellules (ACICO, pour Adhesive Control of Internal Cell Organisation). Des extraits de ce brevet, dans lesquels on trouve la description de l'invention et de l'utilisation qu'il peut en être fait, sont joints en Annexe 2.

En utilisant, par exemple, le principe de la "cellule moyenne", on peut caractériser l'ensemble de la distribution spatiale d'une protéine. En effet, il devient possible de décrire la localisation majoritaire mais également la variabilité qui existe autour de cette localisation. Cette caractérisation complète permet de déceler des écarts beaucoup plus subtils à la normalité que simplement des tests binaires, qui décident si, oui ou non, une protéine donnée est au bon endroit. Ainsi, il devient possible de quantifier par l'imagerie l'effet dose-réponse

d'une drogue ou de l'inhibition d'une protéine sur le niveau d'expression et la localisation des protéines d'intérêts.

Ces quantifications permettent ensuite le développement de modèles mathématiques. Dans un premier temps, la description de l'état stationnaire d'une cellule en réponse à des contraintes données permet de formuler un modèle physique à partir duquel on peut déduire le profil énergétique des organisations possibles et expliquer la stabilité de l'état observé. Nous avons entamé cette étape de modélisation pour les mesures d'orientations de fuseaux mitotiques. Dans un deuxième temps les quantifications de l'évolution temporelle d'un état quelconque vers l'état stationnaire permettent d'ajouter les constantes de temps des processus dynamiques impliqués dans cet équilibre. C'est de cette façon qu'il devient possible de s'attaquer aux problématiques exposées dans l'introduction générale concernant l'étude de la complexité des cellules, grâce à des systèmes expérimentaux permettant de réduire la variabilité et de quantifier l'évolution des systèmes vers des états stationnaires.

Par ailleurs, dans les mains de biologistes et de médecins, ces outils permettraient d'établir des tables de références de l'organisation fine des cellules. Pour chaque type cellulaire, on aurait alors accès à la description phénotypique de la structure interne en réponse à quelques situations types. Cela apporterait des informations intéressantes sur les différents types d'organisation possibles en réponse à une contrainte donnée. En effet, si les cellules testées dans cette étude se comportaient d'une certaine façon, il y a de fortes chances pour que d'autres types cellulaires répondent de façons tout à fait différentes. Dans un deuxième temps, ces tables de référence pourraient servir au diagnostic. Il deviendrait possible de quantifier le comportement des cellules extraites de la biopsie d'un patient et de comparer ces mesures à celles inscrites dans les tables pour ce type cellulaire. Le diagnostic pourrait tout aussi bien être celui de l'effet d'une drogue ou de l'inhibition d'un gène. La recherche fondamentale pourrait ainsi bénéficier d'outils de détection très sensibles pour la caractérisation fonctionnelle d'un gène ou d'une protéine. Par ailleurs, les tests de viabilité de nouveaux médicaments pourraient être facilités par des étapes préliminaires, au cours desquelles seraient effectuées ce type de quantification des réponses des types cellulaires avant les essais cliniques sur les patients.

ANNEXES

ANNEXE 1 – ARTICLE microTAS 2005

CONTROLLING INTERNAL ORGANIZATION AND DIVISION AXIS OF CULTURED CELLS WITH ADHESIVE MICROPATTERNS

M. Théry¹, A. Pépin², Y. Chen², M. Bornens¹

¹*Institut Curie, CNRS UMR144, Paris, France,* ²*Laboratoire Photonique et Nanostructures, CNRS UPR20, Marcoussis, France*

ABSTRACT

We present a novel approach to control internal organization and polarity of individual adherent cells in culture. To control cell adhesion, we used micro-contact printing with two basic features: 1) the proper adhesive surfaces for a given convex envelope were reduced in order to impose more stringent adhesive conditions than a fully adhesive pattern with the same outline; 2) the respective positions of adhesive and non-adhesive zones in the convex envelope polarized the pattern. We show that cells, like in tissues, present a highly reproducible response when constrained by such stringent boundary conditions, as judged by the polarized organization of their internal compartments and by the orientation of their divisions.

Keywords: micro-pattern, cell adhesion, polarity, division

1. INTRODUCTION

Tissue differentiation during the development of multi-cellular organisms involves the organization of a great number of cells adopting a collective behavior. One of the basic features of cohesive multi-cellular organization, in which cell shape and migration are restricted by neighboring cells, is that each individual cells have the same polarity. Cell polarity is defined by the expression of a morphological and functional asymmetry relative to a polar axis defining a front and a rear edge. The actin cytoskeleton network is instrumental in maintaining structural and functional cell surface polarity, whereas the other major cytoskeleton network, the microtubule array, plays an essential role in controlling the asymmetric internal distribution of cytoplasmic organelles. The centrosome, which acts as the microtubule nucleating center, is physically associated with the nucleus and provides the microtubule astral network with an asymmetric distribution due to microtubules exclusion from the nucleus and a global polarity by anchoring the microtubules minus end. As a result, the intracellular compartments adopt an asymmetric and polar distribution. The symmetry axis defined by the nucleus, the centrosome and the Golgi apparatus thus reflects an internal distribution of compartments necessary for polarized intracellular transport and secretion of proteins, or for cell migration. This is particularly obvious in epithelial tissues where the plasma membrane itself is stably polarized, displaying two distinct regions: the apical domain facing the external environment or the lumen, and the baso-lateral domain, which is in contact with neighboring cells or a basal substratum (Figure 1). Cell polarity implies that cell surface polarity and internal polarity coincide and this is achieved by the formation of spatially and functionally distinct domains in the plasma membrane and the membrane-associated cytoskeleton. This organization must also be preserved during tissue growth. Cell divisions must be properly oriented in order to produce daughter cells able to insert in the tissue without impairing its cohesive integrity and function. Cell-cell junctions and cell adhesion to a basal substratum, which are connected to the intracellular cytoskeleton via transmembrane proteins, are clearly important features for that behavior.

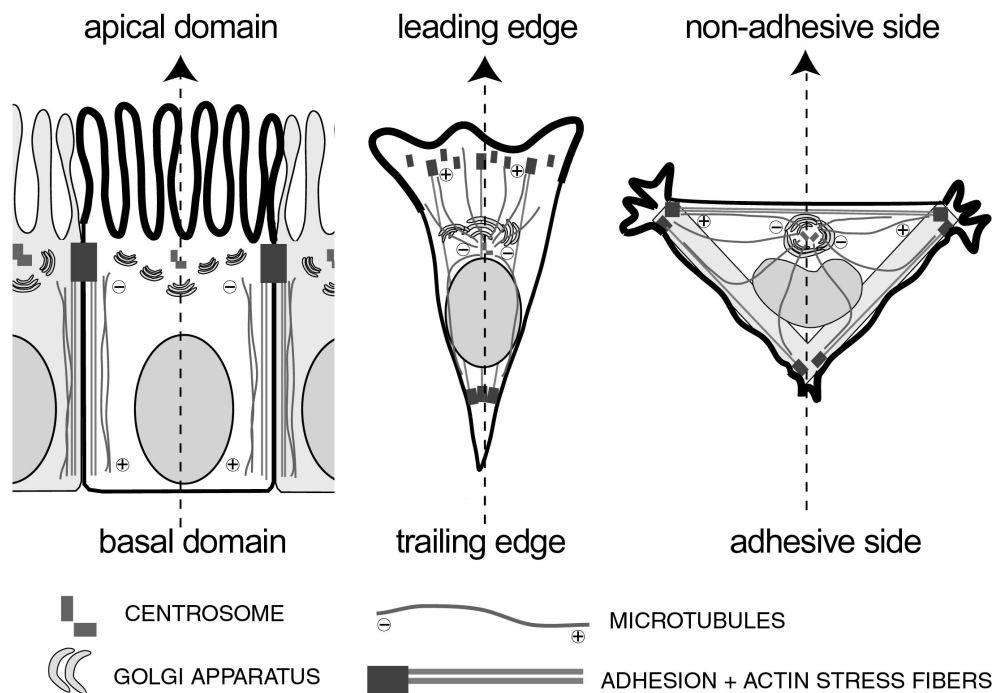


Figure 1. Internal cell organization and polarity of an epithelial cell (left), a migrating cell (middle) and a cell on a [L] micro-pattern (right). The dashed arrow represents the polarized symmetry axis of the cell and the “+” and “-“ the microtubules polarity.

2. WORKING MODEL

A basic question is whether polarity is an intrinsic and permanent property of cells, or if it is externally imposed by the tissue environment. Individual cells growing in culture like fibroblasts or keratocytes display a rather polarized migration (Figure 1) whereas other cell types show a more erratic behavior. In all cases, cells are permanently reshaping their cytoskeleton and their membrane activity. It is not easy to identify the basic principles of this (re)organization from the highly variable behavior of each individual cell. One possible way to experimentally overcome this riddle should be to grow individual cells in a fixed environment, for example on micro-adhesive patterns in which one single cell could spread and divide, but in which cell movement would be restricted like in a tissue. In these conditions, one could expect the inherent variability of individual cells to be normalized. If the boundary conditions imposed to cell adhesion possess a single and polarized symmetry axis due to the respective locations of adhesive and non-adhesive zones, it should drive the internal cell organization and polarity. As a result, the internal organization of each individual cells would be identical, like in tissues. But contrary to tissues, the internal organization of cells would become amenable to controlled modifications, and thus to the dissection of the interplay between intrinsic and externally imposed polarity.

3. EXPERIMENTAL

To control the spatial distribution of the extra-cellular matrix we used micro-contact printing to manipulate the location of fibronectin [1]. Rather than using alkanethiolates self-assembled monolayers on gold we simply silanised glass coverslips with a mercapto-silane

after activation with a “piranha” solution [2]. We then printed the fibronectin (a tenth of which was labeled with Cy3) with a PDMS stamp and neutralized the non-printed areas with PEG-maleimide in order to make them repulsive to cell attachment. In addition to being cheap, easy to use and compatible with fluorescent cell-labeling, this technique allows a micrometer-resolution which is sufficient to design patterns at a subcellular scale. Thereby we imposed a similar shape to cells but distinct adhesion patterns (Figure 2). For comparison it was critical to impose identical cell spreading area instead of identical cell adhesion area [3]. HeLa cells, from a human adenocarcinoma epithelial cell line, and RPE1 cells, from a non transformed retinal pigment epithelial human cell line, were plated on micropatterns and fixed for staining or observed in time-lapse video-microscopy.

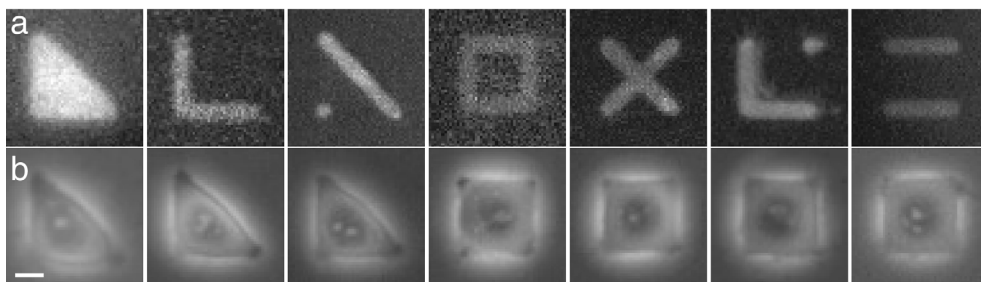


Figure 2. Living *HeLa* cells visualized on fibronectin-Cy3 micropatterns (a) with a 10x objective in phase-contrast (b). Cells display the same shape (triangle or square) on micropatterns having the same convex envelope. Bar = 10 μ m.

4. RESULTS

We observed and quantified the cell response to the spatial distribution of adhesion imposed by the micro-patterns. We first looked at the orientation of the internal cell polarity, defined by the respective location of the nucleus and the centrosome. It appeared that [L] micro-patterns guided the positions of the nucleus (close to the [L] corner) and the

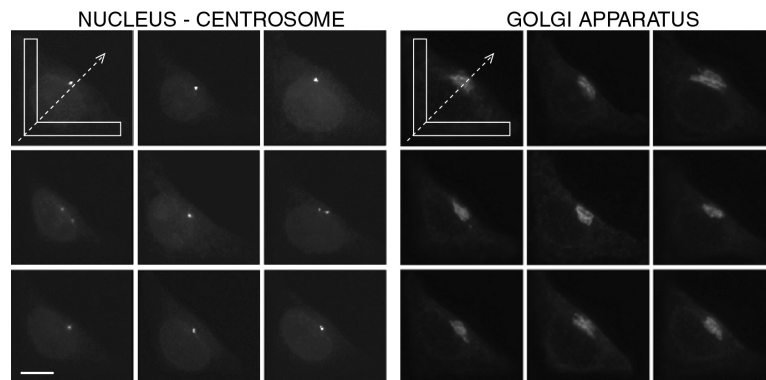


Figure 3. Nucleus (gray ellipse on the left pictures), centrosome (two white dots on the left pictures) and Golgi (left) localization in fixed *HeLa* cells on [L]. Bar=10 μ m.

centrosome (close to the middle of the [L] hypotenuse) in a reproducible manner corresponding to the polarized symmetry axis of the [L] (i.e. their symmetry axis polarized by the respective location of the adhesive and non-adhesive border of the triangular

envelope) (Figure 3). The Golgi apparatus, rather than extended as it would be in classical culture conditions, was compacted around the centrosome. This reproducible structure allows to perform a refine quantitative study of intracellular traffic (Dimitrov A. et al, in preparation). Interestingly, cell polarity and centrosome positioning were more constrained on [L] than on full triangle (Figure 4). This showed that, in addition to cell shape, the restriction of the distribution of cell adhesion in a polarized manner directly impinges on cell polarity and contributes to reduce variability in cell internal organization.

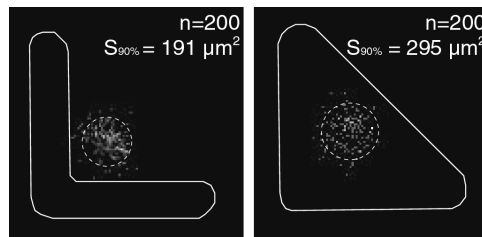


Figure 4. Centrosome positions on [L] and on a full triangle were automatically detected and recorded in 200 fixed cells in each case. The disc area containing 90% of centrosomes ($S_{90\%}$) was 1,5 times bigger on [triangle] than on [L].

The non-adhesive area under the [L] hypotenuse also affected the architecture of the cell cytoskeleton. The bundle of actin stress fibers upon the non-adhesive border was more conspicuous than the one developed upon adhesive borders (Figure 5). It has already been shown that fully adhesive micropatterns confine cell protrusions and traction forces at cell apices [4]. On our micro-patterns the spatial distribution of adhesive and non-adhesive zones appeared to guide the assembly of the actin cytoskeleton and the directions and intensities of the traction forces the cell exert on the substrate, thereby influencing cell migration [5]. The microtubule network polarity also appeared guided by the [L] shape. Microtubules, nucleated from the centrosome, grew toward cell periphery where they followed actin cables mainly toward cell apices flanking the non-adhesive edge (Figure 5). Therefore, both cytoskeleton networks were influenced by the geometry and heterogeneity of the underlying pattern.

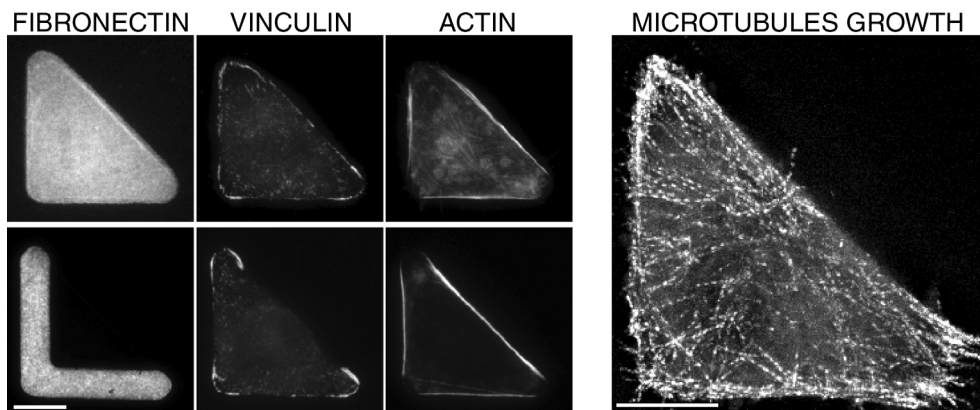


Figure 5. Actin cytoskeleton stained with phalloidin and focal adhesions labeled with vinculin on full triangle and on [L] (left). Projection of a time lapse acquisition of microtubules “+” end trajectories in a living HeLa cell on a [L] (right). Bars = 10 μm .

Cell division is preceded by a bipolarization of the cell. This bipolarization emphasizes the polarity established in interphase : the two cell apices flanking the hypotenuse on [L] where large stress fibers were attached and where microtubules converged (Figure 5) defined the orientation of the spindle during division (Figure 6).

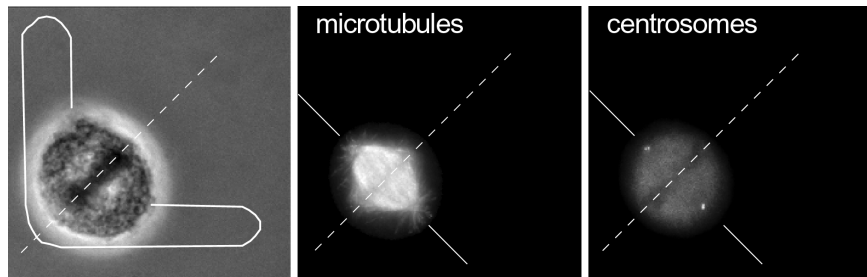


Figure 6. Metaphase cell showing from left to right chromosomes in phase contrast, mitotic spindle labeled with antibodies against tubulin, and centrosomes with centrin-GFP at spindle poles. The dashed line corresponds to the [L] symmetry axis, the solid line to the spindle axis.

We plated cells on [L] and video-recorded their divisions in phase contrast microscopy. It revealed that they divided reproducibly along the hypotenuse (Figure 6a). An extensive comparison between the several micropatterns shown in figure 2 has been performed in order to dissect the respective role of cell shape and cell adhesion in the orientation of the division axis [6].

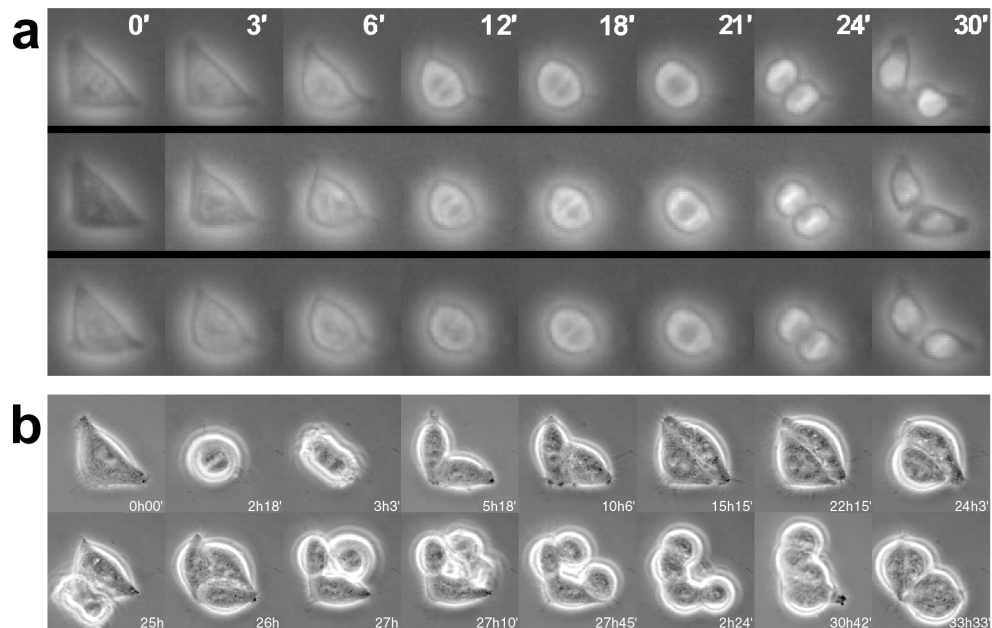


Figure 7. Three examples of RPE1 cells divisions illustrating the spatial and temporal reproducibility on [L] (a). [L] micropatterns also allow the control of two successive divisions of HeLa cells(b). The first division (3h3') and the two following divisions (25h and 27h10') were orientated along the direction of the [L] hypotenuse.

We were also able to record the second round of division of the two daughter cells. (Figure 6b). Interestingly the two daughter cells first respread on the two [L] branches (5h18') and then reorganized into an apparently more stable configuration with one cell in the corner and the other along the hypotenuse (15h15'). The cell in the corner divided along [L] hypotenuse (25h) and its two daughters respread on the [L] branches. Then the second daughter of the first cell also divided along the hypotenuse (27h10'). After mixing together the four cells eventually found an apparently stable configuration respecting the symmetry conditions imposed by the underlying patterns (33h33'). These examples illustrated the ability of symmetrical and polarized micropatterns such as [L] to drive cell bipolarization during division. The two rounds of division reproduced how cells divide in a confined and polarized environment like in an embryo; this could open a new approach to investigate tissue morphogenesis.

5. CONCLUSION

The reproducibility with which cells behave on the micro-patterns we designed (patent WO2005/026313) allows us to quantify the spatial distribution of cell compartments and of individual proteins and to assess its significance by averaging the distribution observed in a great number of cells. The ability of the micro-patterns symmetries and heterogeneities to impinge on cell internal organization and polarity up to mitosis could have a wide range of applications from the fundamental analysis of individual cell polarization or multicellular morphogenesis to tissue engineering.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Pierre Nassoy for help and advices on surface treatments and Donald E. Ingber and Philip LeDuc for generous gift of micro-patterns in the early part of our experiments.

REFERENCES

- [1] Whitesides, G.M., E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, and D.E. Ingber, *Soft lithography in biology and biochemistry*. Annu Rev Biomed Eng, 2001. **3**: p. 335-73.
- [2] Cuvelier, D., O. Rossier, P. Bassereau, and P. Nassoy, *Micropatterned "adherent/repellent" glass surfaces for studying the spreading kinetics of individual red blood cells onto protein-decorated substrates*. Eur Biophys J, 2003. **32**(4): p. 342-54.
- [3] Chen, C.S., J.L. Alonso, E. Ostuni, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber, *Cell shape provides global control of focal adhesion assembly*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **307**(2): p. 355-61.
- [4] Parker, K.K., A.L. Brock, C. Brangwynne, R.J. Mannix, N. Wang, E. Ostuni, N.A. Geisse, J.C. Adams, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber, *Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces*. Faseb J, 2002. **16**(10): p. 1195-204.
- [5] Jiang, X., D.A. Bruzewicz, A.P. Wong, M. Piel, and G.M. Whitesides, *Directing cell migration with asymmetric micropatterns*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(4): p. 975-8.
- [6] Théry, M., V. Racine, A. Pépin, M. Piel, Y. Chen, J. Sibarita, and M. Bornens, *The spatial distribution of the extra-cellular matrix guides the orientation of the cell division axis*. Submitted.

ANNEXE 2 – BREVET WO2005/26313 A1

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 March 2005 (24.03.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/026313 A1

- (51) International Patent Classification⁷: **C12M 3/00**, C12Q 1/02
- (21) International Application Number: PCT/IB2004/003091
- (22) International Filing Date: 10 September 2004 (10.09.2004)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 03292259.3 12 September 2003 (12.09.2003) EP
- (71) Applicants (for all designated States except US): **INSTITUT CURIE** [FR/FR]; 26, Rue d'Ulm, F-75248 Paris Cedex 05 (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **BORNENS, Michel** [FR/FR]; 57 Avenue Edouard Depreux, F-92300 Sceaux (FR). **THERY, Manuel** [FR/FR]; 50 Rue du Faubourg du Temple, F-75011 Paris (FR). **PIEL, Matthieu** [FR/FR]; 86 Avenue du Général de Gaulle, F-77780 Bourron Marlotte (FR).
- (74) Agents: **GALLOIS, Valérie**, et al.; Becker & Associates, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:**
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:**
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

(54) Title: METHODS AND DEVICE FOR ADHESIVE CONTROL OF INTERNAL CELL ORGANISATION

(57) Abstract: The present invention relates to methods and devices for adhering cells in a specific and predetermined position with an adhesive control of internal cell organisation, methods for preparing such devices, methods for studying modifications of cell shape and global internal cell organization such as the distribution of cellular compartments, centrosome centering, spindle orientation, internal compartmentalization and internal transports, methods for screening compounds of interest which enhance or inhibit specific cell functions.



WO 2005/026313 A1

Methods and Device for Adhesive Control of Internal Cell Organisation

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to methods and devices for adhering cells in a specific and predetermined position with an adhesive control of internal cell organisation, methods for preparing such devices, methods for studying modifications of cell shape and global internal cell organization such as the distribution of cellular compartments, centrosome centering, spindle orientation, internal compartmentalization and internal transports, methods for screening compounds of interest which enhance or inhibit specific cell functions.

BACKGROUND OF THE INVENTION

High throughput cell-based phenotypic screening becomes necessary to take advantage of the wealth of data obtained from systematic genome sequencing. Genome wide gene silencing by siRNA is now possible on cultured cells. Alternatively, one would like to rapidly identify biologically active compounds from drugs libraries able to enhance or inhibit specific cell functions. The aim is thus to carry out phenotypic analyses on cultured cells with an automated tool.

High throughput methods have long been used to perform quantitative dosages on known molecular pathways. These methods cannot be used when one wants to identify new genes involved in complex cell properties like protein transport, adhesion, migration, division or apoptosis, or to probe the ability of a new drug to interfere with those mechanisms.

The challenge nowadays is to associate the accuracy of modern cell biology analysis on a small number of cells to the power of high throughput automated methods on a great number of cells. Answers to this challenge are not numerous because of several barriers:

- First, the cell population on the bottom of wells has a distribution which cannot be predicted. This imposes the use of small magnification objectives or an automated but lengthy scanning acquisition.
- Second, the cell shape is different from one cell to another and this parameter cannot be ignored whatever the phenotype under analysis or the quantification performed on a cell basis (intracellular localisation, number and size of particular organelles, molecular signals..).

- 5 - Third, the intracellular distribution of cell compartments and the global cell organisation are also varying considerably from one cell to another. This is particularly cumbersome. It prevents any kind of precise analysis of the mutual distribution of intracellular compartments, or of the establishment and maintenance of cell polarity during cell division or cell migration.
- 10 - The distribution of the cell population as well as the shape and internal organisation of individual cells, are all dependent on cell migration activity. Motility can vary largely depending on the cell type, but it is always a significant parameter.

Overcoming these difficulties would require a method to prevent cells from migrating and to orientate every cell in the same way with respect to an external clue. An answer has been provided with the micro-patterning which allows a precise control of cell shape and cell position by influencing actin assembly. Many possibilities of the micro-patterning have been investigated (Whitesides and Ingber; US 6,368,838; WO 01/70389; 15 WO 02/86452; WO 02/22787) but none of them influence the entire functional and structural polarity in a repetitive way compatible with a precise screening of cell intrinsic properties.

20 SUMMARY OF THE INVENTION

In the present invention, the inventors present an efficient and low cost method that allows the screening of genes or compounds activities on cell functions encompassing polarity, motility and division as well as internal compartmentation and transport. The method according to the invention lies on a precise control of focal adhesions distribution. 25 These transmembranar complexes interact with the cytoskeleton which largely controls cell compartmentation. The accurate control of the intracellular distribution of each organelle is made possible by the use of an anisotropic adhesive pattern such as a concave adhesive pattern involving a non adhesive area. This control can also be made possible by the use of an adhesive pattern leading to a lengthening of the cell.

30 Therefore, the invention concerns methods and devices for adhering cells in a specific and predetermined position with a controlled polarisation of the internal cell organization, thereby inducing the cell machinery polarisation. The device comprises a plate defining a surface and at least one anisotropic adhesive pattern, such as a concave adhesive pattern, for an individual cell, more particularly for only one single cell, which is

isolated by cytophobic regions to which cells do not adhere contiguous with said adhesive pattern.

Such devices are useful in a wide array of cellular biology applications, including cell culturing, cytometry, toxicology, drug screening, diagnosing, and immobilization of 5 cells. They allow a high or medium throughput screening assays and/or individual assays as well.

Therefore, the invention concerns methods for preparing such devices, methods for culturing cells, methods for immobilizing cells on a surface, methods for controlling the cell shape and global internal cell organization, methods for studying cell shape and global 10 internal cell organization such as the distribution of cellular compartments, centrosome centering, spindle orientation, internal compartmentalization and internal transports, methods for screening compounds of interest which modify, e.g. enhance or inhibit, cell shape, global organization and/or function.

15

LEGEND TO THE FIGURES

FIGURE 1 : Automated numerical detection of anaphase and spindle orientation for a cell plated on an L-shape adhesive pattern.

Figure 1A, Frames from a 3 minutes time-lapse in phase contrast microscopy with a 10x objective. Numbers correspond to those reported on the time-curve in Figure 1C. 20 Mitotic cell centre indicated in frame 4 and anaphase spindle orientation shown in frame 5 are reported from the analysis b.

Figure 1B, Wavelet segmentation of the pictures in a. Ellipsoidal fits are shown in black. Black dashed lines correspond to the major and minor ellipse axes. Mitotic cell centre is measured in frame 4, six minutes before anaphase in frame 5. Anaphase 25 orientation is that of the ellipse major axis in frame 5 with respect to the vertical reference of the pattern oriented as shown on figure 2.

Figure 1C, Shape factor versus time. The shape factor is the ratio of the short over the long axis defined in b. Anaphase elongation in frame 5 is automatically detected by the shape factor shift from over 0.9 to less than 0.6. Bar = 20 μ m.

30

FIGURE 2 : Distributions of mitotic cell positions and spindle orientations of living cells plated on various adhesive patterns. First and second columns: mitotic cell positions and spindle orientations measured as described in figure 1. Coordinates of the round cell centre positions are in micrometers and each bar for the mitotic spindle orientations represents 10

FIGURE 16 : Distribution curves of the angle between the cell division axis during telophase and the L hypotenuse. Number of measurements per curve \approx 50.

5 FIGURE 17 : Distribution curves of the angle between the metaphase plane and the normale (perpendicular) to the L, or the corresponding full triangle hypotenuse.

Figure 17A : Distribution curve on an L shape (S13 in fig 16);

Figure 17 B : Distribution curve on the corresponding full triangle.

10

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The approach according to the invention rests on the property of cells from most animal tissues to be convex and to display a stereotyped distribution of intracellular compartments with respect to specialized contacts with neighbour cells which prevent their migration.

15

Indeed, cell-cell or cell-ECM interactions in tissues induce the segregation and spatial organisation of membrane adhesive proteins. The internal cell structure and organisation are linked to these boundary conditions. Signalling cascades control cell activity from peripheral receptors but also from mechanical stimuli at adhesion sites. At any moment, the adhesive pattern of a cell is the outcome of the cross-talk between cell

20 activity, which controls the plasma membrane structure and composition, and cell dynamic response to the constraints of the environment.

25

In classical culture conditions on infinite adhesive planes, cell adhesive structures like focal adhesions (FA) or focal complexes are distributed all over the 'ventral' cell contact area to the substrate, although in a non homogeneous manner. The ability of cells to develop tension between adhesive complexes is an important parameter of their geometry: at any moment, the cell shape corresponds basically to the convex envelope of the most distal adhesive contacts. This property can be used to control cell shape: controlling the distribution of adhesive complexes suffices to impose the shape of cells not only on a non-infinite adhesive surface but even on non-connected surfaces.

30

This property can even be observed *ex vivo* with epithelial cells, for example with enterocytes or kidney cells, when their polarity is normalized by culture conditions (two compartments chambers). The use of such culture conditions for high throughput analysis is however limited.

A more physiological approach for fibroblastic cells is to grow cells in 3D collagen gel fibers. The use of such culture conditions for high throughput analysis is however limited.

An alternative approach compatible with high throughput analysis is to offer a limited pattern of possible contacts on a 2D surface: in this way, one can force cells to adopt a behaviour similar to that of cells in tissues in response to limited contacts with neighbour cells.

As coverslips are infinite adhesive planes which impose a uniform and non physiological environment, micropatterned cell-sized surfaces like squares and other regular polygons are a first step towards mimicking a mechanical constraint from the environment on cell migration and cell organisation. These surfaces only limit the extent of cell flattening however. They still create a very large connected adhesive surface with respect to the cell size, which imposes 'dorsal' and 'ventral' domains to the cell plasma membrane, quite different from the limited number of contacts that cells establish with neighbour cells in tissues.

The inventors demonstrate for the first time that cells interpret the topology of the adhesive pattern by assembling an actin network that exerts a non-isotropic field of traction forces on adhesive contacts. This drives the orientation of the bipolar spindle at the onset of mitosis. Therefore it is not cell shape but cell adhesion that can determine the cleavage plane.

The inventors further demonstrate that cells respect precise rules in response to their adhesive contacts, which in turn affects the orientation of cell division. These adhesive contacts also pass on a positional memory to the daughter cells. They report the first device, using adhesive micro-patterning, to reliably control the division axis of animal cells in culture. Preferably coupled to automated monitoring, it should be of considerable value for analyzing the cell mitotic process and its perturbations in high throughput screenings.

The principle of the present invention, which is called herein adhesive control of internal cell organisation (ACICO), is to create a network (an array or a grid) of adhesion (anchoring) surfaces for individual cells which prevent them from migrating and allow a reproducible polarisation of the cell machinery in which the position of the different organelles, like the centrosome or the Golgi apparatus, can be predicted.

The unit motive or pattern of the network is an anisotropic adhesive surface. This anisotropic adhesive surface induces a disequilibrium in the adhesion sites which leads to a

cell polarisation. More particularly, a preferred anisotropic adhesive surface is such that at least one side of the adhering cell should have no contact with the adhesive surface. The disequilibrium in the adhesion sites can be, for instance, observed through the actin filaments which are inhomogenously distributed at the cell outline. This disequilibrium can also be observed through the number of retracting fibers attachment (RF). For example, the presence of only two RFs attachments leads to an excellent cell polarisation. An anisotropic adhesive surface can design by limiting the number of symmetry elements of the pattern and by biasing their respective weights. Preferably, the adhesive pattern according to the present invention has 1 or 2 axis of symmetry, more preferably only one axis of symmetry.

A preferred anisotropic adhesive surface according to the present invention is a concave or hollow adhesive surface: its convex envelope will impose the casting surface of an individual cell in spite of a large non adhesive area. Once cells are stabilized on these patterns, the limited number of adhesive contacts of each individual cell with the substrate and the distribution of these contacts according to a concave, or hollow, motive, induce the reproducible polarisation of the cell machinery. In the present application, the term "concave adhesive pattern" refers to an adhesive pattern which presents a convex envelop, said envelop includes at least 5 % of non-adhesive area, preferably 10, 20 or 30 %. By "convex envelop" is intended the minimal convex polygon containing the adhesive pattern.

In an alternative and less preferred embodiment of the present invention, the adhesive pattern is a pattern which leads to a lengthening of the cell. Indeed, the lengthening of the cell can polarized the cell. This pattern leads to an outline shape factor (SF) or presents a shape factor which is less than 0.6, preferably less than 0.5, more preferably less than 0.4). In a preferred embodiment, said adhesive pattern is a long and thin adhesive area, for instance a rectangular area or the like. The shape factor is the ratio between the small axis and the large axis of an ellipse fitted on the cell outline or on the envelop of the adhesice area. The long and thin adhesive area according to this embodiment can have various forms such as a rectangle, a diamond or a cross.

The invention concerns a device for adhering at least one cell, preferably in a specific and predetermined template, with a controlled polarisation of the internal cell organization, comprising :

- a plate defining a surface; and,
- at least one anisotropic adhesive pattern on said surface,

wherein the size of said pattern is such that only one individual cell can adhere in said pattern with a controlled polarisation of the internal cell organization; and,

5 wherein the anisotropic adhesive pattern is either a concave adhesive pattern or a long and thin adhesive area with a shape factor of less than 0.6.

Preferably, said device comprises a plurality of adhesive patterns isolated from each others by cytophobic regions to which cells do not adhere. More particularly, said device comprise at least 2 adhesive patterns, preferably at least 5, 10, 100, 1 000, 1 0 000, or 100
10 000 adhesive patterns. In a preferred embodiment, said device comprises between 10 and 50 000 adhesive patterns/cm², more preferably between 5 000 and 15 000 adhesive patterns/cm², still more preferably about 10 000 adhesive patterns/cm².

According to the present invention, the form of the adhesive pattern allows the reproducible polarisation of the cell machinery. In a most preferred embodiment, said
15 anisotropic adhesive pattern is a concave adhesive pattern. In a less preferred embodiment, said adhesive pattern is a long and thin adhesive pattern which induces a lengthening of the cell, with an outline shape factor (SF) which is less than 0.6, preferably less than 0.5, more preferably less than 0.4.

The cytophilic island comprises preferably a concave adhesive pattern involving
20 non adhesive area. For example, the adhesive surface can have the form of the following letters : C, L, U, V. In a most preferred embodiment, the concave adhesive pattern has the [L] form.

The inscribed surface by the concave adhesive pattern comprises adhesive and non-adhesive area and the convex envelope of said concave adhesive pattern comprises
25 preferably one or several adhesive area, more particularly one or several adhesive lines or curves. In a particular embodiment of the present invention, the convex envelope of the concave adhesive surfaces is a polygon. Preferably, said polygon also comprises at least one adhesive edge. Said polygon can be a triangle, a quadrilateral, a pentagon, an hexagon, an heptagon, an octagon, a nonagon, a decagon, a hendecagon, a dodecagon, a
30 pentadecagon or an icosagon.

For example, the polygon consists of one or several adhesive edge(s) and, optionally, one or several adhesive corner(s). Examples of adhesive pattern are also illustrated in Figures 2D, 2E, 2G, 2H and 5.

If the polygon is a triangle, the polygon can have for example either one adhesive edge and one adhesive corner (i.e., [bar+dot] form), or two adhesive edges (e.g., [L] form).

If the polygon is a quadrilateral, the polygon can have for example :

- one adhesive edge and two adhesive corners (i.e., [bar+ 2 dots] form);
- 5 - two non-consecutive adhesive edges (e.g., [twin bars] form);
- two consecutive adhesive edges and one adhesive corner (e.g., [L+dot] form); and
- three consecutive adhesive edges.

Said quadrilateral can be a regular or unregular quadrilateral. It can be for example selected from the group consisting of a square, a rectangle, a diamond, and a trapezium.

10 In a preferred embodiment, said polygon is a triangle. More particularly, said triangle has two adhesive edges. Preferably, the angle between the two adhesive edges is between 30 and 150°, more preferably between 60 and 120°, still more preferably about 90°. Preferably, the length ratio of the two edges is between 0.1 and 1, more preferably between 0.3 and 1, still more preferably between 0.5 and 1. For the analysis of cells in
15 mitosis, the length ratio of the two edges is preferably about 1. For the analysis of cells in interphase, the length ratio of the two edges is less than 1, more preferably between 0.3 and 0.8.

The adhesive pattern can be formed of single connected adhesive surfaces and/or of non-connected adhesive surfaces. In a particular embodiment, the adhesive pattern can be
20 formed either of a single connected adhesive surface or of several non-connected adhesive surfaces. By “single connected adhesive surface” is preferably intended a solid line or curve. By “non-connected adhesive surfaces” is preferably intended dotted or dashed line or curve, or discrete point or area. In a preferred embodiment, the adhesive pattern consists of a combination of adhesive elements selected from a line, a curve and a point.

25 The width of the adhesive point, lines, curves or edges is preferably between 0.1 to 10 µm, more preferably between 1 to 5 µm, still more preferably about 4 µm.

In a preferred embodiment, the inscribed surface by the adhesive pattern is mainly non-adhesive, preferably essentially non-adhesive. More preferably, the inscribed surface by the adhesive pattern is completely non-adhesive. Optionally, 75 % of the inscribed
30 surface by the adhesive pattern is non adhesive, preferably 90 %, more preferably 95 %, still more preferably 99 %.

Preferably, the ratio between the adhesive area and the non-adhesive area of the convex envelope of the adhesive pattern is the lowest consistent with the cell flattening.

For example, the ratio is between 10 and 90 %, preferably between 20 and 80 %, still more preferably between 30 and 70 %.

The size of the adhesive pattern is such that an individual cell is able to adhere thereto. Preferably, the size of the adhesive pattern is such that one single cell could spread 5 and divide, but restricted cell movement. Preferably, the area of the convex envelope of the adhesive pattern is between 1 and 2,500 μm^2 , more preferably between 1 and 1,000 μm^2 , still more preferably between 1 and 500 μm^2 or 500 to 900 μm^2 . The size of the adhesive pattern depends on the cell type.

The surface of a plate comprises a plurality of discrete adhesive patterns, each of 10 which promote adherence of an individual cell, arrayed in a predetermined geometric template, the adhesive patterns being isolated one from another by cytophobic regions which do not promote adherence of cells. The cytophobic regions are sufficiently wide to prevent cells adhered to said adhesive patterns from contacting each other. Preferably, the mesh of the network is larger than two cell diameters. Preferably, the adhesive patterns are 15 separated by at least 10 μm , preferably by at least 20, 30, or 50 μm .

The adhesive pattern comprises molecules that promote cell attachment. These molecules are well known to those of ordinary skill in the art and comprise antigens, antibodies, cell adhesion molecules, extracellular matrix molecules such as laminin, fibronectin, synthetic peptides, carbohydrates and the like. Preferably, said adhesive 20 patterns comprise extracellular matrix molecules, more preferably fibronectin.

The non adhesive surface is an inert surface. An appropriate inert surface is a surface covered by a derivative of oligo or poly(ethylene glycol).

The plate is a support convenient for confocal, optical and/or fluorescence 25 microscopies. In the more preferred embodiment, the plate is glass, preferably silanised glass. For example, a convenient plate according to the present invention is a coverslip or a slide.

The device according to the present invention can comprise several groups of adhesive patterns on the same plate separated from each other such that each group can be 30 incubated in a different medium. For instance, a group of adhesive patterns can be contacted with a test compound and an other group can be contacted with an other test compound or without any test compound. This separation can be provided by a physical barrier such as teflon seal. For example, see SPI Teflon[®] of SPI Supplies, Teflon[®] Printed Slides of Anamed.

The device according to the present invention with adhesive patterns and the cytophobic regions are formed by micropatterning, preferably by microcontact patterning. Standard methods are well known by those skilled in the art. For review, see Whitesides et al (Annu. Rev. Biomed. Eng., 2001, p. 335-373, more particularly p. 341-345).

5 The invention concerns a method for preparing a device according to the present invention, said method comprising:

- preparing a master template with at least one adhesive pattern;
- preparing a stamp from said master template;
- inking said stamp with molecules that promote cell attachment;
- 10 - contacting the inked stamp with the plate;
- making cytophobic the non-printed surface of the plate.

Preferably, the master template is prepared from a silicon wafer coated with a photoresist layer by illuminated with UV through a mask on which the adhesive pattern has been designed. The stamp is preferably poly(dimethylsiloxane) (PDMS) or an other
15 siloxane-based polymer. Preferably, said non printed surface of the plate are made cytophobic by an incubation with an inert material such as polyethyleneglycol.

A particular example of the preparation of a plate according to the present invention is detailed the example section.

The micropatterning allows a precise control of cell position at micron scale. The
20 use of glass coverslips without any gold or other metals coating is compatible with every optical imaging technics and specially with epifluorescence on an inverted microscope for video-microscopy. The automation of many 4D acquisitions (3D in time-lapse) is very easy : with a motorised XY stage, one only needs to record the XY position of the first cell as all the others can be deduced from the first one by a known iterative translation; a 100x
25 objective on a ceramic piezoelectric device makes the 3D stack acquisition very fast. Glass coverslips and micropatterning allow ones to perform high throuput 3D cell screening at high magnification using epifluorescence as well as transmitted light. When cells are synchronized before seeding, one can get at the description of a "mean cell" by summing the observation of as many cells necessary. It provides a very accurate description of cell
30 organization or behaviour as cells are very similar if not identical. From such a "mean cell" description, one can place adequate thresholds for screening active drugs on a particular cell function or genes whose inactivation impairs that function.

Accordingly, the invention further comprise an automated method of analysis for detecting the position and the orientation of cells in the course of time and at the precise moment of cell division. This method comprises :

- a) identifying the position of adhesive patterns on the plate;
- 5 b) recording cell images at several times for several identified patterns;
- c) fitting an ellipse on the cell outline from cell images;
- d) detecting the division time and determining the parameters of interest.

In a preferred embodiment, the method comprise in step d) the step of calculating the rounding of the cell (as indicated below). The evolution of the rounding according to
10 time allows the determination of the moment of the cell division and the spindle orientation. Preferably, the spindle orientation is determined during the lengthening phase.

More particularly, this method comprises :

- 1- identifying the position of adhesive patterns on the plate using fluorescence;
- 2- recording phase contrast images (transmitted light) at several times for several
15 identified patterns;
- 3- preferably, segmenting phase contrast images by wavelet decomposition;
- 4- fitting an ellipse on the segmented images;
- 5- detecting the division time and determining the parameters of interest.

The step 1 is carried on a 2D fluorescent image of the plate. On this plate and
20 according to the objective of the microscope, one observes various rectangular areas (fields) including several adhesive patterns. The adhesive patterns detection is preferably performed by correlation analysis with a 2D Fourier transform.

In the step 2, the detected positions of the adhesive pattern are used for recording temporal sequences (2D images according to time) on the different fields and for each
25 adhesive pattern. The images are phase contrast images (transmitted light). At this stage, it is possible to determine if a cell has adhered on the pattern.

In the step 3, the cell is segmented in order to separate the cell from the background. This segmentation can be performed through a wavelet decomposition transform. The wavelet decomposition transform allows to keep only a part of the details
30 present in the initial image. Therefore, the too small details (which can be considered as background noise) or the too thick details (which can be considered as fluctuation of background) are removed. In the obtained image, a threshold to separate the pixels assimilated to a physical structure of the pixels assimilated to the background is used. An

algorithm of segmentation of the detected structures is used to delimit the related structure representing the cell.

In the step 4, an ellipse is fitted on each segmented cell by a principal components analysis (thus minimizing the average quadratic error). The temporal sequence of images is thus comparable with a set of ellipses centered on the center of mass of the segmented structures, the form (small and large axis) and the orientation of the ellipse reproduce the morphology of the cell as well as possible. One of the form parameters is the rounding (SF) which is the ratio between the small axis and the large axis of the ellipse. For example, when the ellipse is a circle, the rounding is 1 and when the ellipse is a line, the rounding is 0. The orientation parameter is the angle between the large axis and a horizontal or vertical reference. Indeed, it can be assumed that the orientation of the large axis of the ellipse during the lengthening step is the same that the spindle orientation.

In the step 5, the temporal analysis of the rounding of a cell allows the automated detection of the moment of the cell division. The different stages of the cellular cycle induce a particular behaviour of the form parameter. During the mitosis, the cell becomes round (rounding almost 1). Then, at the anaphase, the cell lengthens suddenly (the rounding decreases quickly). One seeks to find the moment exact separating the round phase from the phase of lengthening. Therefore, for each time t , one tests if the few last moment (e.g. $t-6$ to $t-1$) are overall higher than a first threshold (specific to the round phase), then one tests if the few future moments (e.g. $t+1$ with $t+5$) are overall lower than a second threshold (specific to the phase of lengthening). In the affirmative of these two conditions, one considers that the moment T defines the beginning of the anaphase. For more details, see Figure 1 and Example 1.

This automated method allows to deal with higher volumes of data and therefore to perform statistic analysis. Moreover, the morphology analysis of the cells according to time and during cell division is more reproducible and therefore leads to more reliable results.

Parameters of interest are preferably selected in the group consisting of the mitose duration, the duration of the phase of entry into mitose (G2-mitose transition phase), the duration of the mitose end phase (abruptly or gradually) or and the orientation of the spindle orientation. The spindle orientation is one very interesting aspect among the determined parameters.

The device according to the present invention can be useful in a wide array of cellular biology applications, both in fundamental and applied research field, including cell

culturing, cytometry, toxicology, drug screening, immobilization of cells. This device is well appropriate to study the shape, the global internal organization, the internal transport and some cellular functions of cells, preferably the mitosis.

Therefore, the invention concerns a method for culturing at least one cell on a
5 surface or in a medium on a surface, said method comprising:

- providing a plate defining a surface and at least one adhesive pattern according to the present invention, preferably a device according to the present invention; and,
- culturing the cells on said adhesive pattern(s) or in a medium on said
10 adhesive pattern(s).

The medium can be any medium convenient for the cell culture. For instance, the medium can be Dulbecco Modified Eagle Medium with 10% calf serum, 1% peniciline and streptoycine and 1% gutamine.

The invention also concerns a method for immobilizing at least one at a surface,
15 said method comprising:

- providing a plate defining a surface and at least one adhesive pattern according to the present invention, preferably a device according to the present invention; and,
- exposing the plate to at least one cell for a period of time sufficient to
20 allow the cell(s) to bind to said adhesive pattern(s).

The invention further concerns a method for studying the shape, the global internal cell organization, and/or a function of a cell, said method comprising :

- providing a plate defining a surface and at least one adhesive pattern according to the present invention, preferably a device according to the
25 present invention;
- contacting said adhesive pattern(s) with at least one cell for a period of time sufficient to allow the cell(s) to adhere to the adhesive pattern(s);
- growing the cell(s) on the adhesive pattern(s); and,
- observing the shape, the global internal cell organization, the mitosis,
30 and/or a function of said cell(s).

In a particular embodiment, the global cell organization is evaluated through, but not limited to, the observation of the centrosome position, the Golgi apparatus structure (i.e. CGN and TGN), the network of vinculin, actin (e.g., the spatial distribution of actin filaments), and/or tubulin, the internal transport of molecule, or the spindle orientation.

In another embodiment, the method comprises an automated analysis of said cell(s) using an image analyser including a specific software using an algorithm designed for such analysis. More particularly, the specific software allows to perform the automated method described above.

5 Any kind of cell can be used in the present invention. Preferably, the cell is eukaryotic. Cell can be from animal, mammalian, human, or plant. Cell can be for example fibroblast, and hematopoietic, endothelial and epithelial cell. Cell can be derived from an healthy or pathologic tissue or organism. The cell can be wildtype or modified cells. In a particular example, the cell can be a tumor cell. For example, a gene can be inactivated and
10 these methods allow to identify the genes which are involved in the cell shape, in internal cell transport of molecules, in the global internal organization, in the compartmentation, in the spindle formation or orientation etc...

The present invention further concerns a method for determining if a cell has a transformed phenotype associated to a spindle misorientation. It can be an interesting
15 criteria for determining if the cell is a cancer cell. The method can comprises :

- providing a plate defining a surface and at least one adhesive pattern according to the present invention, preferably a device according to the present invention;
- contacting said adhesive patterns with cells to test for a period of time
20 sufficient to allow the cells to adhere to the adhesive patterns;
- growing the cells to test on the adhesive patterns; and
- determining the spindle orientation for each cell and comparing the spindle orientation of different cells;

a large spindle orientation dispersion indicating that the tested cell has a
25 transformed phenotype associated to a spindle misorientation.

A large spindle orientation dispersion is estimated in comparison with the spindle orientation dispersion for normal cells. Preferably, a large spindle orientation dispersion is an angle variation of at least of 20 °, more preferably at least of 30, 40 or 50 °.

The invention concerns the use of a device according to the present invention for
30 screening compounds of interest which modifies the cell shape, the global internal organization of the cell, the mitosis, or a function of the cell. The invention also concerns the use of a device according to the present invention for identify genes of interest which are involved the cell shape, the global internal organization of the cell, the mitosis, or a function of the cell. The invention further concerns the use of a device according to the

present invention for determining if a cell has lost its ability to control a proper orientation of the spindle.

The invention further concerns a method for screening compounds of interest using the device according to the present invention. Indeed, this device allows high-throughput
5 screening since the shape and the global internal organization of the cells are reproducible and rugged and the results record can be automated. This device allows to observe the effect of the test compounds on the cell shape, on the global internal organization of the cell or on a function of the cell.

More particularly, the invention concerns a method of selecting biologically active
10 compounds, said method comprising:

- providing a device according to the present invention;
- contacting said adhesive patterns with at least one cell for a period of time sufficient to allow the cell(s) to adhere to the adhesive patterns;
- contacting a test compound with said cell(s);
- 15 - growing the cell(s) on the adhesive patterns; and,
- observing the shape, the global internal cell organization, the mitosis, and/or a function of said cell(s).

In an alternative embodiment of the screening method, the cells can be grown on the adhesive patterns before to be contacted with the test compound. Thus, it can be
20 possible to evaluate the effect of the compound on the existing shape and organization of the cell.

Preferably, the method comprises an additional step of comparing the shape, the global internal cell organization and/or a function of said cell(s) with cells not contacted by said test compound. Optionally, said control cell can be contacted with a reference
25 compound with known effect.

The test compound may be of various origin, nature and composition. It may be any organic or inorganic substance, such as a lipid, peptide, polypeptide, nucleic acid, small molecule, etc., in isolated or in mixture with other substances. For instance, the test compound can be an antibody, an antisense oligonucleotide, or an RNAi. The compounds
30 may be all or part of a combinatorial library of products, for instance.

For example, compounds of interest can be compounds that inhibit or block mitosis or cell migration or that induces apoptosis. These compounds are useful for the treatment of cancer.

In non dividing cells, or during the interphase of dividing cells

The presence of a non adhesive area under the cell induces a reproducible cell type-specific distribution of adhesive structures and actin filaments. Because of the permanent interaction between the different components of the cytoskeleton, the localisation of FA
5 (Focal Adhesion) influences membrane protrusions where actin polymerizes as well as the dynamic organisation of the microtubule network, including the position of the centrosome where microtubules are nucleated. The whole Golgi structure at the center of the protein traffic, which is classically localised at the vicinity of the centrosome, is polarized from CGN (Cis Golgi Network) to TGN (Trans Golgi Network) not only locally, as observed in
10 classical culture conditions, but globally, at the whole organelle level. The Golgi apparatus is no longer distorted by cell flattening, but displays a concentric organization of the various compartments about the centrosome. This allows an easy comparison of the Golgi structure or activity from one cell to another. Similarly, it is very easy to probe drugs or genes which would have an effect, even a small one, on the position the centrosome,
15 whereas it is very difficult if not impossible to do it in classical culture conditions.

Cell division and mitotic spindle orientation

A very controlled orientation of the spindle axis can be obtained. The orientation of the metaphase plane and the tension between daughter-cells during cytokinesis are very
20 precisely induced by the proposed adhesive patterns. Cell divisions are thus controlled in space and time in a way which allows precise and quantitative comparisons between individual cells, and between cell types, either control or transformed cells. It is particularly convenient for the evaluation of drug effects, but can be used as well for gene inactivation analysis.

25

Further aspects and advantages of the present invention will be disclosed in the following experimental section, which should be regarded as illustrative and not limiting the scope of the present application.

CLAIMS

1 - A device for adhering at least one cell in a specific and predetermined position with a
5 controlled polarisation of the internal cell organization, comprising :

- a plate defining a surface; and,
- at least one anisotropic adhesive pattern on said surface, ,

10 wherein the size of said pattern is such that only one individual cell can adhere in said pattern with a controlled polarisation of the internal cell organization; and,

wherein the anisotropic adhesive pattern is either a concave adhesive pattern or a long and thin adhesive area with a shape factor of less than 0.6.

15 2- The device according to claim 1, wherein said adhesive pattern can be formed either of a single connected adhesive surface or of several non-connected adhesive surfaces.

3- The device according to any one of claims 1-3, wherein said adhesive pattern consists of a combination of adhesive elements selected from a line, a curve and a point.

20 4- The device according to any one of claims 1-4, wherein said anisotropic adhesive pattern is a concave adhesive pattern.

25 5- The device according to claim 4, wherein the convex envelope of said adhesive pattern comprises one or several adhesive lines or curves .

6- The device according to claim 5, wherein said convex envelope is a polygon.

7- The device according to claim 6, wherein said polygon is a triangle.

30 8- The device according to claim 7, wherein said triangle has two adhesive edges.

9- The device according to claim 8, wherein the angle between the two adhesive edges is about 90°.

10- The device according to claim 6, wherein said polygon is a quadrilateral.

11- The device according to claim 10, wherein said quadrilateral has two non-consecutive adhesive edges.

5

12- The device according to claim 10, wherein said quadrilateral has two consecutive adhesive edges and one adhesive corner.

13- The device according to any one of claims 1-12, wherein said device comprises a
10 plurality of adhesive patterns isolated from each others by cytophobic regions to which cells do not adhere.

14- The device according to claim 13, wherein said device comprises at least 100 adhesive patterns.

15

15- The device according to claim 14, wherein said device comprises between 5 000 and 15 000 adhesive patterns/cm².

16- The device according any one of claims 1-15, wherein the inscribed surface by the
20 adhesive pattern is essentially non adhesive.

17- A method for immobilizing a cell at a surface, said method comprising:

- providing a device according to any one of claims 1-16;
- exposing the plate to at least one cell for a period of time sufficient to
25 allow the cell(s) to bind to the adhesive pattern(s).

18- A method for controlling the cell shape and global internal cell organization, said method comprising:

- providing a device according to any one of claims 1-16;
- 30 - contacting said plurality of adhesive patterns with at least one cell for a period of time sufficient to allow the cell(s) to adhere to the adhesive patterns; and,

- growing the cell(s) on the adhesive patterns while allowing the form of the adhesive pattern to influence the shape of the cell and the polarisation of the cell machinery.

5 19- A method for studying the shape, the global internal cell organization, and/or a function of a cell, said method comprising :

- providing a device according to any one of claims 1-16;
- contacting said adhesive pattern(s) with at least one cell for a period of time sufficient to allow the cell(s) to adhere to the adhesive patterns;
- 10 - growing the cell(s) on the adhesive pattern(s); and,
- observing the shape, the global internal cell organization, the mitosis and/or a function of said cell(s).

20- A method of selecting biologically active compounds, said method comprising:

- 15 - providing a device according to any one of claims 1-16;
- contacting said adhesive patterns with at least one cell for a period of time sufficient to allow the cell(s) to adhere to the adhesive patterns;
- contacting a test compound with said cell(s);
- growing the cell(s) on the adhesive patterns; and,
- 20 - observing the shape, the global internal cell organization, the mitosis, and/or a function of said cell(s).

21- The method of claim 20, wherein said method comprises an additional step of comparing the shape, the global internal cell organization and/or a function of said cell(s)
25 with cells not contacted by said test compound.

22- The method of any one of claims 19-21, wherein the global internal cell organization is evaluated through the position of the centrosome and the position of the Golgi apparatus, the spatial distribution of actin filaments and/or the mitotic spindle orientation.

30

23- The method of any one of claims 19-22, wherein the method comprises an automated analysis of said cell(s) using an image analyser including a specific software using an algorithm designed for such analysis.

24- The method according to claim 23, wherein an automated analysis comprises :

- a) identifying the position of adhesive patterns on the plate;
- b) recording cell images at several times for several identified patterns;
- c) fitting an ellipse on the cell outline from cell images;
- 5 d) detecting the division time and determining the parameters of interest among which the spindle orientation.

25- A method for determining if a cell has a transformed phenotype associated to a spindle misorientation comprising :

- 10 - providing a device according to any one of claims 1-16;
- contacting said adhesive patterns with cells to test for a period of time sufficient to allow the cells to adhere to the adhesive patterns;
- growing the cells to test on the adhesive patterns;
- determining the spindle orientation for each cell and comparing the
- 15 spindle orientation of different cells;

a large spindle orientation dispersion indicating that the tested cell has a transformed phenotype associated to a spindle misorientation.

26- Use of a device according to any one of claims 1-16 for screening a compound of
20 interest.

27- Use of a device according to any one of claims 1-16 for identifying a gene of interest.

28- Use of a device according to any one of claims 1-16 for determining if a cell has lost
25 its ability to control a proper orientation of the spindle.

ANNEXE 3 - MOVIES LEGENDS

Au cours de ces travaux, nous avons été amenés à filmer les cellules, dans un but bien précis ou par simple curiosité. L'observation de ces films nous a donné énormément d'indices pour comprendre leur comportement. Bien souvent une expérience menée pour répondre à une question nous informait sur autre chose. Par exemple, en voulant séparer les deux cellules filles d'une façon reproductible et contrôlée, afin de manipuler le pont qui les sépare pendant la cytokinèse, nous avons observé pour la première fois qu'elles faisaient des fibres de rétraction en entrant en mitose. Et c'est ainsi que nous avons compris comment elles restaient sensibles à leur patron adhésif pendant la mitose.

Chaque film comporte des informations auxquelles certains sont sensibles et qui échappent à d'autres. Aujourd'hui, le regard que nous avons sur nos vieux films a beaucoup changé. Ce regard est éclairé car nous comprenons plus de choses, mais il est aussi détourné par tout ce que l'on croit comprendre, par ce que l'on attend des cellules. Chaque chercheur voit le film sous un angle différent. Nous avons donc décidé de mettre ces films à disposition pour que d'autres puissent y voir des choses nouvelles.

Ne pouvant joindre à ce manuscrit, un disque dur qui regrouperait les milliers de films réalisés pendant ces travaux, nous en avons choisi quelque-uns. Certains, comme les séries *Spindle Formation* ou *Division*, illustrent le propos de la thèse sur les divisions, les protrusions ou les fibres de rétraction. D'autres, comme les séries *Bridge Ruffles*, *Cytokinesis* ou *Keratocytes*, ou comme le film *Migration in a Cross Road*, ne sont même pas mentionnés dans ce manuscrit mais contiennent énormément d'informations que nous n'avons pas su ou pas eu le temps d'exploiter.

« Time interval » désigne la durée entre deux images et non la durée de tout le film.

Bridge Ruffles

Phase contrast acquisitions. HeLa cells.
Time interval is 5 minutes.

These movies show how the bridge is displaced in non ruffling part of the cell cortex from a ruffling zone to another where it gets stuck. Displacement of the bridge connections to the cell body occurs on non adhesive and non ruffling zones only.

Cell rounding and moving

Phase contrast acquisitions. HeLa cells.
Time interval is 5 minutes.

These movies show that cell can start rounding and also move backward while staying round. This suggests that retraction fibres are under tension and that this tension can affect the positioning of the mitotic cell.

Cytokinesis

Phase contrast acquisitions. HeLa cells.
Time interval is 5 minutes.

These movies show that the midbody moves close to one of the daughter cells before the abscission. The abscission seems associated to local protrusions.

Cytokinesis DNA bridge

Phase contrast acquisitions. HeLa cells.
Time interval is 5 minutes.

This movie show that the presence of DNA in the bridge prevent abscission and lead to binucleated cells.

Cytokinesis micropattern

Phase contrast acquisitions. HeLa cells.
Time interval is 5 minutes.

These movies illustrate how micropatterns could be used to study the role of space in cytokinesis. Abscission occurs as cells make a lot of protrusions close to the midbody.

Some protruding waves propagate along the elongated cell body of cells on rectangles or egg-timer shapes (movie 01 or 18 for example). Interestingly burst of protrusion regularly appeared close to the nucleus.

CNRS

HeLa cells plated on a CNRS pattern.

COS EB1

EB1-GFP acquisition. Time interval is 1s.

This movie shows microtubule plus end accumulation in ruffling zones and microtubules rerouting along non ruffling edges.

Division Astrocyte L

Phase contrast acquisitions. Interval is 5 minutes. Primary astrocyte of rat brain.

This is the only division of astrocyte we recorded on micropattern and it is orientated along the L hypotenuse.

Division blebbistatin

Phase contrast acquisitions. HeLa cells.
Time interval is 3 minutes.

Cells plated on L micropatterns were treated with 100 μ M of blebbistatin to inhibit the activity of myosin II. Cell rounding is much more slow. Metaphase plate often make large back and forth displacement in the mitotic cell instead of small oscillations around a central position as in control conditions. Interestingly the furrow could ingress but abscission failed. During constriction a “boulelet” formed around the furrow. The orientation of anaphase elongation was correct.

Division cytochalasin D

Phase contrast acquisitions. HeLa cells.
Time interval is 3 minutes.

Cells plated on L micropatterns were treated with 1 μ g/mL of cytochalasin D to disrupt the integrity of the actin shell. The spindle formed anyway, the metaphase plate can be assembled and its orientation is impaired but nor random. Cells go through anaphase A but did not elongate in anaphase B and the cytokinetic furrow did not ingress.

Division HeLa L

Phase contrast acquisitions.
Time interval is 5 minutes.

The anaphase elongation is orientated along the L hypotenuse.

Division HeLa triangle frame

Phase contrast acquisitions.
Time interval is 5 minutes.

The anaphase elongation is orientated along the triangle hypotenuse but the variability is higher than on L.

Divisions Micropatterns

Time-lapse acquisitions in 10x magnification phase contrast.
Time interval is 3 minutes.

HeLa cells were plated on different adhesive fibronectin micro-patterns after release from a thymidine bloc. Several movies are shown together in each case.

Each movie has been chosen and disposed in space in order to illustrate the main behaviour of the entire population. Movies start in order to see anaphase onset on the same picture for each micro-pattern. The first image shows the underlying fibronectin-Cy3 patterns. Scales : rectangle major length is 56 μ m, disc diameter is 29 μ m, triangle horizontal edge is 32 μ m.

Divisions Micropattern Asymmetric

Time-lapse acquisitions in 10x magnification phase contrast.
Time interval is 3 minutes.

HeLa cells were plated on [umbrella] after release from a thymidine bloc. The orientation of the umbrella is the same as in the figure 3.51. Note the ruffles along adhesive borders, the asymmetric orientation of the divisions and the positioning of the two daughter cells as shown in figure 3.53.

Divisions Micropatterns L PP2

Time-lapse acquisitions in 10x magnification phase contrast.
Time interval is 3 minutes.

Cells were plated on [L] and treated with 10 μ M PP2 before mitosis. Note the long block during metaphase and the mispositioning of metaphase plates and that half of the cells (lower panels) showed defects in cleavage furrow positioning and constriction leading to binucleated cells.

Division RPE1 L

Time-lapse acquisitions in 10x magnification phase contrast.
Time interval is 3 minutes.

RPE1 cells were plated on different adhesive fibronectin micro-patterns after release from a thymidine bloc. Several movies are shown together in each case. Each movie has been chosen and disposed in space in order to illustrate the main behaviour of the entire population. Movies start in order to see anaphase onset on the same picture for each micro-pattern. Note the reproducibility of the duration and orientation of mitosis.

EB1 L

Z acquisition and projection of GFP-EB1 in HeLa cells.
Time interval is 5 minutes.

These experiments with EB1 have been carrying on with Ariane Dimitrov.

Last picture shows the projection of all the movie in order to see microtubule plus-end trajectories.

This movie shows how microtubule plus ends are rerouted along cell edges towards cell apices where they accumulate.

Filopodia

The end of this movie shows how the contact of a filopodia with a fibronectin micropattern can guide cell spreading toward this area.

Free Mitosis

Phase contrast and Z acquisition and projection of GFP-centrin1 in HeLa cells plated on homogeneously fibronectin coated coverslip.

Time interval is 5 minutes.

This movies shows that centrosome splitting sometimes precedes cell retraction on these infinite adhesive substrates. It also shows that spindle is not always stable at the cell centre but can also be off-centred and move back and forth from one side to the other.

Fragile Mitosis

During mitosis cells are more fragile as it is shown on this movie where a cell induces the explosion of her neighbour while she tried to pass through mitosis.

HeLa embryogenesis

Phase contrast acquisition. HeLa cells going through two cycles of division.

Time interval is 6 minutes.

[L] were printed on a silanised PDMS layer rather instead of the usual glass coverslip.

The movies show reproducible behaviour of one, and then two three and four cells. After the first division each cell spreads on one of the adhesive bar. Then the two cells find another equilibrium in which both cells are elongated and contact the two bars. Then they enter mitosis again. Both orientations are along the L hypotenuse again. The pairs cross each other and find a new equilibrium. The way cells find a stable mechanical equilibrium and respond to adhesive cues even in a multicellular organisation remind cell spatial organisation in embryos where the space is constrained and the cortical cues are critical.

Keratocytes LowRes Small Square, Keratocytes LowRes Large Square

Phase contrast acquisition.

Time interval is 90 seconds : low temporal resolution

These experiments on keratocytes have been carrying on with Sebastien Schaub.

When the cell runs against a barrier (a non-adhesive barrier) the lamellipodium split into two separate half at the cell extremities. These half fuse back into a lamellipodium after the cells starts to move back.

Two types of movements can be seen in this limited space. One is the back and forth movement with front run into the edges ! this movement is often associated to lamellipodium splitting. The other is the circular migration along the pattern periphery.

Keratocytes HighRes Pentagone, Keratocytes HighRes Hexagone, Keratocytes HighRes Large Square, Keratocytes HighRes Small Square.

Phase contrast acquisition.

Time interval is 2 seconds : high temporal resolution

These experiments on keratocytes have been carrying on with Sebastien Schaub.

When the cell runs against a barrier (a non-adhesive barrier) the lamellipodium split into two separate half at the cell extremities. These half fuse back into a lamellipodium after the cells starts to move back.

These movies show the backward movement of the projected lamellipodium unable to attach in front of the cell.

There is a zone in the lamellipodium close to the pattern edge that appears more dense (black) in phase contrast, particularly during the backward movement of protrusions. This zone has always the same width.

MDCK

Phase contrast acquisitions. MDCK cells.

Time interval is 5 minutes.

MDCK round up completely when isolated, they position anywhere on the [L] in mitosis and divide randomly.

Migration in a cross road

Phase contrast acquisitions. RPE1 cells.

Time interval is 5 minutes.

This movies shows RPE1 migrating with their nucleus in the back, close to the retracting tail. It also highlights that cross roads are interesting situations to study migration persistence.

Mitotic pattern

Phase contrast microscopy and RICM of a mitotic cell.

Time interval is 1 minute.

The movie shows that the mitotic cells is still in contact with its previous attachment zone via the retraction fibres and that the mitotic cells is still in close contact with the substrate even when rounded.

Mother Daughters

Phase contrast acquisitions of HeLa cells (100x) during mitosis on silanised coverslip with low amount of serum in the medium. Time interval is 3 minutes.

These movies show the conservation of the adhesive pattern and location of protruding zones between the mother cells and the two daughters cells during mitosis.

Preliminary L

Phase contrast acquisitions. HeLa cells.

Time interval is 5 minutes.

Preliminary experiments of cell division on various L shape in order to determine the best shape to control spindle orientation.

Retraction fibres

Phase contrast. HeLa cells dividing on egg timer shaped micropattern.
Time interval is 5 minutes.

This movie shows that cells form retraction fibres at previous ruffling zones. The attachment of these fibres get larger during metaphase as visualised by the apparition of little black patches at the distal end of the fibres. After telophase cells pull and fill in the retraction fibres which thereby guide cells spreading.

Rocking metaphase cytochalasin D

Phase contrast acquisitions. HeLa cells on L treated with CD 1µg/mL.
Time interval is 5 minutes.

This movie has been taken while the coverslip was moving but nicely show a rocking metaphase plate in the mitotic cell treated with cytochalasin D.

Rocking metaphase PP2

Phase contrast acquisitions. HeLa cells on L treated with CD 1µg/mL.
Time interval is 5 minutes.

Thess movies show rocking metaphase plates in the mitotic cell treated with PP2 leading to misorientated division.

Ruffles RF

Phase contrast acquisitions. HeLa cells on silanised coverslip with low serum in the medium.
Time interval is 5 minutes.

These movies show that cells determine themselves their adhesive pattern. They make protrusions always at the same location. They will make retraction fibres at these locations when entering cell mitosis.

Spindle formation L NZ

Phase contrast and Z acquisition and projection of GFP-centrin1 in HeLa cells plated on [L].
Time interval is 5 minutes.

Cells were allowed to spread on micro-patterns in usual conditions then treated with 100 nM NZ. Cells rounded up but failed to assemble a metaphase plate. After NZ washout metaphase plates formed and the majority of them were correctly orientated prior to anaphase in spite of the spherical shape of the cell. Scale: triangle horizontal edge is 32µm.

Spindle formation L

Phase contrast and Z acquisition and projection of GFP-centrin1 in HeLa cells plated on [L].

Time interval is 5 minutes.

These movies illustrate clearly the main steps of spindle formation and positioning on L.

First, the duplicated centrosomes move together and then split precisely when the cell starts to retract.

Second, pole-pole axis is re-orientated after nuclear envelope breakdown. The final orientation of the spindle poles is set at the very end of the rounding.

Third, the spindle moves asymmetrically toward one side in metaphase and this movement is directly followed by anaphase. The orientation of anaphase elongation corresponds to spindle orientation in metaphase but not to its orientation during the late asymmetric movement that precedes anaphase.

Spindle formation Disc

Phase contrast and Z acquisition and projection of GFP-centrin1 in HeLa cells plated on [disc].

Time interval is 5 minutes.

One formed the spindle orientation is stable. Just before anaphase the spindle move toward the cell cortex.

Spindle formation L Asym Metaphase

Phase contrast and Z acquisition and projection of GFP-centrin1 in HeLa cells plated on [L]. Time interval is 5 minutes.

This movies shows a late re-orientation of the spindle in a cell which is almost round confirming the presence of cortical cues and the asymmetric displacement of the spindle in metaphase that precedes anaphase.

Spindle formation L929 L

Phase contrast and Z acquisition and projection of GFP-centrin1 in L929 cells plated on [L].

Time interval is 5 minutes.

Spindle formation L929 free

Phase contrast and Z acquisition and projection of GFP-centrin1 in L929 cells plated on [L].

Time interval is 5 minutes.

This movie shows two mitosis in which centrosomes splitting and positioning occurs a long time before cell rounding.

Spindle formation Late Bridge

Phase contrast and Z acquisition and projection of GFP-centrin1 in HeLa cells plated on [L].

Time interval is 5 minutes.

This movie shows a very late reorientation of the spindle, highlighting the presence of cortical cues, an asymmetric anaphase during which one pole is

moving to the cortex whereas the other remain stationary and eventually the movement of one centriole close to the cytokinetic bridge.

Spindle formation 3d L

Phase contrast and Z acquisition and projection of GFP-centrin1 in the three directions of HeLa cells on [L].

Time interval is 5 minutes.

These movies show the movement of the centrosomes pair, a late repositioning of the spindle after the nuclear envelope breakdown in the Z direction as well as in the XY plane and a symmetric metaphase and anaphase.

Spreading on micropatterns

Phase contrast microscopy overlaid with fibronectin-Cy3 micropatterns.

Time interval is 3 minutes.

When L929 cells land on the coverslip they either stay round between the patterns or spread on the patterns. By the end of the movie cells are suffering because of a temperature control malfunctioning...

Spreading RICM Fibro

Reflection Interference Contrast Microscopy. HeLa cells spreading on an homogeneously coated fibronectin coverslip.

Time interval is 10 seconds.

Black areas reveal intimate contact with the substrate. At the beginning the cell is round and not moving but it is not bound to the substrate. The cell makes many filopodia around her during the spreading.

Tension in retraction fibres

Phase contrast acquisitions. HeLa cells.

Time interval is 3 minutes.

Cells dividing in control conditions on infinite substrate coated with fibronectin and collagen. The vertically elongated cells enters in mitosis and rounds up in a highly asymmetric manner (first large arrow). Very long retraction fibres are formed on the lower side only (two thin arrows). The other side at the top is eventually detached from the substrate by the insistent contact of the second cell that moved towards and possibly under it (arrow-heads). As a result, the mitotic cell is violently pulled back before entering in anaphase. Images have been highly contrasted to show the retraction fibres (thin arrows). The movement of the round cells demonstrates that retraction fibres are under tension.

Z acquisition of retraction fibres

This is not a time lapse movie but a Z stack of pictures acquired every 0,2 μm showing from bottom to top the retraction fibres of a cell plated on an homogeneously fibronectin coated coverslip.

Z actin RPE1 on micropillars

This is not a time lapse movie but a Z stack of pictures acquired every 0,2 μm showing from top to bottom the actin network of a cell plated on an [L] printed on micropillars of PDMS.

This experiment has been performed by Emilie Dressaire.

It shows that the cell develops a strong stress fibre along the non adhesive hypotenuse. It also show that the cells is embedded in the pillars.

REFERENCES

- Abal, M., M. Piel, V. Bouckson-Castaing, M. Mogensen, J.B. Sibarita, and M. Bornens. 2002. Microtubule release from the centrosome in migrating cells. *J Cell Biol.* 159:731-7.
- Abercrombie, M., J.E. Heaysman, and S.M. Pegrum. 1971. The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp Cell Res.* 67:359-67.
- Ahringer, J. 2003. Control of cell polarity and mitotic spindle positioning in animal cells. *Curr Opin Cell Biol.* 15:73-81.
- Akhmanova, A., and C.C. Hoogenraad. 2005. Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr Opin Cell Biol.* 17:47-54.
- Akhmanova, A., C.C. Hoogenraad, K. Drabek, T. Stepanova, B. Dortland, T. Verkerk, W. Vermeulen, B.M. Burgering, C.I. De Zeeuw, F. Grosveld, and N. Galjart. 2001. Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell.* 104:923-35.
- Alsop, G.B., and D. Zhang. 2003. Microtubules are the only structural constituent of the spindle apparatus required for induction of cell cleavage. *J Cell Biol.* 162:383-90.
- Angers-Loustau, A., R. Hering, T.E. Werbowetski, D.R. Kaplan, and R.F. Del Maestro. 2004. SRC regulates actin dynamics and invasion of malignant glial cells in three dimensions. *Mol Cancer Res.* 2:595-605.
- Arthur, W.T., L.A. Petch, and K. Burridge. 2000. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol.* 10:719-22.
- Askham, J.M., K.T. Vaughan, H.V. Goodson, and E.E. Morrison. 2002. Evidence that an interaction between EB1 and p150(Glued) is required for the formation and maintenance of a radial microtubule array anchored at the centrosome. *Mol Biol Cell.* 13:3627-45.
- Baird, B., E.D. Sheets, and D. Holowka. 1999. How does the plasma membrane participate in cellular signaling by receptors for immunoglobulin E? *Biophys Chem.* 82:109-19.
- Balaban, N.Q., U.S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, and B. Geiger. 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol.* 3:466-72.
- Barret, C., C. Roy, P. Montcourrier, P. Mangeat, and V. Niggli. 2000. Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. *J Cell Biol.* 151:1067-80.
- Barros, C.S., C.B. Phelps, and A.H. Brand. 2003. Drosophila nonmuscle myosin II promotes the asymmetric segregation of cell fate determinants by cortical exclusion rather than active transport. *Dev Cell.* 5:829-40.
- Baumgart, T., S.T. Hess, and W.W. Webb. 2003. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature.* 425:821-4.
- Beaudouin, J., D. Gerlich, N. Daigle, R. Eils, and J. Ellenberg. 2002. Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell.* 108:83-96.
- Bei, Y., J. Hogan, L.A. Berkowitz, M. Soto, C.E. Rocheleau, K.M. Pang, J. Collins, and C.C. Mello. 2002. SRC-1 and Wnt signaling act together to specify endoderm and to control cleavage orientation in early *C. elegans* embryos. *Dev Cell.* 3:113-25.
- Bellaiche, Y., A. Radovic, D.F. Woods, C.D. Hough, M.L. Parmentier, C.J. O'Kane, P.J. Bryant, and F. Schweisguth. 2001. The Partner of Inscuteable/Discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Cell.* 106:355-66.

- Bement, W.M., H.A. Benink, and G. von Dassow. 2005. A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification. *J Cell Biol.* 170:91-101.
- Beningo, K., M. Dembo, I. Kaverina, V. Small, and Y. Wang. 2001. Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *JCB.* 153:881-887.
- Beningo K., W.Y. 2002. Flexible substrata for the detection of cellular traction forces. *Trends in cell biology.* 12:79-84.
- Beningo, K.A., M. Dembo, and Y.L. Wang. 2004. Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:18024-9.
- Berrueta, L., J.S. Tirnauer, S.C. Schuyler, D. Pellman, and B.E. Bierer. 1999. The APC-associated protein EB1 associates with components of the dynactin complex and cytoplasmic dynein intermediate chain. *Curr Biol.* 9:425-8.
- Bershadsky, A., Gluck, U., Denisenko, ON., Sklyarova, TV, Spector I. and Ben-Ze'ev A. 1995. The state of actin assembly regulates actin and vinculin expression by a feedback loop. *J. Cell Sci.* 108:1183-1193.
- Bershadsky, A.D., N.Q. Balaban, and B. Geiger. 2003. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19:677-95.
- Bjerknes, M. 1986. Physical theory of the orientation of astral mitotic spindles. *Science.* 234:1413-6.
- Bobola, N., R.P. Jansen, T.H. Shin, and K. Nasmyth. 1996. Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell.* 84:699-709.
- Bornens, M. 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.* 14:25-34.
- Bourguignon, L.Y., H. Zhu, L. Shao, D. Zhu, and Y.W. Chen. 1999. Rho-kinase (ROK) promotes CD44v(3,8-10)-ankyrin interaction and tumor cell migration in metastatic breast cancer cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 43:269-87.
- Braga, V.M. 2002. Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 14:546-56.
- Brangwynne, C., S. Huang, K.K. Parker, D.E. Ingber, and E. Ostuni. 2000. Symmetry breaking in cultured mammalian cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 36:563-5.
- Bretscher, A., K. Edwards, and R.G. Fehon. 2002. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:586-99.
- Briggs, M.W., and D.B. Sacks. 2003. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep.* 4:571-4.
- Bringmann, H., and A.A. Hyman. 2005. A cytokinesis furrow is positioned by two consecutive signals. *Nature.* 436:731-4.
- Brock, A., E. Chang, C.C. Ho, P. LeDuc, X. Jiang, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 2003. Geometric determinants of directional cell motility revealed using microcontact printing. *Langmuir.* 19:1611-7.
- Brown, R.A., R. Prajapati, D.A. McGrouther, I.V. Yannas, and M. Eastwood. 1998. Tensional homeostasis in dermal fibroblasts: mechanical responses to mechanical loading in three-dimensional substrates. *J Cell Physiol.* 175:323-32.
- Bryce, N.S., E.S. Clark, J.L. Leysath, J.D. Currie, D.J. Webb, and A.M. Weaver. 2005. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Curr Biol.* 15:1276-85.
- Bulinski, J.C., and G.G. Gundersen. 1991. Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *Bioessays.* 13:285-93.
- Burakov, A., E. Nadezhdina, B. Slepchenko, and V. Rodionov. 2003. Centrosome positioning in interphase cells. *J Cell Biol.* 162:963-9.

- Burridge, K., and K. Fath. 1989. Focal contacts: transmembrane links between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Bioessays*. 10:104-8.
- Burton, T. 1997. traction forces of cytokinesis measured with optically modified substrata. *Nature*. 385:450-454.
- Canman, J.C., L.A. Cameron, P.S. Maddox, A. Straight, J.S. Tirnauer, T.J. Mitchison, G. Fang, T.M. Kapoor, and E.D. Salmon. 2003. Determining the position of the cell division plane. *Nature*. 424:1074-8.
- Canman, J.C., D.B. Hoffman, and E.D. Salmon. 2000. The role of pre- and post-anaphase microtubules in the cytokinesis phase of the cell cycle. *Curr Biol*. 10:611-4.
- Cao, T.T., W. Chang, S.E. Masters, and M.S. Mooseker. 2004. Myosin-Va binds to and mechanochemically couples microtubules to actin filaments. *Mol Biol Cell*. 15:151-61.
- Cary, L.A., and J.L. Guan. 1999. Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. *Front Biosci*. 4:D102-13.
- Cary, L.A., R.A. Klinghoffer, C. Sachsenmaier, and J.A. Cooper. 2002. SRC catalytic but not scaffolding function is needed for integrin-regulated tyrosine phosphorylation, cell migration, and cell spreading. *Mol Cell Biol*. 22:2427-40.
- Cattaruzza, M., C. Lattrich, and M. Hecker. 2004. Focal adhesion protein zyxin is a mechanosensitive modulator of gene expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 43:726-30.
- Chen, C.S., J.L. Alonso, E. Ostuni, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 2003. Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochem Biophys Res Commun*. 307:355-61.
- Chen, C.S., M. Mrksich, S. Huang, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science*. 276:1425-8.
- Chevrier, V., M. Piel, N. Collomb, Y. Saoudi, R. Frank, M. Paintrand, S. Narumiya, M. Bornens, and D. Job. 2002. The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning. *J Cell Biol*. 157:807-17.
- Choquet, D., D. Felsenfeld, and S. M. 1997. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell*. 88:39-48.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and K. Burridge. 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol*. 133:1403-15.
- Cohen, D., P.J. Brenwald, E. Rodriguez-Boulan, and A. Musch. 2004. Mammalian PAR-1 determines epithelial lumen polarity by organizing the microtubule cytoskeleton. *J Cell Biol*. 164:717-27.
- Concha, M.L., and R.J. Adams. 1998. Oriented cell divisions and cellular morphogenesis in the zebrafish gastrula and neurula: a time-lapse analysis. *Development*. 125:983-94.
- Cook, T.A., T. Nagasaki, and G.G. Gundersen. 1998. Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J Cell Biol*. 141:175-85.
- Cowan, C.R., and A.A. Hyman. 2004. Asymmetric cell division in *C. elegans*: cortical polarity and spindle positioning. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:427-53.
- Cox, E.A., S.K. Sastry, and A. Huttenlocher. 2001. Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases. *Mol Biol Cell*. 12:265-77.
- Cramer, L., and T.J. Mitchison. 1993. Moving and stationary actin filaments are involved in spreading of postmitotic PtK2 cells. *J Cell Biol*. 122:833-43.
- Cramer, L.P., and T.J. Mitchison. 1995. Myosin is involved in postmitotic cell spreading. *J Cell Biol*. 131:179-89.

- Cramer, L.P., and T.J. Mitchison. 1997. Investigation of the mechanism of retraction of the cell margin and rearward flow of nodules during mitotic cell rounding. *Mol Biol Cell*. 8:109-19.
- Cuvelier, D., O. Rossier, P. Bassereau, and P. Nassoy. 2003. Micropatterned "adherent/repellent" glass surfaces for studying the spreading kinetics of individual red blood cells onto protein-decorated substrates. *Eur. Biophys. J.* 32:342-354.
- Cytrynbaum, E.N., J.M. Scholey, and A. Mogilner. 2003. A force balance model of early spindle pole separation in *Drosophila* embryos. *Biophys J.* 84:757-69.
- Cytrynbaum, E.N., P. Sommi, I. Brust-Mascher, J.M. Scholey, and A. Mogilner. 2005. Early spindle assembly in *Drosophila* embryos: role of a force balance involving cytoskeletal dynamics and nuclear mechanics. *Mol Biol Cell*. 16:4967-81.
- Daga, R.R., and F. Chang. 2005. Dynamic positioning of the fission yeast cell division plane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8228-32.
- Daly, R.J. 2004. Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem J.* 382:13-25.
- Dard, N., S. Louvet, A. Santa-Maria, J. Aghion, M. Martin, P. Mangeat, and B. Maro. 2001. In vivo functional analysis of ezrin during mouse blastocyst formation. *Dev Biol.* 233:161-73.
- Dard, N., S. Louvet-Vallee, A. Santa-Maria, and B. Maro. 2004. Phosphorylation of ezrin on threonine T567 plays a crucial role during compaction in the mouse early embryo. *Dev Biol.* 271:87-97.
- Davidson, L.A., B.G. Hoffstrom, R. Keller, and D.W. DeSimone. 2002. Mesendoderm extension and mantle closure in *Xenopus laevis* gastrulation: combined roles for integrin alpha(5)beta(1), fibronectin, and tissue geometry. *Dev Biol.* 242:109-29.
- del Pozo, M.A., N.B. Alderson, W.B. Kiosses, H.H. Chiang, R.G. Anderson, and M.A. Schwartz. 2004. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science.* 303:839-42.
- del Pozo, M.A., W.B. Kiosses, N.B. Alderson, N. Meller, K.M. Hahn, and M.A. Schwartz. 2002. Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol.* 4:232-9.
- del Pozo, M.A., L.S. Price, N.B. Alderson, X.D. Ren, and M.A. Schwartz. 2000. Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *Embo J.* 19:2008-14.
- Delanoe-Ayari, H., R. Al Kurdi, M. Vallade, D. Gulino-Debrac, and D. Riveline. 2004. Membrane and acto-myosin tension promote clustering of adhesion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
- DeMali, K.A., C.A. Barlow, and K. Burridge. 2002. Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol.* 159:881-91.
- DeMali, K.A., and K. Burridge. 2003. Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *J Cell Sci.* 116:2389-97.
- DeMali, K.A., K. Wennerberg, and K. Burridge. 2003. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 15:572-82.
- Desai, A., and T.J. Mitchison. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:83-117.
- Dikovskaya, D., J. Zumbunn, G.A. Penman, and I.S. Nathke. 2001. The adenomatous polyposis coli protein: in the limelight out at the edge. *Trends Cell Biol.* 11:378-84.
- Dogterom, M., J.W. Kerssemakers, G. Romet-Lemonne, and M.E. Janson. 2005. Force generation by dynamic microtubules. *Curr Opin Cell Biol.* 17:67-74.
- Drubin, D.G., and W.J. Nelson. 1996. Origins of cell polarity. *Cell.* 84:335-44.
- Du, Q., and I.G. Macara. 2004. Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell.* 119:503-16.

- Du, Q., P.T. Stukenberg, and I.G. Macara. 2001. A mammalian Partner of inscuteable binds NuMA and regulates mitotic spindle organization. *Nat Cell Biol.* 3:1069-75.
- du Roure, O., A. Saez, A. Buguin, R.H. Austin, P. Chavrier, P. Siberzan, and B. Ladoux. 2005. Force mapping in epithelial cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:2390-5.
- Dujardin, D.L., L.E. Barnhart, S.A. Stehman, E.R. Gomes, G.G. Gundersen, and R.B. Vallee. 2003. A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *J Cell Biol.* 163:1205-11.
- Dunn, G.A., D. Zicha, and P.E. Fraylich. 1997. Rapid, microtubule-dependent fluctuations of the cell margin. *J Cell Sci.* 110 (Pt 24):3091-8.
- Erickson, C.A., and J.P. Trinkaus. 1976. Microvilli and blebs as sources of reserve surface membrane during cell spreading. *Exp Cell Res.* 99:375-84.
- Etienne-Manneville, S. 2004a. Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic.* 5:470-7.
- Etienne-Manneville, S. 2004b. Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci.* 117:1291-300.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell.* 106:489-98.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 420:629-35.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2003. Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature.* 421:753-756.
- Euteneuer, U., and M. Schliwa. 1992. Mechanism of centrosome positioning during the wound response in BSC-1 cells. *J Cell Biol.* 116:1157-66.
- Faivre-Moskalenko, C., and M. Dogterom. 2002. Dynamics of microtubule asters in microfabricated chambers: the role of catastrophes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:16788-93.
- Faulkner, N.E., D.L. Dujardin, C.Y. Tai, K.T. Vaughan, C.B. O'Connell, Y. Wang, and R.B. Vallee. 2000. A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol.* 2:784-91.
- Fishkind, D.J., Cao, L., Wang, Y.L. 1991. Microinjection of the catalytic fragment of myosin light chain kinase into dividing cells : effects on mitosis and cytokinesis. *JCB.* 114:967-975.
- Flounders, A.W., D.L. Brandon, and A.H. Bates. 1997. Patterning of immobilized antibody layers via photolithography and oxygen plasma exposure. *Biosens Bioelectron.* 12:447-56.
- Folkman, J., and A. Moscona. 1978. Role of cell shape in growth control. *Nature.* 273:345-9.
- Fukata, M., T. Watanabe, J. Noritake, M. Nakagawa, M. Yamaga, S. Kuroda, Y. Matsuura, A. Iwamatsu, F. Perez, and K. Kaibuchi. 2002. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell.* 109:873-85.
- Galbraith, C.G., K.M. Yamada, and M.P. Sheetz. 2002. The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol.* 159:695-705.
- Gallant, N.D., K.E. Michael, and A.J. Garcia. 2005. Cell adhesion strengthening: contributions of adhesive area, integrin binding, and focal adhesion assembly. *Mol Biol Cell.* 16:4329-40.
- Geiger, B., and A. Bershadsky. 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Current opinion in Cell biology.* 13:584-592.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K.M. Yamada. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:793-805.
- Geiger, B., Bershadsky A. 2002. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell.* 110:139-142.

- Geldmacher-Voss, B., A.M. Reugels, S. Pauls, and J.A. Campos-Ortega. 2003. A 90-degree rotation of the mitotic spindle changes the orientation of mitoses of zebrafish neuroepithelial cells. *Development*. 130:3767-80.
- Ghosh, P.K., A. Vasanthi, G. Murugesan, S.J. Eppell, L.M. Graham, and P.L. Fox. 2002. Membrane microviscosity regulates endothelial cell motility. *Nat Cell Biol*. 4:894-900.
- Giancotti, F.G., and G. Tarone. 2003. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 19:173-206.
- Giannone, G., B.J. Dubin-Thaler, H.G. Dobereiner, N. Kieffer, A.R. Bresnick, and M.P. Sheetz. 2004. Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell*. 116:431-43.
- Giansanti, M.G., M. Gatti, and S. Bonaccorsi. 2001. The role of centrosomes and astral microtubules during asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts. *Development*. 128:1137-45.
- Gilmore, A.P., and K. Burridge. 1996. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature*. 381:531-5.
- Glogauer, M., P. Arora, G. Yao, I. Sokholov, J. Ferrier, and C.A. McCulloch. 1997. Calcium ions and tyrosine phosphorylation interact coordinately with actin to regulate cytoprotective responses to stretching. *J Cell Sci*. 110 (Pt 1):11-21.
- Glotzer, M. 2001. Animal cell cytokinesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 17:351-86.
- Goessl, A., D.F. Bowen-Pope, and A.S. Hoffman. 2001. Control of shape and size of vascular smooth muscle cells in vitro by plasma lithography. *J Biomed Mater Res*. 57:15-24.
- Goldstein, B. 1995. Cell contacts orient some cell division axes in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *J Cell Biol*. 129:1071-80.
- Gomes, E.R., S. Jani, and G.G. Gundersen. 2005. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell*. 121:451-63.
- Gomes, J.E., S.E. Encalada, K.A. Swan, C.A. Shelton, J.C. Carter, and B. Bowerman. 2001. The maternal gene *spn-4* encodes a predicted RRM protein required for mitotic spindle orientation and cell fate patterning in early *C. elegans* embryos. *Development*. 128:4301-14.
- Gomez-Mouton, C., J.L. Abad, E. Mira, R.A. Lacalle, E. Gallardo, S. Jimenez-Baranda, I. Illa, A. Bernad, S. Manes, and A.C. Martinez. 2001. Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *PNAS*. 08:9642-9647.
- Gonczy, P. 2002. Mechanisms of spindle positioning: focus on flies and worms. *Trends Cell Biol*. 12:332-9.
- Gonczy, P., S. Pichler, M. Kirkham, and A.A. Hyman. 1999. Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of MTOC positioning, including centrosome separation, in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo. *J Cell Biol*. 147:135-50.
- Goode, B.L., D.G. Drubin, and G. Barnes. 2000. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol*. 12:63-71.
- Graf, R., M. Freyberg, D. Kaiser, and P. Friedl. 2002. Mechanosensitive induction of apoptosis in fibroblasts is regulated by thrombospondin-1 and integrin associated protein (CD47). *Apoptosis*. 7:493-8.
- Grill, S.W., P. Gonczy, E.H. Stelzer, and A.A. Hyman. 2001. Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature*. 409:630-3.
- Grill, S.W., J. Howard, E. Schaffer, E.H. Stelzer, and A.A. Hyman. 2003. The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science*. 301:518-21.

- Grill, S.W., and A.A. Hyman. 2005. Spindle positioning by cortical pulling forces. *Dev Cell*. 8:461-5.
- Grinnell, F. 2003. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol*. 13:264-9.
- Grinnell, F., and M.K. Feld. 1982. Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J Biol Chem*. 257:4888-93.
- Gundersen, G.G. 2002. Evolutionary conservation of microtubule-capture mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:296-304.
- Gundersen, G.G., and J.C. Bulinski. 1988. Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:5946-50.
- Gundersen, G.G., and T.A. Cook. 1999. Microtubules and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 11:81-94.
- Gundersen, G.G., E.R. Gomes, and Y. Wen. 2004. Cortical control of microtubule stability and polarization. *Curr Opin Cell Biol*. 16:106-12.
- Guo, W., and F.G. Giancotti. 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:816-26.
- Han, B., X.H. Bai, M. Lodyga, J. Xu, B.B. Yang, S. Keshavjee, M. Post, and M. Liu. 2004. Conversion of mechanical force into biochemical signalling. *J Biol Chem*.
- Harder, T., P. Scheiffele, P. Verkade, and K. Simons. 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol*. 141:929-42.
- Hertwig, O. 1884. Das Problem der Befruchtung und der Isotropie des Eies, eine Theorie der Vererbung. *Jenaische Zeitschrift*.
- Hertzler, P.L., and W.H. Clark, Jr. 1992. Cleavage and gastrulation in the shrimp *Sicyonia ingentis*: invagination is accompanied by oriented cell division. *Development*. 116:127-40.
- Hinz, B., and G. Gabbiani. 2003. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol*. 14:538-46.
- Hirao, M., N. Sato, T. Kondo, S. Yonemura, M. Monden, T. Sasaki, Y. Takai, and S. Tsukita. 1996. Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol*. 135:37-51.
- Holy, T.E., and S. Leibler. 1994. Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:5682-5.
- Hu, S., L. Eberhard, J. Chen, J.C. Love, J.P. Butler, J.J. Fredberg, G.M. Whitesides, and N. Wang. 2004. Mechanical anisotropy of adherent cells probed by a three-dimensional magnetic twisting device. *Am J Physiol Cell Physiol*. 287:C1184-91.
- Huang, S., C.P. Brangwynne, K.K. Parker, and D.E. Ingber. 2005a. Symmetry-breaking in mammalian cell cohort migration during tissue pattern formation: role of random-walk persistence. *Cell Motil Cytoskeleton*. 61:201-13.
- Huang, S., C.S. Chen, and D.E. Ingber. 1998. Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. *Mol Biol Cell*. 9:3179-93.
- Huang, S., G. Eichler, Y. Bar-Yam, and D.E. Ingber. 2005b. Cell fates as high-dimensional attractor states of a complex gene regulatory network. *Phys Rev Lett*. 94:128701.
- Huang, S., and D.E. Ingber. 2000. Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. *Exp Cell Res*. 261:91-103.

- Hwang, E., J. Kusch, Y. Barral, and T.C. Huffaker. 2003. Spindle orientation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables. *J Cell Biol.* 161:483-8.
- Hyman, A.A. 1989. Centrosome movement in the early divisions of *Caenorhabditis elegans*: a cortical site determining centrosome position. *J Cell Biol.* 109:1185-93.
- Ingber, D.E. 2003a. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci.* 116:1157-73.
- Ingber, D.E. 2003b. Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci.* 116:1397-408.
- Ishizaki, T., Y. Morishima, M. Okamoto, T. Furuyashiki, T. Kato, and S. Narumiya. 2001. Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat Cell Biol.* 3:8-14.
- Itoh, K., K. Yoshioka, H. Akedo, M. Uehata, T. Ishizaki, and S. Narumiya. 1999. An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med.* 5:221-5.
- Ivetic, A., and A.J. Ridley. 2004. Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology.* 112:165-76.
- Jackman, R.J., J.L. Wilbur, and G.M. Whitesides. 1995. Fabrication of submicrometer features on curved substrates by microcontact printing. *Science.* 269:664-6.
- Jamora, F. 2002. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *nature cell biology.* 4:101.
- Jan, Y.N., and L.Y. Jan. 2001. Asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2:772-9.
- Jiang, X., D.A. Bruzewicz, A.P. Wong, M. Piel, and G.M. Whitesides. 2005. Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:975-8.
- Jiang, X., R. Ferrigno, M. Mrksich, and G.M. Whitesides. 2003. Electrochemical desorption of self-assembled monolayers noninvasively releases patterned cells from geometrical confinements. *J Am Chem Soc.* 125:2366-7.
- Joberty, G., C. Petersen, L. Gao, and I.G. Macara. 2000. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol.* 2:531-9.
- Jones, R.J., V.G. Brunton, and M.C. Frame. 2000. Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. *Eur J Cancer.* 36:1595-606.
- Kaltschmidt, J.A., C.M. Davidson, N.H. Brown, and A.H. Brand. 2000. Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. *Nat Cell Biol.* 2:7-12.
- Katoh, K., Y. Kano, M. Amano, H. Onishi, K. Kaibuchi, and K. Fujiwara. 2001. Rho-kinase-mediated contraction of isolated stress fibers. *J Cell Biol.* 153:569-84.
- Katz, B.Z., E. Zamir, A. Bershadsky, Z. Kam, K.M. Yamada, and B. Geiger. 2000. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell.* 11:1047-60.
- Kaverina, I., O. Krylyshkina, K. Beningo, K. Anderson, Y.L. Wang, and J.V. Small. 2002. Tensile stress stimulates microtubule outgrowth in living cells. *J Cell Sci.* 115:2283-91.
- Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small. 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol.* 146:1033-44.
- Kaverina, I., K. Rottner, and J.V. Small. 1998. Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions. *J Cell Biol.* 142:181-90.
- Kempiak, S.J., H. Yamaguchi, C. Sarmiento, M. Sidani, M. Ghosh, R.J. Eddy, V. Desmarais, M. Way, J. Condeelis, and J.E. Segall. 2005. A neural Wiskott-Aldrich Syndrome

- protein-mediated pathway for localized activation of actin polymerization that is regulated by cortactin. *J Biol Chem.* 280:5836-42.
- Kishi, H., J. Bao, and K. Kohama. 2000. Inhibitory effects of ML-9, wortmannin, and Y-27632 on the chemotaxis of vascular smooth muscle cells in response to platelet-derived growth factor-BB. *J Biochem (Tokyo).* 128:719-22.
- Knoblich, J.A. 2001. Asymmetric cell division during animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:11-20.
- Kodama, A., I. Karakesisoglou, E. Wong, A. Vaezi, and E. Fuchs. 2003. ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell.* 115:343-54.
- Komarova, Y.A., I.A. Vorobjev, and G.G. Borisy. 2002. Life cycle of MTs: persistent growth in the cell interior, asymmetric transition frequencies and effects of the cell boundary. *J Cell Sci.* 115:3527-39.
- Korinek, W.S., M.J. Copeland, A. Chaudhuri, and J. Chant. 2000. Molecular linkage underlying microtubule orientation toward cortical sites in yeast. *Science.* 287:2257-9.
- Kotani, H., K. Takaishi, T. Sasaki, and Y. Takai. 1997. Rho regulates association of both the ERM family and vinculin with the plasma membrane in MDCK cells. *Oncogene.* 14:1705-13.
- Kowalski, J.R., C. Egile, S. Gil, S.B. Snapper, R. Li, and S.M. Thomas. 2005. Cortactin regulates cell migration through activation of N-WASP. *J Cell Sci.* 118:79-87.
- Kruse, K., and F. Julicher. 2000. Actively contracting bundles of polar filaments. *Phys Rev Lett.* 85:1778-81.
- Krylyshkina, O., K.I. Anderson, I. Kaverina, I. Upmann, D.J. Manstein, J.V. Small, and D.K. Toomre. 2003. Nanometer targeting of microtubules to focal adhesions. *J Cell Biol.* 161:853-9.
- Labbe, J.C., P.S. Maddox, E.D. Salmon, and B. Goldstein. 2003. PAR proteins regulate microtubule dynamics at the cell cortex in *C. elegans*. *Curr Biol.* 13:707-14.
- Labbe, J.C., E.K. McCarthy, and B. Goldstein. 2004. The forces that position a mitotic spindle asymmetrically are tethered until after the time of spindle assembly. *J Cell Biol.* 167:245-56.
- Lauffenburger, D.A., and A.F. Horwitz. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 84:359-69.
- Le Borgne, R., Y. Bellaiche, and F. Schweisguth. 2002. Drosophila E-cadherin regulates the orientation of asymmetric cell division in the sensory organ lineage. *Curr Biol.* 12:95-104.
- Lee, J.H., T. Katakai, T. Hara, H. Gonda, M. Sugai, and A. Shimizu. 2004. Roles of p-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation. *J Cell Biol.* 167:327-37.
- Lele, T.P., J. Pendse, S. Kumar, M. Salanga, J. Karavitis, and D.E. Ingber. 2005. Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells. *J Cell Physiol.*
- Leung, B., G.J. Hermann, and J.R. Priess. 1999. Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev Biol.* 216:114-34.
- Leung, C.L., K.J. Green, and R.K. Liem. 2002. Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends Cell Biol.* 12:37-45.
- Levina, E., M. Kharitonova, Y. Rovinsky, and J. Vasiliev. 2001. Cytoskeletal control of fibroblast length: experiments with linear strips of substrate. *Journal of Cell Science.* 114:4335-4341.
- Liakopoulos, D., J. Kusch, S. Grava, J. Vogel, and Y. Barral. 2003. Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment. *Cell.* 112:561-74.

- Ligon, L.A., S. Karki, M. Tokito, and E.L. Holzbaur. 2001. Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. *Nat Cell Biol.* 3:913-7.
- Lin, D., A.S. Edwards, J.P. Fawcett, G. Mbamalu, J.D. Scott, and T. Pawson. 2000. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol.* 2:540-7.
- Lo, C.M., H.B. Wang, M. Dembo, and Y.L. Wang. 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J.* 79:144-52.
- Louvet, S., J. Aghion, A. Santa-Maria, P. Mangeat, and B. Maro. 1996. Ezrin becomes restricted to outer cells following asymmetrical division in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol.* 177:568-79.
- Lu, B., F. Roegiers, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2001. Adherens junctions inhibit asymmetric division in the *Drosophila* epithelium. *Nature.* 409:522-5.
- Lua, B.L., and B.C. Low. 2005. Cortactin phosphorylation as a switch for actin cytoskeletal network and cell dynamics control. *FEBS Lett.* 579:577-85.
- Lyczak, R., J.E. Gomes, and B. Bowerman. 2002. Heads or tails: cell polarity and axis formation in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Dev Cell.* 3:157-66.
- Mack, P.J., M.R. Kaazempur-Mofrad, H. Karcher, R.T. Lee, and R.D. Kamm. 2004. Force-induced focal adhesion translocation: effects of force amplitude and frequency. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287:C954-62.
- Mackay, D.J., F. Esch, H. Furthmayr, and A. Hall. 1997. Rho- and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts: an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins. *J Cell Biol.* 138:927-38.
- Maddox, A.S., and K. Burridge. 2003. RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding. *J Cell Biol.* 160:255-65.
- Magdalena, J., T.H. Millard, and L.M. Machesky. 2003. Microtubule involvement in NIH 3T3 Golgi and MTOC polarity establishment. *J Cell Sci.* 116:743-56.
- Mandato, C.A., H.A. Benink, and W.M. Bement. 2000. Microtubule-actomyosin interactions in cortical flow and cytokinesis. *Cell Motil Cytoskeleton.* 45:87-92.
- Manes, S., E. Mira, C. Gomez-Mouton, R.A. Lacalle, P. Keller, J.P. Labrador, and A.C. Martinez. 1999. Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells. *Embo J.* 18:6211-20.
- Marsden, M., and D.W. DeSimone. 2001. Regulation of cell polarity, radial intercalation and epiboly in *Xenopus*: novel roles for integrin and fibronectin. *Development.* 128:3635-47.
- Martin, P., and S.M. Parkhurst. 2004. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development.* 131:3021-34.
- McBeath, R., D.M. Pirone, C.M. Nelson, K. Bhadriraju, and C.S. Chen. 2004. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell.* 6:483-95.
- Mendoza, M., C. Norden, and Y. Barral. 2005. Division-plane positioning: microtubules strike back. *Curr Biol.* 15:R595-7.
- Meng, W., M. Numazaki, K. Takeuchi, Y. Uchibori, Y. Ando-Akatsuka, M. Tominaga, and T. Tominaga. 2004. DIP (mDia interacting protein) is a key molecule regulating Rho and Rac in a Src-dependent manner. *Embo J.* 23:760-71.
- Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:56-68.
- Miyamoto, S., H. Teramoto, O.A. Coso, J.S. Gutkind, P.D. Burbelo, S.K. Akiyama, and K.M. Yamada. 1995. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol.* 131:791-805.

- Moorman, J.P., D. Luu, J. Wickham, D.A. Bobak, and C.S. Hahn. 1999. A balance of signaling by Rho family small GTPases RhoA, Rac1 and Cdc42 coordinates cytoskeletal morphology but not cell survival. *Oncogene*. 18:47-57.
- Mrksich. 1998. Tailored substrates for studies of attached cell culture. *Cell. Mol. Life Sci.* 54:653-662.
- Mrksich, M., C.S. Chen, Y. Xia, L.E. Dike, D.E. Ingber, and G.M. Whitesides. 1996. Controlling cell attachment on contoured surfaces with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:10775-8.
- Mrksich, M., L.E. Dike, J. Tien, D.E. Ingber, and G.M. Whitesides. 1997. Using microcontact printing to pattern the attachment of mammalian cells to self-assembled monolayers of alkanethiolates on transparent films of gold and silver. *Exp Cell Res.* 235:305-13.
- Mukherjee, S., and F.R. Maxfield. 2004. Membrane domains. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:839-66.
- Munro, E., J. Nance, and J.R. Priess. 2004. Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *C. elegans* embryo. *Dev Cell.* 7:413-24.
- Murata-Hori, M., and Y.L. Wang. 2002. Both midzone and astral microtubules are involved in the delivery of cytokinesis signals: insights from the mobility of aurora B. *J Cell Biol.* 159:45-53.
- Nakamura, M., X.Z. Zhou, and K.P. Lu. 2001. Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Curr Biol.* 11:1062-7.
- Nance, J., E.M. Munro, and J.R. Priess. 2003. *C. elegans* PAR-3 and PAR-6 are required for apicobasal asymmetries associated with cell adhesion and gastrulation. *Development.* 130:5339-50.
- Nathke, I.S., C.L. Adams, P. Polakis, J.H. Sellin, and W.J. Nelson. 1996. The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J Cell Biol.* 134:165-79.
- Nelson, C., and C. Chen. 2002. Cell-cell signaling by direct contact increase cell proliferation via a PI3K-dependent signal. *FEBS Letters.* 514:238-242.
- Nelson, C.M., R.P. Jean, J.L. Tan, W.F. Liu, N.J. Sniadecki, A.A. Spector, and C.S. Chen. 2005. Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:11594-9.
- Nelson, W.J. 2003. Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature.* 422:766-74.
- Nishizawa M., T.K., Matsue T. 2002. Micropatterning of HeLa cells on glass substrates and evaluation of respiratory activity using microelectrodes. *Langmuir*:PAGE EST:4.3.
- Noritake, J., T. Watanabe, K. Sato, S. Wang, and K. Kaibuchi. 2005. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci.* 118:2085-92.
- Novak, I.L., B.M. Slepchenko, A. Mogilner, and L.M. Loew. 2004. Cooperativity between cell contractility and adhesion. *Phys Rev Lett.* 93:268109.
- Obergfell, A., K. Eto, A. Mocsai, C. Buensuceso, S.L. Moores, J.S. Brugge, C.A. Lowell, and S.J. Shattil. 2002. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $[\alpha]I\text{Ib}[\beta]3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 157:265-75.
- O'Brien, L.E., M.M. Zegers, and K.E. Mostov. 2002. Opinion: Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:531-7.
- O'Connell, C., and Y. Wang. 2000. Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion. *Mol. Biol. Cell.* 11:1765-1774.

- Oegema, K., and T.J. Mitchison. 1997. Rappaport rules: cleavage furrow induction in animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:4817-20.
- Oliferenko, S., I. Kaverina, J.V. Small, and L.A. Huber. 2000. Hyaluronic acid (HA) binding to CD44 activates Rac1 and induces lamellipodia outgrowth. *J Cell Biol*. 148:1159-64.
- Oliferenko, S., K. Paiha, T. Harder, V. Gerke, C. Schwarzler, H. Schwarz, H. Beug, U. Gunthert, and L.A. Huber. 1999. Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*. 146:843-54.
- Omelchenko, T., J.M. Vasiliev, I.M. Gelfand, H.H. Feder, and E.M. Bonder. 2002. Mechanisms of polarization of the shape of fibroblasts and epitheliocytes: Separation of the roles of microtubules and Rho-dependent actin-myosin contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:10452-7.
- Palazzo, A.F., T.A. Cook, A.S. Alberts, and G.G. Gundersen. 2001a. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol*. 3:723-9.
- Palazzo, A.F., C.H. Eng, D.D. Schlaepfer, E.E. Marcantonio, and G.G. Gundersen. 2004. Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science*. 303:836-9.
- Palazzo, A.F., H.L. Joseph, Y.J. Chen, D.L. Dujardin, A.S. Alberts, K.K. Pfister, R.B. Vallee, and G.G. Gundersen. 2001b. Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr Biol*. 11:1536-41.
- Pande, G. 2000. The role of membrane lipids in regulation of integrin functions. *Curr Opin Cell Biol*. 12:569-74.
- Parent, C.A., and P.N. Devreotes. 1999. A cell's sense of direction. *Science*. 284:765-70.
- Parker, K.K., A.L. Brock, C. Brangwynne, R.J. Mannix, N. Wang, E. Ostuni, N.A. Geisse, J.C. Adams, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 2002. Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *Faseb J*. 16:1195-204.
- Parsons, J.T. 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*. 116:1409-16.
- Paszek, M.J., N. Zahir, K.R. Johnson, J.N. Lakins, G.I. Rozenberg, A. Gefen, C.A. Reinhart-King, S.S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D.A. Hammer, and V.M. Weaver. 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*. 8:241-54.
- Pearson, C.G., and K. Bloom. 2004. Dynamic microtubules lead the way for spindle positioning. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:481-92.
- Pelham, R.J., Jr., and Y. Wang. 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:13661-5.
- Peng, C.Y., L. Manning, R. Albertson, and C.Q. Doe. 2000. The tumour-suppressor genes *Igl* and *dlg* regulate basal protein targeting in *Drosophila* neuroblasts. *Nature*. 408:596-600.
- Perez, F., G.S. Diamantopoulos, R. Stalder, and T.E. Kreis. 1999. CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell*. 96:517-27.
- Peterson, L.J., Z. Rajfur, A.S. Maddox, C.D. Freel, Y. Chen, M. Edlund, C. Otey, and K. Burridge. 2004. Simultaneous stretching and contraction of stress fibers in vivo. *Mol Biol Cell*. 15:3497-508.
- Pickering, S.J., B. Maro, M.H. Johnson, and J.N. Skepper. 1988. The influence of cell contact on the division of mouse 8-cell blastomeres. *Development*. 103:353-63.
- Piehl, M., Tulu, U.S., Wadsworth, P., Cassimeris, L. 2004. Centrosome maturation : measurement of microtubule nucleation throughout the cell cycle by using GFP-tagged EB1. *PNAS*. 101:1584-1588.

- Piel, M., P. Meyer, A. Khodjakov, C.L. Rieder, and M. Bornens. 2000. The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J Cell Biol.* 149:317-30.
- Playford, M.P., and M.D. Schaller. 2004. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene.* 23:7928-46.
- Polte, T.R., G.S. Eichler, N. Wang, and D.E. Ingber. 2004. Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286:C518-28.
- Prime, K.L., and G.M. Whitesides. 1991. Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science.* 252:1164-7.
- Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zimond, A. Bretscher, and C. Boone. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science.* 297:612-5.
- Quist, A.P., E. Pavlovic, and S. Oscarsson. 2005. Recent advances in microcontact printing. *Anal Bioanal Chem.* 381:591-600.
- Rappaport, R. 1961. Experiments concerning the cleavage stimulus in sand dollar eggs. *J Exp Zool.* 148:81-9.
- Rappaport, R. 1985. Repeated furrow formation from a single mitotic apparatus in cylindrical sand dollar eggs. *J Exp Zool.* 234:167-71.
- Raucher, D., T. Stauffer, W. Chen, K. Shen, S. Guo, J.D. York, M.P. Sheetz, and T. Meyer. 2000. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell.* 100:221-8.
- Reilein, A., and W.J. Nelson. 2005. APC is a component of an organizing template for cortical microtubule networks. *Nat Cell Biol.* 7:463-73.
- Reinsch, S., and P. Gonczy. 1998. Mechanisms of nuclear positioning. *J Cell Sci.* 111 (Pt 16):2283-95.
- Resh, M.D. 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1451:1-16.
- Revenu, C., R. Athman, S. Robine, and D. Louvard. 2004. The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:635-46.
- Ridley, A.J. 2001. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci.* 114:2713-22.
- Ridley, A.J., and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 70:389-99.
- Ridley, A.J., H.F. Paterson, C.L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 70:401-10.
- Ritchie, K., R. Iino, T. Fujiwara, K. Murase, and A. Kusumi. 2003. The fence and picket structure of the plasma membrane of live cells as revealed by single molecule techniques (Review). *Mol Membr Biol.* 20:13-8.
- Riveline, D., E. Zamir, N.Q. Balaban, U.S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, and A.D. Bershadsky. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol.* 153:1175-86.
- Rodriguez, O.C., A.W. Schaefer, C.A. Mandato, P. Forscher, W.M. Bement, and C.M. Waterman-Storer. 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol.* 5:599-609.
- Rodriguez-Boulau, E., G. Kreitzer, and A. Musch. 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:233-47.
- Rodriguez-Boulau, E., A. Musch, and A. Le Bivic. 2004. Epithelial trafficking: new routes to familiar places. *Curr Opin Cell Biol.* 16:436-42.

- Roegiers, F., and Y.N. Jan. 2004. Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol.* 16:195-205.
- Rosenblatt, J., L.P. Cramer, B. Baum, and K.M. McGee. 2004. Myosin II-dependent cortical movement is required for centrosome separation and positioning during mitotic spindle assembly. *Cell.* 117:361-72.
- Rosenfeldt, H., and F. Grinnell. 2000. Fibroblast quiescence and the disruption of ERK signaling in mechanically unloaded collagen matrices. *J Biol Chem.* 275:3088-92.
- Rottner, K., A. Hall, and J.V. Small. 1999. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol.* 9:640-8.
- Salina, D., K. Bodoor, D.M. Eckley, T.A. Schroer, J.B. Rattner, and B. Burke. 2002. Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown. *Cell.* 108:97-107.
- Salmon, W.C., M.C. Adams, and C.M. Waterman-Storer. 2002. Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells. *J Cell Biol.* 158:31-7.
- Sanger, J.M., Reingold, A., Sanger, J.W. 1984. Cell surface changes during mitosis and cytokinesis of epithelial cells. *Cell and Tissue Research.* 237:409-417.
- Sastry, S.K., and K. Burridge. 2000. Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp Cell Res.* 261:25-36.
- Sawada, Y., and M.P. Sheetz. 2002. Force transduction by Triton cytoskeletons. *J Cell Biol.* 156:609-15.
- Sawhney, R.K., and J. Howard. 2004. Molecular dissection of the fibroblast-traction machinery. *Cell Motil Cytoskeleton.* 58:175-85.
- Schaefer, M., A. Shevchenko, and J.A. Knoblich. 2000. A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr Biol.* 10:353-62.
- Seveau, S., Eddy, R.J., Maxfield, F.R., Pierini, L.M. 2001. Cytoskeleton-dependent membrane domain segregation during neutrophil polarization. *Molecular Biology of the Cell.* 12:3550-3562.
- Severson, A.F., and B. Bowerman. 2003. Myosin and the PAR proteins polarize microfilament-dependent forces that shape and position mitotic spindles in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol.* 161:21-6.
- Shannon, K.B., J.C. Canman, C. Ben Moree, J.S. Tirnauer, and E.D. Salmon. 2005. Taxol-stabilized microtubules can position the cytokinetic furrow in mammalian cells. *Mol Biol Cell.* 16:4423-36.
- Sheetz, M.P. 2001. Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:392-6.
- Shima, T., S. Nada, and M. Okada. 2003. Transmembrane phosphoprotein Cbp senses cell adhesion signaling mediated by Src family kinase in lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:14897-902.
- Singhvi, R., A. Kumar, G.P. Lopez, G.N. Stephanopoulos, D.I. Wang, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 1994. Engineering cell shape and function. *Science.* 264:696-8.
- Small, J.V., B. Geiger, I. Kaverina, and A. Bershadsky. 2002. How do microtubules guide migrating cells? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:957-64.
- Small, J.V., and I. Kaverina. 2003. Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr Opin Cell Biol.* 15:40-7.
- Sohrmann, M., and M. Peter. 2003. Polarizing without a c(1)ue. *Trends Cell Biol.* 13:526-33.
- Spargo, B.J., M.A. Testoff, T.B. Nielsen, D.A. Stenger, J.J. Hickman, and A.S. Rudolph. 1994. Spatially controlled adhesion, spreading, and differentiation of endothelial cells on self-assembled molecular monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:11070-4.
- Srivastava, J., B.E. Elliott, D. Louvard, and M. Arpin. 2005. Src-dependent Ezrin Phosphorylation in Adhesion-mediated Signaling. *Mol Biol Cell.*

- Stamenovic, D., S.M. Mijailovich, I.M. Tolic-Norrelykke, J. Chen, and N. Wang. 2002. Cell prestress. II. Contribution of microtubules. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282:C617-24.
- Straight, A.F., A. Cheung, J. Limouze, I. Chen, N.J. Westwood, J.R. Sellers, and T.J. Mitchison. 2003. Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science.* 299:1743-7.
- Strome, S. 1993. Determination of cleavage planes. *Cell.* 72:3-6.
- Suzuki, K., and K. Takahashi. 2003. Reduced cell adhesion during mitosis by threonine phosphorylation of beta1 integrin. *J Cell Physiol.* 197:297-305.
- Tan, J.L., J. Tien, D. Pirone, D. Gray, K. Bhadriraju, and C.S. Chen. 2003. Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *PNAS.* 100:1484-1489.
- Tatosyan, A.G., and O.A. Mizenina. 2000. Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry (Mosc).* 65:49-58.
- Theriot, J.A. 2000. The polymerization motor. *Traffic.* 1:19-28.
- Thorsen, T., S.J. Maerkl, and S.R. Quake. 2002. Microfluidic large-scale integration. *Science.* 298:580-4.
- Tominaga, T., E. Sahai, P. Chardin, F. McCormick, S.A. Courtneidge, and A.S. Alberts. 2000. Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signaling. *Mol Cell.* 5:13-25.
- Tran, P.T., L. Marsh, V. Doye, S. Inoue, and F. Chang. 2001. A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *J Cell Biol.* 153:397-411.
- Tsou, M.F., A. Hayashi, and L.S. Rose. 2003a. LET-99 opposes Galpha/GPR signaling to generate asymmetry for spindle positioning in response to PAR and MES-1/SRC-1 signaling. *Development.* 130:5717-30.
- Tsou, M.F., W. Ku, A. Hayashi, and L.S. Rose. 2003b. PAR-dependent and geometry-dependent mechanisms of spindle positioning. *J Cell Biol.* 160:845-55.
- Tsukita, S., K. Oishi, N. Sato, J. Sagara, and A. Kawai. 1994. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol.* 126:391-401.
- Vallee, R.B., and S.A. Stehman. 2005. How dynein helps the cell find its center: a servomechanical model. *Trends Cell Biol.* 15:288-94.
- van Beneden, E. 1883. Recherches sur la maturation de l'œuf, la fécondation et la division cellulaire. *Arch Biology.* 4:265-658.
- Vasanji, A., P.K. Ghosh, L.M. Graham, S.J. Eppell, and P.L. Fox. 2004. Polarization of plasma membrane microviscosity during endothelial cell migration. *Dev Cell.* 6:29-41.
- Vasiliev, J.M., Omelchenko, T., Gelfand, I.M., Feder, H.H., Bonder, E.M. 2004. Rho overexpression leads to mitosis-associated detachment of cells from epithelial sheets: A link to the mechanism of cancer dissemination. *PNAS.* 101:12526-12530.
- Wadsworth, P. 1999. Regional regulation of microtubule dynamics in polarized, motile cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 42:48-59.
- Waller, B.J., and A.S. Alberts. 2003. The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 13:435-46.
- Wang, A.Z., G.K. Ojakian, and W.J. Nelson. 1990. Steps in the morphogenesis of a polarized epithelium. I. Uncoupling the roles of cell-cell and cell-substratum contact in establishing plasma membrane polarity in multicellular epithelial (MDCK) cysts. *J Cell Sci.* 95 (Pt 1):137-51.
- Wang, H.B., M. Dembo, and Y.L. Wang. 2000. Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279:C1345-50.
- Wang, N., J.P. Butler, and D.E. Ingber. 1993. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science.* 260:1124-7.

- Wang, N., and D.E. Ingber. 1994. Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension. *Biophys J.* 66:2181-9.
- Wang, N., E. Ostuni, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 2002a. Micropatterning tractional forces in living cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 52:97-106.
- Wang, N., I.M. Tolic-Norrelykke, J. Chen, S.M. Mijailovich, J.P. Butler, J.J. Fredberg, and D. Stamenovic. 2002b. Cell prestress. I. Stiffness and prestress are closely associated in adherent contractile cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282:C606-16.
- Wang, S.W., F.J. Griffin, and W.H. Clark, Jr. 1997. Cell-cell association directed mitotic spindle orientation in the early development of the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Development.* 124:773-80.
- Wang, Y., E.L. Botvinick, Y. Zhao, M.W. Berns, S. Usami, R.Y. Tsien, and S. Chien. 2005. Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature.* 434:1040-5.
- Watanabe, T., S. Wang, J. Noritake, K. Sato, M. Fukata, M. Takefuji, M. Nakagawa, N. Izumi, T. Akiyama, and K. Kaibuchi. 2004. Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev Cell.* 7:871-83.
- Waterman-Storer, C.M., and E. Salmon. 1999. Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility. *Curr Opin Cell Biol.* 11:61-7.
- Wedlich-Soldner, R., and R. Li. 2003. Spontaneous cell polarization: undermining determinism. *Nat Cell Biol.* 5:267-70.
- Wedlich-Soldner R., A.S., Wu L., Li R. 2003. Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42-GTPase. *Science.* 299:1231-1235.
- Weed, S.A., and J.T. Parsons. 2001. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene.* 20:6418-34.
- Wen, Y., C.H. Eng, J. Schmoranzer, N. Cabrera-Poch, E.J. Morris, M. Chen, B.J. Wallar, A.S. Alberts, and G.G. Gundersen. 2004. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 6:820-30.
- Wheelock, M.J., and K.R. Johnson. 2003. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 15:509-14.
- White, J.G. 1985. The astral relaxation theory of cytokinesis revisited. *Bioessays.* 2:267-272.
- Whitesides, G.M., E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, and D.E. Ingber. 2001. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu Rev Biomed Eng.* 3:335-73.
- Wilson, E.B. 1925. *The cell in development and heredity.* Macmillan, New-York.
- Xia, Y., E. Kim, X.M. Zhao, J.A. Rogers, M. Prentiss, and G.M. Whitesides. 1996. Complex Optical Surfaces Formed by Replica Molding Against Elastomeric Masters. *Science.* 273:347-9.
- Yamaguchi, R., Y. Mazaki, K. Hirota, S. Hashimoto, and H. Sabe. 1997. Mitosis specific serine phosphorylation and downregulation of one of the focal adhesion protein, paxillin. *Oncogene.* 15:1753-61.
- Yamakita, Y., G. Totsukawa, S. Yamashiro, D. Fry, X. Zhang, S.K. Hanks, and F. Matsumura. 1999. Dissociation of FAK/p130(CAS)/c-Src complex during mitosis: role of mitosis-specific serine phosphorylation of FAK. *J Cell Biol.* 144:315-24.
- Yeaman, C., K.K. Grindstaff, and W.J. Nelson. 1999. New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev.* 79:73-98.
- Yonemura, S., M. Hirao, Y. Doi, N. Takahashi, T. Kondo, and S. Tsukita. 1998. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol.* 140:885-95.

- Yonemura, S., T. Matsui, and S. Tsukita. 2002. Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *J Cell Sci.* 115:2569-80.
- Yoshigi, M., L.M. Hoffman, C.C. Jensen, H.J. Yost, and M.C. Beckerle. 2005. Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *J Cell Biol.* 171:209-15.
- Yoshizaki, H., Y. Ohba, K. Kurokawa, R.E. Itoh, T. Nakamura, N. Mochizuki, K. Nagashima, and M. Matsuda. 2003. Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J Cell Biol.* 162:223-32.
- Yvon, A.M., D.J. Gross, and P. Wadsworth. 2001. Antagonistic forces generated by myosin II and cytoplasmic dynein regulate microtubule turnover, movement, and organization in interphase cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:8656-61.
- Zaidel-Bar, R., C. Ballestrem, Z. Kam, and B. Geiger. 2003. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci.* 116:4605-13.
- Zamir, E., and B. Geiger. 2001. Components of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 114:3577-9.
- Zhelev, D.V., and R.M. Hochmuth. 1995. Mechanically stimulated cytoskeleton rearrangement and cortical contraction in human neutrophils. *Biophys J.* 68:2004-14.
- Zheng, Y. 2004. G protein control of microtubule assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:867-94.
- Zimmerman, B., T. Volberg, and B. Geiger. 2004. Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motil Cytoskeleton.* 58:143-59.
- Zumbrunn, J., K. Kinoshita, A.A. Hyman, and I.S. Nathke. 2001. Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr Biol.* 11:44-9.