



HAL
open science

Influence des propriétés mécaniques du substrat sur l'adhésion et la migration cellulaire

Marion Ghibaudo

► **To cite this version:**

Marion Ghibaudo. Influence des propriétés mécaniques du substrat sur l'adhésion et la migration cellulaire. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2008. Français. NNT : 2008PA077164 . tel-00345790v2

HAL Id: tel-00345790

<https://theses.hal.science/tel-00345790v2>

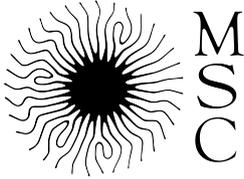
Submitted on 10 Dec 2008

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



Influence des propriétés mécaniques du substrat sur la migration et l'adhésion cellulaire

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 4 décembre 2008

pour l'obtention du

Doctorat de l'Université Paris Diderot (Paris 7)
(spécialité Interface Physique-Biologie)

par

Marion Ghibaudo

Jury composé de :

Président : Didier Châtenay (*Laboratoire De Physique Statistique, Paris*)

Rapporteurs : Pierre Bongrand (*Laboratoire d'Immunologie, Marseille*)
Albrecht Ott (*Université de Sarrebruck, Allemagne*)

Directeurs de thèse : Jean-Marc Di Meglio (*Laboratoire MSC et Université Paris Diderot*)
Benoît Ladoux (*Laboratoire MSC et Université Paris Diderot*)

Examinatrices : Kris Dahl (*Carnegie Mellon University, Etats-Unis*)
Cécile Sykes (*Institut Curie, Paris*)

Remerciements

Les remerciements constituent sans doute la partie la plus délicate de la rédaction : lus par approximativement tout le monde, impossible d'oublier quelqu'un. Je vais donc m'efforcer d'accomplir cette gageure.

Le choix mutuel du directeur de thèse et du doctorant est un exercice qui peut s'avérer périlleux et pour lequel je n'ai jamais oublié les conseils d'un certain Serge Le Goff, enseignant de physique, que j'ai suivi scrupuleusement. Ses conseils étaient sans aucun doute les meilleurs, et j'ai eu la chance de pouvoir concilier l'intérêt maximal du sujet et un encadrement que je n'aurais sans doute pas trouvé ailleurs, ce qui est souvent mission impossible. Benoît a toujours été présent, pour 30 secondes de remise sur les rails ou pour plusieurs heures de brainstorming. Toujours soucieux du bien-être de ses ouailles, il a également été présent lors de la période noire de ma thèse. Ces qualités, doublé de son talent pour dénicher des financements, m'ont permis d'évoluer dans un environnement propice. Merci de m'avoir supporté pendant ces trois années passées, dans tous les sens du terme. Jean-Marc, malgré son emploi du temps plus que chargé en tant que directeur du laboratoire et enseignant-chercheur, a toujours pris le temps de s'assurer que tout allait bien. Merci pour ton attention, notamment lors de la rédaction de ce manuscrit, que tu as relu avec beaucoup de soin, et lors de la préparation de la soutenance.

Je tiens également à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'examiner mon travail. Les deux rapporteurs, Pierre Bongrand et Albrecht Ott, ont accepté la mission, malgré un délai plutôt raccourci. Merci pour toute l'attention que vous avez portée à mon travail. Didier Chatenay a accepté de présider ce jury. Merci et j'espère moi aussi qu'un jour on pourra savoir ce qui se cache vraiment derrière la mécanotransduction. Les hasards de la vie ont mis plusieurs fois Cécile Sykes sur mon chemin. Son rôle a été clé, notamment il y a cinq ans lorsque je l'ai vu présenter son travail de recherche en tant qu'« ancienne ». C'est là que j'ai su de façon concrète que cette idée floue, ce domaine mélange de physique et de biologie, existait. Merci de m'avoir ouvert les portes de ton labo pour une visite, et de m'avoir guidée vers le fameux DEA « Interface Physique-Biologie ». Ta participation à ce jury était pour moi évidente.

J'ai eu la chance, grâce à Yu-Li Wang, de pouvoir entrer en contact avec Kris Dahl, spécialiste de la mécanique du noyau. Kris, with your tremendous enthusiasm, you

believed in the project immediately. I hope that this collaboration will go very far, and I thank you to have crossed the ocean for this defence. Meeting you was such a pleasure !

Ce travail, réalisé au sein du laboratoire Matière et Systèmes Complexes, n'aurait pas été aussi agréable sans l'entourage quotidien, d'autant plus pendant ces années mouvementées lors du déménagement sur le nouveau campus. Merci tout d'abord à l'équipe Physique du Vivant pour votre sens scientifique ainsi que votre gentillesse, notamment à Charlotte, François, Pascal, Sylvie d'avoir accepté de servir de cobayes. Merci également aux utilisateurs du labo 513. Sans Alain, pas de cellules. Merci pour ton professionnalisme, ta gentillesse « tonton Al ». Sans toi, la face du labo en serait changée. Nathalie, et son accent chantant, est venue renforcer les biologistes du labo. Merci pour ta gentillesse, ton soutien et l'amplification de plasmides.

COMSOL n'a pas de secret pour lui, merci Philippe de m'avoir permis d'appréhender certaines notions de ce logiciel surpuissant, avec toute ta patience et ton sourire.

Merci également aux mécaniciens, Manuel d'abord pour avoir fait des merveilles avec des plans pas toujours à l'échelle, Jean-Louis et Alexandre pour leur rapidité et leur super boulot.

Merci à tout le secrétariat, Carole, Claudine, Danielle et Nadine, pour toute la partie administrative.

J'ai eu la chance de pouvoir goûter à l'enseignement, grâce à un monitorat. Merci à Guillaume et Sandra pour avoir toujours pris le temps de répondre à toutes mes questions et donc d'avoir guidé ces pas.

Je tiens également à remercier Yves Charon, directeur de l'École doctorale Constituants Élémentaires <-> Systèmes Complexes d'avoir été présent tout au long de ces années, notamment à une période délicate de ma thèse.

Grâce à l'ARC, j'ai obtenu un financement pour achever mon travail. Merci d'avoir fait confiance à notre projet. Merci également à l'AFM qui m'avait également fait confiance.

Axel Buguin et Pascal Silberzan sont les collaborateurs historiques de l'équipe. Merci notamment à Axel pour sa relecture attentive du manuscrit et à Pascal pour ses conseils sur la fabrication des *wafers*.

Les belles images de microscopie confocale ont été réalisées à la plate-forme d'imagerie de l'Institut Jacques Monod. Merci pour vos conseils judicieux lors de ces acquisitions et pour votre gentillesse.

David Montero est l'artisan des images de microscopie électronique. Merci pour ton savoir faire et les longues heures passées dans le noir à observer des plots, recouverts ou non de cellules. Le résultat m'a toujours fascinée.

Isabelle Roch-Jeune à l'Institut d'Électronique, de Micro-électronique et de Nanotechnologies de Lille (IEMN) a permis de réaliser les *wafers* à une distance raison-

nable du laboratoire. Merci pour ton accueil toujours chaleureux, tes conseils et ton professionnalisme. Les machines en salle blanche se sont parfois montrées capricieuses, mais nous avons toujours réussi à les vaincre.

L'ambiance est également le fait des autres doctorants et post-doctorants du laboratoire. Merci tout d'abord à ceux qui m'ont accueillie lorsque je suis arrivée au laboratoire encore à Jussieu, et pour la place qu'ils m'ont faite dans leur bureau : Delphine, Pascal, Axel et bien sûr Alexandre, maître es plots grâce à qui ces derniers n'ont plus eu de secrets pour moi. Cette première année a été idéale, tu as toujours répondu à mes innombrables questions et après ton départ, j'étais bien armée pour affronter les plots seules. Je n'oublie pas Nico et François, pour toutes nos discussions à Jussieu puis à Condorcet. Merci également à Léa, arrivée l'an dernier. J'ai vraiment apprécié de pouvoir partager la salle de manip et le bureau avec toi !

Les « petits jeunes » ont aussi, depuis un an, contribué à recréer un environnement propice avec moi, dernière des « LBHP-Canal historique ». Merci à Damien, Démosthène, Guillaume, Mickaël pour les discussions enflammées et bonne chance aux petits nouveaux, Amsha, Ester, Félix, Jimmy.

Christine, you helped me during a lot during your internship at the end of my work. Thank you so much, and I wish you good luck in medical school at Urbana-Champaign. It was a pleasure to supervise you.

Dans la vie, il n'y a pas que le labo. Merci donc à mes amis, notamment les « co-thésards » Anne, Lionel, Séb pour nos partages d'expériences mais également Alice, Angélique, Charlotte, Estelle, Julien, Laure, Maud, Pierre, Séb, Séverine, Simon-Pierre et les grumeaux pour toutes ces dernières années. Merci également aux anciens IPB, et plus particulièrement Myriam et Aurélie.

Je tiens à remercier Isa et Laure, elles savent pourquoi. Je n'oublie pas Marie et l'autre Isabelle, pour nos escapades parlementaires qu'on va reprendre sous peu.

Merci à Caroline, Danielle et Jean-Louis, d'être tout simplement vous. Merci notamment pour les deux semaines de rédaction intensive où vous m'avez chouchoutée avec cette gentillesse qui vous caractérise si bien.

Merci à mes parents de m'avoir donné le goût de l'effort, à ma grand'mère qui me comprend si bien et à mes soeurs, Claire et Camille d'avoir fondé avec moi le trio qui fait bloc.

Last but not least, merci à Jérôme. Ton regard sur mon travail, avec toute ta rigueur scientifique m'a parfois... agacé, mais m'a aussi permis de m'interroger toujours plus. Merci d'être resté toi-même, dans les bons comme dans les mauvais moments.

Préambule

Les premières études sur substrats texturés ont été réalisées dès les années 40. Cependant, à l'époque, il avait été dit que l'orientation privilégiée était due à l'orientation des substrats au niveau moléculaire (Weiss, 1945). Une autre hypothèse fut avancée près de 20 ans après : les cellules ne réagiraient pas à une orientation au niveau moléculaire mais aux paramètres physiques du substrat tels que sa courbure (Curtis et Varde, 1964). Ces études étaient notamment justifiées par le fait qu'*in vivo*, les cellules rencontrent des substrats orientés, naturels tels que les fibres de collagène, selon lesquels elles s'orientent, ou artificiels comme les prothèses, dont les surfaces ne peuvent être parfaitement lisses. Les études sur l'influence de la hauteur, de l'espacement et de la forme des motifs se multiplièrent dans les années qui suivirent, grâce notamment aux techniques apportées par la micro-électronique : il était possible de faire varier les dimensions sur de larges gammes, et d'atteindre notamment des échelles submicroniques.

En parallèle, l'hypothèse a été émise que les cellules, en migrant, exerçaient des forces sur leur substrat. Cependant, ces forces étaient supposées très faibles et ne pouvaient être détectées facilement, même par micromanipulation. L'idée de déposer les cellules sur un substrat que les cellules pourraient déformer a émergé et a été concrétisée par Harris *et al.* (1980). Grâce à ces substrats transparents, non toxiques, et traitables chimiquement, on a pu visualiser les contraintes exercées par les cellules sur leur substrat.

Cependant, ces substrats ne permettaient pas de quantifier les forces. En effet, les rides observées dépassent largement la taille de la cellule et donc il n'est pas possible de connaître le déplacement sous la cellule. Sur le même principe ont donc été utilisés des substrats déformables (mais non plissables) et calibrés (Lee *et al.*, 1994). On peut donc observer les déformations et les quantifier, en fonction de la rigidité du substrat (Dembo et Wang, 1999; Lo *et al.*, 2000). Par la suite, sur le même principe, ont été développés des substrats qui présentent l'inconvénient d'être discontinus mais l'avantage de pouvoir cartographier facilement les forces à partir des déplacements mesurés : des micro-piliers élastiques. Ils ont pu être réalisés grâce à la combinaison des deux techniques précédentes, la microfabrication et les substrats élastiques (Tan *et al.*, 2003).

Ces études de l'influence des propriétés mécaniques du substrat (courbure, rigidité) ont évolué en parallèle avec les techniques de biologie cellulaire et moléculaire.

Leurs possibilités ont été élargies notamment à l'aide des rapporteurs de l'activité cellulaire que sont les protéines-fusion, basées sur la Green Fluorescent Protein (GFP)¹. On a alors pu coupler les variations des propriétés mécaniques de l'environnement cellulaire à l'analyse du phénotype cellulaire à l'échelle sub-cellulaire. Les progrès dans le domaine de l'optique et de l'acquisition de données ont fortement contribué à l'étude des phénomènes sub-cellulaires : on pouvait donc suivre à une cadence supérieure à une image par seconde le cheminement intracellulaire des molécules d'intérêt.

Ces techniques, provenant à la fois des matériaux et de la biologie, ont permis de développer les études à l'interface de la physique et de la biologie : on peut par exemple exercer une force sur une cellule et étudier le recrutement de protéines du cytosquelette (Riveline *et al.*, 2001; Icard-Arcizet *et al.*, 2008).

Dans cette étude, nous avons combiné les techniques de microfabrication et les substrats élastiques pour étudier l'influence de topographie sur la migration, l'adhésion et l'étalement cellulaire.

Nous allons commencer par détailler la cellule et ses composants principaux. Nous poursuivrons par la présentation des différents résultats obtenus antérieurement lors de l'étude de l'influence de la rigidité puis de la topographie sur le comportement cellulaire. Nous détaillerons ensuite les techniques que nous avons employées dans cette étude.

Nous présenterons alors nos résultats. Tout d'abord, l'influence de la rigidité et de l'orientation du substrat sur les forces exercées et sur la migration de fibroblastes. Ensuite, l'influence de la topographie sur la migration cellulaire et les fonctions cellulaires. Enfin, l'étude de l'étalement cellulaire dans un environnement topographié élastique.

1. découvertes qui ont été récompensées par le prix Nobel de chimie en octobre 2008

Table des matières

Remerciements	iii
Préambule	vii
I Introduction générale : la cellule dans son environnement	1
1 La migration cellulaire	5
1.1 Composition de la cellule	6
1.1.1 Le noyau et ses propriétés mécaniques	6
1.1.2 Le cytosquelette	8
1.1.3 Les adhésions focales	17
1.2 Les fibroblastes : rôle et modèle de migration	20
1.3 Migration et adhésion sur substrat indéformable	22
1.3.1 Les oscillations lors de l'étalement cellulaire	22
1.3.2 Les mécanismes de la migration	23
1.3.3 Les limitations physiologiques du substrat indéformable	25
2 Rôles de la rigidité dans les mécanismes cellulaires	27
2.1 Mesures de forces à l'aide de substrats déformables passifs	28
2.1.1 Généralités	28
2.1.2 Influence de la rigidité sur les fonctions cellulaires	32
2.2 Influences des contraintes extérieures exercées sur la cellule	40
2.2.1 Renforcement du cytosquelette d'actine	41
2.2.2 Renforcement des adhésions focales	42
2.2.3 Modélisation de l'influence des forces et de la rigidité	44
2.3 Les limitations physiologiques du substrat à 2D	47
3 La migration cellulaire à trois dimensions	49
3.1 Anisotropie de la matrice	50
3.1.1 Composition des gels 3D : propriétés physiques et chimiques	50
3.1.2 Adhésions à trois dimensions	52
3.2 La migration cellulaire à trois dimensions	54

3.2.1	La migration amiboïde	54
3.2.2	La migration mésenchymateuse	55
3.3	Rôle de la topographie dans le comportement cellulaire	56
3.3.1	Texturation de surface : le guidage par contact	56
3.3.2	Substrats artificiels : plots 3D élastiques	60
3.4	Conclusion	61
 II Fabrication des substrats, acquisition et analyse		63
 4 Microfabrication et utilisation des substrats de micro-piliers		65
4.1	Techniques de fabrication des plots	66
4.1.1	La photolithographie	66
4.1.2	La gravure profonde par ions réactifs ou DRIE	68
4.2	Préparation de l'élastomère	69
4.2.1	Démoulage du PDMS	70
4.2.2	Amélioration du substrat	71
4.3	Traitement du PDMS	72
4.4	Conditions expérimentales de l'utilisation des plots	74
 5 Description des dispositifs de vidéomicroscopie optiques employés		77
5.1	Microscopie optique	78
5.1.1	Principes généraux	78
5.1.2	La microscopie par épifluorescence	78
5.1.3	Montages employés	79
5.2	Microscopie confocale à balayage	81
 6 Modèle par éléments finis : COMSOL		83
6.1	Principes généraux	84
6.1.1	Contrainte, déformations et élasticité	84
6.1.2	Relation d'équilibre	85
6.2	Fabrication du modèle de plots dans un socle en PDMS	85
 III Résultats		89
 7 Influence de la rigidité du substrat et des forces		91
7.1	Influence de la rigidité du substrat	92
7.2	Relation force-raideur	95
7.3	Comparaison avec les substrats semi-infinis élastiques	96
7.4	Étalement cellulaire et taille des adhésions focales	98
7.5	La migration est influencée par la rigidité	102
7.6	Résultats des simulations par COMSOL	103

7.6.1	Relation force-déplacement	103
7.6.2	Influence de la déflexion du plot sur le comportement du socle	104
7.7	Conclusion	105
8	Influence de la topographie sur les fibroblastes	107
8.1	Rôle de la hauteur des piliers	108
8.1.1	Morphologie cellulaire dans les plots	109
8.1.2	Migration	111
8.1.3	Cytosquelette	119
8.2	Rôle de l'espace entre les plots	124
8.2.1	Notion d'espace limite	124
8.2.2	Influence du noyau	126
8.3	Conclusion	128
9	Étalement cellulaire dans un environnement « 3D »	131
9.1	Modes opératoires employés	132
9.2	Morphologie lors de l'étalement cellulaire	132
9.3	Analyse temporelle de l'étalement cellulaire	136
9.3.1	Substrats texturés adhésifs	137
9.3.2	Contrôles	145
9.4	Conclusion : proposition de modèle d'étalement	147
	Conclusion générale	151
	Bibliographie	155
	Annexes	163
	Protocoles	163
	Confocal : montage employé	171
	Notations et abréviations	173
	Articles publiés et soumis	175

Première partie

Introduction générale : la cellule dans son environnement

La cellule eucaryote, et plus particulièrement de mammifères, constitue un modèle d'étude privilégié pour pouvoir comprendre le fonctionnement des organismes entiers encore plus complexes. *In vivo*, l'environnement cellulaire est essentiellement tridimensionnel et varie énormément d'un type cellulaire à un autre. La rigidité, la topographie et la composition physico-chimique sont des paramètres importants qui influent sur les différentes fonctions cellulaires comme l'adhésion, la migration ou encore la différenciation. Nous commencerons donc dans cette partie par détailler la composition de la cellule eucaryote et présenter les cellules que nous avons employées dans nos expériences (les fibroblastes). Nous expliquerons ensuite le comportement cellulaire à deux dimensions (2D) à la fois sur substrats synthétiques indéformable et déformable et les limites de ces systèmes modèles. Nous aborderons enfin les modifications induites lors du passage à un environnement à trois dimensions (3D).

Chapitre 1

La migration cellulaire

Sommaire

1.1	Composition de la cellule	6
1.1.1	Le noyau et ses propriétés mécaniques	6
1.1.2	Le cytosquelette	8
1.1.3	Les adhésions focales	17
1.2	Les fibroblastes : rôle et modèle de migration	20
1.3	Migration et adhésion sur substrat indéformable	22
1.3.1	Les oscillations lors de l'étalement cellulaire	22
1.3.2	Les mécanismes de la migration	23
1.3.3	Les limitations physiologiques du substrat indéformable	25

Certaines lignées cellulaires, notamment les cellules cancéreuses, ont la faculté de se déplacer, aussi bien *in vivo* (c'est le phénomène observé lors de la propagation des métastases cancéreuses) qu'*in vitro*. La compréhension de ce phénomène de migration permettrait de bloquer ce phénomène et donc constituerait une piste pour limiter la progression des métastases. L'étude approfondie de la machinerie cellulaire, tant dans sa composition que dans les relations entre ses différents composants, est nécessaire pour ensuite étudier l'influence de l'environnement extérieur.

1.1 Composition de la cellule

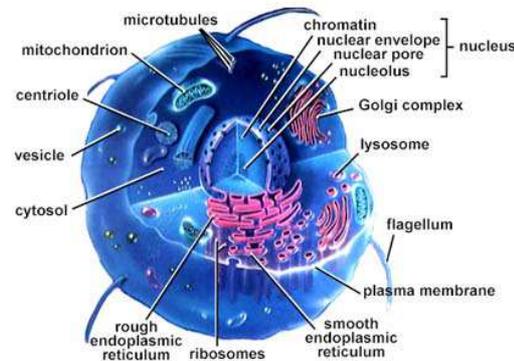


FIGURE 1.1 – Schéma simplifié d'une cellule eucaryote, d'après Audesirk et Audesirk (1998)

La cellule, longtemps vue comme la brique élémentaire de tout être vivant, est elle-même composée de plusieurs compartiments tels que le noyau, le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi, lieux de fabrication et de maturation des protéines mais aussi en vésicules permettant l'importation et la translocation de constituants entre la cellule et l'extérieur. Cette compartimentation permet d'isoler des composants de natures différentes, en pH, en ions et d'avoir des sous-unités indépendantes, telles que les mitochondries, véritables usines produisant l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule. On trouve par ailleurs dans le cytoplasme des macromolécules telles des protéines, sous forme de complexes de tailles diverses, ou les acides ribonucléiques (ARN) en cours de traduction, mais aussi des molécules plus petites, telles que des glucides et des acides nucléiques. La figure 1.1 reprend les principaux composants de la cellule. Ces différents composants interagissent entre eux, les signaux extérieurs modifiant l'expression protéique à l'intérieur de la cellule. Nous allons nous attacher à détailler les différents composants qui interviennent dans les étapes de migration et d'étalement, qu'il s'agisse d'une organelle comme le noyau ou de protéines situées dans le cytoplasme.

1.1.1 Le noyau et ses propriétés mécaniques

Le noyau est la plus grosse organelle contenue dans une cellule (par exemple le noyau mesure environ $20 \mu\text{m}$ de diamètre dans les 3T3, lignée de fibroblastes), encapsulant à l'intérieur d'une double membrane le matériel génétique nécessaire à la division cellulaire et à la synthèse de protéines. Au cours de la mitose, il grossit puis lors de la cytokinèse se scinde en deux parties contenant chacune le même nombre de chromosomes. Les deux membranes sont reliées par des pores nucléaires, qui vont

permettre d'échanger des acides ribonucléiques (ARN) vers le réticulum endoplasmique où se fait la synthèse protéique mais aussi le trafic de macromolécules entre le cytoplasme et le noyau. L'intérieur de la membrane interne est tapissé de filaments intermédiaires décrits dans le paragraphe 1.1.2, les lamines. Les deux membranes et les lamines sont les constituants principaux de l'enveloppe nucléaire.

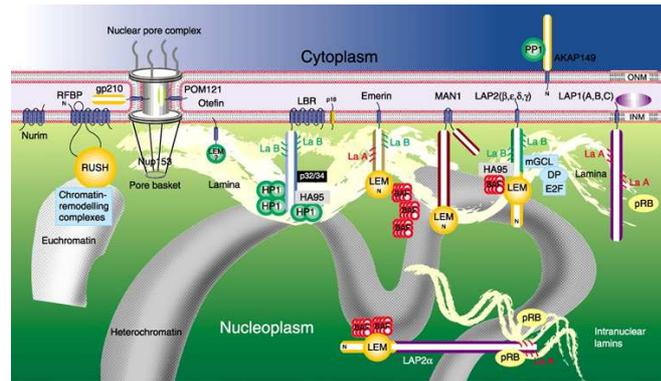


FIGURE 1.2 – La structure de la membrane nucléaire, d'après Foisner (2001)

Il existe deux grands types de lamines : les lamines A et B¹. Leurs fonctions sont complémentaires : les lamines B sont exprimées dans la plupart des cellules, embryonnaires ou non, et sont indispensables pour l'intégrité cellulaire et un développement normal impliquant la réplication de l'ADN et la régulation des facteurs de transcription (Foisner, 2001). Au cours de la mitose, elles restent ancrées à la membrane nucléaire en division. Les lamines A quant à elles ne sont exprimées que dans des cellules différenciées et ne sont pas indispensables pour le développement. Ces lamines sont ancrées dans la membrane nucléaire (voir figure 1.2) et les complexes lamines/protéines transmembranaires ont au moins trois fonctions, l'organisation de la chromatine, le positionnement des pores nucléaires dans la membrane mais aussi l'organisation des protéines du cytosquelette dans le cytoplasme. En effet, par l'intermédiaire de protéines transmembranaires de l'enveloppe nucléaire, le réseau de lamines est relié aux trois composantes du cytosquelette que nous détaillerons dans la partie 1.1.2 (Broers *et al.*, 2006). Lors de la mitose, les filaments de lamine A se dissocient sous forme de dimères, avant de repolymériser après la mitose. Les lamines sont peu mobiles : en utilisant la technique de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)² une lamine fluorescente (A ou B) ne retrouve que

1. La lamine C est de la même famille que la lamine A

2. Cette technique consiste à photo-détruire les fluorophores dans une petite zone. On peut ensuite mesurer la réapparition de la fluorescence après cette destruction, ce qui permet de caractériser la dynamique des molécules d'intérêt marquées. En effet, celles situées autour de la zone photoblanchie diffusent, notamment dans la zone photoblanchie. On peut ensuite déterminer la dynamique de la redistribution de fluorescence.

très peu sa fluorescence³, ce qui indique que leur diffusion est très réduite. Lorsqu'elles sont modifiées et non fonctionnelles, ces protéines sont impliquées dans des maladies appelées laminopathies, telles que la progéria (Dahl *et al.*, 2006), dont la caractéristique principale est un vieillissement très accéléré des malades.

Bien que le lien entre les propriétés mécaniques du noyau et ses fonctions (conservation et réplication du matériel génétique) ne soit pas encore clairement établi, les études physiques sur noyau isolé, notamment par aspiration *via* une micropipette, ont pu montrer l'effet de la tension de la membrane et ce, en fonction des propriétés biochimiques de l'enveloppe nucléaire (Dahl *et al.*, 2005, 2006; Vaziri et Mofrad, 2007). En effet, en tendant la membrane par aspiration ou par gonflement osmotique, on observe que le réseau de lamines se déplie de façon réversible. Le réseau de lamines étant à la fois lié à la membrane et à la chromatine, la déformation des lamines peut modifier la configuration stérique de la chromatine, et donc les liaisons des facteurs de transcription. Une déformation mécanique du noyau pourrait donc modifier la synthèse de protéines. Par exemple, dans le cas de la progéria, il manque 50 acides aminés à la lamine A (la protéine est nommée $\Delta 50$ lamine-A). Il a été montré (Dahl *et al.*, 2006) que le réseau de lamines n'est alors pas dynamique et reste lié à l'enveloppe nucléaire : en effet, la redistribution de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP) est quasi-inexistante aussi bien dans les cellules de patients que dans les cellules transfectées avec le plasmide modèle codant pour la $\Delta 50$ lamine-A. Par ailleurs, la distribution des contraintes dans la lamine après aspiration par micropipette montre que les filaments de lamine normaux sont distribués de façon isotrope, tandis que pour la $\Delta 50$ lamine-A ces filaments de lamine sont alignés. Il découle de cette configuration une plus grande résistance aux contraintes mécaniques. On sait aujourd'hui que les contraintes mécaniques, par exemple celles observées sur les cellules endothéliales dans les vaisseaux sanguins, induisent ce que l'on appelle la mécanotransduction. Si le noyau ne réagit pas à ces contraintes, on observe donc une diminution de la mécanosensibilité. On pense aujourd'hui que l'expression de certains gènes est mécano-sensible. La progéria et la transmission incomplète des contraintes extérieures au noyau pourraient être corrélés.

1.1.2 Le cytosquelette

Le noyau décrit précédemment est situé dans le cytoplasme. Dans ce dernier, on retrouve également, comme indiqué sur la figure 1.3, des filaments qui forment le cytosquelette et des complexes d'adhésion. Le cytosquelette est un composant caractéristique de la cellule eucaryote. Ce nom générique, dû aux premières observations ayant mis en évidence un enchevêtrement de protéines ressemblant au squelette osseux, regroupe en fait trois réseaux distincts de protéines : le réseau d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires (voir figure 1.3 pour une représentation d'une cellule et de ses composants impliqués dans la migration). L'actine et

3. La lamine C par contre est beaucoup plus dynamique

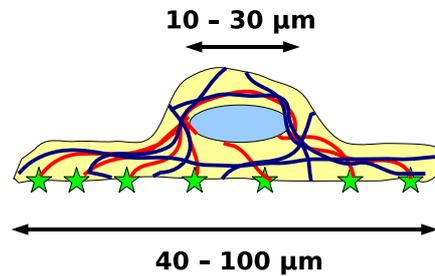


FIGURE 1.3 – Représentation d’une cellule adhérente avec le noyau (bleu clair), les microtubules (bleu foncé), l’actine (rouge) et les adhésions focales (vert). Les tailles caractéristiques du noyau et de la cellule sont respectivement de 10 à 20 μm et de 40 à 100 μm .

les microtubules ont été largement étudiés, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ces trois types de filaments sont complémentaires et ont des dynamiques différentes, qui vont permettre des phénomènes aussi complexes que le transport de molécules entre l’intérieur et l’extérieur de la cellule, la migration et la division cellulaires ainsi que l’étalement cellulaire. Ces deux types de filaments sont conservés chez tous les eucaryotes, tandis que l’on retrouve les filaments intermédiaires uniquement chez les mammifères. Ils sont par contre tous absents des procaryotes où la rigidité de la cellule est assurée par une paroi renforcée. Ces trois enchevêtrements de protéines et les protéines qui les accompagnent vont être maintenant détaillés.

Le réseau d’actine

Les filaments d’actine sont constitués de monomères d’actine globulaire ou actine-G. Lorsque ces monomères polymérisent, ils forment des filaments polaires d’actine ou actine-F, qui sont des hélices de pas 37 nm et de diamètre 8 nm. La polymérisation nécessite un apport énergétique, fourni par l’hydrolyse d’une molécule d’Adénosine TriPhosphate (ATP) en Adénosine DiPhosphate (ADP). Elle se déroule de la façon suivante, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*⁴ :

- l’étape de nucléation : deux puis trois monomères d’actine-G s’assemblent. Ce trimère, stable, sert de nucléateur pour les étapes suivantes de la polymérisation. Les monomères sont polarisés, ce qui induit une polarisation des filaments : la polymérisation a lieu majoritairement au bout dit barbé ;
- l’étape de croissance : Les monomères d’actine, lorsqu’ils s’assemblent, se polarisent. On a donc une extrémité (+) ou barbée, où la polymérisation est rapide, et une extrémité () ou pointue, où la polymérisation est lente. Juste après que le monomère d’actine ne se lie au polymère déjà formé, l’ATP est hydrolysée en ADP ;

4. une des différences principales étant les vitesses de polymérisation, $v_{\text{in vivo}} \sim 1 \mu\text{m}/\text{min}$ et $v_{\text{in vivo}} \sim 200v_{\text{in vitro}}$

– l'étape de dépolymérisation : elle est beaucoup plus rapide à l'extrémité pointue qu'au bout barbé. La forme ADP de l'actine favorise la dépolymérisation. En fonction de la concentration en monomères d'actine à proximité des deux extrémités, le filament d'actine peut avoir différentes dynamiques :

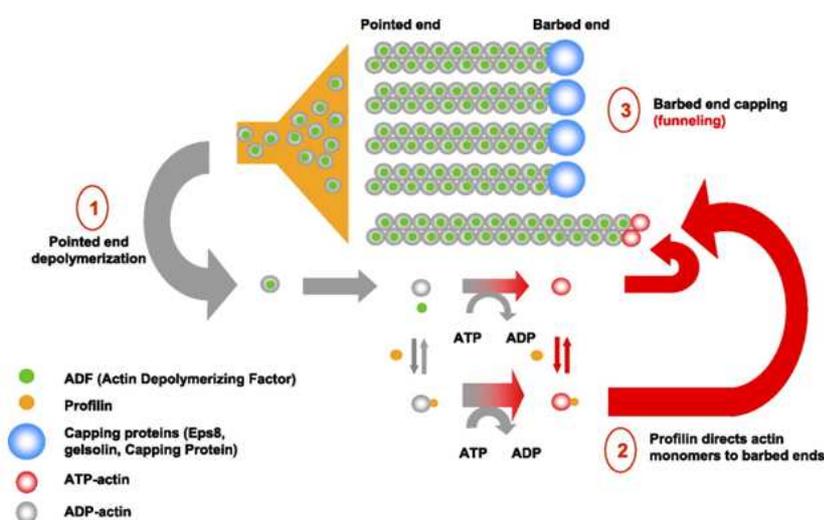


FIGURE 1.4 – Mécanisme de régulation de l'actine, d'après Le Clainche et Carlier (2008)

- il peut être en croissance : la polymérisation au bout (+) est plus importante que la dépolymérisation au bout (-) ;
- la longueur peut être constante : la polymérisation au bout (+) est égale à la dépolymérisation au bout (-). C'est ce qu'on appelle le « treadmilling » les monomères d'actine se déplaçant comme un tapis roulant. C'est un des phénomènes essentiels à la migration cellulaire. Certaines protéines, comme la profiline, qui se lie aux monomères d'actine qui ne peuvent que se lier aux bouts barbés, ou la formine, qui intensifient ce phénomène ;
- il peut être en décroissance : la polymérisation au bout (+) est inférieure à la dépolymérisation au bout (-). Cela peut être dû à l'intervention de protéines-coiffes qui viennent recouvrir le bout (+) et empêchent d'autres monomères d'actine de se lier au filament. On peut citer par exemple la tensine, qui intervient dans les adhésions focales. Il est également possible que l'actine soit dépolymérisée au bout (-) grâce à une protéine. C'est ce qu'il se produit lorsque la cofiline (ou actin depolymerizing factor, ADF) se lie à l'actine-ADP appartenant à des filaments d'actine.

Sur la figure 1.4 sont résumées les différentes étapes de la polymérisation et de la dépolymérisation de l'actine. Dans la cellule, l'actine est pour moitié sous forme globulaire et pour moitié sous forme de filaments.

Pour compenser l'effet des protéines-coiffantes, un autre type de nucléation peut se produire sur un filament d'actine déjà existant. On obtient alors des filaments branchés. D'autres protéines sont impliquées dans ce phénomène que l'on retrouve par exemple dans le lamellipode. Il s'agit du complexe Arp 2/3, que l'on retrouve au niveau du front d'avancée des cellules. Le complexe Arp 2/3 se lie à un filament d'actine déjà existant, et il y a alors nucléation d'un nouveau filament, lié au précédent. On obtient donc un gel réticulé. A cause de l'encombrement stérique, le nouveau filament fait un angle de 70° avec le filament existant. En répétant ce phénomène, on obtient une structure branchée et dirigée. (voir figure 1.5)

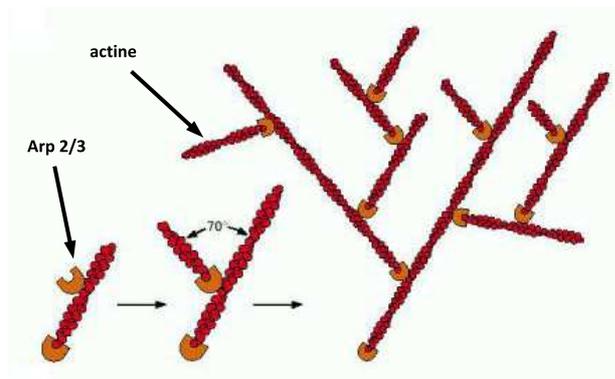


FIGURE 1.5 – Branchement de filaments d'actine, d'après Alberts *et al.* (2002)

Des filaments d'actine déjà formés peuvent également s'assembler pour constituer des structures plus importantes. En effet, *in vivo*, on trouve trois grandes familles de super-structures d'actine :

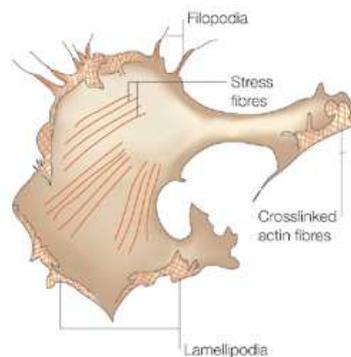


FIGURE 1.6 – Différentes structures d'actine retrouvées dans un fibroblaste, d'après Luo (2000)

- **les fibres de *stress***. Ces fibres peuvent se contracter et exercer des tensions. En effet, l' α -actinine, qui est une *actin binding protein* (ABP), va permettre aux filaments d'actine de se former dans les cellules non musculaires en se liant à deux filaments (voir figure 1.7) et en formant un motif périodique. La molécule d' α -actinine est suffisamment longue (30 nm) pour que la myosine-II, que nous détaillerons par la suite, puisse s'insérer entre deux filaments et former le complexe acto-myosine qui pourra alors se contracter ;
- **l'actine corticale**. Ce gel d'actine sous-tend la membrane plasmique. En fonction du type cellulaire, différents réticulants sont impliqués : la spectrine dans le globule rouge, la dystrophine dans les cellules musculaires ou encore l'eitrine dans les cellules épithéliales. Leur fonction est en tout cas similaire : ancrer le cortex d'actine à la membrane et permettre aux cellules d'adhérer au substrat ;
- **les filopodes**. Ces longs agrégats d'actine permettent à la cellule d'explorer localement son environnement. Ils sont réticulés par des protéines plus petites que l' α -actinine, la fascine ou la fimbrine. Par exemple, la fimbrine va induire une réticulation tellement serrée (elle mesure 14 nm de long) entre les filaments d'actine que la myosine-II ne pourra pas se lier pour former le complexe acto-myosine. Les filaments réticulés par la fimbrine ne pourront donc pas se contracter.

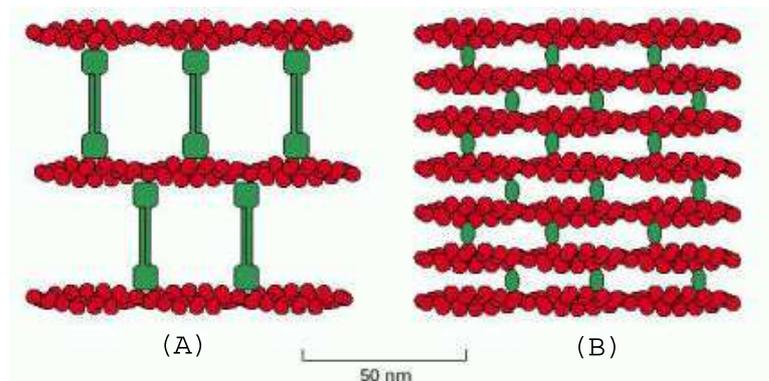


FIGURE 1.7 – Deux types de réticulation de l'actine. (A) la réticulation par l' α -actinine ; (B) la réticulation par la fimbrine, d'après Alberts *et al.* (2002)

La myosine-II fait partie d'une famille de protéines, les myosines. C'est la première à avoir été identifiée, dans les cellules musculaires squelettiques. Elle est constituée de deux chaînes dites lourdes enroulées en hélice possédant chacune une tête pouvant se lier aux filaments d'actine (voir figure 1.8). Au niveau du cou de la myosine-II s'enroulent 4 chaînes dites légères, qui peuvent être phosphorylées par une kinase ou déphosphorylées par une phosphatase. En fonction de leur état, le complexe acto-myosine sera contractile ou pas. La myosine-II est ce qu'on appelle

un moteur moléculaire : grâce à l'énergie apportée par l'hydrolyse de l'ATP en ADP, elle peut se déplacer le long du filament d'actine. Elle a été par la suite trouvée dans d'autres cellules, non musculaires. C'est elle qui apporte en grande majorité l'énergie nécessaire à la contractilité cellulaire. D'autres myosines existent à l'intérieur des cellules eucaryotes, que ce soit chez la levure ou les vertébrés. La myosine-V est par exemple impliquée dans le transport de vésicules intracellulaires.

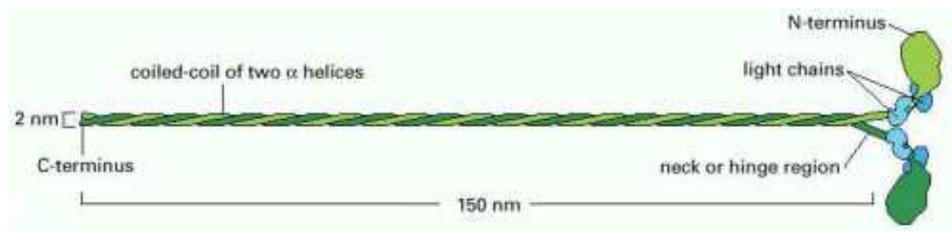


FIGURE 1.8 – Structure de la myosine-II, d'après Alberts *et al.* (2002)

La myosine-II est un constituant essentiel des fibres de *stress*. En effet, en son absence ou lors de l'inhibition de ses têtes, les fibres se dissocient. D'autres protéines permettent la formation de fibres de *stress*, comme la *myosin light chain kinase* (MLCK). Comme son nom l'indique, elle va réguler la liaison myosine-II/actine en phosphorylant la chaîne légère de la myosine. Cette phosphorylation est spécifique de la partie N-terminale de la chaîne légère. On peut étudier son rôle à l'aide de différents inhibiteurs tels que ML-7. Il existe trois grandes familles de fibres de *stress* (Naumanen *et al.*, 2008) :

- **les arches transversales.** Ces fibres de stress sont perpendiculaires à la direction de locomotion de la cellule, parallèles au lamellipode. Ces fibres ne sont pas toutes polarisées dans la même direction. Elles sont transportées par le flux rétrograde grâce à la myosine-II et disparaissent dans le lamellum à proximité du noyau. Elles proviennent du lamellipode et Arp2/3 est impliqué dans leur formation. Elles sont généralement connectées à un autre type de fibre de stress, les fibres dorsales, mais également au substrat sur lequel elles peuvent exercer des forces.
- **les fibres de *stress* dorsales.** Ce ne sont pas à proprement parler des fibres de stress, car elles ne sont pas contractiles. Néanmoins, elles sont reliées aux adhésions focales et, en croissant, vont se connecter aux arches transversales.
- **les fibres de *stress* ventrales.** Elles sont ancrées au substrat à chaque extrémité par l'intermédiaire d'une adhésion focale. Il a longtemps été pensé que c'était la contraction myosique qui alignait les fibres. Or récemment (Naumanen *et al.*, 2008), il a été montré que les fibres ventrales pouvaient être formées à partir des dorsales et des arches.

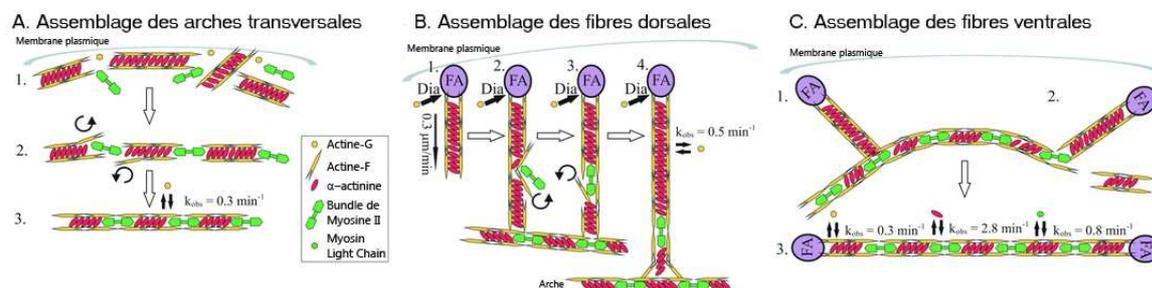


FIGURE 1.9 – **A.** Arche transversale. Après la réticulation des filaments d'actine par l' α -actinine au niveau de la membrane plasmique (1), ces derniers s'associent entre eux grâce à la myosine-II (2). Ces complexes sont alors renforcés (3). **B.** Fibre de stress dorsale. Après formation d'une adhésion focale, des filaments d'actine courts sont polymérisés grâce à Dia (voir partie 1.1.3) et réticulés par l' α -actinine (1). Cette fibre de stress dorsale peut alors croître et se lier à une arche transverse (2-4). **C.** Fibre de stress ventrale. Des fibres de stress dorsales et des arches transversales interagissent (1) et se connectent entre elles (2). L'arche transversale se contracte alors et forme une fibre de stress ventrale qui est ancrée à une adhésion focale à chaque extrémité, d'après Naumanen *et al.* (2008)

Rôle des GTPases dans la formation des fibres de *stress* En amont des adhésions focales, des GTPases (qui sont des protéines actives sous leur forme GTP devenant inactives lorsque le GTP est hydrolysé en GDP) permettent de réguler la migration cellulaire. Il s'agit de protéines appartenant à la famille de Rho, Rac et Cdc42. Ces GTPases ont des rôles à la fois complémentaires et opposés : Rho, qui régule la formation de fibres de stress acto-myosiques contractiles, joue un rôle de contraction et de rétraction notamment à l'arrière de la cellule. Rac et Cdc42 sont par contre actifs à l'avant de la cellule : Rac régule la polymérisation de l'actine et permet la formation du lamellipode tandis que Cdc42 régule la formation des filopodes, mais également la polarisation de la cellule et la direction de sa migration (Raftopoulou et Hall (2004) et voir figure 1.10). Rho et Rac s'inhibent mutuellement, permettant une régulation fine de leur distribution à l'intérieur de la cellule : Rac est très présent à l'avant de la cellule et sa concentration baisse lorsqu'on observe sa répartition vers l'arrière, tandis que la répartition de Rho est inverse : fortement présent à l'arrière, et de moins en moins vers l'avant.

Les microtubules

En complément du réseau d'actine, d'autres filaments donnent une architecture à la cellule. C'est notamment le cas des microtubules. Ils interviennent notamment dans la division cellulaire et le transport de molécules entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Un microtubule est un tube constitué de 13 filaments, appelés protofilaments. Chacun d'eux est un polymère dont la brique de base est un dimère

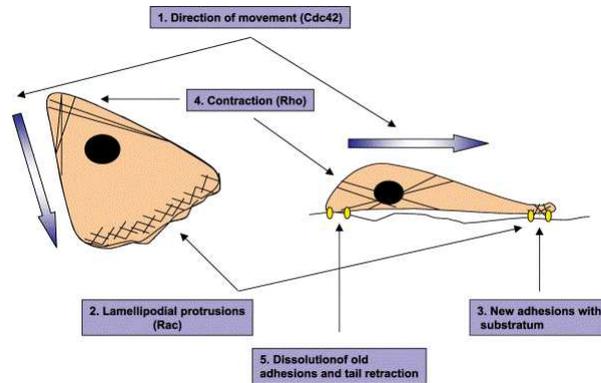


FIGURE 1.10 – Répartition de Rho, Rac et Cdc42 dans la cellule et influence sur la migration, d'après Raftopoulou et Hall (2004)

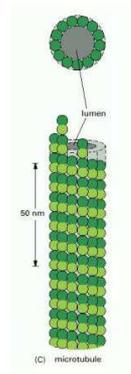


FIGURE 1.11 – Schéma de microtubule, d'après Alberts *et al.* (2002)

d' α -tubuline et de β -tubuline. La propriété physique remarquable des microtubules est leur longueur de persistance, de plusieurs mm, à comparer à la taille de la cellule (de l'ordre de $30 \mu\text{m}$) et à la longueur de persistance de l'actine ($17 \mu\text{m}$). Comme l'actine, les filaments sont polarisés, la polymérisation se produisant au bout (+). Dans la très grande majorité des cas, le bout (-) des microtubules est ancré au centrosome, situé à proximité du noyau. C'est dans le centrosome que l'on trouve la γ -tubuline, nucléateur analogue à Arp 2/3. La polymérisation des microtubules est également analogue à celle de l'actine : en effet, on trouve également au bout (+) des microtubules un nucléoside, la guanosine-triphosphate (GTP), qui peut être hydrolysée. Le bout (+) est stable tant que la β -tubuline se situant à l'extrémité (+) du filament est sous sa forme GTP. Lorsqu'elle est hydrolysée et perd un phosphate, devenant alors GDP, le filament est déstabilisé et va brutalement se dépolymériser par l'extrémité (+). C'est ce qu'on appelle une « catastrophe ». Si un nouveau dimère de tubuline sous forme GTP se lie au bout (+), le microtubule est alors secouru et à

nouveau protégé, il peut à nouveau polymériser. Les deux fonctions principales des microtubules sont le transport de molécules (vers l'extérieur de la cellule mais aussi depuis l'extérieur de la cellule) et la division cellulaire. Le transport s'effectue à l'aide de moteurs moléculaires, la kinésine et la dynéine, qui se lient aux microtubules et, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, peuvent se déplacer le long des microtubules. Liées à la queue des moteurs moléculaires, une ou plusieurs vésicules lipidiques contenant les macromolécules pouvant ainsi être déplacées. La différence majeure entre ces deux moteurs est leur sens de déplacement : la kinésine se déplace vers le bout (+) des microtubules, permettant l'export de molécules en dehors de la cellule ou vers le réticulum endoplasmique depuis l'appareil de Golgi. Elle ressemble structurellement à la myosine-II (voir figure 1.8). La dynéine quant à elle se déplace vers le bout (-) et permet le transport de molécules vers le centre de la cellule, depuis le réticulum endoplasmique et l'extérieur de la cellule. Lors de la mitose, les chromosomes se séparent en migrant le long de microtubules. Ce mécanisme ne fait lui intervenir aucun moteur moléculaire, c'est la dépolymérisation des microtubules qui permet aux chromosomes de se déplacer.

Les filaments intermédiaires

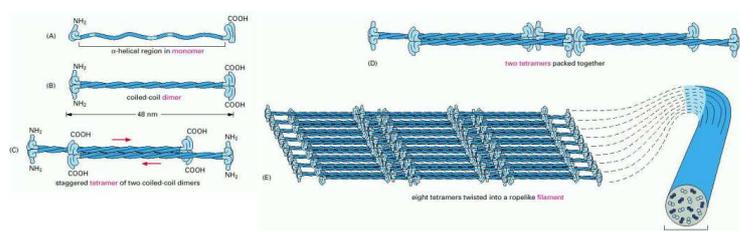


FIGURE 1.12 – Structures des filaments intermédiaires, d'après Alberts *et al.* (2002)

Les filaments intermédiaires sont les plus stables et les moins connus des composants du cytosquelette. Contrairement à l'actine et aux microtubules, ils ne se retrouvent pas chez tous les eucaryotes : ils sont présents chez les vertébrés, les nématodes mais pas chez les plantes ni les levures. Ils ne sont pas composés de monomères globulaires, mais de filaments qui s'assemblent tout d'abord en dimères, puis en tétramères (deux dimères anti-parallèles), qui ne sont donc pas polarisés. Ces tétramères s'assemblent ensuite par huit pour former les filaments intermédiaires (voir figure 1.12). Toujours en opposition aux microtubules et aux filaments d'actine, ces filaments intermédiaires sont très souvent composés d'hétérodimères, voire d'hétérodimères et d'homodimères dans un même filament. On obtient donc une grande hétérogénéité au niveau des propriétés physiques. À titre d'exemple, leur longueur de persistance est de l'ordre du μm (Mücke *et al.*, 2004) pour la vimentine et ils peuvent être étirés jusqu'à 3,5 fois leur taille tout en résistant à la rupture

(Herrmann *et al.*, 2007). Ces propriétés fournissent à la cellule toute la plasticité nécessaire pour résister aux contraintes extérieures.

Leurs ancêtres sont les lamines, protéines qui tapissent l'intérieur de la membrane nucléaire et qui sont détaillées dans la partie 1.1.1. Si on exclut cet ancêtre commun, la nature des filaments intermédiaires change en fonction du type cellulaire et de la localisation au sein d'un même organisme. Cela en fait un marqueur privilégié lors de la détermination de l'origine de métastases. Par exemple, on trouve dans les cellules mésenchymateuses (dont les fibroblastes) des filaments intermédiaires majoritairement composés de vimentine et de desmine, tandis que ce sont des filaments constitués de kératine que l'on retrouve dans les cellules épithéliales telles que la peau où leur rôle est prépondérant pour résister à l'abrasion : les filaments intermédiaires sont à la fois reliés à la matrice extracellulaire et aux autres cellules de l'épithélium, respectivement par des hémidesmosomes et des desmosomes. En leur absence, l'épithélium conserve son intégrité, mais ne résiste pas aux contraintes fortes. On retrouve également des modifications des propriétés mécaniques cellulaires dans des fibroblastes d'embryons de souris dans lesquels le gène codant pour la vimentine a été supprimé. Non seulement la stabilité mécanique des cellules est fortement diminuée, mais elles montrent également une motilité modifiée ainsi que des adhésions focales perturbées (Eckes *et al.*, 1998).

1.1.3 Les adhésions focales

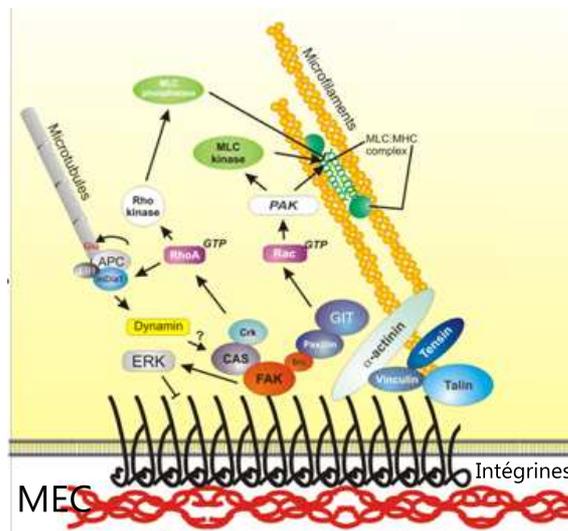


FIGURE 1.13 – Représentation schématique d'une adhésion focale. La matrice extracellulaire est représentée sous forme de filaments rouges, les intégrines sont en noir, d'après Vicente-Manzanares *et al.* (2005)

Lorsque les cellules adhèrent à un substrat, elles s'ancrent à l'aide de plaques de

protéines, appelées contacts focaux. Elles vont mettre en jeu plusieurs dizaines de protéines cytoplasmiques, telles que la taline, la vinculine, la paxilline. Grâce à la présence de protéines transmembranaires, de la famille des intégrines (voir figure 1.13) qui vont se lier à l'environnement cellulaire appelé matrice extra-cellulaire, elles vont s'agréger en complexes focaux puis adhésions focales. L'adhésion à la matrice extra-cellulaire, en fonction de la protéine transmembranaire, est spécifique d'une des protéines la constituant, telles que le collagène, la fibronectine, la vitronectine. Par exemple, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ se lie à la vitronectine et va mener à des adhésions focales riches en paxilline et vinculine, tandis que $\alpha_5\beta_1$ est spécifique de la fibronectine et permet la formation d'adhésions fibrillaires riches en tensine (Zamir *et al.*, 1999). De

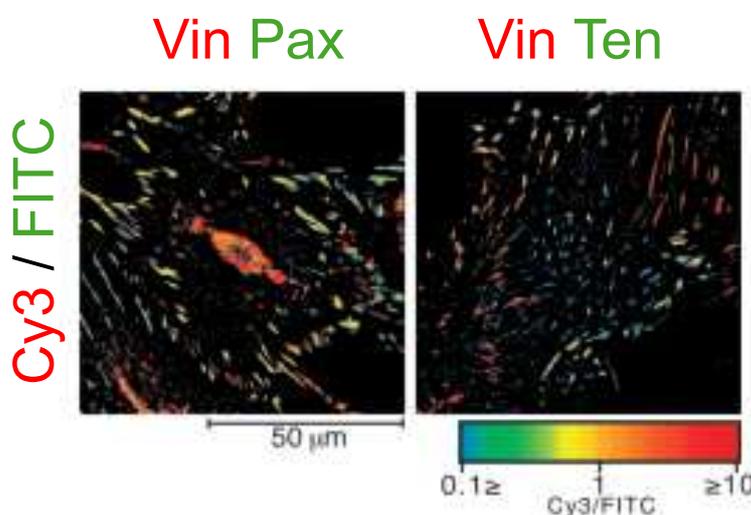


FIGURE 1.14 – Rapport des intensités de fluorescence entre la vinculine d'une part et la paxilline ou la tensine d'autre part. Dans les contacts focaux, la vinculine et la paxilline colocalisent (en jaune sur la figure de gauche) tandis que dans les adhésions fibrillaires la tensine (en bleu sur la figure de droite) ne colocalise pas avec la vinculine, d'après Zamir *et al.* (1999)

façon générale, les intégrines sont constituées de deux sous-unités, α et β . On verra plus loin (voir partie 2.2) que les adhésions focales répondent à des sollicitations externes. Lors de l'étalement cellulaire, la formation des adhésions focales se produit tout d'abord aux extrémités des filopodes à la périphérie de la cellule lorsque celle-ci adhère (Partridge et Marcantonio, 2006). Des projections faisant plus de $10\ \mu\text{m}$ de long peuvent se former puis se rassembler pour constituer des adhésions focales matures. Le recrutement protéique lors de l'étalement de fibroblastes a longtemps été imaginé comme un recrutement d'un groupe de protéines intracellulaires. Il a été montré récemment qu'il se passe en fait de la façon suivante : l'intégrine et la taline (protéine des adhésions focales) sont recrutées quasi-simultanément, tandis que la paxilline et la kinase des adhésions focales (FAK) le sont entre 1 min et 1

min30 après l'intégrine (Partridge et Marcantonio, 2006). FAK est impliquée dans la régulation de la migration (Wang *et al.*, 2001). Les adhésions fibrillaires quant à elles apparaissent lorsque les adhésions focales, stables, servent de point d'ancrage à la cellule et permettent la translocation des intégrines $\alpha_5\beta_1$. La fibronectine soluble, sécrétée par la cellule, va être alors transformée en fibrilles et exercer des tensions sur le réseau formé. Ce type d'adhésion ne fait pas intervenir la paxilline et la vinculine, mais uniquement la tensine et l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (Pankov *et al.*, 2000).

En comparaison, pour des fibroblastes migrants, déjà étalés et solidement ancrés sur le substrat, les adhésions focales ne se déplacent pas (voir partie 1.3), mais vont apparaître, se maintenir puis disparaître lorsque l'adhésion focale sera située à l'arrière de la cellule. *A contrario* dans des fibroblastes non migrants, une majorité d'adhésions focales migre à vitesse constante et avec peu de changement de forme et de taille. La vitesse est similaire à celle de 3T3, fibroblastes migrants soit environ 0,1 à 0,2 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Smilenov *et al.*, 1999). Comme indiqué sur la figure 1.13, les adhésions focales permettent la transmission de forces *via* les microfilaments d'actine (Beningo *et al.*, 2001) et servent donc de points d'ancrage au système acto-myosine. On constate sur la figure 1.15, que les adhésions focales (ici représentées par la vinculine) se situent au bout des filaments d'actine.

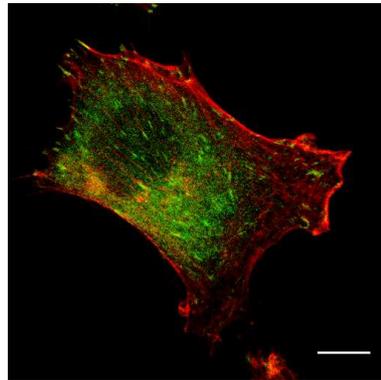


FIGURE 1.15 – Cellule 3T3 sur substrat plan rigide, fixée et marquée - vinculine en vert et actine en rouge - microscopie confocale, image personnelle, Barre=10 μm

Influence des GTPases sur les adhésions focales Les GTPases vues précédemment (voir section 1.1.2) ont également une influence sur les adhésions focales. Lorsque Rho est activé, les intégrines s'agrègent avec les protéines cytoplasmiques participant aux adhésions focales et forment des adhésions focales (voir figure 1.13). Rho va ensuite agir sur une kinase, la Rho-kinase (ou ROCK) qui, par le biais d'une phosphatase, la *myosin light chain* (MLC) *phosphatase*, va aller couper un phosphate sur la chaîne courte de la myosine-II et par ce biais activer la contraction de la myosine. L'activation de Rac quant à elle permet la formation de complexes

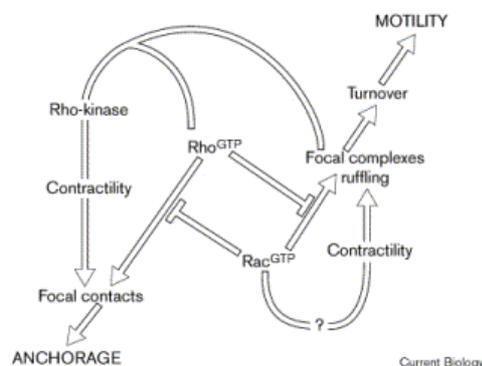


FIGURE 1.16 – Relations entre les GTPases Rho et Rac, d'après Rottner *et al.* (1999)

focaux, agrégats plus labiles et plus petits ($1\ \mu\text{m}$, les adhésions focales faisant de 2 à $5\ \mu\text{m}$ de long), ces derniers pouvant se transformer en adhésions focales après action de Rho (Rottner *et al.*, 1999). Ces deux voies d'activation sont indépendantes, car l'inactivation de l'une n'empêche pas l'expression de l'autre (Nobes et Hall, 1995). Cependant, il a été démontré (voir figure 1.16) dans plusieurs types cellulaires, aussi bien cellules neurales que fibroblastes, qu'il existe un contrôle négatif de l'un sur l'autre (Rottner *et al.*, 1999; Raftopoulou et Hall, 2004). Ces GTPases ont également un rôle sur l'actine et la migration, qui sera détaillé dans la partie 1.3.2.

1.2 Les fibroblastes : rôle *in vivo* et modèle de migration *in vitro*

Pour le moment, nous nous sommes concentrés sur la description globale du fonctionnement cellulaire, sans s'attarder sur les propriétés spécifiques des cellules que nous avons employées. Étant donné que lors de ce travail, seuls des fibroblastes (deux lignées) ont été utilisés, nous avons jugé utile de donner les caractéristiques de ces types cellulaires.

Les fibroblastes sont des cellules appartenant à la famille des cellules du tissu conjonctif. Les cellules cartilagineuses (ou chondrocytes) et osseuses en sont les autres membres, ainsi que les cellules du muscle lisse et les adipocytes. Les fibroblastes, cellules osseuses et chondrocytes ont comme propriétés de pouvoir synthétiser les protéines de la matrice extra-cellulaire et de maintenir la cohésion de l'organisme. De plus, en fonction de l'environnement mais aussi de leur type, les fibroblastes peuvent se différencier et se transformer en cellules osseuses, chondrocytes, cellules du muscle lisse ou adipocytes. C'est notamment le cas des cellules souches mésenchymateuses, qui sont très proches des fibroblastes. De façon générale,

les fibroblastes ont la capacité de réparer les tissus en migrant jusqu'à la blessure et en sécrétant sur place une matrice de collagène pour combler et protéger le tissu endommagé. Une fois à l'emplacement de la blessure, et en fonction des propriétés du tissu conjonctif (concentration en protéines spécifiques, capacité des cellules à adhérer), les fibroblastes pourront soit se différencier en cellules osseuses ou cartilagineuses, soit se transformer en myofibroblastes pour permettre la cicatrisation d'un tissu mou. En effet, dans les tissus mous, le cytosquelette d'actine va se modifier et s'apparenter aux cellules de muscles lisses, utilisant ses propriétés contractiles pour refermer le tissu endommagé. *In vitro*, les fibroblastes ont également la capacité de migrer de façon individuelle, y compris sur des surfaces à deux dimensions.



FIGURE 1.17 – Fibroblaste de souris - microscopie en fond clair, image personnelle. Barre=50 μm

Les 3T3 Les 3T3 sont des fibroblastes de souris, constituant une lignée cellulaire. Leur nom signifie qu'à l'origine, les cellules primaires, des fibroblastes d'embryons de souris, étaient repiquées tous les 3 jours à une concentration donnée, $3 \cdot 10^5$ cellules par boîtes de 20 cm^2 . Au bout d'une vingtaine d'opérations, les cellules se sont spontanément immortalisées, pouvant alors être cultivées et conservées éternellement. Des cellules immortalisées peuvent se diviser sans limite dans le temps, contrairement aux cellules primaires pour lesquelles une barrière, 30 à 50 divisions, ne peut être dépassée. En effet, les cellules primaires, au cours des divisions successives, voient les extrémités de leurs chromosomes, les télomères, se dégrader. Au bout d'un certain nombre de dégradations, la cellule devient instable, des gènes de régulation n'étant plus fonctionnels. Comme garde-fou (la cellule perdrait des régulateurs et pourrait devenir cancéreuse), elle arrête de se diviser. Cependant, certaines cellules, telles les fibroblastes de rongeurs, ont leurs télomères protégés. C'est pour cela qu'elles peuvent s'immortaliser spontanément.

Les REF52 Les REF52 sont des fibroblastes de rat. Contrairement aux 3T3, ces cellules ne se sont pas immortalisées spontanément, mais grâce à un virus (Zhu *et al.*, 1992). En effet, on peut induire l'immortalisation dans des cellules primaires

qui ne s'immortaliseront pas spontanément. Pour cela, les deux techniques les plus employées sont l'infection par un virus, qui va bloquer la phase de sénescence, ou l'utilisation de cellules cancéreuses, qui sont déjà immortelles. Les REF52 ont comme caractéristiques de pousser lentement et d'avoir une morphologie proche de celle des cellules primaires. Par ailleurs, les REF52 employées expriment de façon stable (c'est-à-dire que le gène a été intégré dans le génôme de la cellule) une protéine fusion, la paxilline-YFP (Yellow Fluorescent Protein), la paxilline étant une protéine caractéristique des adhésions focales. On peut donc visualiser les adhésions focales.

1.3 Première approche : migration et adhésion sur substrat indéformable

Les cellules, lorsqu'elles sont placées en suspension, ne peuvent généralement pas survivre, même si des molécules telles que le peptide RGD⁵ sont présentes dans le milieu de culture. Habituellement, les cultures et études cellulaires sont réalisées dans des boîtes de Pétri ou sur lamelles de verre, qui sont donc très rigides. Or *in vivo*, l'environnement peut être plus ou moins rigide. En effet, les os, les muscles, le cerveau ont des modules d'Young variant sur plusieurs ordres de grandeur (de 1 kPa pour le cerveau à 100 kPa pour les os). Il a été montré récemment (Discher *et al.*, 2005) que les cellules sentent et répondent à la rigidité de leur environnement. Nous allons décrire l'étalement, puis la migration sur substrat indéformable avant de décrire celle sur substrat déformable.

1.3.1 Les oscillations lors de l'étalement cellulaire

Les processus cellulaires se déroulent à différentes échelles de temps. Tout d'abord, la cellule s'étale sur son substrat jusqu'à atteindre son étalement maximal. A ce moment-là, elle est ancrée à son substrat. Cependant la vitesse d'étalement n'est pas constante. Si on regarde plus finement le front avant de la cellule en cours d'adhésion, il a été montré qu'il oscille (Giannone *et al.*, 2004). Ces oscillations dépendent de la MLCK et de la concentration en fibronectine sur le substrat. La période de ces contractions correspond au temps nécessaire à l'actine-F pour traverser le lamellipode. Ceci a été mis en évidence en raccourcissant le lamellipode en activant la cofiline. Dans ce cas, la période des contractions diminue. De même, en augmentant la taille du lamellipode en activant la voie de signalisation de Rac, la période des contractions augmente. Il a été suggéré qu'un complexe, lié au réseau d'actine et activé par une contraction, était transporté depuis l'extérieur jusqu'à la base du lamellipode et qu'alors, la contraction suivante, induisant l'extension de la cellule, était déclenchée. Ce complexe fait intervenir la myosine-II. Cette dernière, comme montré sur la figure 1.18, ancre le lamellipode, dynamique, à une autre structure

5. qui peut se lier aux intégrines cellulaires et mimer l'ancrage au substrat

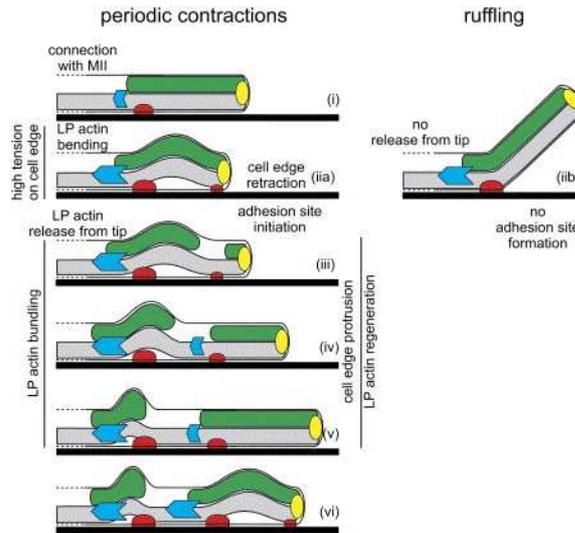


FIGURE 1.18 – Modèle d'étalement d'une cellule sur substrat rigide - comportement de l'actine à différents temps, d'après Giannone *et al.* (2007)

d'actine : le lamellum. Le lamellum est lui-même ancré au substrat *via* les complexes focaux. La myosine-II, en contractant les réseaux d'actine (*i* de la figure 1.18), va particulièrement tirer sur le lamellipode, qui continue de croître. Deux scénarios sont alors possibles : une adhésion a pu se former à l'extrémité du lamellipode ou non.

- si aucune adhésion focale ne s'est formée, la contraction de la myosine-II va faire se lever l'avant du lamellipode, qui va alors se rétracter. C'est ce qu'on appelle le *ruffling* (*ii b*);
- si une adhésion s'est formée, le lamellipode, toujours sous l'action de la myosine-II, va se courber (*ii a*) puis, la contrainte étant trop forte, *se rompre* (*iii*). L'extrême avant du lamellipode va continuer à polymériser grâce à la présence de monomères d'actine, le réseau d'actine n'étant plus continu (*iv*). Ce phénomène peut se reproduire plusieurs fois.

1.3.2 Les mécanismes de la migration

Dans l'organisme, certains types cellulaires migrent. Ceci est vrai par exemple pour les fibroblastes, qui vont permettre la cicatrisation des tissus, ou pour les lymphocytes, qui doivent se diriger jusqu'à l'endroit de l'infection pour ensuite la résoudre. Quel que soit le type cellulaire, on peut dégager certains mécanismes communs (figure 1.19) :

- la membrane s'étend, grâce à la polymérisation de l'actine vue précédemment partie 1.1.2;
- la cellule s'ancre au substrat, grâce aux adhésions focales;
- le contenu de la cellule, le noyau et le cytoplasme, avance dans la direction

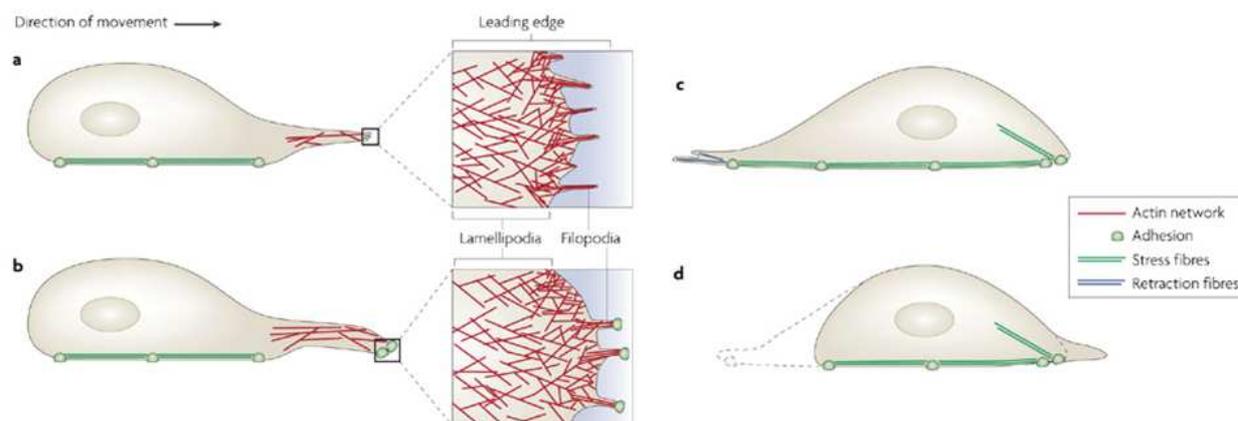


FIGURE 1.19 – Modèle de la migration cellulaire, d'après Mattila et Lappalainen (2008)

du mouvement. À l'arrière de la cellule, des filaments d'actine se contractent, entraînant l'arrière de la cellule ;

- les adhésions qui sont présentes à l'arrière de la cellule se dissocient. (figure 1.19)

Les adhésions focales et les protéines transmembranaires permettent au réseau d'actine d'interagir avec le substrat. Les différentes structures d'actine sont réparties dans la cellule en fonction de sa direction de migration : on trouve le plus en aval les filopodes, qui vont tester l'environnement immédiat de la cellule, aussi bien pour ses propriétés physiques que chimiques. En effet, ce sont les filopodes qui permettent le chimiotactisme. Les filopodes, grâce à la polymérisation de l'actine, vont exercer une force sur la membrane et la déformer pour obtenir une extension de cette membrane, mais très localisée. Ils mesurent généralement jusqu'à $10 \mu\text{m}$, mais peuvent dépasser cette taille dans certains types cellulaires. Ils sont soit situés au bord du lamellipode, en aval de la migration, soit ancrés dans le lamellipode. Ces filopodes interviennent également dans l'adhésion cellule-cellule, comme dans les phénomènes de cicatrisation ou les épithéliums. En amont de la polymérisation, c'est la RhoGTPase Cdc42 qui induit la formation de ces filopodes. En effet, la forme inactive de Cdc42 inhibe toute formation de filopode. Juste après les filopodes est situé le lamellipode. C'est également une entité dynamique, où l'actine n'est pas assemblée en filaments longilignes mais en un gel à deux dimensions, branché notamment par Arp 2/3. Comme dans les filopodes, le lamellipode se déplace grâce au *treadmilling* (partie 1.1.2). De plus, la cellule peut modifier sa direction de migration : si les filaments d'actine, dont l'extrémité (-) est située à l'avant, dépolymérisent plus vite qu'ils ne polymérisent, le lamellipode va se rétracter avec l'aide de la myosine-II, qui va contracter le réseau. Une autre partie du lamellipode peut alors polymériser de façon dirigée, et modifier la direction du mouvement de la cellule. Ce phénomène

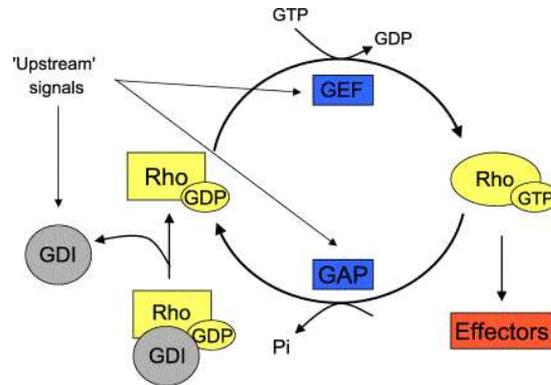


FIGURE 1.20 – Répartition des Rho GTPases dans la cellule en fonction de leurs rôles respectifs : Cdc42 sur les filopodes, Rho sur la contraction de la cellule et Rac sur le lamellipode, d'après Raftopoulou et Hall (2004)

est également valable dans les filopodes.

1.3.3 Les limitations physiologiques du substrat indéformable

Dans le travail de Giannone *et al.* (2004), les oscillations disparaissaient lorsque le substrat était mou ($E \simeq 140$ kPa). De même, Lo *et al.* (2000) ont montré que les cellules migraient vers les plus grandes rigidités (c'est la *durotaxie*). Ces phénomènes dépendent de la contractilité acto-myosique mais aussi des adhésions par l'intermédiaire des intégrines ou des cadhérines. La cellule répond à l'élasticité du substrat en réorganisant son cytosquelette, ce qui va à son tour modifier les forces à l'origine de cette réorganisation. Cette réponse ne dépend pas de la nature de l'ancrage : en effet, que ce soit un ancrage à la matrice extra-cellulaire, à un substrat synthétique ou à une autre cellule, la réponse cellulaire se fera en fonction de l'intensité de l'ancrage. Par exemple, la taille des adhésions focales augmente avec la rigidité du substrat (voir figure 2.9 et Saez *et al.* (2005)). Il a été également montré que la rigidité de l'environnement de cellules cancéreuses varie (Paszek *et al.*, 2005). Par ailleurs, *in vivo* les tissus ne sont pas plans mais tridimensionnels. Or les études sur substrats indéformables ne sont que à deux dimensions. Il est possible d'introduire des modifications de topographie qui seront détaillées partie 3.2. L'étude de l'influence de la rigidité et de la topographie sur le comportement cellulaire peut donc éclairer le comportement de cellules *in vivo*.

Chapitre 2

Rôles de la rigidité de l'environnement dans les mécanismes cellulaires

Sommaire

2.1	Mesures de forces à l'aide de substrats déformables passifs	28
2.1.1	Généralités	28
2.1.2	Influence de la rigidité sur les fonctions cellulaires	32
2.2	Influences des contraintes extérieures exercées sur la cellule	40
2.2.1	Renforcement du cytosquelette d'actine	41
2.2.2	Renforcement des adhésions focales	42
2.2.3	Modélisation de l'influence des forces et de la rigidité	44
2.3	Les limitations physiologiques du substrat à 2D	47

De nombreux substrats déformables ont été utilisés dans l'étude de l'influence de la rigidité sur les mécanismes cellulaires. Nous allons tout d'abord les présenter, expliquer comment ils sont employés et enfin l'influence de la rigidité sur le comportement des cellules.

2.1 Mesures de forces à l'aide de substrats déformables passifs

2.1.1 Généralités

Les premières mesures de forces sur substrat déformable utilisaient un film en élastomère de silicone sur lequel migraient des kératinocytes (Harris *et al.*, 1980). Le film était suffisamment fin pour que les cellules puissent plisser ce film, en exerçant des forces sur le substrat. Cependant, un des problèmes majeurs de ce dispositif était l'impossibilité de connaître la cartographie des forces exercées par la cellule sur son substrat à partir du déplacement observé. En effet, le substrat n'était pas parfaitement reproductible, ni calibré. De plus, comme on le montre sur l'image **A** de la figure 2.1, en plissant le film de silicone, il n'était pas possible d'avoir accès aux déformations situées sous la cellule. Il n'était donc pas possible de connaître les forces associées aux déplacements observés. Selon le même principe, des gels déformables semi-infinis et calibrés ont été développés. Ils permettent de mesurer les forces que les cellules exercent sur leur substrat (voir figure 2.1).

Les gels semi-infinis de polymères

Ces gels sont déformables et on peut modifier leurs propriétés mécaniques en ne changeant que très peu leurs caractéristiques chimiques. La première méthode consiste à employer un hydrogel à base d'acrylamide et de bis-acrylamide (le réticulant). On peut ajuster la proportion de bis-acrylamide (Pelham Jr et Wang, 1997) et obtenir des substrats dont le module d'Young varie de 5 à 70 kPa.

On peut également modifier finement la rigidité du gel avec un autre polymère, le poly diméthyl siloxane (PDMS). En variant la proportion de réticulant par rapport au monomère, on obtient comme pour les gels de polyacrylamide de larges gammes de rigidité. La principale différence entre ces deux matériaux tient à leur nature : le polyacrylamide est un gel aqueux, hydrophile, auquel il faut faire subir un traitement supplémentaire pour permettre l'accroche de protéines de la matrice extra-cellulaire (collagène, fibronectine). Le PDMS, hydrophobe, permet une adhésion non spécifique des protéines de la matrice extra-cellulaire, sans traitement supplémentaire. Suite à ces traitements, les cellules peuvent adhérer.

À l'aide de ces deux types de substrats, une mesure des déformations permet de déduire les forces. Pour arriver à des résultats quantitatifs, deux types d'approches ont été employées :

- l'insertion de billes fluorescentes dans le gel (taille caractéristique : 0,2 à 1 μm) (Lee *et al.*, 1994; Dembo et Wang, 1999) ;
- l'insertion d'un motif dans le gel, suffisamment petit pour ne pas avoir d'influence sur le comportement cellulaire (hauteur = 0,3 μm) mais tout de même visible par microscopie optique (de 0,4 à 0,8 μm de côté). On peut alors voir

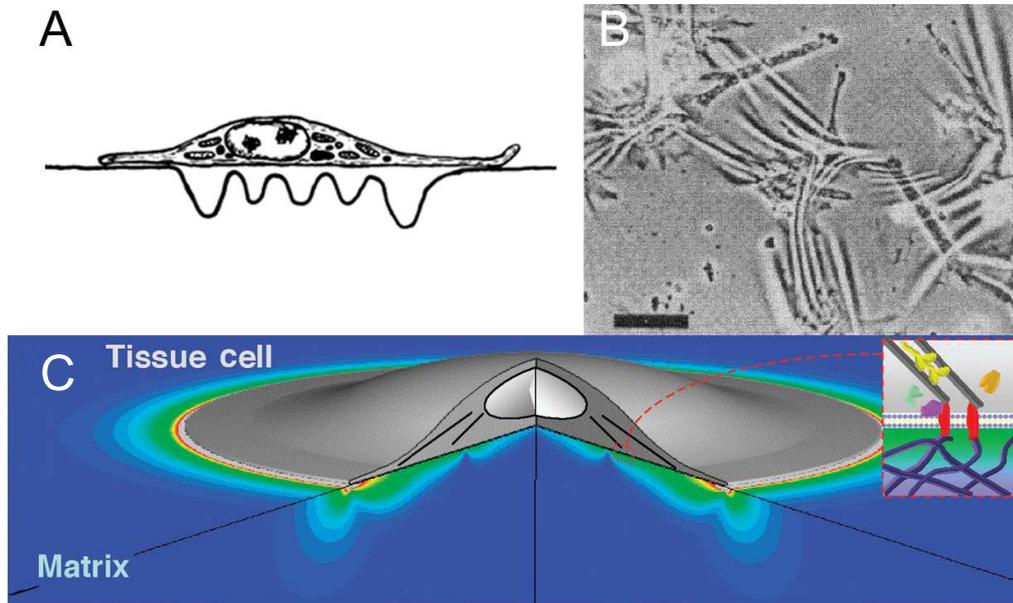


FIGURE 2.1 – **A** Représentation d'une cellule plissant un film de silicone par Harris *et al.* (1980) ; **B** Plissement effectif du film de silicone par les cellules, d'après Harris *et al.* (1980). Barre=100 μm ; **C** Simulation de la cartographie des contraintes (supposées isotropes ici) exercées par une cellule sur un substrat flexible. Le code couleur désigne l'intensité des contraintes : au plus près de la cellule, les contraintes, très fortes, sont représentées en blanc, tandis que loin de la cellule, les contraintes sont quasi-inexistantes (en bleu foncé). En insert, modélisation d'une adhésion : on reconnaît les intégrines, protéines transmembranaires (en rouge) qui relie la matrice extra-cellulaire (en bas) aux filaments d'actine (en haut), d'après Discher *et al.* (2005)

les déformations des motifs par microscopie en contraste de phase (Balaban *et al.*, 2001).

Le principe de mesure des déplacements est le même dans les deux cas : on acquiert une image avec les cellules déformant le gel puis on décolle les cellules du substrat à l'aide de trypsine. On peut alors acquérir une autre image, cette fois-ci du substrat au repos, sans cellule. On obtient le déplacement de chacun des motifs ou billes. Il faut ensuite, connaissant les déplacements, remonter aux forces. Cependant, ces substrats ont un inconvénient : le matériau étant continu, lorsqu'une force est exercée en un point, son effet se propage dans ce matériau. Il est donc difficile de séparer la force exercée en un point A de la force qui agit ailleurs mais est tout de même en partie détectée en ce même point A . La relation déplacement-force est donc, pour chaque direction de l'espace, $u_i(r) = \int G_{ij}(r - r')F_j(r')dr'$ où u représente le déplacement, F la force et G le tenseur de Green, tenseur des déformations. Il est donc nécessaire d'inverser le problème, pour remonter aux forces. Ce calcul est lourd à réaliser, et ne peut être exact. Pour cette raison, on parle de champ de forces le plus probable,

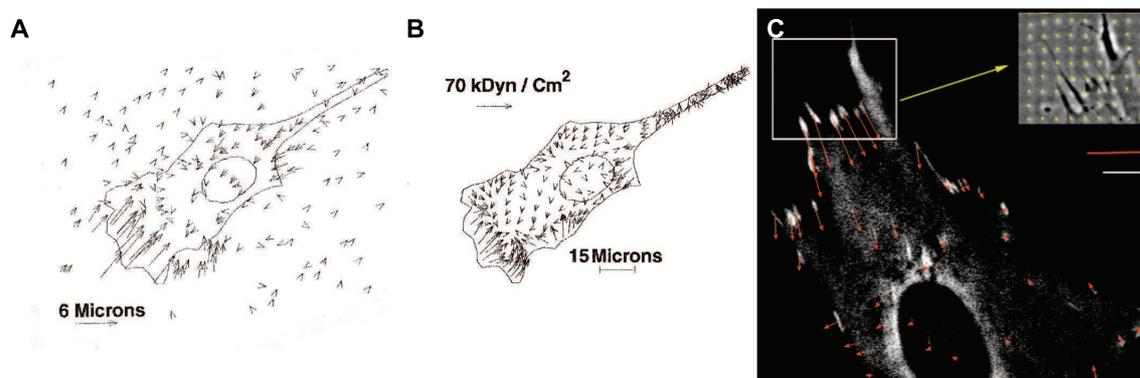


FIGURE 2.2 – champ des déplacements (A) et des forces (B) dans un fibroblaste adhérent à un substrat élastique, d'après Dembo et Wang (1999)

(C) Forces exercées par la cellule au niveau de ses adhésions focales - En zoom, déplacement des marqueurs fluorescents insérés dans le substrat, à partir duquel ont été calculées les forces, d'après Balaban *et al.* (2001). barre blanche = 4 μm , barre rouge = 30 nN

car il n'y a pas de solution unique à l'inversion de la relation force/déformation. Il est nécessaire de faire une hypothèse supplémentaire. Par exemple, il est possible de cartographier les déplacements et de les corrélérer aux emplacements et intensité des adhésions focales. Dans la recherche même du champ le plus probable, on suppose parfois que les forces colocalisent avec les adhésions focales (Balaban *et al.* (2001), voir figure 2.2, image C). On utilise également le fait qu'une cellule est un système isolé, sans inertie. On a donc $\sum \vec{F} = \vec{0}$ sur la cellule. L'intégration des déplacements se fait donc selon un maillage centré sur les adhésions focales.

Pour éviter de faire une hypothèse aussi forte, une autre solution a été proposée, des substrats discontinus constitués de micro-piliers déformables.

Les substrats discontinus : les plots

Les plots sont créés par microfabrication : à l'aide de techniques provenant de la microélectronique (détaillées dans la partie II), il est possible de créer des motifs de l'ordre du μm (Tan *et al.*, 2003). En utilisant des élastomères de silicone comme le PDMS, on obtient alors un réseau de micro-poutres déformables (voir figure 2.3). En modifiant les diamètres et la hauteur des micro-plots, on peut obtenir une large gamme de raideur.

En effet, dans le régime d'élasticité linéaire, la force s'écrit :

$$F = k\Delta x \quad (2.1)$$

où Δx représente le déplacement du sommet du plot, et où k , la raideur est donnée par :

$$k = \frac{3EI}{L^3} \quad (2.2)$$

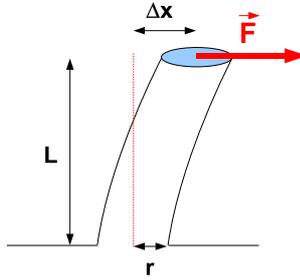


FIGURE 2.3 – Représentation schématique d'un plot défléchi par une force \vec{F}

E représentant le module d'Young du matériau, L la longueur de la poutre et I son moment d'inertie.

Pour une pilier cylindrique, on a :

$$I = \frac{\pi}{4} r^4 \quad (2.3)$$

r représentant le rayon du pilier. L'expression de la force devient donc :

$$F = \frac{3\pi E}{4} \frac{r^4}{L^3} \Delta x \quad (2.4)$$

On obtient, avec $r = 0.5$ ou $1 \mu\text{m}$ et $1.5 \mu\text{m} < L < 7 \mu\text{m}$ la gamme de raideurs

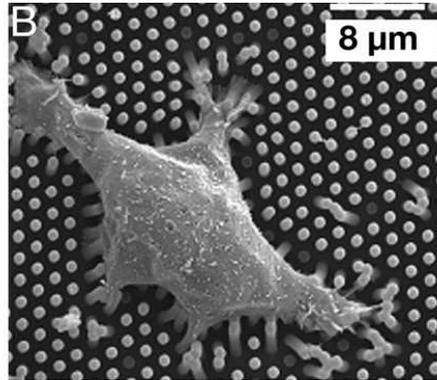


FIGURE 2.4 – Cellule sur plots en microscopie électronique à balayage, d'après du Roure *et al.* (2005)

suivante, qui est adaptée aux forces exercées par les cellules :

$$1 \text{ nN}/\mu\text{m} < k < 700 \text{ nN}/\mu\text{m} \quad (2.5)$$

On peut donc varier sur 3 ordres de grandeurs en ne modifiant que très peu les propriétés géométriques du substrat. De plus, chaque micro-pilier est un capteur de

forces indépendant des autres (voir section 7.6.2), les contraintes ne se propageant que très peu dans la base du substrat. Il est alors très facile, connaissant les déplacements des micro-plots, d'obtenir les forces exercées par les cellules, la relation étant linéaire dans le régime des faibles déformations (voir Eq. 2.1).

A l'aide de ces différents substrats, on peut donc caractériser les forces mais aussi l'influence de la rigidité. Ceci est réalisable avec un substrat continu ou des micro-plots. Le premier a l'avantage d'avoir une géométrie plus proche du substrat classiquement employé *in vitro*, le verre ou le plastique rigide mais l'inconvénient d'un calcul lourd à hypothèses fortes. Le second introduit une surface discontinue mais des calculs beaucoup simples et sans approximation.

2.1.2 Influence de la rigidité sur les fonctions cellulaires

Dans l'organisme, les modules d'Young varient d'un tissu à l'autre. On peut les classer de la façon suivante :

$$E_{\text{muscle}} \approx 100 E_{\text{cerveau}} \approx 10 \text{ kPa} \quad (2.6)$$

L'os ayant pour sa part un module d'Young de plusieurs GPa. Les cellules appartenant à ces différents tissus ne vont donc pas réagir de la même façon à la variation d'une rigidité de leur environnement. On a vu précédemment (partie 2.1.1) qu'on pouvait facilement faire varier la rigidité de gels en polyacrylamide entre 5 et 70 kPa (Pelham Jr et Wang, 1997).

Adhésion et migration

Les surfaces continues La rigidité du substrat joue un rôle sur l'adhésion et sur la migration de la cellule. En effet, il a été montré (Pelham Jr et Wang, 1997) que plus le gel est mou, et moins la cellule s'étale, mais aussi plus elle migre vite : il y a un facteur 10 entre la vitesse sur le gel de raideur 5 kPa ($v \sim 0,1 \mu\text{m}/\text{min}$) et celui de raideur 70 kPa ($v \sim 0,5 \mu\text{m}/\text{min}$). On peut également ajouter que son lamellipode a une dynamique différente, avec de nombreux *ruffles*. De plus, il a été montré que la cellule répond à des variations de rigidité (Lo *et al.*, 2000) :

- la cellule, sur la partie la plus souple du substrat, s'approche de la frontière mou/dur : elle va passer sur la surface rigide sans modification de comportement (voir **(haut)** de la figure 2.5) ;
- la cellule, sur la partie la plus rigide, s'approche du substrat mou : après avoir sondé la surface moins rigide, la cellule ne passe pas la frontière rigide/mou et reste sur la partie rigide, à la frontière des deux substrats (voir **(bas)** de la figure 2.5).

Le problème reste ouvert, même s'il a été avancé que les canaux ioniques pouvaient expliquer cette migration dirigée : on suppose que les forces sont générées par le complexe acto-myosine associé avec les adhésions cellule-substrat. Sur les substrats

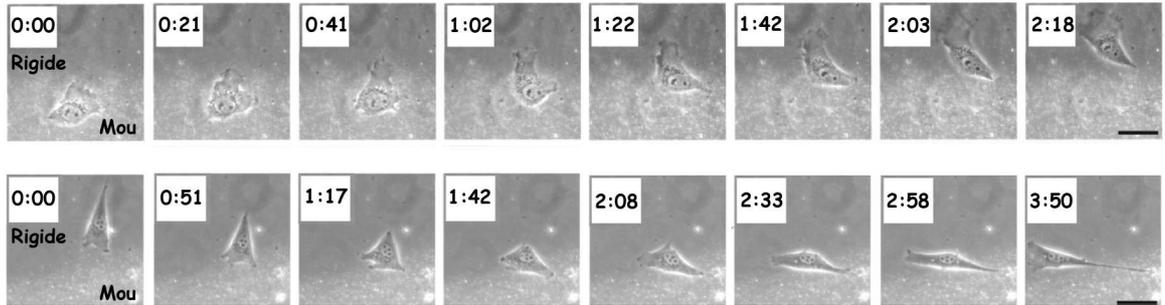


FIGURE 2.5 – **(haut)** Une cellule, sur substrat mou, s’approche de la frontière substrat mou/substrat rigide. A 1 min42, la cellule est passée sur le substrat rigide, en augmentant son étalement et légèrement sa vitesse. **(bas)** Une cellule, sur substrat rigide, s’approche de la frontière substrat rigide/substrat mou. A 1 min17, elle change de direction et poursuit sa migration le long de la limite, en restant sur le substrat rigide, d’après Lo *et al.* (2000). Barre=40 μm

les plus mous, l’ancrage au substrat est faible, et cet ancrage n’est donc pas sous tension. Par contre, sur les substrats rigides, l’ancrage est sous tension. Ceci pourrait induire un afflux de calcium extra-cellulaire à travers les canaux ioniques activés par la tension. Ce calcium pourrait alors entraîner la phosphorylation de la myosine-II, ce qui conduit à une augmentation de l’énergie consommée. On a alors une augmentation de la tension. D’autres hypothèses sont envisageables. Par exemple, on observe, au niveau des ancrages cellulaires, une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine. Cela pourrait moduler la réponse en fonction de la force.

La cellule migre donc vers les zones les plus rigides, ce phénomène est appelé la *durotaxie*.

Durotaxie et protéines du cytosquelette La durotaxie intervient non seulement sur la migration, mais également sur l’ensemble du cytosquelette, en le réorganisant : sur les gels mous, la cellule individuelle perd ses fibres de *stress* (Yeung *et al.*, 2005) caractéristiques des substrats rigides. Elle acquiert également une morphologie beaucoup plus branchée. Le réseau n’est pas le seul à être modifié par la rigidité : lorsque le substrat est mou, les adhésions focales sont plus petites, plus irrégulières et aussi plus dynamiques que sur substrat rigide (Pelham Jr et Wang, 1997) : elles apparaissent et disparaissent plus vite. La figure 2.6 permet de comparer les substrats rigides A et C (70 kPa) et B et D (5 kPa). Sur le substrat rigide, les adhésions (visualisées grâce à une protéine-fusion¹, la vinculine-GFP) sont stables au cours du temps (les deux adhésions mises en valeur sur A sont toujours présentes sur C), tandis qu’au cours du même laps de temps (10 min), elles sont beaucoup

1. il s’agit du couplage d’une protéine d’intérêt, ici la vinculine, avec une protéine fluorescente visualisable. Si la vinculine est exprimée, la GFP également

plus dynamiques sur substrat mou : les deux indiquées sur B disparaissent sur D, tandis qu'une nouvelle apparaît. Si on se place à temps plus court, la rigidité in-

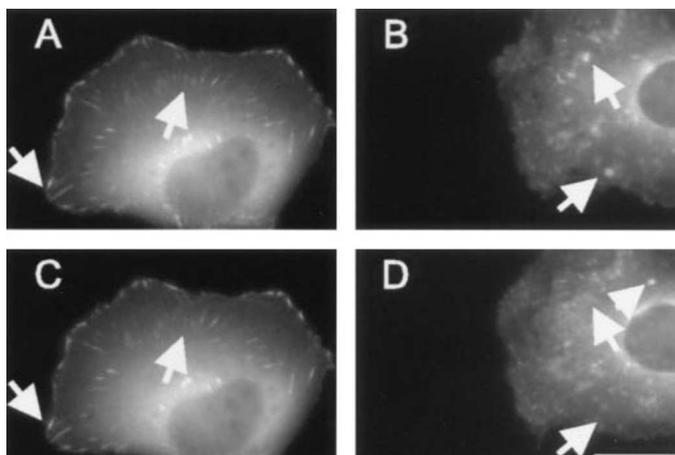


FIGURE 2.6 – (A, B, C et D) Dynamique des adhésions focales en fonction de la rigidité du substrat, d'après Pelham Jr et Wang (1997). Sur substrat dur (A et C) les adhésions focales sont toujours présentes tandis que sur substrat mou, dans le même laps de temps, une adhésion focale a disparu et une autre est apparue. Barre=10 μm

fluence également l'adhésion. En effet, les oscillations observées lors de l'adhésion de fibroblastes sur lamelles de verre disparaissent lorsqu'un substrat mou (gel de polyacrylamide, $E \sim 5$ kPa) est utilisé (Giannone *et al.*, 2004).

Une modélisation de l'adhésion cellulaire sur substrat anisotrope (Bischofs et Schwarz, 2003) a permis d'expliquer ces différentes observations. Si on considère le travail W nécessaire à la cellule pour exercer en un point une force \vec{F}_s , qui est la force seuil, constante, pour former une adhésion, celui-ci va dépendre de la raideur de l'ancrage au substrat. On peut considérer cet ancrage comme un ressort de raideur k . On a alors : $W = \frac{F_s^2}{2k}$. Il sera donc d'autant plus facile d'exercer une force dans une direction donnée que la raideur selon cette direction est grande, car dans ce cas, on minimise l'énergie.

Pouvoir tester l'influence de la rigidité permet également de quantifier les différences de comportements entre des cellules normales et des cellules tumorales modèles. En effet, leurs différences de comportement avaient été observées au début des années 80 grâce aux films de silicone, plissés par les cellules. De façon qualitative, les cellules cancéreuses ne plissaient pas autant les films que les cellules normales. Il n'était cependant pas possible d'en connaître les raisons (Harris *et al.*, 1981). À l'aide de ces substrats calibrés, les phénomènes cellulaires ont pu être quantifiés entre deux types de fibroblastes, normaux et transformés (Munevar *et al.*, 2001) :

- les cellules saines, dont le mouvement reste dirigé sur 2 h, sont bien étalées et les forces qu'elles exercent sont, pour les plus intenses, situées uniquement

dans le lamellipode, front avant de la cellule ;

- les cellules cancéreuses ne sont pas polarisées et beaucoup moins étalées : on ne distingue ni front avant ni front arrière clairement défini, leur mouvement est erratique. De plus, les forces maximales qu'elles exercent sont plus faibles de plusieurs ordres de grandeur que les cellules normales.

Ces résultats ont été confirmés avec une autre lignée fibroblastique cancéreuse (Tzvetkova-Chevolleau *et al.*, 2008).

Les plots Malgré une géométrie différente et une discontinuité du support, les phénomènes observés sur les substrats continus se retrouvent sur les micro-piliers déformables. En fonction de la hauteur, de l'espacement des plots mais aussi du type cellulaire, différents traitements doivent être appliqués sur les plots pour être certain que les cellules n'adhèrent qu'au sommet des plots. Dans ce cas, la mesure

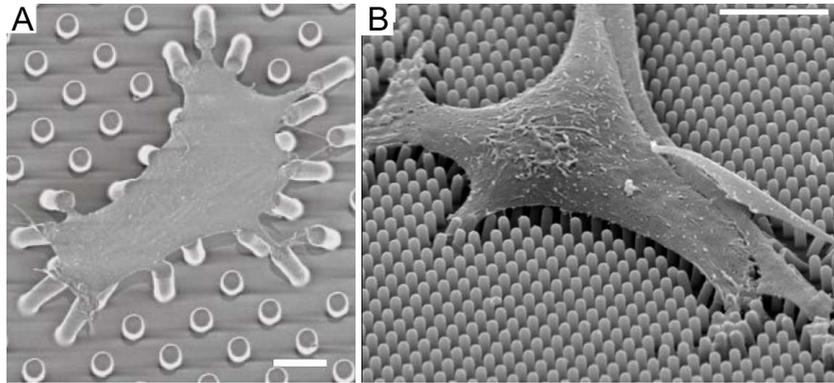


FIGURE 2.7 – Images de MEB. **A** plots de 3 μm de diamètre espacés de 9 μm centre à centre et recouverts de fibronectine. La cellule est un fibroblaste, d'après Tan *et al.* (2003) **B** plots de 1 μm de diamètre espacés de 3 μm centre à centre avec de la fibronectine sur le haut des plots. Il s'agit d'une cellule MDCK. barre=10 μm

de forces est simple et utilise directement l'équation $F = k\Delta x$ si les plots ne sont que faiblement déformés (déplacement du plot inférieur à un diamètre). En fonction du régime dans lequel on est (voir figure 2.8), il est alors possible de corrélérer la taille des adhésions focales situées sur un plot à la déflexion de ce plot, et donc à la force exercée. On retrouve de grandes forces pour de petits contacts focaux aussi bien pour les substrats continus que pour les micro-piliers (voir figure 2.8). Dans l'autre partie de la courbe, on obtient une relation linéaire entre la force mesurée et la taille des adhésions focales. La force par aire d'adhésion focale est constante, et vaut 5 $\text{nN}/\mu\text{m}^2$.

Influence de la raideur des plots sur le comportement cellulaire On peut facilement, en modifiant la géométrie des plots, modifier leur raideur (voir

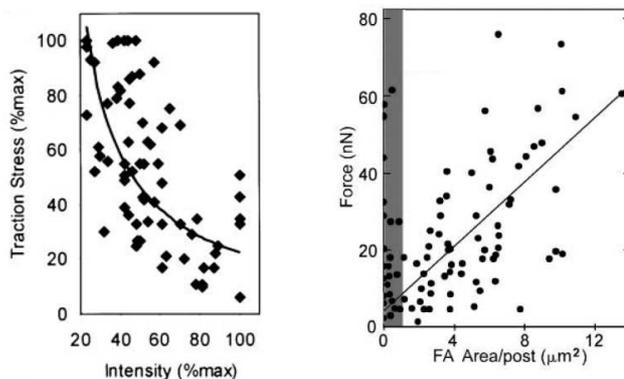


FIGURE 2.8 – À gauche, intensité relative de la contrainte exercée sur le substrat en fonction de l'intensité d'expression d'une protéine des adhésions focales (la zyxine) (Beningo *et al.*, 2001) ; À droite, force en fonction de la surface du plot occupée par l'adhésion focale (Tan *et al.*, 2003). Dans les deux cas, on note une grande force pour les petites adhésions.

partie 2.1.1). En effet, elle varie comme l'inverse de leur longueur au cube. Avec une gamme de hauteurs variant d'un facteur 5, on peut donc avoir une gamme de raideurs sur plus de deux décades, sans modifier les propriétés chimiques du substrat ni même la densité des plots. Il est alors possible d'étudier le comportement des cellules sur toute cette gamme de raideur. À l'aide de ces substrats, il a été montré que la cellule n'adaptait pas la force exercée sur les plots, ni la contrainte, mais le déplacement et ce, dans une gamme de densité assez grande (entre 10 et 40% de la surface est occupée par des micro-piliers), la taille des plots valant 1 ou 2 μm (voir figure 2.9). Autrement dit, la force augmente avec la rigidité, comme pour les substrats continus. On retrouve la corrélation observée sur substrat continu entre rigidité du substrat et taille des adhésions focales (Dembo et Wang, 1999; Saez *et al.*, 2005) : lorsque le substrat est mou, les adhésions focales sont plus petites (voir figure 2.9).

Pour étudier l'influence d'une anisotropie de rigidité au sein d'une même cellule ou d'un même groupe de cellules ont été créés des plots dont la section varie : avec le même principe de fabrication mais un autre motif, il est très aisé de modifier l'aspect des plots. Pour introduire une variation locale de rigidité, des plots à section elliptique ont été utilisés.

La formule 2.2 est toujours valable, mais l'expression du moment d'inertie est modifiée (en prenant comme référence $\theta = 0^\circ$ selon le grand axe) :

$$I = \frac{\pi}{4}ab(a^2 \cos^2 \theta + b^2 \sin^2 \theta) \quad (2.7)$$

Le cas particulier $a = b$ redonne bien l'expression 2.4. Avec ces plots ovales (voir A de la figure 2.10), on obtient une variation de la rigidité continue en fonction de l'angle. Sur de telles surfaces, si on mesure l'ellipticité des îlots de cellules épithéliales et que l'on représente l'angle fait par le grand axe de l'îlot avec l'axe principal des plots, on

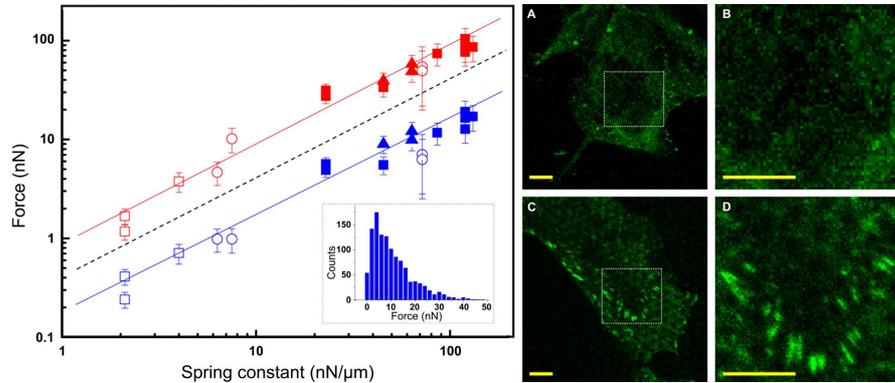


FIGURE 2.9 – À gauche, relation (en échelle log-log) entre la force exercée sur un plot et la raideur des plots, pour différentes géométries, avec variation du diamètre des plots (1 ou 2 μm) et de la densité des plots (10% \circ , 22% \square , 40% \triangle). La relation est linéaire (la pente est égale à 1). A droite, image en microscopie confocale de cellules fixées et dont la vinculine est marquée. Pour A et B (zoom de A), la raideur est de 2 $\text{nN}/\mu\text{m}$, pour C et D (zoom de C), elle est de 71 $\text{nN}/\mu\text{m}$. Barre=10 μm , d'après Saez *et al.* (2005)

constate que l'orientation majoritaire se fait selon la raideur maximale des plots (B de la figure 2.10). Cependant, les cellules ont tendance à s'orienter sur des substrats

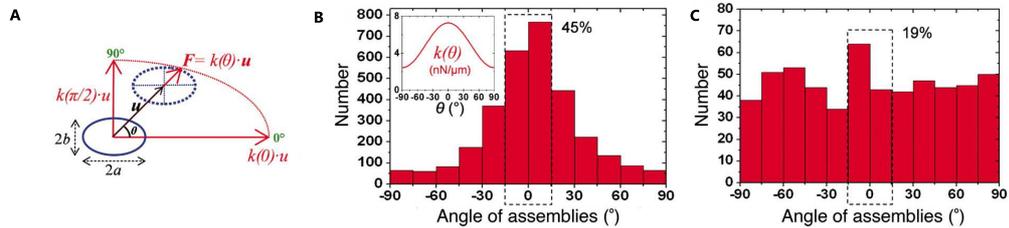


FIGURE 2.10 – **A** Représentation d'un plot à section elliptique ; **B** Répartition de l'orientation des îlots de cellules sur plots ovales - 45% d'entre eux sont selon la direction de plus grande rigidité ; **C** Contrôle : Répartition de l'orientation des îlots de cellules sur lamelle micro-imprimée - 19% d'entre eux sont selon le plus grand axe des ellipses, d'après Saez *et al.* (2007)

ayant des anisotropies de géométrie. C'est ce qu'on appelle le *contact guidance*, qui sera développé dans la partie 3.3.1. Pour décorrélérer un possible effet de la géométrie et l'influence de la raideur, un contrôle est nécessaire. Un motif de plots ovales est imprimé sur une lamelle de verre. On a donc le même motif que les plots, mais sans avoir d'anisotropie de rigidité. L'orientation des îlots de cellules est plus uniforme (voir C de la figure 2.10). C'est donc bien la raideur et non la géométrie qui dirige la croissance de ces îlots. Elle dirige également la migration de cellules sur ce substrat, orientée en grande majorité selon la plus grande raideur (Saez *et al.*, 2007).

La raideur oriente donc l'adhésion et la migration : les adhésions focales étant plus présentes et plus stables sur les substrats les plus rigides, les cellules migrent de préférence selon la plus grande raideur.

En effet, aux temps courts (adhésion), la minimisation de l'énergie du système induit l'orientation selon la plus grande raideur (Bischofs et Schwarz, 2003). Cette énergie minimale confère sa stabilité au système. Aux temps intermédiaires (migration), l'étude sur substrats anisotropes, qu'ils soient continus (Lo *et al.*, 2000) ou discrets (Saez *et al.*, 2007) a montré une orientation selon la plus grande raideur. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées, mais le problème reste ouvert.

On a donc, à temps courts (adhésion) et intermédiaires (migration) une explication de l'orientation selon la plus grande rigidité. De plus, dans certains tissus *in vivo*, les valeurs des rigidités s'étendent sur plusieurs décades. Récemment, des études ont montré que même à temps longs, c'est-à-dire lors de la différenciation cellulaire, la rigidité joue un rôle (Engler *et al.*, 2006).

Différenciation

Récemment a été étudié le comportement de cellules souches adultes (cellules souches mésenchymateuses ou MSC, issues de la moelle osseuse) en fonction de la rigidité du substrat (Engler *et al.*, 2006). Ces cellules ont la possibilité *in vivo* de se différencier en neurones, cellules musculaires ou encore cellules osseuses. Les MSC peuvent être cultivées *in vitro* et donc être étudiées sur des substrats de rigidités différentes, sur un temps long (au moins une semaine). Dans cette étude ce sont des gels de polyacrylamide qui ont été employés.

Les cellules déposées sur un substrat dont la rigidité est du même ordre de grandeur que celle du tissu nerveux ($E \simeq 0,1 - 1$ kPa) vont adopter une morphologie très branchée, avec la présence de nombreux filopodes au bout d'une semaine. Après l'étude de la transcription cellulaire grâce à une puce à ADN, l'expression de marqueurs caractéristiques de neurones a été mise en évidence, aussi bien des marqueurs précoces que plus tardifs. En comparaison, l'expression de ces mêmes marqueurs dans des MSC non différenciées est cinq fois plus faible.

Les cellules déposées sur un substrat de rigidité intermédiaire ($E \simeq 8 - 17$ kPa) prennent, comme les myoblastes, une forme de faisceau caractéristique. L'expression des marqueurs myogéniques est elle aussi fortement augmentée : elle est six fois supérieure à celle des MSC non différenciées, y compris pour des marqueurs de différenciation avancée.

Enfin, les cellules déposées sur un substrat rigide ($E \simeq 25 - 40$ kPa) présentent elles une morphologie proche des ostéoblastes, précurseurs des cellules osseuses. L'expression des marqueurs osseux est quatre fois plus importante que celle dans les MSC non différenciées.

Des cellules souches ont donc la capacité de se différencier à un stade assez avancé de neurones, précurseurs musculaires ou osseux, et ce, uniquement en variant la

rigidité de l'environnement.

Ce phénomène de différenciation cellulaire fait intervenir la myosine-II, caractéristique de la contraction du réseau d'actine. En effet, une inhibition sélective de cette myosine (par la blebbistatine Straight *et al.* (2003)) supprime l'expression de ces marqueurs et ce, quelle que soit la rigidité du substrat (Engler *et al.*, 2006). La myosine-II joue donc un rôle prépondérant dans la capacité cellulaire à sentir et s'adapter à la rigidité du substrat.

Rôle de la mécanique dans l'induction biochimique

Les propriétés biochimiques de l'environnement cellulaire ont déjà montré leur rôle dans le comportement cellulaire. Aujourd'hui, les preuves s'accumulent également du côté des propriétés physiques. Le lien éventuel entre les deux reste à définir, mais des pistes sont déjà avancées. La configuration stérique de certaines molécules, telles que les facteurs de croissance, pourrait être modifiée par la nature de l'ancrage de la cellule à son environnement (Wipff *et al.*, 2007). En effet, dans le cas de fibroblastes

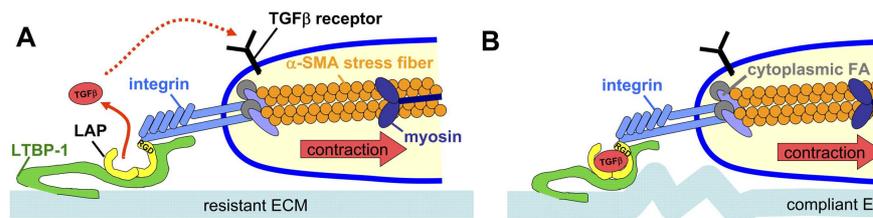


FIGURE 2.11 – Mécanisme de cageage/décageage du TGF- β , d'après Wipff *et al.* (2007)

se transformant en myofibroblastes² un modèle de cage à facteur de croissance a été proposé : lors de la contraction du réseau acto-myosine de la cellule sur un substrat rigide (A de la figure 2.11), la cage enfermant le facteur de croissance (TGF- β) s'ouvre et TGF- β peut aller se fixer sur son récepteur. La cellule peut se transformer en myofibroblaste. Si le substrat est trop mou (B de la figure 2.11), la contraction acto-myosique ne permettra pas l'ouverture de cette cage, et le fibroblaste ne se transformera pas.

De la même manière, une des composantes du complexe d'intégrine, p130cas, s'avère être sensible directement à une force. En effet, lorsqu'une force est exercée et que p130cas est donc étirée, elle est plus facilement phosphorylée (Sawada *et al.*, 2006). C'est une étape nécessaire au déclenchement d'une cascade favorisant les interactions protéine-protéine et donc la formation de plaques d'adhésion.

Enfin, nous avons évoqué plus haut (voir section 2.1.2) l'influence potentielle de la tension sur l'ouverture de canaux calciques, permettant la phosphorylation de la myosine-II et donc un renforcement de la tension cellulaire.

2. cellules dérivant des fibroblastes, évoquées dans la partie 1.2

Le lien entre les deux états (cellule différenciée ou non, réaction à une force ou non) pourrait donc être conformationnel.

2.2 Influences des contraintes extérieures exercées sur la cellule

Nous avons vu que la rigidité change le cytosquelette et les contacts adhésifs. D'une façon similaire, une force extérieure modifie également la réponse cellulaire. Il semble donc qu'il y ait un parallèle à faire entre rigidité et forces extérieures. Différents outils peuvent être employés, couvrant un large spectre de résolutions spatiales et temporelles : pinces optiques, pinces magnétiques, micro-plaques (voir table 2.1). Chacun des outils a sa propre gamme de raideur, les trois couvrant un

	Pincés optiques	Pincés magnétiques	Micro-plaques
Raideur (nN/ μm)	10^{-6} à 0,1	10^{-6} à 0,1	1 à 10
Force (pN)	0,1 à 100	0,05 à 20	$10^4 - 10^5$
Déplacement (μm)	10^{-4} à 100	$5 \cdot 10^{-3}$ à 10	0,2
Taille de la sonde (μm)	0,25 à 5	0,5 à 5	1x10

TABLE 2.1 – Propriétés physiques de différentes sondes utilisables pour exercer des forces sur des cellules, d'après Neuman et Nagy (2008); Zhang et Liu (2008); Thoumine *et al.* (1999)

spectre de plusieurs décades. Seules les micro-plaques ont une raideur du même ordre de grandeur que celle des plots.

Les pinces, optiques et magnétiques, sont beaucoup plus « molles » que les plots, et aussi plus localisées (elle peuvent être inférieures au μm). Elles permettent d'exercer une force sans contact direct. En effet, même si une bille est attachée à la cellule, la bille est manipulée à distance par un gradient de champ électromagnétique (pinces optiques) ou par un champ magnétique (pinces magnétiques). Comme cette bille a été attachée avant d'exercer la moindre force, il est possible de comparer avant force/après force sans que la géométrie ne soit modifiée. L'un ou l'autre pourra être utilisé en fonction des gammes de raideur et de force voulues. La relation entre déplacement de la bille et force est linéaire, comme pour les plots : on a $F = k\Delta x$. Un des avantages des pinces optiques est qu'on peut suivre par vidéomicroscopie le déplacement de la bille, et le corrélérer à la force exercée, y compris à haute fréquence, ce qui n'est pas réalisable avec des pinces magnétiques. L'inconvénient majeur des pinces optiques tient à la photodégradation due à l'utilisation de laser. On limite

ce phénomène, ainsi que l'échauffement, en utilisant des lasers dans le proche infrarouge. Dans ces deux cas, les forces exercées sont plutôt locales (billes de l'ordre du μm), contrairement aux micro-plaques qui permettent des mesures sur cellules entières.

Nous allons dans cette partie illustrer par deux exemples l'influence d'une force extérieure sur le comportement cellulaire, utilisant respectivement des pinces optiques et une micropipette.

2.2.1 Renforcement du cytosquelette d'actine

Lorsque l'on exerce une force à l'aide de pinces optiques, on peut piéger une bille fonctionnalisée³, liée à une cellule. Tant que la bille est maintenue par le piège, cette dernière reste fixe. À partir du moment où le piège est éteint, le mouvement rétrograde d'actine à l'intérieur de la cellule va déplacer la bille. Si on applique à nouveau une force, avec la même intensité, la bille va continuer son mouvement rétrograde. La force exercée par le piège ne suffit plus à maintenir la bille. Si on veut à nouveau la contrôler avec le piège optique, il faut que la force exercée par le piège soit supérieure à la force initiale (Choquet *et al.*, 1997). Ce renforcement, qui

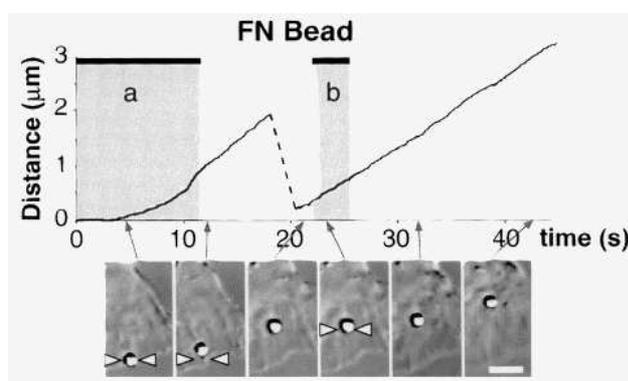


FIGURE 2.12 – Lorsque le piège est en marche pour la première fois (a), la bille commence à s'en échapper au bout de 5s. Lorsqu'on remet le piège en marche à la même puissance, (b) la bille n'est pas piégée et s'en échappe tout de suite, d'après Choquet *et al.* (1997). Barre = 2 μm

est proportionnel à la force, est spécifique du cytosquelette. En effet, si au lieu de recouvrir la bille de fragments spécifiques de la fibronectine se liant à une intégrine donnée, on la recouvre d'anticorps anti-intégrine, on n'observe pas ce renforcement. Depuis, il a été montré que ce renforcement est corrélé au recrutement d'actine (Icard-Arcizet *et al.*, 2008). En effet, lors de l'application de la force sur une bille

3. spécifique des intégrines (RGD, fibronectine)

recouverte d'un peptide spécifique de l'intégrine⁴, la protéine fusion Actine-GFP forme un patch corrélé avec la position de la bille piégée, ce patch n'existant pas avec les billes non piégées. L'intensité d'actine est la plus forte dans la zone de plus forte contrainte. Les cinétiques du renforcement et de l'augmentation de fluorescence sont similaires, avec des temps caractéristiques de l'ordre de quelques centaines de secondes aussi bien pour le renforcement de la cellule que pour le recrutement de l'actine.

2.2.2 Renforcement des adhésions focales

Ce phénomène de renforcement du cytosquelette d'actine est intimement lié aux adhésions focales. Pour l'étudier, des micropipettes de raideur calibrée ($60 \text{ nN}/\mu\text{m}$), ont été utilisées (Riveline *et al.*, 2001). Les cellules sont adhérentes, soit sur fibronectine, spécifique d'une adhésion aux intégrines, soit sur polylysine, permettant une adhésion non spécifique. Les cellules ne forment que des complexes focaux initialement et aucune adhésion focale, car elles ont été laissées dans un milieu sans sérum. Deux expériences ont été menées :

- les micropipettes sont également recouvertes de fibronectine, ou de poly-lysine⁵. En micromanipulant la micropipette, on racle le lamellipode vers l'intérieur de la cellule (voir figure 2.13), exerçant une force sur cette dernière. En fonction de la nature de la fonctionnalisation, deux comportements différents sont observés :
 - lorsque la cellule adhère à une surface fibronectine, les adhésions focales présentes initialement s'allongent. De plus, leur intensité de fluorescence est constante le long de l'adhésion, ce qui montre un recrutement et non une diffusion de protéines. C'est une réponse active, qui a lieu quel que soit le traitement réalisé sur la micropipette.
 - si la cellule adhérait initialement à de la polylysine, la force exercée par la pipette n'engendrera pas d'adhésion focale.
- au lieu de déformer la cellule en exerçant directement une force, il est possible d'utiliser un substrat élastique et, à l'aide d'une micropipette, de le déformer sans entrer en contact avec la cellule. Cette approche avait déjà été employée auparavant (Lo *et al.*, 2000). Dans les mêmes conditions que la première expérience, les cellules n'établissent au départ que des complexes focaux avec leur substrat. Après déformation du substrat, et donc établissement d'une force sur la cellule, des adhésions focales se forment et croissent selon la direction de la force, comme dans la première expérience. Ce n'est donc pas l'augmentation de pression interne exercée sur la cellule qui avait engendré ces adhésions focales, mais bien la force.

4. extrémité de la fibronectine reconnue par l'intégrine, le peptide Arginine-Glycine-Acide aspartique ou RGD

5. la poly-lysine permet une adhésion forte et non spécifique

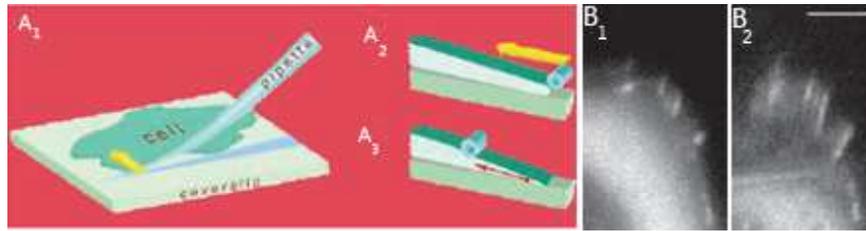


FIGURE 2.13 – **A** : La cellule, adhérente sur une lamelle, est raclée par une pipette, vers l'intérieur; **B** : Adhésions focales avant (**B1**)/après **B2** l'action de la pipette, d'après Riveline *et al.* (2001) barre=20 μm

Cette étude a mis en évidence deux voies de signalisation, à partir de Rho, qui est à l'origine de la formation des adhésions focales (Rottner *et al.*, 1999) : une par ROCK, et une par mDia1, homologue de la formine qui favorise la polymérisation de l'actine au bout (+). À l'aide de drogues inhibitrices spécifiques de vecteurs exprimant une forme active de mDia1, il a été montré que (voir figure 2.14) :

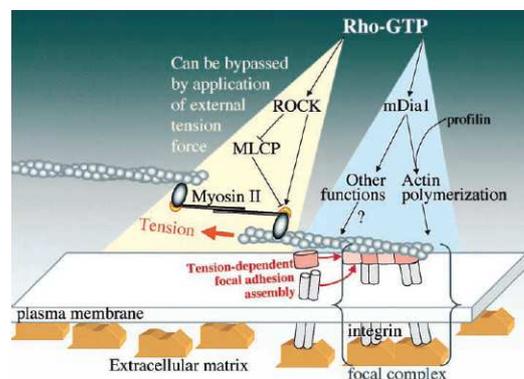


FIGURE 2.14 – Rôle de la tension dans le mécanisme de formation des adhésions focales, d'après Riveline *et al.* (2001)

- ROCK peut être contournée par l'action mécanique : en présence de C3 et de Y-27632, l'application d'une force sur la cellule induit la formation d'adhésions focales comme vu précédemment ;
- l'absence de filaments d'actine empêche la transmission de forces et donc la formation d'adhésions focales ;
- mDia1 est essentielle pour obtenir la formation d'adhésions focales.

2.2.3 Modélisation de l'influence des forces et de la rigidité sur le comportement cellulaire

Des modèles théoriques (Nicolas *et al.*, 2004, 2006) ont tenté d'expliquer la régulation des adhésions focales sous l'effet des contraintes générées par l'adhésion d'une cellule sur un substrat. Ils proposent une explication de la sensibilité mécanique de la forme des adhésions focales mais aussi de la limitation de l'adhésion cellulaire par la rigidité de la matrice extra-cellulaire.

Anisotropie des adhésions focales contrôlée par la mécanosensation

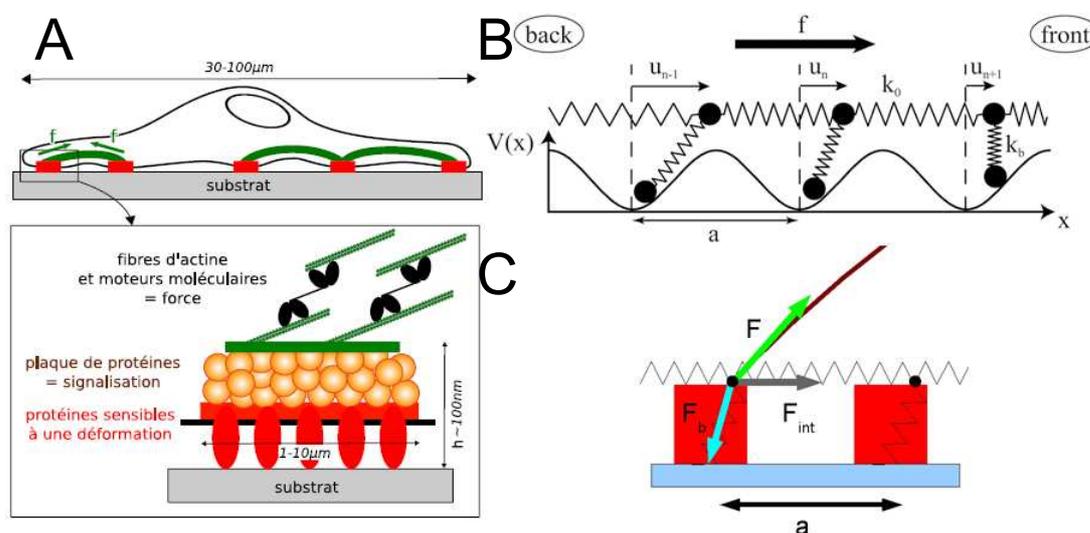


FIGURE 2.15 – **A** : représentation schématique d'une adhésion focale. **B** : modélisation des interactions entre les adhésions focales et la matrice extra-cellulaire à une dimension. a est la distance entre deux intégrines, u_n le déplacement du n -ième ancrage par rapport à sa position en l'absence de force. Le potentiel V représente les propriétés d'ancrage de la matrice extra-cellulaire selon x . **C** : représentation des forces à une adhésion focale, d'après Nicolas (2007); Nicolas *et al.* (2004)

Comme on l'a vu, les adhésions focales sont liées à la fois à la matrice extra-cellulaire et au cytosquelette d'actine (voir image **A** de la figure 2.15). Lorsqu'une force est exercée par le réseau d'actine, la jonction matrice extra-cellulaire-cytosquelette (c'est-à-dire l'adhésion focale) est déformée. C'est cet ancrage qui permet de transmettre la force à l'extérieur de la cellule. Il est donc logique que si la liaison adhésion focale/matrice extra-cellulaire est faible (par exemple si la matrice extra-cellulaire est peu réticulée), les adhésions focales ne soient pas stables. Dans ce cas, il ne peut y avoir déformation dans la zone d'adhésion, et les mécano-senseurs ne peuvent être activés. Le recrutement d'autres protéines pour renforcer la plaque n'a alors pas lieu.

Nicolas *et al.* (2004) a d'abord eu une approche unidimensionnelle, en employant un matériau non élastique. L'interaction cellule/substrat peut alors être modélisée par un ressort de raideur k_b . Les propriétés élastiques de la matrice extra-cellulaire sont modélisées par le potentiel V défini par :

$$V(x) = \frac{k_m a^2}{4\pi^2} \cos 2\pi \frac{x}{a}$$

a représentant la distance entre deux intégrines, k_m la raideur de l'ancrage à l'équilibre. On peut modéliser la force exercée sur la particule n par ses plus proches voisins par

$$F_{int} \simeq k_0 a^2 \frac{d^2 u}{dx^2}$$

Les autres forces mises en jeu sont la force F exercée sur les fibres de stress, et une force F_b dont la projection selon l'axe x vaut : $F_b = -k_b u(x)$. C'est une force de rappel due à une matrice extra-cellulaire fixe et rigide. Les forces sont représentées sur l'image **C** de la figure 2.15. On obtient donc selon l'axe (Ox) :

$$k_0 a^2 \frac{d^2 u}{dx^2} - k_b u + F(x) = 0 \quad (2.8)$$

Si on résout cette équation pour une force F qui vérifie

$$F(x) = \begin{cases} 0 & \text{si } |x| \geq L/2, \\ f & \text{si } |x| < L/2 \end{cases}$$

où L représente la longueur de l'adhésion focale, on obtient :

$$\frac{\delta\Phi}{\Phi}(x) = -\frac{du}{dx} = \frac{f}{\sqrt{k_b k_0}} \begin{cases} \frac{|x|}{x} \sinh\left(\sqrt{\frac{k_b}{k_0}} \frac{L}{2a}\right) e^{-\sqrt{\frac{k_b}{k_0}} \frac{|x|}{a}} & \text{si } |x| \geq L/2, \\ \sinh\left(\sqrt{\frac{k_b}{k_0}} \frac{|x|}{a}\right) e^{-\sqrt{\frac{k_b}{k_0}} \frac{L}{2a}} & \text{si } |x| < L/2 \end{cases} \quad (2.9)$$

On a $\delta\Phi(x) < 0$ pour $x < 0$ et $\delta\Phi(x) > 0$ pour $x > 0$. Ceci nous indique qu'à l'arrière de l'adhésion focale, la densité baisse et donc l'adhésion focale est étirée tandis qu'à l'avant, la densité augmente et donc l'adhésion focale est comprimée. La réponse de l'adhésion à la direction de la force est donc anisotrope.

Ce modèle unidimensionnel peut être étendu à deux dimensions, en ajoutant un module de cisaillement tangentiel. Malgré cela, l'action de la force va tout de même entraîner une anisotropie (voir figure 2.16). Il est donc encore possible de conclure que les mécano-senseurs sont activés à l'avant de l'adhésion et qu'ils sont sensibles à la compression, et que l'adhésion va se former dans la direction de la force, comme observé expérimentalement (Riveline *et al.*, 2001).

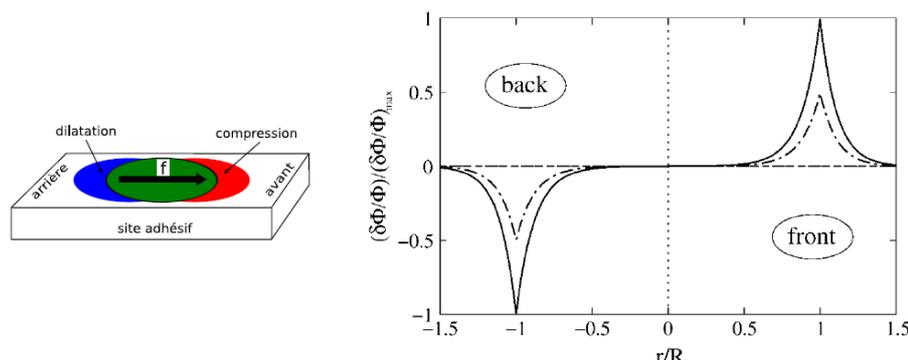


FIGURE 2.16 – A gauche : représentation de la déformation d’une adhésion focale lors de l’application d’une force linéique f . A droite : taux de déformation le long de l’adhésion focale, d’après Nicolas *et al.* (2006)

Limitation de l’adhésion par l’élasticité de la matrice extra-cellulaire

Nicolas *et al.* (2006) ont ensuite étudié le cas d’adhésion bidimensionnelle, sur un substrat élastique. Il a été montré expérimentalement que tant que les forces restent faibles (inférieures à 15 nN), la contrainte reste constante lorsque l’adhésion croît (Balaban *et al.*, 2001). On a alors un recrutement à la fois de protéines de la plaque d’adhésion et de fibres de stress. Il est donc plausible de supposer la contrainte constante lors de la croissance de l’adhésion. Les autres hypothèses du modèle sont que :

- l’assemblage protéique se fait selon un processus quasi-statique. En effet, les temps caractéristiques sont très supérieurs à ceux de la diffusion de molécules (1) ;
- la croissance de l’adhésion focale est thermodynamiquement favorable (2) ;
- le complexe protéique ne contient qu’une intégrine transmembranaire (2).

La croissance de l’adhésion focale dépend de l’énergie libre d’adsorption de nouvelles molécules. Elle s’exprime de la façon suivante :

$$\Delta E_{tot} = \Delta E_{élastique} + \Delta E_{chimique}(\vec{r})$$

$\Delta E_{chimique}(\vec{r})$ dépend de l’énergie libre (par unité d’aire) d’association des molécules de l’adhésion focale e , de la distance a entre deux molécules d’intégrine (voir figure 2.15) et de la densité relative de molécules dans l’adhésion focale $\frac{\delta\Phi}{\Phi}(\vec{r})$. On a alors $\Delta E_{chimique}(\vec{r}) = -e\frac{\delta\Phi}{\Phi}(\vec{r})a^2$. De plus, le coût énergétique de la déformation du substrat, pour un ajout d’un complexe protéique de surface a^2 , la contrainte valant f/a , est de $\Delta E_{élastique} = \frac{f^2 a^2}{2k_b}$ (Bischofs et Schwarz, 2003). Si on ajoute comme contrainte supplémentaire la rigidité du substrat, modélisée par le potentiel V , on

peut définir une nouvelle raideur k telle que

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_m} + \frac{1}{k_b}.$$

On a alors $\Delta E_{\text{élastique}} = \frac{f^2 a^2}{2k} = f^2 a^2 \left(\frac{1}{k_m} + \frac{1}{k_b} \right)$. Pour satisfaire l'hypothèse (2) on doit avoir : $\Delta E_{\text{tot}} < 0$ lors de la croissance des adhésions focales, mais aussi $\Delta E_{\text{chimique}} < 0$. Or, si le substrat est mou ($k_m \rightarrow 0$), on a $\Delta E_{\text{tot}} > 0$. La croissance des adhésions focales s'arrête. À l'aide de ce modèle, il est possible de rendre compte de ce qui a été observé par Saez *et al.* (2007). En considérant que le substrat constitué de micropiliers est similaire à une matrice extra-cellulaire élastique et épaisse, on retrouve la saturation observée de la taille des adhésions focales. En effet, on peut montrer que l'aire des adhésions focales est proportionnelle au module de cisaillement de la matrice extra-cellulaire, ce qui implique que la force totale est proportionnelle à la raideur du matériau : $F \propto k$. Comme la déformation u est telle que $u = \frac{F}{k}$. On a donc $u = \text{cte}$. On obtient donc la même conclusion, mais il n'est pas nécessaire de supposer que la déformation contrôle la croissance des adhésions.

2.3 Les limitations physiologiques du substrat à deux dimensions

Le substrat à deux dimensions, rigide, reste aujourd'hui le plus employé. Cependant, *in vivo*, chaque tissu a sa propre rigidité, sa structure : si les épithéliums sont bien modélisés par un environnement bidimensionnel, de par leur constitution en feuillets polarisés, les muscles ont une structure 3D. La discontinuité du substrat 2D ne correspond donc pas à la géométrie de l'environnement physiologique.

Avec des substrats flexibles, continus et discrets, l'influence de la rigidité a donc pu être étudiée et les forces engendrées mesurées. Il a pu être montré que la rigidité remodèle l'adhésion, la migration ainsi que tous les composants cellulaires y participant : remodelage des fibres de stress, des adhésions focales notamment, si caractéristiques de la cellule étalée sur une lamelle de verre. Certains ont donc étudié le comportement cellulaire dans un environnement qu'on ne peut plus considérer comme plan, que ce soit sous forme de gel ou de substrats micro-fabriqués plus artificiels.

Chapitre 3

La migration cellulaire à trois dimensions

Sommaire

3.1	Anisotropie de la matrice	50
3.1.1	Composition des gels 3D : propriétés physiques et chimiques	50
3.1.2	Adhésions à trois dimensions	52
3.2	La migration cellulaire à trois dimensions	54
3.2.1	La migration amiboïde	54
3.2.2	La migration mésenchymateuse	55
3.3	Rôle de la topographie dans le comportement cellulaire	56
3.3.1	Texturation de surface : le guidage par contact	56
3.3.2	Substrats artificiels : plots 3D élastiques	60
3.4	Conclusion	61

Au cours de notre travail, nous avons utilisé les outils de microfabrication pour étudier le rôle de la topographie sur la migration cellulaire et tenter de se rapprocher des conditions physiologiques de la migration *in vivo*, souvent liées à un environnement tridimensionnel. Nous allons donc présenter les propriétés des gels 3D ainsi que le comportement cellulaire dans ces gels, et enfin le rôle de la topographie dans le comportement cellulaire.

3.1 Anisotropie de la matrice

3.1.1 Composition des gels 3D : propriétés physiques et chimiques

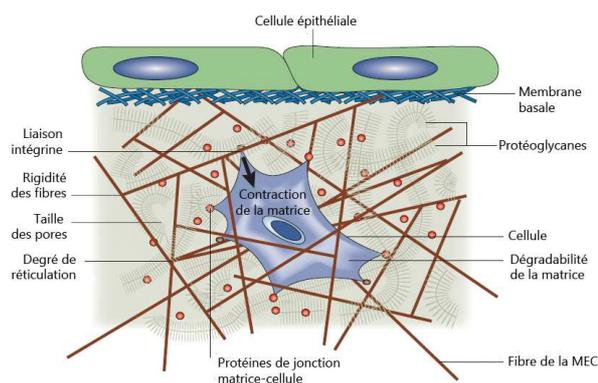


FIGURE 3.1 – Représentation schématique d’une cellule dans un environnement 3D ainsi que les principaux paramètres intervenant dans le comportement cellulaire, d’après Griffith et Swartz (2006)

In vivo, les cellules se trouvent généralement dans un environnement tridimensionnel. La matrice extra-cellulaire est un gel, constitué de fibres formant des pores de taille variable et dont la composition est très hétérogène, à base de polypeptides et de protéines. Ses propriétés mécaniques proviennent de ses différents composants : les fibres de collagène résistent aux tensions mais aussi au compactage engendré par les cellules, tandis que les protéoglycannes¹ permettent de contrôler le taux d’hydratation, et donc la résistance à la compression ainsi que le transport de protéines (voir figure 3.1). Grâce aux propriétés de rétention d’eau des protéoglycannes et leur capacité à piéger les molécules due à leurs nombreuses charges, la composition de la matrice extra-cellulaire varie spatialement : les facteurs de croissance tels que TGF- β évoqués page 39, ainsi que d’autres protéines signalisatrices telles que les chemokines, vont être distribuées en fonction de leur affinité avec les protéines de la matrice extra-cellulaire et la répartition spatiale de ces dernières. Il est donc possible d’avoir des gradients de protéines signalisatrices qui vont favoriser différents phénomènes cellulaires tels que l’adhésion ou la migration. Les propriétés mécaniques de la matrice sont elles aussi fonction de sa composition. De plus, la présence d’enzymes, les métalloprotéases de la matrice, permet une dégradation de celle-ci, qui va alors être remodelée.

1. Association d’une protéine et d’un glycosaminoglycane, polymère sulfaté dont la brique élémentaire est composé de deux oses. C’est le glycosaminoglycane qui, grâce à ses nombreuses charges, a la propriété de rétention d’eau.

Les propriétés mécaniques et biochimiques de l'environnement cellulaire varient aussi bien spatialement que temporellement. L'étude *in vivo* de la mécanique cellulaire à trois dimensions est en pratique difficilement réalisable actuellement. Pour s'en approcher, on utilise généralement des hydrogels pour reproduire *in vitro* un environnement 3D :

- **Les gels de collagène.** Ce sont les premiers gels 3D à avoir été utilisés. Pour obtenir une gamme de gels où la densité varie largement, il est possible de modifier la concentration en collagène (de 0,6 à 2,5 mg/ml), mais aussi sur les conditions de fabrication : type de collagène (généralement I ou IV, ce dernier étant le composant le plus abondant de la matrice extra-cellulaire), température, mode de réticulation. Il existe une gamme étroite de concentrations pour laquelle la vitesse de migration cellulaire est optimale : 1,5 à 2 mg/ml (Friedl et Bocker, 2000). Cependant, *in vivo* la matrice extra-cellulaire contient d'autres éléments, tels que la fibronectine ou des protéoglycanes. Il est possible de les ajouter artificiellement au collagène, mais alors la polymérisation du gel devient plus aléatoire et moins contrôlable.
- **Les gels de polypeptides artificiels.** Ce sont des hydrogels artificiels, à base d'oligo-peptides qui s'assemblent spontanément au pH du milieu de culture (Narmoneva *et al.*, 2005). On peut citer RAD16-I² (dont le nom commercial est PuraMatrix®) ou RAD16-II³. Comme pour les gels de collagène, la rigidité (et par corrélation, sa porosité) de la matrice est modifiée par un changement de concentration. Comme pour les gels de collagène, la rigidité du gel joue sur le réarrangement intercellulaire et permet, en fonction de sa valeur, une construction tissulaire ou non. Lorsqu'il a lieu et contrairement aux gels de collagène, ce réarrangement (ici sous forme de vaisseaux sanguins, car ce sont des cellules endothéliales microvasculaires qui ont été employées) ne nécessite pas d'apport de facteurs extérieurs tels que des facteurs de croissance.
- **Les gels dérivés de la matrice extra-cellulaire.** Le gel le plus employé est un gel commercial, le Matrigel®. Il est sécrété par une lignée cellulaire, les Schwannomes. Il contient du collagène IV et de la laminine. Il permet notamment de recréer des gels mimant la membrane basale, socle des cellules endothéliales, et est souvent utilisé pour étudier l'invasivité de cellules (Friedl et Bocker, 2000).

Dans un gel 3D, les cellules peuvent être ajoutées avant réticulation, pour qu'elles y soient réparties de façon homogène, que l'étape d'adhésion initiale soit contournée et que la cellule établisse directement des liaisons « 3D » avec son environnement. Il est également possible de les ajouter sur le haut du gel après réticulation, ce qui permet d'étudier l'invasion du gel par les cellules et notamment le passage de 2D à 3D. En fonction de la rigidité de la matrice extra-cellulaire, les cellules présentes à

2. dont la formule en acides aminés est $(RARADADA)_2$ avec R = Arginine, A = Alanine et D = Acide aspartique

3. dont la formule en acides aminés est $(RADA)_4$

l'intérieur pourront plus ou moins la contracter : dans une matrice rigide, la cellule exercera moins de forces sur le gel l'entourant et donc ne se différenciera pas de la même façon. Par exemple, Sieminski *et al.* (2004) ont montré qu'en fonction du type de cellules endothéliales utilisé et pour le même type de matrice (donc à rigidité et porosité égales), les unes formaient des vaisseaux semblables à ceux observés *in vivo* tandis que les autres non. Par contre, pour une matrice moins rigide, le deuxième type de cellules formait également des vaisseaux. Chaque type de tissu est adapté à une plage de rigidité, une modification de la rigidité environnante pouvant être le signe d'un phénomène tumoral (Paszek *et al.*, 2005).

3.1.2 Adhésions à trois dimensions

À deux dimensions, il a été montré que les cellules formaient des adhésions avec leur substrat, passant de complexes focaux, de petite taille mais très dynamiques et siège de forces importantes à des adhésions focales, plaques de protéines stables et de taille plus importantes. En fonction du type d'intégrines impliquées dans le processus, des adhésions fibrillaires (voir 1.1.3) peuvent se former. Le phénomène d'adhésion à trois dimensions est différent : il se forme des adhésions 3D (voir Cukierman *et al.* (2001) et figure 3.2). Les protéines dans ces trois types d'adhésions sont différentes (voir table 3.1).

Molécule	Adhésion focale	Adhésion fibrillaire	Adhésion 3D
α_5 intégrine	-	+	+
β_1 intégrine	+	+	+
β_3 intégrine	+	-	-
Fibronectine	+	-	-
Vinculine	+	-	+
Phosphotyrosine	+	-	+
FAK	+	-	+
Paxilline	+	-	+

TABLE 3.1 – Répartitions des protéines d'adhésions impliquées en fonction du type d'adhésion, d'après Cukierman *et al.* (2001)

Pour les mettre en évidence, des cellules ont été déposées sur quatre types de surfaces différentes : une surface plane recouverte de fibronectine, un gel 3D dérivé de la matrice extra-cellulaire, un gel de collagène, mais aussi une surface plane recouverte d'une fine couche du gel 3D aplani dérivé de la matrice extra-cellulaire. À l'aide de ces quatre surfaces, il est possible d'étudier séparément l'influence de la géométrie (2D/3D) et l'influence de la composition, aussi bien en 2D (fibronectine/gel aplani) qu'en 3D (collagène/gel de matrice extra-cellulaire). Étant donné qu'une intégrine

particulière, α_5 , est partie prenante des adhésions 3D, son influence dans chacune des quatre géométries a été étudiée. Lors de son inactivation, un changement a été

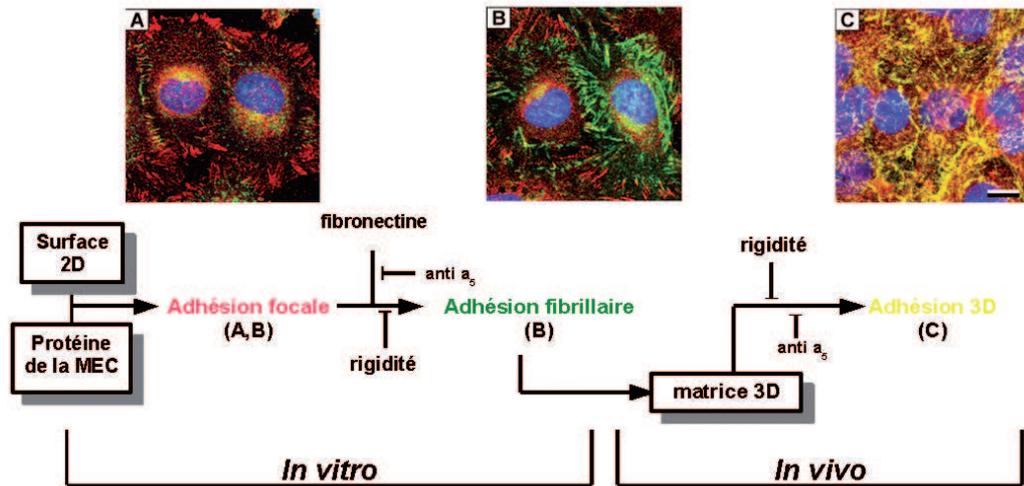


FIGURE 3.2 – Mécanismes du passage de deux dimensions à trois dimensions et de son influence sur l'adhésion cellulaire. **A**, **B** et **C** représentent des cellules dans chacune des configurations (**A** à 40 min, **B** à 4 heures, en présence de fibronectine, **C** à 5-8 jours), l'intégrine α_5 étant en vert, la paxilline en rouge et le noyau en bleu. Barre=10 μm , d'après Cukierman *et al.* (2001)

constaté uniquement dans le cas de cellules déposées dans un gel dérivée de la MEC. Elles adoptent alors une morphologie proche de celle observée à deux dimensions. Dans un gel de collagène, sur un gel aplani ou sur une surface recouverte de fibronectine, son inactivation ne change rien dans le comportement cellulaire.

C'est donc à la fois la composition (le collagène ne suffit pas pour l'adhésion cellulaire 3D) et la géométrie (le comportement cellulaire sur gel aplani est fondamentalement différent de celui sur le même gel 3D) qui déterminent l'adhésion et le comportement cellulaire. De plus, à composition et géométrie équivalentes, la rigidification de la matrice 3D empêche la formation de ces adhésions 3D mais permet la formation d'adhésions focales normalement observées à 2D. Les trois paramètres clés sont donc la composition, la géométrie et la rigidité du substrat. Il a été montré à 2D que la FAK était essentielle dans la formation et la dynamique des adhésions focales, notamment la transformation des adhésions focales en adhésions fibrillaires (Geiger *et al.*, 2001). Son rôle est par contre très réduit dans la formation des adhésions 3D. En effet, son activité est près de 4 fois plus faible dans des cellules sur gel 3D que sur fibronectine (Cukierman *et al.*, 2001).

La découverte des mécanismes de formation des adhésions à trois dimensions, qui remettent en partie en cause l'étude bidimensionnelle des mécanismes cellulaires, permet d'aller plus loin dans la compréhension de la migration tridimensionnelle.

3.2 La migration cellulaire à trois dimensions

Pour pouvoir migrer dans un environnement à 3D, la cellule modifie son interaction avec la matrice extra-cellulaire. Pour cela, elle a trois possibilités :

- (i) changer sa forme ;
- (ii) remodeler la matrice grâce aux forces qu'elle peut exercer par l'intermédiaire des adhésions 3D ;
- (iii) modifier chimiquement la matrice grâce à des protéases.

Le schéma classique de migration présenté sur la figure 1.19 ne s'applique plus à 3D. On peut regrouper les types de migrations à 3D en deux types de stratégies : les migrations amiboïde et mésenchymale.

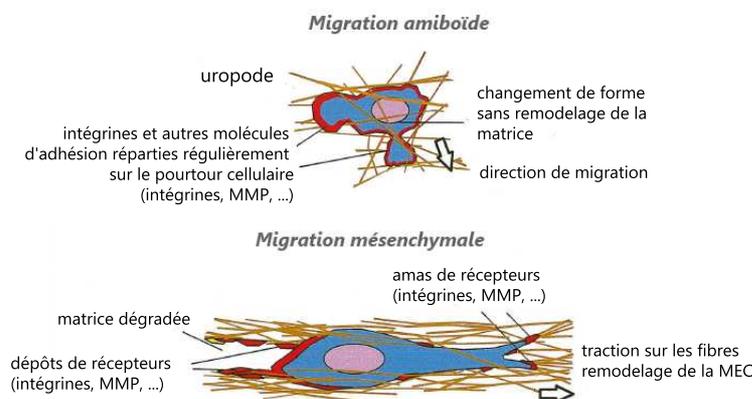


FIGURE 3.3 – Migrations amiboïde et mésenchymale, d'après Friedl et Brocker (2000)

3.2.1 La migration amiboïde

Ce mode de déplacement a été nommé d'après la migration des amibes, la plus étudiée pour sa migration étant *Dictyostelium discoideum*. Ce type cellulaire ne possède pas d'intégrine, même si récemment a été découverte une protéine présentant quelques similitudes avec l'intégrine β et intervenant dans la migration (Cornillon *et al.*, 2006). Ce mode de migration, dans les eucaryotes supérieurs, est utilisé par les cellules souches, les lymphocytes ou encore par certaines cellules cancéreuses. Pour se déplacer, ces cellules n'établissent que des contacts de courte durée avec leur substrat, sans faire intervenir les intégrines. Elles ne possèdent pas de fibres de stress et n'exercent pas de force sur le substrat les entourant. Cette absence de contact et de fibres de stress entraîne un faible étalement, mais aussi des vitesses de migration très élevées pouvant atteindre plusieurs dizaines de $\mu\text{m}/\text{min}$. Pour avancer, ces cellules

forment des pseudopodes par oscillations dirigées de leur cortex d'actine qui vont s'étendre et rétracter leur uropode (voir figure 3.3, gauche). Ce cortex est contrôlé par Rho et ROCK, qui vont lui donner sa rigidité et lui permettre de se déformer tout en conservant sa structure (Friedl, 2004). Grâce à leur grande déformabilité, les cellules migrant sous le mode amiboïde passent dans les micropores de la matrice extra-cellulaire ou à travers un tapis de cellules et ce, sans avoir recours aux tractions sur les fibres de la matrice extra-cellulaire ni à sa dégradation par des protéases. Si le réseau est localement trop dense et que la cellule ne peut pas se déformer assez pour passer à travers ces pores, elle préférera contourner cette zone et passer par une zone moins dense. Le mécanisme est donc bien différent de celui observé à 2D.

3.2.2 La migration mésenchymateuse

Ce type de migration est semblable à celui sur substrat 2D. La morphologie cellulaire est très branchée, proche de celle des fibroblastes. Ce mode de déplacement est utilisé par les fibroblastes, les myoblastes, mais aussi par certains types cellulaires (endothéliales par exemple) qui forment des tapis jointifs, à des vitesses bien inférieures à celles de la migration amiboïde (0,1 à 2 $\mu\text{m}/\text{min}$). La jonction intégrines-matrice extra-cellulaire est indispensable dans ce mode de déplacement. Elle permet à la cellule d'exercer des forces sur son environnement *via* les adhésions 3D et de se propulser le long des fibres constituant la matrice extra-cellulaire. Si la matrice entourant les cellules est trop dense, la cellule peut remodeler la matrice extra-cellulaire en la dégradant (voir figure 3.3, droite). Pour cela, elle utilise des métalloprotéases de la matrice (MMP) présentes à sa surface, qui vont se localiser sur les sites d'adhésions à la matrice. Ces MMP ne sont pas présentes lorsque les cellules sont sur un substrat 2D, et sont donc caractéristiques de la troisième dimension. Cette modification de l'environnement cellulaire permet à d'autres cellules de suivre la nouvelle voie créée, on a donc un guidage par contact (voir 3.3.1). Comme à 2D, les GTPases de la famille de Rho sont impliquées dans la migration 3D. Le rôle de Rac et Cdc42 est semblable à celui observé à deux dimensions, c'est à dire qu'ils favorisent la formation de lamellipodes et l'interaction intégrines-matrice extra-cellulaire.

Ces deux modes de migration ne sont pas exclusifs. En effet, certains types cellulaires peuvent passer de l'un à l'autre en fonction de divers facteurs, que nous allons détailler.

La transition épithéliale-mésenchymale Cette transition se produit lors des cancers mettant en jeu les épithéliums. Tout d'abord, les jonctions cellules-cellules (notamment celles faisant intervenir les cadhérines) sont dissociées. Par contre, les intégrines et les fonctions protéasiques telles que les MMP ne sont pas modifiées. Les cellules peuvent donc migrer, de façon individuelle. Ce comportement peut également être induit par l'emploi de facteurs de croissance, tels que l'*hepatocyte growth*

factor (HGF, voir du Roure *et al.* (2005)).

La transition mésenchymale-amiboïde Certaines cellules cancéreuses, telles que certains fibrosarcomes (Friedl, 2004) ont la capacité de passer d'une migration mésenchymale à une migration amiboïde. Ce processus nécessite de :

- cesser la protéolyse de la matrice ;
- baisser le taux d'expression des intégrines ;
- renforcer la voie de signalisation impliquant Rho et ROCK.

À l'aide de gels 3D, on peut donc étudier la migration cellulaire en jouant sur les paramètres chimiques tels que les enzymes présentes dans le substrat ou en inhibant certaines voies de signalisation. Néanmoins, les différents paramètres physiques (porosité, rigidité) et chimiques interagissent et il est difficile d'étudier leurs actions réciproques, même si certains travaux ont pu être réalisés (Zaman *et al.*, 2006). Aussi, de façon alternative, il est possible dans un premier temps d'utiliser des substrats microfabriqués dont on peut maîtriser les propriétés chimiques pour avancer dans la compréhension des changements induits par une matrice 3D par rapport à un substrat 2D.

3.3 Rôle de la topographie dans le comportement cellulaire

3.3.1 Texturation de surface : le guidage par contact

Il est possible de modifier la topographie du substrat pour étudier le comportement cellulaire dans un environnement qui n'est plus bidimensionnel. Effectivement, de nombreuses études ont montré que les cellules réagissent aux variations de topographie. Cela se produit *in vivo*, dans les étapes de développement ou de régénération de tissus, la topographie étant engendrée par l'environnement extra-cellulaire ou les cellules environnantes. La pose de prothèses et de dispositifs médicaux dans des tissus entraîne également l'insertion de rugosité dans l'organisme. En effet, les surfaces de ces pièces ne sont jamais parfaitement planes. La réussite de l'intégration des dispositifs peut donc parfois reposer sur cette topographie, la morphologie cellulaire s'y adaptant.

Les cellules réagissent à la texturation de la surface, y compris *in vivo* (Teixeira *et al.*, 2003). Sur un substrat parfaitement lisse, les cellules vont s'orienter aléatoirement, sans direction privilégiée. Sur une surface possédant de fines rainures, les cellules vont s'aligner selon les rainures. Ce phénomène a été observé pour la première fois dans les années 50, puis étudié de façon extensive. À l'aide de techniques similaires à celles employées pour fabriquer les plots (voir partie 4), on peut obtenir des surfaces portant des sillons dont la taille caractéristique peut aller jusqu'à 100 nm.

Il es alors possible d'adapter les paramètres aux phénomènes que l'on souhaite explorer grâce à la large gamme de surfaces obtenues. Les deux motifs les plus employés sont les rainures et les micro-plots.

L'alignement selon des rainures

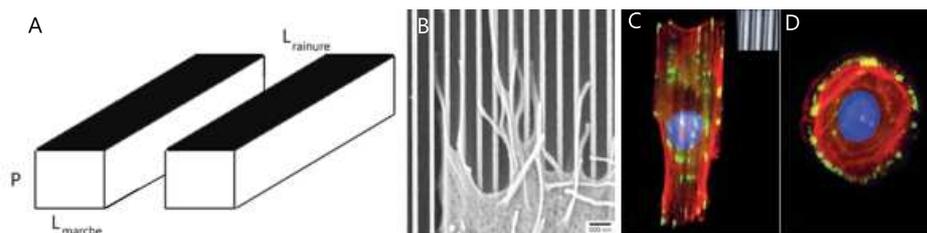


FIGURE 3.4 – **A** Schématisation d'une rainure. Pour faciliter la compréhension, nous allons nommer P la profondeur des rainures, L_{marche} (resp. $L_{rainure}$) la largeur de la marche (resp. de la rainure). On désignera les géométries par $(P(\mu\text{m}); L_{marche}(\mu\text{m}); L_{rainure}(\mu\text{m}))$ - **B** zoom sur des filopodes s'insérant dans les rainures (barre = 500 nm)- Cellules épithéliales sur $(0,6; 1,9; 2,1)$ (**C**) et sur surface plane (**D**) dont l'actine, la vinculine et le noyau ont été marqués respectivement en rouge, vert et bleu, d'après Teixeira *et al.* (2003)

Les différents types cellulaires réagissent aux topographies avec leurs caractéristiques propres. En effets, si certains types cellulaires peuvent s'aligner sur des motifs dont la taille peut descendre jusqu'à 130 nm (Clark *et al.*, 1991), d'autres ne réagiront pas à des motifs dont la taille est inférieure à 1 μm (Teixeira *et al.*, 2003). Cependant, les cellules vont s'étaler et se diviser avec des caractéristiques communes. Lorsque la cellule s'oriente selon les rainures, le cytosquelette va également s'orienter (voir figure 3.5), que ce soit le réseau d'actine ou le réseau de microtubules. L'orientation des microtubules est constatée dès 20 min après le dépôt, alors que la cellule elle-même n'est pas orientée. Le réseau d'actine quant à lui, bien que son orientation globale apparaisse après celle des microtubules, montre une accumulation d'actine au niveau des discontinuités du substrat dès 5 min après le dépôt (Rajnicek *et al.*, 2008). On constate le même phénomène pour les protéines participant aux adhésions focales.

Le phénomène est cependant plus complexe car la largeur des marches et des rainures intervient dans le phénomène. En effet, en utilisant trois motifs différents : $(P(\mu\text{m}); L_{marche}(\mu\text{m}); L_{rainure}(\mu\text{m})) = (0, 5; 0, 5; 0, 5), (3; 15; 15), (3; 3 - 4, 5; 3 - 4, 5)$ et en dépolymérisant alternativement le réseau d'actine et le réseau de microtubules à l'aide de drogues spécifiques (respectivement cytochalasine B et colcémide), les résultats obtenus montrent une influence décorrélée des deux réseaux. En effet, les microtubules sont généralement suffisants pour que les cellules réagissent aux substrats texturés, mais non nécessaires : en l'absence de microtubules, les cellules

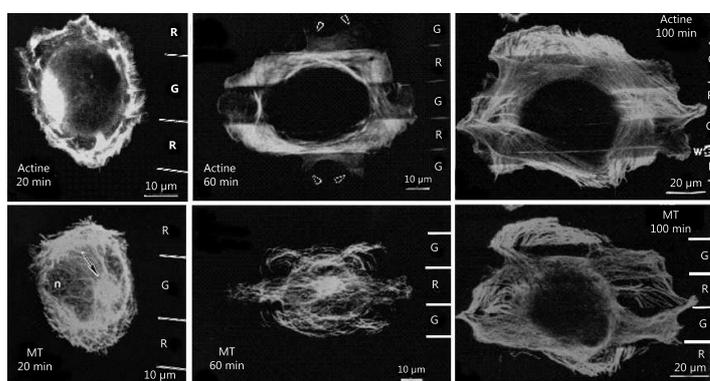


FIGURE 3.5 – Effets de la topographie (rainures de $30 \mu\text{m}$ de large et $3 \mu\text{m}$ de haut) sur l'actine (en haut) et les microtubules (en bas) de fibroblastes au cours du temps - le noyau est indiqué par n - R (=ridge) désigne les marches et G (=groove) les rainures, d'après Oakley et Brunette (1993)

s'alignent et migrent selon les rainures, sauf dans le cas $(0,5;0,5;0,5)$. Sur cette surface, le comportement est similaire à celui observé sur surface plane après dépolymérisation des microtubules. Le réseau d'actine ne permettrait donc pas de sentir une texture en dessous d'une certaine taille. Cependant, sur des surfaces à texturation plus fine encore $((0,15-0,6;0,07;0,33)$ à $(0,15-0,6;1,9;2,1))$ les structures caractéristiques formées par les filaments d'actine, filopodes et lamellipodes, s'alignent selon les rainures (Teixeira *et al.* (2003) et voir C de figure 3.4), sans que la cellule ne pénètre dans ces dernières. Les filopodes vont explorer à la fois le fond des rainures et le haut des marches.

Comme montré sur la figure 3.4, les adhésions focales s'alignent selon la géométrie du substrat. La largeur des marches joue un rôle-clé car lorsqu'elles sont suffisamment larges et espacées, les cellules peuvent descendre dans les rainures. En effet, pour des tailles de marches de 1 à $4 \mu\text{m}$, les adhésions focales sont beaucoup plus prononcées sur le haut de ces marches qu'elles ne le sont sur et entre des marches plus grandes (Meyle *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 2003).

Sur ces substrats, les GTPases de la famille de Rho impliquées dans la migration sur substrat plan le sont également lorsque le substrat est texturé. Sur des substrats $(0,04$ à $1,1;1-2-4;1-2-4)$ ont été inhibés sélectivement Rho, Rac et Cdc42 (Rajnicek *et al.*, 2008). Si l'inhibition de Rho (par la drogue C3) élimine l'orientation cellulaire, celles de Rac et Cdc42 ne jouent aucun rôle. Rho peut même jouer le rôle de variable d'ajustement, car en l'activant grâce à de l'acide lysophosphatidique (LPA), l'orientation est encore plus prononcée (voir figure 3.6).

Ces substrats constitués de rainures, largement utilisés, permettent d'étudier l'influence de la géométrie sur le comportement cellulaire. Cependant, ils présentent une invariance continue par translation. Pour l'éliminer et permettre aux cellules de

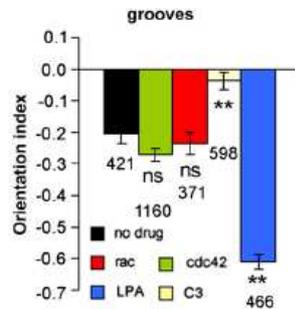


FIGURE 3.6 – Influence de la suppression des RhoGTPases Rho, Rac et Cdc42 sur l'orientation de cellules déposées sur substrats texturés, d'après Rajnicek *et al.* (2008)

rencontrer continuellement des « creux et des bosses » dans toutes les directions, des substrats constitués de petits plots ont également été employés.

Influence de la rugosité du substrat : emploi de nano/microplots

Pour fabriquer ces plots, plusieurs techniques sont possibles (Dalby *et al.*, 2003; Frey *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2007). Elles permettent chacune d'obtenir des tailles de différents ordres de grandeur : généralement de l'ordre du μm (Dalby *et al.*, 2003) ou dizaine de μm (Frey *et al.*, 2006), elles peuvent descendre jusqu'à quelques centaines de nm (Choi *et al.*, 2007). Comme dans les rainures, la profondeur est un paramètre important : lorsqu'elle est suffisamment faible, les filopodes vont explorer l'espace entre les plots (Choi *et al.*, 2007). Une des différences morphologiques majeures est, après exploration par les filopodes, l'apparition de pseudopodes, structures de taille intermédiaire entre les filopodes et les lamellipodes. Ces structures multiples donnent une forme branchée aux cellules : leur facteur de forme (donné par l'expression $FF = \frac{4\pi A}{p^2}$ où A représente l'aire de la cellule et p son périmètre, voir figure 3.7) est fortement diminué par rapport à celui mesuré sur surface plane (Frey *et al.*, 2006). Les cellules sont également moins étalées sur ces surfaces et plus rapides (vitesse de migration multipliée par 1,5).

Non seulement la forme cellulaire est modifiée, mais également l'expression des protéines impliquées dans la migration (voir figure 3.8) : l'actine ne forme que peu voire pas de fibres de stress, tandis que les adhésions focales sont fortement stabilisées sur ces plots : leur durée de vie est doublée. Cependant, malgré le peu de fibres de stress, l'inhibition de la myosine-II rend la morphologie cellulaire identique sur micro-plots et sur surface plane. La myosine-II pourrait donc être impliquée dans la réponse au changement de topographie (Frey *et al.*, 2006), et notamment l'augmentation de vitesse observée. L'absence de FAK tend également à rendre la réponse cellulaire identique à celle observée sur surface plane (Frey *et al.*, 2006).

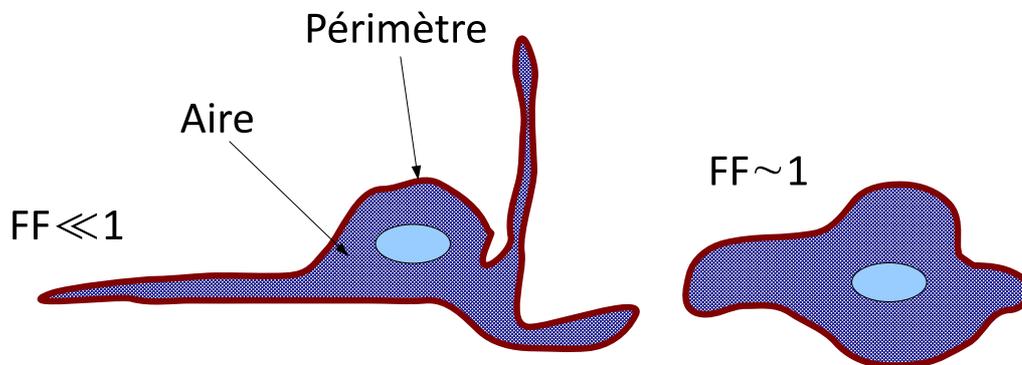


FIGURE 3.7 – Exemples de cellules dont le facteur de forme est très faible et dont le facteur de forme est proche de 1

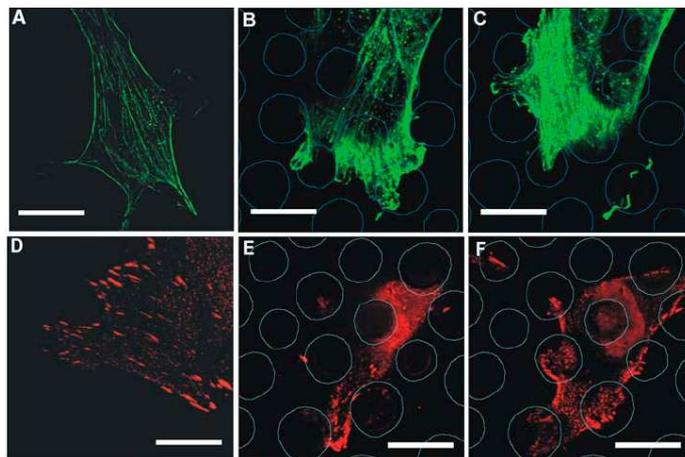


FIGURE 3.8 – Actine (A, B, C) et vinculine (D, E, F) sur surface plane (A et D) et plots (B, C, E, F). Reconstitutions des moitiés inférieure (B et E) et supérieure (C et F) de la cellule. Barre=20 μm , d'après Frey *et al.* (2006)

3.3.2 Substrats artificiels : plots 3D élastiques

Les plots en PDMS, fabriqués par lithographie (voir 4.1), peuvent être facilement modifiés. On a vu précédemment (partie 2.1.1) qu'il est possible de fabriquer de petits motifs de quelques μm de haut et de 1 ou 2 μm de diamètre. Des réseaux carrés de plots de section carrée à la base et ronde au niveau du sommet⁴ ont été utilisés (Kajzar *et al.*, 2008). Ils mesurent 10 μm de côté et de 20 à 30 μm de haut. L'espacement entre les plots est variable, de 20 à 110 μm , son influence peut

4. Le procédé de fabrication employé, qui sera détaillé dans la partie suivante, ne permet pas d'obtenir une section constante sur tout le plot

donc être étudiée sur une gamme assez large. Ces plots, grâce à leurs propriétés mécaniques (module d'Young de $608 \text{ kPa} \pm 20 \text{ kPa}$) et à leurs dimensions sont très flexibles. Si on considère ces plots comme des poutres cylindriques, on peut estimer leur raideur k à $\sim 1500 - 2000 \text{ nN}/\mu\text{m}$. En dessous d'un espacement de $30 \mu\text{m}$, les

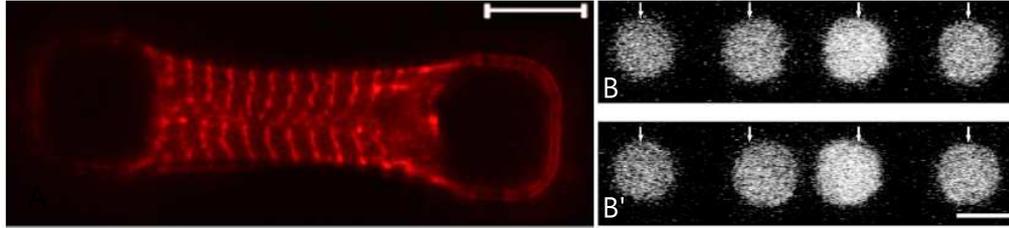


FIGURE 3.9 – **A** Image en microscopie confocale d'un myocyte suspendu entre deux plots. L' α -actinine est marquée en rouge ce qui rend les bandes Z visibles. **B** et **B'** Enregistrements des plots, (**B'** 2s après **B**). La contraction est rendue visible par le déplacement du plot gauche. barre= $10 \mu\text{m}$, d'après Kajzar *et al.* (2008)

cellules, des précurseurs musculaires ou myocytes, vont préférentiellement adhérer entre deux plots (en suspension) plutôt que sur le fond du substrat entre les plots. *In vivo*, les myocytes possèdent des assemblages intra-cellulaires spécifiques des cellules musculaires : ce sont des sarcomères, constitués de myofibrilles. Ces derniers sont constitués de filaments d'actine et de filaments de myosine et sont connectés les uns aux autres par ce qu'on appelle des bandes Z *in vivo*. Ce sont ces bandes Z que l'on retrouve dans les cellules suspendues entre les plots (voir figure 3.9, **A**). Tout comme dans un gel 3D, les fibres de stress sont absentes, ainsi que les adhésions focales. On retrouve donc des conditions plus proches des conditions physiologiques, avec un environnement 3D et une réponse similaire à celle observée *in vivo*. Le système permet de recréer un environnement 3D, certes très simple, mais parfaitement contrôlé. Grâce à la maîtrise des paramètres et à la flexibilité de ces piliers, les cellules suspendues peuvent les déformer. Il est alors possible de mesurer les forces exercées au cours du temps et d'observer les battements associés aux myocytes (voir figure 3.9, **B**). Cette première étude fournit des éléments qualitatifs et ouvre des possibilités d'étude pour d'autres types cellulaires.

3.4 Conclusion

En modifiant finement la texture d'un environnement, il est possible d'induire un comportement cellulaire spécifique : migration dirigée, alignement selon une texture. Les seuils de ces comportements sont propres à chaque type cellulaire, mais on peut en dégager des comportements généraux : les cellules s'alignent le long de rainures et la migration est modifiée. Associés à ces changements morphologiques, les

composants cellulaires eux-même se réorganisent : le cytosquelette épouse la direction des rainures, les adhésions focales se forment préférentiellement au niveau des discontinuités. Néanmoins, si on ne peut plus parler de substrats bidimensionnels, ce ne sont pas encore des substrats 3D. Le modèle en quatre temps de migration décrit par Alberts *et al.* (2002) s'applique encore, ce qui n'est pas le cas dans un gel 3D : les cellules vont certes s'aligner le long des fibres constituant le gel, mais elles peuvent aussi adopter une migration amiboïde, qui n'a pas d'équivalent à 2D. Certaines études (Kajzar *et al.*, 2008) commencent à recréer un environnement tridimensionnel très simple, qui a l'avantage d'être paramétrable facilement (densité, rigidité, dimensions). C'est cette voie que nous avons choisie d'explorer, pour déterminer jusqu'à quel point le mouvement dans ces substrats artificiels modèles se rapproche de celui dans un gel. Nous allons donc déterminer quels sont les paramètres critiques de ces environnements, et déterminer leurs points communs avec les gels, plus proches dans leur composition et leur géométrie d'un environnement *in vivo*, mais dont les paramètres physico-chimiques sont beaucoup moins facilement contrôlables.

Deuxième partie

Fabrication des substrats, acquisition et analyse

Chapitre 4

Microfabrication et utilisation des substrats de micro-piliers

Sommaire

4.1	Techniques de fabrication des plots	66
4.1.1	La photolithographie	66
4.1.2	La gravure profonde par ions réactifs ou DRIE	68
4.2	Préparation de l'élastomère	69
4.2.1	Démoulage du PDMS	70
4.2.2	Amélioration du substrat	71
4.3	Traitement du PDMS	72
4.4	Conditions expérimentales de l'utilisation des plots . . .	74

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé des techniques de microfabrication issues de la microélectronique. Tout d'abord employées en physico-chimie avec la microfluidique, leur utilisation s'est étendue à la biologie depuis les années 90 : puces à ADN, *micro contact printing* (Chen *et al.*, 1997) ou encore *contact guidance* (voir partie 3.3.1). Ces techniques permettent la réalisation de motifs micrométriques, voire nanométriques, sur des matériaux de natures très différentes. Ici nous présenterons comment nous avons utilisé ces techniques pour fabriquer des surfaces de micro-piliers, qui nous ont permis d'analyser l'influence des propriétés mécaniques et topographiques du substrat sur l'adhésion et la migration cellulaires. Nous allons tout d'abord décrire la technique de photolithographie. Nous détaillerons ensuite les différents systèmes employés pour leur utilisation avec des cellules.

4.1 Techniques de fabrication des plots

4.1.1 La photolithographie

La photolithographie est une technique qui permet de creuser un matériau photosensible. On utilise un masque, dont certaines parties sont transparentes et d'autres opaques. On peut ainsi insoler le matériau photosensible. Il existe deux types de masques : si les motifs sont transparents sur fond chromé, on parle de masque positif, si les motifs sont chromés sur fond transparent, c'est un masque négatif (voir figure 4.1). La lumière sera donc transmise par le milieu transparent et arrêtée par celui opaque. Pour fabriquer ces masques, on dépose du chrome sur un cristal de

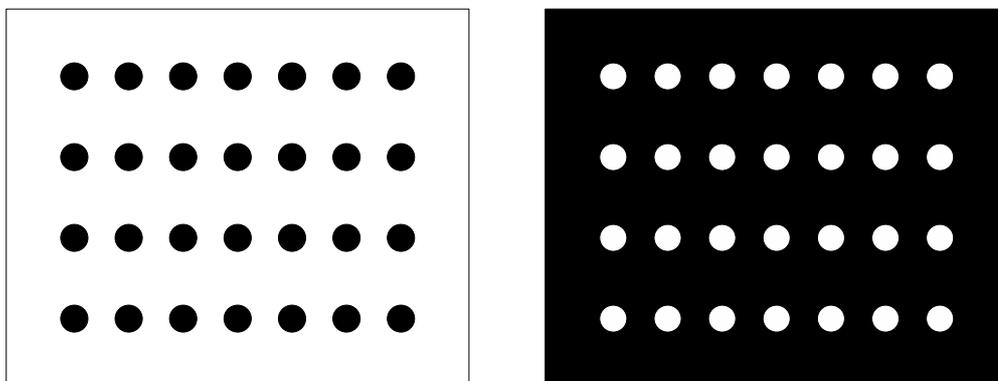


FIGURE 4.1 – Deux types de masques : celui de gauche a des motifs opaques, en négatif. Celui de droite a des motifs transparents, en positif

quartz (sa surface est donc parfaitement plane). C'est lui qui va rendre le quartz opaque. On obtient ensuite le motif correspondant en relief en utilisant des résines photosensibles. Deux types de résines sont utilisées :

- des résines dites positives : la résine exposée à la lumière Ultra-Violette (UV) devient soluble dans le développeur tandis que celle qui est restée protégée reste insoluble. Le motif est alors identique à celui du masque ;
- des résines dites négatives : la résine exposée à la lumière UV devient insoluble dans le développeur tandis que celle qui est restée protégée est soluble. Le motif est alors l'opposé de celui du masque.

Ces résines doivent être déposées en fine couche sur un *wafers* en silicium, fine galette cristalline dont la surface est polie, à l'aide d'une tournette (« *spin-coater* »). En fonction de la nature de la résine (notamment sa viscosité) mais aussi de la vitesse de rotation du spin-coater, l'épaisseur de la résine peut être ajustée, de quelques centaines de nm à quelques centaines de μm . Pour durcir cette résine, on la cuit¹ pendant quelques minutes pour évaporer le solvant qu'elle contient.

1. c'est ce qu'on appelle un recuit

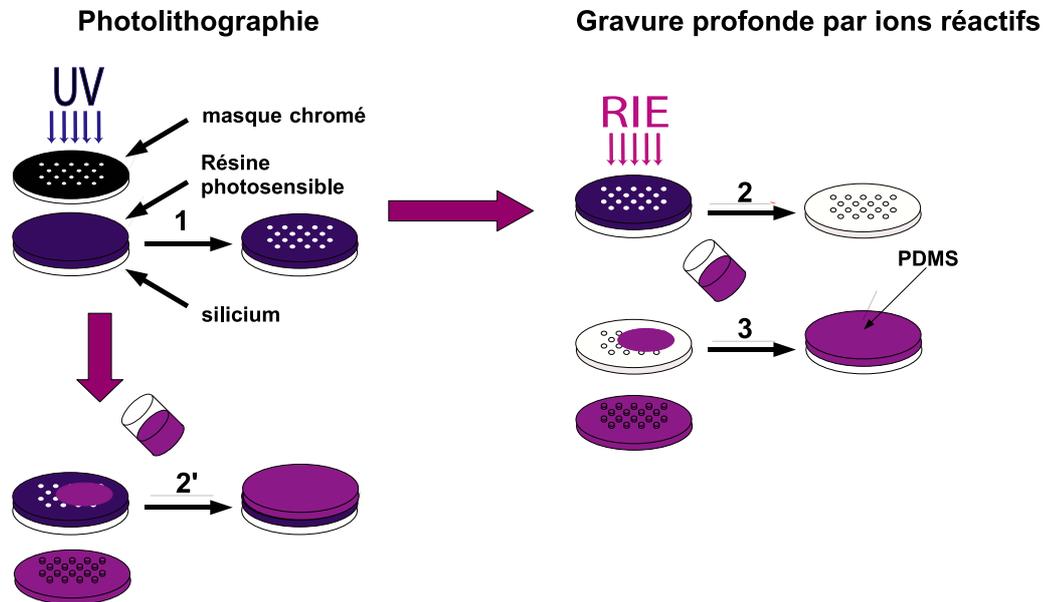


FIGURE 4.2 – Procédés de fabrication de substrats microfabriqués. En haut à gauche, l'étape commune de photolithographie, avec utilisation d'une résine positive. A droite, la gravure profonde. En bas à gauche l'utilisation directe du substrat réalisé par photolithographie

Il est alors possible d'insoler cette résine grâce à une lampe UV (voir étape 1 figure 4.2). Ceci permet à la résine de réticuler (négative) ou dépolymériser (positive) lorsqu'elle est exposée. La résolution est limitée par la taille des motifs présents sur le masque, la longueur d'onde employée mais aussi par la distance entre le masque et la couche de résine. En effet, la longueur d'onde des UV utilisés étant de l'ordre de 400 nm, pour des motifs de l'ordre du μm la lumière est diffractée dans la résine, d'autant plus que la résine est épaisse. Pour améliorer la résolution, il est possible de varier quatre paramètres :

- la taille des motifs. Si on l'augmente, l'effet de la diffraction sera moindre, mais il y a perte de précision sur le motif ;
- l'épaisseur de la couche de résine. Si on la diminue, la lumière diffracte sur une hauteur plus faible, mais la hauteur des motifs est également diminuée ;
- l'énergie lumineuse envoyée sur le masque ;
- l'espace entre le masque et la couche de résine. Il est possible de mettre directement les deux en contact, éventuellement en faisant le vide, ce qui permet une distance encore plus réduite. Sous vide, les faces du wafer ainsi que le masque doivent être parfaitement propres sous peine de rupture du vide et d'échec du processus.

Après l'insolation, il faut retirer la résine qui n'a pas réticulé. Pour cela, on utilise un développeur qui va dissoudre cette résine. Ce sont souvent des bases contenant des

dérivés d'ammonium. Il est soit possible de mécaniser ce système, soit de développer la résine manuellement. En fonction de la taille des motifs souhaités, il faut ajuster le temps de développement ainsi que la vitesse d'agitation du wafer dans le bain (plus cette vitesse est grande, plus le développement est rapide). Le développement est stoppé dans l'eau déionisée. Le motif est répliqué, aux dimensions désirées.

Dans le cadre de ce qui va nous intéresser par la suite, il est notamment possible d'utiliser cette technique de photolithographie pour fabriquer des élastomères, permettant de sonder les propriétés mécaniques des cellules. Ainsi, dès 2003, l'équipe de Christopher Chen a réalisé des plots flexibles en élastomère sur lesquels adhèrent des cellules (Tan *et al.*, 2003). Sur ces substrats sont cultivées des cellules qui, en exerçant des forces, déforment les plots. Cependant, la faible densité offerte fait que les cellules vont s'insérer partiellement entre les plots. Ceci est dû à des limitations optiques de la technique, on ne peut pas dépasser certains rapports d'aspect : il est possible de réaliser des plots de $3\ \mu\text{m}$ de diamètre, espacés de $6\ \mu\text{m}$ et hauts de $11\ \mu\text{m}$ (Tan *et al.*, 2003), mais il est difficile d'obtenir un réseau plus dense et des plots plus hauts en utilisant uniquement la photolithographie classique. On peut alors utiliser une autre méthode pour augmenter la résolution, la gravure profonde.

4.1.2 La gravure profonde par ions réactifs ou DRIE

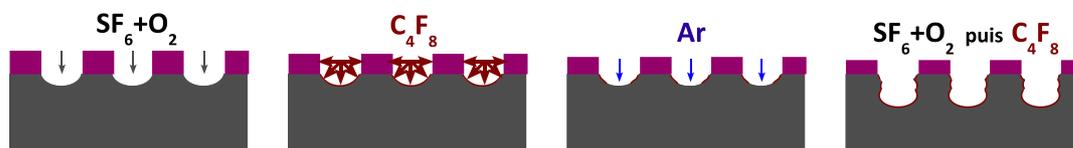


FIGURE 4.3 – Étapes de la gravure profonde

La gravure profonde en micro-fabrication consiste à faire une attaque chimique ciblée du substrat. Auparavant, il faut protéger les parties du substrat qui doivent rester intactes. Dans ce cas, le motif créé en résine, en employant la même technique que celle vue partie 4.1.1, permet de localiser précisément l'attaque chimique : elle aura lieu là où il n'y a pas de résine (voir étape 2 figure 4.2). Le procédé que nous avons utilisé est le procédé Bosch. Il permet d'obtenir des gravures avec un bon rapport d'aspect. On peut sans problème atteindre et dépasser les 1 :10 et ce, avec une densité de motifs assez élevée. Ce procédé, qui a lieu à pression très basse (de l'ordre de 10^{-7} Torr), consiste en une alternance de deux opérations : une première étape de gravure par plasma à base de SF_6 , d'argon et de O_2 , puis une phase de passivation qui va protéger la surface creusée avec un composé inerte, le C_4F_8 . Dans l'étape de gravure, le plasma d'argon est très directionnel, ce qui fait qu'on peut donc creuser perpendiculairement à la surface avec le plasma de SF_6 et de O_2 , en évitant la sous-gravure, à un taux de l'ordre de $5\ \mu\text{m}/\text{min}$. Le seul inconvénient de ce procédé

est l'apparition, dans une phase transitoire, d'anneaux à la base des motifs (voir figure 4.3). Cependant, pour des motifs suffisamment grands, ils disparaissent. La réalisation d'étapes assez courtes (ici 3 s d'attaque et 2,2 s de passivation) permettent également de limiter le phénomène. La vitesse de gravure dépend tout de même de

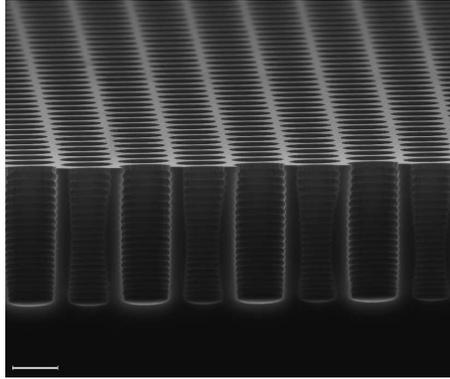


FIGURE 4.4 – Vue en coupe en microscopie électronique à balayage d'un wafer de silicium creusé par procédé Bosch. Les anneaux évoqués sont présents - barre=2 μm

la taille des motifs. En effet, s'ils sont petits (de l'ordre de 1 μm), le gaz peut moins facilement entrer dans les trous formés par la résine, et il faut donc calibrer son temps d'attaque en fonction de la section des motifs. Enfin, même si la vitesse de gravure est moindre pour la résine qui sert de masque ($\sim 0,3 \mu\text{m}/\text{min}$ pour celles employées), il faut prévoir une couche suffisamment importante pour qu'elle ne soit pas complètement détruite et que le silicium ne soit pas attaqué uniformément.

Après la gravure, il est nécessaire de retirer la résine. Il est possible d'utiliser des bains chimiques pour dissoudre la résine restante (acétone et isopropanol pour les résines employées) ou de faire une attaque au plasma O_2 , qui va la détruire sans modifier le substrat en silicium. Le moule est alors prêt à être utilisé. Pour le protéger, augmenter sa durée de vie et faciliter le démoulage de l'élastomère, on le silanise avec un fluorosilane. Ceci a pour conséquence de rendre la surface encore plus hydrophobe. Il ne reste plus qu'à utiliser les motifs creusés dans la plaque de silicium en tant que moules (voir étape 3 figure 4.2).

4.2 Préparation de l'élastomère

Pour nos expériences, nous avons utilisé un élastomère couramment employé en microfluidique, le Poly DiMéthyl Siloxane (PDMS) (formule donnée figure 4.5). Ce matériau présente de nombreux avantages en biologie :

- Il est biocompatible. Le milieu de culture cellulaire ne contiendra donc pas de substance relarguée par le PDMS qui modifie le comportement cellulaire. On

- peut également noter que le PDMS est perméable aux gaz, dont l'oxygène, ce qui permet de meilleurs échanges entre les cellules et leur milieu de culture ;
- Il est optiquement transparent et non fluorescent. Il est donc possible d'imager en microscopie optique, la lumière pouvant traverser l'échantillon. La taille et la structure des plots font qu'ils jouent le rôle de guide d'ondes, et apparaissent blanc sur fond noir ;
 - Il est possible de traiter sa surface avec des protéines d'intérêt (telles que des protéines de la matrice extra-cellulaire comme la fibronectine), qui vont servir d'ancrage aux cellules. On peut donc facilement faire adhérer des cellules à sa surface. On peut également accrocher d'autres molécules, telles que du silane, qui va permettre de créer des zones adhésives coexistant avec des zones non-adhésives.

Dans nos expériences, nous avons utilisé du Sylgard®184. Cet élastomère est

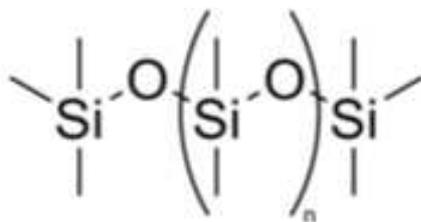


FIGURE 4.5 – Formule du PDMS

constitué de deux composants, la base et le réticulant. Le mélange standard est de une masse de réticulant pour dix masses de base. Nous le cuisons alors toute une nuit à 65°C. En fonction de la proportion de réticulant et du temps de réticulation, les propriétés mécaniques du PDMS varient. Etant donné que l'on s'intéresse à l'influence de la rigidité du substrat sur le comportement cellulaire, les propriétés mécaniques de celui-ci doivent être contrôlées régulièrement.

4.2.1 Démoulage du PDMS

Lorsqu'on a coulé et fait réticuler le PDMS sur le moule, il faut ensuite démouler les plots et les récupérer en bon état. Pour cela, le démoulage se fait en fonction du rapport d'aspect et de la raideur. En effet, si les plots sont souples et si leur densité est élevée, les contraintes exercées sur les plots lors du démoulage vont les défléchir, et ils vont toucher leurs voisins. Or les interactions PDMS-PDMS font qu'il est difficile de séparer deux plots qui se touchent. Il n'est alors plus possible d'utiliser ce réseau. On peut remédier à cette contrainte en démoulant les plots dans de l'éthanol. On a, pour le PDMS et l'éthanol à 70% : $\gamma_{lv} = 37 \text{ nN}/\mu\text{m}$. On peut alors comparer γ_{lv} à la raideur k des plots. Si cette raideur k est supérieure à γ_{lv} ,

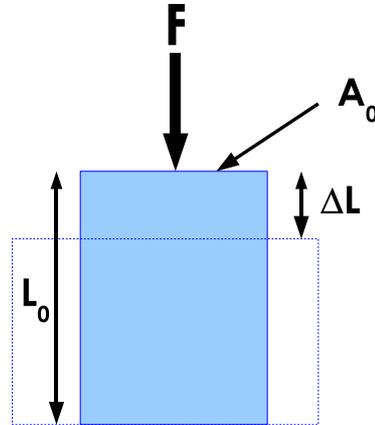


FIGURE 4.6 – Le module d'Young est défini comme étant égal à $E = \frac{FL_0}{A_0\Delta L}$ avec F la force exercée sur la section A_0 d'un objet de longueur à vide L_0 et ΔL la variation de longueur sous la contrainte F/A_0 . On utilise un cylindre de PDMS aux dimensions calibrées sur lequel on exerce une force croissante. La hauteur $L_0 - \Delta L$ est enregistré grâce à un capteur. On peut alors déterminer E

les plots ne se coucheront pas si le substrat est séché. En dessous de γ_{lv} , les plots se coucheront. Nous avons donc maintenant un substrat prêt à l'emploi.

4.2.2 Amélioration du substrat : un réseau permettant une observation par objectif à immersion à huile

Lorsqu'on utilise un microscope inversé, l'observation de l'échantillon est fonction de la distance de travail de l'objectif : pour un objectif à faible grossissement (jusqu'à 20X), elle peut atteindre plusieurs mm, tandis que pour un objectif à immersion à huile, elle n'est que de quelques centaines de μm . (voir figure 4.7) Pour pouvoir

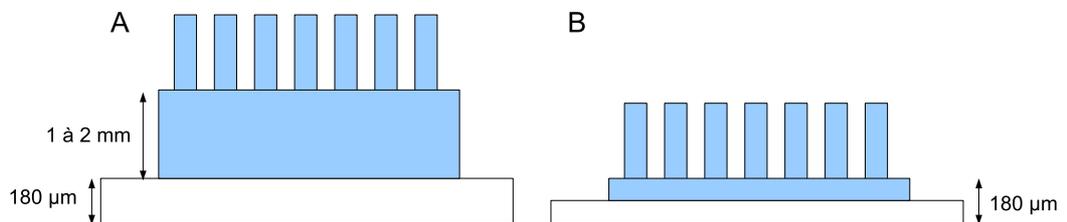


FIGURE 4.7 – **A** : réseau de plots obtenu en coulant le PDMS de façon classique. **B** : réseau de plots sur lamelle, pour pouvoir observer avec un objectif à immersion à huile

faire les observations fines à l'aide d'objectifs à faible distance de travail (40X, 60X,

100X à immersion à huile), nous avons mis au point un substrat fin recouvert de plots, dont l'épaisseur avoisine les $200\ \mu\text{m}$ (voir schéma 4.8). Voici les différences avec le mode opératoire classique. Alors qu'avec le protocole classique il est possible de préparer plusieurs substrats à la fois, notamment lorsqu'ils sont contigus sur le même wafer, cette préparation est individuelle.

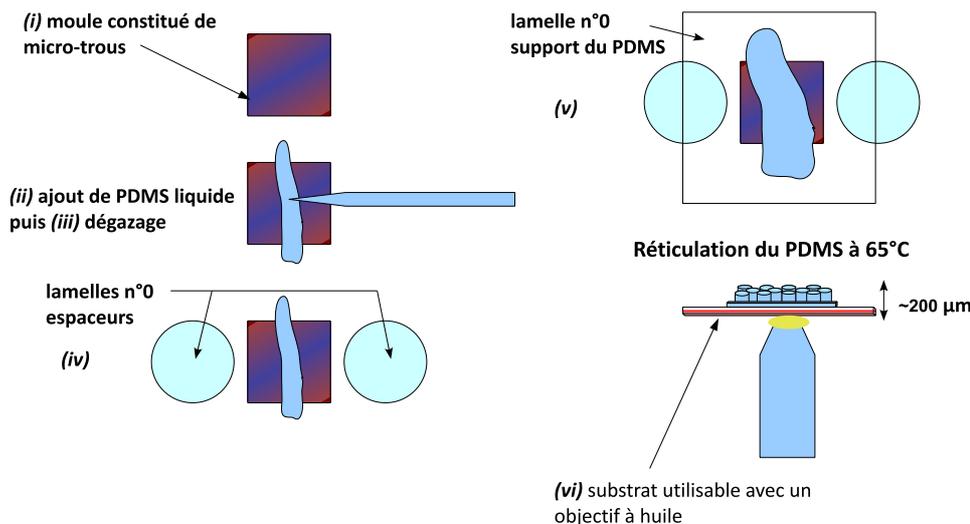


FIGURE 4.8 – Fabrication de plots sur lamelle pour une observation jusqu'au 100X à immersion à huile

- pour un réseau de plots, on dépose une petite quantité de PDMS comme indiqué sur le schéma 4.8 ;
- on dégaze à nouveau le PDMS. Cette étape est essentielle pour la reproductibilité des réseaux ;
- on dépose de part et d'autre de la bande de PDMS dégazé des espaceurs (ici des lamelles) puis une autre lamelle, plus grande. Elle va servir de support au PDMS. Les espaceurs et la lamelle sont choisis de telle sorte que l'épaisseur globale de cet échantillon soit équivalente à une lamelle classique, soit $\sim 200\ \mu\text{m}$. On fait réticuler ;
- on démoule ensuite les réseaux dans de l'éthanol à 70% quelle que soit la rigidité des plots (voir Annexes pour le détail). Si les plots sont suffisamment rigides, il est possible de les laisser sécher à l'air libre après démoulage. On peut ensuite les traiter comme un réseau classique.

4.3 Traitement du PDMS

Si on dépose des cellules sur du PDMS sans traitement, elles n'adhéreront pas. Cependant, il est aisé de le traiter pour déposer des protéines de la matrice extra-

cellulaire telles que la fibronectine. Nous avons utilisé plusieurs approches.

La fibronectine est une protéine composée d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe. Le PDMS est quant à lui hydrophobe. Sans traitement particulier de la surface, la fibronectine s'adsorbe de façon non spécifique. Nous avons pour cela immergé nos réseaux dans une solution de fibronectine à $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ dans du Phosphate Buffered Saline (PBS) pendant une heure à température ambiante. À la suite de ce traitement, l'ensemble de la surface disponible est recouvert de fibronectine, et permet aux cellules d'adhérer.

Une alternative est de déposer spécifiquement la fibronectine sur une partie de la surface. Cela s'appelle de l'impression par micro-contact ou μCP . Le principe est simple : à l'aide d'un « tampon-encreur » recouvert de la protéine que l'on souhaite imprimer, on tamponne la surface (voir figure 4.9). Nous allons imprimer uniformément une protéine d'intérêt, mélange de la fibronectine vue précédemment et non marquée avec de la fibronectine marquée en fluorescence. Le principe est le suivant :

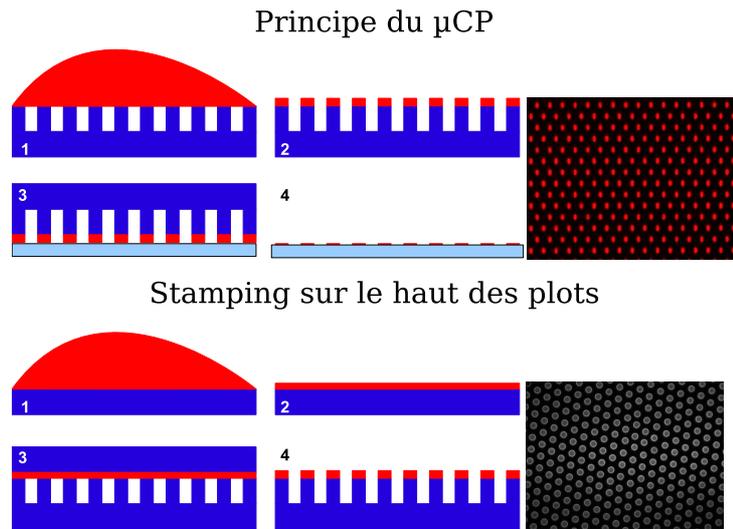


FIGURE 4.9 – Schématisation du tamponnage et résultat en microscopie - en haut, sur lamelle de verre à l'aide d'un tampon texturé (motifs ovales de $2 \mu\text{m}$ sur $1 \mu\text{m}$), en bas sur des plots à l'aide d'un tampon plat (plots de $5 \mu\text{m}$ de diamètre)

- Tout d'abord, on prépare une surface de PDMS, qui va servir de tampon encreur. Ce tampon est rendu hydrophile par passage au plasma O_2 ;
- On dépose la solution de fibronectine marquées sur le tampon hydrophile (1 de la figure 4.9) ;
- On laisse sécher le tampon (2), puis on le met en contact avec la surface à tamponner (3). On le retire, il est alors prêt à être employé (4).

En fonction du type d'expériences, il est possible de coupler cette technique de μCP au greffage d'une brosse de polymères empêchant les cellules d'adhérer là où la fibronectine est absente (soit entre les plots). Nous avons utilisé du polyéthylène glycol

(PEG). Cette brosse est greffée de façon covalente au PDMS par l'intermédiaire d'un silane après le stamping. On traite d'abord des plots en PDMS avec un silane particulier (3-mercaptopropytriméthoxy silane, Roth Sochiel) qui peut se lier de façon covalente au PEG employé (MPEG-MAL-5000, Nektar Therapeutics). En effet, il est lui aussi fonctionnalisé (groupe maléimide). Après la silanisation, on peut traiter les plots par tamponnage de fibronectine (voir section 4.3). Avant de déposer les cellules, on dépose le PEG en solution pendant 1h. Ces fonctions maléimide vont se lier au silane là où il est encore accessible, c'est à dire aux endroits non recouverts de fibronectine. Lorsque les cellules vont sécréter des protéines de la matrice extracellulaire, ces dernières ne pourront pas se déposer là où le PEG est présent. Le tamponnage est donc bien spécifique (pour le protocole de silanisation et de dépôt de PEG, voir annexes).

4.4 Conditions expérimentales de l'utilisation des plots

Nous avons alors obtenu des micro-plots élastiques, recouverts de protéines d'adhésion. Nous nous en sommes servis pour créer un environnement, de rigidité et de topographie contrôlées, pour les cellules. Celles-ci sont cultivées dans un milieu de culture nommé DMEM (pour Dulbecco's Modified Eagle's Medium). Ce milieu contient des acides aminés, des vitamines ainsi que du glucose. Pour apporter les facteurs de croissance nécessaires aux cellules, on y ajoute du sérum de veau fœtal (10% du volume), dont le composant majoritaire est l'albumine de sérum bovin (BSA) mais aussi des antibiotiques, généralement de la pénicilline (100 unités/ml) et de la streptomycine (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Lorsqu'il n'en contient pas, nous rajoutons également de la glutamine (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Pour les maintenir dans des conditions de température et de pH physiologiques, les cellules sont maintenues dans une atmosphère à 37°C et contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture contient traditionnellement du rouge de phénol. Il permet de visualiser le pH du milieu, acide lorsqu'il contient des cellules. Cependant, cet indicateur coloré a tendance à fluorescer. Pour les études de fluorescence, nous avons donc utilisé un milieu sans rouge de phénol.

Selon l'expérience à effectuer, il nous a fallu adapter le dispositif expérimental. Les substrats sur lamelle sont montés dans une chambre permettant de sceller l'environnement (voir figure 4.10). Pour éviter l'évaporation du milieu de culture, nous avons deux possibilités :

- l'observation peut se faire sur le microscope inversé (voir 5.1) directement dans la boîte de Pétri, et dans ce cas le couvercle suffit à sceller l'échantillon.
- l'observation se fait dans une chambre telle que celle décrite 4.7 sur le microscope droit. Alors, il est nécessaire de sceller l'échantillon grâce à de la paraffine liquide, qui va empêcher l'évaporation.

Dans tous les cas, il est nécessaire de tamponner le milieu, avec de l'HEPES (acide 4-

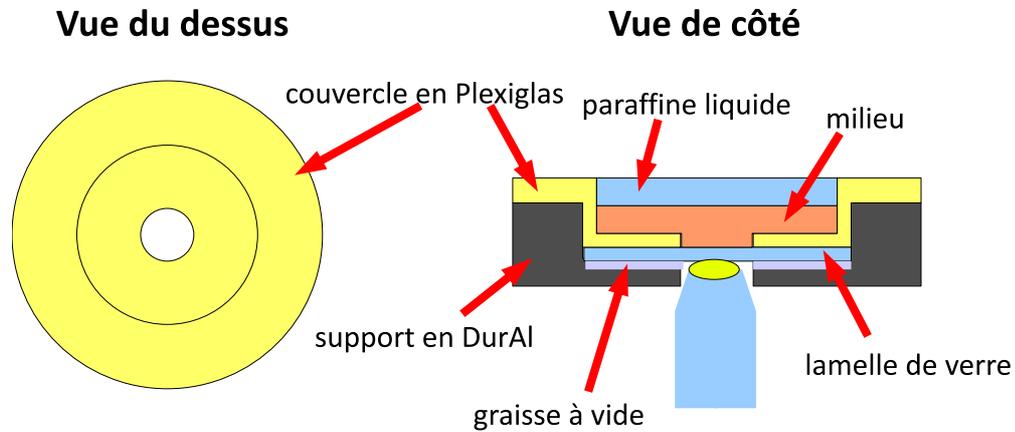


FIGURE 4.10 – Chambre d'observation pour lamelle

(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonique). En effet, l'un de ses pK_a est de 7,55, proche du pH optimal pour les cellules. Sur des expériences assez courtes (de l'ordre de quelques heures), on en utilise généralement 1,5% (soit $45 \mu\text{l}$ pour 3 ml de milieu), tandis que sur des expériences longues (12 à 24 h), il faut augmenter la quantité d'HEPES ajoutée (5%, soit $150 \mu\text{l}$ pour 3 ml de milieu). Pour maintenir le pH et éviter l'ajout d'HEPES, la dernière possibilité est d'utiliser un système d'injection contrôlée de CO_2 et de maintien d'humidité, dans des conditions similaires à celles de l'incubateur.

On peut également fixer les cellules et marquer les protéines d'intérêt telles que celles du cytosquelette ou des adhésions focales, même lorsqu'elles ont été déposées sur les plots (voir annexes pour les protocoles). Pour pouvoir les observer à fort grossissement, et donc à faible distance de travail, il est nécessaire de placer la lamelle sur le haut des plots, le socle en PDMS reposant sur la lame porte-objet. Enfin, il est également possible, après fixation des cellules, de préparer le substrat pour une observation au microscope électronique à balayage.

Chapitre 5

Description des dispositifs de vidéomicroscopie optiques employés

Sommaire

5.1	Microscopie optique	78
5.1.1	Principes généraux	78
5.1.2	La microscopie par épifluorescence	78
5.1.3	Montages employés	79
5.2	Microscopie confocale à balayage	81

Pour nos expériences, nous avons utilisé différentes techniques d'imagerie. Des montages de microscopie optique, en champ clair, en contraste interférentiel différentiel ou en épifluorescence, mais aussi de microscopie confocale. Je vais décrire brièvement les différents dispositifs.

5.1 Microscopie optique

5.1.1 Principes généraux

Le microscope optique peut être résumé à un montage constitué de deux lentilles, l'objectif et l'oculaire. Le principe est le même que pour une lunette : augmenter le pouvoir séparateur entre deux objets proches. Au cours de nos expériences, nous avons utilisé différents types d'objectifs :

- des objectifs à air ($n=1$, 20X) dont la distance de travail est suffisamment grande pour observer des cellules à travers des substrats de plusieurs mm. Cependant, le grossissement est limité (maximum 60X) ainsi que la quantité de lumière récoltée ;
- des objectifs à eau (O.N.=0,9, 60X) qui permet de n'avoir qu'un dioptre entre la cellule et la lentille de l'objectif, le milieu de culture, et d'observer les cellules directement, sans que la lumière ne traverse le support des cellules (ici, les plots). Néanmoins, leur ouverture numérique ne dépasse que très rarement 1, la quantité de lumière récupérée est donc également limitée ;
- des objectifs à huile (100X, 40X, 63X) qui permettent, avec l'huile d'immersion, dont l'indice est proche de celui du verre, de collecter le plus de signal possible de l'échantillon. Néanmoins, ils contraignent à une faible distance de travail (quelques dizaines de μm au dessus de la lamelle). Il faut donc utiliser des substrats de faible épaisseur, tels que ceux présentés partie 4.2.2.

5.1.2 La microscopie par épifluorescence

Nous avons également utilisé la microscopie de fluorescence pour, d'une part, analyser le comportement cellulaire en suivant le haut des plots marqué en fluorescence, et d'autre part lors de l'utilisation de cellules marquées. Nous avons utilisé des protéines de fusion¹, comprenant de la Green Fluorescent Protein (GFP), de la Yellow Fluorescent Protein (YFP) ou des molécules synthétiques (Cy3, FITC). Il est alors possible de suivre dans les cellules vivantes l'expression de la protéine d'intérêt en suivant le niveau et la localisation de la fluorescence qui lui est associée, ou de localiser dans des cellules fixées l'expression de la molécule d'intérêt. L'épifluorescence proprement dite consiste à exciter l'échantillon dans le plan focal et à récupérer l'intégralité du signal réémis par les fluorophores situés sur le trajet optique, aussi bien dans le plan focal qu'à l'extérieur. L'intensité est donc assez forte, mais la localisation précise du signal n'est pas possible. On perd donc en résolution spatiale verticalement.

1. on a fait exprimer à la cellule, soit en l'insérant dans le génome soit en transfectant de façon transitoire, une protéine d'intérêt dont la transcription est couplée à celle d'une protéine fluorescente, sa séquence étant contiguë de celle de la protéine d'intérêt

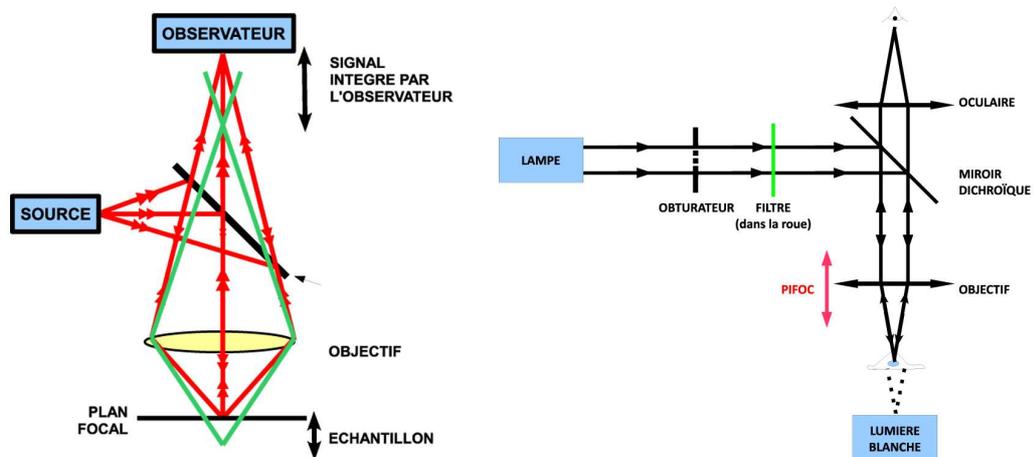


FIGURE 5.1 – À gauche : Principe du microscope à épifluorescence. L'ensemble de la lumière réémise par l'échantillon est récupéré par l'observateur, que ce soit dans le plan focal ou à l'extérieur. À l'extérieur du plan focal, le signal est flou. À droite : Schéma de principe du microscope droit employé.

5.1.3 Montages employés

Microscope droit

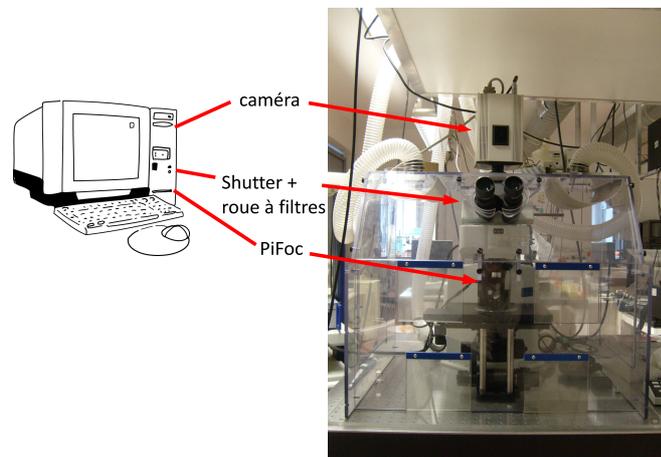


FIGURE 5.2 – Microscope droit employé pour nos expériences. Les appareils pilotés par ordinateur sont également représentés

Nous avons utilisé un microscope droit (BX51 Olympus) (voir figure 5.2). Il est équipé de deux illuminateurs, l'un permettant la microscopie en champ clair et l'autre (à vapeur de mercure) permettant, avec un obturateur et une roue à filtres d'éclairer en fluorescence. La roue et l'obturateur sont pilotables par ordinateur. Pour pouvoir

acquérir différents plans focaux séquentiellement, avec un pas fixé et reproductible, un support à objectif sur cale piezo-électrique (Pifoc), également pilotable par ordinateur et permettant d'ajuster le plan focal, a été employé. Grâce à un objectif à immersion à eau, il est possible d'imager directement les cellules sans que le signal ne traverse le PDMS et soit donc modifié². Pour cela, nous avons utilisé un objectif 60X d'ouverture numérique 0,9. La roue motorisée couplée à l'obturateur permet d'acquérir séquentiellement plusieurs images de fluorescence à intervalle de temps régulier. On peut donc suivre simultanément plusieurs marquages et ainsi corrélérer l'expression de différentes protéines d'intérêt. Pour pouvoir imager des cellules vivantes sur plusieurs heures et garantir une reproductibilité des résultats, le microscope est inséré à l'intérieur d'une boîte en plexiglas (Entreprise LIS, Bâle) munie d'entrées et de sorties d'air soufflé thermalisé. Ce système permet de thermaliser toutes les pièces du microscope, et donc d'éviter les défocalisations dues à un gradient de température à l'intérieur du système. La température est ainsi maintenue à 37°C. Les acquisitions ont été réalisées avec une caméra CCD refroidie, une CoolsnapHQ, par l'intermédiaire du logiciel Metavue (MetaImaging Series), qui peut piloter tous les appareils décrits précédemment. On peut donc acquérir, à la fin de chaque intervalle de temps, différents plans déterminés, et pour chaque plan, les signaux de différents fluorophores. Nous avons utilisé de la fibronectine-Cy3, des cellules exprimant de la paxilline-YFP et également du Hoechst et du DAPI pour marquer les noyaux. Le principe du microscope droit est rappelé à droite de la figure 5.1.

Microscope inversé

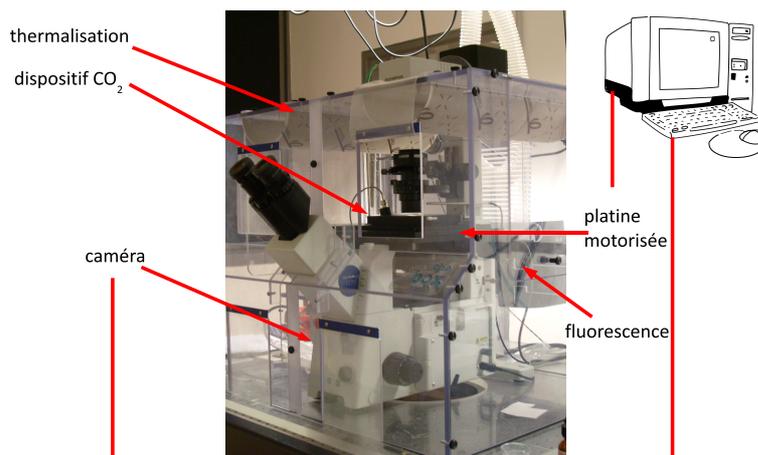


FIGURE 5.3 – Microscope inversé employé pour nos expériences. Les appareils pilotés par ordinateur ou de contrôle (CO₂) sont également représentés

2. son indice valant 1,41

Nous avons utilisé un IX71 (voir figure 5.3). Le principe de fonctionnement est identique à celui du microscope droit. Le montage est inversé par rapport au microscope droit : l'éclairage se fait par le dessus et le signal est récupéré en fond clair par l'objectif situé en dessous de l'échantillon (voir figure 5.3). Tout comme le microscope droit, la thermalisation à 37°C du système est assurée par une enceinte munie d'une soufflerie. Sur ce système, nous avons une platine motorisée, pilotée par Metamorph (MetaImaging Series). Nous pouvons donc acquérir de multiples champs d'observation séquentiellement, ce qui permet d'augmenter le nombre de cellules observées au cours d'une même expérience, dans les mêmes conditions expérimentales. La lumière doit traverser l'échantillon, nous sommes donc obligés d'utiliser soit des objectifs dont la distance de travail est grande (on peut utiliser tous les objectifs à air, jusqu'au 60X), soit d'utiliser le substrat présenté partie 4.2.2 (avec des objectifs à huile). Nous avons principalement utilisé un 20X à air, qui permet d'acquérir des images même à travers une boîte de Pétri, et des 40X, 60X et 100X à huile. Les images ont été acquises avec une caméra CCD (CoolsnapES).

5.2 Microscopie confocale à balayage

Comme on l'a vu précédemment, la microscopie par épifluorescence intègre le signal émis par les fluorophores sur toute l'épaisseur de l'échantillon. Il n'est donc pas possible de localiser avec précision le plan où a lieu l'événement étudié. Pour pallier à cet inconvénient, nous avons utilisé la microscopie confocale. Le principe est le suivant :

On utilise un ou plusieurs lasers, qui permettent de couvrir la gamme de longueurs d'onde correspondant aux marquages. On peut alors exciter les fluorochromes d'intérêt. A l'aide de déflecteurs, on va pouvoir balayer tout le plan focal (d'où le nom de microscope confocal à balayage). Bien que le laser soit focalisé, le plan focal de l'échantillon n'est pas le seul à recevoir la lumière. En effet, comme dans le microscope à épifluorescence, les fluorochromes présents sur le trajet lumineux sont eux aussi excités par le laser, et c'est donc un signal intégré qui arrive au détecteur. Pour séparer le signal provenant du plan focal du signal parasite, un tri est opéré en amont du détecteur, à l'aide d'un diaphragme dont le diamètre est de $\sim 100 \mu\text{m}$ (d'où son nom de *pinhole*) (voir figure 5.4). En effet, seul le signal provenant du plan focal (sur une épaisseur variant en fonction de la longueur d'onde et du diamètre du *pinhole*) pourra pénétrer dans le détecteur, le reste du signal étant bloqué par le diaphragme. Il est donc possible d'obtenir un signal intégré uniquement sur quelques centaines de nm et ce, sur toute l'épaisseur de l'échantillon, dans la limite de la profondeur de champ de l'objectif. On peut donc obtenir, en choisissant bien le pas entre deux plans successifs, une répartition 3D des signaux d'intérêt. Une fois le signal récupéré, il va être amplifié à l'aide de photomultiplicateurs pour améliorer le rapport signal sur bruit. L'avantage du microscope confocal est principalement sa résolution spatiale très supérieure à celle d'un microscope en épifluorescence. En effet, le bruit de fond

82 Chapitre 5. Description des dispositifs de vidéomicroscopie optiques employés

continu dû aux plans entourant le plan focal peut être supprimé, ce qui permet une détection plus sensible et une meilleure définition. De plus, on peut non seulement réaliser une pile d'images selon Z, mais également latéralement ce qui n'est pas du tout accessible avec un microscope classique. Cependant, la résolution temporelle

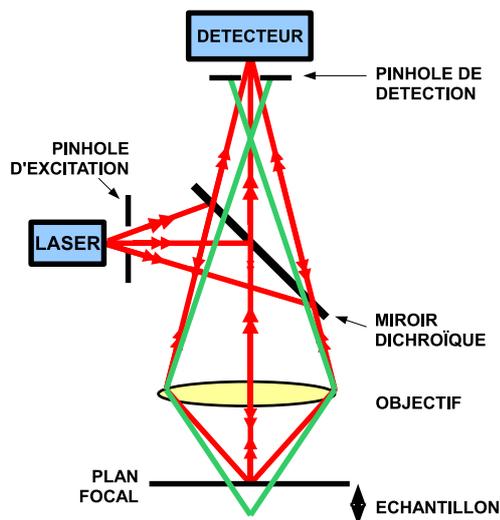


FIGURE 5.4 – Principe de fonctionnement du microscope confocal

du microscope confocal est faible : dans les conditions d'acquisition que nous avons employées³, nous avons un temps d'acquisition de 2,64 s par image, alors que nous descendons à quelques centaines de ms en épifluorescence. En effet, acquérir la zone d'intérêt en la balayant prend du temps. De plus, ce mode d'acquisition induit le photoblanchiment de l'échantillon. Une observation sur échantillon vivant ne permet donc pas de cadence élevée, sous peine de décroissance de la fluorescence très rapide et donc de perte de signal. C'est pour cela que nous avons, dans cette étude, employé le confocal à balayage uniquement sur cellules fixées.

3. images de 512x512 pixels, fréquence de 400 Hz, moyenne de deux images

Chapitre 6

Modèle par éléments finis : COMSOL

Sommaire

6.1	Principes généraux	84
6.1.1	Contrainte, déformations et élasticité	84
6.1.2	Relation d'équilibre	85
6.2	Fabrication du modèle de plots dans un socle en PDMS	85

Pour déterminer les forces à partir du déplacement, nous avons jusqu'à présent utilisé la relation linéaire $F = k\Delta x$ où k est la constante de raideur d'un plot et Δx le déplacement mesuré. Néanmoins, nous avons voulu vérifier jusqu'où cette hypothèse était valable, mais également déterminer les forces dans des configurations différentes : forces exercées sur une partie de la surface latérale par exemple. Pour cela, nous avons utilisé un logiciel de simulation par éléments finis, COMSOL. Ce logiciel est disponible au laboratoire grâce à Philippe Dantan, qui nous a aidé à réaliser ces simulations. Nous allons pour le moment présenter uniquement le principe, les résultats seront intégrés aux parties expérimentales correspondantes.

6.1 Principes généraux

La méthode des éléments finis permet de résoudre numériquement des équations aux dérivées partielles (EDP) linéaires que l'on ne peut pas résoudre autrement. Pour pouvoir résoudre ces équations, l'objet est découpé en polyèdres qui constituent un maillage approché de l'objet. Ce maillage, en fonction de la précision recherchée et de la puissance de calcul disponible, peut être adapté. Il faut chercher un compromis permettant d'obtenir une solution convergente, stable, et unique du problème dans la limite de la puissance de l'unité de calcul employé. Une fois choisies, ces mailles auront pour nous la forme de triangles équilatéraux formant donc des tétraèdres. L'objet continu a été discrétisé. On peut alors, sur chaque élément, résoudre numériquement les équations d'équilibre de forces grâce à ses petits déplacements. Nous allons dorénavant prendre l'exemple des équations d'élasticité de mécanique des structures que nous avons employées pour illustrer le mode de calcul.

6.1.1 Contrainte, déformations et élasticité

Pour décrire les contraintes en un point, on caractérise le tenseur des déformations ϵ à l'aide des déplacements (u, v, w) de la façon suivante :

$$\begin{aligned}\epsilon_x &= \frac{\partial u}{\partial x} & \epsilon_{xy} &= \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x} \right) \\ \epsilon_y &= \frac{\partial v}{\partial y} & \epsilon_{yz} &= \frac{1}{2} \left(\frac{\partial v}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial y} \right) \\ \epsilon_z &= \frac{\partial w}{\partial z} & \epsilon_{xz} &= \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial x} \right)\end{aligned}$$

on a alors

$$\epsilon = \begin{pmatrix} \epsilon_x & \epsilon_{xy} & \epsilon_{xz} \\ \epsilon_{xy} & \epsilon_y & \epsilon_{yz} \\ \epsilon_{xz} & \epsilon_{yz} & \epsilon_z \end{pmatrix} \quad (6.1)$$

Ce tenseur des déformations est lui-même relié au tenseur des contraintes σ par la relation

$$\sigma = D\epsilon$$

où D est la matrice d'élasticité, matrice symétrique dont les paramètres sont E , module d'Young et ν coefficient de Poisson du matériau. On a :

$$\sigma = \begin{pmatrix} \sigma_x & \tau_{xy} & \tau_{xz} \\ \tau_{xy} & \sigma_y & \tau_{yz} \\ \tau_{xz} & \tau_{yz} & \sigma_z \end{pmatrix}$$

Le module d'Young E est défini par la loi de Hooke

$$\sigma = E\epsilon$$

pour une déformation suffisamment faible (c'est-à-dire que les limites d'élasticité du matériau ne soient pas atteintes). Le PDMS que nous utilisons a un module d'Young égal à 2 MPa.

Le coefficient de Poisson quant à lui permet de caractériser la contraction du matériau perpendiculairement à la direction d'application de la force. Lorsqu'un matériau est incompressible, son coefficient de Poisson ν est égal à $\frac{1}{2}$. Ce sera le cas ici.

6.1.2 Relation d'équilibre

En éléments finis, il est difficile de résoudre des problèmes à 3 dimensions en dynamique. Nous avons donc résolu une succession de points d'équilibre.

Cette relation d'équilibre est la suivante :

$$-\frac{\partial\sigma_x}{\partial x} - \frac{\partial\tau_{xy}}{\partial y} - \frac{\partial\tau_{xz}}{\partial z} = F_x \quad (6.2)$$

$$-\frac{\partial\sigma_y}{\partial y} - \frac{\partial\tau_{xy}}{\partial x} - \frac{\partial\tau_{yz}}{\partial z} = F_y \quad (6.3)$$

$$-\frac{\partial\sigma_z}{\partial z} - \frac{\partial\tau_{xz}}{\partial x} - \frac{\partial\tau_{yz}}{\partial y} = F_z \quad (6.4)$$

$$(6.5)$$

que l'on peut résumer par

$$-\nabla \cdot \sigma = \vec{F}$$

Pour pouvoir calculer les déplacements et les contraintes dans l'objet sur lequel est exercée une force, il faut donc maintenant définir tous les paramètres.

6.2 Fabrication du modèle de plots dans un socle en PDMS

Il faut en premier lieu créer l'objet. Ici, ce sera un parallélépipède aux dimensions voulues (les côtés mesurant de quelques dizaines à une centaines de μm) surmonté de un à plusieurs cylindres de 1 ou 5 μm de diamètre et de 5 ou 20 μm de haut. Les propriétés physiques (E , ν) de ces éléments doivent être ajustées aux conditions expérimentales, ainsi que le type de matériau : pour nous, il est isotrope (voir figure 6.1). Une fois ces propriétés mécaniques définies, les conditions aux limites doivent l'être. Tout d'abord, il faut fixer la base du socle, et aussi lier le cylindre et le socle entre eux. Sans cela, on ne pourra pas avoir de convergence. Il faut également choisir si on considère le plot comme étant encastré ou au contraire dans un matériau élastique. Ensuite les forces doivent être cartographiées. En effet, il est possible

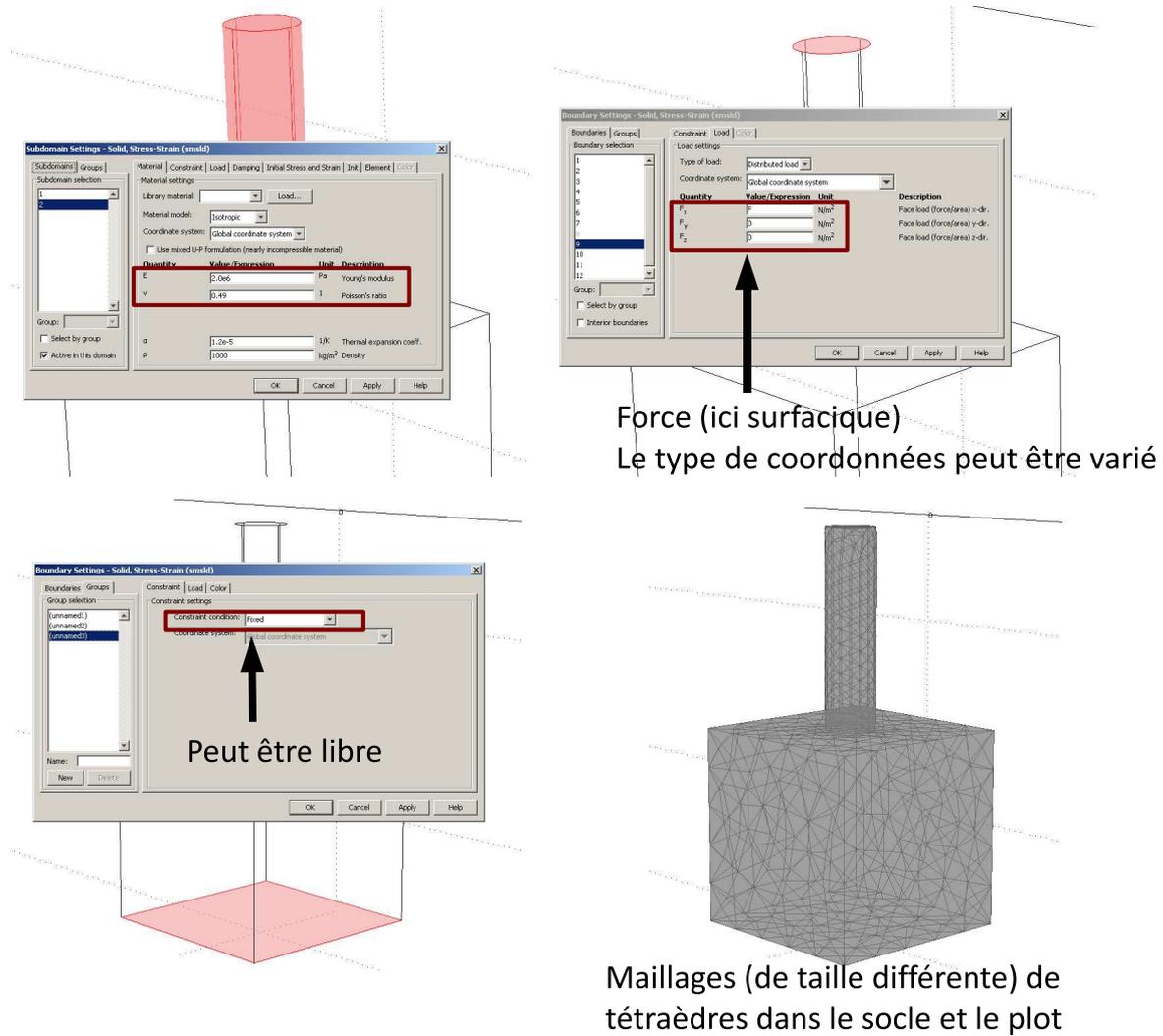


FIGURE 6.1 – Différentes étapes-clé de l'analyse par éléments finis. De gauche à droite et de haut en bas, les caractérisations physiques du matériau, la valeur de la force sur une surface donnée, les conditions aux limites (ici au socle), le résultat du maillage, différent dans le cylindre et dans le socle

d'exercer des forces aussi bien sur une surface, en un point que sur une arête. Pour une surface (resp. une arête), on considérera une force surfacique (resp. linéique).

On peut alors définir le maillage, qui peut être différencié en fonction de la zone de l'objet (ici socle et cylindre), la précision nécessaire n'étant pas forcément la même partout.

Il suffit alors de lancer la résolution du problème à l'aide de ces paramètres. On peut alors représenter le déplacement de l'objet, mais aussi les contraintes dans le matériau.

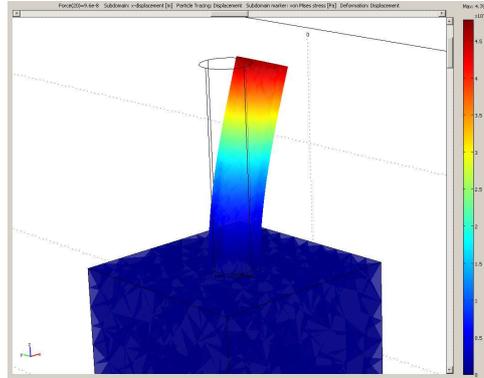


FIGURE 6.2 – Représentation du champ des déplacements dans un plot de $20 \mu\text{m}$ de haut de de $5 \mu\text{m}$ de diamètre. Le bleu représente les déplacements les plus faibles, le rouge les plus grands

Nous donnerons les résultats découlant de cette utilisation en regard des expériences correspondantes.

Troisième partie

Résultats

Chapitre 7

Influence de la rigidité du substrat et des forces exercées par les cellules sur les fonctions cellulaires

Sommaire

7.1	Influence de la rigidité du substrat	92
7.2	Relation force-raideur	95
7.3	Comparaison avec les substrats semi-infinis élastiques	96
7.4	Étalement cellulaire et taille des adhésions focales	98
7.5	La migration est influencée par la rigidité	102
7.6	Résultats des simulations par COMSOL	103
7.6.1	Relation force-déplacement	103
7.6.2	Influence de la déflexion du plot sur le comportement du socle	104
7.7	Conclusion	105

Pour adhérer et migrer, les cellules exercent des forces sur leur environnement. Dans leur environnement naturel, les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire peuvent être très variées. Des études récentes montrent notamment que la rigidité a une influence sur les forces développées, mais aussi sur l'organisation de l'architecture interne de la cellule, de façon corrélée. Dans ce contexte, nous avons utilisé les substrats de micropiliers décrits dans la partie 2.1.1 pour tester l'influence de la rigidité sur les forces, l'adhésion et la migration des cellules. En effet, les cellules vont exercer des forces sur leur support, déterminées à partir des déflexions des plots. En modifiant les dimensions des plots, il est possible de varier leurs propriétés mécaniques, telles que leur raideur, leur densité et d'étudier leur influence sur le comportement cellulaire. Nous avons montré précédemment dans l'équipe (Saez *et al.*, 2005; Saez, 2006; Saez *et al.*, 2007) que la rigidité du substrat influence le comportement de cellules épithéliales (des MDCK). Nous allons montrer que ce comportement se retrouve avec des cellules individuelles, des fibroblastes.

7.1 Influence de la rigidité du substrat sur l'amplitude des forces

Nous avons employé des plots de 1 ou 2 μm de diamètre, leur hauteur variant de 1,4 à 7 μm de hauteur. La gamme des raideurs correspondantes est donnée dans la table 7.1. Dans un régime de faibles déformations, $F = k\delta x$, connaître la déformation

Diamètre des plots (μm)	H_{mini} (μm)	k_{maxi} (nN/ μm)	H_{maxi} (μm)	k_{mini} (nN/ μm)
1	1,4	118	6,5	1,1
2	2,8	214	7	13

TABLE 7.1 – Valeurs des raideurs en fonction de la hauteur et du diamètre des plots

et les dimensions des plots permet de déterminer les forces correspondantes. Ces plots ont été recouverts de fibronectine comme expliqué partie 4.3 puis des cellules ont été déposées (fibroblastes 3T3 ou MDCK). L'activité des cellules sur ces plots a été alors enregistrée par vidéo-microscopie. On a pu analyser la déflexion des piliers à l'aide d'un programme développé au laboratoire. Ensuite, nous avons mesuré ce qu'on a nommé la force maximale et la force moyenne sous la cellule ou l'îlot de cellules, définies sur la figure 7.3.

Rappel bref sur la méthode de détection des plots Le programme réalisé au laboratoire, écrit en Visual Basic, utilise le réseau parfait de plots au repos pour déterminer leur déplacement.

Tout d'abord, il faut déterminer la position au repos. Cette partie est réalisée manuellement, en entrant les directions et le pas du réseau (voir figure 7.1). Une position de base est donc déterminée pour tous les plots, position qui sera affinée lors des étapes suivantes. Ensuite il faut donner au logiciel la nature des plots : recouverts/en contact avec la cellule ou au repos. On déterminera le déplacement de ceux en contact avec la cellule, les autres plots restant au repos serviront de base pour calculer la position non défléchie des plots recouverts.

Pour calculer leur position, on cherche, dans une fenêtre de rayon ajustable (voir figure 7.1) les pixels dont l'intensité est supérieure à un seuil valant un pourcentage ajustable du maximum dans cette fenêtre. Ces pixels sont ceux représentant le sommet du plot. En calculant leur barycentre, on trouve le centre du plot défléchi. On obtient donc la position des plots à l'instant t .

Pour mesurer le déplacement, on a besoin de connaître la position théorique du plot défléchi lorsqu'il est au repos. Elle n'est pas accessible expérimentalement, on utilise donc l'arrangement régulier des plots pour la déterminer. On calcule la position du centre des plots non défléchis qui est le barycentre des pixels les plus brillants

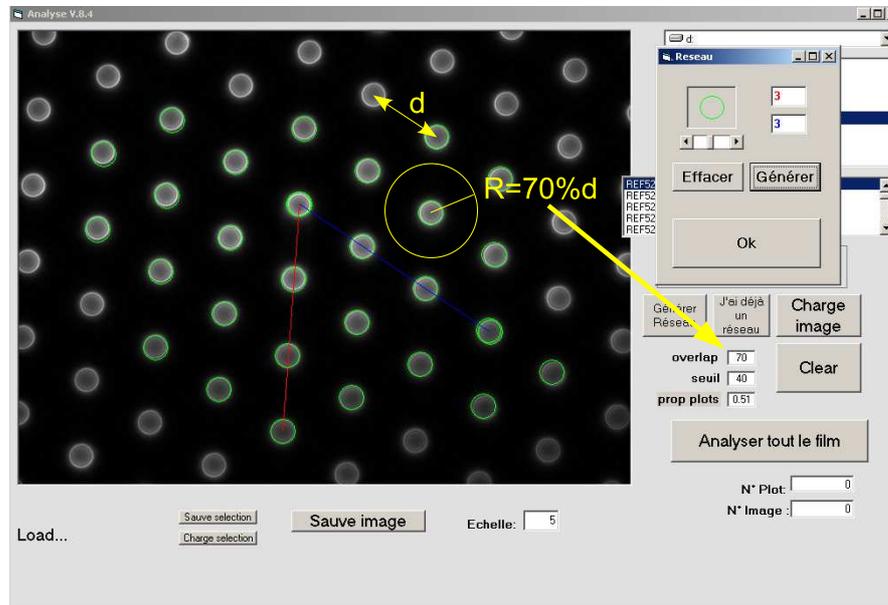


FIGURE 7.1 – Fenêtre du programme d’analyse du mouvement des plots. La fenêtre réseau permet de repérer manuellement et relativement grossièrement l’organisation des plots en amont de l’analyse. Le rayon dans lequel se fait cette analyse est fonction de la distance inter-plots mais aussi d’un paramètre *overlap* que l’on peut modifier. Il est également possible de faire varier le seuil en dessous duquel les pixels ne sont pas pris en compte pour la détermination du barycentre.

comme vu précédemment puis, à l’aide de tous les plots alignés non défléchis, on détermine l’équation de la droite passant par ces centres grâce à une régression linéaire (voir figure 7.2). Si on fait cela pour deux droites auxquelles appartient le plot défléchi, l’intersection de ces deux droites donne les coordonnées de la position au repos théorique. On est alors en mesure de calculer le déplacement de tous les plots défléchis, sous réserve qu’il y ait suffisamment de plots pour effectuer la régression linéaire.

Une fois que l’on connaît le déplacement de chaque plot à chaque instant, il est possible de calculer la résultante, de suivre l’évolution d’un plot au cours du temps ou au contraire d’établir à un instant donné la cartographie des déplacements.

Lorsque la cellule n’est que sur le haut des plots, on peut considérer, comme on l’a vu partie 2.1.1, que la force est proportionnelle au déplacement. Cependant, nous verrons que lorsque l’intervalle entre deux plots augmente, les cellules peuvent pénétrer entre les plots et adhérer le long des plots. La relation linéaire force/déplacement n’est alors plus valable.

Les forces maximales, que ce soit sur cellules individuelles (fibroblastes) ou îlots de cellules (MDCK), se situent sur la périphérie, comme cela a été vu précédemment (Munevar *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2003; Saez *et al.*, 2005). L’incertitude des forces

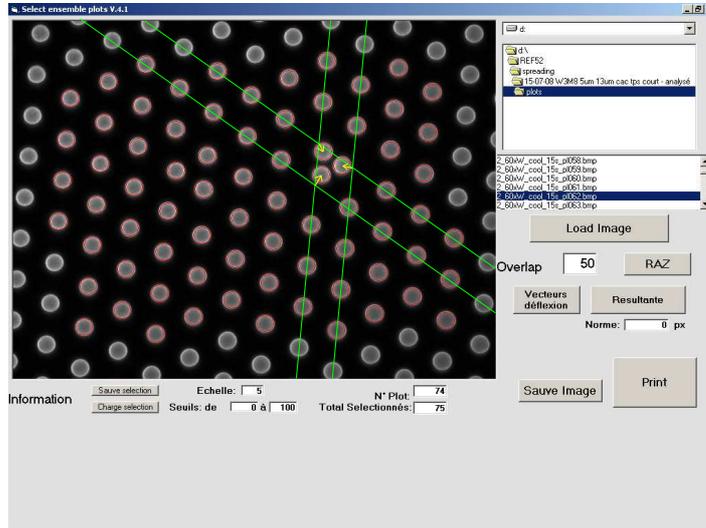


FIGURE 7.2 – Les plots, y compris ceux qui sont défléchis, sont repérés par le programme (plots entourés en rouge). Les droites de régression linéaire sont rendues apparentes pour les trois plots défléchis (droites vertes), ainsi que les déplacements des plots (flèches jaunes)

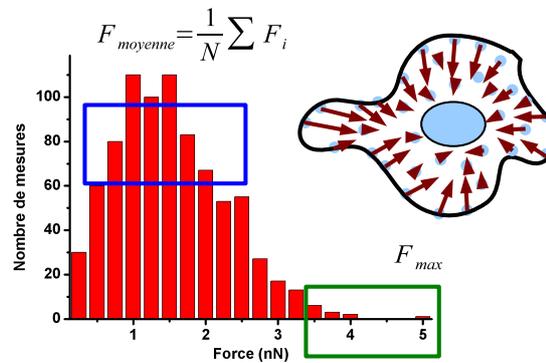


FIGURE 7.3 – Répartition des forces au niveau de chaque micro-pilier sous une cellule au cours du temps. On définit F_{max} comme étant la force moyenne des forces situées en queue de distribution et $F_{moyenne}$ comme étant la moyenne de cette distribution

est corrélée à celle des déplacements (fonction de la sensibilité de la caméra ainsi que de l'objectif) qui est d'environ 30 nm . Elle varie de $0,03$ à 6 nN en fonction de la raideur.

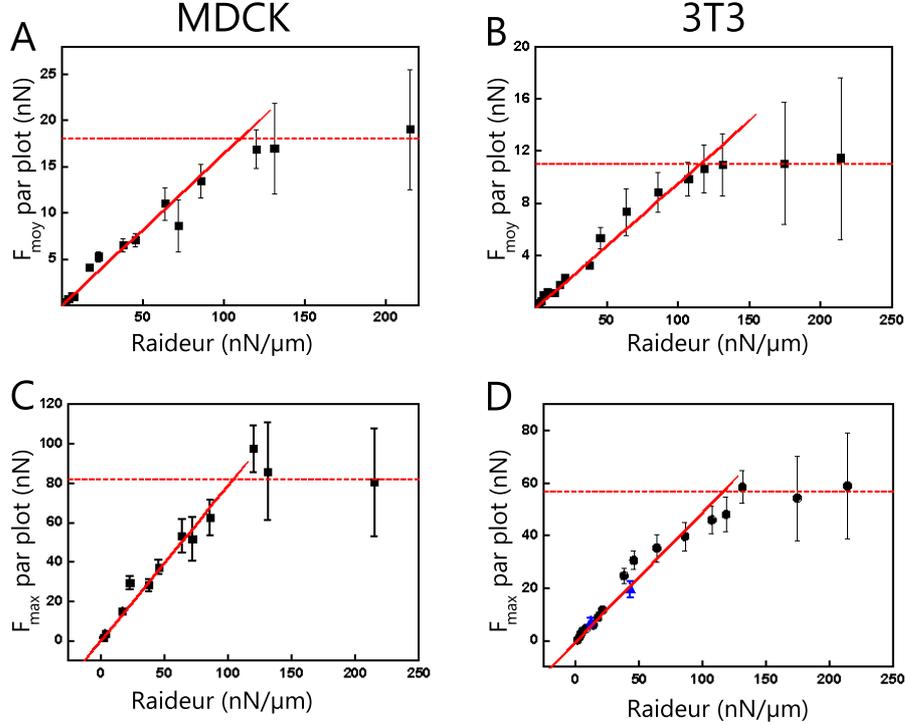


FIGURE 7.4 – Relation force moyenne-raideur pour des cellules épithéliales (A) et pour des fibroblastes (B). Jusqu'à une raideur de l'ordre de $130 \text{ nN}/\mu\text{m}$, la relation est linéaire. On a ensuite un plateau avec une force moyenne maximale quelle que soit la raideur $130 < k < 214 \text{ nN}/\mu\text{m}$. Relation force maximale-raideur pour des MDCK (C) et des 3T3 (D). On retrouve la relation linéaire jusqu'à $k = 130 \text{ nN}/\mu\text{m}$ puis un plateau. On a ($F_{\text{sat max}} \simeq 5 F_{\text{sat moy}}$)

7.2 Relation force-raideur

Nous avons étudié les forces développées par les 3T3 sur une gamme de raideur allant de 2 à $214 \text{ nN}/\mu\text{m}$ et montré que ces forces varient linéairement en fonction de la raideur pour les 3T3 et ce, jusqu'à une raideur de l'ordre de $130 \text{ nN}/\mu\text{m}$ (voir figure 7.4). Ceci confirme nos précédents résultats, obtenus sur des îlots cellulaires de MDCK. Cette relation linéaire force/raideur n'est donc pas limitée à un type cellulaire. On a donc, aussi bien pour les 3T3 que pour les MDCK, et pour $k < k_0 = 120 \text{ nN}/\mu\text{m}$ une relation du type :

$$F_{\text{moy}} = k\delta \quad (7.1)$$

où F_{moy} est la force moyenne, k la raideur et δ une distance, qui est le coefficient de proportionnalité entre F_{moy} et k . Pour les 3T3, $\delta \simeq 100 \text{ nm}$ et pour les MDCK, $\delta \simeq 160 \text{ nm}$. Cependant, ce régime linéaire n'est plus valable au dessus de k_0 . La force

moyenne atteint une valeur de saturation, F_{sat} qui vaut 11 nN pour les fibroblastes et 18 nN pour les MDCK.

Le même phénomène est observé pour les forces maximales, qui se trouvent sur le bord des cellules ou des îlots de cellules. La relation F_{max} -raideur est linéaire jusqu'à $k \sim 130$ nN/ μ m puis elle atteint une saturation (respectivement $\simeq 80$ nN pour les MDCK et $\simeq 60$ nN pour les 3T3).

Nous avons montré que, dans notre cas, le déplacement était constant. Néanmoins, on ne peut pas conclure que le mécanisme est contrôlé par la déformation. En effet, Nicolas *et al.* (2006) ont montré que, dans le cas des micro-piliers, en supposant la contrainte constante, on aboutit également à une déformation constante. La question reste donc ouverte. De plus, la force étant transmise *via* les adhésions focales, la saturation pourrait correspondre à la saturation de la taille des adhésions focales, car il a été montré que leur taille maximale est proportionnelle au module d'Young de la matrice extra-cellulaire (Nicolas *et al.*, 2006).

7.3 Comparaison avec les substrats semi-infinis élastiques

Des études similaires ont déjà été effectuées sur des 3T3, mais sur substrats continus déformables (Lo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Il est donc légitime de vouloir comparer les deux études. Cependant, dans le cas des plots, la raideur ressentie par la cellule n'est pas directement comparable au module d'Young du matériau continu. Il faut donc calculer un module d'Young effectif, E_{eff} . Nous avons donc comparé la force nécessaire pour induire un déplacement latéral u sur un substrat continu et celle qui va déplacer le sommet d'un plot de la même quantité u .

Considérons un espace semi-infini, élastique, de module d'Young E et de coefficient de Poisson $\nu = 1/2$. Si on applique une force \vec{F} en un point O tangentiellement à la surface. Elle va induire un déplacement $\vec{u}(\vec{r})$ en M, situé à une distance r de O. On obtient :

$$\vec{u}(\vec{r}) = \frac{3}{4\pi Er} (\vec{F} + (\vec{r} \cdot \vec{F}) \frac{\vec{r}}{\|\vec{r}\|^2})$$

Au lieu de considérer un point O, on va exercer la force sur un disque de rayon a et de centre O (voir figure 7.5). On peut appliquer la formule précédente pour calculer $\vec{u}(O)$ en intégrant sur la surface du disque et en prenant : $\vec{F} = d\vec{F} = \vec{P}dS$

On obtient donc :

$$\vec{u}(O) = \iint \frac{3}{4\pi Er} (\vec{P} + \frac{(\vec{r} \cdot \vec{P})}{\|\vec{r}\|^2} \vec{r}) dS \quad (7.2)$$

En \vec{u} selon la direction de la force, on obtient :

$$u(O) = \frac{3}{4\pi E} \iint (P + P \cos^2 \theta) dr d\theta$$

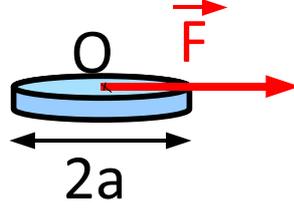


FIGURE 7.5 – Schéma d’une adhésion focale de diamètre $2a$ sur laquelle s’exerce une force \vec{F} de manière homogène

Après intégration, et sachant que $P = \frac{F}{\pi a^2}$ et que $k = \frac{F}{u(O)}$, on obtient

$$k = \frac{4\pi a E}{9} \quad (7.3)$$

Soit un module d’Young équivalent :

$$E_{eff} = \frac{9k}{4\pi a} \quad (7.4)$$

où k désigne la raideur des plots et a une longueur sur laquelle la force s’exerce. Dans le système de micro-piliers, on considère que les forces s’exercent sur toute la surface des plots. On peut donc penser à prendre comme valeur pour a le rayon des plots.

Si on considère les modules d’Young des substrats continus utilisés dans l’équipe de Yu-Li Wang (voir table 7.2), on obtient alors que E_{eff} varie entre 1,5 et 150 kPa. On admet que les forces sont exercées *via* les adhésions focales (Balaban *et al.*, 2001). Pour déterminer les forces associées à ces substrats, nous avons utilisé les contraintes calculées sur les zones de fortes activités cellulaires et nous avons considéré que les adhésions focales étaient des disques de $\sim 1 \mu\text{m}$ de rayon, ce qui donne une surface de $\sim 3 \mu\text{m}^2$ (Balaban *et al.*, 2001). On obtient les valeurs suivantes : On peut

	Module d’Young (kPa)	Contrainte (nN/ μm^2)	Force (nN)
Lo <i>et al.</i> (2000)	14	0,62±0,13	1,86 ±0,39
	30	1,09±0,34	3,27±1,02
Wang <i>et al.</i> (2000)	14	1,02±0,36	3,06 ±1,08
	33	1,54±0,21	4,62±0,63

TABLE 7.2 – Répartition des raideurs en fonction de la hauteur et du diamètre des plots

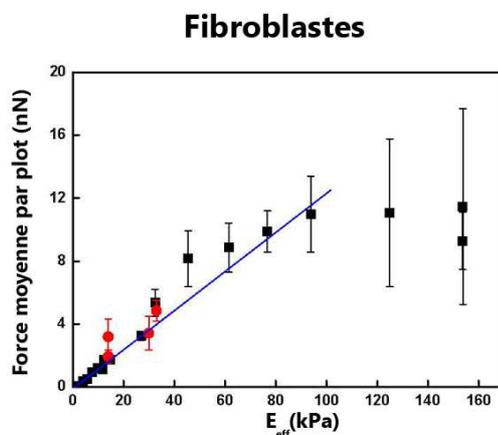


FIGURE 7.6 – En noir, les points provenant des plots, $1\ \mu\text{m}$ et $2\ \mu\text{m}$ de diamètre rassemblés. En rouge, les quatre points des substrats continus de Lo *et al.* (2000) et Wang *et al.* (2000).

alors comparer les valeurs obtenues pour les substrats continus et pour les plots. Les résultats obtenus sur substrats continus sont en bon accord avec ceux provenant les plots (voir figure 7.6). Néanmoins, ce modèle présente certaines limitations. En effet, nous avons dû faire une approximation sur la taille des adhésions, car dans Lo *et al.* (2000); Wang *et al.* (2000), elles n’ont pas été mesurées. Il peut donc y avoir une incertitude sur la raideur équivalente. De plus, dans l’étude de Tan *et al.* (2003), certaines adhésions, dont la surface est faible, exercent de grandes forces. Pour pouvoir les prendre en compte, on aurait besoin de savoir ce que ces forces représentent et de connaître la valeur de F_{moy} dans le cadre de cette étude.

7.4 Rôle de la rigidité du substrat sur l’étalement cellulaire et sur la taille des adhésions focales

Il a été montré que sur substrat déformable rigide, les cellules épithéliales, endothéliales, ou encore fibroblastiques croissent et adhèrent normalement alors que sur substrat mou, les cellules sont moins étalées, forment des contacts focaux mais pas d’adhésions focales (voir section 2.1.2 et Pelham Jr et Wang (1997); Yeung *et al.* (2005)). De plus, l’étalement influe sur l’amplitude des forces exercées. En effet, plus les cellules sont étalées, et plus les forces qu’elles exercent sont élevées (voir Tan *et al.* (2003) et figure 7.7). Nous avons voulu donc étudier le rôle des changements de la morphologie cellulaire dans le processus de transmission des forces par la cellule à son substrat. Pour cela, nous avons analysé l’étalement cellulaire et la répartition des adhésions focales en fonction de la rigidité du substrat pour des fibroblastes. En moyennant sur une cinquantaine de cellules par valeur de rigidité, nous avons

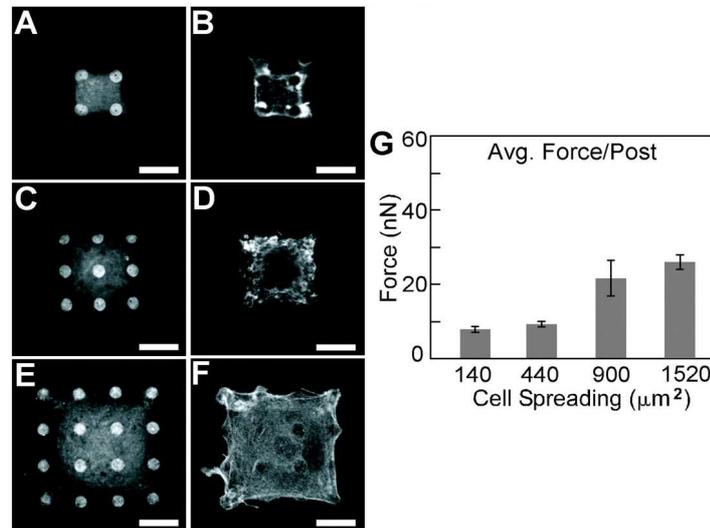


FIGURE 7.7 – **A, C, E** : Surfaces recouvertes par de la fibronectine, permettant aux cellules de s'étaler. **B, D, F** : Etalement effectif des cellules sur les surfaces correspondantes. **G** : Forces moyennes par plot exercées sur les plots en fonction de l'étalement. Elles croissent avec la surface disponible, d'après Tan *et al.* (2003). Barre = 10 μm

constaté une augmentation de l'aire moyenne des cellules avec la rigidité, s'étendant de 500 à 1600 μm^2 , sur une gamme de raideur de 17 à 1700 $\text{nN}/\mu\text{m}$ (voir figure 7.8). Ceci est en bon accord avec les données obtenues sur gels continus.

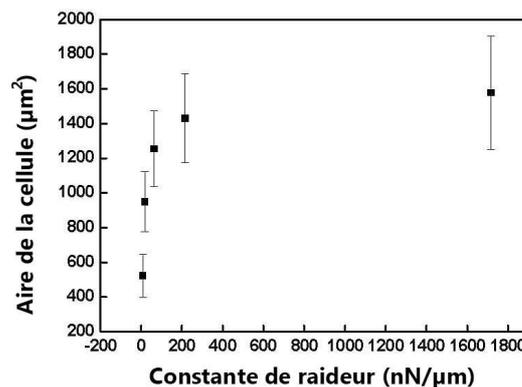


FIGURE 7.8 – Aire moyenne des cellules en fonction de la rigidité des plots

Pour connaître la morphologie des adhésions focales, nous avons étudié la vinculine, qui peut servir de marqueur de la formation des adhésions focales. Pour cela, nous avons fixé et marqué par immunofluorescence (voir protocole en annexe) des cellules adhérant sur le haut des plots. Sur substrat rigide ($85 \text{ nN}/\mu\text{m}$), les adhésions focales

sont très marquées et assez grandes tandis que sur substrat mou ($13 \text{ nN}/\mu\text{m}$) la distribution de la vinculine est plus diffuse et on ne voit pas d'adhésion focale (voir figure 7.9).

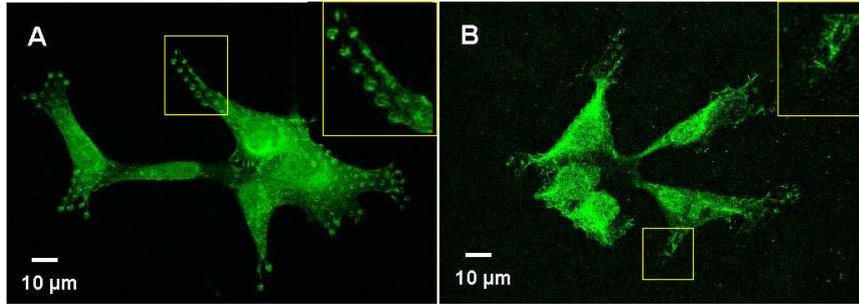


FIGURE 7.9 – Marquage de la vinculine par immunofluorescence dans des 3T3. A : $k=85 \text{ nN}/\mu\text{m}$, les adhésions focales sont situées sur le haut des plots et bien marquées. B : $k=13 \text{ nN}/\mu\text{m}$, la vinculine ne forme que de petits contacts focaux peu intenses et diffus

Dans un environnement constitué de micro-piliers à section elliptique (voir 2.1.2), nous avons montré précédemment que des îlots de cellules épithéliales s'orientent selon la plus grande rigidité (Saez *et al.*, 2007). Nous avons donc voulu vérifier si cette orientation privilégiée se retrouvait sur une cellule individuelle. En effet, le modèle théorique, décrit partie 2.1.2, prédit qu'un substrat anisotrope pourrait suffire à orienter une cellule (Bischofs et Schwarz, 2003) lors de l'étalement cellulaire. En utilisant les mêmes plots ovales que Saez *et al.* (2007) (de grand axe égal à $2 \mu\text{m}$ et de petit axe valant $1 \mu\text{m}$, la hauteur variant de 3 à $6 \mu\text{m}$), il est possible de créer un environnement dont la rigidité est anisotrope. On peut alors étudier l'influence de la variation de rigidité au sein d'une même cellule. Les raideurs des plots sont, selon les deux axes principaux :

$$k_{\perp} = \frac{3}{32}\pi E \frac{a^4}{L^3} \quad (7.5)$$

$$k_{\parallel} = \frac{3}{8}\pi E \frac{a^4}{L^3} \quad (7.6)$$

On a donc :

$$\frac{k_{\perp}}{k_{\parallel}} = \frac{1}{4}$$

la plus grande raideur étant selon le grand axe des plots.

Les plots ont été recouverts de fibronectine et des 3T3 y ont été déposés en les laissant s'étaler toute une nuit à 37°C . On peut alors les observer et comparer leur orientation à celle des plots, en déterminant leur ellipticité et, le cas échéant, l'angle que fait l'axe principale de la cellule avec le grand axe des plots. Les cellules se sont orientées selon la plus grande rigidité, tout comme leur cytosquelette (voir

figure 7.10). En déterminant l'angle entre le grand axe des cellules et celui des plots, on constate (image **B** de la figure 7.10) que l'orientation se fait selon le grand axe des plots. C'est ce qui avait déjà été observé pour les cellules épithéliales MDCK (Saez *et al.*, 2007). Cependant, ces substrats présentent aussi une anisotropie géométrique.

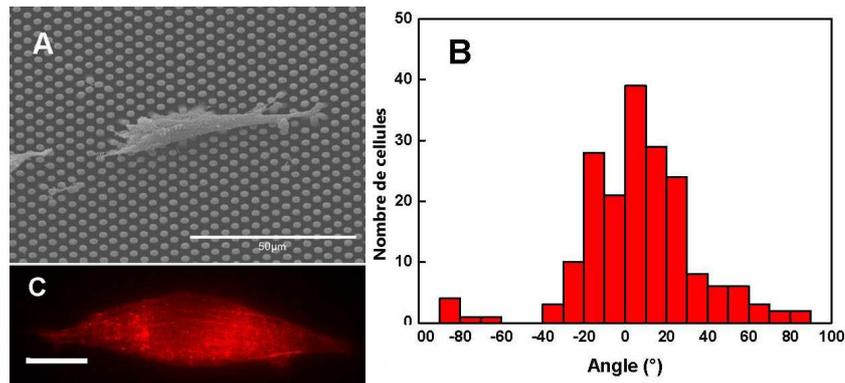


FIGURE 7.10 – (A) : image en microscopie électronique d'un fibroblaste sur des plots ovales. Il est orienté selon la plus grande rigidité. (B) : distribution de l'orientation des cellules. L'angle 0° correspond à la plus grande rigidité. (C) : 3T3 dont le cytosquelette d'actine a été marqué. Les fibres de *stress* sont également orientées selon la plus grande rigidité. Barres = $50 \mu\text{m}$ (A) et $10 \mu\text{m}$ (B)

Or, il a été montré que des textures orientent les 3T3 (c'est le guidage par contact détaillé partie 3.3.1). Avec les plots ovales, on ne peut donc pas savoir si l'orientation préférentielle est due à la différence de rigidité ou au *contact guidance*. Nous avons donc effectué des expériences de contrôle pour vérifier que l'orientation observée était bien due à l'anisotropie de la raideur. L'idée est donc d'utiliser un substrat où seule la géométrie est anisotrope, la raideur restant constante. Nous avons eu l'idée d'imprimer un réseau constitué d'ovales sur une lamelle de verre. On transfère le motif constitué de plots ovales et les propriétés adhésives sont donc anisotropes. Mais dans le même temps, le substrat support, la lamelle de verre, a la même rigidité quelle que soit la direction observée. On a donc bien découplé la géométrie de la raideur. Pour conserver cette anisotropie d'adhésion, on dépose entre les motifs une brosse de polymères, du PEG, pour que la cellule n'adhère que sur les patches de fibronectine.

Si on observe toujours une orientation privilégiée alors que la raideur est constante, nous pourrions conclure que l'orientation sur les plots ovales est due à du guidage par contact. Si au contraire, les cellules n'ont pas d'orientation privilégiée sur la lamelle micro-imprimée, l'allongement des cellules selon le grand axe des plots est dû à variation de la raideur. Pour obtenir cette surface, on utilise la technique de *micro-contact printing* décrite partie 4.3. Tout comme les cellules épithéliales, ni les cellules ni leur cytosquelette d'actine ne présentent une orientation privilégiée. C'est donc bien la rigidité qui commande cette orientation et non le guidage par contact.

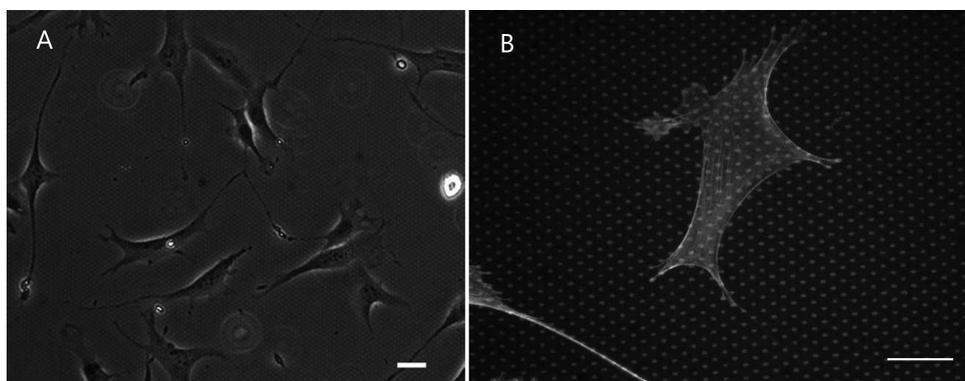


FIGURE 7.11 – **A** Cellules sur lamelle de verre sur laquelle est imprimée un motif en fibronectine constitué d’ovales. Les cellules ne sont pas orientées selon la direction privilégiée. **A** : Organisation du cytosquelette d’actine sur une lamelle tamponnée d’un motif constitué d’ovale. Les fibres de stress ne sont pas orientées selon la direction privilégiée. Barres = 20 μm

7.5 La migration est influencée par la rigidité

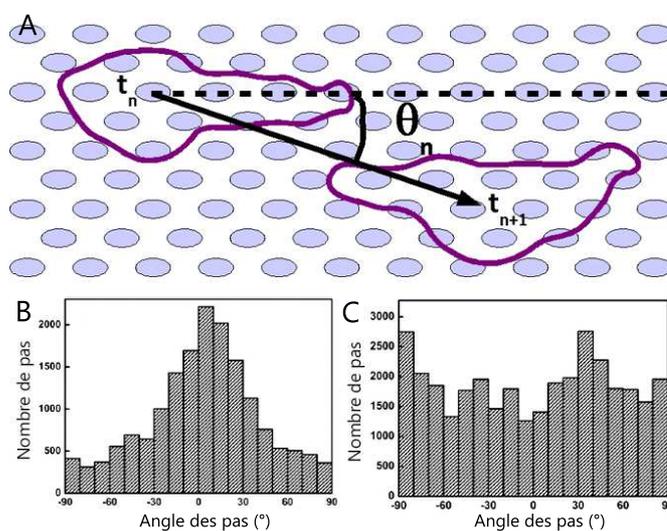


FIGURE 7.12 – **(A)** : mode de calcul de l’angle entre deux positions successives. **(B)** : orientation des pas de cellules successifs sur plots à section ovale, la référence à 0° étant la direction de plus grande rigidité. **(C)** : orientation des pas de cellules successifs sur plots cylindriques. La direction de référence est choisie arbitrairement

Nous avons établi que les cellules s’orientaient selon la direction de plus grande rigidité. Il a déjà été montré dans l’équipe (Saez *et al.*, 2007) que la migration de

cellules MDCK, stimulées par un facteur de croissance qui induit la dissociation du tapis cellulaire et la migration des cellules, était gouvernée par la rigidité. Nous avons adopté la même démarche, en suivant par vidéomicroscopie la migration sur des surfaces à piliers ovales. À titre de contrôle, nous avons réalisé les mêmes acquisitions sur un réseau de plots à section circulaire, et donc isotrope. Nous avons ensuite traité les images et déterminé les positions successives des centres de masse des cellules. Pour déterminer leur direction de migration, nous avons mesuré les angles entre le grand axe des plots et le vecteur reliant deux positions successives des centres de masse des cellules (voir image **A** de la figure 7.12). Pour les fibroblastes, la migration a également lieu selon le grand axe des plots, alors que les cellules déposées sur plots cylindriques ont une migration sans direction privilégiée (voir images **B** et **C** de la figure 7.12).

7.6 Résultats des simulations par COMSOL

Pour vérifier que nous évaluons correctement la force en mesurant le déplacement, nous avons réalisé des simulations par éléments finis. Nous avons donc vérifié jusqu'à quel point la relation force-déplacement est linéaire, mais également si, lors de grandes déformations, le socle élastique dans lequel les plots sont encastrés se déforme de façon non négligeable.

7.6.1 Relation force-déplacement

Pour connaître le comportement des piliers lors de l'application d'une force, nous avons pris un plot isolé, de diamètre $1\ \mu\text{m}$, de hauteur $5\ \mu\text{m}$ et de module d'Young $2\ \text{MPa}$. Lorsque nous calculons la valeur de la constante de raideur k avec ces paramètres, nous obtenons : $k = 2,3\ \text{nN}/\mu\text{m}$. Nous avons alors tracé $F = k\Delta x$ pour $\Delta x = 0$ à $4\ \mu\text{m}$ (en rouge figure 7.13). Dans le même temps, nous avons simulé l'application d'une force (contrainte uniforme sur l'ensemble de la face supérieure du plot) entre 1 et $20\ \text{nN}$. Nous avons considéré le socle du plot comme étant élastique, pour vérifier son influence sur la déflexion. Nous avons tracé, comme pour la relation théorique, la force exercée sur le plot en fonction du déplacement du sommet du plot. Nous avons voulu également connaître l'influence de la base sur la relation force-déplacement. Pour cela, nous avons simulé une force de $0,1$ à $10\ \text{nN}$ (en vert figure 7.13) pour un plot encastré dans un solide non élastique.

La première constatation est qu'on sous-estime la force exercée sur le plot avec le modèle linéaire. La différence entre les deux est inférieure à $10\ \%$ tant que le déplacement est inférieur à $2\ \mu\text{m}$ puis elle augmente fortement, jusqu'à atteindre près de 50% d'écart. Les plots de $1\ \mu\text{m}$, dans nos réseaux, ne peuvent se déplacer que de 1 à $1,5\ \mu\text{m}$ maximum. L'erreur reste donc faible en pratique.

Par ailleurs, même si la différence est faible, la base élastique modifie la relation force-déplacement : pour un déplacement donné, la force est plus faible lorsque le

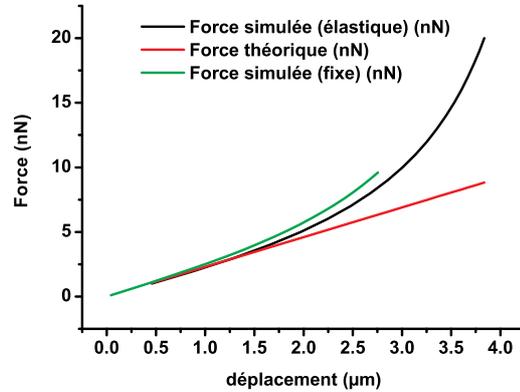


FIGURE 7.13 – Relations force-déplacement pour une force exercée uniformément sur le sommet du plot (mesure du déplacement au centre de la face supérieure) de $1\mu\text{m}$ de diamètre et de $5\mu\text{m}$ de haut. En noir, simulation par éléments finis lorsqu'on considère un plot lié à un socle élastique, en vert lorsque le plot est encastré et en rouge relation théorique $F = k\Delta x$.

socle est élastique que lorsque le plot est encastré. Nous avons donc voulu savoir si la base se déformait et si oui, dans quelle mesure.

7.6.2 Influence de la déflexion du plot sur le comportement du socle

Lorsque le plot est défléchi, s'il est solidaire d'un socle élastique, le socle va également être modifié à proximité du plot. Si on considère le plot de diamètre $1\mu\text{m}$ centré en $(0;0)$, et la force dirigée selon (Ox) , la déformation du socle sera maximale à la jonction plot-socle en $x = \pm 0,5\mu\text{m}$, le socle étant comprimé pour $x = 0,5\mu\text{m}$ et étiré pour $x = -0,5\mu\text{m}$. Pour connaître l'ordre de grandeur de ces déformations, nous avons regardé ce qu'il se passe à la jonction plot-socle. Pour cela, nous avons tracé le déplacement en z le long de l'axe (Ox) , passant par le centre du plot et orienté dans la direction de la force \vec{F} (voir figure 7.14). Nous avons calculé ces déplacements pour des forces comprises entre 0 et 20 nN. Sur le graphe 7.14, le déplacement maximum (obtenu pour $F = 20\text{ nN}$) est de 40 nm. Bien que le socle soit élastique, sa déformation reste négligeable devant le déplacement du sommet du pilier.

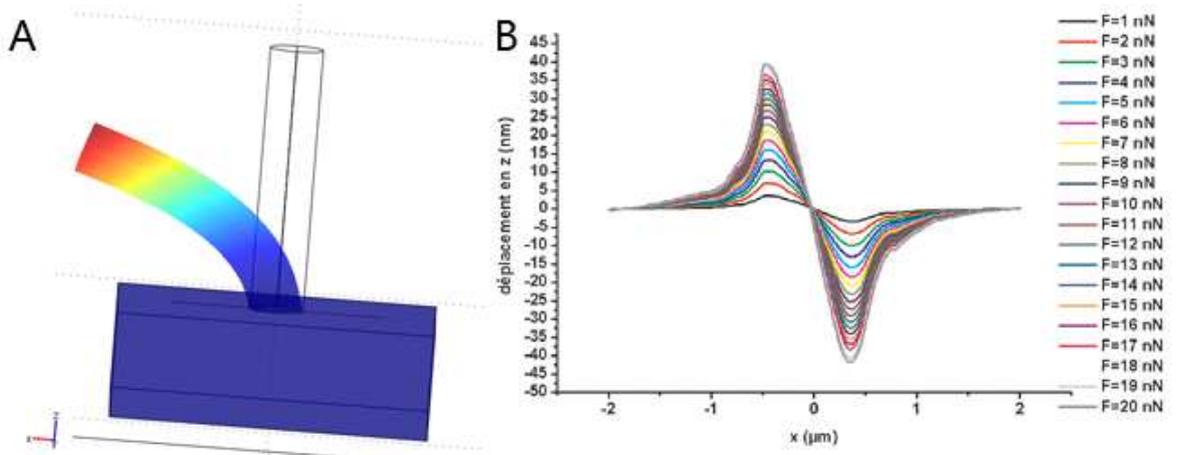


FIGURE 7.14 – **A** : Déflexion d'un plot de $1 \mu\text{m}$ de diamètre et $5 \mu\text{m}$ de haut, pour une force de 20 nN localisée sur le sommet du plot. **B** : Déplacement en z du socle du plot, selon la ligne rouge représentée sur **A**, en fonction de la force exercée. Le plot est centré en 0 et fait $1 \mu\text{m}$ de diamètre. La déflexion maximale est observée sur les bords du plots, c'est à dire à $x = \pm 0,5 \mu\text{m}$. Elle reste négligeable devant les dimensions caractéristiques du plot.

7.7 Conclusion

Nous avons donc montré ici que la rigidité influence les phénomènes cellulaires, y compris sur des cellules individuelles. La relation force-rigidité, tant que $k < k_{\text{seuil}} = 120 \text{ nN}/\mu\text{m}$ est linéaire et détermine un déplacement δ constant dépendant du type cellulaire. La cellule adapte donc son comportement à la rigidité de son environnement. Son cytosquelette d'actine se comporte comme un ressort de raideur k' , qui s'adapte pour conserver un déplacement constant lorsque la raideur des micro-piliers k , et donc la force qu'exerce les piliers sur la cellule, augmente. On a une réaction active (augmentation de la force cellule-substrat) à un processus passif (augmentation de la raideur de l'environnement). Bien que les piliers constituent un substrat discontinu, on peut déterminer un module d'Young effectif E_{eff} et ainsi comparer les résultats obtenus sur les piliers à ceux obtenus sur des gels élastiques déformables. On constate malgré la discontinuité des surfaces, que les relations $E_{\text{eff}}/F_{\text{moy}}$ sont cohérents et que, avec une densité de piliers au moins égale à 10%, seule la rigidité influe sur la force moyenne. De plus, cette relation force-raideur est en accord avec un modèle proposé par Nicolas *et al.* (2006), qui suggère que la taille des adhésions focales atteint une valeur seuil, proportionnelle au module d'Young de la matrice extra-cellulaire. Comme la force est proportionnelle à la taille des adhésions focales, la force est bien proportionnelle à la rigidité, même si les auteurs considèrent pour leur part que le contrôle se fait par la contrainte et non par la déformation.

Enfin, la variation de la rigidité est prise en compte à un niveau sub-cellulaire.

Lorsqu'on utilise des plots ovales, l'étalement et la migration cellulaires ont lieu selon la plus grande rigidité. Ceci est également cohérent avec l'hypothèse selon laquelle les adhésions focales s'adaptent en fonction de la rigidité : elles vont s'étendre selon l'axe de plus grande rigidité, induisant une anisotropie à une échelle sub-cellulaire. On peut donc avancer que certaines des molécules les constituant, comme p130cas, jouent le rôle de mécano-senseurs et permettent l'adaptation à la rigidité.

Chapitre 8

Influence de la topographie sur la migration de fibroblastes

Sommaire

8.1	Rôle de la hauteur des piliers	108
8.1.1	Morphologie cellulaire dans les plots	109
8.1.2	Migration	111
8.1.3	Cytosquelette	119
8.2	Rôle de l'espacement entre les plots	124
8.2.1	Notion d'espace limite	124
8.2.2	Influence du noyau	126
8.3	Conclusion	128

Différentes approches ont été présentées dans la partie 3.3.1. Cependant, la plupart de ces études sont réalisées sur des substrats bidimensionnels. Or, *in vivo* les cellules évoluent majoritairement dans un environnement tridimensionnel. Les méthodes de microfabrication permettent de faire varier l'environnement physique en se rapprochant d'un environnement 3D et aussi d'étudier l'influence de la topographie sur les fonctions cellulaires. Nous avons donc utilisé des surfaces constituées de micro-piliers dont nous avons varié les dimensions : diamètre, hauteur, espacement. On contrôle alors la densité, l'épaisseur et la rigidité du substrat, et les cellules peuvent pénétrer dans la structure formée par les piliers. Nous allons tout d'abord nous intéresser à l'influence des propriétés géométriques du substrat sur le comportement de fibroblastes, 3T3 et REF52.

8.1 Rôle de la hauteur des piliers

La nature, la raideur du substrat ainsi que sa texture ont une influence sur le comportement cellulaire (voir partie I). Par exemple, les cellules vont s'aligner et migrer le long de rainures de l'ordre du μm , mais aussi créer des adhésions au niveau des discontinuités du substrat (que ça soient des rainures ou des micro- voire nano-plots). *In vivo* les cellules rencontrent des environnements, assimilables à des gels, dont les propriétés physiques (taille des pores, densité) varient au sein de l'organisme mais également au fil du temps. Pour étudier l'influence de la topographie sur les cellules, nous avons utilisé des substrats constitués de micro-plots. Ils ont été fabriqués par les mêmes techniques que celles présentées précédemment. Ils n'ont

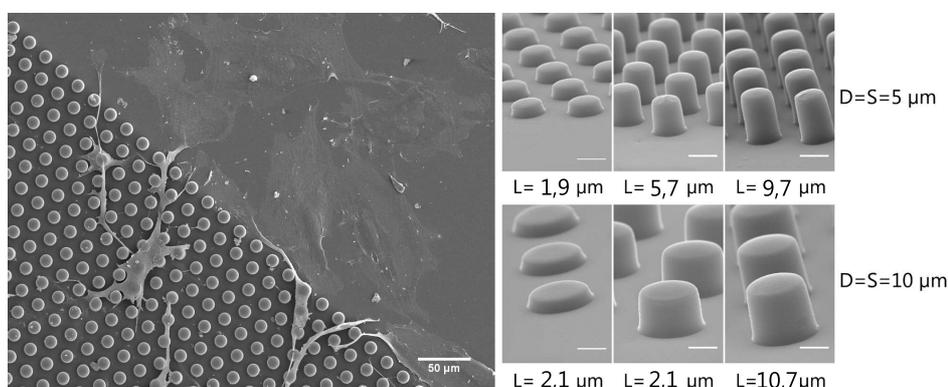


FIGURE 8.1 – A gauche : Image en microscopie électronique de l'interface entre une zone plane de PDMS et une surface couverte de plots ($D=10\ \mu\text{m}$ et $S=10\ \mu\text{m}$). A droite : Images en MEB des différents plots utilisés, avec une inclinaison de 70° . Les hauteurs mesurées sont données en dessous de chaque image. Pour la compréhension, nous arrondirons les longueurs des plots au μm près

pas les mêmes dimensions que ceux utilisés dans la partie précédente : ils sont plus gros et plus espacés : des plots de $5\ \mu\text{m}$ de diamètre espacés de $5\ \mu\text{m}$, et des plots de $10\ \mu\text{m}$ de diamètre espacés de $10\ \mu\text{m}$. Trois hauteurs ont été utilisées pour chaque motif, respectivement $2\ \mu\text{m}$, $6\ \mu\text{m}$, $10\ \mu\text{m}$ et $2\ \mu\text{m}$, $7\ \mu\text{m}$, $10\ \mu\text{m}$. Les différents types de plots employés sont représentés sur la figure 8.1. Dans la suite, nous désignerons les plots par leur géométrie (L-D-S) pour respectivement leur longueur, diamètre et espacement. Si L,D ou S est remplacé par X, cela désigne toutes les dimensions. Ces zones de micro-piliers sont entourées d'une surface plane, également en PDMS, seule la géométrie du substrat change. Ces substrats ont été immergés dans une solution de fibronectine (à $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$) comme précédemment, pour permettre l'adhésion des cellules. On peut alors y déposer des cellules. Si on se place à l'interface entre les plots et la surface plane (voir figure 8.1), on constate immédiatement la modification de la morphologie cellulaire entre la surface plane et les plots : les cellules sont très étalées sur la partie plane du substrat, tandis qu'entre les plots, les

cellules s'allongent et entourent les plots. Nous allons donc étudier l'influence de cette topographie sur les fonctions cellulaires, en variant les paramètres physiques de l'environnement cellulaire.

8.1.1 Morphologie cellulaire dans les plots

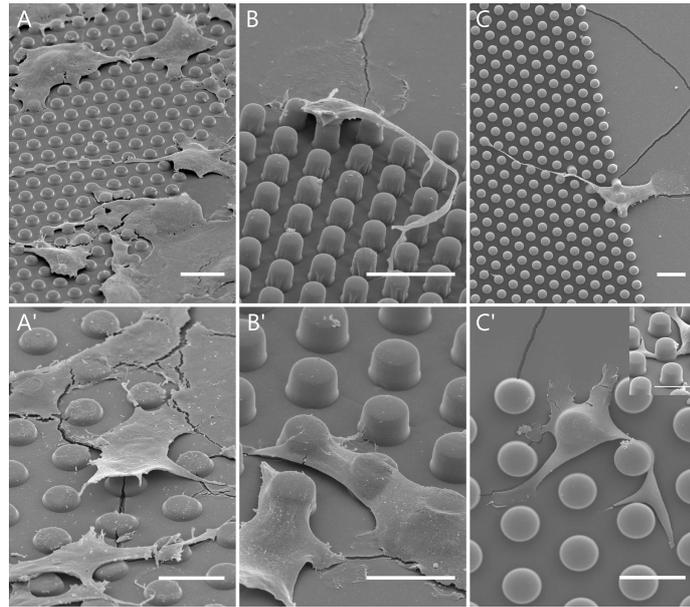


FIGURE 8.2 – Images en MEB des différents substrats (L-D-S) où des 3T3 ont été déposés. **A** : (2-5-5), **A'** : (2-10-10), **B** : (6-5-5), **B'** : (7-10-10), **C** : (10-5-5), **C'** : (10-10-10) l'insert montrant une vue de profil de la même cellule et l'enroulement du plot. barre=20 μm

Nous avons cultivé des cellules de types fibroblastes (3T3) sur des substrats variés et recouverts de fibronectine. Une fois les cellules déposées, elles sont utilisées le lendemain. Nous avons commencé par étudier la morphologie cellulaire. Pour cela, nous avons réalisé des images de MEB sur les différents substrats (figure 8.2). Les cellules ont donc été fixées, puis déshydratées dans l'éthanol (voir protocole 9.4). Pour pouvoir observer les cellules, on remplace l'éthanol par du CO_2 liquide. Ce dernier est ensuite passé en phase fluide au niveau du point critique. On a alors un substrat sec, sur lequel est déposé un alliage d'or et de platine. C'est grâce à ce dépôt que l'on peut acquérir les images de MEB.

Lorsque $L > 2 \mu\text{m}$, les morphologies entre les (X-5-5) (X valant 6 ou 10 μm) et les (X-10-10) (pour X valant 7 ou 10 μm) changent radicalement, à hauteur (presque) égale :

- les cellules sont situées majoritairement sur le haut des (X-5-5) et forment de longues protrusions qui mesurent plusieurs dizaines de μm (jusqu'à 100 μm).

Ces protrusions peuvent s'enrouler autour des plots et ne se situent pas uniquement sur le haut des plots. Bien que situées sur le haut des plots, les cellules utilisent donc aussi la troisième dimension du substrat.

Si on observe des cellules situées à moitié sur ces plots et à moitié sur le substrat plan contigu aux plots, la même cellule forme un large lamellipode semblable à celui observé sur une surface plane rigide (voir figure 8.2, image **B** et **C**). Les propriétés chimiques de l'environnement sont identiques sur les deux surfaces. C'est donc bien la topographie qui induit ce changement de morphologie ;

- Sur les (X-10-10), les cellules sont étalées aussi bien sur le haut des plots qu'entre les plots, la distance entre les plots étant plus élevée que pour les (X-5-5). Elles les recouvrent en formant des nappes. On peut noter la présence de petits lamellipodes (ou pseudopodes) sur les surfaces planes inter-plots. Comme on peut le voir sur **C'**, les cellules peuvent entourer les plots et adhérer sur les surfaces latérales de ces derniers.

Pour les plots les plus courts ((2-5-5) et (2-10-10)), les cellules ont presque la même morphologie de part et d'autre de la limite plots/plat, s'étalant à la fois sur les plots et la surface plane. On n'observe pas de différence majeure entre les plots et une surface plane. On remarque tout de même quelques protrusions du côté des plots, généralement assez courtes mais pouvant courir sur 8 plots (image **A** de la figure 8.2). Bien que des études précédentes aient noté des différences dans ce cas (Frey *et al.*, 2006), nous ne les avons pas constatées.

Nous avons ensuite voulu quantifier ces différences de morphologie. Pour cela, après préparation du substrat comme expliqué précédemment (plots recouverts de fibronectine, puis ajout de 3T3, l'observation ayant lieu le lendemain), nous avons acquis, avec un objectif 10X, des images d'une vingtaine de cellules pour trois types de substrat : plat, (6-5-5) et (7-10-10). A partir de ces images, nous avons mesuré à la fois le périmètre et l'aire des cellules. A l'aide de ces deux données, nous avons déterminé le facteur de forme, qui est défini par $\frac{4\pi A}{P^2}$ où A représente l'aire de la cellule et P son périmètre. Ce rapport permet de définir la circularité des objets. En effet, lorsque le facteur de forme vaut 1, l'objet est un disque. Lorsqu'il tend vers 0, c'est une structure très branchée. Ces deux grandeurs sont présentées sur la figure 8.3 : les cellules s'étendent jusqu'à trois fois moins sur les surfaces (6-5-5) et (7-10-10) que sur le plat, et les cellules ont une structure beaucoup plus branchée sur les plots que sur le plat. En effet, le facteur de forme vaut 0,36 sur le plat et 0,26 (resp. 0,22) sur les surfaces (6-5-5) (resp. (7-10-10)).

Ces observations et mesures n'ont été réalisées qu'en statique. Nous avons ensuite étudié la dynamique des 3T3 dans ces environnements texturés.

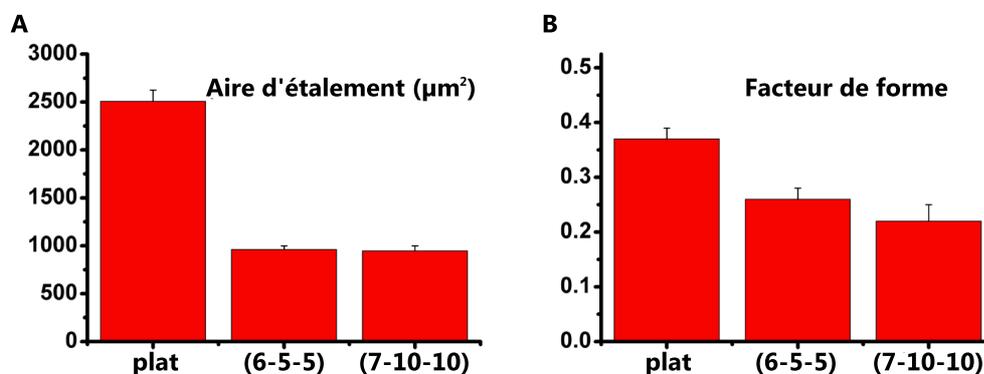


FIGURE 8.3 – **A** : Aire d'étalement (projection) sur les trois surfaces ; **B** : Facteur de forme sur les trois surfaces

8.1.2 Migration

Pour étudier l'influence de la hauteur sur la migration cellulaire, nous avons suivi en vidéo-microscopie des 3T3 déposés 8 ± 1 h avant le lancement de l'acquisition. Les conditions expérimentales étaient les suivantes : le réseau de plots, disposé dans une boîte de Pétri, est immergé pendant 1 h à température ambiante dans une solution de fibronectine (voir Annexes). Les 3T3 sont ensuite décollées et immédiatement déposées à faible concentration sur les plots recouverts de fibronectine (immersion dans une solution à $10 \mu\text{g/ml}$), dans du DMEM 10% sérum. Le réseau est maintenu à 37°C et 5% CO_2 jusqu'à l'acquisition.

L'acquisition est réalisée sur le microscope inversé, avec l'objectif 20X à air et à 37°C . Pour tamponner le milieu sur toute l'expérience (24h), de l'HEPES est ajouté. Grâce à la platine motorisée, plusieurs positions (entre 5 et 10) sont acquises séquentiellement, l'intervalle entre deux acquisitions étant de 5 minutes. Le contraste et la focalisation sont soigneusement réglés pour que le contour des cellules soit suffisamment apparent. La détection de ce contour est assurée par un filtrage passe-bande basé sur la FFT¹ (voir partie 8.1.2). Généralement, une légère défocalisation permet de mieux faire ressortir ce contour lors du filtrage.

Nous avons utilisé différents programmes pour analyser les cellules dans leurs environnements. Tout d'abord, pour pouvoir suivre les cellules dans les différents types de plots employés, nous avons dû éliminer ces derniers des images tout en améliorant le contraste des cellules.

Détection des trajectoires

Nous avons employé le logiciel, ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Ce programme, associé à des routines que nous allons détailler, permet de traiter les

1. transformée de fourier rapide

images acquises.

Les images sont acquises avec un objectif 20X, en champ clair. Un exemple d'images brutes figure 8.4.

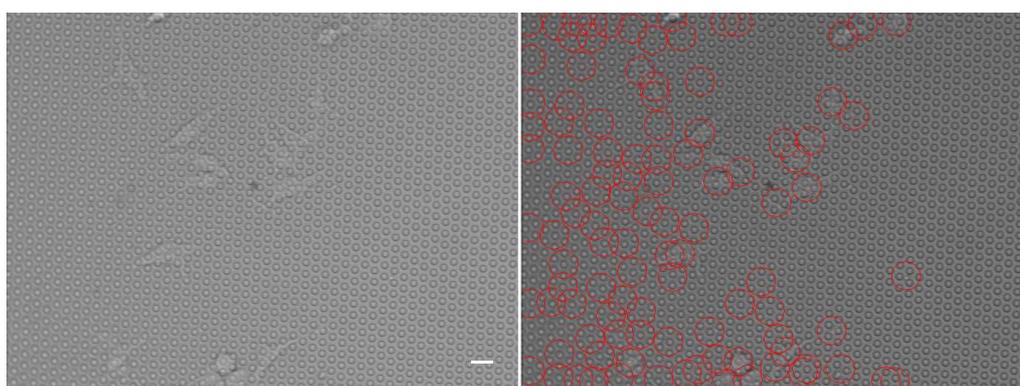


FIGURE 8.4 – A gauche : image acquise avant traitement FFT. A droite : détection sur la même image avant traitement FFT. Le rayon est de 20 pixels, le cut-off de 0 et le percentile de 1. Le contraste est pauvre et les plots perturbent la détection. barre=20 μm

Les plots ont tous la même taille et sont régulièrement disposés. Pour s'en affranchir et les éliminer de l'image, nous avons utilisé un filtre passe-bande en FFT. En effet, en coupant les motifs plus petits qu'une certaine taille (de l'ordre du diamètre des plots), l'image est lissée et seules les cellules apparaissent (image A de la figure 8.5). Cependant, ce traitement n'est pas suffisant car l'image est très peu contrastée. Pour améliorer le rapport signal sur bruit, on peut soustraire le bruit de fond et augmenter le contraste, en augmentant la proportion de pixels saturés. On obtient alors l'image B de la figure 8.5 sur laquelle on peut utiliser Particle Tracker, plugin réalisé à l'ETH Zürich, qui permet de suivre plusieurs particules dans le champ de la caméra.

Pour détecter les particules (ici des cellules), il est possible d'ajuster plusieurs paramètres :

- le rayon approximatif de la particule à suivre. Cette valeur doit être supérieure au rayon, tout en restant inférieure à la plus petite distance particule-particule. Sur l'image C de la figure 8.5, le groupe de cellules pointé par la flèche rouge est considéré comme une seule particule.
- le pourcentage p . Pour sa détection, le programme ne prendra en compte que les $p\%$ les plus brillants. Par exemple, sur l'image C de la figure 8.5, la cellule désignée par la flèche blanche n'a pas été prise en compte du fait de son intensité trop faible par rapport au paramètre entré (1%).
- la taille de coupure (*cut-off*). En dessous, les particules ne sont pas considérées comme des particules à suivre. Nous l'avons laissé à 0.

Une fois les particules détectées sur chaque image, il faut reconstituer les trajec-

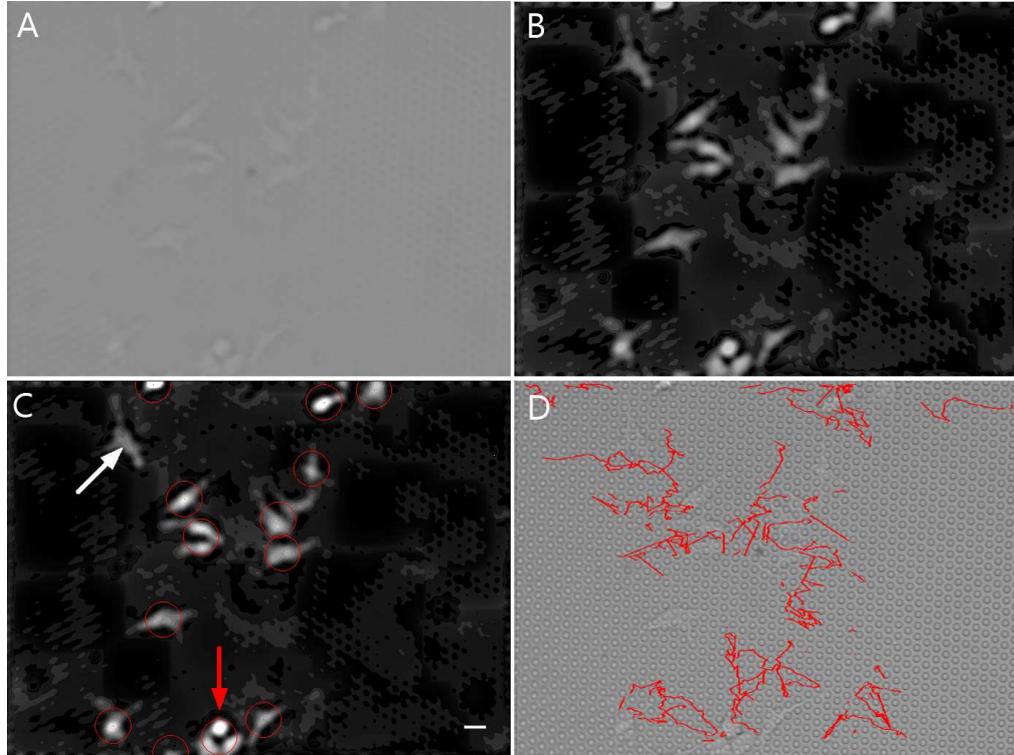


FIGURE 8.5 – **A** : image après traitement FFT (valeur basse : $8 \mu\text{m}$, valeur haute : $\sim 130 \mu\text{m}$). **B** : après amélioration du contraste et soustraction du bruit de fond. **C** : Détection des cellules grâce au programme Particle Tracker (Sbalzarini et Koumoutsakos, 2005) pour ImageJ, avec les mêmes paramètres que sur la figure 8.4. **D** : Trajectoires associées. barre= $40 \mu\text{m}$

toires. Pour cela, on fixe le déplacement autorisé entre deux images, mais aussi le nombre d'images à prendre en compte pour trouver le trajet le plus probable des particules. Ces paramètres sont modifiables après détection. On obtient alors tous les paramètres des trajectoires des différentes particules, que l'on peut représenter comme sur l'image D de la figure 8.5.

Par une première analyse purement qualitative, on peut comparer des trajectoires caractéristiques pour chaque surface. C'est ce qui est réalisé sur la figure 8.6.

Si nous nous ramenons mesurons les trajectoires parcourues pour une durée commune à toutes les surfaces (550 min), il est possible de mesurer la distance parcourue telle que $L_{tot} = \sqrt{(x_{fin} - x_0)^2 + (y_{fin} - y_0)^2}$. En comparant d'un côté les (X-5-5) entre eux, et les (X-10-10) de l'autre avec en référence la distance parcourue sur une surface plane pour le même temps, on constate que, si la hauteur n'a que peu d'influence sur la distance parcourue dans les substrats (X-5-5), le mouvement des cellules est de plus en plus persistant lorsque la hauteur augmente dans les substrats (X-10-10). (voir figure 8.7).

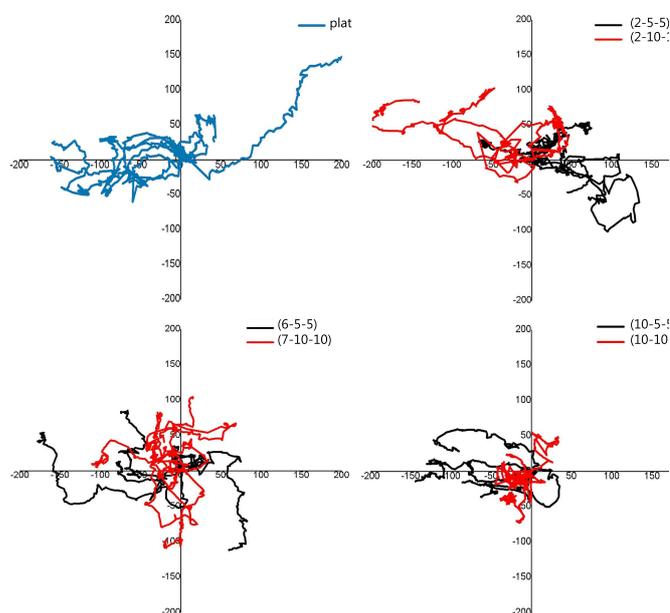


FIGURE 8.6 – Comparaison des trajectoires sur chaque type de substrat en fonction de la hauteur et de la géométrie. Pour chaque surface, 5 trajectoires caractéristiques sont représentées. Pour chaque courbe, les trajectoires ont toutes été acquises sur la même durée. Entre les différentes courbes, les trajectoires sur plots ont des durées similaires ($14\text{ h}30 \pm 30\text{ min}$), celle sur surface plane étant de $9\text{ h}15$

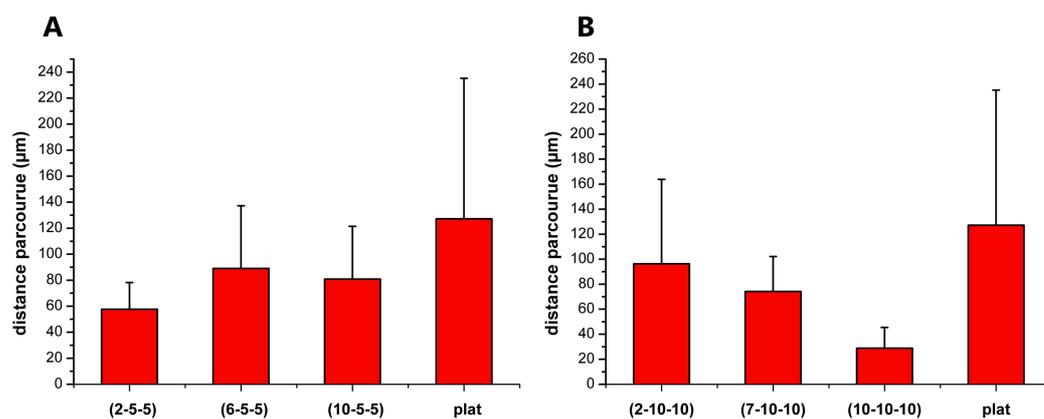


FIGURE 8.7 – **A** : L_{tot} sur (X-5-5). **B** : L_{tot} sur (X-10-10).

Sur une durée de 550 min , les trajectoires sur plots (7-10-10) et (10-10-10) sont plus confinées que celles sur (6-5-5) et (10-5-5). La distance parcourue semble n'être que peu influencée par le diamètre et l'espacement pour les plots les plus courts

($L=2 \mu\text{m}$).

Nous avons choisi de calculer cette distance totale, qui va caractériser le confinement des trajectoires à temps longs, en moyennant sur 10 trajectoires pour chaque substrat, sur le temps le plus long possible. Cette distance permet de caractériser le confinement des cellules : plus L_{tot} est faible et plus la migration est confinée. Néanmoins, ce n'est qu'une première approche, dont les résultats sont très dispersés. Pour étudier plus finement la migration des cellules dans les environnements texturés, nous avons utilisé le déplacement quadratique moyen (ou MSD pour *Mean Square Displacement*).

Elle est définie de la façon suivante :

$$MSD(n\Delta t) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-1-n} [(x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2] \quad (8.1)$$

où x_i (resp. y_i) représente l'abscisse (resp. l'ordonnée) du point i , N le nombre total de points de la trajectoire et $n\Delta t$ la taille de la fenêtre. Δt est quant à lui le pas de temps entre deux images successives et pour maintenir une statistique correcte, on choisit $n_{max} \leq \sqrt{N}$. Il s'agit de faire la moyenne des distances quadratiques

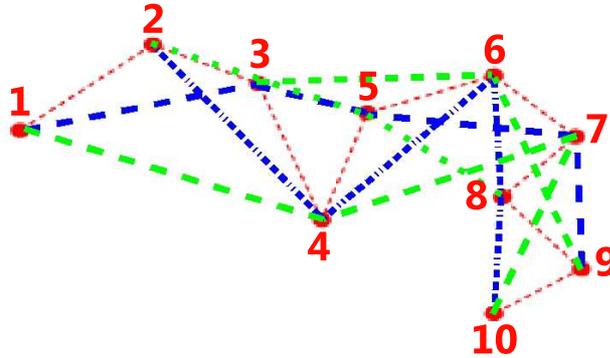


FIGURE 8.8 – Calcul du déplacement quadratique moyen. Lorsque $n = 1$, c'est le tracé rouge, reliant tous les points, qui permet de calculer la distance quadratique moyenne pour la fenêtre de taille Δt . Lorsque $n = 2$, ce sont les deux trajets en bleu, reliant 1, 3, 5, ... $2i + 1$ et 2, 4, 6, ..., $2i$ qui sont pris en compte. Les tracés en vert représentent ceux pour $n = 3$ et relient 1, 4, 7, 10, ... pour le premier, 2, 5, 8, ... pour le second, 3, 7, 9, ... pour le troisième.

parcourues entre deux positions séparées par un intervalle de temps multiple de l'intervalle de base (voir figure 8.8). On peut alors représenter le MSD en fonction de $t = n\Delta t$.

Le MSD permet de déterminer le type de mouvement adopté par les cellules. En général, la plupart des études utilisent une marche aléatoire persistante pour décrire la migration cellulaire. Dans ce cas, on suppose que $MSD = v^2 t^2$ à temps courts (v

représente la vitesse du mouvement) et $MSD = 2n_dDt$ à temps longs (n_d représente le nombre de dimensions de l'environnement de la cellule, et D est le coefficient de diffusion). Lorsque $MSD \propto t^2$ on parle de mouvement dirigé, lorsque $MSD \propto t$, il s'agit de mouvement diffusif.

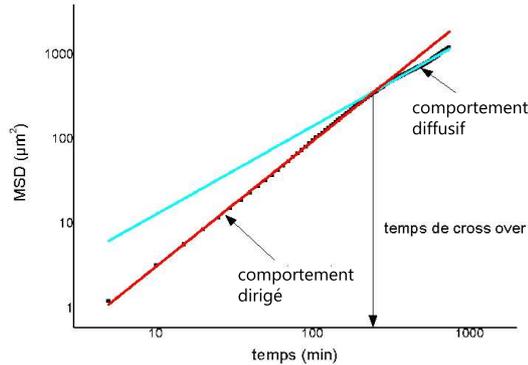


FIGURE 8.9 – Déplacement quadratique moyen d'une cellule. En noir sont représentés les différents MSD pour chaque taille de fenêtre. En bleu (resp. rouge) est représenté le comportement diffusif (resp. dirigé) de la cellule. La pente vaut 1 (resp. est supérieure à 1) en représentation log-log.

On représente les MSD déterminés sur chaque substrat (on moyenne sur 10 trajectoires). On a $\Delta t = 5$ min, les MSD étant déterminés sur plus de 500 min. On a donc $n_{max} \simeq 100$. On obtient pour les cellules un comportement global commun, que nous avons représenté sur la figure 8.9. Dans la première partie de la courbe, la migration est dirigée. On a $MSD \propto t^\alpha$ avec $\alpha > 1$. On ne retrouve pas le comportement en t^2 qui est généralement recherché, le mouvement cellulaire n'est donc pas balistique. Dans la deuxième partie de la courbe, le comportement est diffusif, on a $MSD \propto t$. L'intersection des deux droites de pente α et 1 (en coordonnées log-log) nous donne le temps de *cross-over*, qui représente le temps nécessaire à la cellule pour sortir de son comportement dirigé et retrouver une marche aléatoire. La vitesse des cellules est de l'ordre du $\mu\text{m}/\text{min}$, et le diamètre d'une cellule est de l'ordre de $50 \mu\text{m}$. On s'attend donc à trouver un temps de *cross-over* de l'ordre de 50 min, la cellule ne corrélant son déplacement que sur une distance de l'ordre de sa taille. Or on constate que, même sur le substrat plan, ce temps de *cross-over* est très supérieur à cette évaluation (table **D** de la figure MSDdiff). La cellule n'est pas un objet inerte, elle remodèle son substrat en migrant. Il est donc possible par exemple que les protéines qu'elle dépose lors de sa migration ne permettent pas d'évaluer simplement le temps de *cross-over*, car elles constituent l'histoire de la cellule. Il faut donc exploiter les trajectoires obtenues pour évaluer le comportement des cellules en migration.

Les acquisitions ont été réalisées sur un temps supérieur à celui généralement

considéré (Tzvetkova-Chevolleau *et al.*, 2008). Dans ce cas, seul le mouvement dirigé est vu, car on est en dessous du temps de *cross-over*. En plus du temps de

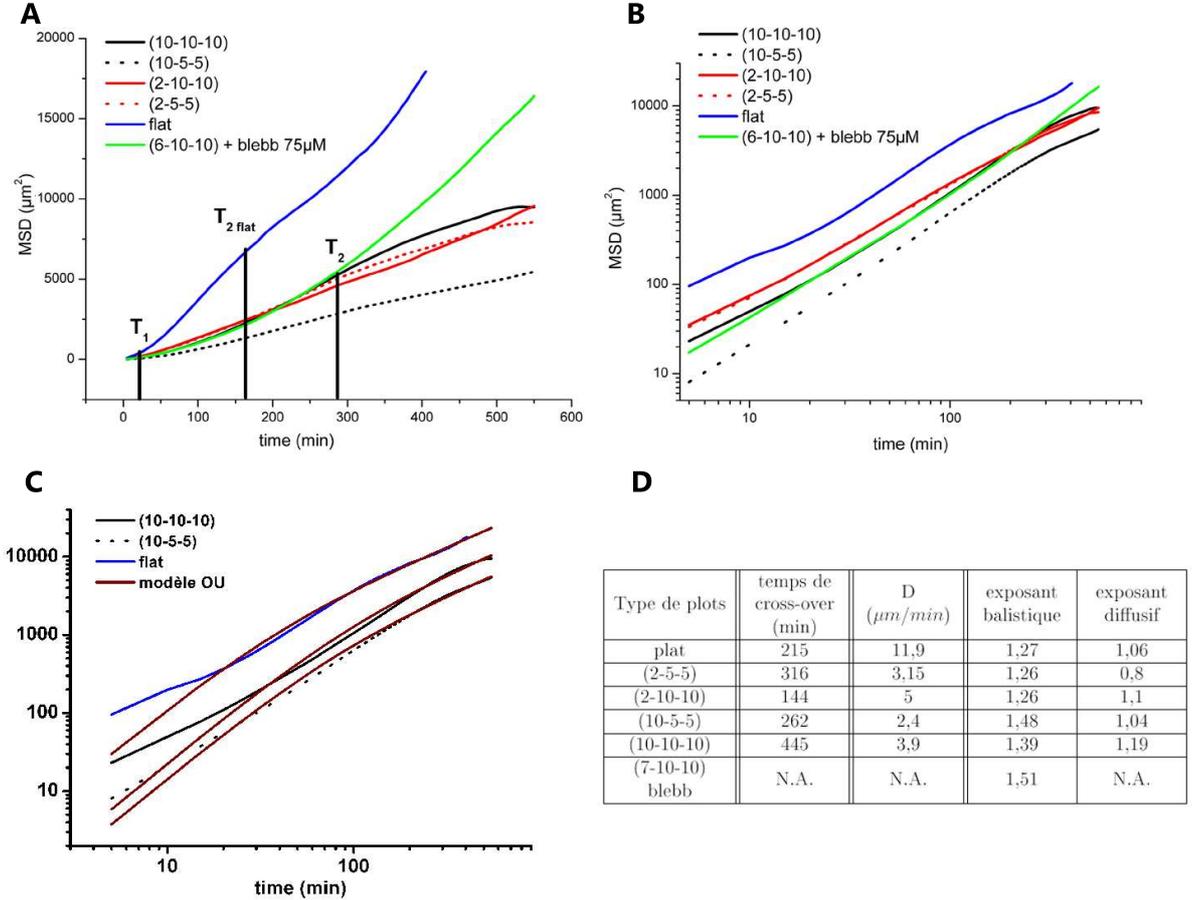


FIGURE 8.10 – **A** : représentation des MSD sur différents substrats. **B** : représentation log-log de ces mêmes MSD. **C** : superpositions des données expérimentales et du modèle Ornstein-Uhlenbeck pour chacune des conditions expérimentales. **D** récapitulatif des temps de *cross-over*, coefficients de diffusion et des différents exposants pour toutes les surfaces représentées, déterminés par régressions linéaires

cross-over, on peut, sur la deuxième partie de courbe, la diffusion, calculer le coefficient de diffusion. L'environnement texturé ne représente pas un vrai environnement tridimensionnel. On considérera donc que $n_d = 2$. On a donc $MSD = 4Dt$ (+ *cte*) à temps long.

Si on examine l'image **A** de la figure 8.10, on peut tout d'abord constater que le déplacement quadratique moyen est plus faible sur surface texturée que sur surface plane et ce, quel que soit le temps. Cette analyse apparaît comme une bonne méthode pour discriminer entre les différents types de substrat et ce, même pour les plots les plus courts. La hauteur des plots joue un rôle tout aussi important : pour les plus

courts ($L = 2 \mu\text{m}$), les MSD pour les substrats (2-5-5) et (2-10-10) sont presque identiques tandis qu'il est plus faible pour les (10-5-5) que pour les (10-10-10). Les cellules semblent ne discriminer le type de texture qu'au delà d'une certaine hauteur, supérieure à $2 \mu\text{m}$.

Lorsque les cellules ont un coefficient de diffusion faible (quelques $\mu\text{m}^2/\text{min}$) et que le temps de *cross-over* qui leur est associé est élevé, les plots guident les cellules au cours de leur migration. Si on se place à temps longs, on détermine donc pour chaque substrat le coefficient de diffusion. Que la hauteur vaille 6-7 ou $10 \mu\text{m}$, D dans les plots (X-10-10) est supérieur à celui observé dans les plots (X-5-5) (voir image **C** de la figure 8.10). Cependant, l'espacement et le diamètre ne sont pas les seuls facteurs, la hauteur influence également le coefficient de diffusion : la migration est plus aisée sur les plots de longueur 6-7 μm que sur ceux de $10 \mu\text{m}$ de haut.

Les temps de *cross-over* montrent également que le mouvement est plus persistant. En effet, plus les plots sont hauts et espacés, et plus ce temps de *cross-over* est élevé (voir image **D** de la figure 8.10). Dans l'environnement (10-10-10), ce temps de *cross-over* (qui correspond à T_2 sur l'image **A** de la figure 8.10) vaut près de deux fois celui mesuré sur le plat ou les plots de $2 \mu\text{m}$ de haut. Les différences de temps de *cross-over* entre la surface plane et les plots les plus courts ($L=2 \mu\text{m}$) ne sont quant à elles pas significatives (tableau **D** de la figure 8.10). Ces trois valeurs se situent en effet dans un intervalle large (à cause de la détection qui n'était pas très bonne sur ces substrats, les cellules étant bien étalées et donc peu contrastée) et on peut considérer qu'ils sont tous de l'ordre de $270 \text{ min} \pm 85 \text{ min}$. Ce type de plots n'augmente pas la persistance de la migration.

Nous avons jusqu'à présent décrit le comportement cellulaire en fonction des différents régimes observés. Comme nous l'avons dit plus haut, la migration cellulaire est souvent modélisée par une marche aléatoire persistante (Uhlenbeck et Ornstein, 1930). On a alors :

$$MSD(t) = 2n_d D(t - \tau(1 - e^{-\frac{t}{\tau}})) \quad (8.2)$$

A temps courts ($t \ll \tau$), on a $MSD = 2n_d D \frac{t^2}{\tau}$, avec $v = \sqrt{\frac{2n_d D}{\tau}}$. On retrouve le mouvement dirigé car $MSD \propto t^2$. A temps longs ($t \gg \tau$), on a $MSD = 2n_d D t$. On retrouve le mouvement diffusif défini précédemment. Les valeurs de D et τ sont rapportées pour les différents substrats dans la table 8.1.

Néanmoins à temps courts ($t \ll \tau$), le modèle sous-évalue le MSD (image **C** de la figure 8.10). τ n'est donc pas bien évalué, tout comme v . Il faut savoir que nous avons peu de statistiques à temps courts. En effet, notre pas de temps est de 5 min, ce qui fait que τ ne vaut que 3 à 8 fois Δt . De plus, ce modèle a l'inconvénient de ne pas considérer l'aspect actif des cellules. Les cellules ne se meuvent pas sous la seule influence du mouvement brownien, les processus impliquant le cytosquelette sont régis par des processus énergétiques, et donc actifs. Par contre, les coefficients de diffusion sont en bon accord, ce qui est en fait logique : à $t \gg \tau$ (donc notamment lorsque $t > t_{\text{cross-over}}$) dans le modèle Ornstein-Uhlenbeck, on a $MSD \sim 2n_d D$. On

Type de substrat	D ($\mu\text{m}^2/\text{min}$)	τ (min)	v ($\mu\text{m}/\text{min}$)
plat	$10,9 \pm 0,1$	$16,5 \pm 1,8$	$0,81 \pm 0,05$
(2-5-5)	$4,33 \pm 0,04$	$13,5 \pm 2,7$	$0,57 \pm 0,06$
(2-10-10)	$4,45 \pm 0,02$	$28 \pm 1,2$	$0,40 \pm 0,01$
(10-5-5)	$2,71 \pm 0,02$	34 ± 2	$0,28 \pm 0,01$
(10-10-10)	$5,16 \pm 0,06$	42 ± 4	$0,35 \pm 0,02$

TABLE 8.1 – Paramètres de la modélisation Ornstein-Uhlenbeck : Coefficient de diffusion D et temps τ

retrouve donc l'expression employée précédemment.

Nous avons donc caractérisé la migration en fonction du substrat sur lequel elle a lieu. Nous avons vu que l'on peut déterminer deux régimes, l'un super-diffusif, s'approchant d'un régime balistique, mais également un régime diffusif, ainsi qu'une échelle de temps, le temps de cross-over de l'ordre de quelques centaines de minutes, à laquelle on bascule d'un régime à l'autre. Cette analyse permet de distinguer les différents mouvements cellulaires en fonction du substrat.

Le cytosquelette est un paramètre essentiel de la morphologie et de la mobilité cellulaire. Comment est-il modifié par la topographie ?

8.1.3 Cytosquelette

Les cellules, lorsqu'elles sont sur un substrat plan et rigide, développent des fibres de stress et des adhésions focales. Elles sont visibles sur les images **A** et **A'** de la figure 8.11. Or dans un milieu tridimensionnel, tel qu'un gel, les cellules développent des structures différentes (voir partie 3.1.2). Nous avons donc voulu savoir quelle était la réorganisation du cytosquelette et des adhésions dans les environnements de plots et comprendre le rôle du cytosquelette dans la migration.

Pour cela, nous avons préparé les substrats comme précédemment, puis nous avons fixé les cellules. Nous avons ensuite marqué le cytosquelette d'actine avec de la phalloïdine fluorescente (elle sera visualisée en rouge) et les adhésions focales avec un anticorps antivinculine suivi d'un anticorps secondaire (elles seront visualisées en vert). Les procédures expérimentales sont données en annexes (voir page 164). Nous avons ensuite observé les échantillons au microscope confocal. De façon globale, et quel que soit le substrat texturé, peu de fibres de stress sont présentes (images **B** et **C**, figure 8.11). L'actine se répartit en fait autour et entre les plots, en fonction de la géométrie : dans les plots (X-10-10) avec $X > 2 \mu\text{m}$, l'actine entourent les plots et est également localisée au niveau du cortex cellulaire (voir figure 8.11, image **C**) tandis que dans les (X-5-5) avec $X > 2 \mu\text{m}$ (voir figure 8.11, image **B**) les câbles d'actine sont suspendus entre deux plots. A deux dimensions, ces câbles suspendus entre deux

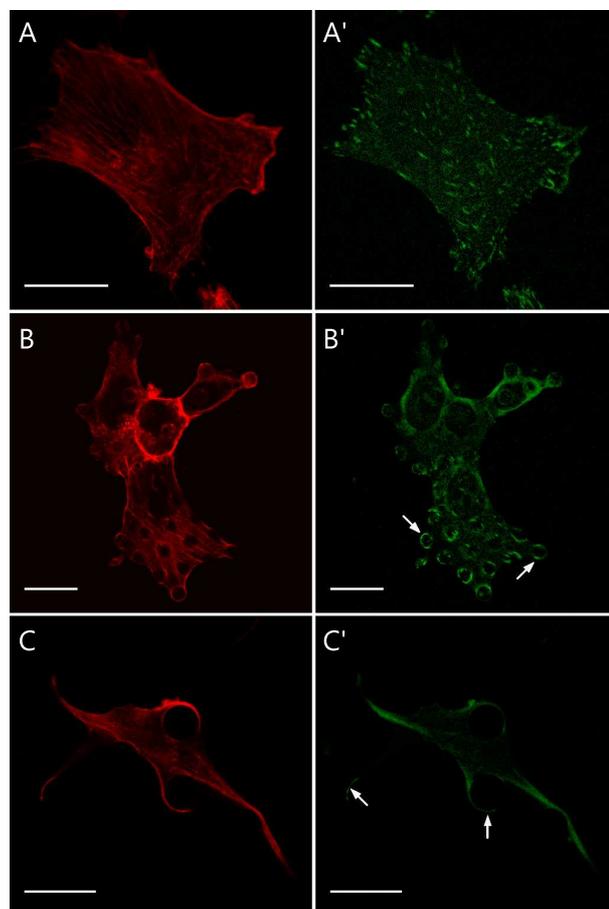


FIGURE 8.11 – **A**, **B**, **C** (resp. **A'**, **B'**, **C'**) : images en microscopie confocale de 3T3 dont l'actine (resp. la vinculine) a été marquée. Les cellules sont sur du PDMS plat (**A** et **A'**), et des substrats (6-5-5) (**B** et **B'**) et (7-10-10) (**C** et **C'**)

zones d'adhésion ont déjà été observés Théry *et al.* (2006). Dans ces expériences, ils ont imprimé de la fibronectine sur lamelle de verre selon des motifs particuliers et constaté que les cellules qui se déposent sur ces motifs y adhèrent en renforçant leur cytosquelette d'actine. En particulier les filaments d'actine forment des structures renforcées entre les zones d'adhésions (voir figure 8.12). Ce renforcement du cytosquelette dans une géométrie donnée (un réseau de plots hexagonal) permet en fait à la cellule d'adopter une migration dirigée, que nous avons caractérisée par le MSD : en s'appuyant sur le réseau de plots, qui est régulier, la polymérisation de l'actine est orientée, donc la migration également et le comportement dirigé est plus important dans l'environnement texturé (pour une hauteur suffisante) que sur un substrat plan. Les adhésions focales quant à elles se retrouvent aux sommets des plots sur les plots les plus serrés (espacés de $5 \mu\text{m}$) (voir figure 8.11, image **B'**). Bien que les plots soient de diamètre supérieur, elles adoptent une géométrie similaire à

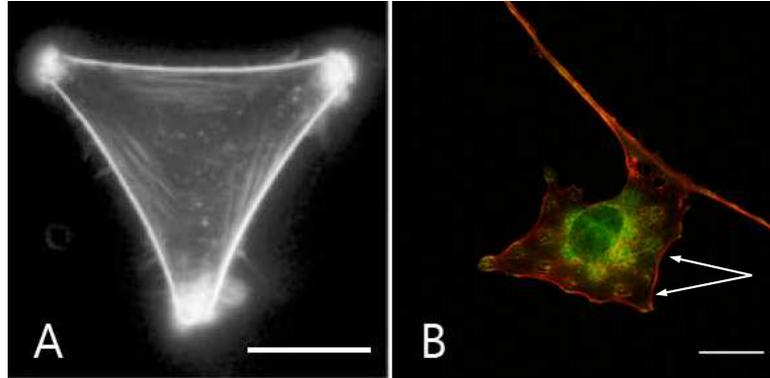


FIGURE 8.12 – **A** : cellule déposée sur un motif en forme de Y (Théry *et al.*, 2006) ; **B** : cellule déposée sur le haut de plots (6-5-5). Dans les deux cas, on a des structures d'actine renforcée entre les surfaces adhésives, 3 pour le Y, entre deux plots voisins sous la cellule pour les (6-5-5). Deux exemples sont mis en valeur par les flèches

celle observée dans Saez *et al.* (2005). Le fait que les cellules pénètrent peu entre les plots leur permet de maintenir une structure visible en 2D. Par contre sur les (X-10-10), on retrouve des complexes d'adhésion sur toute la longueur des plots (voir figure 8.11, image **C'**). On les retrouve notamment au bout de protrusions entourant les plots, comme l'indiquent les flèches de l'image **C'**. On a donc colocalisation de l'actine et de la vinculine sur le pourtour des plots (X-10-10), ce qui étaye la thèse de guidage par la topographie : toutes les structures permettant l'avancée de la cellule (adhésion et contraction) sont localisées de façon privilégiée au niveau des plots.

Etant donné que l'actine est localisée au niveau des plots, tout comme les adhésions focales, nous avons voulu évaluer l'influence de la contractilité cellulaire sur la migration dans les substrats texturés. Pour cela nous avons ajouté, avant l'acquisition des données, de la blebbistatine à $75 \mu\text{M}$, qui est un inhibiteur de la myosine-II et donc de la contractilité acto-myosique. Alors, nous ne retrouvons pas les deux régimes sur le temps d'observation (500 min) (voir figure 8.10, images **B** et **D**). Les cellules maintiennent une migration persistante, quasi-balistique et sont en fait guidées de façon rectiligne entre les plots. Les cellules ne peuvent plus changer de direction lorsque le complexe acto-myosine est inhibé. La contraction du réseau d'actine est donc essentielle dans ce phénomène de guidage. En effet, les adhésions, combinées à la contraction du complexe acto-myosique, permettent aux cellules de s'ancrer sur les plots et d'y exercer une force. Les cellules peuvent alors changer de direction, ce qui n'est pas observé lorsqu'on ajoute de la blebbistatine.

Bien que se déplaçant entre les plots, les cellules utilisent donc ces derniers pour avancer, en contractant son cytosquelette.

Comme on l'a vu parties 1.1.2 et 1.1.3, les GTPases influencent la migration : Rho module la contractilité à l'arrière de la cellule tandis que Rac permet la for-

mation de protrusions à l'avant et la présence de Cdc42 entraîne l'apparition de filopodes. Nous avons donc transfecté des 3T3 avec un plasmide exprimant RhoV14, qui permet de surexprimer Rho de façon constitutive. Le cytosquelette est alors plus contractile. Comme Rho et Rac s'inhibent mutuellement, on observe également un abaissement de l'expression de Rac ce qui rend la migration plus difficile. Il est à noter que le taux de transfection n'atteint pas 100% et il n'est pas possible de discriminer une cellule transfectée d'une non transfectée en champ clair. On considérera donc l'ensemble de ces trajectoires en comparaison du contrôle non transfecté, sans extraire une trajectoire de l'ensemble pour réaliser une analyse plus spécifique. Nous avons représenté sur la figure 8.13 un ensemble de trajectoires de cellules non transfectées (**A**) et un autre de cellules exprimant RhoV14 (**B**). Lorsque les cellules

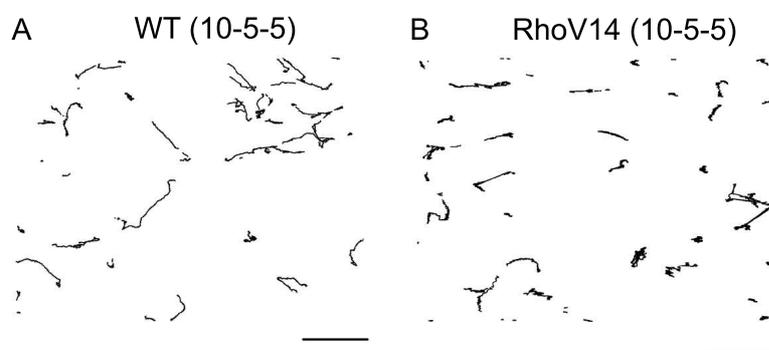


FIGURE 8.13 – **A** : Trajectoires de cellules non transfectées sur un substrat (10-5-5) ; **B** : Trajectoires de cellules exprimant RhoV14 sur un substrat (10-5-5) - Barre = 20 μm

expriment RhoV14, on constate que leurs trajectoires sont en moyenne beaucoup moins étendues (de 2 à 5 fois) et suivent beaucoup moins les plots que les cellules non transfectées. Elles ont tendance à balayer un petit espace autour de leur point de départ. Elles perdent donc la capacité à suivre les axes du réseau de plots.

L'organisation cellulaire est donc remodelée par la topographie.

La migration cellulaire dans cet environnement texturé étant dirigée, nous avons voulu étudier le temps de vie des adhésions focales dans l'environnement tridimensionnel et le comparer à celui sur un substrat plan. Pour cela, nous avons utilisé la lignée fibroblastique REF52 exprimant la paxilline-YFP de façon stable (don d'Alexander Bershadsky). Nous avons pu suivre la migration de cellules dans les plots en vidéo-microscopie de fluorescence. Nous avons choisi pour cela de nous placer à l'interface plots-plat. En effet, dans certaines conditions qui seront détaillées ultérieurement (voir partie 8.2), les cellules qui sont sur la surface plane peuvent pénétrer entre les plots. Un exemple est donné figure 8.14.

Pour quantifier la durée de vie des adhésions focales, nous nous sommes à nouveau servi du plugin Particle Tracker d'ImageJ. Nous avons donc détecté les adhé-

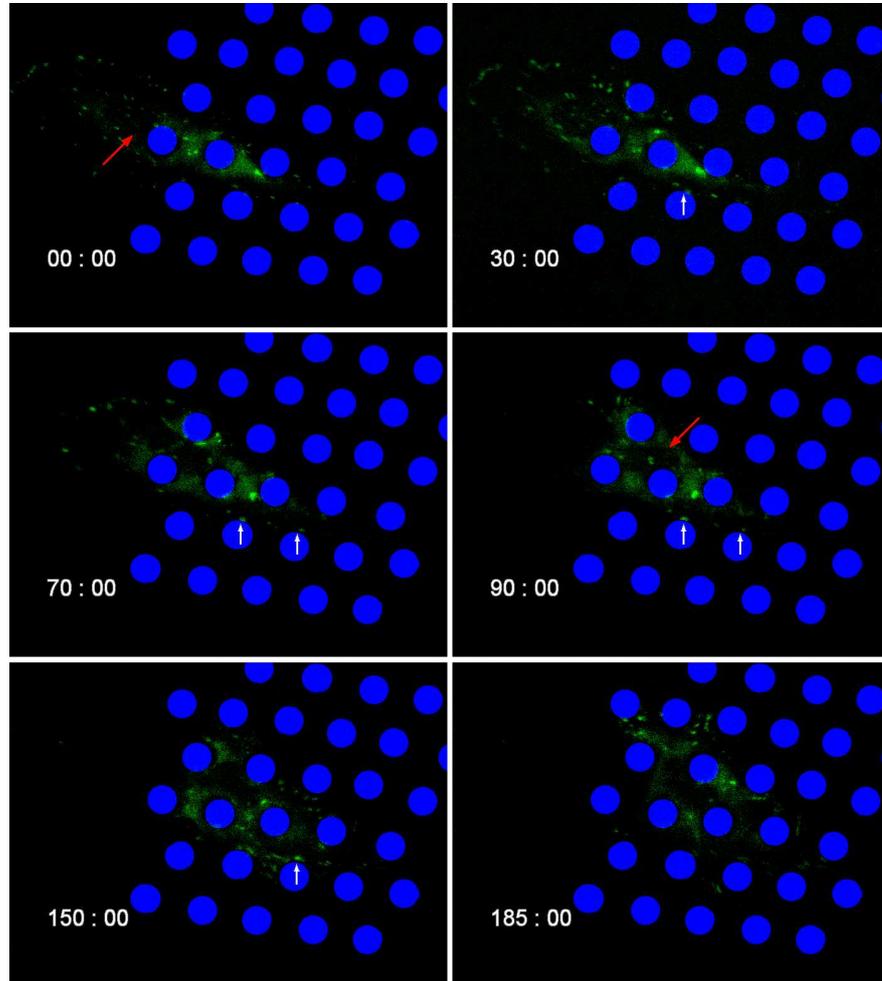


FIGURE 8.14 – Séquence d’images montrant l’entrée d’une cellule REF52 dans des plots (7-10-10). Les flèches rouges désignent le noyau, les blanches deux adhésions focales qui restent stables pendant près de deux heures. Lorsque la cellule entre dans les plots, les adhésions focales se concentrent au niveau des plots au lieu d’être réparties plus uniformément sous la cellule

sions focales sur chacune des images, qu’elles soient sur les plots ou sur la surface plane à côté des plots. Nous avons alors pu mesurer leur durée de vie, en fonction de leur localisation. Les adhésions focales sont beaucoup plus stables sur le bord des plots que sur le PDMS plat. En effet, elles ont une durée de vie de 28 ± 4 min sur le plat, et de 89 ± 11 min sur le bord des plots (mesurée sur 15 et 10 adhésions focales respectivement). La rugosité de l’environnement confère donc une stabilité aux cellules et leur permet de migrer. Cet effet est proche de celui observé lorsqu’on augmente la rigidité du substrat. En effet, lorsque la rigidité augmente, les adhésions focales sont de plus en plus stabilisées, ce qui permet d’ailleurs de diriger la

migration selon la direction de plus grande raideur.

Lorsqu'on augmente la hauteur des plots, on a donc une augmentation de la stabilité des adhésions focales et une orientation du cytosquelette. Ces deux composantes sont indispensables pour obtenir une migration dirigée : la diminution de la contractilité par la blebbistatine a montré que le complexe acto-myosine est indispensable pour que la cellule tire parti de l'environnement texturé. En effet, sans contractilité, les plots sont uniquement des obstacles et ne sont pas employés pour se diriger de façon plus efficace. Dans le même temps, inhiber Rac (en surexprimant Rho) empêche les premières phases exploratoires, qui permettent à la cellule de prendre en compte son environnement. Nous avons vu que les cellules peuvent entrer dans les plots, où elles trouvent une stabilité au niveau des adhésions. Nous avons donc voulu quantifier les préférences de migration, en fonction de l'espacement.

8.2 Rôle de l'espacement entre les plots

L'espacement joue un rôle dans le sens de migration des cellules. En effet, lors de l'étude de migration à la frontière plots-plat, nous avons constaté que, si les cellules pouvaient entrer sans difficulté entre les plots (X-10-10), ce n'était pas le cas dans les plots (X-5-5) pour $X > 2 \mu\text{m}$. Nous avons donc voulu savoir quelle était la taille limite d'entrée dans les plots, et aussi quantifier ce phénomène. En fonction de l'espacement disponible, les cellules peuvent passer des plots au plat et vice versa (voir figure 8.15).

Nous avons donc voulu étudier de façon systématique l'influence de l'espacement entre les plots dans le comportement cellulaire à la frontière plots-plat.

8.2.1 Notion d'espace limite

Comme nous l'avons constaté précédemment, le comportement cellulaire change en fonction de l'espacement des plots : à $S=5 \mu\text{m}$, les cellules ont tendance à ne pas passer entre les plots (pour $L > 2 \mu\text{m}$), tandis qu'à $S=10 \mu\text{m}$, les cellules migrent entre les plots (voir figure 8.16). On peut se demander s'il n'y a pas un effet de « topotaxie » semblable à la durotaxie observée par Lo *et al.* (2000).

Pour étudier l'influence de l'espacement des plots sur la migration cellulaire, nous avons utilisé des plots de diamètres et de hauteurs constants ($D=5 \mu\text{m}$ et $L=20 \mu\text{m}$) et d'espacements variés ($S=4 \mu\text{m}$ à $12 \mu\text{m}$). Nous avons pris le parti d'utiliser des plots plus hauts pour être certains que les cellules qui pénétreraient dans les plots passeraient bien entre eux, et non au dessus d'eux. Nous avons compté le nombre de cellules traversant la frontière du plat vers les plots et celles approchant les plots mais restant sur le PDMS plat, pour chaque type de plots cités, sur 12 heures.

Nous avons, en fonction des substrats, obtenus un nombre de cellules très variables : 21 (20-5-4), 31 (20-5-6), 23 (20-5-8) et 94 (20-5-12) cellules. Pour pouvoir comparer les différentes expériences, nous avons comptabilisé les cellules restant sur

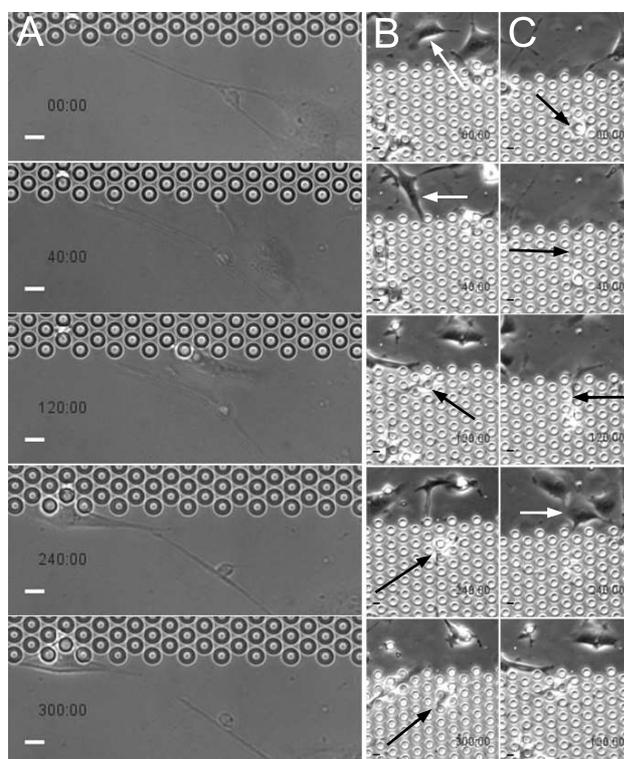


FIGURE 8.15 – **A** : une cellule s'approche de plots (10-5-5) et n'y pénètre pas, malgré quelques incursions; **B** : une cellule s'approche de plots (10-10-10) et, dans le même temps que **A**, y pénètre; **C** : une cellule sort de plots (10-10-10). On aurait pu mettre une série d'images similaires dans des plots (X-5-5). Barre = 5 μm

le plat ou passant dans les plots et avons déterminé le pourcentage de chacune de ces catégories pour un type de plots donné. Ces pourcentages sont représentés sur la figure 8.17.

Entre $S=4 \mu\text{m}$ et $S=6 \mu\text{m}$, on constate un changement radical du comportement cellulaire. Pour l'espacement le plus faible, les cellules restent très majoritairement à l'extérieur des plots (75%) et s'alignent le long des plots (voir figure 8.16, image B et Clark *et al.* (1987)). Par contre, à partir de $S=6 \mu\text{m}$, les cellules entrent majoritairement dans les plots (>70%) (voir image **C** de la figure 8.16).

Pour confirmer cette tendance, nous avons effectué les mêmes mesures sur des substrats encore plus espacés : $S=8 \mu\text{m}$ et $S=12 \mu\text{m}$. Sur ces substrats, les cellules entrent d'autant plus que les plots sont espacés : on passe de 70 à 80 puis 85% de cellules migrant du plat dans les plots. L'entrée dans les plots est donc favorisée. Les adhésions focales étant plus stables dans les plots que sur le plat, on peut faire l'hypothèse que leur stabilité favorise le passage des cellules de la surface plane aux plots.

La situation des cellules provenant des plots n'est pas contre pas aussi claire : les

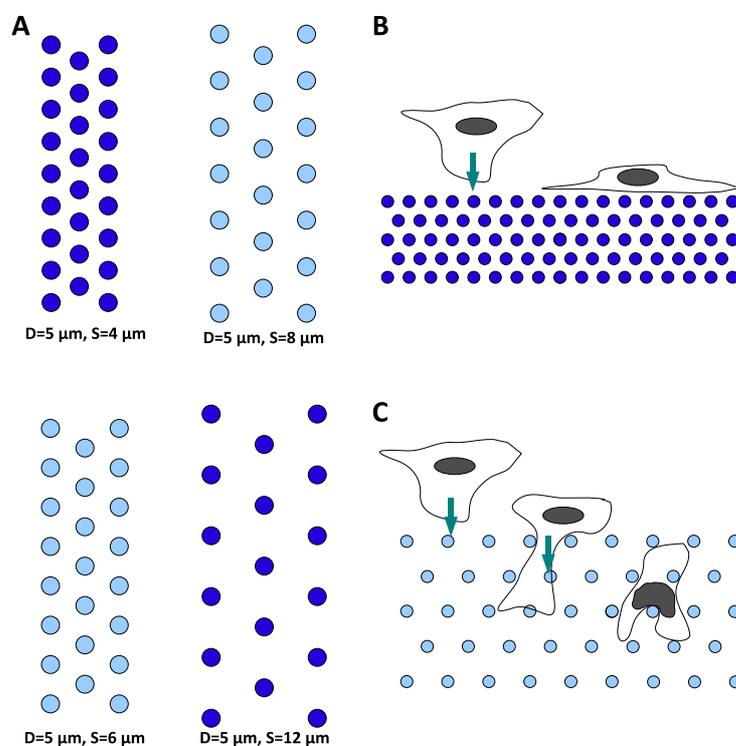


FIGURE 8.16 – **A** : Représentation à la même échelle des différents substrats employés pour les études de transmigration ; **B** : Comportement d'une cellule à proximité de plots « serrés » ; **C** : Comportement d'une cellule à proximité de plots « espacés »

cellules s'approchant de l'interface plots-plat n'y resteront pas bloquées et auront tendance, si elles entrent en contact avec le substrat plat, à passer de l'autre côté. On a par contre observé que les échanges de cellules entre les plots et le substrat plat augmentaient avec l'espacement : une cellule pourra passer la frontière plusieurs fois, dans un sens comme dans l'autre. Une cellule dans des plots espacés de $4 \mu\text{m}$ aura par contre tendance, lorsqu'elle est passée sur le substrat plan, à y rester.

On a par contre une taille limite, ici de $4 \mu\text{m}$ pour les 3T3 employés. Nous nous sommes interrogés sur les raisons de cette limite. Nous avons observé que le noyau se déformait beaucoup dans les plots, et nous nous sommes donc demandé s'il existait une limite à cette déformation. Nous avons donc souhaité rigidifier le noyau, pour voir si l'espacement limite était modifié.

8.2.2 Influence du noyau

Les noyaux dans les plots s'adaptent à l'espace disponible. En effet, lorsqu'une cellule est étalée sur une surface plane, son noyau est régulier, ovale. Si on dépose des 3T3 sur des plots, les noyaux vont se déformer pour s'adapter à la topographie.

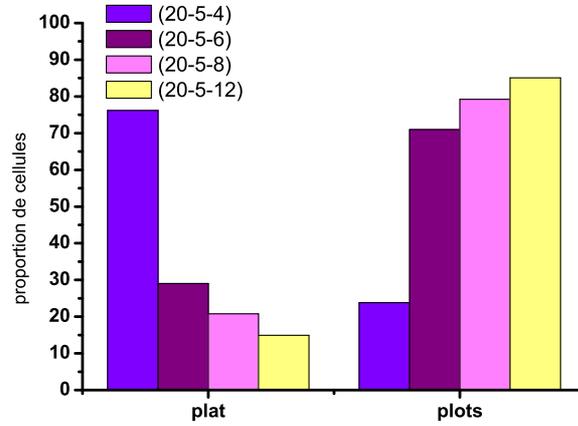


FIGURE 8.17 – Pourcentages respectifs des cellules restant à la frontière côté PDMS plat (gauche) et de celles passant dans les plots lorsqu’elles arrivent à la frontière plots-plat (droite)

Un exemple est donné figure 8.18.

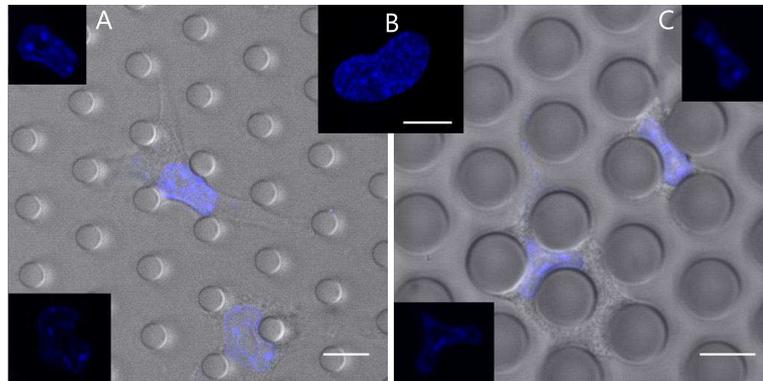


FIGURE 8.18 – **A** : Cellules sur des plots (25-5-10), dont le noyau a été marqué. En insert, les deux noyaux sans les plots; **B** : noyau d’une cellule sur une surface plane; **C** : Cellules sur des plots (25-10-5), dont le noyau a été marqué. En insert, les deux noyaux sans les plots. Barre=10 μm

Les propriétés mécaniques du noyau peuvent donc être le facteur limitant d’entrée dans les plots. Un module d’Young dynamique E a été déterminé, il a été montré qu’il varie en loi de puissance : $E = Bt^{-\alpha}$ (Dahl *et al.*, 2005). Pour comparer deux rigidités de noyau, nous avons utilisé un plasmide codant pour une protéine du noyau, la lamine A. Son mode d’action a été détaillé partie 1.1.1. Dahl *et al.* (2006)

ont déterminé expérimentalement le module d'Young dynamique de noyaux sains et l'ont comparé à celui mesuré sur des patients atteints de progéria. Ils ont trouvé que B ne varie pas significativement avec les propriétés de la lamine, mais que par contre, la dynamique, caractérisée par α , change : la puissance est deux fois plus faible pour les cellules dont la lamine-A est tronquée (0,18). La déformation sous contrainte dynamique est donc plus difficile lorsque le noyau contient de la lamine-A $\Delta 50$ et donc les noyaux de patients sont plus rigides que les noyaux sains.

Nous avons donc transfecté les 3T3 avec le plasmide lamine A- $\Delta 50$, donné par Kris Dahl (Carnegie Mellon, Pittsburgh). Après 24 heures d'incubation, nous avons trypsiné les cellules et les avons déposés sur les plots. Comme pour les expériences de migration évoquées plus haut, nous avons ensuite enregistré les migrations cellulaires sur 12 heures en différentes positions, en combinant fluorescence et champ clair.

Le taux de transfection étant très faible, nous n'avons obtenu qu'un faible nombre (5) de cellules transfectées migrant du plat vers les plots. Néanmoins, toutes ces cellules déposées sur plots (20-5-6), espacement où une majorité de cellules entraient dans les plots, sont restées sur le plat. Il semble donc que la rigidité du noyau joue bien un rôle dans la migration cellulaire au sein d'un environnement texturé, notamment au niveau de la taille des « pores » définis par les plots. Des expériences contrôles que nous sommes en train d'effectuer viseront à confirmer ce résultat, en contrôlant que ce n'est ni la modification du noyau (contrôle grâce à un plasmide codant pour la lamine A-GFP saine) ni la transfection (contrôle avec un plasmide GFP) qui entraîne cette modification.

8.3 Conclusion

Nous avons donc montré ici qu'avec un substrat texturé, dont on peut varier les dimensions de façon contrôlée, on pouvait sonder les propriétés cellulaires. En effet, les cellules modifient leur comportement même lorsque les variations du substrat peuvent sembler ténues : une variation de hauteur de quelques μm suffit à modifier la migration cellulaire, comme on a pu le voir sur le MSD. Lorsqu'on augmente la hauteur des plots, le temps de *cross-over* augmente et le coefficient de diffusion diminue, ce qui caractérise la persistance de la migration cellulaire. Par ailleurs, un espacement inter-plots diminué de 2 μm suffit à rendre l'interface plots-plat quasi infranchissable depuis la surface plane. Bien qu'on ne puisse pas considérer ce substrat constitué de plots comme étant un véritable environnement 3D (il n'est pas isotrope, et les cellules peuvent trouver, entre les plots, une surface plane), on retrouve des caractéristiques identiques entre ces plots et un gel tridimensionnel :

- les cellules ne sont complètement étalées, elles adhèrent aussi le long des plots et s'en servent comme point d'appui pour migrer, comme celles qui migrent de façon mésenchymateuse en 3D.
- la migration est dirigée : dans un gel tridimensionnel, les cellules peuvent migrer le long des fibres le constituant.

- les fibres de *stress* sont quasiment absentes, les seules structures d'actine renforcées sont dues à la présence des plots.
- Alors même que les cellules sont déposées sur un substrat plan entre les plots, le fait qu'elles soient adhérentes aux surfaces latérales des plots entraîne une concentration d'adhésions focales plus faible sur le substrat plan.

On a pu alors en dégager des caractéristiques aussi bien au niveau du comportement global de la cellule (migration) qu'au niveau intra-cellulaire (réorganisation). Cependant, nous avons jusqu'à présent considéré comme un prérequis l'étalement de la cellule dans cet environnement. Nous allons donc, de façon préliminaire, nous intéresser à cette première étape.

Chapitre 9

Étalement cellulaire dans un environnement « 3D »

Sommaire

9.1	Modes opératoires employés	132
9.2	Morphologie lors de l'étalement cellulaire	132
9.3	Analyse temporelle de l'étalement cellulaire	136
9.3.1	Substrats texturés adhésifs	137
9.3.2	Contrôles	145
9.4	Conclusion : proposition de modèle d'étalement	147

Dans cette partie, nous avons combiné les travaux précédents pour étudier les forces lors de l'étalement des cellules dans un environnement mimant un milieu 3D. Pour cela, nous avons utilisé des plots d'espacement variable ($S=4$ à $12 \mu\text{m}$), de diamètre $5 \mu\text{m}$ et de hauteur $20 \mu\text{m}$. Ils sont donc beaucoup plus flexibles qu'auparavant. Jusqu'à présent, nous avons effectué des expériences sur cellules en contact avec leur substrat depuis plusieurs heures. Ici, nous nous intéresserons à la génération de forces lors des premières étapes de l'adhésion dans un environnement où les plots, de diamètre $5 \mu\text{m}$ et d'espacement variable, peuvent être défléchis par les cellules. La dynamique de l'étalement a déjà fait l'objet d'études sur des substrats bidimensionnels (Dobereiner *et al.*, 2004; Dubin-Thaler *et al.*, 2004) : au cours de l'étalement, l'aire cellulaire augmente, et on peut distinguer plusieurs régimes : des bourgeonnements de membrane (*blebbing*) dans un premier temps, de la protrusion ensuite, des oscillations enfin (Giannone *et al.*, 2004). Au cours de cet étalement, les cellules exercent des forces, le cytosquelette se réorganise. Récemment, dans des études à 2D, la troisième dimension est prise en compte : il a été montré que lors de son adhésion, la cellule (un monocyte) détecte la surface lorsque celle-ci se situe à 50 nm et ce, sur des échelles de temps très courtes (quelques secondes) (Pierres *et al.*, 2008). Nous avons donc voulu ensuite connaître les mécanismes d'étalement des cellules dans les environnements de plots employés précédemment.

9.1 Modes opératoires employés

Pour caractériser l'étalement cellulaire, nous avons déposé les cellules (des REF52 exprimant la paxilline-GFP) sur des micro-piliers en PDMS de raideur ~ 400 nN/ μm . Ceux-ci avaient été préparés suivant le même protocole que pour l'étude sur la migration. L'ensemble du substrat est traité avec de la fibronectine. Néanmoins, pour suivre la déformation du substrat, nous avons préalablement imprimé de la fibronectine fluorescente sur le haut des plots. Cela nous a permis de suivre avec une meilleure précision le mouvement des plots induit par la contraction cellulaire. Nous n'avons utilisé que des plots de $5 \mu\text{m}$ de diamètre, hauts de $20 \mu\text{m}$ pour avoir des plots suffisamment souples. Nous avons fait varier la densité de plots entre 10 et 33%.

Dans tous les cas, la cellule déposée va commencer par s'étaler sur les plots puis pénétrer entre les plots. L'étalement a lieu en 3 dimensions, et il est difficile de réaliser une étude en dynamique qui permettrait d'avoir accès à l'ensemble du volume d'intérêt. En effet, un essai avec un microscope confocal à *spinning-disk* ne s'est pas avéré concluant : le signal était trop faible pour pouvoir suivre l'évolution de la paxilline-YFP au delà de quelques min sans détruire la fluorescence. Pour caractériser leur comportement, nous avons donc utilisé deux techniques, pour avoir accès à la fois aux 3 dimensions et à la dynamique, mais de façon découplée :

- en dynamique, en imageant le haut des plots pour suivre leur déplacement. Nous avons également, grâce à un PiFoc, enregistré le signal de la paxilline-YFP sur plusieurs plans, en haut des plots, au milieu et en bas. Ces acquisitions ont été réalisées en épifluorescence.
- en fixant, dans du paraformaldéhyde, des cellules à différents instants : 15 min, 30 min, 1h et 2h après le dépôt des cellules sur les plots. Nous avons ensuite marqué l'actine, la paxilline exprimée, caractérisant les adhésions focales, étant déjà couplée à une protéine fluorescente. Nous avons renouvelé l'expérience en marquant le noyau avec du DAPI (voir protocoles en annexe) sur des cellules qui avaient été incubées avec de la calcéine AM (BD Biosciences) avant la trypsinisation. Ces échantillons ont ensuite été imagés par microscopie confocale, pour étudier la répartition spatiale du cytosquelette et du noyau. Pour cela, nous avons effectué des coupes en Z mais également en Y, pour avoir la répartition des protéines d'intérêt le long des plots.

Nous allons commencer par nous intéresser aux cellules fixées.

9.2 Morphologie lors de l'étalement cellulaire

On rappelle que la nomenclature des plots est (H-D-S) pour hauteur, diamètre et espacement. Pour cette étude, nous avons utilisé un seul type de plots, des (20-5-12), suffisamment espacés pour que la cellule se dépose entre les plots, tout en interagissant avec eux. Nous avons ensuite fixé et marqué les cellules.

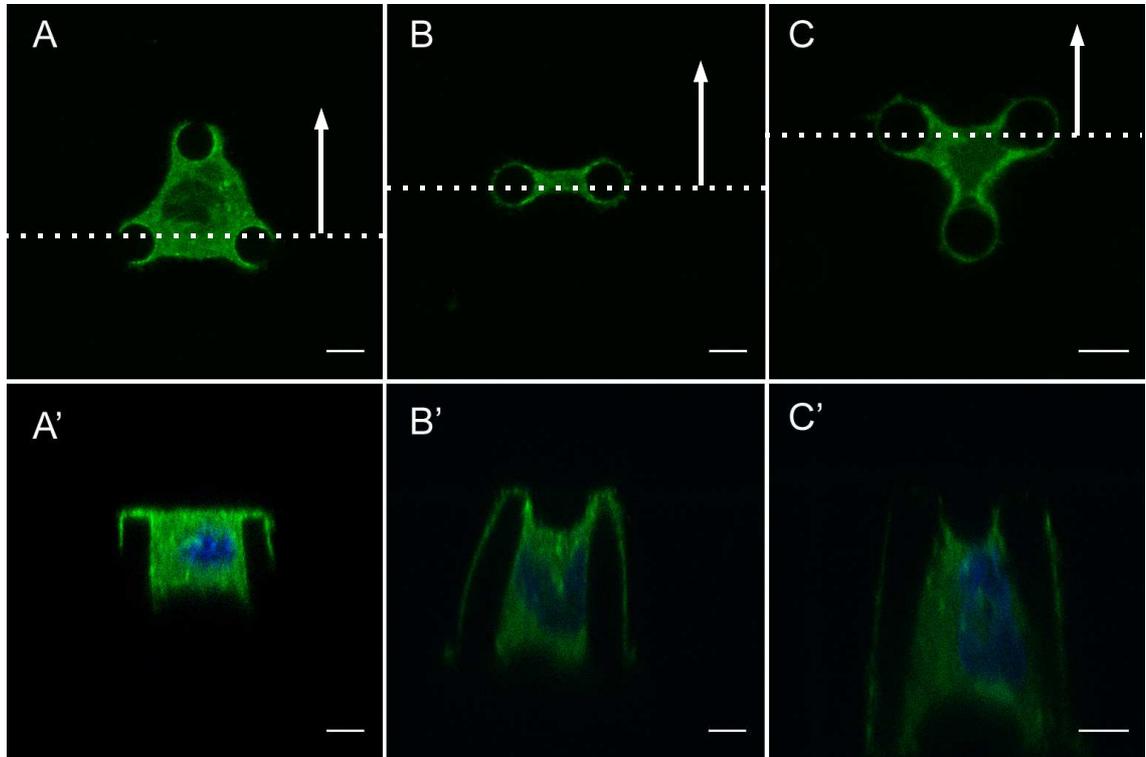


FIGURE 9.1 – Vues du dessus (**A**, **B**, **C**) et coupes selon l'axe représenté (**A'**, **B'**, **C'**) pour des cellules fixées à différents temps : 15 min (**A** et **A'**), 30 min (**B** et **B'**) et 1h (**C** et **C'**). Le noyau apparaît en bleu, le corps cellulaire en vert (visualisé grâce à l'ajout de calcéine AM). Barre = 5 μm .

Lors de l'étalement cellulaire sur des plots, la cellule va occuper aussi bien le sommet des plots que l'espace inter-plots. Pour un espacement $S \sim 8$ à $12 \mu\text{m}$, les premières étapes d'étalement se font sur deux ou trois plots, le corps cellulaire se plaçant au milieu d'eux. Au tout début de l'étalement ($t < 15$ min) la cellule est posée sur le haut des plots et pénètre déjà entre les plots, où on trouve notamment le noyau (voir image **A'** de la figure 9.1). Dès cet instant ($t = 15$ min), les plots sont défléchis par la cellule alors même qu'aucune adhésion focale n'est clairement visible le long des plots (voir image **A** de la figure 9.2).

Par contre, dès 30 min après le dépôt des cellules, la paxilline s'est assemblée en complexes que l'on trouve sur le haut mais également sur le côté des plots. La morphologie de la cellule évolue également. On peut également relever que pour $t \sim 15$ min, la convexité de la cellule change. En effet, lorsqu'une cellule se dépose sur un substrat, elle est ronde. Sur un substrat plan, elle va s'étaler en se polarisant tout en restant convexe. Par contre ici, comme on peut le voir sur l'image **A** de la figure 9.1 les structures reliant les plots sont, pour deux d'entre elles, encore convexes, tandis que celle de gauche est devenue concave. Cette concavité sera conservée ensuite,

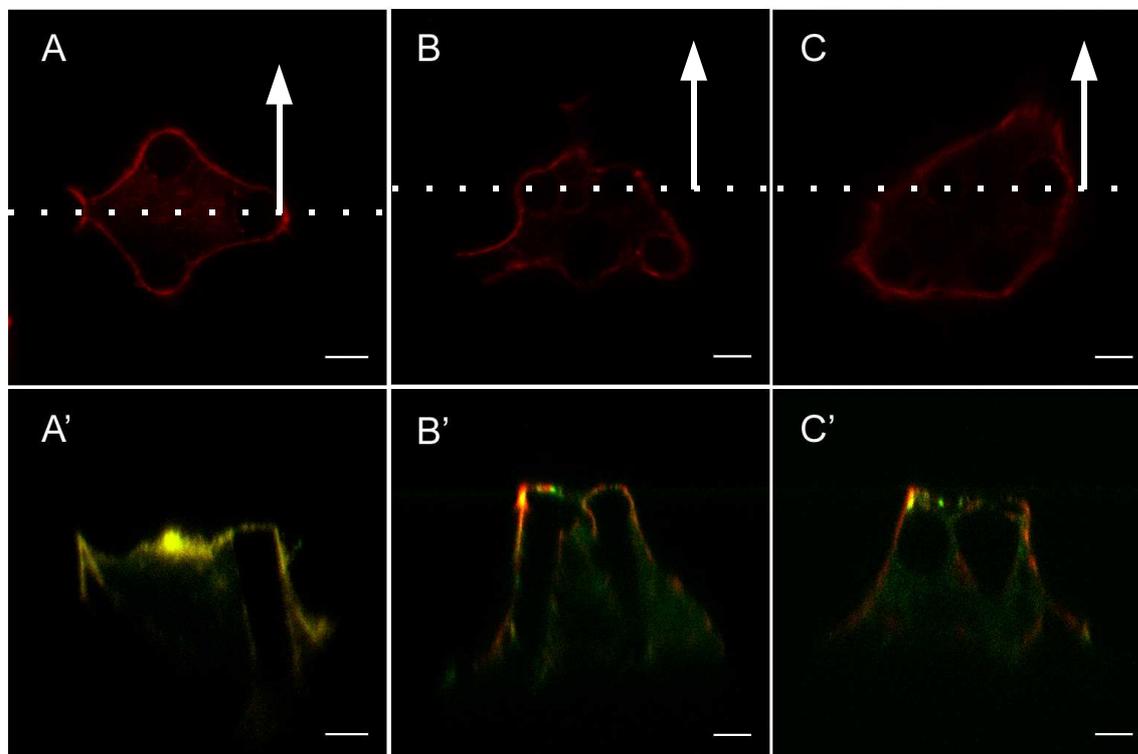


FIGURE 9.2 – Vues du dessus (**A**, **B**, **C**) et coupes selon l'axe représenté (**A'**, **B'**, **C'**) pour des cellules fixées à différents temps : 15 min (**A** et **A'**), 1 h (**B** et **B'**) et 2 h (**C** et **C'**). L'actine apparaît en rouge, la paxilline en vert. Barre = 5 μm

comme on peut le voir sur les images **B** et **C** de la même figure, et n'a pas de point de comparaison avec une morphologie cellulaire sur substrat plan. Tant que $t < 1$ h, les cellules sont suspendues entre les plots, puis la cellule adhère au socle des plots. Le mécanisme d'étalement des cellules est donc le suivant :

- dès que la cellule touche les plots, elle va s'ancrer à 2 ou 3 plots (en moins de 2 min). L'aire de la cellule dans le plan d'observation, une fois ancrée aux plots, ne changera pas jusqu'à ce que la cellule atteigne le socle des plots. L'étalement va donc être principalement vertical et nous ne pourrons pas voir si, comme sur un substrat plan, l'aire varie en loi de puissance (Dobereiner *et al.*, 2004) ;
- la cellule occupe l'espace inter-plots. Le noyau pénètre entre les plots et la cellule adhère le long des plots. On note la présence de complexes focaux sur le haut des plots, mais également sur la surface latérale. Si on peut signaler l'absence de fibres de stress visibles dans le cytoplasme (voir images **A**, **B** et **C** de la figure 9.2), on trouve sur le pourtour cellulaire un câble d'actine enserrant les plots. On retrouve ce signal d'actine sur toute la longueur des plots occupée par la cellule. Par ailleurs, les adhésions focales sont également

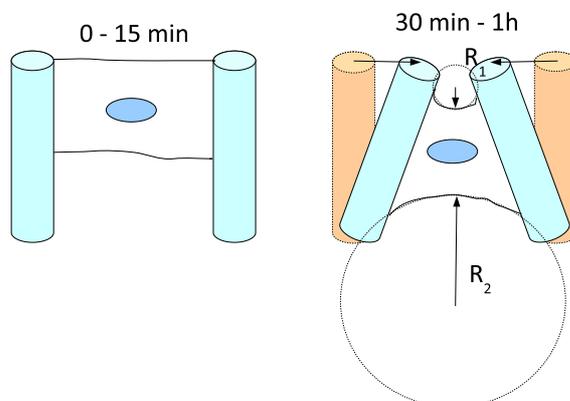


FIGURE 9.3 – Cellule entre deux plots dans deux configurations caractéristiques : Dans les 15 premières minutes (gauche) et à partir de 30 minutes. On peut noter que le rayon de courbure R_1 est inférieur à R_2 , l'écart s'accroissant au cours du temps.

- localisées en majorité sur l'extérieur des plots. On a donc une nappe d'actine qui enserre les plots, auxquels elle est liée par le biais d'adhésions focales ;
- la cellule, en adhérant entre les plots, exerce des tensions en formant des adhésions focales (dès $t = 30$ min). On les trouve à la fois sur le haut et sur les surfaces latérales des plots. Au cours du temps, alors que la surface d'adhésion le long des plots augmente, le rayon de courbure¹ de la cellule dans le plan (xOz) lui diminue, celui du haut de la cellule étant plus toujours inférieur à celui du bas (voir figure 9.3) ;
 - au bout d'environ 1h, la cellule adhère au socle du substrat, et occupe à la fois l'espace inter-plots en s'étalant entre les plots et toute la longueur des plots (voir image **C'** de la figure 9.2). Sur le socle du substrat elle va former des complexes focaux ressemblant à ceux observés sur un substrat rigide et plan, ce qui constitue une des limites à notre modèle approchant le 3D.

Tant que les cellules sont suspendues entre les plots, on a donc des surfaces adhésives (les plots) séparées par un espace non adhésif (l'espace inter-plots).

On retrouve en fait un patron utilisé par Théry *et al.* (2006). En effet, tout comme dans cette étude, nous avons des zones d'adhésion séparées par des zones non adhésives (ici les cellules sont suspendues entre les plots). On observe alors un renforcement de l'actine en suspension entre les plots, comme on peut le constater déjà sur l'image **A** de la figure 9.2, et encore mieux sur l'image **B** de la même figure. Ce renforcement de l'adhésion peut être couplé à la déflexion des plots que l'on observe dès le début de l'étalement (voir image **A'** de la figure 9.1, plot de droite).

1. la cellule présente deux surfaces libres d'adhésion, visibles par exemple sur les images **B'** et **C'** de la figure 9.1. On peut déterminer les rayons de courbure de ces surfaces

Nous avons souhaité ensuite évaluer la dynamique des cellules lorsqu'elles pénètrent dans les plots, en étudiant le déplacement des plots au cours de l'étalement. En utilisant des REF52, qui expriment de façon stable la paxilline-YFP, nous avons observé en même temps la formation des adhésions focales.

9.3 Analyse temporelle de l'étalement cellulaire

Lors de l'étalement cellulaire sur un substrat à deux dimensions, la cellule se comporte de la façon suivante : tout d'abord, elle teste si les propriétés physico-chimiques de la matrice extra-cellulaire sont favorables à l'étalement, par petites touches (Pierres *et al.*, 2008). Dans l'affirmative, elle s'étale largement. Enfin, en exerçant des forces périodiques, elle teste l'élasticité de son substrat. S'il est suffisamment rigide, elle poursuit son étalement jusqu'à atteindre une aire maximale (Dobereiner *et al.*, 2005). Pour étudier la dynamique de l'étalement cellulaire dans les plots, nous avons tamponné au préalable le haut des plots avec de la fibronectine fluorescente puis recouvert de fibronectine non marquée (figure 9.4, gauche). Cela nous a permis de suivre le déplacement des plots au cours du temps, à l'aide du logiciel présenté dans la partie 7.1.

Nous avons ensuite réalisé un contrôle, où nous avons diminué la surface adhésive disponible pour les cellules. Après avoir tamponné les plots comme précédemment avec de la fibronectine fluorescente, nous les avons immergés dans du PEG. Les plots avaient été traités préalablement, comme décrit dans la partie 4.3, pour permettre la liaison du PEG avec le PDMS. On obtient alors des plots où les cellules ne peuvent adhérer que sur le sommet.

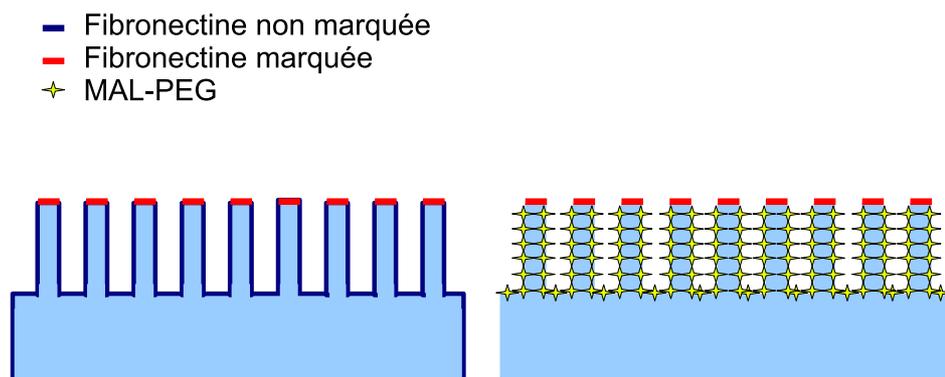


FIGURE 9.4 – A gauche : plots entièrement recouverts de fibronectine, le haut étant fluorescent. A droite : plots dont le haut a été tamponné avec de la fibronectine fluorescente, les surfaces inter-plots étant recouvertes de PEG.

La mesure des déplacements des plots a été réalisée à l'aide du programme mis au point au laboratoire, décrit partie 7.1. Les plots ont tout d'abord été utilisés pour

mesurer des forces lorsque des cellules adhéraient uniquement sur le haut des plots (Saez, 2006). Dans ce travail, les plots mesuraient 1 à 2 μm de diamètre, étaient espacés également de 1 à 2 μm et ne dépassaient pas 7 μm de haut. Ici, les plots font 5 μm de diamètre, sont espacés de 4 à 12 μm et font 20 μm de haut. Malgré la différence de dimensions, les raideurs sont similaires, et les cellules peuvent les défléchir dans les deux cas. Le programme peut donc être utilisé pour analyser le déplacement des plots lors de l'étalement cellulaire. Il faut néanmoins faire attention au nombre de plots disponibles dans la fenêtre d'analyse. En effet s'il y en a trop peu, la régression linéaire nécessaire pour déterminer la position des plots au repos ne sera pas réalisable.

9.3.1 Substrats texturés adhésifs

Comportement des plots Lors de ces expériences, nous avons lancé l'acquisition d'images immédiatement après le dépôt des cellules. Cependant, le temps entre le dépôt des cellules et le lancement de l'acquisition varie : les cellules ne se déposent pas toutes au même rythme, et le temps de réglage peut varier légèrement d'une expérience à l'autre. Les expériences lancées sur des cellules à peine déposées (ou qui se sont déposées en cours d'expérience) montrent que dès que les cellules touchent les plots, elles les défléchissent.

Nous avons commencé par regarder l'étalement sur des substrats (20-5-4). La déflexion augmente au cours du temps, pour atteindre une valeur de l'ordre de 3 à 4 μm (voir figure 9.5). L'espacement étant de 4 μm , on peut se demander si cette saturation n'est pas due à l'espacement inter-plots, et donc si la force n'est pas sous-évaluée.

Pour contrôler que l'espacement inter-plots n'est pas un obstacle au déplacement, nous avons utilisé également des plots de type (20-5-10). On renouvelle les expériences d'étalement cellulaire réalisées avec des plots (20-5-4). Dans ces nouvelles conditions, le déplacement maximal mesuré est compris généralement entre 3 et 4 μm , et n'atteint 6 μm que rarement. La saturation observée avec les plots (20-5-4) n'est donc pas due à l'espacement inter-plots, mais bien à un autre phénomène (intrinsèque à la cellule ou dû à la raideur des plots). Les plots situés au centre de la cellule ne sont pour leur part que très peu défléchis, même lorsque les cellules sont uniquement sur le haut des plots, les forces étant exercées en majorité au niveau du pourtour de la cellule (du Roure *et al.*, 2005; Saez, 2006).

L'analyse des résultats nous montre une croissance rapide puis une saturation du déplacement pour tous les espacements de plots. Nous avons donc supposé que le déplacement d'un plot D s'écrit $D = D_{seuil}(1 - e^{-\frac{t-t_0}{\tau}})$ où D_{seuil} représente la valeur que ne dépassera pas D , t_0 l'instant à partir duquel la cellule défléchit le plot et τ un temps caractéristique qui détermine le temps nécessaire pour atteindre D_{seuil} . Nous avons voulu comparer les valeurs des paramètres D_{seuil} et τ pour les plots (20-5-4) et (20-5-10). Pour cela, nous avons calculé les moyennes des deux paramètres pour

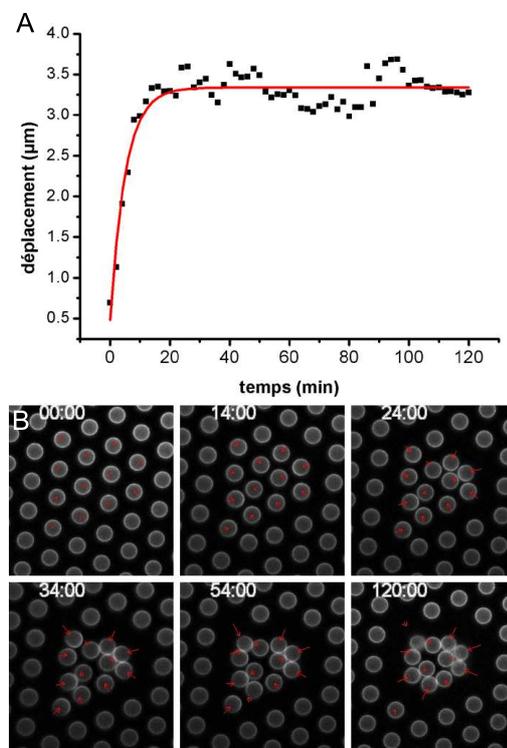


FIGURE 9.5 – **A** : déplacement au cours du temps du sommet d’un plot extérieur dans la géométrie (20-5-4). On atteint un seuil de l’ordre de $3,5 \mu\text{m}$. **B** : Déflexions des plots au cours du temps. À la fin, les plots semblent se toucher.

chaque type de substrat. Malgré une grande hétérogénéité dans les valeurs comme le témoigne les barres d’erreur sur la figure 9.8, on ne note pas de différence entre les deux substrats. L’espace inter-plot ne semble donc pas être limitant dans la dynamique cellulaire.

L’actine observée autour des plots contracte donc les plots. Ce phénomène de contraction du cytosquelette est généralement associé à des adhésions sur le support, qui servent d’ancrage aux filaments d’actine. Quelle est la dynamique des adhésions focales ?

Dynamique des adhésions focales Pour étudier la dynamique des adhésions focales, nous avons acquis séquentiellement le signal émis par la paxilline-YFP en trois positions : le haut, le milieu et le bas des plots, à chaque instant. On peut alors déterminer à quelle vitesse la cellule descend entre les plots. La paxilline apparaît en $z = 10 \mu\text{m}$ (au milieu des plots) au bout de 15 min et en $z = 0 \mu\text{m}$ (au niveau du socle) au bout de 30 min. On peut donc estimer que la cellule pénètre dans les plots à $v \sim 6 \mu\text{m}/\text{min}$. Par ailleurs, si on compare cellule par cellule, on remarque que le temps de descente entre les plots est du même ordre que τ , le temps caractéristique

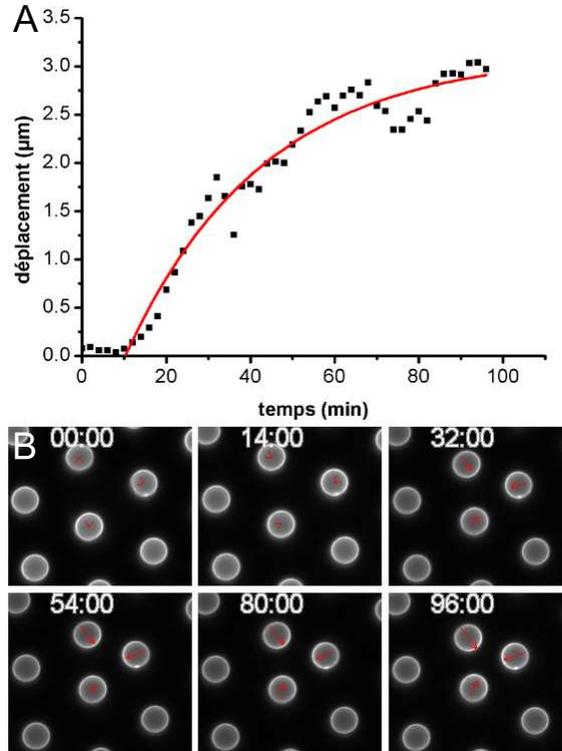


FIGURE 9.6 – **A** : déplacement au cours du temps du sommet d'un plot extérieur dans la géométrie (20-5-10). On atteint un seuil de l'ordre de $3,5 \mu\text{m}$. **B** : Déflexions des plots au cours du temps. À la fin, les plots ne se touchent pas.

qui apparaît dans la relation $D = D_{seuil}(1 - e^{-\frac{t-t_0}{\tau}})$. La déflexion des plots dépend du temps d'étalement et d'une longueur seuil, de l'ordre de $3 \mu\text{m}$.

Influence de la déflexion d'un plot sur un plot voisin

Étant donné que notre système de plots est organisé en un réseau de plots régulièrement espacés, nous avons voulu vérifier que la déflexion d'un plot était bien indépendante de celle de ces voisins, notamment dans le cas de l'étalement, et aussi que les déformations du socle étaient négligeables. Pour cela, nous avons créé un ensemble de cinq plots disposés de façon hexagonale, espacés de $S = 5 \mu\text{m}$, soit quasiment l'espacement minimal que nous avons employé (voir figure 9.10). On a donc un sous-réseau de plots (20-5-5). Nous avons exercé des forces entre 1 et 91 nN sur les sommets des quatre plots extérieurs. Nous avons étudié le déplacement du socle selon z en se déplaçant le long d'une des diagonales (ceci est suffisant car le modèle est symétrique). On constate alors que, lors du déplacement des plots les plus extérieurs, l'influence à proximité du plot central est négligeable. En effet, même lorsqu'on exerce sur chaque plot une force de 91 nN, ce qui correspond à ce que

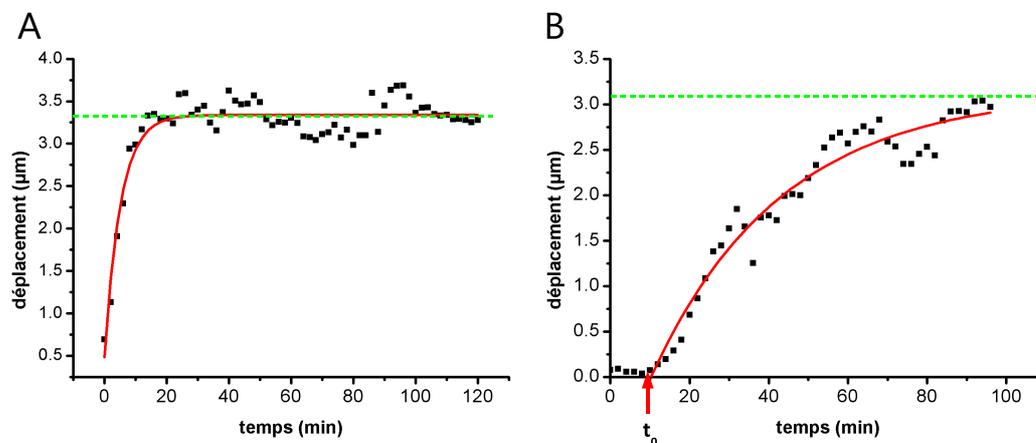


FIGURE 9.7 – **A** : Exemple typique d'un plot extérieur de (20-5-4) défléchi. On note le seuil légèrement en dessous de $4 \mu\text{m}$, l'espace interplots. **B** : Exemple d'un plot de (20-5-10) défléchi. t_0 désigne le temps à partir duquel la cellule défléchi le plot. Dans les deux cas, on peut modéliser la relation déplacement - temps par $D = D_{seuil}(1 - e^{-\frac{t-t_0}{\tau}})$, la valeur D_{seuil} étant représentée en vert.

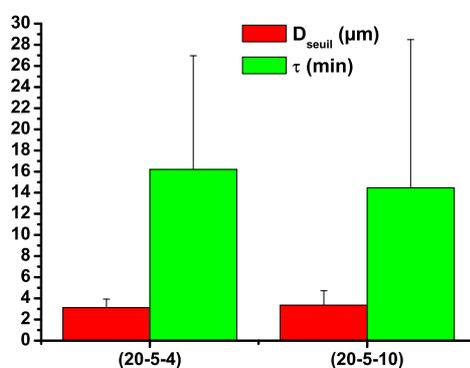


FIGURE 9.8 – Valeurs de D_{seuil} et τ pour deux espacements de plots

les plots touchent le plot central, le déplacement du socle au niveau du plot central n'est que de quelques nm.

Nous pouvons donc considérer les plots comme étant indépendants les uns des autres et que la déformation du socle reste négligeable lorsqu'on exerce une force sur un des plots.

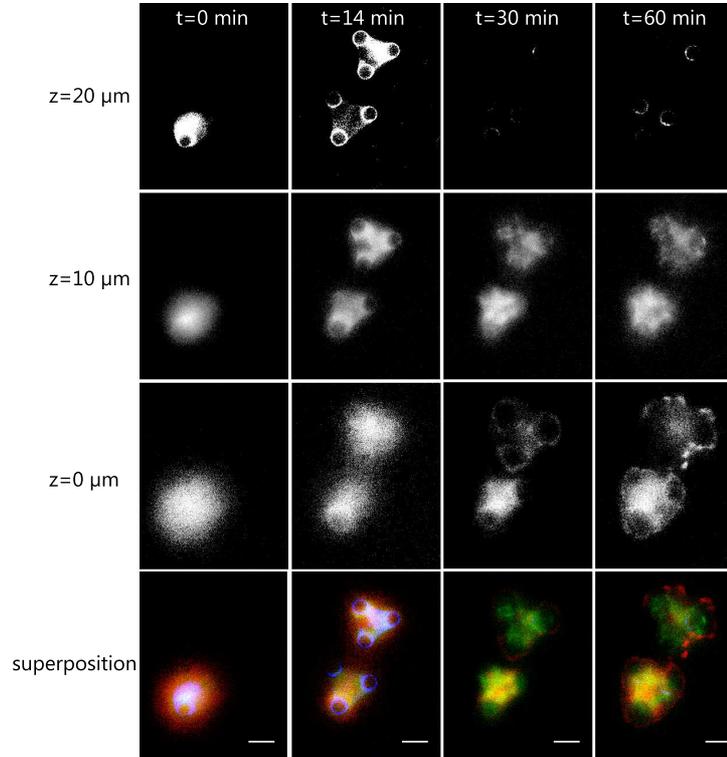


FIGURE 9.9 – Etalement d’une, puis de deux cellules sur des plots (20-5-10). En fausses couleurs sont représentées les adhésions focales sur le haut (bleu), au milieu (vert) et en bas (rouge) des plots. Barre = 10 μm

Détermination des forces à partir du déplacement

Une fois que l’on connaît les déplacements, il faut remonter aux forces. Contrairement à la partie 7, les cellules n’exercent pas des forces uniquement sur le haut des plots. Lorsqu’elles s’étalent le long des plots, des adhésions focales apparaissent sur la surface latérale, signe d’une tension. On ne peut donc pas utiliser la formule $F = k\Delta x$, vue partie 2.1.1 car k varie selon z . Il faut définir où s’applique la force et la recalculer en fonction du déplacement. La géométrie adoptée est représentée sur la figure 9.11.

Nous avons supposé que la densité de force (force par unité de longueur) était constante le long de la surface d’actine. Les lois de l’élasticité donnent :

$$\frac{d^2x}{dz^2} = -\frac{\mathcal{M}(z)}{EI} \quad (9.1)$$

où z correspond à la hauteur et x au déplacement. Le socle est fixe, on a donc $x(0) = 0$

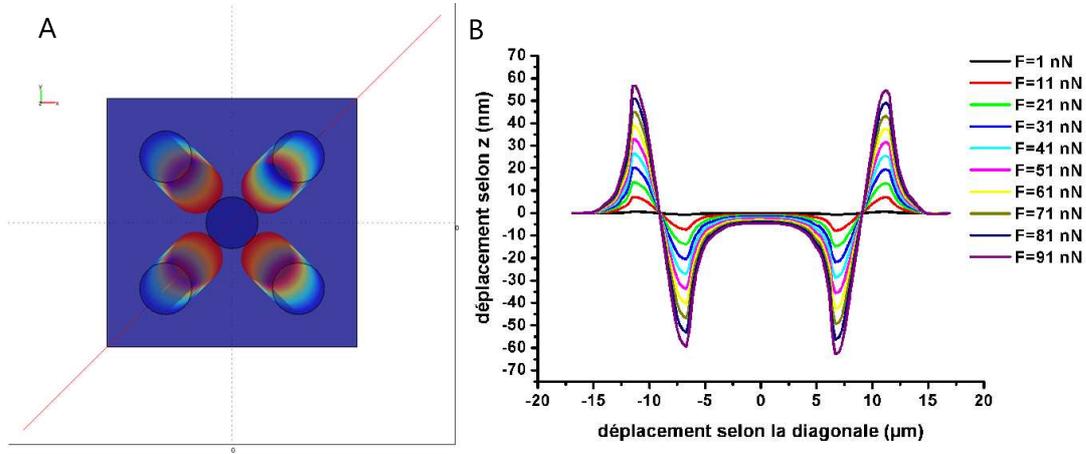


FIGURE 9.10 – Déplacements du plan $z = 0$ (jonction socle-plots) selon la diagonale représentée sur **A**, en fonction de la force exercée. Le plot qui est centré en 0 ne bouge pas, tandis qu'on exerce une force centripète sur ceux situés de part et d'autre. Ils font tous $5 \mu\text{m}$ de diamètre.

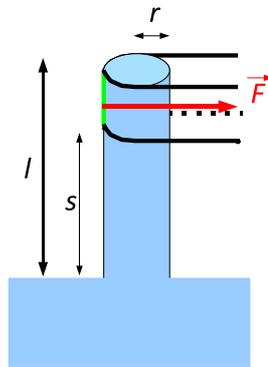


FIGURE 9.11 – Définition des paramètres du modèle. On considère un plot de hauteur l et de rayon r entouré par une nappe de membrane cellulaire sur une hauteur $l - s$. Sur la longueur $l - s$ s'exerce une force \vec{F} perpendiculaire à l'axe du plot.

et $\frac{dx}{dz}(0) = 0$ Le moment des forces s'exerçant sur le plot est défini par

$$\vec{\mathcal{M}} = \int_{\text{plot}} |\overrightarrow{df(z')} \wedge \overrightarrow{OM}| \quad (9.2)$$

La force étant selon (Ox), on ne va considérer que la composante selon z du vecteur \overrightarrow{OM} , $z - z'$. On définit la densité de force par $df(z') = \mathcal{H}(z) f_0 dz$ où \mathcal{H} est la fonction

de Heaviside. La force ici est nulle pour $z < s$. On a donc

$$\mathcal{M}(z) = \int_0^l \mathcal{H}(z' - s)(z - z')f_0 dz' \quad (9.3)$$

En remplaçant la fonction de Heaviside, on obtient :

$$\mathcal{M}(z) = f_0 \int_s^l (z - z') dz' \quad (9.4)$$

Après intégration, on obtient :

$$\mathcal{M}(z) = -\frac{f_0}{2}(l - s)(l + s - 2z) \quad (9.5)$$

Or on a $F = f_0(l - s)$. D'où

$$\mathcal{M}(z) = -\frac{F(l + s - 2z)}{2} \quad (9.6)$$

On peut alors calculer $\frac{dx}{dz} = \frac{1}{EI} \int_0^z \frac{F(l+s-2z')}{2} dz'$, puis à nouveau intégrer $\frac{dx}{dz}$ entre 0 et z .

On obtient alors :

$$x(z) = \frac{F(3(l + s)z^2 - 2z^3)}{12EI} \quad (9.7)$$

Le déplacement mesuré est en fait $x(l)$. Sachant que $I = \frac{\pi r^4}{4}$, r étant le rayon du plot, la force correspondante est donc :

$$F = 3\pi E \frac{r^4}{l^2(l + 3s)} \Delta x \quad (9.8)$$

On peut vérifier que si on se place à $s = l$, on retrouve bien la formule précédente : $F = \frac{3}{4}\pi E \frac{r^4}{l^3} \Delta x$

On peut alors supposer que l'étalement se fait à vitesse constante, jusqu'à ce que $s = 0$. On a alors $l - s = vt$ où $v \simeq 2 \mu\text{m}/\text{min}$, vitesse de polymérisation de l'actine tant que $s > 0$. Ensuite, on considère que $s = 0$. Le déplacement quant à lui peut être modélisé par $\Delta x = D_{seuil}(1 - e^{-\frac{t}{\tau}})$. On prend comme paramètre $D_{seuil} = 14 \mu\text{m}$ et $\tau = 3 \text{ min}$. La force au cours du temps est représentée sur la figure 9.12.

Etalement symétrique et forces

Lors de l'étalement, les déplacements des plots par les cellules se produisent de façon symétrique (voir figure 9.13). On a donc $\sum \Delta \vec{x}_i = \vec{0}$. Or on a observé sur les images de microscopie confocale (figure 8.11) que les cellules adhèrent le long des plots de façon isotrope. La raideur d'un plot, même si elle varie en fonction de la proportion de sa surface latérale en contact avec la cellule, peut donc être considérée

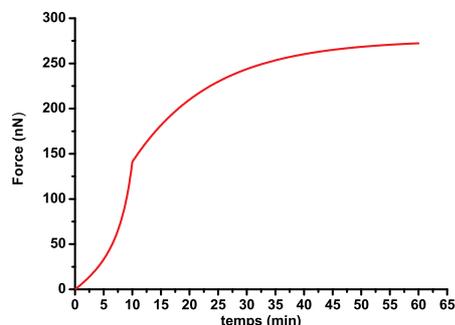


FIGURE 9.12 – Force au cours du temps, lors de l'étalement le long des plots. La singularité est due au changement de régime entre la force lors de l'étalement le long du plot et la force une fois que la cellule exerce une force sur toute la longueur du plot

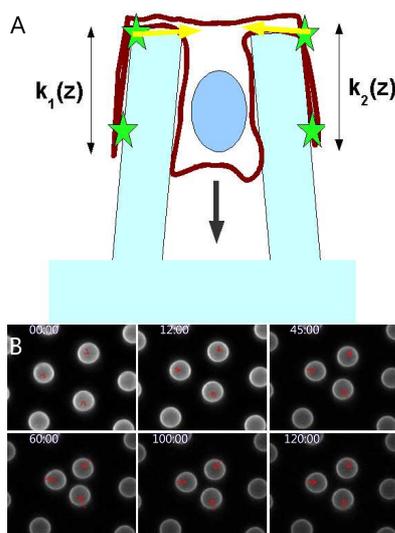


FIGURE 9.13 – **A** : Schématisation d'une cellule suspendue entre deux plots. La raideur effective de chaque plot dépend de l'étalement de la cellule sur la surface latérale des plots et des complexes d'adhésion (en vert) qui y sont associés ; **B** : Exemple de contraction des plots isotropes. La cellule se situe entre les plots et les déplacements des plots sont égaux à tout instant. Les plots mesurent 5 μm de diamètre

comme égale pour tous les plots. On a donc $k_i(t) = k(t), \forall t$. La somme des forces s'écrit donc $\sum \vec{F}_i = \sum k_i(t) \Delta \vec{x}_i = k(t) \sum \Delta \vec{x}_i = \vec{0}$

On suppose donc que $\sum \vec{F}_i = \vec{0}$ lors de l'étalement, même sur une surface texturée élastique. Ceci est cohérent car on considère que les cellules sont des systèmes isolés sur lesquels ne s'exercent pas de forces.

9.3.2 Contrôles

Rôle de la myosine-II dans l'étalement cellulaire

La myosine-II est responsable de près de 90% des forces de traction que la cellule exerce sur son environnement. Nous avons donc inhibé la myosine-II à l'aide de blebbistatine, qui est un inhibiteur spécifique de cette myosine. Pour cela, nous avons ajouté $75 \mu\text{M}$ de blebbistatine au milieu de culture. A cause de la phototoxicité de la molécule en dessous de 488 nm (Kolega, 2004), nous n'avons imagé que les plots (marqués à la Cy3, rouge), et pas les cellules (dont la paxilline est marquée avec de l'YFP). Nous avons analysé comme précédemment le mouvement des plots. Cette fois-ci, les plots, défléchis préalablement par les cellules, ont été relâchés, mais pas jusqu'à un déplacement nul. Cette différence peut être due à la présence d'autres myosines que la myosine-II, qui permettraient une contractilité cellulaire résiduelle. Le relâchement est très rapide : en 2 minutes, la déflexion diminue de près de 40%. Le plot va continuer à relaxer, jusqu'à environ 30 min post blebbistatine où le déplacement vaut encore 30-40% du déplacement initial. Ceci peut être dû à d'autres myosines, car même à une concentration plus forte, on n'obtient jamais une relaxation totale. C'est donc bien la myosine-II qui est majoritairement responsable

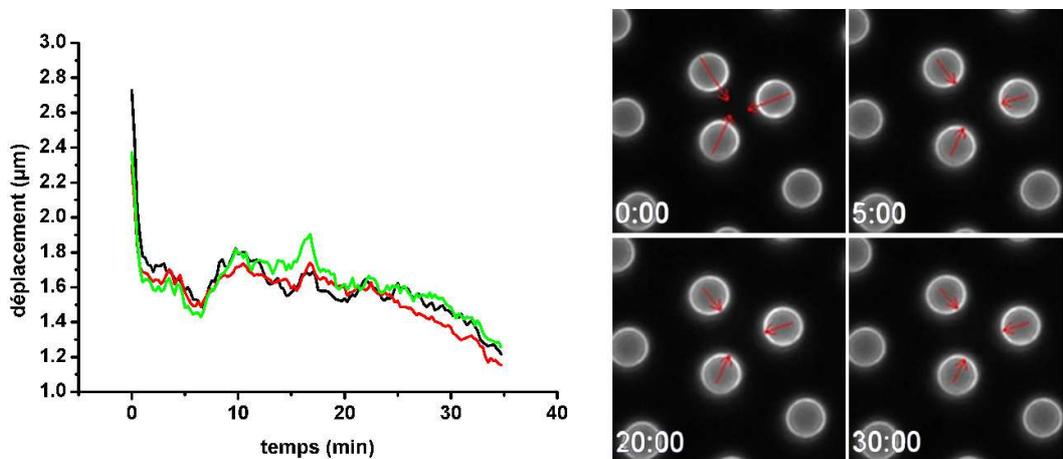


FIGURE 9.14 – Relaxation de plots lors de l'ajout de blebbistatine et plots correspondants à différents instants

de la déformation du substrat.

Influence des propriétés adhésives du substrat

Pour déterminer quelle est l'influence de l'étalement selon z sur le comportement cellulaire, nous avons voulu rendre les surfaces latérales des plots non adhésives. Comme écrit plus haut (figure 9.4, droite), nous avons utilisé du PEG. Nous en

avons testé deux, du PEG-polylysine ou PLL-PEG et du PEG-maleimide (PEG-MAL). Nous avons retenu le PEG-MAL, car on peut le lier de façon covalente au PDMS après avoir traité la surface de PDMS avec un silane qui va se lier à la fois au PDMS et à la fois au PEG. Le PLL-PEG, plus simple d'utilisation, ne se lie que de façon électrostatique avec le PDMS. Ceci a un inconvénient rédhibitoire pour son emploi dans ce contrôle : les protéines présentes dans le milieu de culture entrent en compétition avec le PLL-PEG et la surface est rendue adhésive, et alors les cellules entrent dans les plots.

Une fois déposées sur le substrat traité au PEG-MAL, les cellules ne peuvent alors que rester suspendues sur haut des plots, sans possibilité de pénétrer et d'adhérer entre eux. Nous avons, tout comme dans le cas des plots entièrement recouverts de fibronectine, acquis la position des plots au cours du temps. On observe alors des déplacements très faibles, dont on ne peut dégager de tendance, les plots ayant de plus chacun un comportement différent. De plus, l'amplitude reste faible : en moyenne

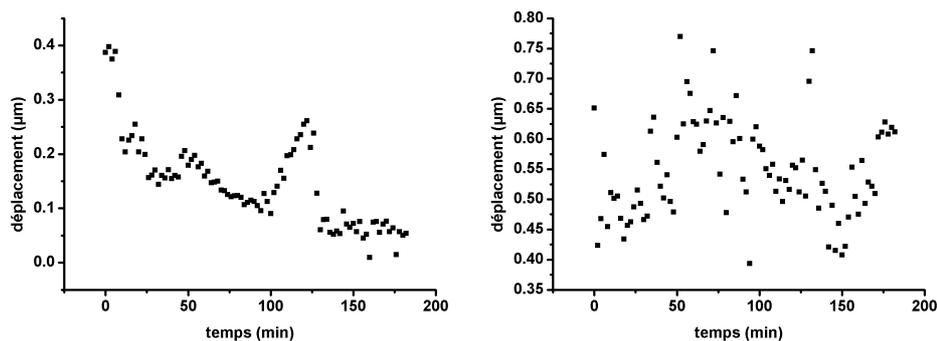


FIGURE 9.15 – Exemples de déplacement au cours du temps pour des plots tamponnés de fibronectine puis recouverts de PEG

0,23 μm , et ne dépassant pas 0,76 μm . On a donc un facteur au moins égal à 4 en amplitude entre le déplacement sur substrat entièrement recouvert de fibronectine et sur celui seulement partiellement accessible. Comme les cellules sont sur le haut des plots et que le déplacement est très faible, l'approximation linéaire $F = k\Delta x$, avec ici $k = 23 \text{ nN}/\mu\text{m}$, permet de déterminer la force. On a donc $F_{moy} \sim 5 \text{ nN}$ et $F_{max} \sim 17,5 \text{ nN}$. Si on compare avec les forces mesurées lorsque toute la longueur des plots est traitée à la fibronectine, on constate que les forces sur substrat traité au PEG sont près de 20 fois plus faibles que celles déterminées sur les substrats entièrement adhésifs (les forces maximales atteignent 250 nN lorsque l'ensemble du plot est recouvert par la cellule). Ceci est en accord avec l'étude de Tan *et al.* (2003), qui montre que sans étalement les cellules exercent des forces moindres, voire pas de force sur leur substrat. Lors de ces expériences, les cellules ne s'étaient que très peu. Le signal de la paxilline-YFP reste alors très bruité, sans que l'on puisse visualiser

les contacts focaux voir figure 9.16.

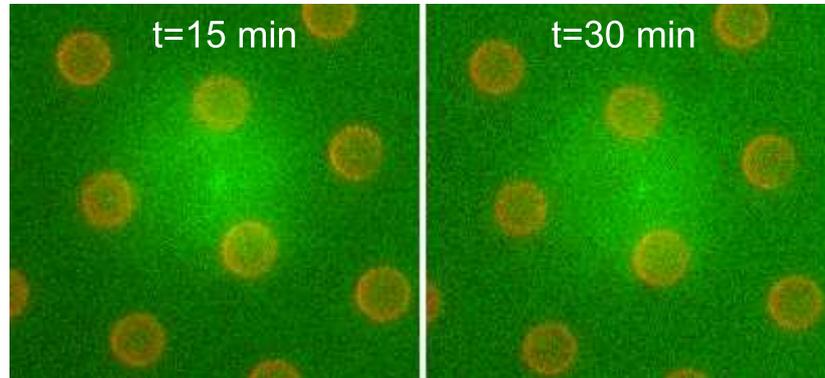


FIGURE 9.16 – Cellule REF52 exprimant la paxilline-YFP sur des plots (20-5-10) dont le haut a été tamponné avec de la fibronectine fluorescente (rouge)

9.4 Conclusion : proposition de modèle d'étalement

En guise d'ouverture et de conclusion de cette partie, nous allons proposer un modèle préliminaire d'étalement dans des plots, basé sur nos mesures. Tout d'abord, la cellule entre en contact avec les plots (**A**), commence à adhérer et à exercer des forces sur les bords des plots, le long de câbles d'actine qui entourent le sommet des plots (**B**). Dans le même temps, le cytoplasme et le noyau pénètrent entre les plots. La membrane cellulaire descend le long des plots, aussi bien dans l'espace interplots que sur le pourtour (**C**). L'actine enveloppe les plots et continue de se contracter. A cause de la contraction acto-myosine, la membrane cellulaire, qui était auparavant convexe, devient concave, aussi bien dans le plan (xy) que dans le plan (xz). Des adhésions se forment sur le pourtour des plots. Le corps cellulaire ainsi que la membrane continuent de descendre entre les plots et autour des plots. La concavité de la membrane s'accroît (**D**). Elle reste plus importante sur le haut des plots que proche de la surface.

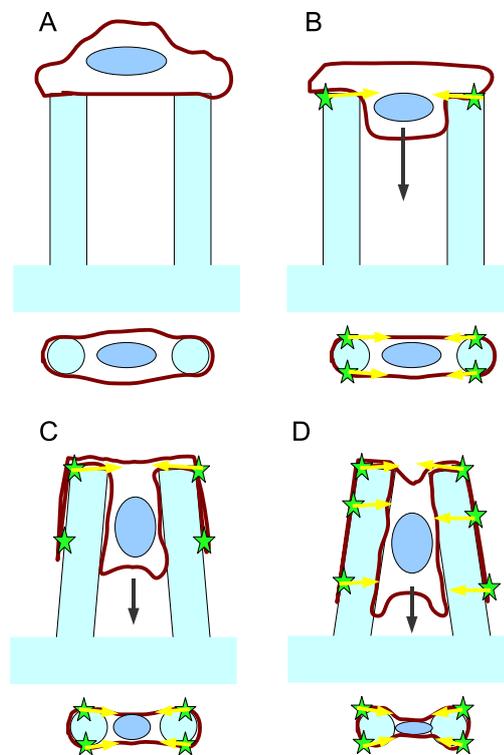


FIGURE 9.17 – Evolution d’une cellule dans un environnement de plots souples, recouverts de fibronectine vu en coupe.

Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'influence des propriétés physiques et mécaniques de l'environnement cellulaire sur certaines fonctions cellulaires comme l'adhésion et la migration. Nous avons pu montrer que l'utilisation des techniques de microfabrication constituait un outil de choix pour déterminer comment la topographie et la rigidité de la matrice extra-cellulaire modifiaient les conditions d'adhésion des cellules.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un substrat dense de micropiliers déformables pour étudier les forces générées par les cellules en fonction de la rigidité du substrat. Pour quantifier ce phénomène et caractériser la dépendance des forces avec la rigidité du substrat, nous avons fait varier la raideur des piliers (en modifiant leurs hauteur et diamètre). Lors d'une étude précédente, il avait été montré que sur une gamme de rigidités s'étendant de 1 à 100 nN/ μm , les forces moyennes (de 0,1 à 10 nN) exercées par des îlots de cellules épithéliales sur le substrat croissaient linéairement avec la raideur. Au cours de mon travail, j'ai d'une part étendu cette étude à une gamme plus large de raideurs (jusqu'à 200 nN/ μm) pour montrer que ces forces atteignaient un plateau pour les piliers les plus raides et d'autre part, j'ai pu démontrer que ce comportement mécanique pouvait se généraliser à d'autres types cellulaires comme des fibroblastes. En d'autres termes, pour les deux types cellulaires étudiés, on passe d'un régime « substrat mou » où la déformation des piliers est constante (~ 100 et 160 nm en moyenne pour les fibroblastes et les cellules épithéliales) à un régime « substrat dur » où la force est constante et s'établit à environ 10-20 nN selon le type cellulaire. On a également observé que la taille des complexes d'adhésion était affectée par la raideur du substrat avec un renforcement des contacts cellulaires sur des substrats plus rigides. Ces résultats indiquent que la réponse cellulaire peut se traduire par l'existence d'une taille caractéristique intrinsèque (la pente du régime linéaire ? 100-200 nm), ou que les cellules sont capables de sonder activement la rigidité du substrat. Les modèles théoriques développées par Nicolas *et al.* (2006, 2008) montrent que la croissance des adhésions focales contrôlée par la contrainte peut induire une déformation du substrat proportionnelle à l'élasticité de la matrice, ce qui pourrait expliquer nos résultats expérimentaux. On peut également mentionner la découverte récente (Sawada *et al.*, 2006) du rôle de mécano-senseur de p130Cas par extension de la protéine en réponse à une force externe induisant un processus de signalisation intracellulaire. L'extension de la protéine d'environ 200 nm est très

certainement une voie à explorer pour essayer de corrélérer nos résultats à un modèle moléculaire de la réponse cellulaire à la rigidité de l'environnement. Plusieurs pistes sont donc envisageables et la question du contrôle de l'activité mécanique cellulaire par la déformation ou la force reste donc une question ouverte. Dans ce contexte, nous nous sommes demandés si ces différences de forces exercées par les cellules en fonction de la rigidité locale sont suffisantes pour influencer sur l'adhésion et la migration des cellules individuelles. Les propriétés mécaniques (variations spatiales de rigidité par exemple) de la matrice extra cellulaire peuvent-elles guider la migration des cellules? Pour vérifier cette hypothèse, nous avons confectionné des surfaces présentant une anisotropie de rigidité. Les piliers sont ici de section elliptique et sont donc plus raides dans la direction de leur grand axe. Après avoir mis en évidence dans un travail précédent que la croissance de cellules épithéliales sur ce type de substrat se faisait selon la direction la plus rigide, nous avons pu montrer que des cellules individuelles comme des fibroblastes migraient et s'orientaient également selon l'axe de plus grande raideur.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé ces techniques de microfabrication pour étudier l'influence de la topographie du substrat sur la migration cellulaire. Les substrats sont alors constitués de micro-plots régulièrement espacés, ayant des tailles plus importantes que dans le cas précédent (diamètre $\sim 10 \mu\text{m}$) et des densités plus faibles. A ces échelles, le substrat n'est pas déformable mais les cellules se déforment afin de pouvoir migrer dans ces micro-structures. En faisant varier les propriétés géométriques de ce type d'environnement, nous avons pu mettre en évidence un certain nombre de caractéristiques de l'adhésion et de la migration cellulaires induites par la topographie du substrat. Tout d'abord, nous avons pu voir que la morphologie cellulaire, l'organisation du cytosquelette d'actine et des adhésions focales étaient fortement modifiées par rapport à ce que nous observions sur une surface plane. Ensuite, nous avons analysé sur des temps longs (10 heures) les trajectoires des cellules en fonction du type de substrat. Cela nous a permis de montrer que le mouvement pouvait être décomposé en différentes phases : une première phase traduisant un mouvement persistant jusqu'à $T \sim 100-400$ min (en fonction du substrat) et une seconde phase diffusive. La variation du temps T de « *cross-over* » entre ces deux régimes dépend fortement de la topographie du substrat et il augmente fortement sur un substrat micro-texturé par rapport à une surface plane. L'augmentation du temps de persistance avec la topographie peut s'expliquer par les contraintes spatiales imposées par le substrat qui guident le mouvement cellulaire, les cellules utilisant préférentiellement la surface des plots comme points d'ancrage. Nous avons pu confirmer cette hypothèse en montrant que sur un substrat de micropiliers, les adhésions focales se formaient majoritairement sur ou le long des micropiliers et surtout leur temps de vie était beaucoup plus important lorsqu'elles étaient localisées au niveau des plots que sur une surface plane. Il apparaît donc que la réponse cellulaire à la topographie présente certaines similarités avec la réponse à la rigidité puisque dans les deux cas, la dynamique des adhésions focales est modifiée et que la stabilité

des zones de contact augmente aussi bien avec la rigidité (Pelham Jr et Wang, 1997) qu'avec la topographie.

L'une des motivations premières de cette étude était de tenter de guider la migration cellulaire en modifiant la topographie et en utilisant des gradients micro-texturés. C'est donc tout naturellement que nous nous sommes intéressés au mécanisme de migration à la frontière entre une surface plane et un réseau de micropiliers. En effectuant des mesures sur les flux cellulaires à la frontière, nous n'avons pu mettre clairement en évidence un effet de « topotaxie », comme cela avait été fait pour la rigidité (« durotaxie », Lo *et al.* (2000)). Cependant, nous avons pu montrer que l'espacement entre les plots jouait un rôle crucial dans ce mécanisme de transmigration : 80% des cellules venant de la partie plane du substrat migrent vers le substrat de micropiliers pour un espacement inter-plots de 6 μm alors que ce nombre tombe à 20% pour un espacement de 4 μm ! Les expériences que nous avons effectuées en rigidifiant le noyau cellulaire indiquent que les déformations du noyau jouent un rôle clé dans la transmigration à travers un réseau d'obstacles et que cette distance critique (5 μm) au-delà de laquelle les cellules peuvent pénétrer au sein du substrat de micro-piliers se trouve modifiée si la membrane nucléaire est plus rigide. L'ensemble de ces résultats montre que l'utilisation de substrats micro-fabriqués aux propriétés géométriques et physico-chimiques bien contrôlées constitue un outil de choix pour étudier l'adhésion et la migration cellulaires dans un environnement qui n'est pas purement bidimensionnel et pour proposer des pistes d'étude afin de comprendre les mécanismes de migration cellulaire tridimensionnelle.

Enfin, la dernière partie de ce manuscrit combine des effets de rigidité et de topographie. Elle concerne l'étude de l'étalement cellulaire au sein d'un substrat micro-texturé et déformable. Bien que les résultats soient encore préliminaires, nous avons pu montrer que dans ce type d'environnement, la génération de forces allait de pair avec l'étalement cellulaire et l'extension de la membrane cellulaire. Une analyse ultérieure de la répartition de l'actine et des adhésions focales devrait nous permettre de proposer un modèle mécanique des processus de traction dans ce type d'environnement.

Il reste cependant de nombreuses pistes à explorer. Certaines sont déjà amorcées : l'étude de l'influence d'une discontinuité de rigidité sur la migration et l'adhésion cellulaire est réalisée par Léa Trichet, en couplant la mesure de forces avec la dynamique des adhésions focales.

Grâce aux micro-piliers magnétiques que Jimmy Le Digabel est en train de développer, pourraient être employés en tant qu'environnement texturé. L'environnement cellulaire pourrait être modifié de façon dynamique et mimer le remodelage de la matrice par les cellules.

Nous avons montré qu'en fonction de l'espacement des plots, les cellules provenant d'un substrat plan préféraient rester sur leur substrat ou au contraire pénétrer entre les plots. Il pourrait être intéressant, pour diriger la migration, de créer des substrats possédant des gradients d'espacement et ainsi de voir comment les cellules se

comportent vis à vis d'une modification au sein d'un substrat texturé.

Enfin, lors de l'étude de Ganz *et al.* (2006), il a été observé que les cellules, des C2, plongeaient entre les plots recouverts de fragments de cadhérine, alors même que les plots étaient similaires à ceux employés dans la partie 7. On pourrait s'interroger sur l'influence du traitement de surface sur la capacité des cellules à envahir l'environnement texturé.

Bibliographie

- B. ALBERTS, A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS et P. WALTER : *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 4ème éd., 2002.
- T. AUDESIRK et G. AUDESIRK : *Life on earth*. Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, 1998.
- N. Q. BALABAN, U. S. SCHWARZ, D. RIVELINE, P. GOICHBURG, G. TZUR, I. SABANAY, D. MAHALU, S. SAFRAN, A. BERSHADSKY, L. ADDADI et B. GEIGER : Force and focal adhesion assembly : a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature Cell Biology*, 3:466–472, 2001.
- K. A. BENINGO, M. DEMBO, I. KAVERINA, J. V. SMALL et Y.-L. WANG : Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol*, 153(4):881–8, 2001.
- I. B. BISCHOFPS et U. S. SCHWARZ : Cell organization in soft media due to active mechanosensing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(16):9274–9279, 2003.
- J. L. V. BROERS, F. C. S. RAMAEKERS, G. BONNE, R. B. YAOU et C. J. HUTCHISON : Nuclear lamins : Laminopathies and their role in premature ageing. *Physiological Reviews*, 86(3):967, 2006.
- C. S. CHEN, M. MRKSICH, S. HUANG, G. M. WHITESIDES et D. E. INGBER : Geometric Control of Cell Life and Death. *Science*, 276(5317):1425, 1997.
- C. H. CHOI, S. H. HAGVALL, B. M. WU, J. C. Y. DUNN, R. E. BEYGUI et C. J. KIM : Cell interaction with three-dimensional sharp-tip nanotopography. *Biomaterials*, 28(9):1672–1679, 2007.
- D. CHOQUET, D. P. FELSENFELD et M. P. SHEETZ : Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell*, 88(1):39–48, 1997.
- P. CLARK, P. CONNOLLY, A. S. G. CURTIS, J. A. T. DOW et C. D. W. WILKINSON : Topographical control of cell behaviour : I. simple step cues. *Development*, 99:439–448, 1987.

- P. CLARK, P. CONNOLLY, A. S. G. CURTIS, J. A. T. DOW et C. D. W. WILKINSON : Cell guidance by ultrafine topography in vitro. *Journal of Cell Science*, 99(1):73–77, 1991.
- S. CORNILLON, L. GEBBIE, M. BENGHEZAL, P. NAIR, S. KELLER, B. WEHRLE-HALLER, S. CHARETTE, F. BRUCKERT, F. LETOURNEUR et P. COSSON : An adhesion molecule in free-living Dictyostelium amoebae with integrin beta features. *EMBO Rep*, 7(6):617–621, 2006.
- E. CUKIERMAN, R. PANKOV, D. R. STEVENS et K. M. YAMADA : Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 294(5547):1708–12, 2001.
- A. S. CURTIS et M. VARDE : Control of cell behavior : topological factors. *J Natl Cancer Inst*, 33:15–26, 1964.
- K. N. DAHL, A. J. ENGLER, J. D. PAJEROWSKI et D. E. DISCHER : Power-law rheology of isolated nuclei with deformation mapping of nuclear substructures. *Biophys J*, 89(4):2855–2864, 2005.
- K. N. DAHL, P. SCAFFIDI, M. F. ISLAM, A. G. YODH, K. L. WILSON et T. MISTELI : Distinct structural and mechanical properties of the nuclear lamina in hutchinson-gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(27):10271, 2006.
- M. J. DALBY, S. CHILDS, M. O. RIEHLE, H. J. H. JOHNSTONE, S. AFFROSSMAN et A. S. G. CURTIS : Fibroblast reaction to island topography : changes in cytoskeleton and morphology with time. *Biomaterials*, 24(6):927–935, 2003.
- M. DEMBO et Y.-L. WANG : Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J*, 76(4):2307–2316, 1999.
- D. E. DISCHER, P. JANMEY et Y.-L. WANG : Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310(5751):1139–1143, 2005.
- H.-G. DOBEREINER, B. DUBIN-THALER, G. GIANNONE, H. S. XENIAS et M. P. SHEETZ : Dynamic phase transitions in cell spreading. *Phys Rev Lett*, 93(10):108105, 2004.
- H.-G. DOBEREINER, B. DUBIN-THALER, G. GIANNONE, H. S. XENIAS et M. P. SHEETZ : Force sensing and generation in cell phases : analyses of complex functions. *J Appl Physiol*, 98(4):1542–6, 2005.
- O. du ROURE, A. SAEZ, A. BUGUIN, R. H. AUSTIN, P. CHAVRIER, P. SILBERZAN et B. LADOUX : Force mapping in epithelial cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(7):2390–5, 2005.

- B. DUBIN-THALER, G. GIANNONE, H.-G. DOBEREINER et M. P. SHEETZ : Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. *Biophys J*, 86(3):1794–806, 2004.
- B. ECKES, D. DOGIC, E. COLUCCI-GUYON, N. WANG, A. MANIOTIS, D. INGBER, A. MERCKLING, F. LANGA, M. AUMAILLEY, A. DELOUVÉE, V. KOTELANSKY, C. BABINET et T. KRIEG : Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *Journal of Cell Science*, 111(13):1897–1907, 1998.
- A. J. ENGLER, S. SEN, H. L. SWEENEY et D. E. DISCHER : Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4):677–689, 2006.
- R. FOISNER : Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina. *Journal of Cell Science*, 114(21):3791–3792, 2001.
- M. T. FREY, I. Y. TSAI, T. P. RUSSELL, S. K. HANKS et Y.-L. WANG : Cellular responses to substrate topography : role of myosin II and focal adhesion kinase. *Biophys J*, 90(10):3774–82, 2006.
- P. FRIEDL : Prespecification and plasticity : shifting mechanisms of cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 16:14–23, 2004.
- P. FRIEDL et E. B. BROCKER : The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(1):41–64, 2000.
- A. GANZ, M. LAMBERT, A. SAEZ, P. SILBERZAN, A. BUGUIN, R. M. MEGE et B. LADOUX : Traction forces exerted through N-cadherin contacts. *Biol Cell*, 98(12):721–30, 2006.
- B. GEIGER, A. BERSHADSKY, R. PANKOV, K. M. YAMADA *et al.* : Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:793–805, 2001.
- G. GIANNONE, B. J. DUBIN-THALER, H.-G. DOBEREINER, N. KIEFFER, A. R. BRESNICK et M. P. SHEETZ : Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell*, 116(3):431–43, 2004.
- G. GIANNONE, B. J. DUBIN-THALER, O. ROSSIER, Y. CAI, O. CHAGA, G. JIANG, W. BEAVER, H.-G. DOBEREINER, Y. FREUND, G. BORISY et M. P. SHEETZ : Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell*, 128(3):561–75, 2007.
- L. G. GRIFFITH et M. A. SWARTZ : Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(3):211–24, 2006.

- A. K. HARRIS, D. STOPAK et P. WILD : Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature*, 290(5803):249–251, 1981.
- A. K. HARRIS, P. WILD et D. STOPAK : Silicone rubber substrata : a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science*, 208(4440):177–179, 1980.
- H. HERRMANN, H. BÄR, L. KREPLAK, S. V. STRELKOV et U. AEBI : Intermediate filaments : from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:562–573, 2007.
- D. ICARD-ARCIZET, O. CARDOSO, A. RICHERT et S. HENON : Cell stiffening in response to external stress is correlated to actin recruitment. *Biophys J*, 94(7):2906, 2008.
- A. KAJZAR, C. M. CESA, N. KIRCHGESSNER, B. HOFFMANN et R. MERKEL : Toward physiological conditions for cell analyses : forces of heart muscle cells suspended between elastic micropillars. *Biophys J*, 94(5):1854–66, 2008.
- J. KOLEGA : Phototoxicity and photoinactivation of blebbistatin in UV and visible light. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(3):1020–1025, 2004.
- C. LE CLAINCHE et M.-F. CARLIER : Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological Reviews*, 88(2):489, 2008.
- J. LEE, M. LEONARD, T. OLIVER, A. ISHIHARA et K. JACOBSON : Traction forces generated by locomoting keratocytes. *J Cell Biol*, 127(6):1957–1964, 1994.
- C. M. LO, H. B. WANG, M. DEMBO et Y.-L. WANG : Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*, 79(1):144–152, 2000.
- L. LUO : Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neuroscience*, 1(3):173–180, 2000.
- P. K. MATTILA et P. LAPPALAINEN : Filopodia : molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008.
- J. MEYLE, K. GÜLTIG, M. BRICH, H. HÄMMERLE et W. NISCH : Contact guidance of fibroblasts on biomaterial surfaces. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, 5(6):463–466, 1994.
- N. MÜCKE, L. KREPLAK, R. KIRMSE, T. WEDIG, H. HERRMANN, U. AEBI et J. LANGOWSKI : Assessing the flexibility of intermediate filaments by Atomic Force Microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 335(5):1241–1250, 2004.
- S. MUNEVAR, Y.-L. WANG et M. DEMBO : Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts. *Biophys J*, 80(4):1744–1757, 2001.

- D. A. NARMONEVA, O. ONI, A. L. SIEMINSKI, S. ZHANG, J. P. GERTLER, R. D. KAMM et R. T. LEE : Self-assembling short oligopeptides and the promotion of angiogenesis. *Biomaterials*, 26:4837–4846, 2005.
- P. NAUMANEN, P. LAPPALAINEN et P. HOTULAINEN : Mechanisms of actin stress fibre assembly. *J Microsc*, 231(3):446–54, 2008.
- K. C. NEUMAN et A. NAGY : Single-molecule force spectroscopy : optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nature Methods*, 5:491–505, 2008.
- A. NICOLAS, A. BESSER et S. SAFRAN : Dynamics of Cellular Focal Adhesions on Deformable Substrates : Consequences for Cell Force Microscopy. *Biophys J*, 95(2):527, 2008.
- A. NICOLAS, B. GEIGER et S. SAFRAN : Cell mechanosensitivity controls the anisotropy of focal adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(34):12520–12525, 2004.
- A. NICOLAS, S. SAFRAN *et al.* : Limitation of cell adhesion by the elasticity of the extracellular matrix. *Biophys J*, 91(1):61, 2006.
- A. NICOLAS : L'adhésion cellulaire, une sonde de l'environnement mécanique dans les tissus. *Images de la physique*, 2007.
- C. D. NOBES et A. HALL : Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81(1):53–62, 1995.
- C. OAKLEY et D. M. BRUNETTE : The sequence of alignment of microtubules, focal contacts and actin filaments in fibroblasts spreading on smooth and grooved titanium substrata. *Journal of Cell Science*, 106(1):343–354, 1993.
- R. PANKOV, E. CUKIERMAN, B.-Z. KATZ, K. MATSUMOTO, L. C. DIAN, S. LIN, C. HAHN et K. M. YAMADA : Integrin dynamics and matrix assembly : Tensin-dependent translocation of $\alpha_5\beta_1$ integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol*, 148(5):1075–90, 2000.
- M. A. PARTRIDGE et E. E. MARCANTONIO : Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. *Molecular Biology of the Cell*, 17(10):4237, 2006.
- M. PASZEK, N. ZAHIR, K. JOHNSON, J. LAKINS, G. ROZENBERG, A. GEFEN, C. REINHART-KING, S. MARGULIES, M. DEMBO, D. BOETTIGER *et al.* : Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 8(3):241–254, 2005.
- R. J. PELHAM JR et Y.-L. WANG : Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(25):13661, 1997.

- A. PIERRES, A. BENOLIEL, D. TOUCHARD et P. BONGRAND : How cells tiptoe on adhesive surfaces before sticking. *Biophys J*, 94(10):4114, 2008.
- M. RAFTOPOULOU et A. HALL : Cell migration : Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology*, 265(1):23–32, 2004.
- A. RAJNICEK, L. FOUBISTER et C. MCCAIG : Alignment of corneal and lens epithelial cells by co-operative effects of substratum topography and DC electric fields. *Biomaterials*, 2008.
- D. RIVELINE, E. ZAMIR, N. Q. BALABAN, U. S. SCHWARZ, T. ISHIZAKI, S. NARUMIYA, Z. KAM, B. GEIGER et A. D. BERSHADSKY : 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):1175–1186, 2001.
- K. ROTTNER, A. HALL et J. V. SMALL : Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr. Biol*, 9(12):640–648, 1999.
- A. SAEZ : *Etude mécanique des processus d'adhésion et de migration des cellules épithéliales à l'aide de substrats microfabriqués*. Thèse de doctorat, Université Paris 7 - Denis Diderot, 2006.
- A. SAEZ, A. BUGUIN, P. SILBERZAN et B. LADOUX : Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformations or forces? *Biophys J*, 89(6):L52–4, 2005.
- A. SAEZ, M. GHIBAUDO, A. BUGUIN, P. SILBERZAN et B. LADOUX : Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(20):8281–6, 2007.
- Y. SAWADA, M. TAMADA, B. J. DUBIN-THALER, O. CHERNIAVSKAYA, R. SAKAI, S. TANAKA et M. P. SHEETZ : Force sensing by mechanical extension of the src family kinase substrate p130cas. *Cell*, 127(5):1015–1026, 2006.
- I. F. SBALZARINI et P. KOUMOUTSAKOS : Feature point tracking and trajectory analysis for video analysis for video imaging in cell biology. *Journal of Structural Biology*, 151(2):182–195, 2005.
- A. L. SIEMINSKI, R. P. HEBBEL et K. J. GOOCH : The relative magnitudes of endothelial force generation and matrix stiffness modulate capillary morphogenesis in vitro. *Exp Cell Res*, 297(2):574–84, 2004.
- L. B. SMILENOV, A. MIKHAILOV, R. J. PELHAM JR, E. E. MARCANTONIO et G. G. GUNDERSEN : Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science*, 286(5442):1172, 1999.

- A. F. STRAIGHT, A. CHEUNG, J. LIMOUZE, I. CHEN, N. J. WESTWOOD, J. R. SELLERS et T. J. MITCHISON : Dissecting Temporal and Spatial Control of Cytokinesis with a Myosin II Inhibitor. *Science*, 299(5613):1743–1747, 2003.
- J. L. TAN, J. TIEN, D. M. PIRONE, D. S. GRAY, K. BHADRIRAJU et C. S. CHEN : Cells lying on a bed of microneedles : An approach to isolate mechanical force. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4):1484–1489, 2003.
- A. I. TEIXEIRA, G. A. ABRAMS, P. J. BERTICS, C. J. MURPHY et P. F. NEALEY : Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. *Journal of Cell Science*, 116(10):1881–1892, 2003.
- O. THOUMINE, A. OTT, O. CARDOSO et J. MEISTER : Microplates : a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 39(1-2):47–62, 1999.
- M. THÉRY, A. PEPIN, E. DRESSAIRE, Y. CHEN et M. BORNENS : Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil Cytoskeleton*, 63(6):341–355, 2006.
- T. TZVETKOVA-CHEVOLLEAU, A. STÉPHANOU, D. FUART, J. OHAYON, P. SCHIAVONE et P. TRACQUI : The motility of normal and cancer cells in response to the combined influence of the substrate rigidity and anisotropic microstructure. *Biomaterials*, 29(10):1541–1551, 2008.
- G. E. UHLENBECK et L. S. ORNSTEIN : On the theory of the brownian motion. *Phys. Rev.*, 36(5):823–841, Sep 1930.
- A. VAZIRI et M. R. K. MOFRAD : Mechanics and deformation of the nucleus in micropipette aspiration experiment. *Journal of Biomechanics*, 40(9):2053–2062, 2007.
- M. VICENTE-MANZANARES, D. J. WEBB et A. R. HORWITZ : Cell migration at a glance. *Journal of Cell Science*, 118(21):4917–4919, 2005.
- H. B. WANG, M. DEMBO et Y.-L. WANG : Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279(5):1345–1350, 2000.
- H. B. WANG, M. DEMBO, S. K. HANKS et Y.-L. WANG : Focal Adhesion Kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20):11295–300, 2001.
- P. WEISS : Experiments on cell and axon orientation in vitro : the role of colloidal exudates in tissue organization. *J Exp Zool*, 100:353–386, 1945.

- P.-J. WIPFF, D. B. RIFKIN, J.-J. MEISTER et B. HINZ : Myofibroblast contraction activates latent TGF-1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol*, 179(6):1311, 2007.
- T. YEUNG, P. C. GEORGES, L. A. FLANAGAN, B. MARG, M. ORTIZ, M. FUNAKI, N. ZAHIR, W. MING, V. WEAVER et P. A. JANMEY : Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 60(1):24–34, 2005.
- M. H. ZAMAN, L. M. TRAPANI, A. L. SIEMINSKI, D. MACKELLAR, H. GONG, R. D. KAMM, A. WELLS, D. A. LAUFFENBURGER et P. MATSUDAIRA : Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(29):10889–94, 2006.
- E. ZAMIR, B. Z. KATZ, S. AOTA, K. M. YAMADA, B. GEIGER et Z. KAM : Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science*, 112(11):1655–1669, 1999.
- H. ZHANG et K.-K. LIU : Optical tweezers for single cells. *J R Soc Interface*, 5 (24):671–90, 2008.
- J. ZHU, P. W. RICE, L. GORSCH, M. ABATE et C. N. COLE : Transformation of a continuous rat embryo fibroblast cell line requires three separate domains of simian virus 40 large T antigen. *Journal of Virology*, 66(5):2780, 1992.

Protocoles

Protocole de fixation d'échantillons avec cellules pour MEB

Fixer dans paraformaldéhyde 4% dans du PBS pendant 30 min à température ambiante.

Rincer trois fois dans du PBS 1X à température ambiante.

Déshydratation

Remplacer le PBS par un mélange eau/éthanol (70%/30%) et laisser 10 minutes.

Augmenter petit à petit la proportion d'éthanol : 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% (2 fois) pendant 10 minutes à chaque fois. Si les échantillons doivent être conservés s'arrêter à l'éthanol à 70%, conserver à 4°C puis finir la déshydratation avant utilisation.

Les échantillons doivent ensuite être séchés, pour pouvoir être recouverts d'un alliage or-platine avant d'être imagés au MEB.

Fixation et marquage par immunofluorescence

Protocole de Philippe Chavier

Fixer dans du paraformaldéhyde à 4% dans PBS pendant 30 à 60 minutes. Rincer avec du PBS. Conserver si besoin à 4°C.

Marquage

Rincer avec du PBS 1X.

Rajouter une solution de NH_4Cl 50 mM dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante.

Rincer avec du PBS.

Perméabilisation : pour une lamelle, ajouter 3 ml de Triton à 0,1% dans du PBS pendant 4 minutes à température ambiante.

Rincer avec du PBS.

Saturation des sites : pour une lamelle/un réseau de plots, mettre une goutte (50-60 μ l) de PBS contenant 10% de sérum pendant 30 minutes à 1 heure à température ambiante.

Retirer le sérum puis ajouter les anticorps primaires aux concentrations voulues dans une goutte de PBS contenant 5% de sérum pendant 20 à 30 minutes à température ambiante. (volume : 50-60 μ l)

Rincer trois fois en 5 minutes dans du PBS 1X.

Ajouter les anticorps secondaires aux concentrations voulues dans une goutte de PBS à 5% sérum pendant 20 à 30 minutes à température ambiante.

Rincer trois fois en 5 minutes dans du PBS 1X.

Monter entre lame et lamelle en Mowiol.

Concentration des anticorps disponibles

Antivinculine : 1 :2 (don de Marina Gluckova)

Phalloïdine rouge (FluoProbes 547H) : 1 :40

Phalloïdine verte (Oregon green) : 1 :100

Anti-souris FITC : 1 :128

Transfection avec Nanofectine

Pour une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre :

Préparer 2 eppendorfs stériles contenant chacun 50 μ l de la solution de NaCl fournie avec la Nanofectine.

Dans l'eppendorf n°1 : ajouter 1 μ g de plasmide

Dans l'eppendorf n°2 : ajouter 3,2 μ l de Nanofectine (4 μ l pour les 3T3)

Introduire le contenu de l'eppendorf n°2 dans l'eppendorf n°1 et attendre 30 min.

Verser le contenu de l'eppendorf sur les cellules.

Agiter doucement pour homogénéiser le milieu.

On peut observer les cellules 24 à 48h plus tard.

Préparation de plots en PDMS

Préparation classique

Peser quelques grammes de PDMS Sylgard 184.

Ajouter le réticulant (10% de la masse de PDMS), bien mélanger.

Faire dégazer le mélange dans une cloche à vide.

Déposer le mélange sur le wafer, en faisant attention à ne pas faire de bulles.

Attendre quelques minutes que le PDMS se répartisse bien dans les trous.

Faire réticuler à 65°C pendant toute une nuit.

En fonction de la raideur des plots, démouler à sec ou dans l'éthanol 70%. Si le démoulage a lieu dans l'éthanol, transférer immédiatement le réseau dans une boîte de Pétri contenant de l'eau ou du PBS 1X (3 à 4 ml pour un boîte de 35 mm de diamètre).

Préparation sur lamelle de verre

Pour un réseau de plots, il faut tout d'abord préparer une petite quantité de PDMS (une grosse goutte suffit) comme précédemment. Il faut ensuite la déposer comme indiqué sur le schéma 4.7 en veillant à ne pas déborder.

Une fois déposé sur le wafer, on dégaze à nouveau le PDMS dans une cloche à vide pour faire sortir l'air emprisonné dans les trous. Dans le cas classique, le PDMS étant perméable à l'air, le dégazage peut se faire dans le four, la surface supérieure étant libre. Mais ici, une lamelle de verre va être déposée par dessus. Si on laisse le PDMS dégazer seul, les bulles vont s'accumuler contre la lamelle ou rester bloquées dans les trous, et le substrat en PDMS n'est alors pas homogène (notamment les plots n'ont pas tous la même taille). Cette étape est essentielle pour la reproductibilité des réseaux.

On dépose de part et d'autre de la bande de PDMS dégazé deux lamelles n°0, dont l'épaisseur est la moitié d'une lamelle classique, soit 85 μm . Elles serviront d'espaceurs. Pour permettre une meilleure adhérence, on aura déposé au préalable une petite goutte d'eau déionisée (10 μl) sur laquelle chacune des lamelles est déposée.

On dépose par dessus le PDMS et les deux espaceurs une autre lamelle n°0, plus grande; elle va servir de support au PDMS. On ajoute un petit poids par dessus cette lamelle pour bien écraser le PDMS. L'épaisseur globale de cet échantillon sera donc équivalent à une lamelle classique, soit $\sim 200 \mu\text{m}$. On fait réticuler comme d'habitude.

Pour démouler ces réseaux, qui n'ont pas la souplesse du PDMS à cause de la lamelle-support, on utilise de l'éthanol à 70% quelle que soit leur rigidité. Il

est également judicieux de ne pas exercer de contrainte directe (très localisée) avec une pince sur la lamelle, sa faible épaisseur la rendant encore plus fragile qu'une lamelle classique. On utilise plutôt les espaceurs, qui peuvent servir de leviers en répartissant la contrainte sur une plus grande surface et qui peuvent se casser sans endommager le réseau de plot. Si les plots sont suffisamment rigides, il est possible de les laisser sécher à l'air libre après démoulage. On peut ensuite les traiter comme un réseau classique.

Stamping de fibronectine sur plots en phase liquide

Si on souhaite ensuite ajouter du PEG sur les plots pour rendre non adhérentes les zones non recouvertes de fibronectine, faire la silanisation. Sinon, passer directement à l'étape 2.

Silanisation des plots

Immerger les plots, juste après le démoulage, dans récipient contenant 10mL d'éthanol.

Ajouter 450 μ l d'eau miliQ, 86 μ l d'acide acétique et 212 μ l de silane.

Fermer le récipient et laisser réagir 3 h à température ambiante sous la hotte ou la nuit à 4°C.

Préparation du tampon encreur

Fabriquer un tampon avec du PDMS réticulé, prélevé de préférence sur un wafer.

N'utiliser que du PDMS récent (moins d'une semaine), car sinon il vieillit et le stamping ne fonctionne plus.

Passer le tampon au plasma O₂ pendant quelques minutes (3 à 5)

Préparer 25 μ l de mélange de fibronectine fluorescente (concentration finale 5 μ g/ml) et fibronectine normale (concentration finale 50 μ g/ml) dans du PBS 1X par tampon.

Poser la goutte de mélange sur le tampon et laisser incuber 10 min.

Stamping

Si les plots ont été silanisés les sortir du mélange de silanisation, les rincer dans 2 bains successifs d'éthanol, puis les laisser 1 h dans un bain de PBS 1X.

Egoutter le tampon encreur puis le laisser sécher sous la hotte jusqu'à ce que le film liquide disparaisse, sans trop le laisser.

Plonger les plots dans une boîte de Pétri remplie de PBS.

Poser délicatement le tampon sur le réseau de plots (dans le PBS), appuyer un peu et laisser en contact 5 à 10 min.

Retirer délicatement le tampon des plots.

Emploi de PEG sur les plots

Par réseau (resp. lamelle), préparer 1 ml (resp. 500 μ l) de PEG à 20mg/ml dans du PBS 1X (fermer le PEG sous argon)

Après avoir retiré délicatement les tampons, mettre une goutte de 1 ml (resp. 500 μ l) de la solution de PEG sur chaque réseau (resp. lamelle). Laisser 1 h à température ambiante.

Rincer les réseaux ou lamelles au PBS.

Confocal : montage employé

Le confocal employé est le SP5 (Leica) de la plateforme d'imagerie de l'Institut Jacques Monod (Paris).

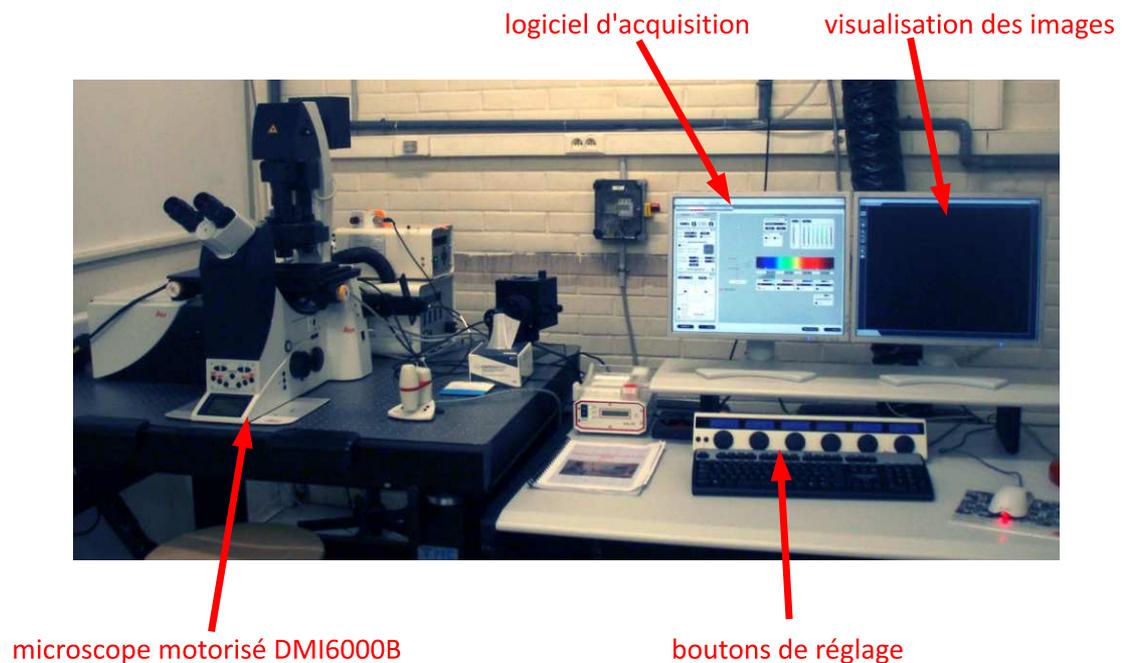


FIGURE 9.18 – Confocal SP5 de Leica, utilisé à la plateforme d'imagerie de l'Institut Jacques Monod (photo IJM)

Il possède 4 lasers :

- Diode laser (25mW) : raie à 405nm
- Argon (100mW) raies à 458, 476, 488 (40mW) 496 et 514nm
- Diode laser (1mW) : raie à 561nm
- Hélium néon (10mW) : raie à 633nm

Pour avoir un bon échantillonnage spatial, il est nécessaire d'adapter la taille des pixels en fonction de l'objectif employé. Par exemple, pour le 63X utilisé, la résolution en XY est de 180 nm. Pour avoir une image ni sous- ni sur-échantillonnée,

le pixel doit représenter un carré de 90 nm de côté. Il suffit pour cela d'adapter le zoom.

Avec le confocal, il est donc possible de réaliser des coupes successives selon Z. Si on veut pouvoir reconstituer un objet en 3D, il faut l'échantillonner en fonction de l'objectif employé. Par exemple, pour le 63X que nous avons utilisé, la résolution axiale est de 640 nm. Pour que l'acquisition ne soit ni sous- ni sur-échantillonnée, il faut donc séparer deux plans successifs de 320 nm. Cependant, des coupes aussi fines entraînent du photoblanchiment. Nous avons donc choisi de sous-échantillonner les acquisitions, en ne faisant qu'une image tous les 1 à 2 μm . Il n'est alors pas possible de reconstituer l'objet selon Z, mais le signal reste de bonne qualité sur toute la hauteur.

Notations et abréviations

2D : deux dimensions
3D : trois dimensions
ADF : Actin Depolymerizing Factor
ADP : Adénosine DiPhosphate
AF : Adhésion Focale
ATP : Adénosine TriPhosphate
Arp : Actin Related Protein
Arp2/3 : complexe formé par Arp2, Arp3 et 5 autres protéines
Blebb : Blebbistatine
CytoD : Cytochalasine D
FAK : Kinase des Adhésions Focales
FFT : Transformée de Fourier Rapide
GDP : Guanosine DiPhosphate
GTP : Guanosine TriPhosphate
LatA : Latrunculine A
MEC : Matrice Extra Cellulaire
MLCK : Myosin Light Chain Kinase
 μ CP : Micro Contact Printing
MMP : Matrix MetalloProtease
MT : Microtubule
PBS : Phosphate Buffer Saline
PDMS : Poly Di-Méthyl Siloxane
ROCK : Rho-Kinase
Y-27632 : inhibiteur de ROCK

Articles publié et soumis

Voici les deux articles reprenant, en partie, les travaux correspondant à cette thèse. Le premier article, publié dans *Soft Matter*, correspond au chapitre 7. Le second, soumis à *Biophysical Journal*, correspond en partie au chapitre 8.

Traction forces and rigidity sensing regulate cell functions

Marion Ghibaudo,^{†a} Alexandre Saez,^{†a} Léa Trichet,^a Alain Xayaphoummine,^a Julien Browaeys,^a Pascal Silberzan,^b Axel Buguin^b and Benoît Ladoux^{*,a}

Received 10th March 2008, Accepted 19th May 2008

First published as an Advance Article on the web 2nd July 2008

DOI: 10.1039/b804103b

Increasing evidence suggests that mechanical cues inherent to the extracellular matrix may be as important as its chemical nature in regulating cell behavior. Here, the response of cells to the mechanical properties of the substrate is examined by culturing 3T3 fibroblastic cells and epithelial cells on surfaces composed of a dense array of flexible microfabricated pillars. We focus on the influence of substrate rigidity on the traction forces exerted by cells, and on cell adhesion and migration. We first measure these forces by monitoring the deflection of the pillars. Then, by varying their geometric parameters, we control the substrate stiffness over a large range from 1 to 200 nN μm^{-1} . We show that the force–rigidity relationship exhibits a similar behavior for both cell types. Two distinct regimes are evidenced: first, a linear increase of the force with the rigidity and then a saturation plateau for the largest rigidities. We observe that the cell spreading area increases with increasing rigidity, as well as the size of focal adhesions. Substrates with an anisotropic rigidity allow us to determine that the migration paths of 3T3 cells are oriented in the stiffest direction in correlation with maximal traction forces. Finally, to compare the force measurements on micro-textured surfaces and continuous flexible gels, we propose an elastic model that estimates the equivalent Young's modulus of a micropillar substrate. This qualitative model gives comparable results for both experimental approaches.

Introduction

Many cellular processes, such as growth,¹ differentiation,² migration,³ and tumor metastasis,⁴ involve adhesion of living cells to specific micro-environments. Although most investigations have focused on chemical factors, accumulating evidence shows that cell adhesion and migration are also driven by mechanical interactions, in terms of traction forces between the cells and their surrounding environment.⁵ Tissue cells probe the elasticity of their environment by pulling on it. Such processes are dependent in part on acto-myosin contractility and trans-cellular adhesion to transmit forces to substrates. Most of the cells do not only apply forces but also respond through cytoskeleton organization to the resistance that they sense with regard to the mechanical properties of the matrix. Cell migration may be directed toward increased substrate adhesiveness,⁶ stiffness⁷ and cell adhesion depends on substrate topography^{8,9} or rigidity.¹⁰ Cellular tension can also be affected by changes in the mechanical properties of the environment.^{11–15}

In this context, several methods based on the use of deformable substrates have been developed to characterize the traction forces at the cell-to-substrate interface either by tracking the displacements of embedded markers in deformable gels,^{16–19} or by microfabricating designed surfaces.^{20–22} These approaches

have provided new insights into the mechanical interactions of cells with their environment. In particular, the use of soft materials with a well-defined stiffness has allowed characterization of the rigidity sensing mechanisms: most tissue cells like fibroblasts or epithelial cells are able to actively probe the stiffness of their environment.⁷ For instance, the substrate rigidity can govern the direction of migration,^{13,23,24} cell spreading,^{25,26} the traction forces that they exert on a substrate,^{13,14} but also the organization of their cytoskeleton and focal adhesions (FAs).^{10,14,27,28} On stiff substrates, stress fibers and strong focal adhesions predominate whereas the adhesive contacts to the substrate present faster dynamics and appear less organized on softer substrates. Moreover, theoretical models have been recently developed to predict the dynamics and orientation of cells in response to changes in the matrix elasticity.^{29–31}

Here, we used the micropillar method to quantify the effects of substrate stiffness on cell traction forces.^{21,22,32} Traction forces with our micro-force sensor array (μFSA) were determined by analyzing the deflections of the vertical micropillars. Indeed, the deflection is directly proportional to the force in the linear regime of small deformations. In a first approximation, the linear elastic theory applied to a cylinder of radius r and length L bent by the application of a force F at its extremity gives the following relation:

$$F = k\Delta x = \left(\frac{3}{4}\pi E \frac{r^4}{L^3}\right)\Delta x \quad (1)$$

where E , k , and Δx are, respectively, the Young's modulus, the spring constant of a pillar and the deflection of the post. According to eqn 1, surfaces of different spring constants can be designed by changing the geometric parameters of the pillars (length and radius).¹⁴ Using this technique, we determine the

^aLaboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC), UMR 7057 CNRS and Université Paris Diderot, Bâtiment Condorcet, CC 7056, 75205 Paris cedex 13, France. E-mail: benoit.ladoux@univ-paris-diderot.fr; Fax: +33 1 57 27 62 11; Tel: +33 1 57 27 70 35

^bLaboratoire de Physico-Chimie Curie, Institut Curie Centre de recherche, CNRS UMR 168, Université Pierre et Marie Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France

[†] These authors contributed equally to this work.

force–rigidity relationship of different cell types. A first regime observed for low rigidities exhibits a linear variation of the traction forces exerted by either epithelial cells or fibroblasts on their substrate. Beyond this regime, the saturation plateau that we obtain for the highest spring constants of the pillars determines the upper limit of traction forces that cells could exert on the substrate. The size of the adhesive complexes also increases with substrate stiffness confirming that the rigidity sensing mechanism probably couples biomechanical and biochemical pathways. Complementary qualitative observations indicate that other parameters such as cell motility or spreading can be tuned by changing the substrate stiffness. Finally, we propose an elastic model to directly compare the forces measured on pillar substrates with the ones obtained on continuous gels. It allows us to evaluate the equivalent Young's modulus of a micro-textured surface and gives quantitative agreement between both methods.

Material and methods

Cell culture

3T3 fibroblasts and Madin–Darby Canine Kidney (MDCK) epithelial cells are maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% bovine calf serum. 3T3 cells are plated overnight on μ FSA before microscopy experiments. MDCK cells are seeded on the substrates 24 h before acquisition.

Fabrication and calibration of μ FSAs

PDMS micropillar arrays are prepared as previously described²¹ using conventional photolithography followed by a deep etching process ("Bosch Process"). Briefly, silicon wafers are patterned with an array of cylindrical pits in positive photoresist by photolithography. Bare parts of the wafers are then etched by a deep Si etching process down to the desired depth to obtain the negative pattern of the array. A liquid silicone, poly(dimethylsiloxane) (PDMS) (Sylgard 184, Dow Corning), is poured over the silicon template, cured at 65 °C for 15 h and peeled off the wafer either in dry conditions or in ethanol depending on the aspect ratio (L/r) of the pillars.

We use dimensionally calibrated macroscopic cylinders of this material and measured their compressions under a fixed normal strain to evaluate the Young's modulus of the PDMS, E . We use a consistent curing time of 15 h \pm 2 h at 65 °C leading to $E = 2$ MPa \pm 0.1 MPa. By performing SEM observations, we measured the dimensions of the pillars and calculated their spring constant according to eqn 1.

Surface treatment and micro-contact printing

μ FSA substrates are immersed for 1 h into a fibronectin solution (20 μ g ml⁻¹) (Sigma-Aldrich) in PBS buffer. Alternatively, only the top of the pillars are coated with fluorescently labeled fibronectin (Cy3, Amersham Biosciences, Orsay, France). In this case, we use a modified procedure of micro-contact printing described by Thery *et al.*³³ Briefly, a stamp of flat PDMS is inked with a PBS solution containing 50 μ g ml⁻¹ of fibronectin and 5 μ g ml⁻¹ of labeled Cy3-fibronectin. The stamps are then dried under argon and placed against the μ FSA for 15 min.³⁴

For micro-contact printing on glass coverslips, the coverslips are treated by immersion into a silanization bath [10 ml ethanol, 215 μ l 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (Roth Sochiel), 450 μ l water and 86 μ l acetic acid] for 3 h. The arrays of PDMS pillars with oval cross section described above are oxidized by plasma treatment and incubated with 50 μ g ml⁻¹ fibronectin + 5 μ g ml⁻¹ of Cy3-stained fibronectin in PBS for 15 min. They are then dried and put into contact with the silanized coverslip for 15 min to imprint the pattern. The coverslip is finally incubated with 20 mg ml⁻¹ reactive PEG (ShearWater mPEG-MAL MW, Nektar Therapeutics) in PBS for 1 h to prevent cell adhesion outside fibronectin patches.

Calculation of forces on micropillar substrates with anisotropic cross sections

The linear elastic theory for a beam (length L) with an elliptic cross section (semi-major axis a and semi-minor axis b) bent by the application of a lateral force F at its extremity predicts the following relation:²³

$$F = k(\theta)\delta\mathbf{u} = \frac{3}{4}\pi E \frac{ab}{L^3} (a^2 \cos^2\theta + b^2 \sin^2\theta)\delta\mathbf{u} \quad (2)$$

where E , θ , and $\delta\mathbf{u}$ are respectively the Young's modulus, the angle of deflection with respect to the major axis and the deflection vector.

In particular, eqn 2 leads to two different spring constants, k_x and k_y , in the x ($\theta = 0$) and y ($\theta = \pi/2$) directions of the substrate, respectively (Fig. 6): $k_x \sim (E/L^3)a^2b$ and $k_y \sim (E/L^3)ab^2$

$$k_x/k_y = a^2/b^2 \quad (3)$$

Video microscopy and force traction measurements

Time-lapse imaging of pillars is realized using either an Olympus BX51 upright microscope or a IX71 inverted one (Olympus, Rungis, France), both equipped with an on stage chamber maintaining the temperature at 37 °C. Image stacks are acquired using a frame delay of 10 s over about one hour. Observations are made using an Olympus 60X water immersion objective (NA 0.9). Pillars are imaged using either transmission light microscopy, as previously described,³⁵ or a signal is induced by the stamping of fluorescent fibronectin on the top of the pillars. To prevent gas exchange and evaporation of water, the culture medium is covered with a thin layer of mineral oil after addition of 10 mM HEPES to the solution in order to maintain a constant pH. Images are acquired with a Photometrics Coolsnap ES camera (Roper Scientific, Evry, France) using Metamorph software (Universal Imaging). We use a home-made multi-particle tracking routine that allows us to detect micropost positions for each image of the stack. In bright field microscopy, posts act as wave guides and appear brighter than the background. Otherwise we detect the fluorescent signal emitted by fibronectin on the top of the posts. For both cases, the contrast is high enough to determine the post position with good accuracy (\sim 20–30 nm). Then we determine the undeflected position of each pillar and thus calculate its displacement. The applied forces are immediately deduced by multiplying the displacements by the spring constant of the pillars (eqn 1).

Analysis of cell migration

The migration trajectories (displacements between two consecutive images) are determined on thresholded images with a particle tracking plugin (ImageJ software). Time-lapse sequences are acquired using a 1 min delay between frames over 3 to 12 h. Observations are made using a 10 \times Olympus objective.

Cell fixation and staining

For scanning electron microscopy (SEM), cells are cultured on a μ FSA after their previous resuspension, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 1 h and then further rinsed 3 times with PBS buffer. Dehydration is performed by rinsing the samples through graded ethanol–water mixtures (50%, 70%, 80%, 90%, and finally 100%, 10 min per step at 4 $^{\circ}$ C). Ethanol is slowly exchanged successively by amyl acetate and liquid CO₂. Finally, samples are dried using the critical point method and then coated by sputtering with a thin layer of gold.

For vinculin and actin fluorescence staining, cells are fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min at room temperature, rinsed three times with PBS and permeabilized (50 mM of NH₄Cl in PBS for 10 min and 0.1% TritonX-100 in PBS for 4 min). For actin labeling, cells are stained with tetramethylrhodamine (TRITC)-conjugated phalloidin (Molecular Probes) at a dilution of 1 : 500. Vinculin staining is performed by using a mouse anti-vinculin monoclonal antibody followed by incubation with secondary anti-mouse, FITC-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch) at a dilution of 1 : 128.

Results

Stiffer substrates induce larger traction forces than softer ones

3T3 fibroblasts or MDCK epithelial cells are cultured on μ FSA coated with fibronectin (Fig. 1). Cells are thus encouraged to attach and spread on the μ FSA's top surface. All experiments are performed on either small islands of subconfluent MDCK cells containing 10 to 20 cells or on individual fibroblasts. Video microscopy experiments are used to analyze the deflection of the pillars and to map the forces under the cells. For each experiment, images are captured over time periods of several hours. The forces detected for all the pillars covered by cells are collected into histograms (Fig. 1C). Despite a large dispersion in the force magnitude due to a large variability of the mechanical activity within a cell or an island of cells, we measure the mean and the maximal traction forces. As previously shown for different cell types and using different experimental methods,^{14,22,36} we observe that maximal forces exerted by individual fibroblasts are primarily localized on the edge of the cell (Fig. 1A and B).

We use this experimental method to analyze the force–rigidity relationship (Fig 2). The stiffness of the micropillars is adjusted by changing their length (from 1.4 up to 7 μ m) and diameter (1 and 2 μ m) according to (eqn 1). The lengths of the 1 μ m diameter pillars are varied from 6.5 down to 1.4 μ m corresponding to stiffnesses ranging from 1.1 up to 118 $\text{nN } \mu\text{m}^{-1}$. For the 2 μ m diameter ones, their lengths are chosen from 7 down to 2.8 μ m corresponding to stiffnesses ranging from 13 up to 214 $\text{nN } \mu\text{m}^{-1}$. The constant resolution of around 30 nm for the position of the pillars allows us to obtain force resolutions from 0.03 up to 6 nN

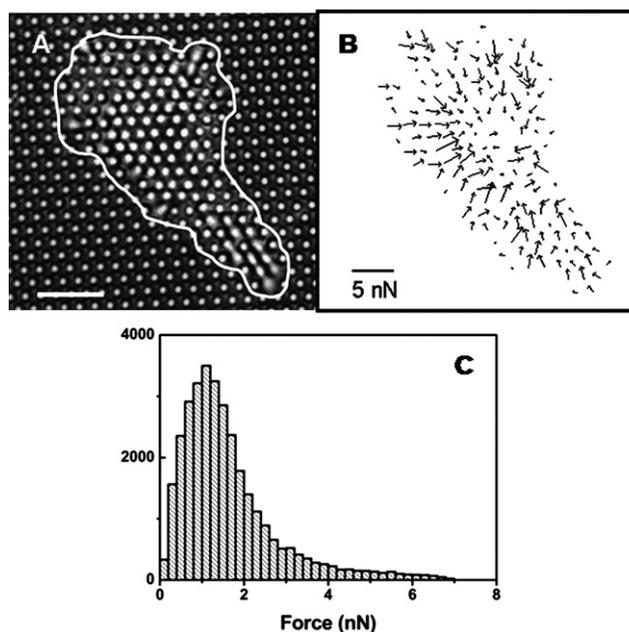


Fig. 1 Force measurements on individual 3T3 fibroblast cells on fibronectin-coated μ FSA. (A) Transmission videomicroscopy image. The cell border is represented by the white line. Scale bar = 10 μ m. (B) Corresponding force cartography. The force field exerted by the cell is obtained from the deflection of the underlying pillars. (C) Typical distribution of traction forces on μ FSAs ($k = 8 \text{ nN } \mu\text{m}^{-1}$). Time-lapse sequence is captured over one hour. The forces detected for all the pillars underlying the cell were collected into histograms.

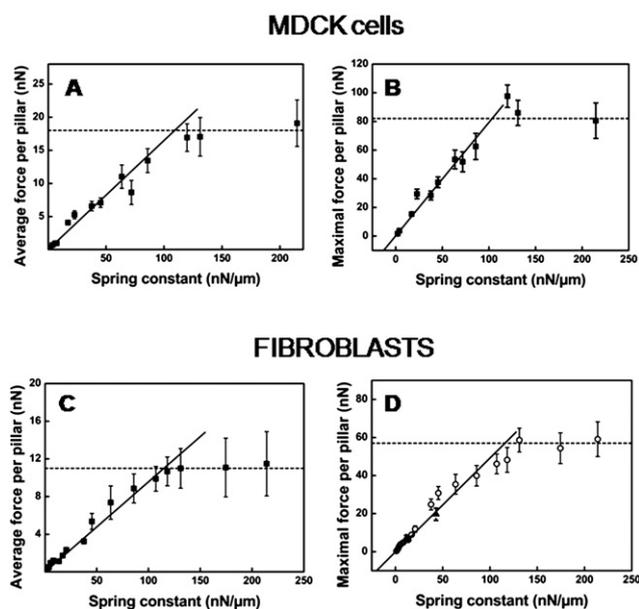


Fig. 2 Traction forces as a function of substrate rigidity. (A) and (B) Mean and maximal forces exerted by islands of epithelial cells. (C) and (D) Mean and maximal forces exerted by individual fibroblasts. On panel (D), round (○) and triangular (▲) markers represent the maximal forces measured on substrates composed of cylindrical and ellipsoidal anisotropic pillars, respectively. For each panel, the straight line represents the linear fit and the dashed one the saturation plateau.

over the range of pillar spring constants studied. For each substrate, the statistics involve at least 6 independent cells or cell islands. From one experiment to the other, we check that cells lying on equivalent substrates present identical behavior within experimental error. The mean value of the force, $\langle F \rangle$, plotted as a function of the spring constant of the pillars (for epithelial cells and individual fibroblasts in Fig. 2A and C, respectively) exhibits a strong correlation with the surface stiffness. Indeed, we observe a linear increase of the force from 0.08 ± 0.01 nN to 10.9 ± 0.4 nN for spring constants varying from 1.1 nN μm^{-1} up to 130 nN μm^{-1} for fibroblasts (Fig. 2C). This finding, in agreement with our previous results on epithelial cells,¹⁴ shows that the relationship between cell traction forces and substrate rigidity can be extended to different cell lines. This linear regime implies that the pillar deflection keeps a constant value: around 100 nm for fibroblasts and 160 nm for epithelial cells. Above these values of spring constants, we observe a second regime that corresponds to maximal forces at a plateau of about 11 nN for fibroblasts and 18 nN for epithelial cells. It appears that epithelial cells develop larger traction forces than fibroblasts. In our previous study on epithelial cells,¹⁴ the range of stiffness was too limited to reach this value. The same dependence is observed for the highest forces, F_{max} , deduced by averaging the forces of the histograms tails. Maximal traction forces, mostly due to the activity of the lamellipodium at the edges of the fibroblast or the epithelial cell monolayer,²¹ are about one order of magnitude larger than the mean value for both cell types (Fig. 2B and D). By increasing the stiffness above ~ 120 nN μm^{-1} , one also reaches the saturated regime of the maximal forces exerted by the cells.

Elastic model for traction forces on continuous and discrete substrates

As mentioned in the introduction, the analysis of traction forces at the cell-to-substrate interface is often based on experiments using deformable substrates such as continuous elastic gels.^{17,36,37} A direct comparison with our method needs to be addressed. To compare the force measurements done on our micro-textured surfaces with the ones performed on continuous flexible gels, we propose an elastic model that estimates the equivalent Young's modulus, E_{eff} , of a micropillar substrate.

A micro indented surface does not have the same mechanical behavior as a semi-infinite elastic substrate. Each micropillar may be considered as a small independent spring with a spring constant k . The Green tensor of the micro indented surface is therefore extremely localized, whereas the Green tensor of a semi-infinite elastic solid decreases as $1/r$, where r is the distance between the applied force and the location of displacement. Nevertheless, in order to compare our results with other experiments using (semi-infinite) elastic substrates, we try to evaluate an equivalent Young's modulus for our micropillar textured surfaces. Considering a semi-infinite incompressible (Poisson's ratio = 1/2) elastic substrate, the displacement response \mathbf{u} at a position r from a point-like force \mathbf{F} is given by:

$$\mathbf{u}(r) = \frac{3}{4\pi E r} [\mathbf{F} + (\mathbf{nF})\mathbf{n}] \quad (4)$$

where $\mathbf{n} = \frac{\mathbf{r}}{r}$. A cell adheres to this substrate through focal points. Let us consider only one of these focal points, "far" from the

others. For sake of simplicity, we will assume it has a circular shape. One can define the shearing stress \mathbf{P} by $d\mathbf{F} = \mathbf{P}dS$, where $d\mathbf{F}$ is the force applied on the surface element dS , and assume that the shearing stress \mathbf{P} applied by the cell on the substrate is uniform. The previous expression (eqn 2) integrated over a disc of radius a gives the displacement at the center point $\mathbf{u}(O)$:

$$\mathbf{u}(O) = \iint \frac{3}{4\pi E r} \left(\mathbf{P} + \frac{(\mathbf{rP})\mathbf{r}}{r^2} \right) dS$$

A straightforward calculation of the displacement $u_x(O)$ at the center of the focal point in the direction x of the applied force yields:

$$u_x(O) = \frac{9Pa}{4E} \quad (5)$$

The total force applied by the cell onto this focal point is: $F = \pi a^2 P$.

Thus, one can estimate the equivalent Young's modulus E_{eff} for a micropillar textured surface:

$$E_{\text{eff}} = \frac{9k}{4\pi a} \quad (6)$$

where k is the spring constant of a micropillar.

The relation between, E_{eff} , and the pillar spring constant, k , is given by (eqn 6) where a roughly corresponds to either the size of FA or the radius of the pillars, r . According to this relation, we plot the average force, $\langle F \rangle$, exerted by the cells as a function of the equivalent Young's modulus of the microstructured substrate (Fig. 3). We assume that:

$$a \sim r \sim \text{FA size} \sim \mu\text{m}$$

This assumption is consistent with the use of pillars of 1 and 2 μm diameters in our study. By varying the spring constants from 1.1 to 214 nN μm^{-1} and choosing a as the radius of the pillars, we obtain a range of E_{eff} varying from 1.5 to 150 kPa. A similar behavior as the one described in the previous paragraph is

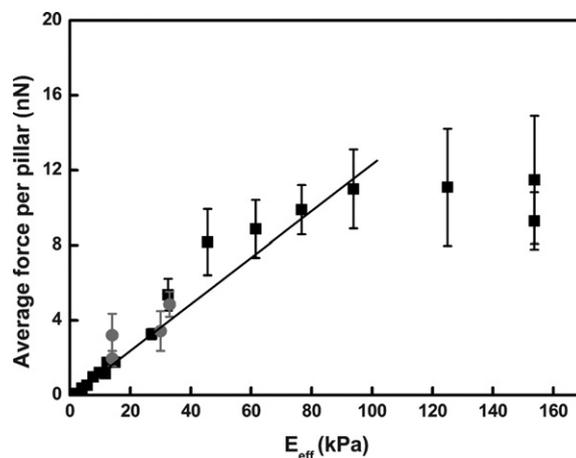


Fig. 3 Plot of the mean force exerted by fibroblasts as a function of the equivalent Young's modulus, E_{eff} . Square (■) markers represent the forces measured on micropillar substrates and round (●) markers correspond to the forces obtained by previous studies on flexible continuous gels.^{13,38} The straight line is a linear fit for the values <90 kPa.

observed for the variation of $\langle F \rangle$ as a function of E_{eff} . The force exerted by fibroblasts linearly increases up to 10.9 ± 2.4 nN for a Young's modulus varying between 1.5 and 90 kPa. Above 90 kPa (*i.e.* $130 \text{ nN } \mu\text{m}^{-1}$ spring constant), we again observe the saturated regime (Fig. 3). Interestingly, if we compare these results with the ones obtained in previous experiments with 3T3 fibroblasts migrating on collagen-coated polyacrylamide substrates with two different rigidities (~ 15 and 30 kPa),^{13,38} we obtain a very good quantitative agreement between both methods, considering the following approximations. From the values of the mean stress given in these studies, we calculate the average force assuming that most of the traction forces on flat elastic substrates are transmitted through FA³⁹ and that the mean size of FA is $\sim 3 \mu\text{m}^2$.¹⁷ The force measurements coming from the micropillar technique (squares) and the method of using flexible polyacrylamide sheets (circles) as a function of substrate stiffness are plotted on the same curve (Fig. 3).

Spreading and focal adhesion size of 3T3 Fibroblasts depend on substrate stiffness

Previous studies have shown that on more rigid substrates, most tissue cells were well spread and appeared indistinguishable from those cultured on glass or plastic surfaces whereas cells cultured on increasingly flexible substrates became less well spread and presented a different organization of their actin cytoskeleton and FA.^{10,27} In order to investigate the role of morphological cellular changes in the force transmission process, we analyze the spreading area of the cells and the distribution of FAs as a function of substrate rigidity. First, we observe an increase of the projected area of 3T3 fibroblasts with the stiffness of the micropillars (Fig. 4, ~ 50 measurements for each experiment). Then, we studied the distribution of vinculin expression as a marker for FA formation.⁴⁰ Cells attached to the top of the pillars are labeled and imaged by immunofluorescence microscopy to localize vinculin expression (Fig. 5). As previously shown for epithelial cells on micropillar substrates,¹⁴ we only observe large and well-defined focal contacts for 3T3 fibroblasts on stiff substrates ($k = 85 \text{ nN } \mu\text{m}^{-1}$) whereas vinculin protein

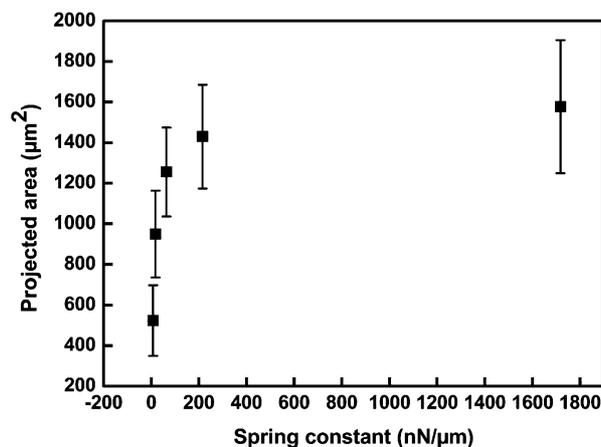


Fig. 4 Projected spreading area of 3T3 individual fibroblasts as a function of the spring constant of the pillars. The pillar diameter and density are maintained constant. The values of the projected areas of cells correspond to the average over a population of around 50 individual cells.

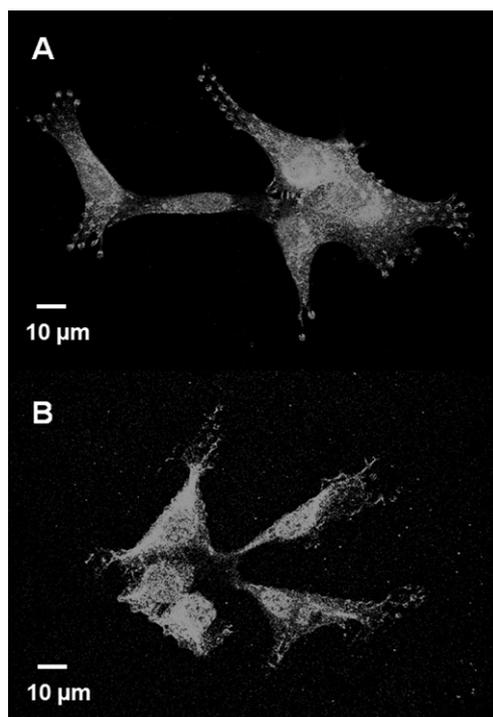


Fig. 5 Confocal images of focal adhesions. Vinculin is stained by immunofluorescence. The pillar spring constants are respectively 85 and $13 \text{ nN } \mu\text{m}^{-1}$ for (A) and (B). Scale bars correspond to $10 \mu\text{m}$.

appears broadly distributed on more compliant substrates ($k = 13 \text{ nN } \mu\text{m}^{-1}$) and no large focal contacts are formed (Fig. 5).

Cell spreading and migration on anisotropic micropillars

We also use substrates exhibiting anisotropic rigidity. Ellipsoidal microposts with a minor axis ($b \approx 1 \mu\text{m}$) twice as small as the major one ($a \approx 2 \mu\text{m}$) correspond to posts around 4 times stiffer in the major direction (eqn 3, see Material and methods section).²³ We also vary the length of these pillars from 3 to $6 \mu\text{m}$ in order to change the global rigidity of the substrate. According to our previous work, the direction of growth and the orientation of cell sheets are correlated with the direction of the maximal stiffness of the substrate.²³ Here we focus on the migration of individual cells on these substrates by analyzing the angular distribution of the individual cells with respect to the stiffest direction (major axis taken as the origin of the angles) (0° , Fig. 6A). 12 hours after plating 3T3 cells on the micropillar substrates, cells are fixed and their contours fitted with ellipses to determine their mean orientation (Fig. 6B). As theoretically predicted,³¹ it appears that most of the individual 3T3 cells are elongated and aligned along the stiffest direction of the substrate (49% in a 30° -wide sector, compared to 16% for an isotropic distribution, see Fig. 6).

Different explanations can be supplied for these observed growth patterns. Among them, we can attribute this phenomenon to the anisotropic rigidity or to contact guidance⁴¹ due to the geometry of our substrates that present a favored direction. To uncouple the influence of both effects, we use the PDMS arrays of anisotropic micropillars as a stamp to print glass coverslips with fluorescently labeled fibronectin (see Material

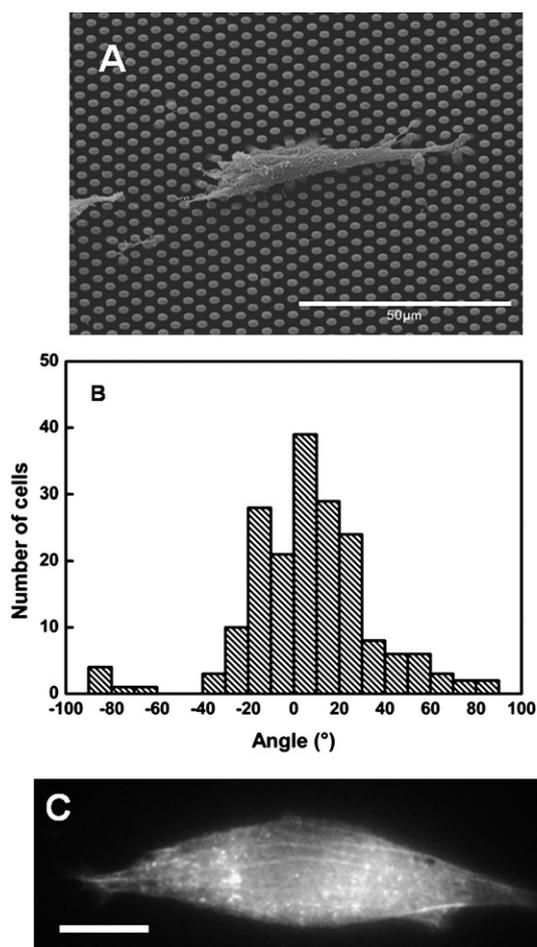


Fig. 6 Fibroblast orientation on substrates with anisotropic rigidity. (A) Scanning electron micrograph of a 3T3 fibroblast on an array of oval pillars. Scale bar: 50 μm. (B) Angular distribution of cells with respect to the stiffest direction ($\theta = 0^\circ$, horizontal direction). (C) Immunofluorescent image of filamentous actin of a fibroblast grown on an anisotropic substrate. In (A) and (C) the scale bar (10 μm) is oriented along the stiffest direction.

and methods section). To limit cell adhesion to the transferred pattern, the substrates are then treated with polyethyleneglycol, used to passivate the rest of the surface. In these conditions, we obtain an array of oval fibronectin patches printed on glass and offering the same adhesive surface as the μ FSA (Fig. 7B). By culturing 3T3 cells on such substrates, we compare the orientation of cells on micropillar arrays and micro-contact printed surfaces (Fig. 7). On such substrates, presenting the same geometric anisotropy as the micropillar arrays but no angle-dependent rigidity, we observe no specific orientation of the cells (Fig. 7C). Consequently, the orientation of 3T3 cells is mainly a consequence of the anisotropic substrate elasticity and cannot be attributed to contact guidance.

To further investigate the effect of stiffness anisotropy on the spatial organization of filamentous actin, we use immunofluorescence staining. We observe a clear orientation of actin stress fibers along the stiffest direction of the μ FSA (Fig. 6C). This result confirms that such a local anisotropic rigidity can induce an alignment of fibroblasts correlated with the polarization of the

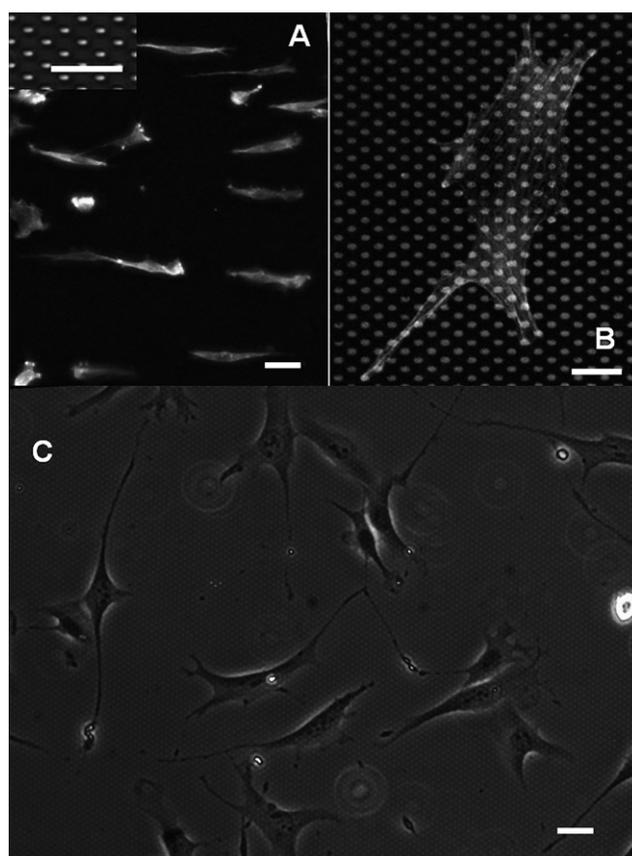


Fig. 7 Orientation of 3T3 cells on anisotropic micropillar substrates and micro-patterned surfaces. (A) Immunofluorescent image (actin staining) of 3T3 fibroblasts on flexible anisotropic micropillars. The scale bar (30 μm) is oriented along the major axis of the micropillars (insert: transmission light image of the micropillars. Scale bar = 10 μm). (B) Fluorescence microscopy image of actin cytoskeleton of 3T3 fibroblast grown on micro-contact printed surface with Cy3-fibronectin. Scale bar: 10 μm. (C) Phase-contrast image of 3T3 fibroblasts cultured on a glass coverslip micro-stamped with the arrays of anisotropic micropillars merged with a fluorescent image of the micro-printed fibronectin oval patches. Scale bar: 20 μm.

actin cytoskeleton. We also map the traction forces exerted by fibroblasts on the anisotropic μ FSAs. As expected, we observe that the forces are maximal on the edges of the cell. Interestingly, these maximal forces reached typical, instantaneous values of around 7 nN and 13 nN on substrates with 4.7 μm long pillars, in agreement with the results on cylindrical posts with the same cell type (Fig. 1B).

Finally, previous studies have shown that cell migration could be influenced by substrate rigidity.^{13,23,24} The effect of stiffness anisotropy on the migration of 3T3 fibroblasts induces a directional motion of the cells whereas a random walk like motility is observed on substrates made with cylindrical micropillars. The analysis of individual cell trajectories presents an angular distribution of steps made by each cell between two consecutive images (see Material and methods section) that are strongly correlated with the stiffest direction of the substrate (Fig. 8A: 35% in a 30°-wide sector), whereas control experiments on substrates made of cylindrical posts led to an isotropic

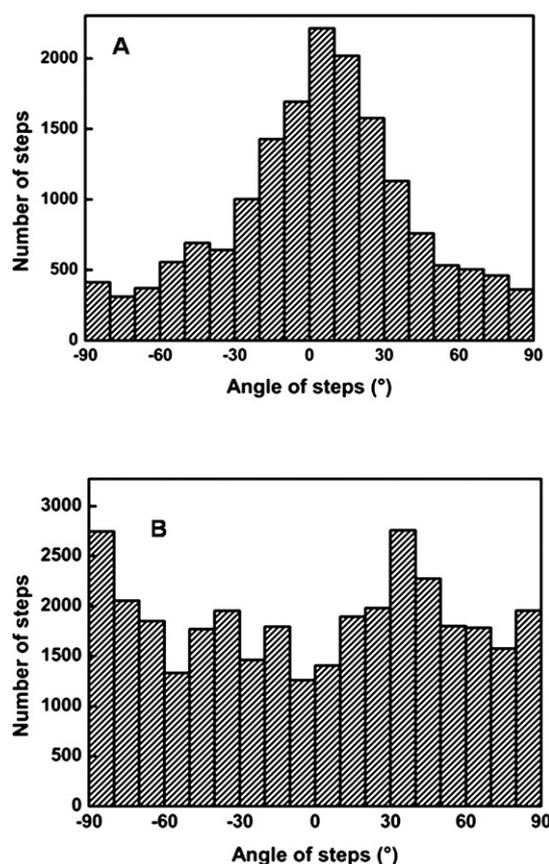


Fig. 8 Effects of the anisotropic rigidity on cell migration. (A) Histogram of migratory trajectories of individual cells on PDMS anisotropic micropillar substrates. The histogram represents the angular distribution of the displacements linking the centers of mass of the same cell on two consecutive images ($\Delta t = 60$ s) with respect to the stiffest direction. (B) Histogram of migratory trajectories of individual cells on an array of cylindrical micropillars.

distribution (Fig. 8B). These experiments demonstrate that a substrate with an anisotropic rigidity can govern the direction of motility.

Discussion

Understanding the active response of biological cells to various mechanical environments is an important issue for the rational design of artificial tissues, cellular self-assembly, wound healing and cell growth.^{7,42–45} Previous studies have shown that altering the stiffness of the underlying substrate under conditions that maintain a constant chemical environment can lead to drastic changes in the rates at which cells move, the force they apply on their substrate and whether or not they form actin stress fibers.^{13,14,25,46–48}

By using microfabricated surfaces, we aim at quantifying the morphological and physical properties of fibroblasts as a function of the rigidity of their substrate. Here, we have used μ FSAs to correlate the mechanical properties of epithelial cells and fibroblasts with the formation of FA and cytoskeleton organization. By tuning the geometric parameters of the pillars, we measure the influence of substrate stiffness on cell traction forces

for 3T3 fibroblasts and epithelial MDCK cells. For a range of substrate stiffness from 1 to 130 $\text{nN } \mu\text{m}^{-1}$, the average traction forces for both cell types vary linearly with the rigidity up to ~ 11 nN for fibroblasts and ~ 18 nN for MDCK cells. In this regime, it appears that cells maintain a constant displacement of around 150 nm. As the substrate stiffness overcomes 130 $\text{nN } \mu\text{m}^{-1}$, the force reaches a saturation value, maybe the limit of the mechanism by which they reinforce their cytoskeletons and/or their FA. Well-defined elongated FAs become prevalent only on the stiffer substrates as shown in this study for fibroblasts and in a previous one for MDCK cells.¹⁴ The spreading area of fibroblasts also increases with the substrate stiffness. Based on these findings, we define different states of cell-to-substrate interactions: on soft substrates, the cell is not fully spread and adhesion sites appear as blurred spots irregularly distributed. On stiff ones, cells spread and organize their adhesive contacts into stable FA. The finite size of focal adhesions may explain the plateau observed for high rigidities.

Cell-to-substrate interactions are controlled by a multitude of biochemical processes within the cell, which comprise an overall regulation mechanism. This mechanism can work in two alternative ways: it maintains either certain deformations or certain forces. Our results showing a linear increase of the forces in a certain range of rigidity may imply that cell traction forces are regulated to achieve a certain deformation of the matrix. Even if other studies⁴⁹ indicate that the force is maintained at an optimal value, a recent work by Nicolas *et al.*³⁰ predicts the dynamic evolution of cell–matrix adhesions as a function of the stiffness of the matrix. In the regime of their model corresponding to our experiments, FA reaches a saturation size proportional to the Young's modulus of the extracellular matrix. Consequently, the total force that each adhesion transmits to the substrate is also proportional to the matrix rigidity as observed in our experiments. This theoretical model can explain some trends observed in the force–rigidity relationship observed in the present study. Furthermore, a recent experiment showing that muscle cell contraction is correlated to the amplitude of elastic pillar deflections seems to confirm our observations.⁵⁰

This paper also proposes a simple model to directly compare the measurements on discrete substrates (such as μ FSAs) and continuous flexible ones. The estimation of the equivalent Young's modulus, E_{eff} , for a micro-textured substrates with pillar spring constants, k , leads to the following equation: $E_{\text{eff}} = 9k/4\pi a$. Even if our calculation only gives an estimation of the effective Young's modulus, the comparison between both techniques shows similar results (Fig. 3). The typical length, a , that relates E_{eff} and k has to be defined. We assume that the local force exerted by the cell is applied on a surface area $\sim a^2$ corresponding to the size of an adhesive contact.¹⁷ One should note that further experiments done with fluorescently labeled living cells could help improve our description by giving a precise colocalization of the growth of focal adhesions and forces on microstructured substrates.

Moreover, our substrates allow us to show that cell migration is oriented along the stiffest direction of anisotropic substrates. This orientation is correlated to a polarization of the actin cytoskeleton in the same direction. The measurements of the mechanical forces exerted in both directions of such substrates are in agreement with the ones obtained on cylindrical pillars.

Indeed, since the force–deformation relation is given by $F = k\delta x$, for a constant deformation δx , the largest forces exerted by cells are oriented in the more rigid direction. As a consequence, the cell orients in the direction of maximal stiffness of the environment, as observed in the present study. Again, the observation of the dynamic growth of focal adhesion on anisotropic substrates that should depend on the stiffness³¹ will be helpful to confirm these observations.

Recent experiments⁴⁵ have shown that cell differentiation can be tuned by changing the substrate rigidity. The versatility of the micropillar technique for locally changing the mechanical properties of the substrate could be a useful tool to study the dynamics and the mechanics of cell differentiation. Our findings suggest specific ways to characterize, control, or engineer cell growth and migratory patterns by tuning the cell–matrix interactions. Such interactions could be helpful to engineer artificial tissues as well as cell supports for tissue regeneration. In the same line, we also expect important applications for such substrates as tools to induce and control cell differentiation.

Acknowledgements

We acknowledge A. Asnacios, F. Gallet, P-G. de Gennes, J.-M. di Meglio, A. Nicolas, J. Prost, O. du Roure and S. Safran for helpful discussions, Alain Richert for cell culture and R. H. Austin and I. Roch-Jeune for their help in the microfabrication processes. We thank M. Glukhova for providing us with anti-vinculin monoclonal antibody. SEM observations have been obtained with the help of H. Boulekbache and D. Montero in Centre Interuniversitaire de Microscopie Electronique (CIME/Jussieu, Paris). This work was partly supported by grants from the Association pour la Recherche contre le Cancer, the Fondation de France, the ANR Program PNANO 2005 and the Ligue Contre le Cancer (Comité de Paris). This work was performed in part at the Cornell Nano-Scale Science and Technology Facility (USA) and the Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie (Villeneuve d'Ascq, France). A.X. and L.T. respectively acknowledge "Fondation de France"/"Région Ile-de-France" and the "ANR" for post-doctoral grants.

References

- 1 C. O'Neill, P. Jordan and G. Ireland, *Cell*, 1986, **44**, 489–496.
- 2 R. Singhvi, A. Kumar, G. P. Lopez, G. N. Stephanopoulos, D. I. C. Wang, G. M. Whitesides and D. E. Ingber, *Science*, 1994, **264**, 696–698.
- 3 M. P. Sheetz, D. P. Felsenfeld and C. G. Galbraith, *Trends Cell Biol.*, 1998, **8**, 51–54.
- 4 S. B. Carter, *Nature*, 1965, **208**, 1183–1187.
- 5 D. A. Lauffenburger and A. F. Horwitz, *Cell*, 1996, **84**, 359–369.
- 6 S. B. Carter, *Nature*, 1967, **213**, 256–260.
- 7 D. E. Discher, P. Janmey and Y. L. Wang, *Science*, 2005, **310**, 1139–1143.
- 8 X. F. Walboomers, W. Monaghan, A. S. G. Curtis and J. A. Jansen, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, **46**, 212–220.
- 9 A. I. Teixeira, G. A. Abrams, P. J. Bertics, C. J. Murphy and P. F. Nealey, *J. Cell Sci.*, 2003, **116**, 1881–1892.
- 10 R. J. Pelham and Y. L. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, **94**, 13661–13665.
- 11 D. Choquet, D. P. Felsenfeld and M. P. Sheetz, *Cell*, 1997, **88**, 39–48.
- 12 D. Riveline, E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger and A. D. Bershadsky, *J. Cell Biol.*, 2001, **153**, 1175–1185.

- 13 C. M. Lo, H. B. Wang, M. Dembo and Y. L. Wang, *Biophys. J.*, 2000, **79**, 144–152.
- 14 A. Saez, A. Buguin, P. Silberzan and B. Ladoux, *Biophys. J.*, 2005, **89**, L52–L54.
- 15 R. Paul, P. Heil, J. P. Spatz and U. S. Schwarz, *Biophys. J.*, 2008, **94**, 1470–1482.
- 16 M. Dembo and Y. L. Wang, *Biophys. J.*, 1999, **76**, 2307–2316.
- 17 N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi and B. Geiger, *Nat. Cell Biol.*, 2001, **3**, 466–472.
- 18 J. P. Butler, I. M. Tolic-Norrelykke, B. Fabry and J. J. Fredberg, *Am. J. Physiol.*, 2002, **282**, C595–C605.
- 19 A. K. Harris, P. Wild and D. Stopak, *Science*, 1980, **208**, 177–179.
- 20 C. G. Galbraith and M. P. Sheetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, **94**, 9114–9118.
- 21 O. du Roure, A. Saez, A. Buguin, R. H. Austin, P. Chavrier, P. Silberzan and B. Ladoux, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 2390–2395.
- 22 J. L. Tan, J. Tien, D. M. Pirone, D. S. Gray, K. Bhadriraju and C. S. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, **100**, 1484–1489.
- 23 A. Saez, M. Ghibaudo, A. Buguin, P. Silberzan and B. Ladoux, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 8281–8286.
- 24 S. R. Peyton and A. J. Putnam, *J. Cell. Physiol.*, 2005, **204**, 198–209.
- 25 G. Giannone, B. J. Dubin-Thaler, H. G. Dobereiner, N. Kieffer, A. R. Bresnick and M. P. Sheetz, *Cell*, 2004, **116**, 431–443.
- 26 G. Y. Jiang, A. H. Huang, Y. F. Cai, M. Tanase and M. P. Sheetz, *Biophys. J.*, 2006, **90**, 1804–1809.
- 27 T. Yeung, P. C. Georges, L. A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Y. Ming, V. Weaver and P. A. Janmey, *Cell Motil. Cytoskeleton*, 2005, **60**, 24–34.
- 28 A. Engler, L. Bacakova, C. Newman, A. Hategan, M. Griffin and D. Discher, *Biophys. J.*, 2004, **86**, 617–628.
- 29 R. De, A. Zemel and S. A. Safran, *Nat. Phys.*, 2007, **3**, 655–659.
- 30 A. Nicolas and S. A. Safran, *Biophys. J.*, 2006, **91**, 61–73.
- 31 I. B. Bischofs and U. S. Schwarz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, **100**, 9274–9279.
- 32 W. Roos, J. Ulmer, S. Grater, T. Surrey and J. P. Spatz, *Nano Lett.*, 2005, **5**, 2630–2634.
- 33 M. Thery, V. Racine, A. Pepin, M. Piel, Y. Chen, J. B. Sibarita and M. Bornens, *Nat. Cell Biol.*, 2005, **7**, 947–953.
- 34 A. Ganz, M. Lambert, A. Saez, P. Silberzan, A. Buguin, R. M. Mege and B. Ladoux, *Biol. Cell*, 2006, **98**, 721–730.
- 35 Y. F. Cai, N. Biais, G. Giannone, M. Tanase, G. Y. Jiang, J. M. Hofman, C. H. Wiggins, P. Silberzan, A. Buguin, B. Ladoux and M. P. Sheetz, *Biophys. J.*, 2006, **91**, 3907–3920.
- 36 S. Munevar, Y. L. Wang and M. Dembo, *Biophys. J.*, 2001, **80**, 1744–1757.
- 37 M. Dembo, T. Oliver, A. Ishihara and K. Jacobson, *Biophys. J.*, 1996, **70**, 2008–2022.
- 38 H. B. Wang, M. Dembo and Y. L. Wang, *Am. J. Physiol.*, 2000, **279**, C1345–C1350.
- 39 U. S. Schwarz, N. Q. Balaban, D. Riveline, A. Bershadsky, B. Geiger and S. A. Safran, *Biophys. J.*, 2002, **83**, 1380–1394.
- 40 K. Burridge, K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls and C. Turner, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1988, **4**, 487–525.
- 41 A. Curtis and C. Wilkinson, *Biomaterials*, 1997, **18**, 1573–1583.
- 42 S. Huang and D. E. Ingber, *Nat. Cell Biol.*, 1999, **1**, E131–E138.
- 43 M. Poujade, E. Grasland-Mongrain, A. Hertzog, J. Jouanneau, P. Chavrier, B. Ladoux, A. Buguin and P. Silberzan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 15988–15993.
- 44 C. M. Nelson, R. P. Jean, J. L. Tan, W. F. Liu, N. J. Sniadecki, A. A. Spector and C. S. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 11594–11599.
- 45 A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney and D. E. Discher, *Cell*, 2006, **126**, 677–689.
- 46 J. Solon, I. Levental, K. Sengupta, P. C. Georges and P. A. Janmey, *Biophys. J.*, 2007, **93**, 4453–4461.
- 47 P. C. Georges and P. A. Janmey, *J. Appl. Physiol.*, 2005, **98**, 1547–1553.
- 48 W. H. Guo, M. T. Frey, N. A. Burnham and Y. L. Wang, *Biophys. J.*, 2006, **90**, 2213–2220.
- 49 T. M. Freyman, I. V. Yannas, R. Yokoo and L. J. Gibson, *Exp. Cell Res.*, 2002, **272**, 153–162.
- 50 A. Kajzar, C. M. Cesa, N. Kirchgessner, B. Hoffman and R. Merkel, *Biophys. J.*, 2008, **94**, 1854–1866.

Substrate topography induces a cross-over from 2D to 3D behavior in fibroblast migration

Marion Ghibaudo, Léa Trichet, Alain Richert and Benoît Ladoux*

Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC), Université Paris Diderot and CNRS
UMR 7057, Paris – France

Corresponding author: Benoit Ladoux.

E-mail: benoit.ladoux@univ-paris-diderot.fr

Tel: +33 1 57 27 70 35

Fax: +33 1 57 27 62 11.

Adress: Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC)
Bâtiment Condorcet
Université Paris Diderot - CC7056
75205 PARIS CEDEX 13
FRANCE

Keywords: cell migration, microfabrication, substrate topography, cytoskeleton, focal adhesion, diffusion.

Abstract

In a three-dimensional environment, cells migrate through complex topographical features. Using micropatterned polydimethylsiloxane (PDMS) substrates, we investigate the influence of substrate topography on cell shape and movement. 3T3 and REF 52 fibroblastic cells are plated on chemically identical substrates either flat surfaces or microfabricated pillars with tunable sizes (both diameter and spacing from 5 to 10 μm). In such environments, migrating cells encounter alternating flat and rough surfaces that depend on the spacing between the pillars. The spacing affects the migration paths by changing the cell positioning with regard to the micropillars. Compared with cells on flat substrates, we observe an increase of the persistent time and a decrease of the diffusion coefficients of 3T3 cell migration on micro-textured surfaces, which depend on the substrate geometry. Cells on micropillar substrates exhibit more elongated and branched shapes with less actin stress fibers than cells on flat surfaces. By using YFP-paxillin stably transfected fibroblasts, we observe a preferential formation of focal adhesions (FAs) on/along micropillars and an increase of their life time compared to flat surfaces. The impact of cytoskeleton changes on cell migration was tested by treating cells with blebbistatin or overexpressing Rho to block myosin II activity and increase contractility, respectively. Both treatments exhibited opposite effects on cell migration in micropillar substrates with an increase of the persistent motion for myosin II inhibition and confined displacements for Rho overexpression. Finally, by analyzing cell movements at the frontier between flat and micropillar substrates, we show that cell migration through the micropillar substrates exhibits a “topotaxis” mechanism that depends on the spacing between the pillars.

Introduction

Many cellular processes, such as growth (1), differentiation (2), motility (3), and tumor metastasis (4), involve adhesion of living cells to external surfaces. Various factors, such as different chemoattractants, temperature, rigidity and topography of the extra cellular matrix (ECM), can modify cell migration by changing signal transduction pathways that affect cytoskeleton organization. The mechanisms and regulation of cell migration have been studied extensively in two-dimensional (2D) cell culture models. However, discrepancies between the behavior of cells in culture and *in vivo* have led growing numbers of research groups to switch to three-dimensional (3D) models, which better represent the microenvironment of living cells and tissues (5). 3D matrices include complex chemical, physical and topographical components and many cellular structures, such as stress fibers or FAs, can appear less obvious than familiar structures in flattened cells on 2D substrates (6).

Although most investigations have focused on chemical factors, accumulating evidence shows that cell adhesion and migration are also driven by the physical parameters of the surrounding environment (7). Cell migration may be directed toward increased substrate stiffness (8, 9), local or global external tensions can affect cell orientation and cytoskeleton dynamics (10-12) and cell adhesion is also modified by the ECM stiffness (9, 13). Additional guidance cues, such as grooves inscribed into the substrates, can guide cell adhesion and migration (14). Fibroblasts become elongated along the edges of the grooves on such substrates (15).

To understand cell responses to guidance signals induced by substrate topography, many studies have used micro- and nano-technologies to develop well-defined environments. Cell functions as well as mechanical forces exerted by cells have been examined using a large variety of topographical features obtained by micro-fabrication techniques, such as lines (16), ridges (17), columns (18, 19) or pits (20-23).

Despite the development of numerous strategies to analyze the cellular response to substrate topography, our knowledge concerning how cells detect, move over long time scales and respond in terms of cytoskeleton reorganization and formation of adhesive contacts to well-defined geometrical parameters of their environment and gradients of topographic features is still limited. In particular, FAs linked to the actin cytoskeleton play a key role in the establishment of contractile forces on the substrate (24-26). How FAs can transmit an extracellular topographic signal into a biochemical one and how their dynamics is affected by the topography with regard to 2D surfaces are still open questions. Moreover most of the previous studies that combined cell migration and topographical features are usually limited to small spatiotemporal scales (16, 18). Therefore, they provide little information about how the integration of the different mechanisms involved in cell migration (3) leads to the sustained long-term movement of the entire cell. Strong spatiotemporal correlations should characterize the alternating phases of directed migration, changes of direction, and polarization. Recent theoretical modeling (27) exhibits that anomalous dynamics characterize cell migration instead of a simple diffusive behavior like usual Brownian motion (16, 28). It is therefore important to perform long-term movement experiments in various environments to analyze their influence on cell migration. Finally, it remains largely unclear how cells “sense” combinations of topographic features and flat surfaces. As cells *in vivo* predominantly migrate through a 3D environment, are topography gradients able to reorient cell migration?

In this study, we used PDMS substrates patterned with micro-sized pillars of different heights and diameters to determine the responses of fibroblasts -3T3 and REF52 lines- on such substrates in terms of morphology, migration and cytoskeleton organization. Clear morphological changes in cell spreading and shape are correlated to the various environments. We systematically analyzed the cell motility by time-lapse video-microscopy to measure the mean square displacements over long time periods as a function of substrate topography. We

observed that cell migration was governed by diffusion dynamics that depends on the geometrical parameters of the substrate. The analysis of the mean square displacement (*MSD*) appeared as a clear criteria to study the influence of substrate topography on cell migration. Our results suggest that the organization of the actin cytoskeleton and FAs give fibroblastic cells the capacity to orient and migrate through micron-sized patterns. In particular, we observed that the life-time of FAs increased on micropillar substrates and that myosin II and cell contractility play an important role in the migration processes. Finally, by studying the cellular transmigration at the frontier between a 2D surface and a micropillar substrate, we showed that the topography could guide the directionality of cell migration depending on the micropillar spacing.

Materials and methods

Cell cultures and transfections

REF52 (kindly provided by A. Bershadsky), and 3T3 cells are maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% bovine calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 100 mg/mL glutamine. REF52 cells express a stable paxilin-YFP.

3T3 cells were transfected using Nanofectin reagent (PAA, Austria) using, for a 35mm Petri dish, 1 µg RhoV14-GFP plasmid (kindly provided by M. Coppey), 4 µl of Nanofectin reagent and 2x50 µl NaCl 150mM following the PAA protocol. Transfected cells were observed 24-48 hours after transfection.

Blebbistatin was added to the medium at a 75µM concentration. Due to the phototoxicity at wavelengths under 488nm, we put a 03 FCG 089 filter (Melles Griot) on the light path. We registered the cell behavior every 5 min on different positions.

Fabrication of microstructured PDMS substrates

PDMS micropillar arrays were prepared according to du Roure et al. (29) using conventional photolithography followed by a deep etching process ("Bosch Process"). Briefly, silicon wafers were patterned with an array of cylindrical pits in positive photoresist by photolithography. Bare parts of the wafers were then etched by the deep Si etching process down to the desired depth to obtain the negative pattern of the array. After a silanization step, a liquid silicone, poly(dimethylsiloxane) (PDMS) (Sylgard 184, Dow Corning), was poured over the silicon template, cured at 65°C for 15 h +/- 2h and peeled off the wafer in dry conditions. PDMS substrates were immersed for 1h with fibronectin (20µg/ml) (Sigma-Aldrich) in PBS buffer.

Characterization of the substrate

We used dimensionally calibrated macroscopic cylinders of this material and measured their compressions under a fixed normal strain to evaluate the Young's modulus of the PDMS, *E*. As *E* depends on the PDMS cured time, we used a consistent cure time of 15 h +/- 2h at 65°C corresponding to a Young's modulus of 2 MPa +/- 0.1 MPa. By performing SEM observations, we measured the dimensions of the pillars.

Time-lapse video microscopy

We acquired time-lapse images of cells on pillars on an Olympus BX51 upright and on an Olympus IX71 inverted microscope (Olympus, Rungis, France), both equipped with a on-stage heater maintaining the temperature at 37°C (LIS, Basel, Switzerland). To prevent gas exchange and water evaporation, the culture medium was covered with a thin layer of mineral

oil after addition of 15 mM HEPES into the solution to keep constant pH. Images were acquired by Photometrics Coolsnap ES (inverted microscope) and HQ² (upright one) cameras (Roper Scientific, Evry, France) using Metamorph software (Universal Imaging Corporation). For the 3T3 trajectories experiments, time-lapse sequences were acquired during 24 hours using a frame delay of 5 min on the inverted microscope. Images were taken using an Olympus 20X air objective (NA 0.40). Thanks to an automated stage driven by Metamorph (Marzhauser) we can acquire different areas during the same experiment (between 6 and 8). REF52 cells were observed with an Olympus 60X water immersion objective (NA 0.9). We used a PIFOC system (Physik Instrument, Universal Imaging Corporation) mounted on the objective to acquire image stacks at different z-positions.

Quantitative analysis of individual cell motility

To quantify cell migration, we used the time-lapse images acquired with ImageJ plugins (NIH, Bethesda). Individual cells were followed by tracking their center of mass. First, we used the FFT bandpass filter to eliminate the pillars from the pictures. For cell tracking, we used the Particle tracker plugin (Image J). By knowing all the positions as a function of time, we determined the cell speed and the *MSD*, $\langle d^2 \rangle$. For each substrate, *MSD* curves were obtained by averaging 10 trajectories with the same duration ~ 550 min.

The linear speed, V , was calculated by simply dividing the integrated travel distance by the total time of the trajectory T (Eq. 1, where x_i and y_i are coordinates at frame i).

$$V = \sum \frac{\sqrt{(x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2}}{T} \quad [1].$$

The *MSD* was determined by:

$$\langle d^2(t) \rangle = MSD(n\Delta t) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-1-n} [(x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2] \quad [2].$$

The increase of the *MSD* can be quantified by the logarithmic derivative:

$$\beta(t) = \frac{d \ln \langle d^2(t) \rangle}{d \ln(t)} \quad [3]$$

leading to a time-dependent increase $\langle d^2(t) \rangle = MSD(t) \approx t^{\beta(t)}$.

The persistent random walk equation (30-32) was then used to fit the *MSD* and determine the different regimes of cell migration:

$$\langle d^2 \rangle = 4D_{diff} (t - P(1 - e^{-t/P})) \quad [4]$$

D_{diff} is the diffusion coefficient of the Ornstein-Uhlenbeck (OU) process, and is referred to as the motility coefficient of the cell, and P is the persistence time of the motion.

FA Analysis

We first enhanced the contrast, filtering the background and adapting the brightness and contrast. We then used again Particle Tracker (ImageJ software). We determined the position of the adhesions for each picture and also the time they appeared and disappeared.

Scanning Electron Microscopy

For Scanning Electron Microscopy (SEM), cells were cultured on a μ FSA after their previous resuspension, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30min and then further rinsed 3

times with PBS buffer. Dehydration was performed by rinsing the samples through graded ethanol/water mixtures (50%, 70%, 80%, 90%, and finally twice 100%, each step for 10 min). Ethanol was slowly exchanged successively by amyl acetate and liquid CO₂. Finally, samples were dried using the critical point method and then sputter coated by a thin layer of an a gold/platinum alloy.

Confocal acquisitions

We used the confocal microscope SP5 (Leica, Germany) from the Institut Jacques Monod (Paris). We used a 63X oil immersion objective (Leica, HCX APO 63x/1,4 - 0,60) and acquired sequentially both Z-stacks and Y-stacks for different fluorophores, so that we can have the colocalisation of the different labeled proteins.

Immunofluorescent staining

For vinculin and actin fluorescence staining, cells are fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min at room temperature, rinsed three times with PBS and permeabilized (50 mM of NH₄Cl in PBS for 10 min and 0.1% TritonX-100 in PBS for 4 min). For actin labeling, cells are then stained with either Oregon green-conjugated phalloidin at a dilution of 1:100 or Phalloidin-FluoProbes[®] 547H (Interchim, Montluçon, France) at a dilution of 1:40.

Vinculin staining is performed by using a mouse anti-vinculin monoclonal antibody followed by incubation with secondary anti-mouse, FITC-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch) at a dilution of 1:128.

Results

Micropillar substrate topography

Variable micropillar substrates have been used to compare fibroblast cell behavior under the same chemical conditions. The dimensions of the pillars and their spacing were chosen to be relevant to modify cell migration processes. To create the substrates, PDMS was moulded on etched silicium wafers (see Materials and Methods). The size and shape of the holes, their spacing or other geometrical parameters were easy to vary by the microfabrication process. After peeling off PDMS from the wafer, the topographical features consist of a hexagonal array of cylindrical pillars with three different heights, L , from 2 to 10 μm , diameters, D , 5 and 10 μm and center-to-center spacing, S , 5 and 10 μm (see Table 1 and Fig. 1). For clarity, the micropillar substrates will be designated by these three numbers (H-D-S) in the following. Let us notice that due to the geometrical parameters that we used in the present study, the pillars were too stiff to be significantly deformed by cells. Indeed the spring constants of the pillars under compression, k_n , or shear, k_t , are given by the following formulas:

$$k_n \propto E \cdot \frac{d^2}{L} \text{ and } k_t \propto E \cdot \frac{d^4}{L^3}$$

where E , L and d are the Young's modulus of the PDMS, the length and the diameter of the pillars, respectively (29, 30). A rough estimation of the softest pillar spring constants used in this study leads to values of ~ 8000 and 200 nN/ μm for k_n and k_t , respectively. The substrates were then immersed with a fibronectin solution to promote cell adhesion and migration (see Materials and Methods). Flat PDMS and micropillar substrates were coated using the same chemical procedure and thus differed only in topographical features.

Cell positioning on the micropillar substrates

After plating cells for a few hours (at least 6h) onto the different micropillar substrates, we first used phase-contrast microscopy with low magnification (10X) to observe cell behaviour

and morphology on various conditions (Fig. 2). Compared to cells on the flat part of the substrates, cells on pillars (6-5-5) appeared to be more branched in shape (Fig. 2). In addition, the extension of these long protrusions following the grooves appeared as the key mechanism to guide cell migration in between the micropillar array (Fig. 2A and Movie 1, supplemental data). Once they spread on the flat surface, cells recovered standard 2D-shapes with the formation of a large lamellipodium (movie 1).

On pillars with larger spacing between them (7-10-10), 3T3 cells adopted different morphology and behaviour. We observed less long and thin extensions than on (6-5-5) substrates but pseudopodia-like protrusions that extended on the flat part of the substrate between the pillars (Fig. 2B). Cells appeared thus trapped in between the pillars and they frequently changed their direction of motion, as previously observed (18). The cell body extensions followed the topographical features and anchored around the pillars to move the cell forward (Fig. 2B).

We then used SEM to correlate these observations to the positioning of cells on micropillar substrates. 3T3 cells were fixed at low density on the surface to facilitate SEM observations after one day in standard cell culture conditions. For a pillar height around 2 μm , we observed that the morphological responses of the cells due to the topographical features were not significantly affected by the pillars and thus close to the ones observed on a flat PDMS substrate (Fig. 3). In agreement with our optical microscopy observations, a critical height of the pillars ($> 2 \mu\text{m}$) should be reached to obtain drastic modifications of the cellular responses as a function of the micropillar substrate, as observed at the interface between flat and pillars substrate (Fig. 3D). Furthermore, for the same values of S and D, we observed no major difference in cell positioning and morphology by increasing H above 6 μm (Fig. 3).

The relative position of fibroblast cells strongly depended on the spacing between the pillars. On (6-5-5) substrates, the cell body was mostly localized on the top of pillars whereas thin extensions that could reach lengths of 50 μm followed the micropillar array and ended in between the pillars (Fig. 3A). Such extensions that were confined by the spacing between the pillars were not observed on 2D surfaces (see also movie 1). By contrast, on (7-10-10) substrates, cells adhered both on the top of the pillars and in between. Some of them were thus suspended from pillar to pillar with anchored extensions guided by the topography and ending on the flat part of the substrate around the pillars (Fig. 3B). In both cases, cell body extensions that were constrained by the micropillars dragged cells to move from pillar to pillar. Due to these physical constraints, fibroblasts lacked this well-spread morphology observed for cells moving on 2-D substrates. In contrast, a predominantly bi- to tripolar spindle-shaped morphology with matrix-binding pseudopodia in between the pillars was observed (Fig. 3B). Such cell shapes shared similarities with the ones observed for cells embedded in 3D-matrices (33).

Morphological responses

In order to correlate the above results with a quantitative analysis of the cell morphology, we measured the projected spreading area of the cells on each substrate and their shape factor. The shape factor was defined as $4\pi A/P^2$ where A is the projected spreading area of the cell and P, the perimeter. Thus it corresponded to a measure of the degree of branching in cell shape. Concerning the spreading area of the cells, 3T3 cell surface was sensitive to topographical features since we obtained smaller values of 900 μm^2 on (6-5-5) and (7-10-10) substrates than on a flat PDMS substrate ($\sim 2500 \mu\text{m}^2$) (Fig. 4A). On smaller pillars in height, the influence of the topography was less pronounced ($\sim 1000 \mu\text{m}^2$ for (2-10-10)). For the shape factor, we obtained a value of 0.36 for cells on a flat surface whereas the measurements (6-5-5) and (7-10-10) substrates gave lower values of 0.25 and 0.22, respectively (Fig. 4B). These quantitative data confirmed our SEM and optical microscopy observations, exhibiting that cells on pillar substrates presented a more complex and branched shape.

Characterization of the migration paths

We performed migration experiments and analyzed the trajectories of migrating 3T3 fibroblasts on flat surfaces and micropillar substrates. The cells were observed for up to 24 hours. First, measurements of cell movement indicated that cells on pillar substrates moved at a smaller linear speed, V , (Eq. 1) than those on flat regions (15 ± 7 and 10 ± 5 $\mu\text{m/hr}$ for (6-5-5) and (7-10-10) vs. 23 ± 10 $\mu\text{m/hr}$, respectively). However since these results showed a large dispersion of speed measurements from one cell to another, we preferred to analyze the *MSD* displacements over long time periods to determine the effect of topography on cell movements. Fig. 5 (A-C) depicts the contours and the paths of migrating cells for 420 min on three different conditions ((A), flat surface; (B) (6-5-5); (C) (7-10-10)). Consistent with our earlier observations, 3T3 cells exhibited more confined trajectories on micropillar substrates than on the flat surface.

At first sight, the trajectories of the cells on the different substrates resembled those of normal Brownian particles. Such a movement should be characterized by a mean squared displacement, *MSD* (see Material and Methods), proportional to t^2 at short times corresponding to ballistic motion and t for long time intervals designating normal diffusion (32). We thus analyzed cell motion to determine the characteristics of the trajectories as a function of the topography. In agreement with previous experiments analyzing long-term movements (27), the *MSD* plotted for the different substrates exhibited a crossover between three different dynamical regimes (Fig. 5D). For short times ($\leq T_1$; phase I), the increase of the *MSD* did not fit with a ballistic scaling. T_1 values were roughly the same for the different experiments (~ 20 min). We looked at the logarithmic derivative of the *MSD*, $\beta(t)$ (see Material and Methods). In this first region, we obtained an exponent β below 1.5. In the phase II (up to T_2), the *MSD* increased with an exponent whose value depended on the topographical features varying from 1.3 on a micropillar substrate to 1.45 on a flat one. T_2 appeared as a measurement of the cross-over time before a purely diffusive regime. As expected, we obtained larger values (~ 260 and 445 min for (10-5-5) and (10-10-10) substrates, respectively) than the one on a flat surface (~ 130 min). Thus the duration of the persistent phase increased on micropillar substrates, confirming that the directionality of cell movements was enhanced by topographical features. At larger time scales, the *MSD* exhibited a transition with an exponent β that gradually decreased to reach values of ~ 1.0 for the different curves. 3T3 fibroblasts described a diffusive motion at long time scales, different from the one observed for epithelial cells (27).

These results were confirmed by fitting the curves with the persistent random walk equation (Eq. 4), indicating a good agreement ($R^2=0.998$) between our experimental data and the OU model for $T > T_1$ (Fig. 5). According to equation 4, T_1 corresponds to the persistent time, P . For $T \leq T_1$, since the exponent β was below 1.5, cell movements were not characterized by a ballistic motion as predicted by the OU model. It could explain the differences that we observed. However, the statistics was not high for short time scales and further experiments should be performed to confirm the observed behavior. Cell migration over long time periods exhibited a diffusive behavior as shown by the strong correlation between experimental data and the OU model (Fig. 5E). We analyzed the diffusion coefficients on the different substrates. Fibroblast cells moved less efficiently on micropillar substrates than on a flat surface, resulting in a reduced *MSD* for all times (Fig. 5). Moreover *MSD* were also smaller for all times on (10-5-5) substrates than on (10-10-10) substrates. Since we obtained a linear relation of the *MSD* with T for long time intervals for all curves, we measured the diffusion coefficient, D_{diff} , for the different substrates. It was more than twice as large on a flat surface (~ 11 $\mu\text{m}^2/\text{min}$) as on (10-10-10) substrate (5 $\mu\text{m}^2/\text{min}$) (Fig. 5F). On a (10-5-5) substrate, the diffusion coefficient was even smaller (2.4 $\mu\text{m}^2/\text{min}$), confirming a cell trapping mechanism at long time scales. On short pillars ($H \sim 2$ μm), the diffusion coefficients with values around

$\sim 6 \mu\text{m}^2/\text{min}$ decreased in comparison with a flat surface but stayed larger than the ones measured on high aspect ratio pillars. Altogether, these results showed that the analysis of cell migration allowed to decipher the important steps involved in cell migration in response to the environment.

Cytoskeleton and FAs organization and dynamics

As fibroblast cells exhibited different shapes on the micropillars and also interacted with them to promote their migration, we hypothesized that the organization of actin cytoskeleton as well as the formation of FAs (vinculin staining) may differ on the different substrates. We first used confocal microscopy to observe immunofluorescent stained cells on the micropillars. First, compared to cells spread on a flat substrate (Fig. 6A, A'), we observed less stress fibers and FAs on micropillar substrates (Fig. 6B-C'). On (7-10-10) substrate, cells were partly spread on the flat area in between the pillars. Actin was mostly recruited around the pillars but we also observed a strong expression in the formation of arches between two consecutive pillars (Fig. 6C), similar to the one showed on micropatterned 2D-surfaces (34). Interestingly, as shown on Fig. 6C, cellular branches that were associated with pillars contained actin filaments, confirming that cell movement on pillar substrates was promoted by actin reorganization. The analysis of fluorescently stained cells of vinculin protein showed that FAs were preferentially localized on the pillar edges, as previously observed (18) (Fig. 6C'). On (6-5-5) substrates, vinculin-positive structures were mostly distributed on pillars since a large part of the cell body stayed on the top of the pillars. Again, we observed that the thin cellular extensions contained actin filaments and their tips localized on the pillars an important recruitment of vinculin protein (Fig. 6B, B'). Even for a larger spacing between the features, we observed a reinforcement of vinculin staining at pillars indicating that topographic features increased the formation of focal adhesions.

We also observed the migration of cells located at the frontier between a flat PDMS surface and a micropillar substrate (Fig. S2). First, on fixed samples, vinculin-positive structures presented a dissymmetrical distribution between both parts: the fluorescent cytoplasmic signal was strongly enhanced on the micropillar part and thus the recruitment of vinculin proteins within FA-like structures was lower on this part of the substrate. Indeed, we observed less FAs appearing on the micropillar side (Fig. S2). Furthermore we observed the dynamics of FAs as cells entered into the micropillar substrate for a $10 \mu\text{m}$ -spacing. After seeding over night, the migration of cells was recorded by time-lapse phase microscopy over a period of 4-6 h. One typical example is shown in Fig. 7, in which a cell approached the boundary from the flat PDMS surface. When part of the leading edge encountered the micropillar side, we clearly observed that large FAs were preferentially formed on the side of the pillars, inducing the translocation of the cell body through the micropillar substrates. These results confirmed that cellular protrusions previously described were guided by actin reorganization and that the topography promoted stable cell adhesion.

To confirm these results, we used REF 52 cells, expressing YFP-paxillin (35), to analyze the dynamics of FAs formation. On substrates with a $10 \mu\text{m}$ -spacing between the pillars, we measured the turnover of FAs on flat surfaces and pillar substrates. The lifetime of FAs was increased when they were formed in the vicinity of the pillars (89 min) in comparison with the flat part of the substrate (28 min) (Fig. 8). Again, it appeared that the topography induced a stabilization of focal adhesions.

Effects of myosin-driven contractility on cell migration

To investigate the role of the cytoskeleton during cell migration, we modulated actomyosin contractility by perturbing the function of non-muscle Myosin II and Rho signaling pathway. First, 3T3 cells were plated onto the micropillar substrates and treated with $75 \mu\text{M}$ blebbistatin to inhibit myosin II (36). Blebbistatin treated cells were even more elongated than

non-treated ones. By analyzing their movement, we found a strongly enhanced directional movement on a (7-10-10) substrate (Fig. 5 D and E). The *MSD* of blebbistatin treated cells followed the same powerlaw for all times with an exponent $\beta \sim 1.5$, without any cross-over time to a diffusive behavior over 550 min. We showed that the stability of FAs and the organization of actin cytoskeleton were enhanced by the presence of micropillars. Thus the contractility removal did not allow the cells to strongly adhere along the micropillars, and thus, to change their migration direction by moving from pillar to pillar.

To test whether cytoskeleton contractility was required for the responses to substrate topography, cells were transfected with constitutively active GTP-ase RhoA (37) and placed on arrays of microposts. We plotted the migration paths of cells transfected with active RhoV14 plasmid (Fig. S2 A and B). The overexpression of Rho exhibited more confined trajectories of the cells than wild-type 3T3 cells on the micropillar substrate (Fig. S2 E and F). Furthermore we confirmed that the formation of stress fibers in these cells enhanced on a flat substrate whereas Rho transfection induced more branched elongated structures containing actin filaments that propagated over long distances (\sim tens of μm) on both types of substrates ((7-10-10) and (6-5-5)) in comparison to flat surfaces (Fig. S2 C and D). However, further experiments that were beyond the scope of the present study should be performed to over or down regulate the expression of Rho.

“Topotaxis” phenomenon

Similarly to some observations on the influence of physical gradients on cell migration (8, 15, 38), we looked at the migration of cells at the frontier between a flat part and a micro-textured one to determine if a topographical gradient could also induce a preferential direction of cell migration. We focused on individual 3T3 cells either coming from the flat surface or the micropillar substrate. After seeding for 6-8 h, the migration of cells was recorded by time-lapse phase microscopy over a period of 12-24 h. For each substrate, observations were successfully made with around 30 cells approaching the boundary from the micropillar side or from the flat one. The results reported below were consistently obtained among each set of cells. On pillars with small heights ($\sim 2 \mu\text{m}$), we did not observe any clear evidence that cells migrate preferentially towards one part or the other (data not shown). By increasing the height of the pillars, we observed an influence of the topography on cell migration. On (6-5-5) substrates, 80 % of the cells coming from the flat substrate did not cross the boundary. One typical example is given in Fig. 9A, in which a cell approached the boundary from the flat side, sent some protrusions in between the pillars but stayed on the flat part (see also supplemental material, Movie 2). In contrast, when cells approach the frontier from the micropillar part of the substrate, they migrated and spread onto the flat substrate (see movie 1). A similar result was obtained for a larger spacing ($10 \mu\text{m}$) between the pillars (7-10-10) (Fig. 9B) Interestingly we observed a different mechanism for cells coming from the flat part. Although we did not observe any preferential direction in the migration paths from flat to pillar or pillar to flat surface over the whole cell population, we showed that 75% of the cells ($n=26$) coming at the boundary from the flat substrate migrated through the micropillar (Fig. 9C). Altogether these results pointed out the role of the spacing between “obstacles” for cell migration guidance. According to these data, a transition occurred for a distance from pillar to pillar comprised between 5 and $10 \mu\text{m}$. The transmigration through micropillar substrates was blocked for a $5\mu\text{m}$ -spacing whereas most of the cells could transmigrate for a $10\text{-}\mu\text{m}$ one.

Discussion

Numerous studies have demonstrated that micropatterned substrates can modify cell functions including adhesion (39, 40), migration (18, 41, 42) and even differentiation (19). However, rather few studies are dealing with systematic analysis of the impact of micropillar sizes on

cell adhesion and migration whereas most of the cells *in vivo* evolve in a 3D matrix with variable porosity. Furthermore very little is known about the effect of topography gradients on cell migration.

In this study, we used PDMS substrates with various well-defined micropillar geometries to determine the influence of substrate topography on cell adhesion and migration of fibroblasts. Under the same chemical conditions, we varied the geometrical parameters of the substrates, *i.e.* diameter, height and spacing, to analyze the morphology of the cells and the dynamics of cell migration. We first established that cells presented a completely different morphology when plated on bumped surfaces as compared to the one on flat surfaces. Cells on pillars exhibited a more branched shape than on a flat surface. Interestingly, we observed that these phenomena strongly depended on the height and the spacing between the pillars. In particular, very thin and long protrusions were observed for a 5 μm -spacing whereas pseudopodia like structures were formed in between the pillars for a larger spacing. Such differences enhance the importance of the spacing between the microstructures. The geometrical constraints at the micrometer scale induced morphological changes of the cells by preventing the formation of extended lamellipodia and promoting thin extensions or pseudopodia. However, in both cases, these cellular protrusions were guided by substrate topography since they were preferentially formed in the vicinity of the micropillars. The height of the pillars, H , also appeared as a crucial parameter in the cellular processes guided by substrate topography: we did not observe any major differences for a cell migrating on a flat surface or on a micropillar substrate for $H < 2\mu\text{m}$.

Moreover substrate topography influences cell migration as shown on Fig. 5. By analyzing the trajectories of 3T3 cells on flat and micropatterned substrates over long time periods, we first established that the paths of migrating cells could not be simply described in terms of normal Brownian motion as previously shown for epithelial cells in an isotropic environment (27). By analyzing cell movements on different types of substrates including a flat surface over long time periods (up to 24 hours), we showed that the increase of the MSD differed from a ballistic t^2 scaling at short time scales but corresponded to a diffusive motion at long time scales. Our results demonstrated that the MSD strongly depended on the type of substrates. It enabled us to discriminate between the migration paths observed on the different substrates. In particular, the cross-over time between the persistent and diffusive regimes appeared as a clear signature of the migration process: it increased as the cell migrated on micropillar substrate with regard to a flat surface. Consequently, as the time of the diffusive regime appeared later on micropillar substrates, it confirmed that the directionality of cell movements was enhanced by topographical features. Furthermore, longer cross-over times were measured on (7-10-10) substrates than on (6-5-5) ones, showing that the formation of protrusions in between the pillars was an important factor to enhance the directionality of cell movements.

In the same line, we showed that cell migration on micropillar substrates was governed by actin polymerization and the formation of FAs. Our immunofluorescent staining experiments indicated the presence of F-actin in the cellular protrusions extended in between pillars. However we observed less stress fibers and FAs on micropillar substrates as compared to flat surfaces. The formation of focal adhesions was preferentially localized in the vicinity of the micropillars. Since an important part of the cell body was localized on the top of the pillars for a 5 μm -spacing, we observed focal adhesions on pillars. For a 10 μm -spacing, FAs were formed both on flat surfaces and on the pillars. However they appeared larger and more stable over time on pillars.

Altogether, these observations point out that the topographical features promote the guidance of actin cables and the formation of FAs as previously shown on various substrates (15, 18). The contractile cell machinery plays a key role to govern cell movements in response to topography. The enhanced stability of FAs and directionality of actin cables can thus explain why cell movements present more confined trajectories and longer persistent regimes on

micropillars than on flat surfaces. In other words, a possible mechanism for cell movements on micropillar substrates would be that the topographical features enhance the formation of adhesive contacts. Since focal adhesions are known to regulate traction forces (24), their preferential location at pillars drive the directionality of cell migration and induce a longer persistent movement than on a flat surface. The cellular response to substrate topography presents similarities with the responses to substrate rigidity. Previous studies have shown that fibroblasts exert stronger traction forces on stiff substrates than on soft ones (8, 40) which is correlated with an enhancement of anchorage through FAs. One can hypothesize that the substrate micropattern may increase the density of local contacts through integrin clustering. Additionally focal adhesions are known to regulate adhesion cell signaling through Rho and Rac GTPases (43). Here we showed that cell migration paths were strongly affected by an overexpression of RhoA inducing more confined trajectories than the ones observed in normal conditions. This phenomenon could be due to the stimulation of focal adhesions by activated Rho and thus lead to an increase of their stabilization on micropillars. Substrate topography could probably drive cell migration by modulating GTPases signaling pathways. The contractility, when the cell is anchored to the pillars through the FAs, allows the cell to move forward and to change its direction. The acto-myosin system is then essential to move in this environment. This result was confirmed by the experiments with blebbistatin-treated cells. Previous studies have shown that myosin II contractility was required for cell shape regulation (18, 44). Here, the inhibition of non-muscular myosin II induced persistent cell motion over long time scales as if cell movement was only governed by the geometrical constraints imposed by the micropillar hexagonal array and not by the specific attachment of cells along the pillars by actin driven protrusions and FAs that induced a cell motion from pillar to pillar. Our observations showed that cells adhering on micropatterned substrates presented some similarities with cells cultured in a 3D environment. Recent studies have shown that Rac activity was modulated between 2D- and 3D-environment, changing cell patterns of migration (45). Microfabricated substrates thus appeared as a useful tool to study cell migration in well-defined environments. Further experiments should be performed to analyze both roles of Rac and Rho on cell migration within micropatterned substrates.

Finally, we observed that the spacing between the pillars was an important parameter that modified the cell response to topographical features. Cell adhesion, spreading and morphology presented different characteristics on (7-10-10) and (6-5-5) substrates. For a 5 μm -spacing, the main part of the cell body was located on the top of the pillars whereas cells formed larger protrusions and easily dived in between the pillars for a 10- μm one. Furthermore our experiments done at the frontier between the bumpy surface and the flat one confirmed that the ability of cells coming from the flat surface to cross this frontier was compromised or enhanced for a 5 or 10 μm -spacing, respectively. Thus our experiments exhibit a critical distance comprised between these two values for the transmigration of fibroblasts through micro-environments. As for now, the exact interpretation of this critical distance is still unclear. However we can assume that the nucleus, especially its stiffness (46), could play a key role in the migration on micropillar substrates by probing the topographical features to be deformed. Further experiments with variable spacing between consecutive pillars should clarify this point.

This work provides an extensive study of cell responses to substrate topography. We showed that microfabricated substrates were helpful to study the cellular responses in environments between 2D and 3D with well-defined chemical and mechanical properties. Our results highlight that both cellular and molecular functions are affected by the geometrical features of the substrate. A careful analysis of cell movement and molecular processes enables us to discriminate between the different responses of fibroblasts as a function of substrate topography. Thus these different morphological and dynamical behaviors may have strong

insights in defining strategies for discriminating between cellular phenotypes, especially in the case of cancer progression.

Acknowledgements

We acknowledge A. Buguin, K. Dahl, G. Grégoire, P. Silberzan and Y.-L. Wang for helpful discussions, I. Roch-Jeune for her help in the microfabrication processes, T. Piolot and A. Malfat for their help in the confocal pictures acquisition. We thank M. Glukhova for providing us anti-vinculin monoclonal antibody and A. Bershadsky for YFP-paxillin transfected REF 52 cell line. SEM observations have been performed with the help of H. Boulekbache and D. Montero in Centre Interuniversitaire de Microscopie Electronique (CIME/Jussieu, Paris). Confocal acquisitions have been performed at the Imaging platform at the Institut Jacques Monod (IJM, Paris). This work was performed in part at the « Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie » (Villeneuve d'Ascq, France). L.T. acknowledges the “ANR” for postdoctoral grants. This work was partly supported by grants from the “ANR” (Program PNANO 2005), the region Ile-de-France (CNano Program), the “CNRS” (Programme Prise de Risque), the “Association Française contre les Myopathies” and the “Ligue Contre le Cancer” (Comité de Paris).

References

1. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:11594-11599.
2. Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126:677-689.
3. Lauffenburger, D. A., and A. F. Horwitz. 1996. Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369.
4. Comoglio, P. M., and L. Trusolino. 2005. Cancer: the matrix is now in control. *Nature medicine* 11:1156-1159.
5. Even-Ram, S., and K. M. Yamada. 2005. Cell migration in 3D matrix. *Current Opinion in Cell Biology* 17:524-532.
6. Cukierman, E., R. Pankov, and K. M. Yamada. 2002. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current Opinion in Cell Biology* 14:633-639.
7. Vogel, V., and M. Sheetz. 2006. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7:265-275.
8. Lo, C. M., H. B. Wang, M. Dembo, and Y. L. Wang. 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical Journal* 79:144-152.
9. Saez, A., M. Ghibaudo, A. Buguin, P. Silberzan, and B. Ladoux. 2007. Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:8281-8286.
10. Eastwood, M., V. C. Mudera, D. A. McGrouther, and R. A. Brown. 1998. Effect of precise mechanical loading on fibroblast populated collagen lattices: Morphological changes. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 40:13-21.
11. Rivelino, 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 mDial-dependent and ROCK-independent mechanism. *Journal of Cell Biology* 153:1175-1185.
12. Icard-Arcizet, D., O. Cardoso, A. Richert, and S. Henon. 2008. Cell stiffening in response to external stress is correlated to actin recruitment. *Biophysical Journal* 94:2906-2913.
 13. 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* 116:431-443.
 14. Curtis, A., and C. Wilkinson. 1997. Topographical control of cells. *Biomaterials* 18:1573-1583.
 15. Walboomers, X. F., W. Monaghan, A. S. G. Curtis, and J. A. Jansen. 1999. Attachment of fibroblasts on smooth and microgrooved polystyrene. *Journal of Biomedical Materials Research* 46:212-220.
 16. Tzvetkova-Chevolleau, T., A. Stephanou, D. Fuard, J. Ohayon, P. Schiavone, and P. Tracqui. 2008. The motility of normal and cancer cells in response to the combined influence of the substrate rigidity and anisotropic microstructure. *Biomaterials* 29:1541-1551.
 17. Kaiser, J. P., A. Reinmann, and A. Bruinink. 2006. The effect of topographic characteristics on cell migration velocity. *Biomaterials* 27:5230-5241.
 18. Frey, M. T., I. Y. Tsai, T. P. Russell, S. K. Hanks, and Y. L. Wang. 2006. Cellular responses to substrate topography: Role of myosin II and focal adhesion kinase. *Biophysical Journal* 90:3774-3782.
 19. Steinberg, T., S. Schulz, J. P. Spatz, N. Grabe, E. Mussig, A. Kohl, G. Komposch, and P. Tomakidi. 2007. Early keratinocyte differentiation on micropillar interfaces. *Nano Letters* 7:287-294.
 20. Hamilton, D. W., B. Chehroudi, and D. M. Brunette. 2007. Comparative response of epithelial cells and osteoblasts to microfabricated tapered pit topographies in vitro and in vivo. *Biomaterials* 28:2281-2293.
 21. Charest, J. L., A. J. Garcia, and W. P. King. 2007. Myoblast alignment and differentiation on cell culture substrates with microscale topography and model chemistries. *Biomaterials* 28:2202-2210.
 22. Ganz, A., M. Lambert, A. Saez, P. Silberzan, A. Buguin, R. M. Mege, and B. Ladoux. 2006. Traction forces exerted through N-cadherin contacts. *Biology of the Cell* 98:721-730.
 23. Tan, J. L., J. Tien, D. M. Pirone, D. S. Gray, K. Bhadriraju, and C. S. Chen. 2003. Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:1484-1489.
 24. 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. *Nature Cell Biology* 3:466-472.
 25. Saez, A., A. Buguin, P. Silberzan, and B. Ladoux. 2005. Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformations or forces? *Biophysical Journal* 89:L52-L54.
 26. Chen, C. S., J. Tan, and J. Tien. 2004. Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annual Review of Biomedical Engineering* 6:275-302.
 27. Dieterich, P., R. Klages, R. Preuss, and A. Schwab. 2008. Anomalous dynamics of cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:459-463.

28. Stokes, C. L., D. A. Lauffenburger, and S. K. Williams. 1991. Migration of individual endothelial cells - stochastic model and parameter measurement. *Journal of Cell Science* 99:419-430.
29. du Roure, O., A. Saez, A. Buguin, R. H. Austin, P. Chavrier, P. Silberzan, and B. Ladoux. 2005. Force mapping in epithelial cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:2390-2395.
30. Shreiber, D. I., V. H. Barocas, and R. T. Tranquillo. 2003. Temporal variations in cell migration and traction during fibroblast-mediated gel compaction. *Biophysical Journal* 84:4102-4114.
31. Selmeczi, D., S. Mosler, P. H. Hagedorn, N. B. Larsen, and H. Flyvbjerg. 2005. Cell motility as persistent random motion: Theories from experiments. *Biophysical Journal* 89:912-931.
32. Uhlenbeck, G. E., and L. S. Ornstein. 1930. On the theory of the Brownian motion. *Physical Review* 36:0823-0841.
33. Friedl, P., and E. B. Brocker. 2000. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57:41-64.
34. They, M., V. Racine, M. Piel, A. Pepin, A. Dimitrov, Y. Chen, J. B. Sibarita, and M. Bornens. 2006. Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:19771-19776.
35. Zamir, E., B. Z. Katz, S. Aota, K. M. Yamada, B. Geiger, and Z. Kam. 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science* 112:1655-1669.
36. Limouze, J., A. F. Straight, T. Mitchison, and J. E. Sellers. 2004. Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 25:337-341.
37. 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* 70:389-399.
38. Curtis, A. S. G., and C. D. Wilkinson. 1998. Reactions of cells to topography. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 9:1313-1329.
39. Chen, C. S., M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science* 276:1425-1428.
40. Ghibaudo, M., A. Saez, L. Trichet, A. Xayaphoummine, J. Browaeys, P. Silberzan, A. Buguin, and B. Ladoux. 2008. Traction forces and rigidity sensing regulate cell functions. *Soft Matter* 4:1836-1843.
41. Jiang, X. Y., D. A. Bruzewicz, A. P. Wong, M. Piel, and G. M. Whitesides. 2005. Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:975-978.
42. Gustavsson, P., F. Johansson, M. Kanje, L. Wallman, and C. E. Linsmeier. 2007. Neurite guidance on protein micropatterns generated by a piezoelectric microdispenser. *Biomaterials* 28:1141-1151.
43. Mackay, D. J. G., 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. *Journal of Cell Biology* 138:927-938.
44. Mader, C. C., E. H. Hinchcliffe, and Y. L. Wang. 2007. Probing cell shape regulation with patterned substratum: requirement of myosin II-mediated contractility. *Soft Matter* 3:357-363.
45. Pankov, R., Y. Endo, S. Even-Ram, M. Araki, K. Clark, E. Cukierman, K. Matsumoto, and K. M. Yamada. 2005. A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *Journal of Cell Biology* 170:793-802.

46. Dahl, K. N., P. Scaffidi, M. F. Islam, A. G. Yodh, K. L. Wilson, and T. Misteli. 2006. Distinct structural and mechanical properties of the nuclear lamina in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:10271-10276.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1: Schematic representation of the micropillar substrates indicating the important geometrical parameters (H, D and S correspond respectively to the height, the diameter and the spacing between the pillars). Scanning Electron Micrographs of the different types of pillars used in this study. Bar = 5 μm

Figure 2: Cell adhesion on micropillar substrates. (A) Phase contrast image at the boundary between a flat surface and the micropillar substrate (6-5-5). Scale bar = 50 μm . (B) DIC image of a cell migrating on a (7-10-10) substrate. Scale bar = 20 μm .

Figure 3: SEM pictures of 3T3 cells on the different types of pillars: (A) on (10-5-5) substrates, cells are mainly on the top of them and present long protrusions up to 60 μm ; (B) and (B') cells are spread on the top and in between the pillars occupying the whole spacing available on (10-10-10) substrate; (C) spread cells on (2-5-5) substrates present a morphology close to the one observed on flat surfaces. (D) Cells at the interface between a flat substrate and a (6-5-5) micropillar substrate exhibit a change of morphology with a large lamellipodium on the flat part and branched structures on the pillars. Scale bars = 20 μm .

Figure 4: Projected spreading area (A) and shape factor (B) of 3T3 cells on flat, (6-5-5) and (7-10-10) substrates.

Figure 5: Five typical trajectories of 3T3 cells on flat (A), (6-5-5) (B) and (7-10-10) (C) substrates, for the same duration (420 min). (D) Plot of the *MSD* as a function of time for different substrates. T_1 corresponds to the first regime for short time scales. T_2 corresponds to the cross-over time before the diffusive regime for a flat substrate and the micropillar substrates ((10-10-10), (5-10-10)) and is indicated for the different substrates. The black curve represents the *MSD* of blebbistatin treated cells. In this case, we do not observe the diffusive regime at long time scales. (B) Log-log plots of the *MSD* as a function of time. Experimental data (dashed curves) are fitted by the OU model (continuous curves). Each color corresponds to a different substrate. The black curve corresponds to the cells treated with blebbistatin that can not be fitted by the OU model since it does not exhibit a diffusive regime. For the flat surface, the *MSD* is over all the others and the (10-10-10) is over the (10-5-5) one. For all these curves, we can distinguish two different regimes, which is not the case for the surface with blebbistatin : there is no diffusion behavior, the cells are guided by the spacing in between the pillars and cannot change their direction. (C) Diffusion coefficients, D_{diff} , obtained by the OU model. The diffusion coefficient is higher on flat substrates than on micropillar ones.

Figure 6: Confocal images of immunofluorescent staining of actin (A, B, C) and vinculin (A', B', C'). (A) and (A') on a flat surface; (B) and (B') on a (6-5-5) substrate and (C) and (C') (7-10-10) substrates. Less stress fibers were observed on the micropillar substrates. Focal adhesions are present all over the cell (A'), on the top of the pillars, with a diffuse signal in the cytoplasm (B', arrows for examples) or only on the side of pillars (C', arrows). Scale bars = 20 μm .

Figure 7: Transmigration of a REF 52 cell stably transfected with YFP-paxillin from the flat surface into the micropillar substrate (7-10-10). The red arrows show the nucleus, whereas the white ones highlight two FAs on pillar edges. The cell crawled in between the pillar and the

nucleus was deformed (90 min). When the cell was fully spread in between the pillar (after 90 minutes), most of the FAs were localized on pillar sides. The diameter of the pillars is 10 μm . Duration = 185 min.

Figure 8: Stability of focal adhesions on pillar substrates and flat surfaces. Average life time of focal adhesions, determined using REF 52 cells stably transfected with YFP-paxillin, shows an increase for focal adhesions on pillars compared to those on the flat PDMS surface. Bars represent the average life time for 20 to 30 focal adhesions in 3 cells under each condition.

Figure 9: Movements of 3T3 cells at the boundary between a micropillar substrate and a flat surface. Images were recorded with phase illumination. (A) A cell moved from the micropillar side of the substrate (6-5-5) toward the flat one. The cell moved along the boundary and stayed on the flat side. (B) A cell moved from the micropillars on a (6-5-5) substrate toward the flat part of the substrate. The cell migrated through the micropillars and spread on the flat surface. (C) A cell moved from the micropillar side of the substrate (7-10-10) toward the flat one. The cell entered through the micropillar and changed its morphology. Scale bars = 10 μm and duration \sim 5 hours.

Name	Height	Diameter	Spacing
(2-5-5)	1.9	5	5
(2-10-10)	2.1	10	10
(6-5-5)	5.7	5	5
(7-10-10)	7	10	10
(10-5-5)	9.7	5	5
(10-10-10)	10.7	10	10

Table 1, Ghibaudo et al.

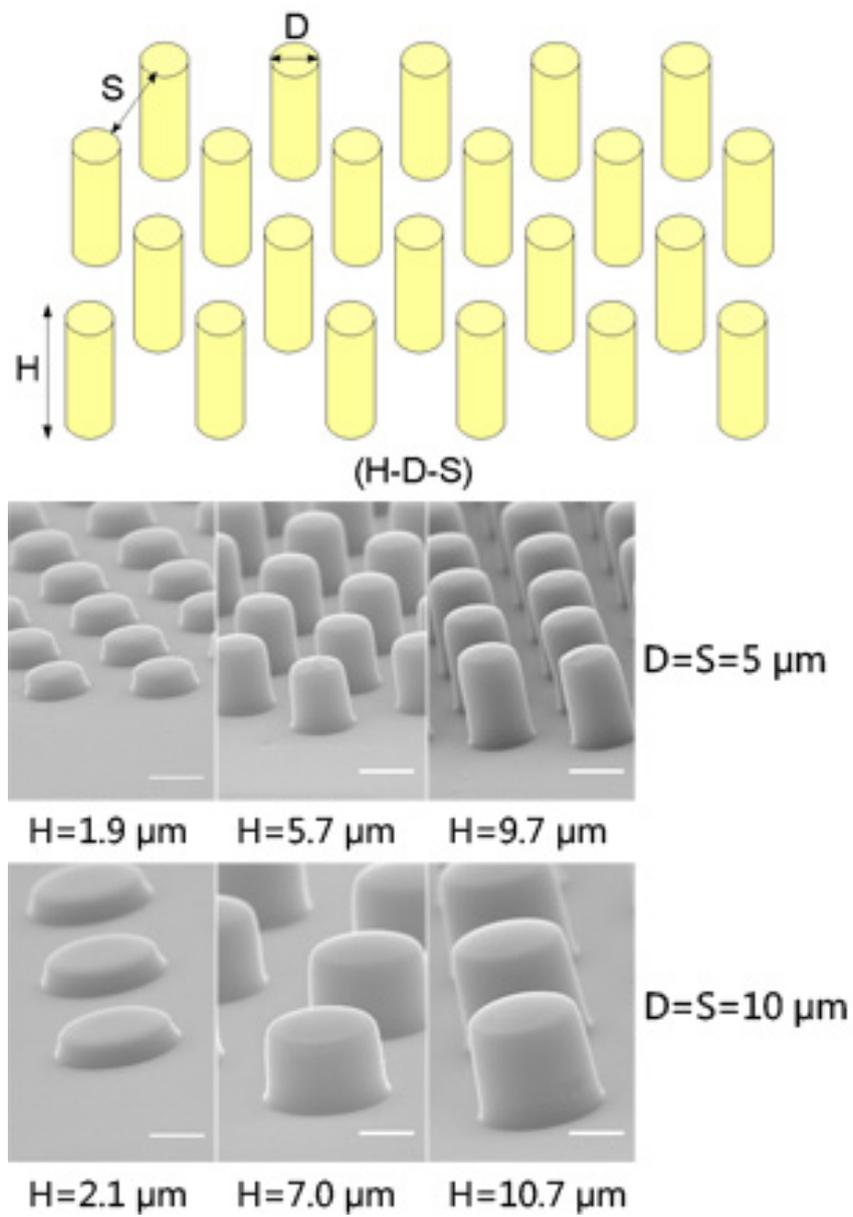


Figure 1, GHIBAUDO et al.

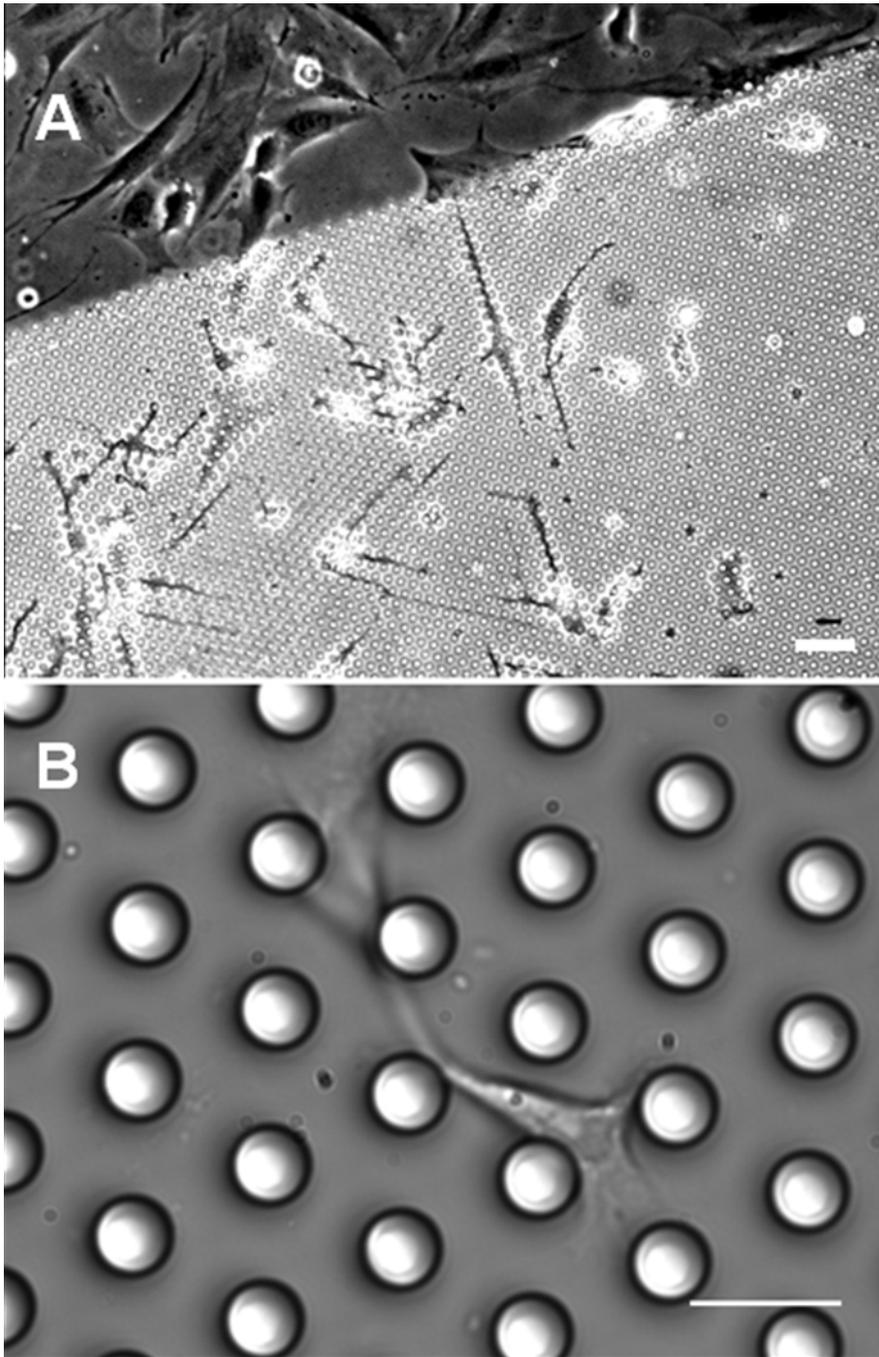


Figure 2, GHIBAUDO et al.

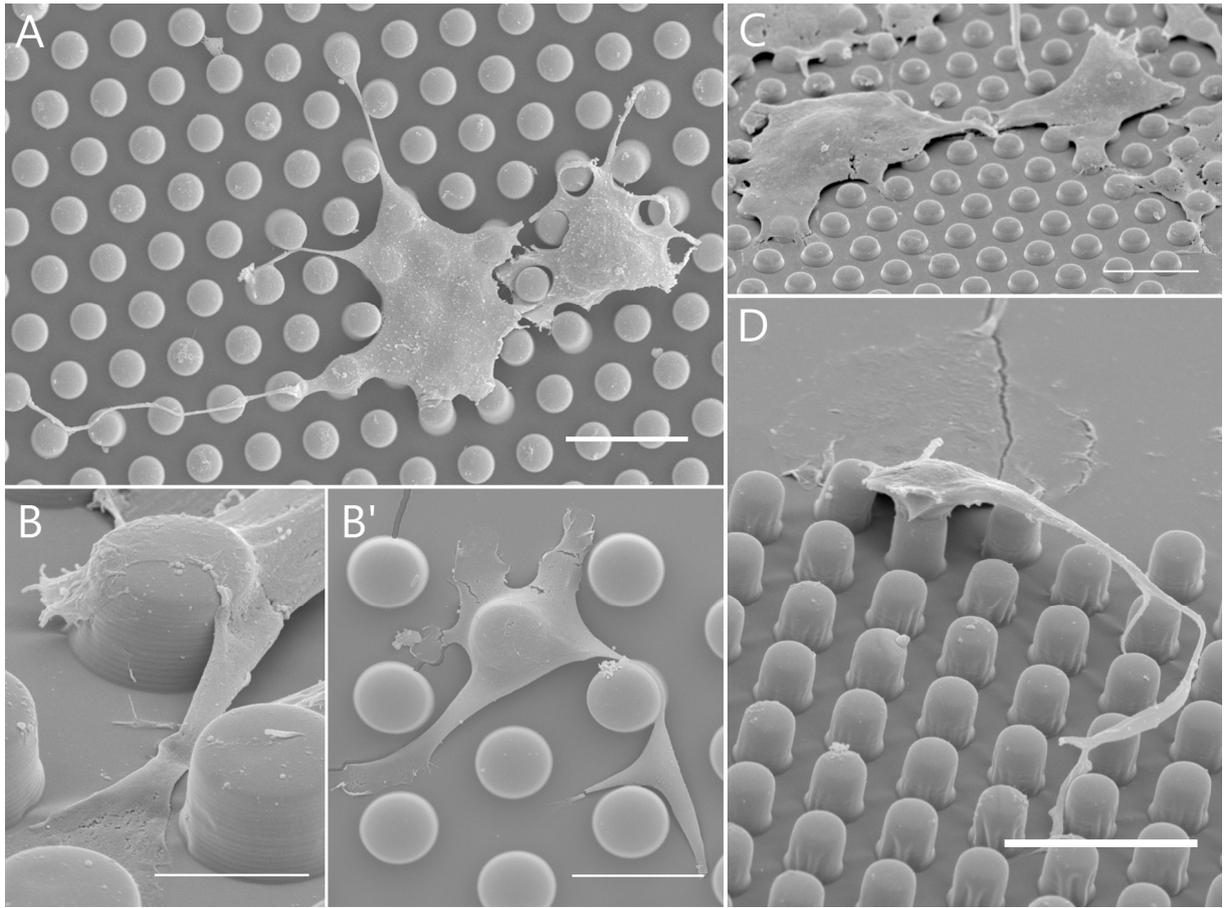


Fig. 3, GHIBAUDO et al.

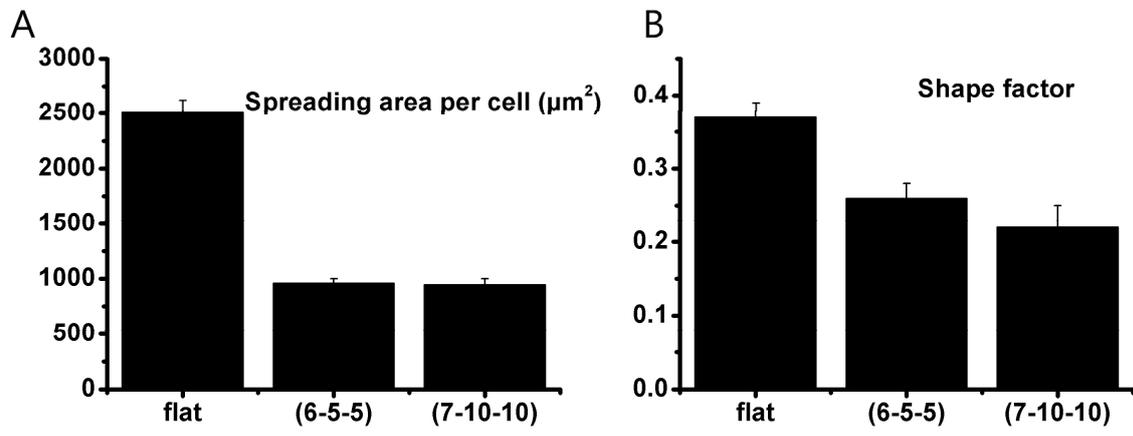


Figure 4, GHIBAUDO et al.

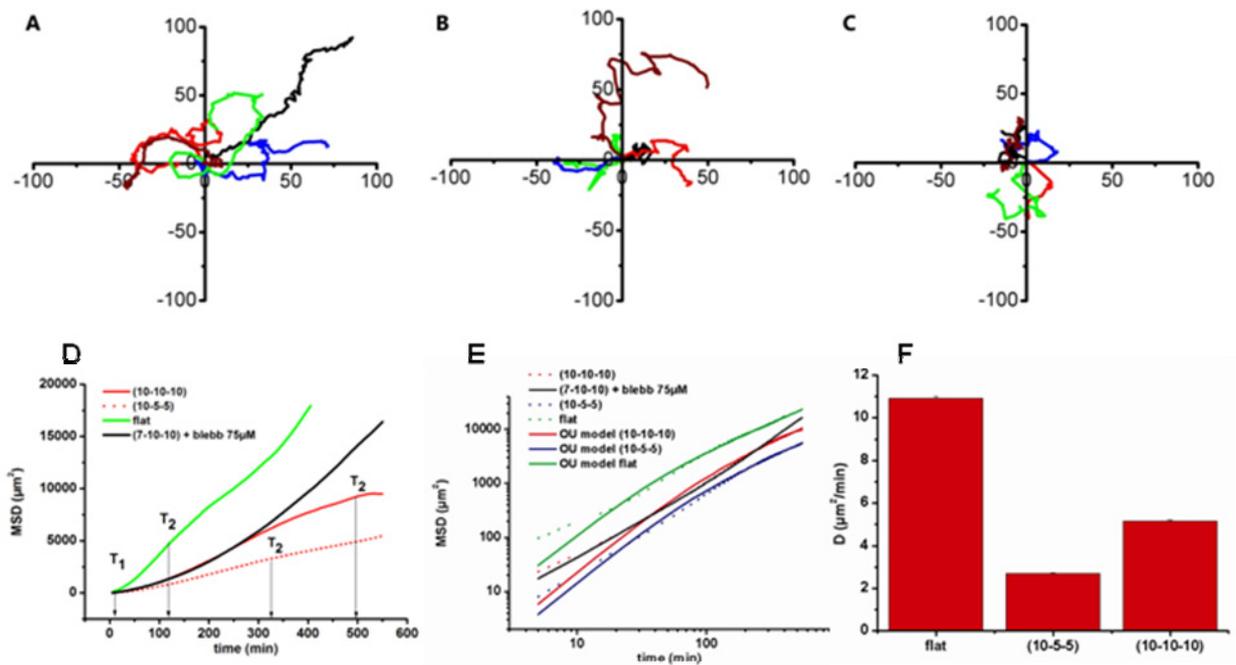


Figure 5, GHIBAUDO et al.

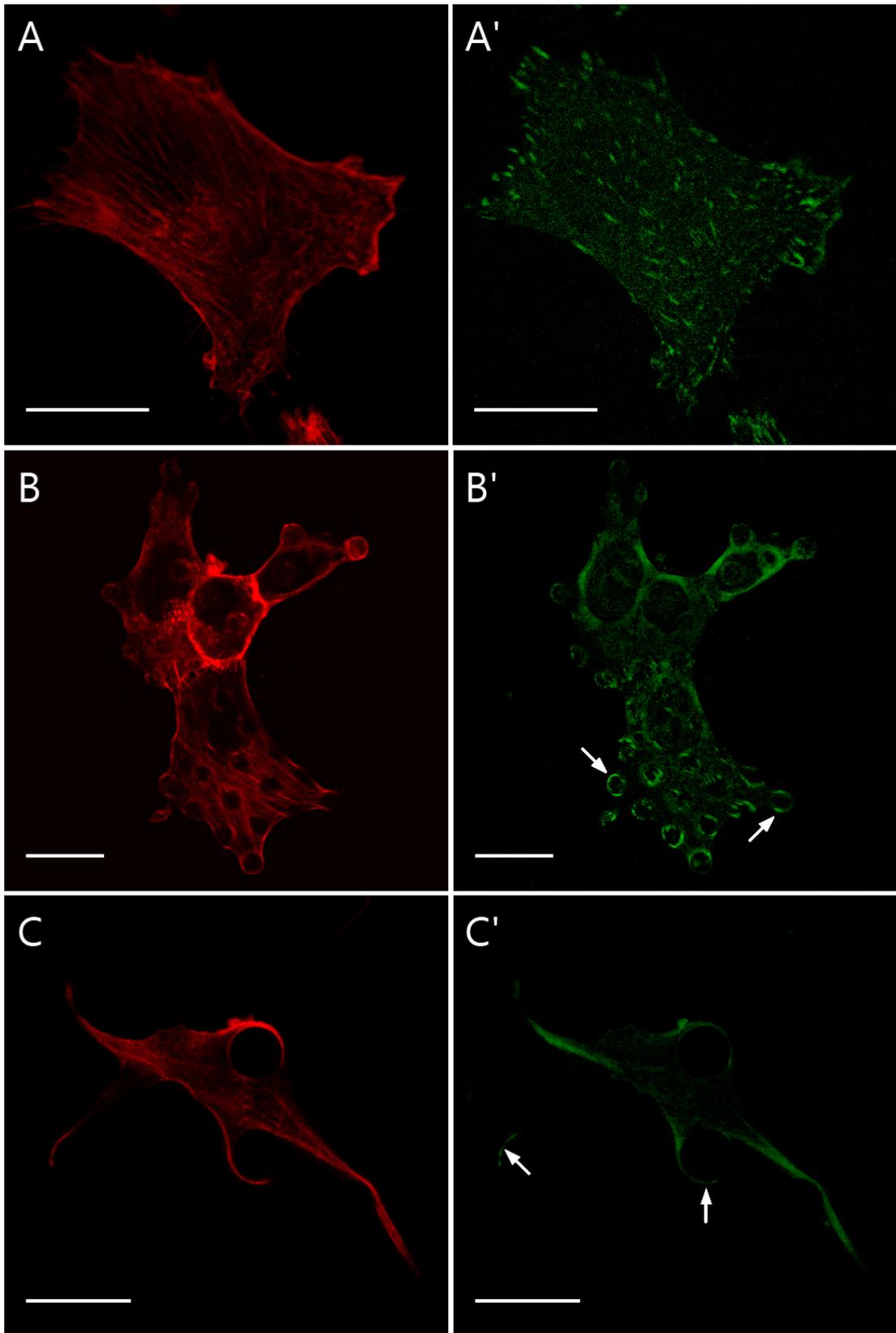


Fig. 6, GHIBAUDO et al.

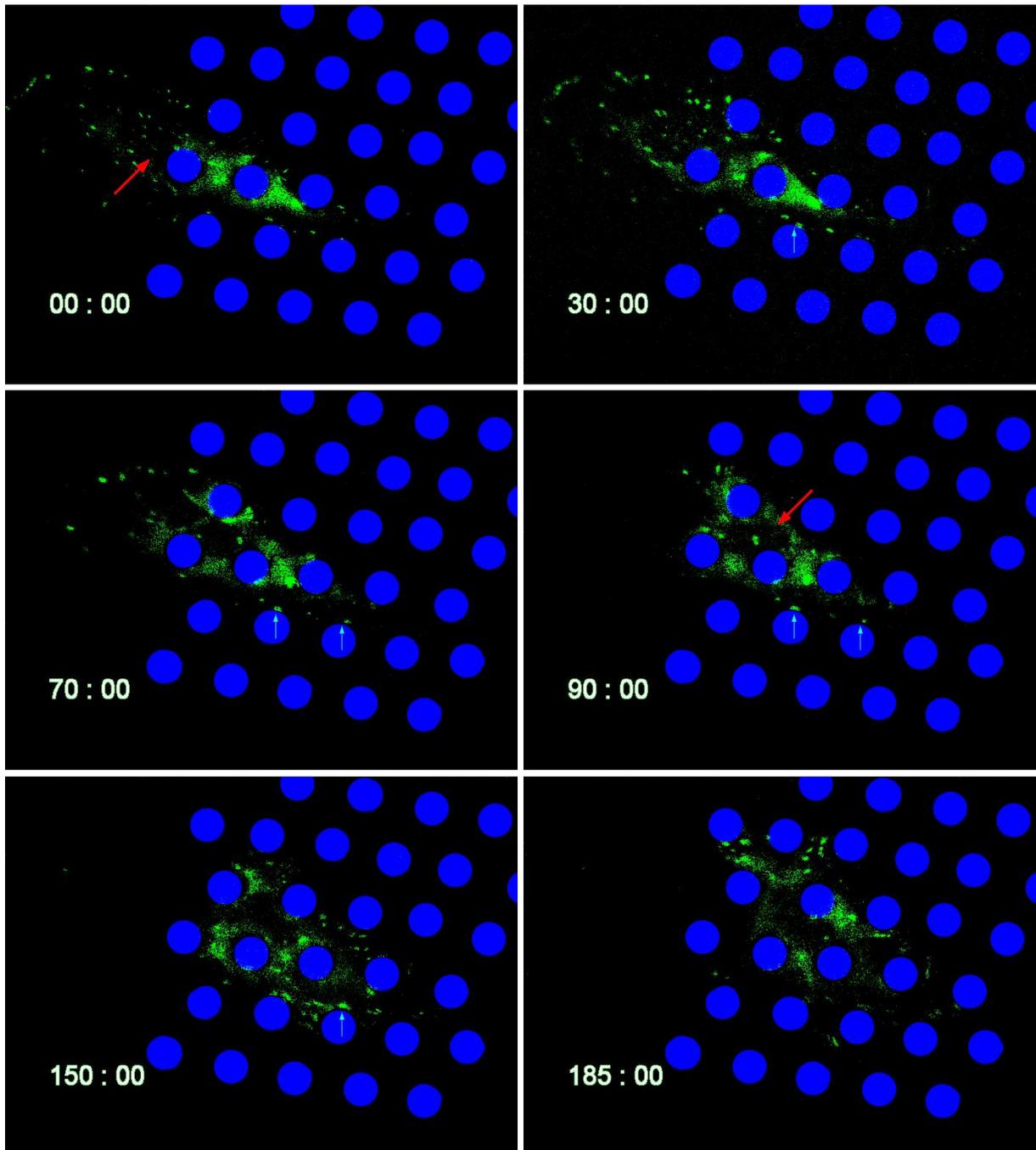


Figure 7, GHIBAUDO et al.

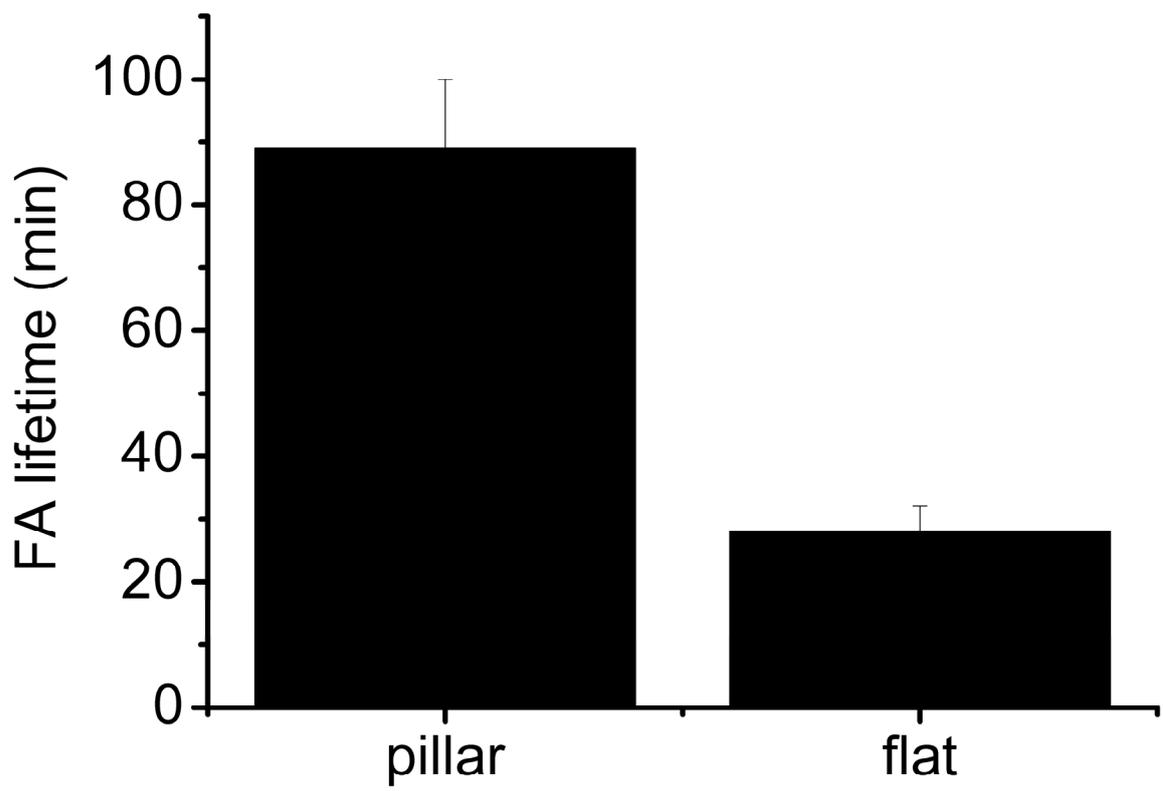


Figure 8, GHIBAUDO et al.

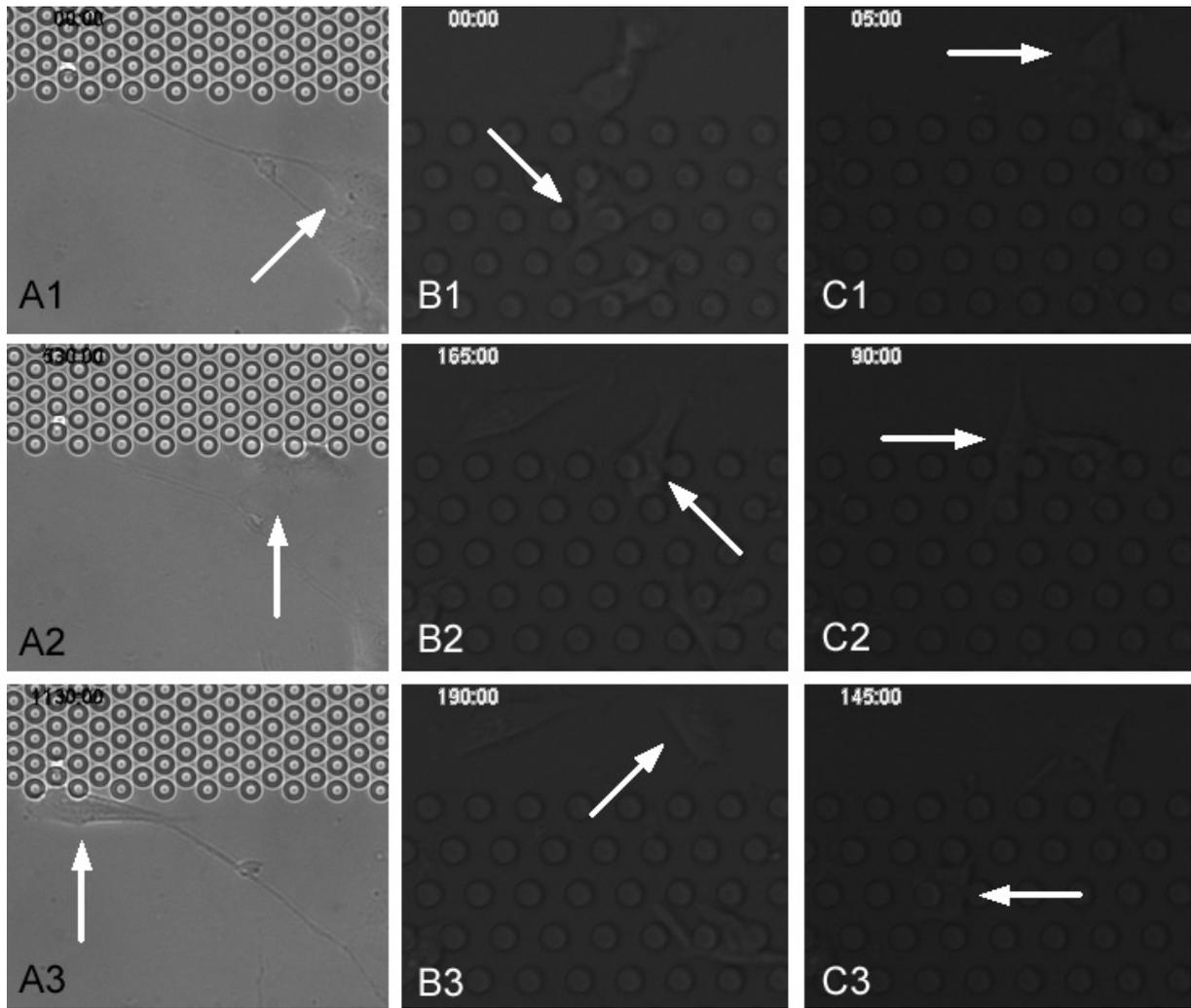


Figure 9, GHIBAUDO et al.

Résumé

L'adhésion et la migration des cellules jouent un rôle important dans de nombreux mécanismes cellulaires qui vont de la morphogenèse à la prolifération tumorale en passant par la réparation des tissus. Il est maintenant bien établi que l'environnement physique et mécanique des cellules a une grande influence sur de nombreuses fonctions cellulaires comme l'adhésion et la migration ainsi que sur leur devenir et donc leur différenciation. Pour contrôler les propriétés de l'environnement cellulaire, nous avons choisi de combiner des méthodes de micro-fabrication issues de la microélectronique aux techniques de biologie cellulaire et moléculaire. Nous nous sommes notamment intéressés à l'influence de la rigidité du support sur la migration cellulaire et les forces mécaniques exercées par les cellules, des fibroblastes, sur la matrice. Pour cela, nous avons utilisé un substrat constitué de micro-piliers flexibles, qui ont servi de micro-capteurs de force. Nous avons montré que les cellules employées adaptent les forces qu'elles exercent sur leur support à la rigidité de ce dernier. Nous avons ensuite étudié l'influence de la topographie du substrat sur la migration cellulaire. Nous avons pour cela également utilisé des micro-piliers, mais dont le diamètre est 5 à 10 fois supérieur aux précédents. Les cellules, en migrant, rencontrent donc alternativement des surfaces lisses et rugueuses. Nous avons montré que dans ces environnements, les cellules adoptent un comportement s'approchant de celui observé dans un gel tridimensionnel et que le noyau joue un rôle dans cette migration. Enfin, nous avons commencé l'étude de l'étalement cellulaire dans ces environnements texturés.

Abstract

Cell adhesion and migration play a significant role in numerous cell mechanisms, from morphogenesis to metastasis. It is well known that the cell micro-mechanical environment has a strong influence on multiple cell functions such as adhesion, migration and also differentiation. To control the cell environment properties, we chose to combine micro-fabrication techniques, adapted from micro-electronics, with cell and molecular biology. We focused on the influence of substrate stiffness on cell, here fibroblasts, migration and forces on their matrix. For that, we used flexible micro-pillars as force detectors. We showed that cells adapt the forces they exert on their substrate to its rigidity. We then studied the influence of substrate topography on cell migration. We also used micro-posts, but with higher dimensions (5 to 10 times larger). Migrating cells encounter flat and bumpy surfaces when migrating. We showed that in these environments, cells adopt a behavior close to the one observed in a 3D environment, and also that the nucleus stiffness is involved in this behavior. Then we did a preliminary work on spreading cells in these environments.