



HAL
open science

Effet de l'écoulement sur l'adhésion de cellules en géométrie confinée

Cécile Couzon

► **To cite this version:**

Cécile Couzon. Effet de l'écoulement sur l'adhésion de cellules en géométrie confinée. Physique [physics]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00351427

HAL Id: tel-00351427

<https://theses.hal.science/tel-00351427>

Submitted on 9 Jan 2009

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.

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier
Grenoble I

Discipline : Physique

présentée et soutenue publiquement par :

Cécile Couzon

le 17 novembre 2008

Effet de l'écoulement sur l'adhésion de cellules en
géométrie confinée

Composition du jury :

Franz Bruckert (Examineur)

Valérie Deplano (Rapporteur)

Jean-Paul Rieu (Rapporteur)

Claude Verdier (Directeur de thèse)

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu mon directeur de thèse pour son encadrement au cours de ces trois années. Merci Claude pour ta disponibilité, ta franchise et la confiance que tu m'a accordée. C'est grâce à ton implication que ce travail de thèse aboutit aujourd'hui. J'ai vraiment apprécié de travailler à tes côtés, et je n'oublierai pas non plus tous les bons moments passés ensemble autour d'un bon repas après les réunions, ou lors des sorties ski du labo.

Mes remerciements vont également à Alain Duperray, pour l'aide qu'il m'a apportée en biologie. Merci Alain de tout l'investissement que tu as mis dans ma thèse. Tes conseils ont été précieux, tant en salle de culture cellulaire que sur les pistes de ski de fond ou tu m'a beaucoup appris.

Je souhaite également remercier les rapporteurs, Valérie Deplano et Jean-Paul Rieu, ainsi que Franz Bruckert pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Je leur adresse ma profonde reconnaissance pour m'avoir accordé de leur temps.

Je voudrais ensuite remercier toutes les personnes du labo de Spectro et de l'institut Albert Bonniot. Merci en particulier à mes co-bureau, Andreea, Shirin et Hafssa, avec qui c'était toujours un plaisir de partager des pauses café, et dont le soutien mutuel était indispensable. Merci à Jocelyn, Jos, Oualid, Roxana et Valérie pour toutes leurs présentations d'articles aux réunions biblio et les petits plats qu'ils ont préparés pour les dîners qui suivaient. J'ai également une pensée pour les secrétaires, les techniciens et tous les membres du laboratoire qui contribuent à créer un environnement chaleureux.

Enfin, je ne saurais oublier de remercier infiniment mes parents pour leur amour, leur dévouement et leur soutien. Qu'ils trouvent ici ma reconnaissance et la récompense à tous leurs sacrifices. Un énorme merci également à mon frère jumeau, le meilleur frangin du monde.

J'ai gardé le meilleur pour la fin : merci à toi mon Loulou, qui rends ma vie si belle tous les jours.

TABLE DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION GÉNÉRALE	5
1.1	La cellule et son environnement	5
1.1.1	L'organisation cellulaire	5
1.1.2	La membrane plasmique, interface avec le milieu extérieur	7
1.1.3	Les cellules cancéreuses	9
1.1.3.1	La cancérogenèse	9
1.1.3.2	Les tumeurs primaires et les métastases	10
1.2	Le cytosquelette	12
1.2.1	Les microtubules	12
1.2.2	Les microfilaments d'actine	15
1.2.3	Les filaments intermédiaires	20
1.2.4	Synthèse comparative des propriétés et rôles des trois types de filaments du cytosquelette	22
1.3	L'adhésion cellulaire	24
1.3.1	Différents types de jonctions cellulaires	24
1.3.2	Modélisation physique de l'adhésion cellulaire	24
1.3.3	Les contacts focaux	28
1.3.3.1	Localisation des contacts focaux	28
1.3.3.2	Rôle des contacts focaux	29
1.3.3.3	Molécules impliquées dans les contacts focaux	29
1.3.4	Influence de la rigidité du substrat	32
1.3.5	L'adhésion dans les processus métastatique et immunitaire	34
1.3.5.1	La diapédèse des leucocytes	34
1.3.5.2	La diapédèse des cellules cancéreuses	35
1.4	La réponse cellulaire à des sollicitations externes	37
1.4.1	Différents types de sollicitations externes	37
1.4.2	Mécanismes impliqués dans la réponse cellulaire à des sollicitations mécaniques externes	38
1.4.3	Les conditions de flux <i>in vivo</i>	40
1.4.4	Les contraintes hydrodynamiques	42
1.4.4.1	Cisaillement à la paroi d'un canal	42
1.4.4.2	Calcul du champ de vitesse et des contraintes dans un canal parallélépipédique	43
1.4.5	Prédictions théoriques des effets d'un écoulement sur une cellule adhérente	52
1.4.5.1	Modèle de Pozrikidis <i>et al.</i>	52
1.4.5.2	Modèle de Gaver <i>et al.</i>	53
1.4.5.3	Modèle de Dong <i>et al.</i>	55
1.4.5.4	Autres travaux de modélisation	57
1.4.6	Dispositifs expérimentaux d'étude de l'effet des contraintes hydrodynamiques sur les cellules	59

1.4.6.1	Le système cône-plan	59
1.4.6.2	La chambre d'écoulement radial	60
1.4.6.3	La chambre d'écoulement à parois parallèles	62
1.4.6.4	Les micropipettes	64
1.4.6.5	Les dispositifs microfluidiques	65
1.4.7	Observations en fluorescence du cytosquelette d'une cellule adhérente sous écoulement	66
2	MÉTHODES EXPÉRIMENTALES	69
2.1	Les cellules	69
2.1.1	Présentation des T24	69
2.1.2	Entretien des cellules	69
2.1.3	Mise en solution des cellules	70
2.2	Les microcanaux	70
2.2.1	Méthode de fabrication des microcanaux	71
2.2.1.1	Fabrication des moules par photolithographie	71
2.2.1.2	Fabrication des microcanaux en silicone	74
2.2.2	Fonctionnalisation des parois	74
2.2.2.1	Présentation de la fibronectine	74
2.2.2.2	Protocole de fonctionnalisation	76
2.2.3	Propriétés (visco)élastiques du PDMS	76
2.3	Techniques d'observations	77
2.3.1	Microscopie à contraste de phase	77
2.3.1.1	Principe de la microscopie en contraste de phase	77
2.3.1.2	Microscope à contraste de phase au Laboratoire de Spectrométrie Physique	79
2.3.2	Microscopie de fluorescence	80
2.3.2.1	Principe de la microscopie de fluorescence	80
2.3.2.2	Immunofluorescence indirecte	82
2.3.2.3	Fluorescence par transfection	83
2.3.2.4	Microscope de fluorescence à l'Institut Albert Bonniot	84
2.4	Écoulement dans le microcanal	86
2.4.1	Le pousse-seringue	86
2.4.2	Le piège à bulles	86
2.5	Déroulement d'une expérience	88
2.5.1	Introduction des cellules dans le microcanal	88
2.5.1.1	Dispositif au Laboratoire de Spectrométrie Physique	88
2.5.1.2	Dispositif à l'Institut Albert Bonniot	88
2.5.2	Sédimentation et début d'étalement au fond du microcanal	88
2.5.3	Paliers de flux	89
2.5.3.1	Déroulement des paliers de flux au Laboratoire de Spectrométrie Physique	89
2.5.3.2	Déroulement des paliers de flux à l'Institut Albert Bonniot	90
2.6	Expérience témoin (en conditions statiques)	91
3	INFLUENCE DE L'ÉCOULEMENT SUR L'AIRE D'ADHÉSION	93
3.1	Traitement des données (images en contraste de phase)	93
3.2	Expérience témoin (en conditions statiques)	94

3.3	Expériences sous écoulement	96
3.3.1	Evolution de l'aire $A(t)$ sous cisaillement croissant	97
3.3.2	Evolution du taux de croissance de l'aire $\frac{dA(t)}{dt}$ en fonction du cisaillement	98
3.3.3	Définition et détermination de la contrainte de cisaillement critique	100
3.3.4	Influence du confinement	100
3.4	Compétition entre liaisons adhésives et forces hydrodynamiques	101
3.4.1	Présentation du modèle	101
3.4.2	Confrontation avec les résultats expérimentaux	107
3.5	Synthèse des résultats	110
4	EVOLUTION DU CYTOSQUELETTE ET DES ZONES FOCALES SOUS FLUX	113
4.1	Traitement des données (images en fluorescence)	113
4.2	Evolution des zones d'adhésion focales en fonction du cisaillement	118
4.2.1	Observation de l' α -actinine 4	118
4.2.2	Observation de la paxilline	121
4.2.3	Taille des zones focales	121
4.2.4	Nombre de zones focales par cellule	123
4.2.5	Surface cumulée des zones focales par cellule	125
4.2.6	Localisation des zones focales sur la cellule	126
4.2.7	Estimation de la contrainte adhésive au niveau d'une zone focale	127
4.3	Evolution du cytosquelette d'actine en fonction du cisaillement	131
4.3.1	Surface cumulée des zones comportant de l'actine	131
4.3.2	Localisation de l'actine sur la cellule	133
4.4	Discussion	135
4.4.1	Evolution des zones focales sous cisaillement croissant	135
4.4.2	Evolution du cytosquelette d'actine sous cisaillement croissant	136
4.4.3	Corrélation entre les zones focales et le cytosquelette d'actine	137
5	CONCLUSION	141
	ARTICLE SOUS-PRESSE DANS J MATH BIOL.	145
	ARTICLE SOUMIS DANS ANN BIOMED ENG. (MAI 2008)	171
	PHÉNOMÈNE DE BLEBBING	193

LISTE OF FIGURES

1.1	Schéma d'une cellule animale	6
1.2	Trois vues d'une membrane cellulaire	8
1.3	Processus de diapédèse des cellules cancéreuses	11
1.4	Les barrières aux métastases	12
1.5	Structure d'un microtubule et de ses sous-unités	13
1.6	Localisation des microtubules et de l'ADN pendant les 4 phases de la mitose	14
1.7	Structure d'un monomère d'actine et arrangement des monomères dans un filament	16
1.8	Schéma inspiré de Polland <i>et al.</i> décrivant la polymérisation de l'actine au voisinage de la membrane plasmique	18
1.9	Modèle de l'édification d'un filament intermédiaire	21
1.10	Modèle de l'interaction cellule-cellule	25
1.11	Diagramme de phase de l'adhésion entre deux vésicules	27
1.12	Découverte des contacts focaux	29
1.13	Famille des intégrines	30
1.14	Adhésion focale	31
1.15	La diapédèse des leucocytes	35
1.16	Diamètres caractéristiques des conduits du réseau de circulation sanguine .	41
1.17	Système d'axes choisi pour décrire l'écoulement d'un fluide dans un canal parallélépipédique	43
1.18	Evolution du débit dans une conduite parallélépipédique en fonction de $\frac{w}{h}$.	48
1.19	Représentation de la valeur absolue de la contrainte de cisaillement dans une section perpendiculaire à l'écoulement pour deux canaux parallélépipédiques	51
1.20	Schéma d'un écoulement de cisaillement simple sur un plan présentant une protubérance axisymétrique	52
1.21	Paramètres géométriques du modèle 2D de Gaver et Kute pour l'étude de l'effet des contraintes de cisaillement sur un obstacle adhérent à la paroi d'un microcanal	53
1.22	Modèle de Dong <i>et al.</i> d'une cellule adhérente soumise à un flux	56
1.23	Distribution des contraintes normales et tangentielles à la surface d'une cellule déformée dans un vaisseau de 30 μm	57
1.24	Dispositif cône-plan	60
1.25	Chambre d'écoulement radial	61
1.26	Chambre d'écoulement à parois parallèles	62
1.27	Micropipette utilisée pour appliquer un flux sur une cellule	64
2.1	Différentes étapes de fabrication des moules pour microcanaux par photo- lithographie	71
2.2	Courbes d'étalonnage de la résine SU8 GM 1060, Gersteltec	73
2.3	Moules en résine photosensible SU8 utilisés pour la fabrication de microca- naux en silicone	73

2.4	Strucure d'un dimère de fibronectine montrant ses principaux domaines de liaisons	75
2.5	Strucure tridimensionnelle de deux types de répétitions de type III de fibronectine	75
2.6	Echelle de comparaison des modules élastiques de différents matériaux . . .	76
2.7	Modules élastique $G'(f)$ et visqueux $G''(f)$ du PDMS constituant les microcanaux	77
2.8	Eléments optiques spécifiques du microscope à contraste de phase	78
2.9	Microscope à contraste de phase utilisé au Laboratoire de Spectrométrie Physique	79
2.10	Principe du microscope à fluorescence	81
2.11	Plages de longueurs d'onde d'absorption et d'émission de divers colorants et protéines	81
2.12	Principe de l'immunofluorescence indirecte	82
2.13	Structure de la GFP	84
2.14	Microscope de fluorescence utilisé à l'Institut Albert Bonniot	85
2.15	Schéma du dispositif microfluidique utilisé au LSP	87
2.16	Piège à bulles en fonctionnement	87
3.1	Traitement de l'image en contraste de phase d'une cellule T24	94
3.2	Cellule T24 adhérente sur un substrat en PDMS en conditions statiques . .	94
3.3	Aire d'une cellule T24 en conditions statiques	95
3.4	Répartition de l'aire de 22 cellules filles (T24) une heure après la division cellulaire	96
3.5	Evolution d'une cellule T24 adhérente à la paroi d'un microcanal soumise à un flux de cisaillement croissant	97
3.6	Evolution de l'aire pour 5 cellules adhérentes soumises à un flux croissant dans un microcanal	98
3.7	Evolution du taux de croissance de l'aire pour 5 cellules adhérentes soumises à un flux croissant dans un microcanal	99
3.8	Contrainte critique (WSS_c) en fonction de la hauteur du canal	101
3.9	Modélisation d'une cellule adhérente à une paroi et soumise à un flux . . .	104
3.10	Contraintes de cisaillement critiques (WSS_c) pour différentes valeurs du paramètre d'adhésion Nf_{ad_z}	106
3.11	Images d'une cellule adhérente après application un cisaillement croissant .	109
4.1	Direction du flux et conventions choisies pour l'angle θ pour repérer la position des zones focales et de l'actine sur les cellules observées après cisaillement	115
4.2	Deux exemples de traitement d'images en fluorescence de la paxilline colorée à la rhodamine	116
4.3	Deux exemples de traitement d'images en fluorescence de l'actine marquée à la GFP	117
4.4	Localisation de l' α -actinine 4 dans 6 cellules T24 α -actinine 4-GFP étalées	119
4.5	Localisation de l' α -actinine 4 sur une cellule T24 soumise à un cisaillement croissant	120
4.6	Exemples d'images en fluorescence de cellules T24 dont la paxilline est marquée à la rhodamine	121

4.7	Taille moyenne des zones focales pour des cellules T24 en fonction de la contrainte de cisaillement maximale subie	122
4.8	Répartition de la taille des zones focales pour des cellules T24 ayant subi différentes contraintes de cisaillement	122
4.9	Comparaison du nombre de zones focales pour des cellules T24 ayant subi différentes contraintes de cisaillement	123
4.10	Nombre moyen de zones focales pour des cellules T24 en fonction de la contrainte de cisaillement maximale subie	124
4.11	Evolution de la fraction d'aire occupée par des zones focales en fonction de la contrainte maximale subie	125
4.12	Localisation angulaire des zones focales par rapport au flux	127
4.13	Contrainte adhésive σ_{ad} exercée par des cellules T24 en fonction de la rigidité du substrat	130
4.14	Localisation de l'actine dans 4 cellules T24 actine GFP étalées	131
4.15	Evolution de la fraction d'aire où est présente l'actine en fonction de la contrainte maximale subie	132
4.16	Niveaux d'expression de l'actine GFP chez 2 cellules T24 actine GFP . . .	133
4.17	Répartition angulaire de l'actine chez des cellules T24 actine GFP soumises à différentes contraintes de cisaillement	134
C.1	Phénomène de blebbing à la périphérie cellulaire	194

PRÉAMBULE

L'adhérence cellulaire joue un rôle essentiel dans le fonctionnement d'un être vivant. C'est elle qui en assure la cohésion : la formation d'un tissu à partir de cellules d'un même type cellulaire sous-entend des liaisons adhésives fortes entre elles. Même chez des cellules circulantes telles que les leucocytes, qui ne vivent pas en association avec d'autres dans un tissu, les phénomènes adhésifs sont primordiaux car ils permettent aux cellules de communiquer avec d'autres cellules. Lors de la migration, les déplacements ne sont possibles que si les cellules sont capables de former des contacts avec leur environnement, ce qui constitue, avec la dynamique des filaments les conditions indispensables pour générer des forces de traction. La réponse immunitaire est un bon exemple pour illustrer la complexité des phénomènes adhésifs. En effet, la diapédèse des leucocytes nécessite dans un premier temps leur recrutement grâce à des molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules endothéliales. Cette étape déclenche ensuite une succession de processus actifs : une adhérence plus forte du leucocyte puis la traversée de la paroi endothéliale pour aller phagocyter l'agent infectieux (Cinamon et Alon, 2003).

Il est maintenant clairement établi que les cellules sont capables d'intégrer des informations biochimiques et biophysiques de leur environnement. Elles génèrent alors une réponse adaptée, dépendant du type cellulaire et de sa fonction. De ce fait, leur environnement conditionne en partie le comportement des cellules. Les stimuli chimiques sont captés par des récepteurs insérés dans la membrane plasmique, ce qui déclenche une cascade de réactions en chaîne. Les mécanismes impliqués lors d'un signal mécanique sont moins bien établis. Sachant que les cellules doivent leurs propriétés mécaniques à la présence d'un cytosquelette, celui-ci est un candidat de choix pouvant intervenir dans la réponse à des stimuli mécaniques. Le cytosquelette est un réseau tridimensionnel dense constitué de filaments organisés en fibres, qui déterminent la forme et les propriétés visco-élastiques de la cellule (Zhu *et al.*, 2000). Ils lui permettent d'exercer des forces de traction au niveau des complexes d'adhésion (Riveline *et al.*, 2001). Selon le type cellulaire, sa localisation et sa fonction, les sollicitations mécaniques sont différentes : elles peuvent être occasionnelles lors d'une contraction musculaire, cycliques si elles sont dues à la respiration, permanentes

dans le cas de l'écoulement du sang. La façon dont les cellules répondent aux contraintes mécaniques auxquelles elles sont soumises dépend de leurs propriétés mécaniques et des interactions éventuelles avec d'autres cellules, par exemple leurs voisines dans le cas d'un tissu. A la différence d'un matériau inerte, le comportement de la cellule est une réponse biologique dirigée, afin d'assurer les fonctions telles que l'adhésion (Bershadsky *et al.*, 2003), la division ou la migration.

La réponse de la cellule intervient en particulier dans le développement d'un cancer lorsque des cellules tumorales issues d'une tumeur primaire sont disséminées dans tout le corps par le réseau de circulation sanguine pour former des métastases. Les cellules malignes circulantes peuvent alors interagir avec des molécules d'adhésion présentes sur la paroi endothéliale puis adhérer et transmigrer. Ce phénomène présente des similitudes avec la diapédèse des leucocytes dans la réponse immunitaire (Miles *et al.*, 2008). Ainsi, la traversée de la couche de cellules endothéliales par la cellule tumorale fait intervenir des phénomènes adhésifs et des sollicitations mécaniques dues à la présence de contraintes hydrodynamiques générées par l'écoulement du sang dans le capillaire sanguin. En effet, un autre ingrédient influençant la diapédèse des cellules cancéreuses est le confinement. Les interactions entre les cellules circulantes et la paroi du vaisseau sanguin étant favorisées lorsque le canal est étroit, elles ont le plus souvent lieu dans les microcapillaires sanguins, dont le diamètre peut être proche de celui de la cellule cancéreuse. Dans de telles conditions, la présence de la cellule dans le microvaisseau modifie l'écoulement : le flux est contraint à s'écouler dans une section diminuée. Lorsqu'une cellule cancéreuse adhère à la paroi, elle est donc soumise à de fortes contraintes hydrodynamiques (Gaver et Kute, 1998), face auxquelles elle tente d'adopter une réponse pour ne pas être décollée.

Dans le but d'étudier ces phénomènes, nous avons essayé de caractériser la réponse d'une cellule cancéreuse adhérente à une paroi soumise à un écoulement en géométrie confinée. Grâce à un dispositif expérimental microfluidique, nous avons testé l'influence du confinement et de l'intensité des contraintes de cisaillement sur l'adhésion. Nous nous sommes penchés sur les modifications du cytosquelette et des zones d'adhésion d'une cellule sous flux croissant. Dans un modèle théorique nous mettons en relation la résistance d'une cellule adhérente et les zones d'adhésion qu'elle établit avec son substrat. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet européen de recherche contre le cancer : Marie Curie Research Training Network (RTN).

Le premier chapitre présente la cellule et ses constituants intervenant dans l'adhésion. Après avoir passé en revue les différents types de sollicitations mécaniques auxquelles peuvent être soumises des cellules, nous nous intéresserons plus particulièrement aux contraintes hydrodynamiques, sur le plan théorique et expérimental.

Dans le deuxième chapitre, nous présenterons les méthodes expérimentales qu'a nécessité ce travail.

Le troisième chapitre exposera les résultats relatifs à l'étalement d'une cellule adhérente soumise à un écoulement dont le débit varie, en géométrie confinée. Nous avons déterminé la contrainte hydrodynamique critique marquant la transition entre la phase d'étalement de la cellule (à faible flux) et celle de rétraction (à flux élevé).

Dans le quatrième chapitre, nous verrons comment évoluent les zones d'adhésion et le cytosquelette de la cellule lorsqu'elle est soumise à un flux croissant. Ceci nous permettra de déterminer la contrainte adhésive au niveau des zones d'adhésion permettant à la cellule de résister au décollement sous flux.

Nous concluons en rappelant les résultats principaux et en validant le dispositif expérimental microfluidique utilisé pour les obtenir.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 *La cellule et son environnement*

1.1.1 *L'organisation cellulaire*

Bien qu'infiniment variés vus de l'extérieur, tous les êtres vivants sont identiques vus de l'intérieur : ils sont tous constitués de briques élémentaires appelées cellules. La cellule est l'unité de base de la matière vivante. Elle peut à elle seule constituer un organisme vivant, alors dit unicellulaire, ou alors s'assembler à d'autres cellules pour constituer un être pluricellulaire. Une caractéristique commune à tous les êtres vivants, uni- ou pluricellulaires, est la capacité à se reproduire. C'est dans la cellule qu'est stockée toute l'information qui spécifie précisément les caractéristiques de l'espèce : qu'il s'agisse d'une bactérie isolée, ou d'un être humain formé de plus de 10^{13} cellules, les organismes vivants sont tous générés à partir d'une seule cellule qui contient l'information héréditaire et toutes les machines permettant de construire une nouvelle cellule à partir du matériel brut de l'environnement.

Toutes les cellules stockent leurs informations héréditaires sous la même forme chimique : une molécule d'ADN¹ à double brin, dont des séquences (les gènes) sont transcrites sous forme d'une seule unité codant pour une protéine. Il existe cependant deux modes de stockage de l'information génétique dans la cellule, qui définissent les deux grandes classes de cellules (et donc d'organismes) :

- Les eucaryotes : ils gardent l'information génétique dans un compartiment intracellulaire distinct : le noyau, qui est limité par une membrane. Les végétaux, les champignons et les animaux sont des eucaryotes.
- Les procaryotes : ils n'ont pas de compartiment nucléaire distinct abritant leur ADN. Les bactéries sont des procaryotes.

¹Acide DésoxyriboNucléique

Les compositions chimiques de ces deux grandes classes de cellules sont voisines, et de nombreuses voies métaboliques leur sont communes. Cependant, les cellules eucaryotes sont en général plus grandes (d'un facteur 1000 en volume) et plus élaborées que les cellules procaryotes. L'augmentation de la taille s'accompagne de différences radicales dans la structure et les fonctions cellulaires.

L'intérieur des cellules eucaryotes, délimité du milieu extérieur par une membrane plasmique, se compose de plusieurs compartiments intracellulaires (appelés « organites »), parmi lesquels on trouve (Fig. 1.1) :

- Le noyau : il contient l'ADN de la cellule, support de l'information génétique.
- Le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi : ils entourent le noyau et interviennent respectivement dans la production et la modification des protéines.
- Les mitochondries : ce sont les centrales énergétiques de la cellule, elles récupèrent l'énergie fournie par les molécules organiques puis la stockent sous forme d'ATP² utilisable par la cellule.

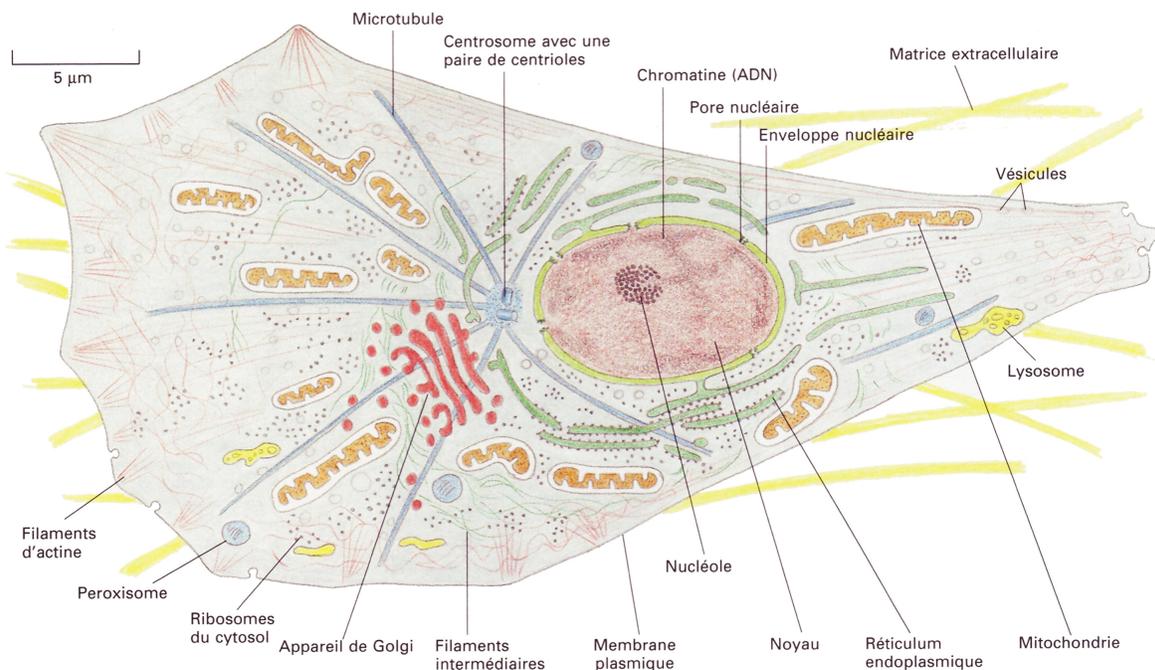


FIG. 1.1: Schéma d'une cellule animale (Alberts *et al.*, 2002).

²Adénosine TriPhosphate

Ces organites baignent dans une sorte de « bain protéique », le cytosol, dans lequel sont présentes de nombreuses molécules (dont des protéines et des ions) aux localisations et interactions spécifiques. Le cytosol contient également le cytosquelette, un réseau tridimensionnel de protéines fibreuses qui confère à la cellule sa forme et sa motilité et qui intervient également dans la transmission d'informations biologiques. Il est constitué de trois types de fibres protéiques : les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules.

1.1.2 La membrane plasmique, interface avec le milieu extérieur

La membrane plasmique est un double feuillet de phospholipides, molécules qui ont la propriété physicochimique d'être amphiphiles. Composées d'une tête polaire et d'une queue hydrophobe, ces lipides s'organisent en feuillets : les queues hydrophobes se placent en contact les unes des autres, de façon à se protéger de l'eau, les têtes polaires, hydrophiles, étant orientées vers l'extérieur et exposées à l'eau (Fig. 1.2). Cet arrangement forme une sorte de phase 2D liquide désordonnée, dans laquelle les lipides peuvent se mélanger et diffuser librement : la diffusion latérale, plus complexe qu'un simple mouvement brownien (Singer et Nicolson, 1972), est rapide, avec un coefficient de diffusion D d'environ $10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$, mais les transferts de lipides d'un feuillet à l'autre (« flip-flop ») sont rares. Cette organisation permet de créer une barrière de quelques nanomètres d'épaisseur infranchissable pour la plupart des molécules polaires et/ou chargées : du fait de son cœur hydrophobe, la bicouche lipidique s'oppose au passage de la plupart des molécules polaires.

Afin d'importer des nutriments essentiels de l'extérieur, d'excréter des produits de déchets métaboliques et réguler la concentration ionique intracellulaire, les cellules ont développé des modes de transfert à travers cette membrane plasmique. Pour cela, elles possèdent des protéines spécialisées (protéines porteuses et protéines de canaux) encastrées dans la membrane, qui servent à transporter de façon active ou passive, des molécules spécifiques d'un côté à l'autre de la membrane (Fig. 1.2).

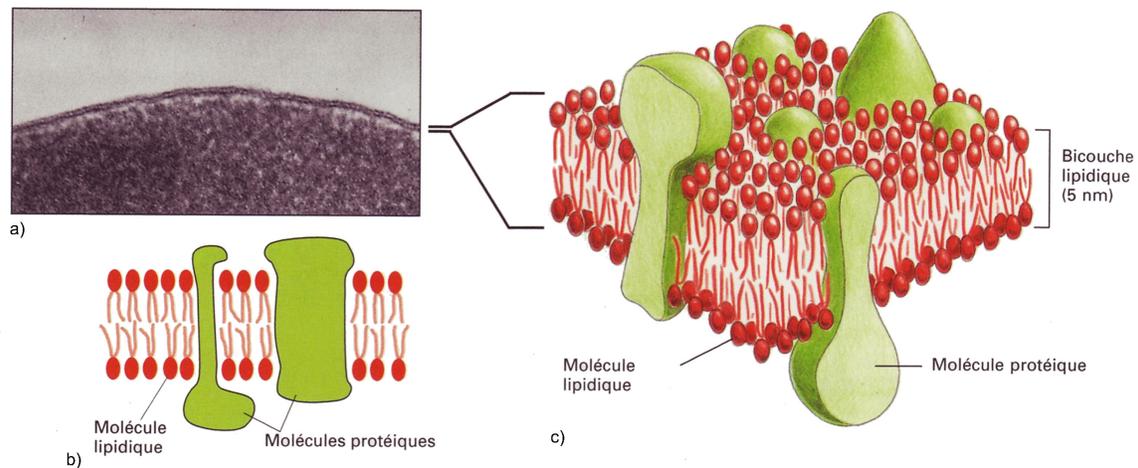


FIG. 1.2: Trois vues d'une membrane cellulaire. a) Photographie en microscopie électronique d'une membrane plasmique (d'une hématie humaine) observée en coupe. b) et c) Vues bi- et tridimensionnelle d'une membrane cellulaire (Alberts *et al.*, 2002).

La membrane plasmique servant d'interface avec le milieu extérieur, on y trouve également encastrées des protéines jouant un rôle dans la communication entre la cellule et son environnement (Fig. 1.2). Ces récepteurs membranaires détectent spécifiquement des molécules de signalisation externe et déclenchent une cascade de réactions à l'intérieur de la cellule. Les intégrines sont un exemple de ces protéines insérées dans la membrane, elles constituent le principal récepteur utilisé par les cellules pour interagir avec la matrice extracellulaire (Alberts *et al.*, 2002). Des stimuli mécaniques sur la membrane peuvent également induire des signaux biologiques, on parle de mécanotransduction (Giancotti et Ruoslahti, 1999; Ingber, 2003).

Les propriétés élastiques de la membrane interviennent dans les phénomènes d'adhésion. Pour permettre l'adhésion entre deux cellules, leurs membranes doivent être suffisamment souples pour se déformer, sans trop fluctuer, de façon à maintenir une surface de contact suffisante entre les deux cellules (Bell *et al.*, 1984).

L'ancrage du cytosquelette à la membrane est également un facteur important influençant les propriétés mécaniques des cellules (Fig. 1.2) comme l'ont montré les comparaisons avec les vésicules, qui sont des compartiments fermés par une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique. Alors que la membrane d'une vésicule se déforme en ondulant sur tout le contour à cause des fluctuations thermiques (Bruinsma *et al.*, 1994), la membrane des cellules fluctue peu car elle est sous-tendue par un réseau fortement réticulé : le cortex.

Les cellules émettent des protrusions localisées de deux types :

- Les lamellipodes : ce sont des étendues membranaires de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur pour des largeurs et des longueurs de quelques micromètres.
- Les filopodes : ce sont des tubes rigides d'environ 200 nanomètres de diamètre et pouvant atteindre plusieurs micromètres de long.

Ces structures sont causées par la polymérisation dynamique de l'actine qui pousse la membrane plasmique (voir le paragraphe 1.2).

Outre la détermination de la forme cellulaire, la tension de la membrane et son arrimage au cytosquelette interviennent aussi dans des mécanismes tels que l'exocytose ou la modulation de l'expression génétique (Evans et Hochmuth, 2003; Sheetz, 2001; Sheetz *et al.*, 2006).

1.1.3 Les cellules cancéreuses

1.1.3.1 La cancérogenèse

Les cellules cancéreuses sont définies par deux propriétés transmissibles :

- Néoplasiques, elles se reproduisent à l'encontre des restrictions normales de la division cellulaire.
- Malignes, elles envahissent des régions normalement réservées à d'autres cellules.

Les cancers sont classés selon le tissu et le type cellulaire dont ils proviennent (Alberts *et al.*, 2002) :

- Les carcinomes proviennent de cellules épithéliales.
- Les sarcomes partent des tissus conjonctifs ou des cellules musculaires.
- Les leucémies dérivent des cellules hématopoiétiques.
- Les cellules du système nerveux donnent également lieu à des cancers.

La plupart des cancers partent d'une seule cellule ayant subi une mutation génétique anormale. Beaucoup d'agents dits « carcinogènes » sont connus pour initier des modifications génétiques, parmi lesquels :

- Les carcinogènes chimiques : certaines molécules présentes dans la fumée de cigarette, les gaz d'échappement du diesel, les colorants, etc... induisent des modifications lo-

cales de la séquence d'ADN (Alberts *et al.*, 2002).

- Les radiations ionisantes, comme les rayons X, peuvent provoquer une cassure chromosomique et une translocation (Alberts *et al.*, 2002).
- Les virus introduisent un ADN étranger dans la cellule.

Cependant, des mutations se produisent même dans un environnement sans agents mutagènes : chez l'homme, la probabilité est d'environ 10^{-6} mutations par gène et par division cellulaire, ce qui correspond à 10^{10} occasions pour un gène de muter au cours de la vie. Mais une mutation occasionnelle ne suffit pas à provoquer à elle seule un cancer : un cancer se développe par étapes lentes à partir d'une cellule légèrement aberrante, plusieurs incidents indépendants et rares sont nécessaires dans la lignée d'une cellule mutante. La descendance de cette cellule doit subir d'autres modifications et mutations successives sur des gènes régulateurs de la prolifération cellulaire ou réparateurs de l'ADN. Ceci entraîne une altération des points de contrôle de la vitesse de prolifération et de l'intégrité du génome cellulaire, rendant les cellules malades résistantes à l'apoptose. Parmi les mutations fréquentes génératrices de cancer, citons :

- L'amplification de l'oncogène *c-erb-B2*, qui entraîne la surexpression du récepteur de croissance HER2, causant une croissance cellulaire anormale (Witton *et al.*, 2003; Woodburn, 1999).
- Une mutation de la protéine anti-oncogène p53, qui lève le freinage permanent qu'elle exerce sur la division cellulaire (Fiscella *et al.*, 1993; Leach *et al.*, 1993).

1.1.3.2 Les tumeurs primaires et les métastases

Lorsque la prolifération d'une cellule n'est plus contrôlée, elle donne naissance à une tumeur, masse constamment croissante de cellules anormales. Une tumeur est qualifiée de maligne quand ses cellules ont acquis la capacité de se détacher et d'envahir les tissus voisins en y formant des métastases secondaires. Les métastases représentent l'aspect le plus craint, et le moins compris, du cancer. Par sa dissémination dans tout le corps, le cancer devient alors presque impossible à éradiquer chirurgicalement ou par irradiation localisée, et donc mortel. Cet envahissement nécessite une modification des mécanismes d'adhésion qui maintiennent normalement les cellules fixées à leurs voisines. L'échappée de la tumeur primaire et l'établissement de colonies dans des tissus éloignés est un processus lent et inefficace, que peu de cellules parviennent à réaliser. Pour former des métastases, une cellule doit pénétrer dans la circulation sanguine (soit directement en traversant la

paroi d'un vaisseau sanguin ou d'un vaisseau de l'angiogenèse, soit en traversant la paroi d'un vaisseau lymphatique qui libère son contenu dans le courant sanguin), puis sortir de la circulation quelque part dans le corps, survivre et proliférer. Inspirée du modèle de la diapédèse leucocytaire (voir le paragraphe 1.3.5), la figure 1.3 présente les différentes étapes de la traversée de la paroi endothéliale, avec les molécules d'adhésion impliquées.

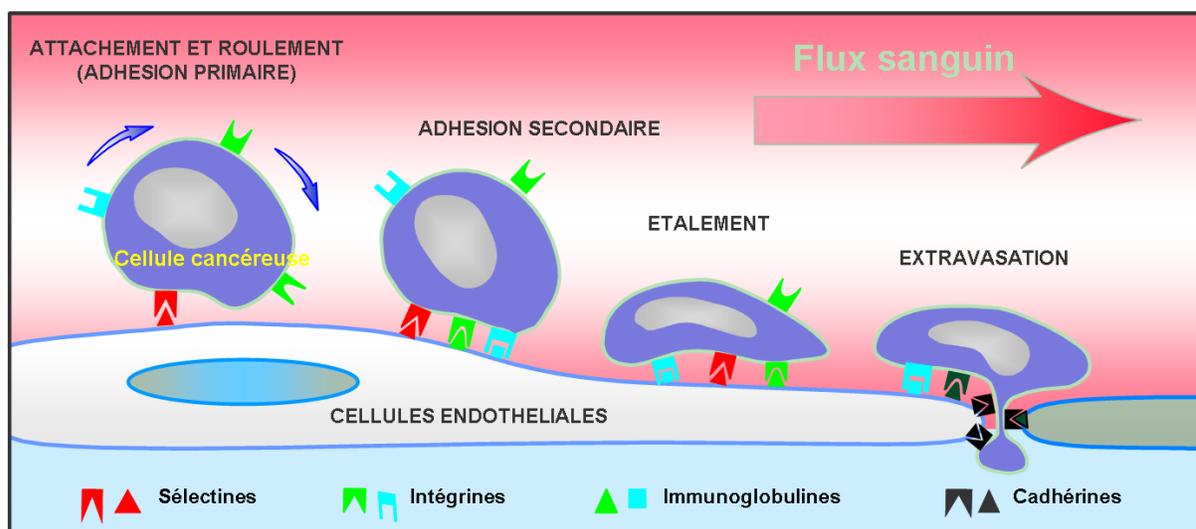


FIG. 1.3: Modèle basé sur la diapédèse leucocytaire, montrant les différentes étapes de la traversée de la paroi endothéliale par une cellule cancéreuse circulante. Après une adhésion initiale faible et éventuellement un roulement de la cellule tumorale sur la paroi endothéliale, l'adhésion se renforce et la cellule cancéreuse s'étale sur la paroi vasculaire. L'extravasation se produit au niveau d'une jonction entre deux cellules endothéliales (adapté de Verdier *et al.*, 2008).

En injectant des cellules cancéreuses marquées par un colorant fluorescent dans la circulation d'un animal vivant et en suivant leur destinée, il est possible de déterminer quelles sont les étapes qui posent le plus de difficultés aux cellules, et donc doivent être facilitées par l'acquisition de mutations supplémentaires (Alberts *et al.*, 2002). Dans ces expériences, beaucoup de ces cellules survivent dans la circulation, se logent dans les petits vaisseaux et en sortent pour aller dans les tissus avoisinants. La plus grande partie des pertes en cellules cancéreuses se produit ensuite : certaines cellules meurent immédiatement, d'autres survivent à l'entrée dans le tissu étranger mais ne peuvent pas s'y développer, d'autres se divisent un petit nombre de fois puis s'arrêtent (Fig. 1.4). Ces observations montrent que la capacité à former une métastase dans un tissu étranger est une propriété capitale que les cellules doivent acquérir. Typiquement, on estime que moins d'une cellule maligne sur les plusieurs milliers qui s'échappent d'une tumeur primaire survit et produit une tumeur dans un nouveau site.

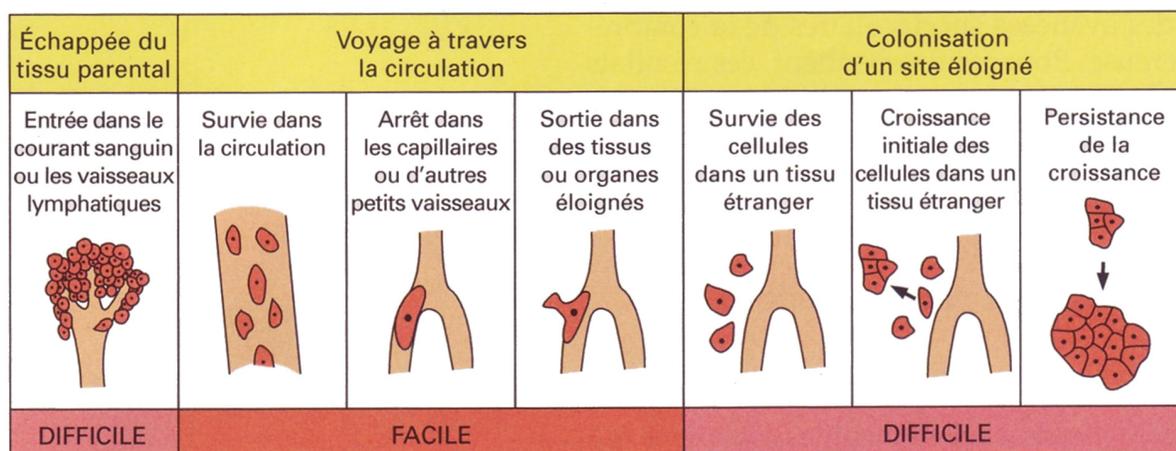


FIG. 1.4: Les barrières aux métastases. L'étude des cellules tumorales marquées qui quittent un site tumoral, entrent dans la circulation et établissent des métastases, montre les étapes du processus métastatique difficiles, que seules les cellules hautement métastatiques réussissent à passer. Il semble que les capacités à s'échapper des tissus parentaux, à survivre et à croître dans le tissu étranger soit des propriétés capitales que les cellules acquièrent pour devenir métastatiques (Alberts *et al.*, 2002).

1.2 Le cytosquelette

Comme évoqué précédemment (paragraphe 1.1.1), le cytosquelette est responsable des propriétés mécaniques de la cellule. C'est un réseau tridimensionnel de fibres protéiques plus ou moins tendues dans le cytoplasme. Ce réseau est constitué de trois types de filaments, qui diffèrent par leurs tailles, leurs propriétés mécaniques et physicochimiques.

1.2.1 Les microtubules

Les microtubules sont de longs cylindres creux et rigides d'environ 25 nanomètres de diamètre, de 5 nanomètres d'épaisseur et pouvant atteindre plusieurs micromètres de longueur. Leur longueur de persistance (L_p) est de l'ordre de 5 millimètres. *In vivo*, les microtubules sont très généralement formés de l'assemblage longitudinal de 13 protofilaments parallèles. Chaque protofilament est un alignement de sous-unités protéiques de tubuline, elles-mêmes constituées de l'assemblage de deux protéines globulaires proches : la tubuline α et la tubuline β . Dans chacun des 13 protofilaments formant un microtubule, les hétérodimères de tubuline s'assemblent en pointant tous dans la même direction, résultant en une alternance de monomères de tubulines α et β , conférant ainsi une polarité au microtubule (Fig. 1.5) :

- L'extrémité présentant les sous-unités β polymérise plus vite, i.e. l'ajout d'un nouveau dimère de tubuline est plus rapide, elle est par conséquent appelée extrémité +.
- L'extrémité présentant les sous-unités α polymérise plus lentement, l'ajout d'un nouveau dimère de tubuline est plus lent et elle est appelée extrémité -.

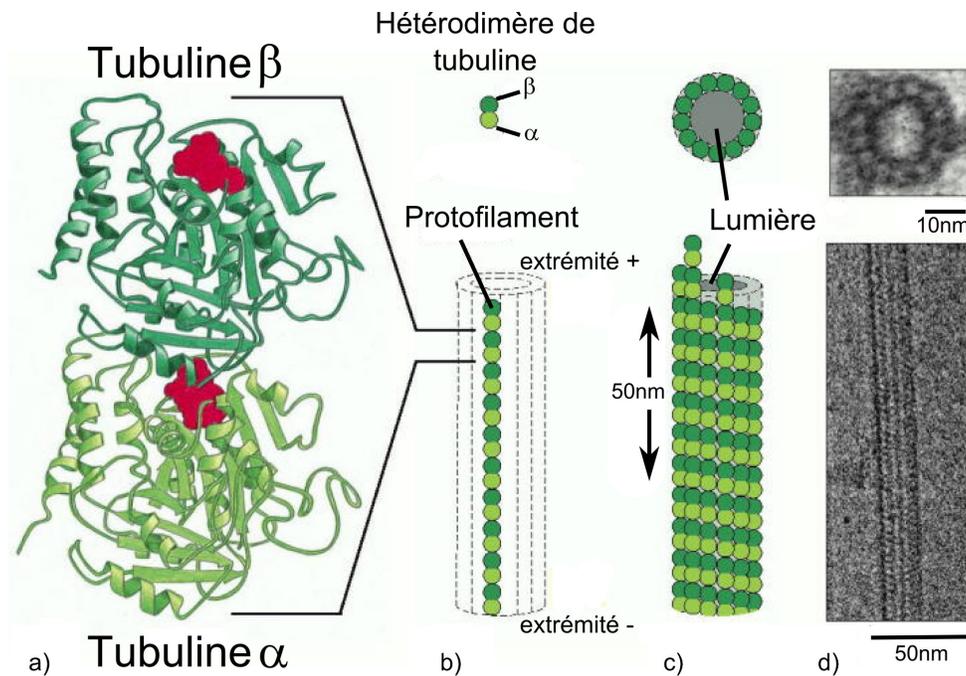


FIG. 1.5: Structure d'un microtubule et de ses sous-unités : a) La sous-unité de chaque protofilament est un hétérodimère de tubuline, formé à partir d'une paire de monomères de tubulines α et β très solidement reliés. Deux molécules de GTP (en rouge) sont présentes sur le dimère : une solidement fixée sur la tubuline α tandis que celle de la tubuline β est moins solidement fixée et joue un rôle important dans la dynamique des filaments. b) Représentation schématique d'une sous-unité de tubuline et d'un protofilament composé de nombreuses sous-unités adjacentes de même orientation. c) Le microtubule est un tube creux formé de 13 protofilaments alignés parallèlement. d) Segment (bas) et coupe transversale (haut) d'un microtubule vus en microscopie électronique. (Alberts *et al.*, 2002)

La polymérisation à l'extrémité + est fortement dépendante des concentrations de tubuline libre et de GTP³. Cette extrémité présente une « coiffe de GTP ». Dans des conditions chimiques constantes, la polymérisation est interrompue par des phases de dépolymérisation rapide appelées « événements catastrophes », survenant de façon stochastique et correspondant à la perte de la coiffe GTP. L'hydrolyse des nucléotides est alors plus rapide que l'addition d'une nouvelle sous-unité. Ce phénomène est connu sous le

³Guanosine TriPhosphate

nom d'instabilité dynamique (Mitchison et Kirschner, 1984) et est régulé par des protéines MAP⁴ (Amos et Schlieper, 2005). Dans la cellule, la polymérisation *de novo* est très lente, les microtubules se forment par addition de molécules de tubuline sur des assemblages déjà présents ou à partir du centre de nucléation : le centrosome, situé près du noyau, à partir desquels les microtubules s'organisent en asters (Mitchison et Kirschner, 1984). L'extrémité – des microtubules est généralement associée au centrosome, et par conséquent ne polymérise et ne dépolymérise pas.

Le réseau de microtubules, combiné avec son centre organisateur joue un rôle essentiel dans la vie cellulaire, sa destruction par des substances telles que le nocodazole, est létale pour la cellule. Il intervient dans différents processus :

- Le trafic cellulaire : les microtubules servent de rails à des moteurs moléculaires (les kinésines et les dynéines qui se déplacent respectivement vers les bouts + et – des microtubules) qui transportent les vésicules provenant de l'appareil de Golgi ou d'autres organites à des vitesses de l'ordre de quelques nanomètres par seconde (Vale *et al.*, 1985).
- La division cellulaire : lors de la mitose, deux centrosomes migrent aux pôles opposés de ce qui constituera les deux cellules filles. Les microtubules croissent à partir de ces extrémités pour former le fuseau mitotique. L'attachement des microtubules de ce fuseau sur chaque chromosome au niveau des deux kinétochores situés près du centrosome, permet le placement des chromosomes sur le plan équatorial, puis le partage du matériel génétique de façon égale entre les deux cellules filles (Sharp *et al.*, 1985).

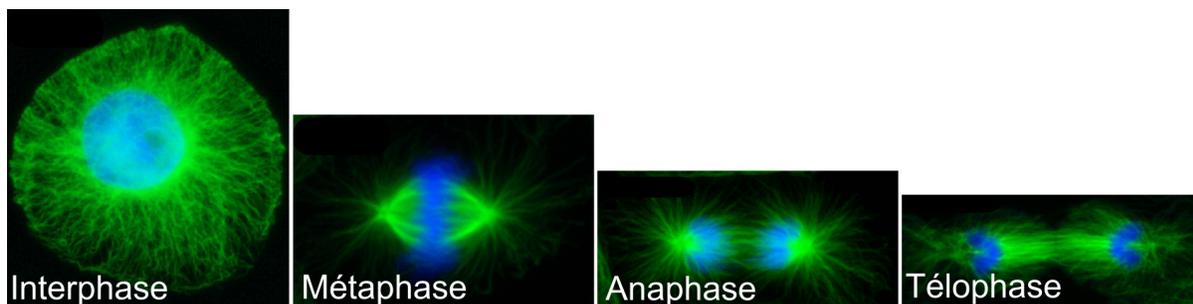


FIG. 1.6: Localisation des microtubules (en vert) et de l'ADN (en bleu) pendant les 4 phases de la mitose d'une cellule de xénope XL-177. La tubuline visualisée est en vert avec un anticorps anti-tubuline, l'ADN en bleu avec le DAPI. (source : <http://mitchison.med.harvard.edu/>)

- La motilité cellulaire : associés à d'autres protéines, les microtubules peuvent former

⁴Microtubule Associated Proteins

des structures complexes comme les cils et les flagelles, qui servent de propulseurs à la cellule, ou qui lui permettent de déplacer des fluides, des mucus ou d'autres cellules présents à sa surface.

- La contractilité cellulaire : mis à part leur activité de transport directionnel de protéines pouvant entrer en jeu dans la formation de zones d'adhésion, les microtubules sont impliqués dans la régulation de la contractilité cellulaire. En effet, leur dépolymérisation conduit à l'activation de la voie de signalisation Rho et ainsi à la formation de fibres de stress (Bershadsky *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998).

1.2.2 Les microfilaments d'actine

Les filaments d'actine, aussi appelés microfilaments ou F-actine (actine filamenteuse) résultent de la polymérisation de l'actine G (globulaire), une protéine hautement conservée lors de l'évolution des eucaryotes et présente en grande quantité dans la cellule (Fig. 1.7). Sous ses deux formes (filamenteuse et globulaire), l'actine représente en effet jusqu'à 10% de la masse totale protéique d'une cellule, avec une concentration dans le cytosol pouvant atteindre 5 mM dans des structures spéciales comme les microvillosités. L'abondance de l'actine dans la cellule justifie le fait que les structures qu'elle forme occupent une large proportion du volume cytoplasmique.

Un filament d'actine a une structure en double hélice avec un diamètre compris entre 7 et 9 nanomètres, et un pas d'environ 37 nanomètres (Fig. 1.7). Avec une longueur de persistance (L_p) d'environ 17 micromètres, c'est une structure relativement souple. Le monomère d'actine G, brique élémentaire d'un filament, est une protéine dissymétrique composée de deux sphères entre lesquelles se trouve une fente où se fixe un nucléotide (ATP ou ADP⁵). Tous les monomères constitutifs d'un filament étant orientés parallèlement, les filaments d'actine, comme les microtubules, sont polarisés.

⁵Adénosine DiPhosphate

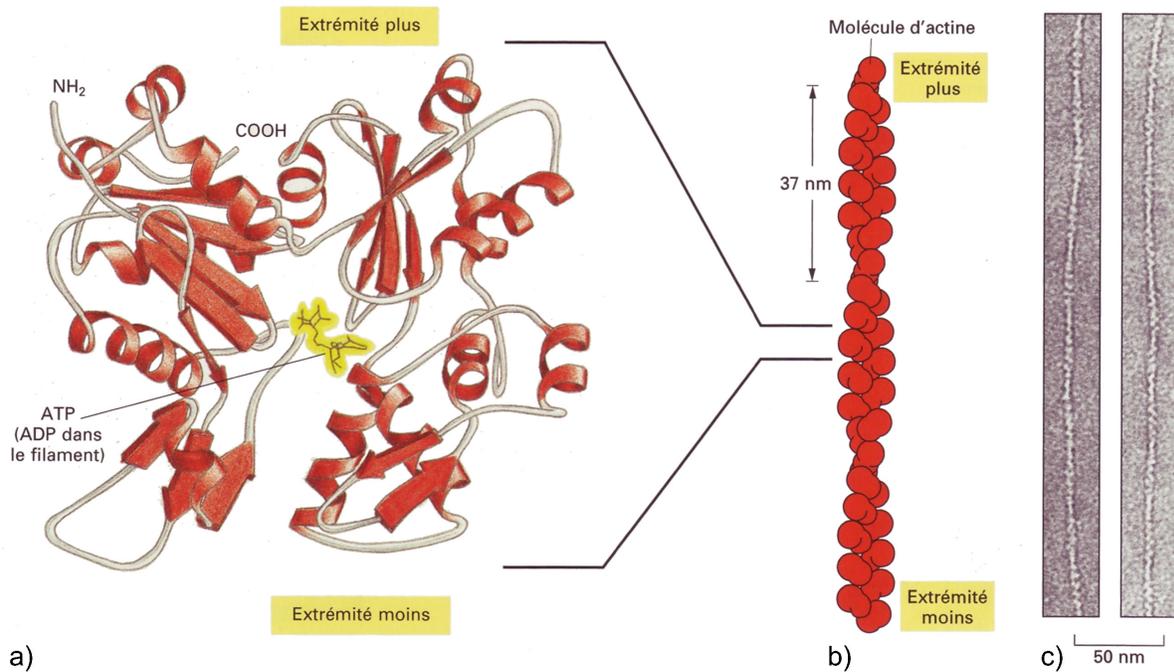


FIG. 1.7: Structure d'un monomère d'actine et arrangement des monomères dans un filament. a) Le monomère d'actine a un nucléotide (ATP ou ADP) fixé sur une fente profonde au centre de la molécule. b) Disposition des monomères dans un filament. Bien que le filament soit souvent décrit comme une unique hélice de monomères, on peut aussi considérer qu'il est composé de deux protofilaments, maintenus ensemble par des contacts latéraux, qui s'enroulent l'un autour de l'autre comme deux brins parallèles d'une hélice, avec une répétition de tour tous les 37 nanomètres. Toutes les sous-unités à l'intérieur du filament ont la même orientation. c) Photographie en microscopie électronique de filaments d'actine (Alberts *et al.*, 2002).

La polymérisation à une extrémité du filament est fonction de la concentration en monomères libres (C) : en dessus d'une concentration critique d'actine G notée C_c , des monomères peuvent venir s'ajouter à cette extrémité à une vitesse proportionnelle à la concentration en actine G ($k_{on} \times C$), en dessous de cette concentration, l'extrémité a tendance à dépolymériser à une vitesse indépendante de la concentration en actine G (k_{off}). A la concentration critique $C_c = \frac{k_{off}}{k_{on}}$, l'extrémité du filament est à l'équilibre, la vitesse d'addition des sous-unités étant égale à la vitesse d'élimination des sous-unités. Lors de la polymérisation de l'actine, des monomères liés à l'ATP s'ajoutent à une extrémité d'un filament existant, l'ATP s'hydrolyse lentement le long de ce filament et des monomères liés à l'ADP se désassemblent à son autre extrémité. Une des conséquences de l'hydrolyse de l'ATP qui accompagne la formation du polymère d'actine est une modification de conformation de chaque sous-unité du filament (monomère d'actine). Les deux bouts du filament n'ont alors pas la même affinité pour les monomères d'actine libres. k_{on}^T et

k_{off}^D , se référant à des réactions (respectivement l'addition d'un monomère portant un ATP et la séparation d'un monomère portant un ADP) différentes aux deux extrémités du polymères, les vitesses de polymérisation ainsi que les concentrations critiques C_c sont différentes aux deux extrémités, notées + et -, du polymère. La forme des têtes de myosines qui se fixent le long des filaments, observées en microscopie électronique en 1963 (Huxley, 1963), ont donné leurs noms respectifs aux deux extrémités du filament d'actine : les extrémités + des filaments d'actine sont dites « barbées » et les extrémités - sont dites « pointues ». Des études *in vitro* (Pollard, 1986) ont estimé les concentrations critiques à $0.1 \mu M$ et $0.8 \mu M$ pour les extrémités barbée et pointue. Ces observations ont conduit à l'élaboration d'un modèle pour décrire la polymérisation d'un filament d'actine : pour une concentration d'actine G comprise entre les concentrations critiques aux extrémités barbée et pointue, l'extrémité barbée s'allonge, tandis que l'extrémité pointue dépolymérise. En régime stationnaire, la concentration en actine monomérique libre est constante, le filament est à l'équilibre : il polymérise aussi rapidement au bout barbé qu'il dépolymérise au bout pointu. Tandis que la longueur du filament, alors en équilibre dynamique, reste constante, il y a un perpétuel renouvellement des monomères qui le constituent. Les monomères nouvellement ajoutés au filament à l'extrémité + paraissent avancer dans le filament, comme sur un « tapis roulant », avant d'atteindre le bout - où ils se dissocient. Ce phénomène, rappelant la rotation d'une vis sans fin, est appelé « treadmilling ».

Les vitesses de polymérisation mesurées dans la cellule (plusieurs micromètres par seconde) sont supérieures à celles *in vitro* de quelques dizaines de nanomètre par seconde observées par Wegner (Wegner, 1976). Ceci est dû à la présence de diverses protéines pouvant s'associer à l'actine et intervenant dans le processus de polymérisation (Fig. 1.8) :

- La profiline : en se liant aux monomères d'actine complexés à l'ATP, cette protéine favorise l'association des monomères au bout barbé et empêche leur association au bout pointu.
- L'ADF/cofiline : en se liant au filament d'actine polymérisé, cette protéine augmente le taux de dissociation des monomères au bout pointu, donc la concentration d'actine monomérique à l'équilibre, ainsi que la vitesse de polymérisation à l'extrémité barbue qui lui est proportionnelle.
- Les « capping protéines » (ou protéines de coiffe) : ces protéines se lient au bout barbé du filament d'actine, empêchant sa polymérisation. Les filaments dont la polymérisation est ainsi bloquée ne peuvent plus que dépolymériser, les autres pouvant quant à eux croître plus vite.

- Le complexe Arp2/3 : il s'agit d'un nucléateur de filament. Il se fixe sur le côté d'un filament d'actine polymérisé et initie la croissance d'une branche à 70° du filament initial en mimant le bout pointu d'un filament (Pantaloni *et al.*, 2001).
- Des protéines de la famille des formines : ces protéines ont également été identifiées comme nucléatrices de filaments d'actine.

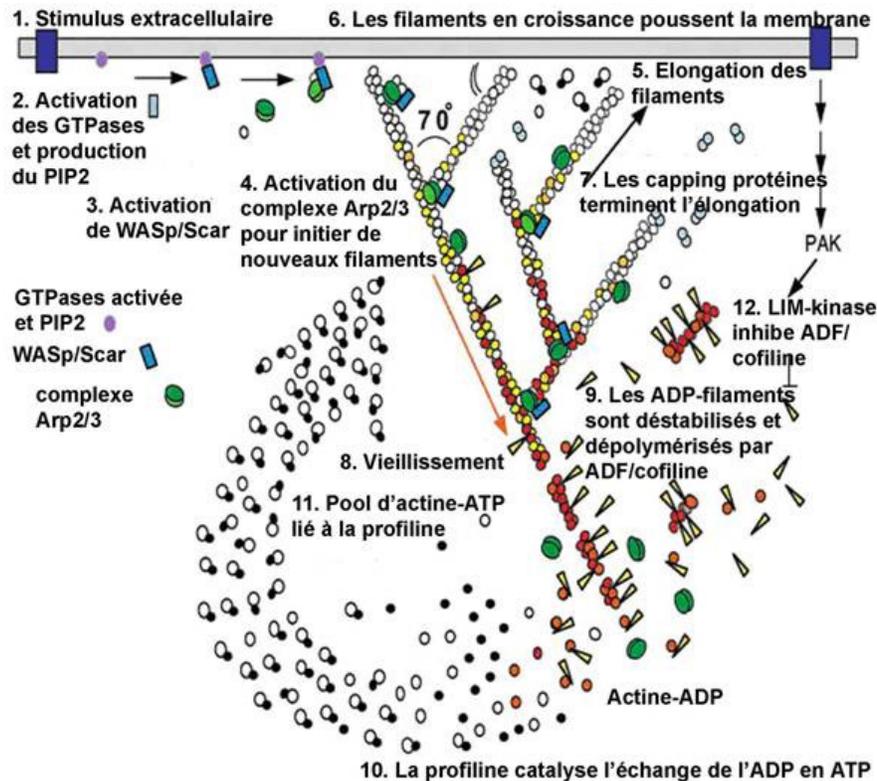


FIG. 1.8: Schéma décrivant la polymérisation de l'actine au voisinage de la membrane plasmique (Pollard et Borisy, 2003)

Pour former l'échaffaudage intracellulaire qui détermine la forme de la cellule, les éléments du cytosquelette doivent être organisés et maintenus en structures à plus grande échelle. Pour cela, les filaments d'actine des cellules animales sont organisés en deux types de motifs :

- Les faisceaux : ils sont constitués par un assemblage parallèle de filaments d'actine reliés entre eux par des liaisons croisées faisant intervenir des protéines de fasciculation. De petite taille, ces protéines forcent les deux filaments qu'elles relient à rester parallèles. Citons pour exemple la villine et la fimbrine présentes dans les faisceaux d'actine constituant les filopodes qui croissent en périphérie de la cellule, ainsi que

l' α -actinine, cette dernière étant responsable de la liaison relativement lâche des filaments d'actine dans les fibres de stress et de leur maintien en « contacts focaux » au niveau de la membrane plasmique.

- Les gels : ils sont constitués de filaments faisant entre eux de grands angles car dans ce cas, les protéines de réticulation (telles que le complexe Arp2/3, la spectrine, la filamine) sont relativement longues et flexibles, permettant aux filaments de choisir leur orientation respective. Dans la cellule, un gel d'actine réticulée nommé cortex est associé à la membrane plasmique, dont il augmente le module de courbure (Simson *et al.*, 1998).

Cet échaffaudage moléculaire est arrimé à la membrane plasmique par des complexes d'ancrage. La forme de la cellule dépend non seulement de l'arrangement de ses filaments d'actine, mais aussi des protéines qui les fixent à la paroi, qui seront présentées dans la partie 1.3. Des adaptateurs moléculaires, tels que α -actinine et la vinculine permettent ainsi de relier les faisceaux d'actine aux protéines transmembranaires impliquées dans l'adhésion cellule-substrat (intégrines) ou dans les jonctions inter-cellulaires (cadhérines).

Le cytosquelette d'actine n'a cependant pas seulement un rôle de soutien de la membrane plasmique. La polymérisation de l'actine est également génératrice de forces dans la cellule, permettant par exemple à la bactérie pathogène *Listeria* de se propulser et de transpercer la membrane de sa cellule hôte pour infecter une cellule voisine (Theriot *et al.*, 1992). Des expériences en vidéomicroscopie ont montré que l'actine polymérise contre la membrane, y créant localement une tension. Les forces ainsi générées engendrent des structures qui confèrent sa forme à la cellule :

- Les filopodes : ils sont formés d'un faisceau comptant une vingtaine de filaments d'actine reliés entre eux par des protéines de pontage, telle la fascine.
- Les microvilosités : elles sont soutenues par un squelette de microfilaments interconnectés par la villine et la fimbrine.
- Les lamellipodes : ils sont constitués d'un réseau branché de filaments.

Les filaments d'actine sont également capables de complexer avec des moteurs moléculaires appelés myosines pour former des faisceaux parallèles et contractiles. Dans les cellules musculaires, les molécules de myosine II s'organisent en filaments épais et engendrent la contraction des gros faisceaux d'actine, les sarcomères. Dans les cellules non musculaires, actine et myosine II s'associent en faisceaux contractiles impliqués dans la formation de

plaques d'adhérence et dans la migration cellulaire.

Les petites GTPases de la famille Rho jouent un rôle primordial dans une telle structuration du réseau d'actine. Ces protéines sont de véritables « interrupteurs moléculaires », contrôlant des processus cellulaires : citons par exemple Rac1 et CDC42 intervenant dans la formation des lamellipodes et filopodes (Ridley *et al.*, 1992; Nobes et Hall, 1995) et RhoA qui permet, entre autres, la formation des faisceaux contractiles d'actine et de myosine (Ridley *et al.*, 1992) dont font partie les fibres de stress.

1.2.3 Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont des polymères protéiques résistants de 10 nanomètres de diamètre, présents dans le cytoplasme de la plupart des cellules. On les appelle « intermédiaires » car leur diamètre apparent est compris entre celui des filaments d'actine (microfilaments) et celui des microtubules. Ils sont composés de protéines d'une famille comptant plus de 50 membres, différents d'un point de vue biochimique, mais possédant une superstructure commune : toutes ces protéines ont un domaine central de 40 nanomètres de long en forme de batonnet (hélice α) très conservé alors que les domaines N- et C-terminaux sont très variables. A partir des homologies de séquence, on distingue 6 groupes parmi lesquels la kératine, la vimentine, la lamine et la nestine. La structure d'un filament intermédiaire résulte de l'organisation de ces protéines (Fig. 1.9) :

- Association de deux protéines en dimère
- Surenroulement de deux dimères en un protofilament (formation d'un tétramère)
- Assemblage des protofilaments en quinconce (souvent jusqu'à 8 protofilaments)

Ce type d'association implique que le filament intermédiaire n'est pas polarisé, ses deux extrémités sont équivalentes contrairement aux microfilaments et aux microtubules.

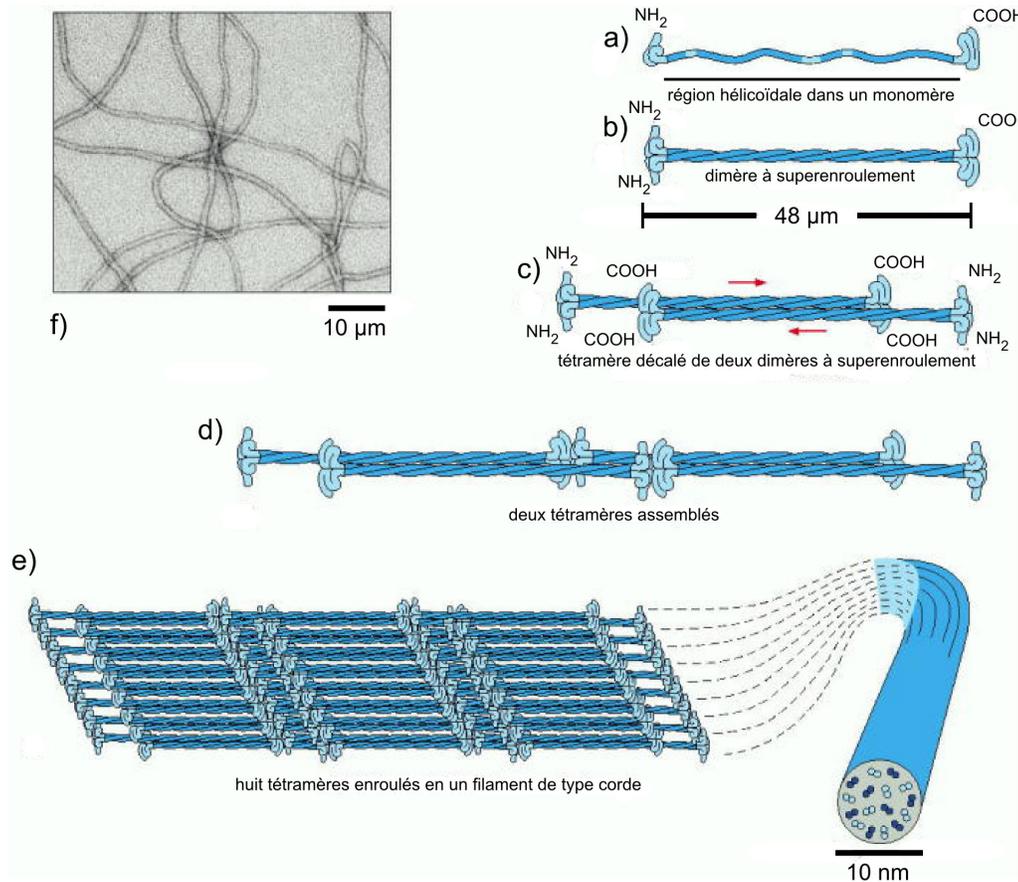


FIG. 1.9: Modèle de l'édification d'un filament intermédiaire : le monomère (a) s'apparie à un monomère identique pour former un dimère (b) dans lequel les domaines centraux s'enroulent ensemble en un superenroulement. Deux dimères s'alignent côte à côte pour former un tétramère antiparallèle (c) de quatre chaînes polypeptidiques, décalés l'un par rapport à l'autre pour pouvoir s'associer à un autre tétramère (d). Dans le filament final (d) en forme de corde, les tétramères sont disposés en une conformation hélicoïdale, qui possède 16 dimères en coupe transversale, la moitié pointant dans une direction, l'autre moitié dans l'autre direction. f) Filament intermédiaire vu au microscope électronique. (Alberts *et al.*, 2002)

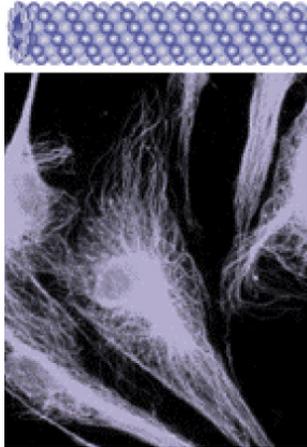
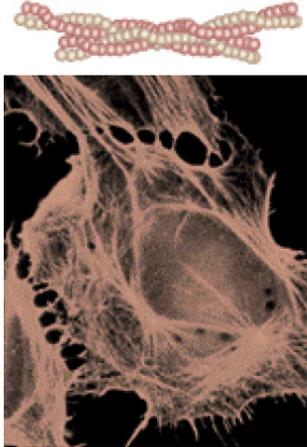
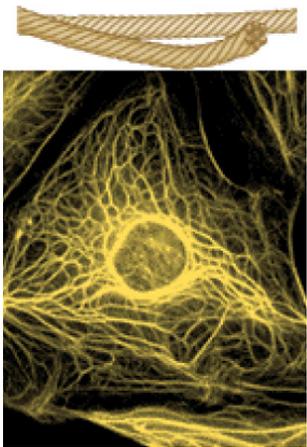
Les réseaux de filaments intermédiaires sont peu dynamiques, excepté au moment de la division cellulaire où ils se réorganisent fortement. Ce sont ainsi les structures les plus stables du cytosquelette (Fuchs et Weber, 1994), ils constituent la charpente de la cellule (Beil *et al.*, 2003). Différents types de filaments intermédiaires sont impliqués dans ce rôle de maintien de la structure cellulaire :

- Un réseau de filaments de kératine entoure le noyau et s'étend jusqu'à la périphérie de la cellule.
- Un réseau de lamine mince et serré soutient la membrane nucléaire.
- D'autres types de filaments intermédiaires s'étendent à travers le cytoplasme et donnent à la cellule sa résistance mécanique.

- Grâce à leur ancrage aux desmosomes et hémidesmosomes, les réseaux de filaments intermédiaires relient respectivement deux cellules ensemble et une cellule et la matrice extracellulaire, assurant ainsi la cohésion des tissus. Ces interactions permettent de répartir les contraintes mécaniques appliquées à une cellule sur les cellules voisines, et ainsi d'assurer l'intégrité des cellules.

1.2.4 Synthèse comparative des propriétés et rôles des trois types de filaments du cytosquelette

Le tableau suivant (Tab. 1.1) regroupe de manière synthétique les caractéristiques et les propriétés individuelles des trois éléments composant le cytosquelette, qui interviennent sur des échelles spatio-temporelles s'étalant sur plusieurs ordres de grandeur, et dont la combinaison confère sa structure à la cellule.

Caractéristiques	Microtubules	Filaments d'actine	Filaments intermédiaires
			
Sous-unités protéiques	Tubuline	Actine G (libre)	Famille hétérogène de protéines (kératine, desmine, vimentine...)
Diamètre du filament (Φ)	$\Phi \sim 25 \text{ nm}$	$\Phi \sim 5 - 9 \text{ nm}$	$\Phi \sim 10 \text{ nm}$
Longueur du filament (L)	$L \sim 0.2 - 25 \mu\text{m}$	$L \sim 30 - 100 \mu\text{m}$	$L \sim 10 - 20 \mu\text{m}$

Caractéristiques	Microtubules	Filaments d'actine	Filaments intermédiaires
Polarité	Polarisé Extrémités + et -	Polarisé, extrémités + (barbée) et - (pointue)	Non polarisé
Module d'Young (E)	$E \sim 10^9 Pa$	$E \sim 10^9 Pa$	$E \sim 10^7 Pa$
Longueur de persistance (L_p)	$L_p \sim 5 mm$	$L_p \sim 17 \mu m$	$L_p \sim 1 \mu m$
Organisation structurale dans la cellule	- En étoile depuis le centrosome - Sous forme de fibres ou de fuseau mitotique dans le cytoplasme - Structure échaffaudée dans les cils	- Dispersés en réseaux ou en filaments au travers de la cellule - Très concentrés dans la zone corticale - Filaments isolés rares	- Sous forme de coque nucléaire et sous membranaire - Très concentrés dans le cytoplasme
Propriétés mécaniques dans la cellule	- Plus rigide que l'actine - Comportement fluide dans le cytoplasme - Résistance à la compression	- Structure flexible sous tension	- Structure stable
Fonctionnalité	- Transport de vésicules, organites... - Alignement et partage des chromosomes pendant la mitose - Motilité (cils, flagelles) - Contractilité	- Maintien de la membrane - Forme cellulaire (filopodes, lamellipodes microvillosités) - Contractilité (avec la myosine) - Adhésion	- Ossature de la cellule - Résistance mécanique de la cellule

TAB. 1.1: Propriétés des trois composants du cytosquelette de la cellule : les microtubules, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires, synthétisées d'après Alberts *et al.* et Fudge *et al.* (Alberts *et al.*, 2002; Fudge *et al.*, 2003)

1.3 *L'adhésion cellulaire*

1.3.1 *Différents types de jonctions cellulaires*

L'adhésion cellulaire est un phénomène impliqué dans la plupart des phénomènes cellulaires (survie, prolifération, différenciation, migration, activation) et des situations pathologiques (réponse immunitaire, inflammation, invasion d'un tissu par un agent pathogène, formation de métastases cancéreuses, athérosclérose et thromboses, réaction de l'organisme vis-à-vis des biomatériaux ou des virus). Dans les tissus, les cellules sont reliées les unes aux autres et à la matrice extracellulaire au niveau de sites de contact spécifiques appelés jonctions cellulaires, que l'on peut classer en trois groupes fonctionnels :

- Les jonctions occlusives : elles scellent les cellules en un épithélium de manière à empêcher le passage d'une molécule, même petite, d'un côté d'un feuillet à l'autre.
- Les jonctions communicantes : elles permettent le passage de substances chimiques ou de signaux électriques entre une cellule et son partenaire.
- Les jonctions d'ancrage : elles attachent mécaniquement les cellules (et leur cytosquelette) à leurs voisines ou à la matrice extracellulaire.

Les phénomènes adhésifs étudiés dans ce travail concernent cette troisième catégorie : les jonctions d'ancrage. Largement réparties dans les tissus animaux, elles sont particulièrement abondantes dans les tissus soumis à d'importantes tensions mécaniques où elles jouent un rôle essentiel car elles permettent de palier à l'incapacité de la bicouche lipidique, fragile, à transmettre d'importantes forces d'une cellule à une autre ou à la matrice extracellulaire.

1.3.2 *Modélisation physique de l'adhésion cellulaire*

D'un point de vue physique, l'adhésion entre deux cellules ou une cellule et un substrat n'est possible que si elle est favorable énergétiquement, i. e. l'énergie du système est plus faible dans la configuration d'adhésion que dans l'état dissocié. Bien qu'il existe des interactions attractives à courte portée (interactions de type Van der Waals), deux vésicules, chacune formée d'une membrane lipidique fermée, n'adhèrent pas naturellement à cause des fluctuations thermiques à longue portée de la membrane (Israelachvili, 1985; Helfrich, 1973). Pour contrôler l'adhésion et s'attacher de manière sélective, les cellules vivantes sont en plus dotées de mécanismes d'anti-adhésion, comme la présence d'une

région appelée « glycocalyx », riche en sucres hydrophiles porteurs d'une charge négative qui induisent un effet répulsif entropique également à longue portée. Pour surpasser cette barrière répulsive et atteindre un état de plus basse énergie, des liaisons sont créées entre les deux cellules : les protéines d'adhésion diffusant dans la membrane lipidique reconnaissent des ligands fixés sur une surface ou diffusant sur la membrane d'une autre cellule (Fig. 1.10). Le gain d'énergie apporté par les interactions entre les molécules d'adhésion de deux membranes a été estimé à $5 - 20 kT$ (Zuckerman et Bruinsma, 1998). Dans les conditions physiologiques, les cellules peuvent ainsi vaincre des effets répulsifs pour adhérer, tout en ayant la possibilité de se désassembler pour certains processus comme la migration.

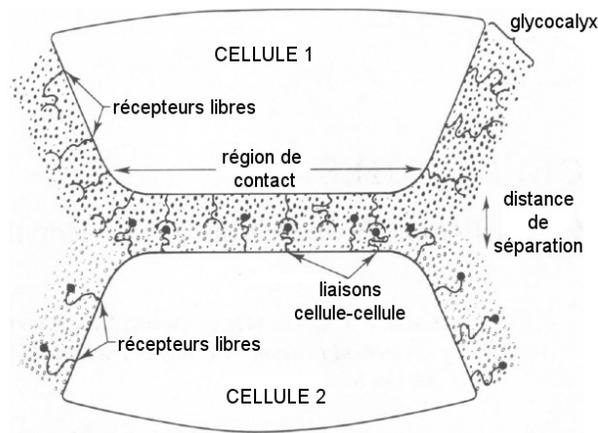


FIG. 1.10: Modèle de l'interaction des molécules de surfaces dans la région de contact cellulaire. La répulsion non spécifique due à des polymères hydrophiles associés à la surface de la cellule est contrebalancée par la formation de ponts entre des récepteurs mobiles présents à la surface des cellules (Bell *et al.*, 1984).

Les travaux sur l'adhésion cellulaire ont été initiés par Bell en 1978 (Bell, 1978). Son modèle repose sur une description physique avec les outils de la thermodynamique et de la physique statistique. Ceux-ci se justifient respectivement par les faits que les processus physiques et chimiques impliqués s'équilibrent sur des échelles de temps courtes comparées à celle des changements métaboliques de la cellule, et que l'adhésion repose sur l'effet coopératif d'un grand nombre de molécules d'adhésion (de l'ordre de 10^4 molécules par μm^2). Les hypothèses de ce modèle sont pour la plupart tirées d'observations expérimentales :

- La présence du glycocalyx impose une distance intermembranaire importante (de 50 à 100 nanomètres), ce qui rend négligeable toute interaction non spécifique de type Van der Waals.

- La salinité de l’environnement physiologique rend la longueur de Debye très faible (de l’ordre du nanomètre). Toute interaction électrostatique est donc inefficace dans les phénomènes adhésifs.
- Les molécules d’adhésion diffusent librement dans la membrane plasmique.

Le Hamiltonien H du système comporte deux termes : $H = H_{L/R} + H_{rep}$, l’adhésion cellulaire étant décrite comme la compétition entre la répulsion due au glycocalyx comprimé entre les membranes des deux cellules (H_{rep}) et les interactions attractives spécifiques de type ligand-récepteur entre les molécules d’adhésion ($H_{L/R}$). A chaque oscillation d’un complexe ligand-récepteur due à l’agitation thermique, il existe une certaine probabilité de rupture P donnée par la loi de Boltzmann $P = \exp[-\epsilon/kT]$, où k est la constante de Boltzmann, T la température absolue et ϵ l’énergie d’activation nécessaire pour rompre la liaison. Si le complexe est soumis à une force étrangère F , l’énergie nécessaire pour rompre la liaison sera diminuée puisque la force contribue à la rupture en fournissant une énergie Fd , où d est la portée de la liaison. La constante de dissociation du complexe ligand-récepteur peut alors s’écrire : $k_{off} = k_0 \exp(F_r d/kT)$, où F_r est la force de rupture de la liaison, et k_0 la constante de dissociation en absence de force appliquée. Pour une liaison typique supposée de portée égale à 0.5 nanomètre, Bell a ainsi estimé à 20 piconewtons la force de rupture $F_r = kT/d$ correspondante (Bell, 1978; Verdier *et al.*, 2008). C’est également l’ordre de grandeur des forces mesurées en AFM⁶. Pour déterminer si deux cellules adhèrent (ou si une cellule adhère sur un substrat), plusieurs paramètres doivent être pris en compte :

- Le nombre de molécules d’adhésion, i. e. de récepteurs et de ligands
- L’aire de chaque cellule
- Les potentiels chimiques des couples ligand-récepteur libres et liés
- La répulsion surfacique due au glycocalyx
- Le taux de chargement peut également jouer un rôle sur l’intensité de la force de rupture F_r .

Afin d’améliorer la modélisation du phénomène d’adhésion, des ingrédients du problème biologique ont été ajoutés au modèle initial de Bell. La prise en compte des propriétés élastiques des membranes permet d’expliquer l’agrégation observée des molécules d’adhésion. En effet, le regroupement des protéines membranaires en zones discrètes minimise la per-

⁶Atomic Force Microscope

turbation des lipides environnants de la membrane (Huang, 1986; Dan *et al.*, 1993) et diminue la surface sur laquelle la répulsion entropique entre le glycocalyx est forte ainsi que les zones de forte courbure de la membrane (Bruinsma *et al.*, 1994; Menes et Safran, 1997). Le Hamiltonien s'écrit alors comme la somme de trois contributions : $H = H_{L/R} + H_{rep} + H_{el}$ où H_{el} est le Hamiltonien de la membrane, prenant en compte l'énergie de courbure de la membrane, l'énergie de tension superficielle et l'énergie de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Quant au Hamiltonien de l'interaction ligand récepteur ($H_{L/R}$), il comporte, en plus du terme de l'énergie de liaison gagnée par la formation des couples ligand-récepteur, une énergie de répulsion de sphères dures entre molécules voisines et une énergie de courbure induite au niveau de la liaison par la contrainte de distance entre le récepteur et le ligand. La minimisation de ce Hamiltonien total a permis de tracer un diagramme de phase en fonction de la tension de membrane et de la pression due au glycocalyx (Fig. 1.11), sur lequel apparaissent trois régimes d'adhésion distincts :

- Un régime non adhésif quand la pression du glycocalyx est forte (au dessus du double trait sur la figure 1.11).
- Un régime d'adhésion faible pour de petites valeurs de pression du glycocalyx (région notée « Weak Coupling » sur la figure 1.11).
- Un régime d'adhésion forte dans lequel tous les couples ligands-récepteurs ont tendance à se concentrer en un point pour des faibles tensions de membrane et pression du glycocalyx (zone hachurée sur la figure 1.11).

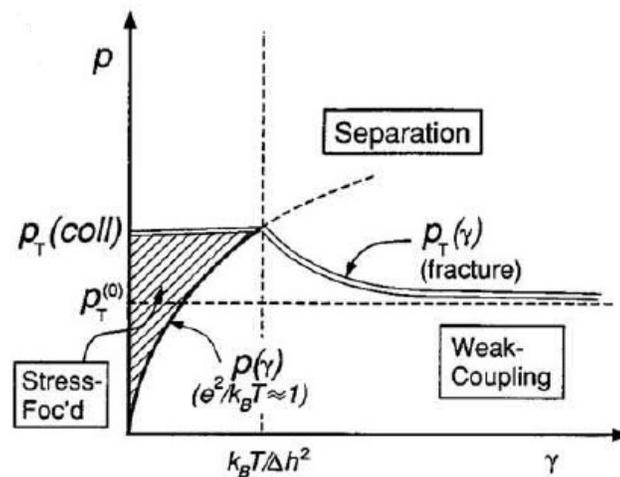


FIG. 1.11: Diagramme de phase de l'adhésion entre deux vésicules avec p la pression due au glycocalyx et γ la tension de la membrane. Le double trait marque la séparation entre les domaines où les vésicules sont adhérentes (en dessous du trait), et celui où elles sont séparées (au dessus du trait). La zone notée « Weak Coupling » correspond à un disque d'adhésion avec des molécules adhésives réparties majoritairement sur le bord, tandis que dans la zone hachurée, les molécules adhésives sont rassemblées et forment un « cluster » unique (Zuckerman et Bruinsma, 1998).

D'après plusieurs travaux, la dynamique de formation des zones adhésives semble être bien décrite par des lois de puissance pour le rayon de la surface de contact d'une cellule adhérente sur un substrat en fonction du temps (P. G. de Gennes et Brochard-Wyart, 2003; Cuvelier *et al.*, 2007).

Des modèles ont également été élaborés pour prendre en compte l'effet de la contrainte hydrodynamique sur une cellule adhérente à une paroi, ils seront abordés dans la partie 1.4.5.

1.3.3 Les contacts focaux

1.3.3.1 Localisation des contacts focaux

Les premières observations des zones d'adhésion d'une cellule sur un substrat ont été réalisées par Curtis en 1960 (Curtis, 1960; Curtis, 1962; Izzard et Lochner, 1976). Il a utilisé une technique de microscopie interférométrique appelée RICM⁷ permettant d'imager la répartition de distance entre la membrane de fibroblastes de poulet et la lame de verre sur laquelle ces cellules étaient étalées. Il a observé que le corps cellulaire était généralement éloigné de 50 nanomètres de la surface du verre, alors que de petites régions en bordure de cellules n'étaient séparées que d'une dizaine de nanomètres de cette surface (Fig. 1.12). Une dizaine d'années plus tard, Izzard et Lochner ont repris et amélioré cette technique sous le nom DIC⁸ (Izzard et Lochner, 1976), et ont remarqué l'existence de zones de contact fines et allongées, situées à la périphérie de la cellule, perpendiculaires à la bordure de la cellule et colocalisant avec l'extrémité de microfilaments d'actine (Fig. 1.12). Ces zones d'adhésion étant les plus proches de la surface de verre, ils les ont appelées « contacts focaux ».

⁷Reflection Interference Contrast Microscopy

⁸Differential Interferential Contrast, aussi appelé Nomarsky

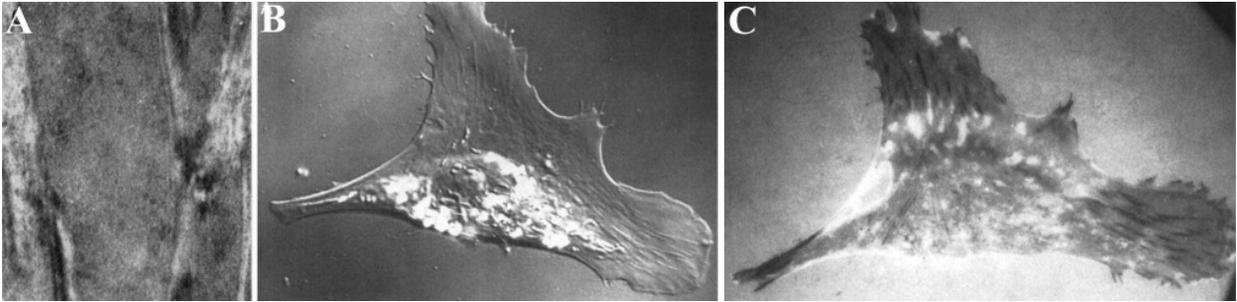


FIG. 1.12: Découverte des contacts focaux. A) Images en RICM de fibroblastes de poulet étalés sur une lamelle de verre. Les zones sombres correspondent aux zones de contact alors que le corps cellulaire, plus clair, est plus éloigné de la lamelle (Curtis, 1962). B) et C) Colocalisation des microfilaments d'actine d'une cellule adhérente repérés en DIC (B) et des zones de contact visualisées en RICM (C) (Izzard et Lochner, 1976).

1.3.3.2 Rôle des contacts focaux

Ces plaques d'adhésion, ou contacts focaux, sont une forme des jonctions d'ancrage qui fixent les cellules à la matrice extracellulaire. On appelle matrice extracellulaire le matériel extracellulaire organisé en fibres ou en feuillets, sécrété par les cellules. Elle constitue un substrat, une séparation et une structure de maintien des tissus et organes. Elle est composée principalement de collagène et de protéines fibreuses (fibronectine, laminine, vitronectine...) permettant l'adhésion. Les contacts focaux sont des structures résistantes qui traversent la membrane. Ils sont fixés à l'intérieur de la cellule sur les filaments d'actine du cytosquelette qui supportent la tension. Ils permettent à la cellule d'exercer des forces de traction sur sa matrice extracellulaire via le système de contractilité d'acto-myosine. La morphologie des contacts focaux est très dépendante du type cellulaire, et notamment du degré de motilité des cellules. Les cellules « statiques » ou à migration lente (comme les fibroblastes, dont la vitesse de déplacement est de $\sim 1\mu m/min$) sont connues pour développer des contacts focaux allongés et de taille relativement importante tandis que les cellules à locomotion rapide (telles que les kératocytes), présentent des adhésions ponctuelles.

1.3.3.3 Molécules impliquées dans les contacts focaux

Les contacts focaux peuvent être décrits comme un système à 4 étages : des ligands (étage 1) sont reconnus par une protéine d'adhésion (étage 2), elle-même en interaction

avec des complexes protéiques (étages 3) assurant la liaison à l'actine (étage 4). Les protéines d'adhésion transmembranaires impliquées dans ce type de jonctions sont les intégrines, une grande famille de protéines. Les intégrines sont des protéines transmembranaires hétérodimériques composées de deux chaînes protéiques distinctes : une chaîne α et une chaîne β . Chacune des chaînes comprend une partie principale extracellulaire responsable de l'adhésion du ligand, un domaine transmembranaire traversant la membrane plasmique une seule fois, et un domaine cytoplasmique généralement très court (d'environ 15 à 20 acides aminés). Les chaînes α et β interagissent entre elles pour former un hétérodimère stabilisé surtout par des liaisons entre leurs parties extracellulaires. Il existe chez les mammifères 18 sous-unités α et 8 sous-unités β , pouvant former 24 intégrines différentes, toutes les combinaisons n'étant pas représentées (Fig. 1.13). Les chaînes α et β forment ensemble le site de liaison pour des ligands extracellulaires. La plupart des intégrines se lient à plusieurs ligands (grâce à des changements de conformation), de même qu'un ligand peut être associé à plusieurs intégrines, ce qui est par exemple le cas de la fibronectine (comportant notamment la séquence RGD⁹) reconnue par les intégrines $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$.

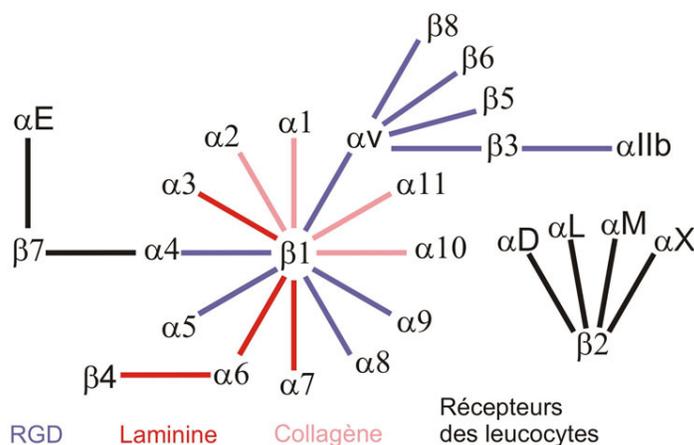


FIG. 1.13: Famille des intégrines : schéma des diverses possibilités d'agencement entre les 18 sous-unités α et les 8 sous-unités β d'intégrines. Les différents substrats associés à chaque paire sont représentés par des barres de couleur : les séquences RGD (fibronectine, vitronectine...) sont en bleu, la laminine est en rouge, le collagène est en rose et les différents récepteurs des leucocytes sont en noir (Hynes, 1992).

La liaison d'une intégrine à un ligand extracellulaire fournit à une cellule un point de contact avec son environnement. Bien que l'interaction ligand-récepteur soit forte, cette liaison reste instable car des forces modestes suffisent à arracher l'intégrine de la mem-

⁹Arginine-Glycine-Acide aspartique

brane plasmique. Un ancrage de l'intégrine dans une structure intracellulaire résistante telle le réseau d'actine est donc nécessaire. Pour cela, les domaines cytoplasmiques des intégrines sont capables d'interagir avec des protéines intracellulaires par l'intermédiaire d'un complexe protéique composé d'un grand nombre de protéines différentes :

- Des protéines associées à l'actine (vinculine, paxilline, α -actinine...)
- Des protéines liant le domaine cytoplasmique (FAK, α -actinine, tensine...)
- Des kinases et des phosphatases régulant l'activité de certaines protéines (en contrôlant la phosphorylation et la déphosphorylation)
- Des régulateurs de petites GTPases et d'autres enzymes.

Toutes ces protéines ne sont pas présentes simultanément dans un contact focal, la composition exacte d'un contact focal dépend du type d'intégrine et du degré de maturation du contact (Fig. 1.14). En effet, suite à un stimulus externe impliquant une voie de signalisation activée par la protéine RhoA, les complexes focaux, de petite taille et situés sous les lamellipodes, évoluent en contacts focaux (ou zones focales), de plus grande taille et de forme allongée situés à la périphérie des cellules (Riveline *et al.*, 2001).

L'actine intervient dans les contacts focaux sous forme de faisceaux de filaments complexés avec la myosine II, une extrémité de ces faisceaux se terminant au niveau du contact focal (Abercrombie et Dunn, 1975).

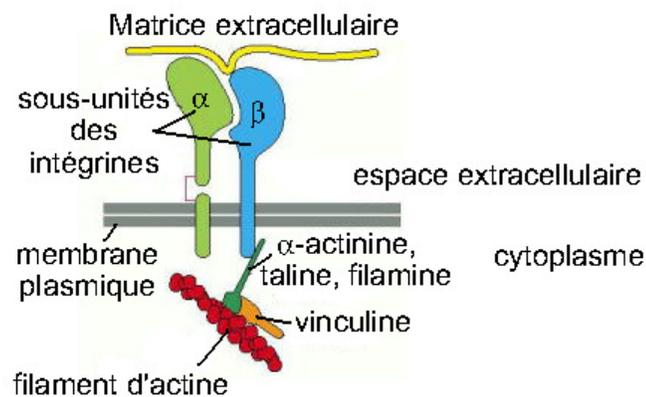


FIG. 1.14: Schéma d'une adhésion focale, inspiré de Alberts *et al.* La protéine d'adhésion transmembranaire est un hétérodimère d'intégrine composé d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Son domaine extracellulaire se lie avec des composants de la matrice extracellulaire, et le domaine cytoplasmique de la sous-unité β est indirectement attaché à l'actine par l'intermédiaire de différentes protéines d'ancrage (Alberts *et al.*, 2002).

1.3.4 Influence de la rigidité du substrat

Des cellules adhérentes sont capables d'évaluer certaines caractéristiques de leur environnement et d'adapter leur comportement en conséquence. En effet, par les phénomènes de chimiotaxie, haptotaxie, phototaxie, galvanotaxie, géotaxie, les cellules peuvent répondre à des gradients de concentration de réactifs dissous (Pettit et Fay, 1998), de ligands adhésifs (Harris, 1973), d'intensité lumineuse (Saranak et Foster, 1997), de potentiel électrostatique (Brown et Loew, 1994), de potentiel gravitationnel (Lowe, 1997) respectivement.

Il existe un phénomène similaire, la durotaxie, concernant les propriétés mécaniques de l'environnement cellulaire : en fonction de la rigidité mécanique de leur substrat i. e. son module d'Young E , les cellules adoptent différentes morphologies et vitesses de migration. Ainsi, Pelham *et al.* ont comparé l'étalement de cellules épithéliales et de fibroblastes sur des substrats en polyacrylamide de rigidités différentes (Pelham et Wang, 1997). Ils ont observé que la surface d'étalement croît avec la rigidité du gel, avec un comportement similaire à celui sur du verre ou du plexiglas pour les gels de polyacrylamide les plus durs. Leurs expériences montrent que l'activité au niveau du lamellipode des cellules épithéliales augmente avec la flexibilité du substrat : le bord des cellules fluctue plus (protrusions et rétractions successives) sur les substrats les plus mous. Ils ont mesuré des vitesses de migration plus rapides pour les fibroblastes adhérents sur les substrats mous : ceux-ci peuvent se déplacer d'autant plus vite que le substrat est souple. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lo *et al.*, qui ont de plus montré qu'en présence d'un substrat de rigidité non uniforme, les cellules se déplacent en direction des régions les plus dures (Lo *et al.*, 2000). Ce mécanisme de migration, appelé « durotaxie », peut s'expliquer par le fait que l'adhésion est moins stable sur les substrats mous : les complexes d'adhésion sont ponctuels ($< \mu m^2$), diffus et très dynamiques sur un substrat « mou », de module d'Young $E \sim 1 kPa$, alors qu'ils forment des structures stables et allongées (plusieurs μm^2) sur des substrats plus rigides, de module d'Young $E \sim 100 kPa$ (Pelham et Wang, 1997; Discher *et al.*, 2005). Les adhésions transitoires sur les substrats mous vont de pair avec la mise en mouvement de la cellule, qui va chercher à migrer vers les zones du substrat de plus grande rigidité mécanique, favorables à la formation d'adhésions focales qui déclenchent une cascade de réactions chimiques influençant l'expression génétique, la prolifération et la survie cellulaire. Sur un substrat suffisamment dur, les complexes focaux mûrissent en contacts focaux.

Au niveau des zones focales, les forces contractiles générées par les interactions entre le cytosquelette d'actine et des moteurs moléculaires tels la myosine peuvent être transmises au substrat : en effet, une adhésion nouvellement formée au cours de la migration cellulaire a un double rôle : d'une part elle fixe l'extension de la membrane à la matrice extracellulaire et la stabilise, et d'autre part elle sert de point d'appui pour les forces contractiles liées au couple actine-myosine qui vont ramener en avant le reste du corps cellulaire. Les fibres de stress d'actine exercent ainsi une traction sur les points d'ancrage. La localisation et l'intensité des forces de traction ont pu être obtenues expérimentalement grâce à différentes méthodes basées sur la visualisation des déformations du substrat dues aux forces de traction générées par la cellule :

- Le déplacement de billes fluorescentes insérées dans le substrat à faible distance de la surface (Lo *et al.*, 2000; Dembo et Wang, 1999; Ambrosi *et al.*, 2008; Rieu *et al.*, 2005)
- La déflexion de plots flexibles fluorescents constituant le substrat, aussi appelé « tapis de fakir » (Saez *et al.*, 2007a; Li *et al.*, 2007)

Une carte des déplacements est alors générée en comparant la position des billes ou des plots avec et sans les cellules. Il est ensuite possible, connaissant les propriétés élastiques du substrat, de remonter aux contraintes générées par les cellules. L'intensité des forces de traction varie selon le type cellulaire et la rigidité du substrat. Pour des fibroblastes 3T3, Lo *et al.* les ont estimées à $0.62 \pm 0.13 \text{ kPa}$ et $1.09 \pm 0.34 \text{ kPa}$ sur des substrats en polyacrylamide de module d'Young respectivement égaux à 14 kPa et 30 kPa (Lo *et al.*, 2000). Sur des gels de polyacrylamide plus mous, de modules d'Young compris entre 1.95 kPa et 9.9 kPa , Ambrosi *et al.* ont mesuré des forces de traction comprises entre 0.05 kPa et 0.2 kPa pour des cellules T24 (Ambrosi *et al.*, 2008).

Un modèle simple d'élasticité permet d'expliquer comment les cellules détectent les différences de rigidité de leur substrat (Saez *et al.*, 2007b). En se basant sur l'existence d'une force seuil minimale F_s s'exerçant sur un complexe d'adhésion pour en assurer la stabilité, le travail de la force W pour déformer d'une longueur x_s un substrat élastique de raideur k est donné par la relation : $W = \frac{1}{2}k\Delta x_s^2 = \frac{F_s^2}{2k}$. Par conséquent, le travail à fournir pour atteindre la formation d'un complexe stable est inversement proportionnel à la raideur du support. Il est donc énergétiquement plus favorable d'établir des adhésions sur un substrat de raideur élevée. L'adhésion, la croissance et la migration des cellules s'orientent alors dans cette direction.

L'adhésion des cellules ne se résume donc pas à un simple processus biochimique mais elle est aussi intimement liée à la réponse des cellules à la rigidité de la matrice extracellulaire. Si la construction des zones d'adhésion nécessite la comptabilité biochimique entre la cellule et son environnement, les cellules sondent les propriétés mécaniques de leur environnement et y adaptent leur activité biochimique.

1.3.5 *L'adhésion dans les processus métastatique et immunitaire*

1.3.5.1 *La diapédèse des leucocytes*

Comme cela a déjà été énoncé au paragraphe 1.3.1, l'adhérence cellulaire intervient au cours de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Dans la réponse immunitaire, la diapédèse est la traversée active des parois vasculaires par les leucocytes. La diapédèse est sous la dépendance de l'expression de molécules d'adhérence à la surface des leucocytes et des cellules endothéliales. Ces molécules appartiennent à quatre familles :

- Les Sélectines : E-sélectine (endothéliale), P-sélectine (endothéliale et plaquettaire), L-sélectine (leucocytaire).
- La Superfamille des Immunoglobulines : ICAM-1, VCAM-1..., molécules d'adhérence principalement endothéliales.
- Les Intégrines : LFA-1, MAC-1, VLA-1..., molécules d'adhérence surtout leucocytaires. Les cadhérines : VE-cadhérine, protéine assurant l'adhésion intercellulaire entre les cellules endothéliales.

Ces molécules interviennent dans les différentes étapes de la diapédèse (Fig. 1.15) :

- Margination : les leucocytes sont pressés vers le bord des microvaisseaux où le flux du sang est plus lent. Ils sont alors proches de l'endothélium qui, lors d'une inflammation, est activé par des médiateurs chimiques, cette activation entraînant une augmentation d'expression des sélectines.
- Roulement : les leucocytes, exprimant des sucres PSGL-1 et des protéoglycanes, roulent à la surface des cellules endothéliales dans les microvaisseaux en formant des liaisons fragiles et transitoires avec les sélectines de l'endothélium.
- Activation : les cellules endothéliales, activées par des médiateurs d'inflammation, produisent des chémokines associées aux protéoglycanes. Ces protéoglycanes stimulent les récepteurs présents à la surface du leucocyte.
- Adhésion : les récepteurs de chémokines présents à la surface du leucocyte activent les

intégrines inactives sur la membrane avec des signaux nucléaires. Ainsi, l'adhérence faible des leucocytes via les sélectines stimule indirectement l'expression des intégrines. Ces intégrines activées s'attachent aux ICAM¹⁰ de la cellule endothéliale. L'interaction entre les intégrines et des molécules de la superfamille des immunoglobulines (ICAM) conduit ensuite à une adhésion forte.

- Traversée de l'endothélium : la migration se fait entre deux cellules endothéliales dans la région d'inflammation, en suivant un gradient de concentration des médiateurs d'inflammation.

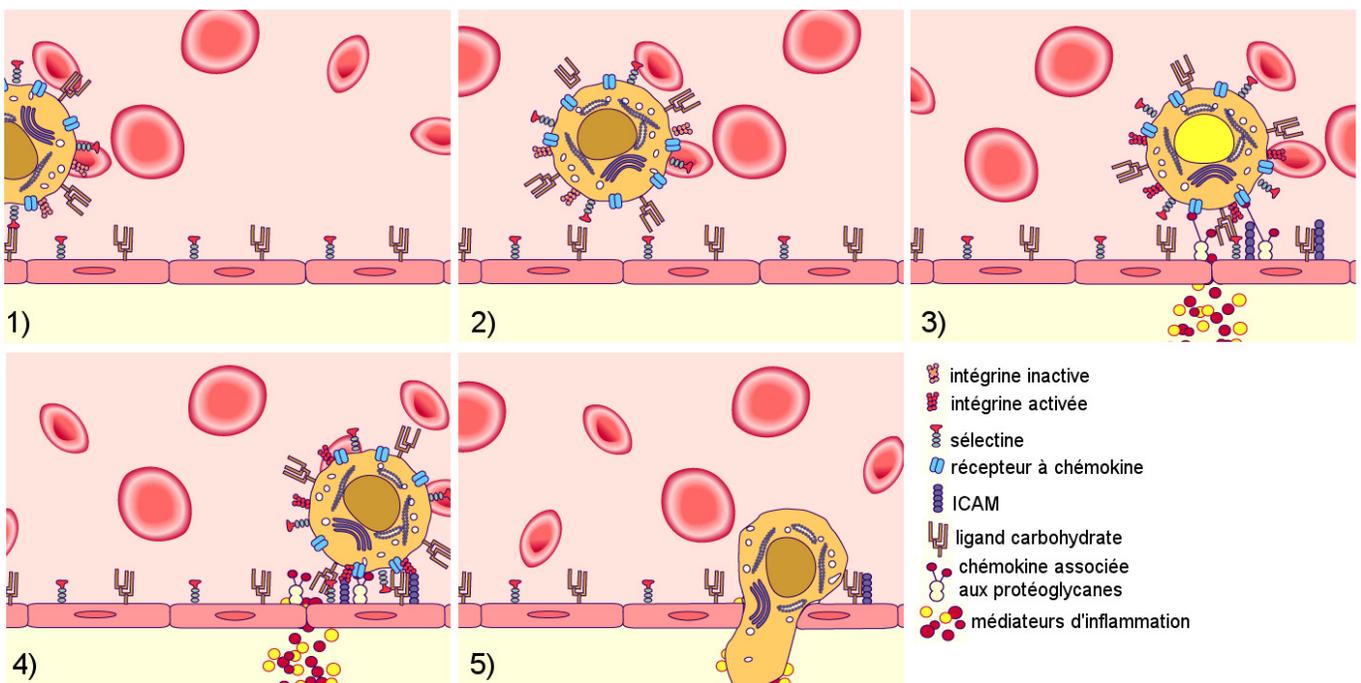


FIG. 1.15: La diapédèse des leucocytes (pour des raisons de clarté, l'échelle de taille n'est pas respectée). 1) Margination, 2) Roulement, 3) Activation, 4) Adhésion, 5) Diapédèse. (source : http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/francais/bindegewebe/popup_zelle/f-diapedese.php)

1.3.5.2 La diapédèse des cellules cancéreuses

Au cours du développement d'un cancer, l'adhésion cellulaire est prépondérante dans la formation des métastases secondaires, tout particulièrement lorsque les cellules cancéreuses

¹⁰InterCellular Adhesion Molecule

détachées de la tumeur primaire s'arrêtent à un endroit précis du réseau de circulation sanguine pour former une nouvelle tumeur. On peut classer les facteurs d'arrêt potentiel en trois catégories :

- Les contraintes mécaniques.
- Les effets de taille et les effets microfluidiques : en effet, une cellule tumorale circulante va s'arrêter dans un capillaire si le diamètre est inférieur à son diamètre, adhérer puis croître localement pour former une tumeur secondaire
- Les mécanismes de reconnaissance spécifique : les cellules tumorales sont ainsi capables d'interagir avec l'endothélium vasculaire par l'intermédiaire de molécules d'adhésion exprimées à la surface des deux types cellulaires, ce qui leur permet de s'arrêter, d'adhérer et de transmigrer (Miles *et al.*, 2008).

L'adhésion à la paroi du vaisseau sanguin est donc une phase clé dans le processus métastatique puisqu'il préconditionne la diapédèse, ou « extravasation », i. e. la traversée de l'endothélium par la cellule cancéreuse, processus qui marque l'entrée dans le tissu sous-jacent.

Les mécanismes biologiques impliqués dans la diapédèse des cellules cancéreuses ne sont pas clairement compris. Un modèle de la diapédèse des cellules cancéreuses a été établi sur la base de la migration trans-endothéliale des leucocytes, phénomène déjà largement étudié et aujourd'hui bien caractérisé. Ceci se justifie tout d'abord car la transmigration des cellules cancéreuses et celle des leucocytes au travers de l'endothélium vasculaire se déroulent toutes deux en présence d'un écoulement. De plus, certains des récepteurs de l'endothélium se liant aux protéines d'adhésion des cellules cancéreuses sont similaires à ceux impliqués au cours de la reconnaissance immunitaire lorsque les leucocytes atteignent une zone d'inflammation. Cependant, malgré des similitudes entre la diapédèse des leucocytes et l'extravasation des cellules cancéreuses, il y a des différences entre les leucocytes et les cellules cancéreuses circulantes :

- Les cellules cancéreuses, avec un diamètre moyen de $20 \mu m$, ont une taille plus importante que les leucocytes (environ $8 \mu m$ de diamètre), ce qui les rend moins motiles (Chotard-Ghodsnia *et al.*, 2003).
- Leur taille plus importante combinée à la présence de certaines molécules d'adhésion confère aux cellules cancéreuses une tendance à s'agréger soit entre elles soit avec des leucocytes ou plaquettes. Ces agrégats sont alors facilement arrêtés par des contraintes de taille dans le vaisseau sanguin, ce confinement tendant à augmenter le taux de formation de métastases.

- Chez les cellules cancéreuses, l'expression de molécules d'adhésion et d'enzymes est modifiée par rapport aux cellules saines, ce qui influence les phénomènes adhésifs et la dégradation de l'endothélium vasculaire par les cellules cancéreuses (Thiery, 2003).
- Les propriétés rhéologiques des cellules cancéreuses sont différentes de celles des leucocytes. Les cellules tumorales sont en général plus déformables que les cellules saines (Suresh, 2007).

Du fait de sa localisation dans un microvaisseau sanguin ou lymphatique, la phase d'adhésion qui précède la diapédèse se produit dans des conditions particulières : la cellule cancéreuse est confinée et soumise à une contrainte de cisaillement. En effet, dans des géométries confinées où le diamètre peut être inférieur à $100 \mu m$, la contrainte de cisaillement à la paroi peut atteindre $10 Pa$ (Gaver et Kute, 1998). On peut donc supposer que les conditions de flux et le confinement sont deux paramètres qui influencent fortement les phénomènes adhésifs mis en jeu. Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte : pour tester l'influence du flux et du confinement sur l'adhésion d'une cellule cancéreuse confinée, un dispositif microfluidique a été mis au point. Il modélise un vaisseau sanguin à la paroi duquel des cellules cancéreuses adhèrent dans la phase précédant la diapédèse.

1.4 La réponse cellulaire à des sollicitations externes

1.4.1 Différents types de sollicitations externes

En fonction de son type cellulaire et de son environnement naturel, une cellule peut subir différents types de sollicitations mécaniques :

- Certaines cellules sont des récepteurs mécaniques, leur rôle est de transmettre une information lorsqu'elles sont sollicitées mécaniquement par le milieu extérieur. Citons par exemple les cellules auditives ciliées. Ces cellules sont maintenues dans une structure rigide appelée organe de Corti, recouverte d'une masse de matrice extracellulaire, la membrane tectoriale. Les vibrations sonores provoquent le balancement de l'organe de Corti, qui est alors comprimé contre la membrane tectoriale, provoquant une inclinaison des stéréocils, batonnets rigides situés à l'extrémité des cellules ciliées. Cette modification de structure génère un signal électrique qui est transmis au système nerveux. Les cellules auditives convertissent ainsi un stimulus mécanique en signal électrique.
- Au sein d'un tissu, les cellules sont soumises à des forces de cohésion. Grâce aux des-

mosomes, hémidesmosomes et cadhérines, qui relie respectivement deux cellules entre elles ou une cellule et la matrice extracellulaire, une cellule partage une partie des contraintes mécaniques appliquée aux cellules environnantes (Alberts *et al.*, 2002). Ces forces de cohésion permettent ainsi aux tissus de résister à des forces plus importantes qu'une cellule isolée.

- Les cellules endothéliales constituent la paroi des vaisseaux sanguins, et par conséquent, subissent les forces hémodynamiques générées par le flux pulsatile du sang : les forces de pression responsables de l'étirement cyclique, i. e. la distension de la paroi du vaisseau, et les contraintes de cisaillement ou « shear stress ». Les cellules adhérentes aux parois des vaisseaux sanguins subissent également de telles forces hémodynamiques (portance, traînée). Lors des phénomènes de diapédèse présentés dans la partie 1.3.5, les leucocytes et les cellules cancéreuses adhérents à la paroi du microvaisseau sont donc soumis à de telles contraintes mécaniques.

Après cette liste non exhaustive des différents types de contraintes mécaniques auxquelles peuvent être soumises des cellules, nous allons présenter les principaux mécanismes cellulaires impliqués pour générer une réponse à ces signaux.

1.4.2 Mécanismes impliqués dans la réponse cellulaire à des sollicitations mécaniques externes

Lorsqu'une cellule est soumise à une sollicitation extérieure, elle intègre la réponse de chacun de ses constituants. Son comportement mécanique est donc déterminé par ceux de ses composants à l'échelle microscopique. D'un point de vue purement mécanique, les différents éléments du cytosquelette répondent aux forces qui leur sont appliquées en fonction de leurs propriétés rhéologiques intrinsèques, c'est à dire de leur capacité à se déformer plus ou moins, à une vitesse plus ou moins rapide sous l'effet d'une contrainte. Le comportement d'une cellule ne se limite pas à des déformations passives en fonction des contraintes. La cellule est capable de sentir des forces extérieures et de les convertir en une réponse biologique pour s'adapter à son environnement. Les moteurs moléculaires présents dans le cytosquelette jouent également un rôle dans le comportement mécanique d'une cellule. Mizuno *et al.* ont par exemple montré qu'ils peuvent augmenter la rigidité du cytosquelette ou changer ses propriétés viscoélastiques en présence d'ATP (Mizuno *et al.*, 2007). Le milieu cellulaire étant le siège de nombreuses réactions (polymérisation/dépolymérisation de l'actine, rupture/création de liens interfilaments, activité des moteurs, apport d'énergie

biologique), le comportement mécanique de la cellule résulte d'un bilan de forces dynamique complexe.

Pour induire une réponse cellulaire, un signal extérieur (de nature mécanique ou autre), doit être reconnu au niveau des cellules. Le ligand présent à la surface du substrat constitue le premier messenger. Sa fixation au récepteur membranaire génère un signal qui, pour activer une fonction cellulaire, doit être relayé par d'autres messagers intracellulaires, les seconds messagers, tels que l'AMPc¹¹, les ions Ca²⁺... La conversion du signal généré par la fixation du ligand (premier messenger) au récepteur membranaire, en signal véhiculé par les seconds messagers, est appelée transduction. Dans le cas d'un signal de nature mécanique, on parle de mécanotransduction. Parmi les protéines membranaires intervenant dans la transduction du signal, les intégrines jouent un rôle prépondérant. Lorsqu'elles se lient à leur ligand (fibronectine, vitronectine...), elles se regroupent et s'organisent avec les différents composants du cytosquelette par leur domaine cytoplasmique. Cette interaction aboutit à une importante organisation de la phosphorylation des résidus tyrosine portés par des protéines cytoplasmiques comme la paxilline, la protéine d'adhésion focale 125 FAK ou la tensine (Burrige *et al.*, 1992; Bockhölft et Burrige, 1993), ces protéines participant à l'organisation des points focaux qui sont les sites d'ancrage des protéines du cytosquelette, notamment les filaments d'actine, aux molécules de la matrice extracellulaire via les intégrines. Une fois le signal extérieur « reçu » par la cellule, la réponse cellulaire est initiée et contrôlée par différentes voies de signalisation. Une voie de signalisation est une cascade de réactions biochimiques intracellulaires aboutissant à l'expression de certains gènes et donc à un comportement cellulaire particulier : adhésion, changements morphologiques, multiplication, différenciation, communication intercellulaire... Une des voies de signalisation les plus importantes dans la régulation de la morphologie et de la communication cellulaires est la voie de l'AMPc. Bien que très complexe, le fonctionnement de cette voie de signalisation peut être résumé en deux phases (Alberts *et al.*, 2002) :

- Une phase intramembranaire : un premier messenger se lie au récepteur membranaire de la cellule. Le complexe ainsi formé module indirectement le fonctionnement de l'enzyme adénylate cyclase.
- Une phase intracytoplasmique : la stimulation de l'adénylate cyclase aboutit à l'augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire. Ce second messenger active à son tour une protéine kinase, la PKA¹², dont le rôle est de phosphoryler des enzymes

¹¹Adénosine MonoPhosphate 3'-5' cyclique

¹²Protéine Kinase A

cytoplasmiques ou nucléaires ayant pour substrat des facteurs de transcription de gènes inductibles par l'AMPc.

Il a été mis en évidence une augmentation du niveau d'AMPc dans différents types de contraintes mécaniques appliquées à des cellules : en présence de contraintes de cisaillement (de 0.01 à 3.5 *Pa*) en chambre d'écoulement (Reich *et al.*, 1990), de déformations cycliques : flexions, tractions (Manolopoulos et Lelkes, 1993; Cohen *et al.*, 1997). Plusieurs travaux ont montré qu'une telle élévation du taux d'AMPc entraîne la diminution des protéines comme la paxilline (Han et Rubin, 1996) et la protéine d'adhésion focale 125 FAK (Troyer *et al.*, 1996), ce qui explique la destruction des fibres de stress et des contacts focaux observée chez de nombreux types cellulaires (Burridge *et al.*, 2007; Burridge et Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Glass et Kreisberg, 1993; McNamee *et al.*, 1995).

Même si la présence d'éléments spécialisés de mécanotransduction pour certains types cellulaires n'est pas exclue, la voie de signalisation de l'AMPc faisant intervenir les intégrines semble un composant de la réponse aux sollicitations mécaniques commun à la majorité des cellules. Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux contraintes mécaniques générées par un écoulement sanguin sur des cellules.

1.4.3 Les conditions de flux *in vivo*

Avant d'étudier l'effet du flux sanguin sur des cellules, il est intéressant de faire le point sur le système sanguin humain. L'homme, comme tous les vertébrés, possède un système circulatoire clos assurant une dispersion du sang, contrairement à son système vasculaire lymphatique fonctionnant en circuit ouvert. Le système vasculaire sanguin est constitué d'une pompe musculaire, le cœur, et d'un système de conduits progressivement dichotomisés et rétrécis, répartis en deux réseaux vasculaires :

- Un circuit à haute pression, le réseau artériel, en aval du cœur.
- Un circuit à basse pression, le réseau veineux, en amont du cœur.

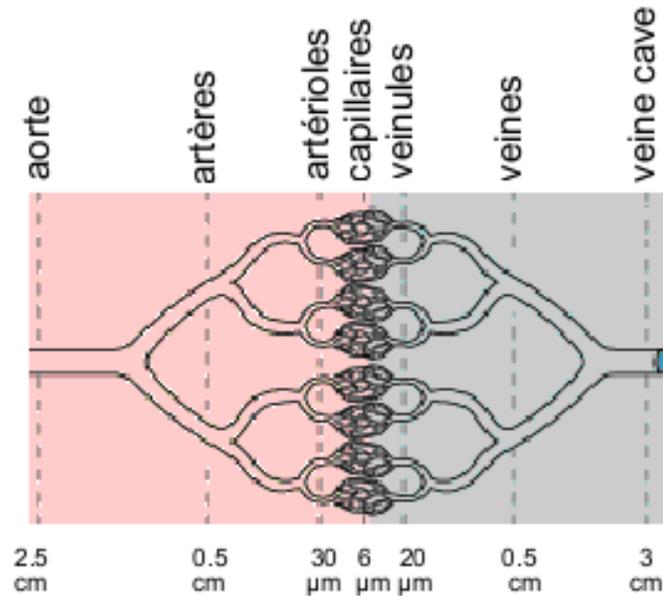


FIG. 1.16: Diamètres caractéristiques des conduits du réseau de circulation sanguine. Le réseau artériel est décrit à gauche en rose, le réseau veineux à droite en gris. (source : <http://www-c.inria.fr/who/Marc.Thiriet/Glosr/Bio/AppCircul/Circul.html>)

Selon leur éloignement du cœur et leur situation au sein des organes, ces conduits présentent des architectures différentes (Fig. 1.16), adaptées aux conditions physiologiques (Fung, 1984) :

- Le sang expulsé du cœur est amené aux différents organes par les artères (diamètre de l'ordre du centimètre). Dans le réseau artériel, raméfié, l'écoulement est pulsé. La vitesse du sang dans l'aorte varie entre -10 et 120 cm.s^{-1} , les valeurs négatives correspondant au reflux (Fung, 1984). Le volume sanguin contenu dans le réseau artériel est très faible par rapport au volume sanguin veineux. Le pouls correspond à l'onde de pression qui se propage très rapidement (10 à 40 m.s^{-1}) depuis le cœur vers la périphérie (Deplano et Siouffi, 2005).
- Le sang est dispersé dans les organes via les artérioles (diamètre compris entre 10 et $100 \mu\text{m}$). Le réseau artériolaire est dit « résistif » car il est caractérisé par une capacité à modifier son diamètre (et donc la résistance à l'écoulement) d'une part par la contraction des fibres lisses de la paroi des artérioles, et d'autre part par la présence de très nombreux sphincters (petits muscles lisses circulaires à commande nerveuse individualisée) situés juste avant les capillaires.
- Les capillaires permettent le passage de substances et éventuellement de cellules du

sang vers l'organe. Le réseau capillaire est extrêmement ramifié, très résistif mais peu adaptable car la paroi des capillaires est quasiment limitée à l'endothélium vasculaire. La vitesse d'écoulement du sang y est très faible, de l'ordre de quelques $mm.s^{-1}$.

- Le sang est ensuite rassemblé dans les veinules, puis les veines pour être reconduit au cœur. Même si le réseau veineux est considéré comme passif, le retour veineux au cœur se fait de façon active grâce à la présence de valvules et de pompes. La résistance à l'écoulement y est considérée comme faible, les variations du volume veineux, importantes, étant suivies par des modifications élastiques du volume des veines sans grandes variations de pression. Le sang veineux représente la très grande majorité (70 %) du volume sanguin total.

Les échanges de substances entre le sang et les tissus passent par l'endothélium sur toute la longueur du système vasculaire, mais ce processus est particulièrement intense au niveau des capillaires et des veinules, où la paroi se réduit virtuellement à l'endothélium et sa lame basale. Par cette couche, le sang échange des molécules, des particules, des cellules (leucocytes, cellules tumorales) avec le tissu environnant.

Cette présentation du système vasculaire nous permet donc de recenser les conditions de flux auxquelles sont confrontées les cellules *in vivo* : la taille des conduits et les vitesses d'écoulement s'étalent sur des plages de valeurs importantes. L'écoulement du sang dans de telles conditions génère des contraintes de cisaillement à la paroi des vaisseaux sanguins, dont la définition, le calcul et les valeurs sont présentés paragraphe suivant.

1.4.4 Les contraintes hydrodynamiques

1.4.4.1 Cisaillement à la paroi d'un canal

La contrainte de cisaillement à la paroi d'un vaisseau correspond aux forces frictionnelles (tangentes) exercées par le flux sanguin contre la paroi vasculaire. Elle est déterminée par le débit sanguin, la viscosité du sang et par le diamètre du vaisseau. La valeur moyenne de cette contrainte *in vivo*, dans une portion droite de vaisseau, est comprise entre 0.2 et 5 Pa, selon le type de vaisseau (Legendre *et al.*, 2005; Reneman *et al.*, 2006).

1.4.4.2 Calcul du champ de vitesse et des contraintes dans un canal parallélépipédique*Système de coordonnées*

Le problème est étudié dans le repère (x, y, z) précisé sur la figure 1.17 (axe z colinéaire avec le grand axe du parallélépipède, avec $\frac{w}{2} \leq x \leq \frac{w}{2}$, $0 \leq y \leq h$ et $0 \leq z \leq L$).

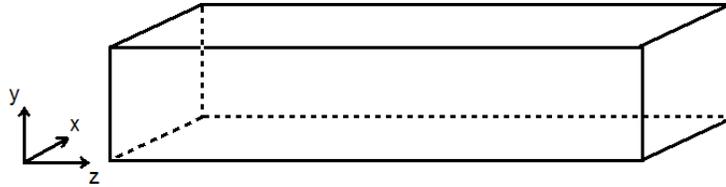


FIG. 1.17: Système d'axes choisi pour décrire l'écoulement d'un fluide dans un canal parallélépipédique de largeur w (selon l'axe x) et de hauteur h (selon l'axe y).

Mise en équation du problème

L'équation de conservation de la masse s'obtient en écrivant que la variation de la masse totale m contenue dans un volume (V) fixe par rapport au référentiel utilisé pour décrire le mouvement du fluide est opposée au flux sortant à travers la surface S délimitant ce volume :

$$\frac{dm}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\int \int \int_V \rho dV \right) = - \int \int_S \rho \vec{v} \cdot \vec{n} dS \quad (1.1)$$

Le volume d'étude (V) étant fixe, la dérivée temporelle et l'intégration sur le volume peuvent être permutées, et en appliquant le théorème d'Ostrogradski au second membre de l'équation (1.1), on obtient :

$$\int \int \int_V \left(\frac{\partial \rho}{\partial t} + \text{div}(\rho \vec{v}) \right) dV = 0 \quad (1.2)$$

Cette équation est vraie quel que soit le volume (V), d'où l'équation de continuité (1.3) :

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \operatorname{div}(\rho \vec{v}) = 0 \quad (1.3)$$

Avec $\operatorname{div}(\rho \vec{v}) = \rho \operatorname{div} \vec{v} + \vec{v} \cdot \overrightarrow{\operatorname{grad}} \rho$, et en introduisant la dérivée convective correspondant à une description lagrangienne $\frac{d\rho}{dt} = \frac{\partial \rho}{\partial t} + \vec{v} \cdot \overrightarrow{\operatorname{grad}} \rho$, on obtient l'équation de la conservation de la masse pour un fluide en mouvement :

$$\frac{d\rho}{dt} + \rho \operatorname{div} \vec{v} = 0 \quad (1.4)$$

qui donne pour un fluide incompressible (masse volumique constante au cours du mouvement, dans le temps et dans l'espace, $\frac{d\rho}{dt} = 0$) :

$$\operatorname{div} \vec{v} = 0 \quad (1.5)$$

Relation fondamentale de la dynamique

Le principe fondamental de la dynamique appliquée à un volume (V), i. e. l'égalité entre la variation temporelle de sa quantité de mouvement et l'ensemble des forces qui lui sont exercées, donne :

$$\frac{d}{dt} \left[\int \int \int_V \rho \vec{v} dV \right] = \int \int \int_V \rho \vec{f} dV + \int \int_S [\vec{\sigma}_T] \cdot \vec{n} dS \quad (1.6)$$

Dans cette relation, dV représente le volume d'un élément matériel de fluide et dS un élément de surface fermée S limitant le volume V . Le tenseur $[\vec{\sigma}_T]$ prend en compte l'ensemble des forces de surface (pression et viscosité s'exerçant sur l'élément dS , et \vec{f} est la force en volume appliqué à l'unité de masse du fluide (par exemple la pesanteur).

L'intégrale de surface dans l'équation (1.6) peut être ramenée à une intégrale de volume par le théorème d'Ostrogradski, et le produit ρdV étant constant dans le référentiel qui

suit le mouvement (dans lequel on calcule la dérivée lagrangienne), on obtient donc :

$$\int \int \int_V \rho \frac{d\vec{v}}{dt} dV = \int \int \int_V \rho \vec{f} dV + \int \int \int_V \overrightarrow{div}[\overrightarrow{\sigma}_T] dV \quad (1.7)$$

Cette identité étant valable quel que soit l'élément de volume dV , il vient :

$$\rho \frac{d\vec{v}}{dt} = \rho \vec{f} + \overrightarrow{div}[\overrightarrow{\sigma}_T] \quad (1.8)$$

En séparant les contributions des forces de pression et de viscosité dans le tenseur $[\overrightarrow{\sigma}_T]$, l'équation (1.8) devient :

$$\rho \frac{d\vec{v}}{dt} = \rho \vec{f} - \overrightarrow{grad}p + \overrightarrow{div}[\overrightarrow{\sigma}] \quad (1.9)$$

où p est la pression et $[\overrightarrow{\sigma}]$ le tenseur des contraintes de viscosité. $\frac{d\vec{v}}{dt}$ peut être mis sous la forme $\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \overrightarrow{grad}) \vec{v}$, soit :

$$\rho \left(\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \overrightarrow{grad}) \vec{v} \right) = \rho \vec{f} - \overrightarrow{grad}p + \overrightarrow{div}[\overrightarrow{\sigma}] \quad (1.10)$$

Le tenseur des forces de viscosité $[\overrightarrow{\sigma}]$ s'écrit sous forme vectorielle $\overrightarrow{div}[\overrightarrow{\sigma}] = \eta \Delta \vec{v} + (\zeta + \frac{2}{3}\eta) \overrightarrow{grad}(div \vec{v})$ où le terme en η correspond à une déformation sans changement de volume et celui en ζ à une dilatation isotrope. Dans le cas d'un fluide incompressible ($div \vec{v} = 0$), cette relation devient : $\overrightarrow{div}[\overrightarrow{\sigma}] = \eta \Delta \vec{v}$.

Le principe fondamental de la dynamique appliqué à une particule de fluide dans un repère lagrangien donne donc :

$$\rho \left(\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \overrightarrow{grad}) \vec{v} \right) = -\overrightarrow{\nabla}p + \eta \Delta \vec{v} + \rho \vec{f} \quad (1.11)$$

La relation de conservation de la masse et le principe fondamental de la dynamique appliqués à un fluide newtonien visqueux incompressible conduisent au système d'équations de Navier–Stokes, qui décrivent le mouvement d'un fluide newtonien visqueux incompressible.

sible :

$$\begin{cases} \operatorname{div} \vec{v} = 0 \\ \rho \left(\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \overrightarrow{\operatorname{grad}}) \vec{v} \right) = -\overrightarrow{\operatorname{grad}} p + \eta \Delta \vec{v} + \rho \vec{f} \end{cases} \quad (1.12)$$

A bas nombre de Reynolds ($Re \ll 1$) et du fait de l'invariance par symétrie par rapport à un plan (xz) ou un plan (yz) (configuration du canal : parallélépipède rectangle, de section $w \times h$ et de longueur L), la vitesse du fluide n'a de composante que selon l'axe z : $\vec{v} = v_z \vec{e}_z$. En introduisant cette condition dans la seconde équation du système 1.12, on montre que la pression dépend uniquement de z : $p = p(z)$. En conditions stationnaires, on obtient le système :

$$\begin{cases} \frac{\partial v_z}{\partial z} = 0 \\ \rho \left(v_z \frac{\partial v_z}{\partial z} \right) = -\frac{\partial p}{\partial z} + \eta \left(\frac{\partial^2 v_z}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial y^2} \right) \end{cases} \quad (1.13)$$

système duquel on tire l'équation (1.14) qui détermine le champ de vitesse dans le canal :

$$\frac{\partial^2 v_z(x, y)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_z(x, y)}{\partial y^2} = \frac{1}{\eta} \frac{\partial p}{\partial z} = \frac{1}{\eta} \frac{dp}{dz} \quad (1.14)$$

Avec $\frac{\partial^2 v_z(x, y)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_z(x, y)}{\partial y^2} = f(x, y)$ et $\frac{1}{\eta} \frac{dp}{dz} = g(z)$, on a donc $f(x, y) = g(z) = c^{te} = \frac{1}{\eta} \frac{\Delta p}{L}$ avec $\Delta p = p(L) - p(0) < 0$.

Résolution du champ de vitesse

L'équation (1.14) est résolue en utilisant la décomposition en série de Fourier (White, 2003) avec les conditions d'adhérence à la paroi (non glissement) écrites ci-dessous pour un canal de longueur L , de largeur w et de hauteur h :

$$\begin{cases} v_z \left(-\frac{w}{2}, y, z \right) = 0 = v_z \left(\frac{w}{2}, y, z \right) \\ v_z(x, 0, z) = v_z(x, h, z) = 0 \end{cases} \quad (1.15)$$

Du fait de ces conditions aux limites, la solution peut se mettre sous la forme d'une somme des termes impairs d'une série :

$$v_z(x, y) = \frac{\Delta p 4h^2}{\eta L \pi^3} \sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{1}{n^3} \left(1 - \frac{\cosh\left(\frac{n\pi x}{h}\right)}{\cosh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)} \right) \sin\left(\frac{n\pi y}{h}\right) \quad (1.16)$$

avec $-\frac{w}{2} < x < \frac{w}{2}$ et avec $0 < y < h$.

On calcule le débit en intégrant le flux du vecteur vitesse du fluide à travers une section perpendiculaire à l'axe z du canal :

$$Q = \int_{x=-\frac{w}{2}}^{x=\frac{w}{2}} \int_{y=0}^{y=h} \vec{v} \cdot \vec{n} \cdot dS = \int_{x=-\frac{w}{2}}^{x=\frac{w}{2}} \int_{y=0}^{y=h} v_z dx dy \quad (1.17)$$

En remplaçant v_z par son expression, on obtient :

$$Q = \frac{\Delta p 4h^2}{\eta L \pi^3} \int_{x=-\frac{w}{2}}^{x=\frac{w}{2}} \int_{y=0}^{y=h} \sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \left[\frac{1}{n^3} \left(1 - \frac{\cosh\left(\frac{n\pi x}{h}\right)}{\cosh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)} \right) \sin\left(\frac{n\pi y}{h}\right) dx dy \right] \quad (1.18)$$

Soit :

$$Q = \frac{\Delta p 4h^2}{\eta L \pi^3} \sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{1}{n^3} \left[\int_{-\frac{w}{2}}^{\frac{w}{2}} \left(1 - \frac{\cosh\left(\frac{n\pi x}{h}\right)}{\cosh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)} \right) dx \int_0^h \sin\left(\frac{n\pi y}{h}\right) dy \right] \quad (1.19)$$

L'intégration de l'équation (1.19) donne :

$$Q = \frac{\Delta p 4h^2}{\eta L \pi^3} \sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{1}{n^3} \left(\left[x - \frac{h \sinh\left(\frac{n\pi x}{h}\right)}{n\pi \cosh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)} \right]_{-\frac{w}{2}}^{\frac{w}{2}} \left[\frac{-h}{n\pi} \cos\left(\frac{n\pi y}{h}\right) \right]_0^h \right) \quad (1.20)$$

Après calcul, le débit est :

$$Q = \frac{\Delta p 8h^4}{\eta L \pi^4} \sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{1}{n^4} \left(\frac{w}{h} - \frac{2h}{n\pi} \tanh\left(\frac{wn\pi}{2h}\right) \right) \quad (1.21)$$

Cette formule prédit une dépendance du débit Q en $\frac{w}{h}$. La figure 1.18 montre l'évolution du débit Q en fonction de $\frac{w}{h}$: pour $\frac{w}{h} < 1$ Q croît selon $\left(\frac{w}{h}\right)^3$, puis la dépendance devient linéaire.

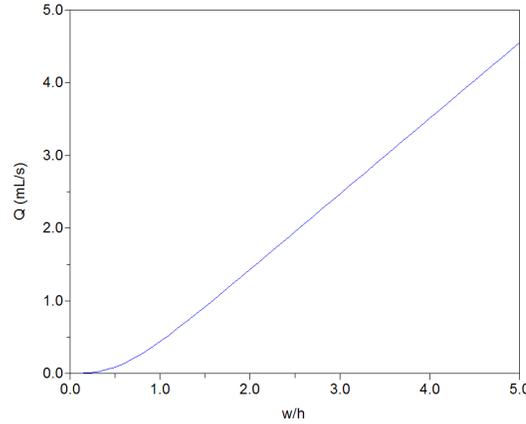


FIG. 1.18: Evolution du débit dans une conduite parallélépipédique en fonction de $\frac{w}{h}$, avec $\eta = 0.001 Pa.s$, $h = 50 \mu m$, $\Delta p = 2 Pa$ et $L = 1 m$.

Détermination de la contrainte de cisaillement

Le vecteur contrainte \vec{t}_n pour une facette orientée de normale \vec{n} est donné par :

$$\vec{t}_n = [\vec{\sigma}] \cdot \vec{n} \quad (1.22)$$

où $[\vec{\sigma}]$ est le tenseur des contraintes de viscosité.

Sur une facette au fond du canal parallélépipédique, le vecteur normal vaut $\vec{n} = \vec{e}_y =$

$$\vec{n} = \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix} \text{ dans le repère défini précédemment, donc le vecteur contrainte est :}$$

$$\vec{t}_n = \begin{pmatrix} \sigma_{xy} \\ \sigma_{yy} \\ \sigma_{zy} \end{pmatrix} \quad (1.23)$$

Pour un fluide newtonien incompressible, le tenseur des contraintes de cisaillement $[\vec{\sigma}]$ s'écrit :

$$[\vec{\sigma}] = 2\eta[\vec{D}] \quad (1.24)$$

avec $[\vec{D}] =$ partie symétrique de $\overrightarrow{grad}(\vec{v})$ c'est à dire $[\vec{D}] = \frac{1}{2} \left(\overrightarrow{grad}(\vec{v}) + \overrightarrow{grad}(\vec{v})^t \right)$.

Dans le cas du canal parallélépipédique étudié ici, on a :

$$[\vec{D}] = \begin{bmatrix} 0 & 0 & \frac{1}{2} \frac{\partial v_z}{\partial x} \\ 0 & 0 & \frac{1}{2} \frac{\partial v_z}{\partial y} \\ \frac{1}{2} \frac{\partial v_z}{\partial x} & \frac{1}{2} \frac{\partial v_z}{\partial y} & 0 \end{bmatrix} \quad (1.25)$$

Soit :

$$[\vec{\sigma}] = \begin{bmatrix} 0 & 0 & \eta \frac{\partial v_z}{\partial x} \\ 0 & 0 & \eta \frac{\partial v_z}{\partial y} \\ \eta \frac{\partial v_z}{\partial x} & \eta \frac{\partial v_z}{\partial y} & 0 \end{bmatrix} \quad (1.26)$$

Les composantes σ_{zy} et σ_{zx} de $[\vec{\sigma}]$ sont :

$$\sigma_{zy} = \eta \frac{\partial v_z}{\partial y} \quad \text{et} \quad \sigma_{zx} = \eta \frac{\partial v_z}{\partial x} \quad (1.27)$$

La composante qui nous intéresse ici est celle qui donne une force de résistance dans la direction y soit σ_{zy} .

En injectant dans l'équation (1.27) l'expression de la composante v_z obtenue à l'équation

(1.16), on obtient après calcul :

$$\sigma_{zy} = \frac{\Delta p}{L} \frac{4h}{\pi^2} \sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \left[\frac{1}{n^2} \left(1 - \frac{\cosh\left(\frac{n\pi x}{h}\right)}{\cosh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)} \right) \cos\left(\frac{n\pi y}{h}\right) \right] \quad (1.28)$$

Dans le cas d'un dispositif à débit imposé et non pas pression imposée, il est plus intéressant d'avoir l'expression de la contrainte de cisaillement à la paroi inférieure σ_{zy} en fonction du débit Q . En remplaçant dans l'équation (1.28) $\frac{\Delta p}{L}$ par son expression tirée de la formule du débit (1.21), l'expression de σ_{zy} devient :

$$\sigma_{zy} = \frac{\eta Q \pi^2 \sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \left[\frac{1}{n^2} \left(1 - \frac{\cosh\left(\frac{n\pi x}{h}\right)}{\cosh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)} \right) \cos\left(\frac{n\pi y}{h}\right) \right]}{2h^2 \sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{1}{n^4} \left[w - \frac{2h}{n\pi} \tanh\left(\frac{wn\pi}{2h}\right) \right]} \quad (1.29)$$

Contrainte de cisaillement à la paroi (Wall Shear Stress)

Au fond du canal, $y = 0$ donc la contrainte de cisaillement vaut :

$$\sigma_{zy\text{ wall}} = \frac{\eta Q \pi^2 \sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{1}{n^2} \left[1 - \frac{\cosh\left(\frac{n\pi x}{h}\right)}{\cosh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)} \right]}{2h^2 \sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{1}{n^4} \left[w - \frac{2h}{n\pi} \tanh\left(\frac{wn\pi}{2h}\right) \right]} \quad (1.30)$$

Nous avons écrit un programme dans le logiciel Scilab nous permettant de calculer la contrainte de cisaillement dans une section du canal perpendiculaire à l'écoulement. Deux exemples sont présentés sur la figure 1.19 : la contrainte de cisaillement dans le cas d'un canal de section carrée et la contrainte de cisaillement dans le cas d'un canal de section aplatie. Sur ces graphes, les axes x et y sont respectivement les axes horizontaux et verticaux du canal (le plan horizontal du graphe représente donc une section du canal perpendiculaire à l'écoulement). L'axe z du graphique donne la valeur absolue de la contrainte de cisaillement : la contrainte de cisaillement en un point de coordonnées (x, y) d'une section du canal perpendiculaire au flux est donnée par l'ordonnée de ce point sur le graphique.

Dans nos expériences d'adhésion de cellules au fond de microcanaux, nous sommes principalement intéressés par la contrainte sur la paroi inférieure du canal, pour laquelle $y = 0$. Nous lisons donc les valeurs de la contrainte de cisaillement au fond du canal dans le plan vérifiant $y = 0$, c'est à dire la face présentée au premier plan des graphes de la

figure 1.19. Ainsi, la contrainte de cisaillement au fond d'un canal de section carrée (à gauche sur la figure 1.19) est nulle sur les bords, maximale au centre, et montre un profil d'aspect parabolique. Pour un canal de section aplatie (à droite sur la figure 1.19), la contrainte de cisaillement est nulle sur les bords, puis atteint rapidement une valeur qui reste constante lorsqu'on s'éloigne des bords. En effet, pour un canal très aplati $w \gg h$, l'expression (1.30) de la contrainte de cisaillement appliquée dans la région centrale du canal ($x \ll \frac{w}{2}$) prend une forme simplifiée (Chotard-Ghodsniya *et al.*, 2002) :

$$\sigma_{zy\text{ wall}, w \gg h, x \ll \frac{w}{2}} = \frac{6\eta Q}{wh^2} \quad (1.31)$$

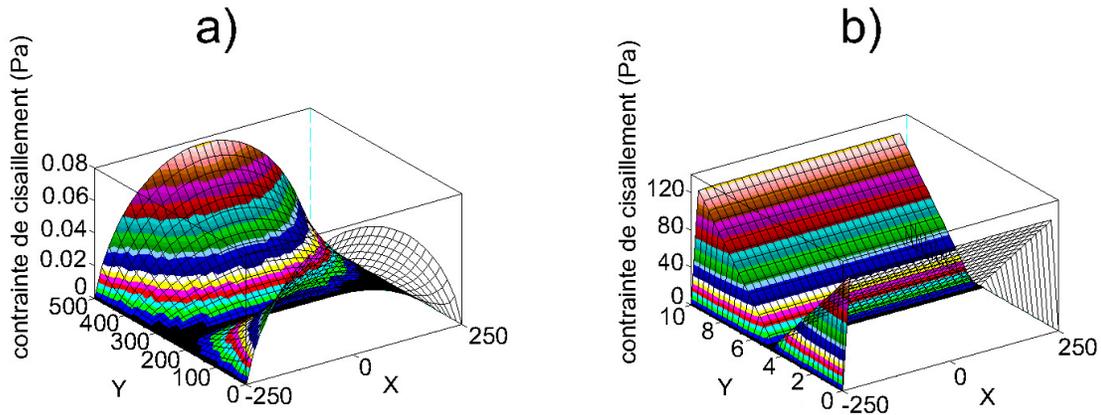


FIG. 1.19: Représentation de la valeur absolue de la contrainte de cisaillement dans une section perpendiculaire à l'écoulement pour deux canaux parallélépipédiques. Les axes x et y sont respectivement les axes horizontaux et verticaux du canal (unité : μm). L'axe z du graphique donne la valeur absolue de la contrainte de cisaillement (unité : Pa) : la contrainte de cisaillement en un point de coordonnées (x, y) d'une section du canal perpendiculaire au flux est donnée par l'ordonnée de ce point sur le graphique. a) Contrainte de cisaillement dans le cas d'un canal de section carrée $\sigma_{w=h}$ ($w = h = 500\mu m$ et $Q = 1\mu L.s^{-1}$). b) Contrainte de cisaillement dans le cas d'un canal de section aplatie $\sigma_{w \gg h}$ ($w \gg h$ avec $w = 500\mu m$, $h = 10\mu m$ et $Q = 1\mu L.s^{-1}$).

Tous ces calculs ont été faits dans l'hypothèse d'un écoulement établi, qui est satisfaite dans nos expériences où le nombre de Reynolds n'excède pas 130 : $Re = (\rho V D_h)/\eta$ où $D_h = (wh)/(2w + 2h)$ est le diamètre hydraulique, V la vitesse moyenne du fluide, ρ sa masse volumique et η sa viscosité dynamique. La longueur d'établissement de l'écoulement à l'entrée du canal L_e peut être estimée par la formule de White : $L_e = 0.05hRe$ (White, 2003). Dans nos conditions expérimentales, L_e n'excède pas 4% de la longueur du canal. L'hypothèse d'un écoulement laminaire dans le canal est donc justifiée.

1.4.5 Prédictions théoriques des effets d'un écoulement sur une cellule adhérente

Pour déterminer l'effet d'un flux cisailant une cellule adhérente à la paroi d'un canal, il est nécessaire de connaître la force et le couple engendrés par ce flux sur la cellule. En effet, la cellule obstruant une partie du canal, l'écoulement est modifié et les contraintes sur la cellule sont différentes des contraintes à la paroi d'un canal vide. Différents modèles théoriques ont été développés pour calculer la force et le couple hydrodynamique sur une cellule adhérente au fond d'un canal.

1.4.5.1 Modèle de Pozrikidis et al.

Dans les travaux de Pozrikidis la cellule est représentée par une capsule sphérique (de rayon R) ou éllipsoïdale adhérent à une surface plane (Pozrikidis, 1997). En amont de la cellule, le champ de vitesse est supposé linéaire : $u = kx$, u étant la norme du vecteur vitesse, x la distance à la paroi plane sur laquelle la cellule adhère, et k une constante (Fig. 1.20).

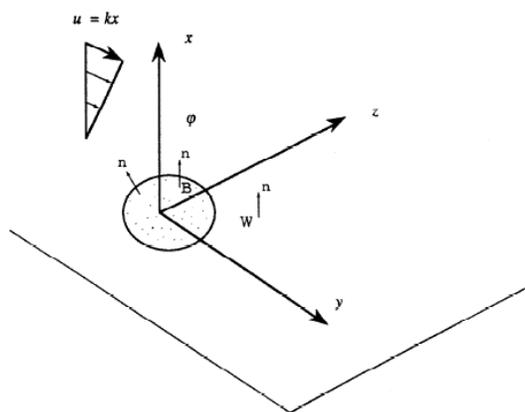


FIG. 1.20: Schéma d'un écoulement de cisaillement simple sur un plan W présentant une protubérance axisymétrique B . Le vecteur normal à la surface de l'obstacle est noté \vec{n} . Loin de l'obstacle, le flux est selon l'axe y et la norme du vecteur vitesse (u) croît linéairement avec la distance au plan $u = kx$ (Pozrikidis, 1997).

Le problème est formulé par la méthode des intégrales de frontières (Ladyzhenskaya, 1969). Le système d'équations obtenu est résolu numériquement par la méthode des éléments de frontières en maillant les surfaces de la protubérance et de la paroi. Par cette méthode, Pozrikidis détermine l'écoulement ainsi que la distribution des contraintes

de cisaillement. Il montre ainsi que la contrainte de cisaillement au sommet d'un obstacle hémisphérique est quatre fois supérieure à la contrainte de cisaillement sur une paroi sans protubérance. Ces résultats permettent également de voir qu'il est faux d'approximer la force hydrodynamique sur un obstacle à celle exercée par un écoulement non perturbé sur une surface égale à la base de cet obstacle. Dans le cas d'une demi-sphère de rayon R , la force de traînée exercée par le fluide est estimée à $F_y = 4.30\pi\mu kR^2$, soit 4.3 fois plus que la force générée par un écoulement non perturbé sur un disque de rayon R . Le couple hydrodynamique sur l'obstacle (par rapport au centre de sa base) a été déterminé pour différentes géométries d'obstacles, sa composante selon l'axe z pour un obstacle hémisphérique est $M_z = 2.44\pi\mu kR^3$.

1.4.5.2 Modèle de Gaver et al.

Dans le modèle de Pozrikidis, le domaine fluide est illimité, la cellule n'est pas confinée. Le confinement a été seulement pris en compte par Gaver et Kute dans un modèle 2D où la cellule est une demi sphère de rayon R collée au fond d'un canal de hauteur h , comme cela est représenté sur la figure 1.21 (Gaver et Kute, 1998).

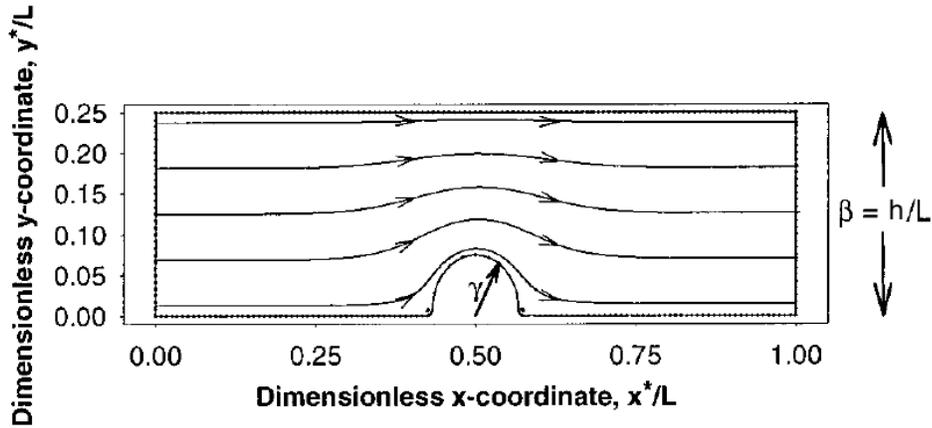


FIG. 1.21: Paramètres géométriques du modèle 2D de Gaver et Kute pour l'étude de l'effet des contraintes de cisaillement sur un obstacle hémisphérique (rayon R) adhérent à la paroi d'un microcanal de longueur L et de hauteur h . x^* et y^* sont les coordonnées adimensionnées : $x^* = Lx$, $y^* = Ly$. Dans cet exemple, $\gamma = R/h = 0.30$, $\beta = h/L = 0.25$. (Gaver et Kute, 1998).

En faisant l'hypothèse d'un écoulement à bas nombre de Reynolds ($Re = \rho Vh/\eta \ll 1$ où η est la viscosité dynamique du fluide, ρ sa masse volumique, h la hauteur du canal et V la vitesse représentative de l'écoulement), l'écoulement est déterminé en résolvant, à

différence de pression Δp imposée, l'équation de Stokes (1.32) et l'équation de continuité (1.33) :

$$\overrightarrow{grad} p = \eta \Delta \overrightarrow{v} \quad (1.32)$$

$$div \overrightarrow{v} = 0 \quad (1.33)$$

avec p la pression et \overrightarrow{v} la vitesse convective du fluide.

Ces équations sont résolues numériquement par la méthode des éléments de frontières, mais ils disposent cependant d'expressions analytiques grâce à l'hypothèse de lubrification. En effet, dans ce modèle, la hauteur du microcanal h étant supposée faible devant sa longueur L , la théorie de la lubrification s'applique, les effets sont prépondérants dans la direction y :

$$\frac{\partial^2 u}{\partial y^2} \gg \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \quad \text{et} \quad \frac{\partial p}{\partial y} \sim 0 \quad (1.34)$$

u et v étant les composantes du vecteur vitesse du fluide, respectivement dans les directions x et y .

Grâce à ces simplifications, Gaver et Kute fournissent des expressions analytiques simples de la contrainte de cisaillement maximale, de la force et du couple s'exerçant sur l'obstacle hémisphérique présent à la paroi du canal dans leur modèle 2D. Ils ont ensuite transposé ces résultats en trois dimensions en posant $(F_x)_{3D} = 2R \times (F_x)_{2D}$ et $(T_{base})_{3D} = 2R \times (T_{base})_{2D}$ où (F_x) est la force horizontale, $2R$ la longueur de la cellule et (T_{base}) le couple calculé par rapport au centre de la surface d'adhésion. Ils obtiennent alors les formules suivantes pour la force de traînée et le moment par rapport au centre de la surface d'adhésion en 3 dimensions :

$$\overrightarrow{F}_{flow} = 24\eta\gamma^2 \frac{Q}{w} \frac{3.19 + 0.65\gamma + 4.34\gamma^2}{(1 - \gamma^2)^{5/2}} \overrightarrow{e}_z \quad (1.35)$$

$$\overrightarrow{T}_{flow} = 12\pi\eta\gamma^2 \frac{RQ}{w} \frac{1.15 + 0.7\gamma}{(1 - \gamma^2)^{5/2}} \overrightarrow{e}_x \quad (1.36)$$

où η est la viscosité du fluide, R le rayon de la cellule, Q le débit et γ le degré de confinement

défini par $\gamma = \frac{R}{h}$, h étant la hauteur du canal. Comme ceux de Pozrikidis, ces travaux ont permis d'estimer que la contrainte de cisaillement est maximale au sommet de la cellule adhérente au fond du canal. Ils ont de plus montré que sa valeur dépend du degré de confinement :

- Lorsque la cellule obstrue peu le canal ($\frac{R}{h} < 0.4$), la contrainte de cisaillement maximale (au sommet de la cellule) est environ trois fois supérieure à la contrainte de cisaillement à la paroi d'un canal vide.
- L'effet du confinement est le plus fort pour $\frac{R}{h} \sim 0.8$ pour lequel il y a un rapport d'environ 6 entre la contrainte au sommet de la cellule et la contrainte de cisaillement à la paroi d'un canal vide.
- Pour des degrés de confinement supérieurs ($\frac{R}{h} > 0.8$), ou lorsque le canal est plus court ($\frac{R}{L}$ de l'ordre de 0.1), le débit dans le canal est diminué par la présence de la cellule, ce qui fait donc baisser la contrainte de cisaillement.

1.4.5.3 Modèle de Dong et al.

La déformabilité de la cellule est un paramètre important dans sa réponse à un flux. Elle a été prise en compte dans des modèles plus élaborés comme celui de Dong qui s'intéresse à la mécanique de roulement et d'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium (Dong *et al.*, 1999). Dans ce modèle, la cellule est modélisée en 2D par un anneau élastique adhérent à un substrat et soumis à un écoulement (Fig. 1.22). Cet anneau élastique représente la zone corticale riche en actine sous la membrane de la cellule, et il entoure un fluide newtonien incompressible jouant le rôle du cytoplasme. Le modèle prend également en compte les phénomènes adhésifs entre le leucocyte et le substrat, ils sont décrits par la cinétique chimique de formation et de dissociation de liaison entre un ligand et un récepteur, résumés dans la revue de Verdier *et al.* (Verdier *et al.*, 2008). Lors du roulement du leucocyte sous l'effet du flux, des liaisons se créent à l'avant de la membrane, d'autres se dissocient à l'arrière. D'un point de vue physique, les liaisons individuelles sont symbolisées par des petits ressorts. Seuls les ressorts situés dans une zone de pelage à l'arrière de la cellule (notée δ) sont étirés pendant le processus de décollement, et participent à la force adhésive qui s'oppose à la force de traînée.

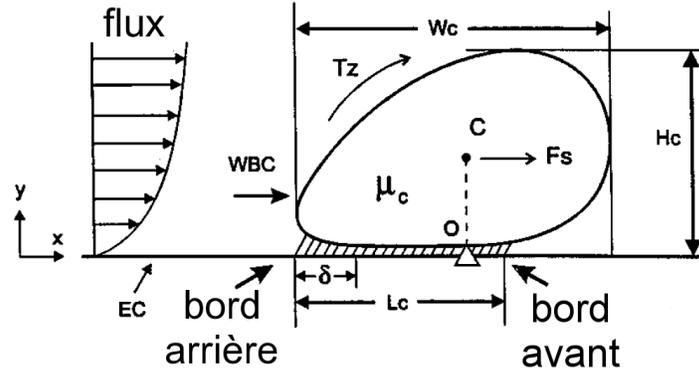


FIG. 1.22: Schéma en 2D d'un leucocyte (*WBC*) adhérent à un tapis de cellules endothéliales (*EC*) dans le modèle de Dong *et al.* H_c est la hauteur de la cellule, W_c est la projection sa longueur, L_c est la longueur de contact, δ est la zone active de pelage, μ_c est la viscosité intracellulaire, F_s est la force de traînée du fluide, T_z est le moment hydrodynamique par rapport au point O (projection du centre de masse C sur le substrat). Redessiné d'après l'article de Dong *et al.* (Dong *et al.*, 1999).

A l'équilibre, la force hydrodynamique est exactement contrebalancée par la force adhésive. Pour déterminer la forme de la cellule, Dong *et al.* ont tout d'abord écrit l'équilibre d'un segment de longueur infinitésimale de la membrane élastique (non adhérent et soumis au flux), prenant en compte le cisaillement et la tension dus aux segments voisins, ainsi que les contraintes normales et tangentielles générées par le flux. Ils obtiennent une équation différentielle d'ordre quatre qu'ils transforment en un système de quatre équations différentielles linéaires du premier ordre, ensuite résolu numériquement par la méthode de Runge-Kutta pour déterminer le flux autour de la cellule et sa forme. Ceci leur permet de montrer que la contrainte de cisaillement maximale est située à l'endroit le plus haut de la cellule, où elle vaut 2.5 fois la contrainte de cisaillement en amont de la cellule (Fig. 1.23). Dans ce modèle, la loi de membrane est donnée par la relation : $T = T_0 + E(\lambda - 1)^n$ où T est la tension de la membrane, E son module d'Young (supposé égal à 0.15 dyn/cm) et n un nombre entier pris égal à 1.

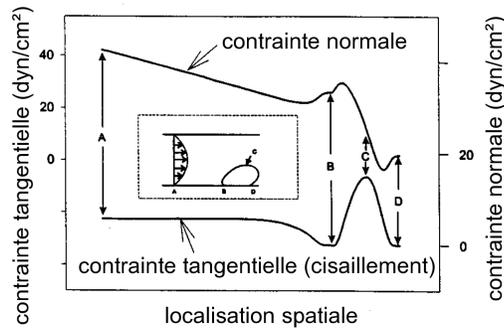


FIG. 1.23: Distribution des contraintes normales et tangentielles à la surface d'une cellule déformée dans un vaisseau de $30 \mu\text{m}$. La contrainte de cisaillement à la paroi du vaisseau vaut 6 dynes/cm^2 soit 0.6 Pa . Les localisations spatiales A, B, C, D en abscisses correspondent aux points indiqués dans l'encart. Redessiné d'après l'article de Dong *et al.* (Dong *et al.*, 1999).

Avec ce modèle combinant les équations hydrodynamiques, la cinétique d'adhésion, et la théorie de l'élasticité, Dong *et al.* ont étudié l'effet de différents paramètres sur la déformation et le roulement d'un leucocyte sur un substrat. Les résultats sont les suivants :

- Une membrane plus extensible entraîne une déformation plus importante de la cellule, et une augmentation de la zone de contact L_c .
- Un cytoplasme plus visqueux à l'intérieur de la membrane fait diminuer la déformation de la cellule et la zone de contact avec le substrat.
- Le temps caractéristique du décollement de la cellule adhérente (défini par le début de la diminution de la zone de contact) augmente avec la densité de ligands.
- Sous fort cisaillement (6 ou 9 dyn/cm^2), le processus de décollement est plus rapide que la déformation de la cellule, alors que sous faible cisaillement (3 dyn/cm^2) la cellule se déforme dans un premier temps avant que le processus de décollement prédomine.

Bien que les caractéristiques de ce modèle (type cellulaire, dimensions du canal et contraintes de cisaillement) sont différentes de nos expériences, il sera intéressant de comparer ces résultats théoriques avec les résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail de thèse. Ce modèle compare l'aire d'adhésion pour différentes valeurs de contraintes de cisaillement, et dans nos expériences, la contrainte de cisaillement sur une cellule adhérente est augmentée progressivement par paliers (partie 2.5.3).

1.4.5.4 Autres travaux de modélisation

Des modèles 3D incluant adhésion et déformabilité ont également été mis au point

(Khismatullin et Truskey, 2004; Jadhav *et al.*, 2005; Verdier *et al.*, 2008) pour rendre compte de l'effet du flux sur une cellule adhérente soumise à un flux. Khismatullin et Truskey ont mis au point un modèle de goutte composite imitant les différents constituants de la cellule : un noyau viscoélastique recouvert d'une couche épaisse de cytoplasme viscoélastique (Khismatullin et Truskey, 2004). Ils ont pris en compte la déformabilité et la viscoélasticité du leucocyte, ainsi que les microvilli à la surface de la membrane. Dans ce modèle, le leucocyte initialement sphérique, est immergé dans un fluide peu visqueux et confiné entre deux plaques horizontales, la plaque inférieure étant recouverte de molécules adhésives. Le champ de vitesse parabolique du fluide est créé par un gradient de pression. Les microvilli sont modélisés par des petits cylindres ayant une certaine élasticité, qui possèdent des molécules adhésives à leurs extrémités. Chaque liaison ligand-récepteur, modélisée par un ressort est ainsi en série avec un autre ressort : le microvillus. Ce modèle prédit l'évolution de la forme et de l'aire de contact en fonction de différents paramètres. Voici quelques résultats :

- La déformation est plus grande à haut cisaillement (40 dyn/cm^2) que sous faible cisaillement (8 dyn/cm^2).
- La force de traînée augmente avec la hauteur du canal.
- Le nombre de microvilli impliqués dans l'adhésion est plus élevé à fort cisaillement (40 dynes/cm^2) qu'à faible cisaillement (8 dynes/cm^2).

Su *et al.* ont d'autre part montré dans un modèle basé sur la méthode des éléments finis, que les microvilli étaient soumis à des cisaillements plus importants que la membrane dans les interstices entre les microvilli (Su et Schmid-Schönbein, 2008). Selon leurs travaux, l'augmentation de la contrainte de cisaillement au sommet d'un microvillus serait d'un facteur 30 par rapport à la contrainte de cisaillement à la paroi. Par conséquent, même dans les régions proches de la zone de contact cellule-substrat (moins exposées au cisaillement que la partie apicale de la cellule) les récepteurs placés sur les microvilli sont soumis à des contraintes significatives.

Dans le modèle de Jadhav (Jadhav *et al.*, 2005), la cellule est décrite par une enveloppe élastique incompressible et isotrope, dont le potentiel est donné par :

$$W = \frac{Eh}{6}(\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_1^{-2}\lambda_2^{-2} - 3) \quad (1.37)$$

où E est le module d'Young de la membrane élastique, h l'épaisseur de la membrane, et λ_1

et λ_2 les valeurs propres dans les deux directions principales d'élongation. Les interactions récepteur-ligand suivent une loi stochastique. Ce travail repose sur la combinaison de deux techniques de résolution :

- L'hydrodynamique est traitée par la méthode de la frontière immergée, qui a l'avantage de ne pas nécessiter de remaillage du domaine à chaque évolution de l'interface. Des conditions sont imposées aux nœuds situés dans la cellule pour que celle-ci soit effectivement « vue » par l'écoulement.
- L'adhésion est traitée par la méthode de Monte Carlo.

D'après ce travail :

- Une augmentation du cisaillement cause une plus grande déformation de la cellule ainsi qu'une vitesse de roulement plus rapide.
- La rigidité de la membrane influe également sur la déformation : une cellule dont la membrane est plus rigide se déforme moins, elle reste plus ronde avec une aire de contact faible, ce qui favorise une augmentation de la vitesse de roulement.
- Des vitesses de roulement fluctuantes sont obtenues.

1.4.6 Dispositifs expérimentaux d'étude de l'effet des contraintes hydrodynamiques sur les cellules

Au cours des deux dernières décennies, différents dispositifs expérimentaux ont été mis au point pour étudier les effets du flux sur l'adhésion cellulaire. Le principe de fonctionnement et les résultats qu'ils ont permis d'obtenir sont présentés dans les paragraphes ci-dessous.

1.4.6.1 Le système cône-plan

Le système cône plan est une enceinte remplie de milieu de culture, dont la paroi inférieure est fixe et la paroi supérieure est constituée d'un cône mobile tournant autour d'un axe (Fig. 1.24). La rotation du cône à la vitesse angulaire ω met le fluide en mouvement, générant ainsi une contrainte de cisaillement σ sur les cellules adhérentes ou en suspension dans le milieu de culture, dont l'expression est donnée par $\sigma = \frac{\mu\omega}{\alpha}$ où μ est la viscosité du fluide et α l'angle du cône.

Ce type de dispositif a permis de montrer que les cellules endothéliales s'alignent dans

le sens de l'écoulement sous l'effet des contraintes de cisaillement (Dewey *et al.*, 1981), les modifications de forme et d'orientation dépendant du temps d'application et de l'amplitude du cisaillement. Makino *et al.* ont utilisé un tel dispositif cône-plan pour étudier l'effet d'un cisaillement sur des cellules, et en particulier les petites GTPases de la famille Rho (Rac1, Rac2, cdc42 et rhoA). L'activité de ces protéines est contrôlée par la durée d'application et l'amplitude des contraintes de cisaillement générées par le flux (Makino *et al.*, 2005).

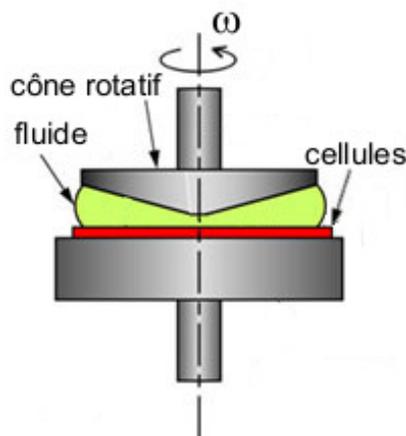


FIG. 1.24: Dispositif cône-plan. Le cône tourne à la vitesse angulaire ω générant un taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ constant $\dot{\gamma} = \frac{\omega}{\alpha}$ et des contraintes de cisaillement tangentielles sur les cellules cultivées en suspension ou adhérentes sur le disque inférieur.

1.4.6.2 La chambre d'écoulement radial

La chambre d'écoulement radial est composée de deux plaques circulaires de rayon R parallèles espacées d'une distance e . Le disque supérieur possède un orifice au centre connecté à un réservoir de milieu de culture. Ceci permet d'introduire le fluide dans l'enceinte par le centre, il est ensuite évacué par les paroi latérales (Fig. 1.25). Les lignes de courant sont donc radiales, tout comme les contraintes de cisaillement générées, données par la relation : $\sigma(r) = \frac{3Q\eta}{\pi r e^2}$, où Q est le débit et η la viscosité du fluide. La contrainte de cisaillement étant liée à la distance au centre du disque, un tel dispositif produit une plage continue de contraintes de cisaillement au cours d'une même expérience.

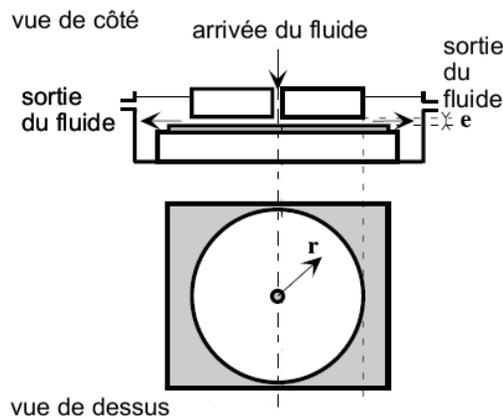


FIG. 1.25: Chambre d'écoulement radial. Le fluide circule du centre vers la périphérie des deux disques, générant des contraintes de cisaillement radiales sur les cellules en suspension ou adhérentes au fond de la chambre.

Un tel dispositif a d'abord été utilisé pour étudier le détachement de billes de latex portant un récepteur d'une plaque de verre fonctionnalisée avec le ligand correspondant. Cozens-Roberts *et al.* ont utilisé comme couple ligand-récepteur des immunoglobulines de chèvre et des anti-immunoglobulines de chèvre de lapin soumis à des contraintes de cisaillement comprises entre 0 et 40 dynes/cm^2 (Cozens-Roberts *et al.*, 1990). Ils ont montré expérimentalement que la contrainte seuil, i. e. la contrainte de cisaillement entraînant le détachement des billes, augmente linéairement avec la densité de récepteurs sur le substrat et avec la densité de ligands sur les billes, ce qui est cohérent avec les modèles mathématiques établis par Bell, Hammer et Lauffenburger (Bell, 1978; Hammer et Lauffenburger, 1987).

Des expériences de décollement de cellules adhérentes ont également été réalisées en chambre d'écoulement radial. Décavé *et al.* ont étudié la cinétique de détachement de *dictyostelium discoïdeum* induit par un flux (Décavé *et al.*, 2002). Leurs travaux ont montré que le détachement de la cellule du substrat se produit lorsque la contrainte de cisaillement est supérieure à une valeur seuil, et qu'il suit alors une loi cinétique du premier ordre. Ils ont également étudié l'effet des propriétés physicochimiques du substrat, et conclu qu'elles modifient à la fois l'efficacité d'attachement (déterminée par la contrainte de cisaillement pour laquelle 50% des cellules restent adhérentes) et la cinétique de détachement : sur le verre, l'attachement est moins efficace que sur des surfaces fonctionnalisées, mais la cinétique est plus rapide. Leurs expériences ont aussi mis en évidence le rôle des microfilaments d'actine dans la cinétique de détachement, celui-ci étant accéléré par la destruction du

réseau d'actine. La confluence des cellules adhérentes est également un facteur influençant la cinétique et l'efficacité du détachement par un flux, comme l'ont prouvé Peel et DiMilla (Peel et DiMilla, 1999) à partir d'expériences sur des cellules de moelle osseuse de souris. Leurs résultats montrent que la contrainte de cisaillement critique pour le détachement est plus élevée à confluence moyenne (10 – 40%).

1.4.6.3 La chambre d'écoulement à parois parallèles

Un autre type de chambre d'écoulement est la chambre d'écoulement à paroi parallèles. Elle est constituée d'un canal de section rectangulaire dans lequel on fait circuler le fluide (Fig. 1.26). En l'absence de perturbations, les lignes de courant sont des droites dans la direction du canal. Dans le cas d'un canal aplati (de section $w \times h$ avec $w \gg h$, et orienté selon l'axe z), la contrainte de cisaillement générée à la paroi (loin des bords verticaux) est donnée par la formule :

$$\sigma_{zy\ wall} = \frac{6\eta Q}{wh^2} \quad (1.38)$$

pour $w \gg h$ et $x \ll \frac{w}{2}$, et où η , Q , w et h sont respectivement la viscosité du fluide, son débit volumique, la largeur et la hauteur du canal (pour le calcul, voir la partie 1.4.4).

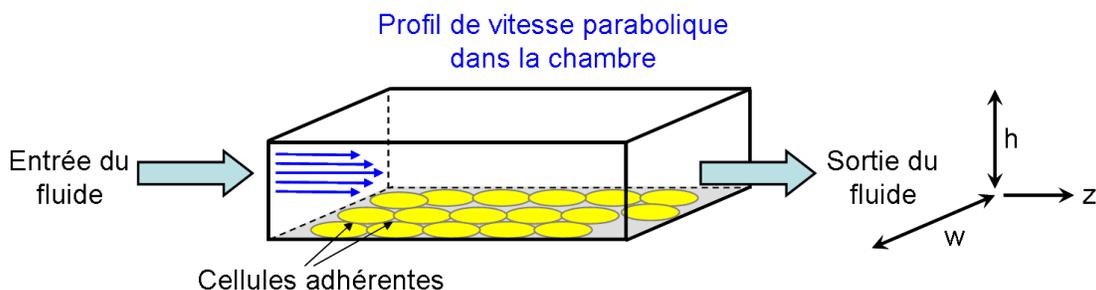


FIG. 1.26: Chambre d'écoulement à parois parallèles : le fluide est introduit par une des extrémités du canal parallélépipédique

L'utilisation de chambre d'écoulement a permis de mettre en évidence l'alignement de cellules endothéliales confluentes et la réorganisation de leur cytosquelette sous l'effet d'un flux :

- Galbraith *et al.* ont observé la réorganisation spatiale du cytosquelette d'actine de cellules endothéliales adhérentes à la paroi d'une chambre d'écoulement et soumises à un flux correspondant à des valeurs physiologiques de cisaillement (Galbraith *et al.*,

1998). Ils décrivent la réponse des cellules au flux en trois phases : dans les premières heures, les cellules s'allongent, acquièrent de plus en plus de fibres de stress et de microfilaments dans la zone apicale, les jonctions intercellulaires s'épaississent. Après 6 heures d'exposition au flux, les noyaux ainsi que les centres d'organisation des microtubules (les centrosomes) gagnent les régions situées en avant de la cellule, face au flux. Au cours de la dernière phase, après 12 heures de cisaillement, les cellules sont orientées dans la direction du flux, avec des fibres de stress plus grosses et plus longues, et des jonctions intercellulaires plus épaisses.

- Bruder *et al.* ont utilisé une chambre d'écoulement à paroi parallèles pour étudier l'effet d'un polyphénol présent dans la peau de raisin, le resveratrol, sur des cellules endothéliales soumises à un flux. Ils ont ainsi montré que l'association du resveratrol et d'un flux de cisaillement induit une élongation des cellules endothéliales. Cette étude avait pour but de comprendre le faible taux d'athérosclérose et de maladies coronariennes chez les populations du sud de la France consommant régulièrement du vin rouge (Bruder *et al.*, 2001).

Plusieurs travaux en chambre d'écoulement à parois parallèles ont également montré que des cellules adhérentes isolées se déforment sous l'effet d'un écoulement :

- Dans des expériences réalisées par Makino *et al.* sur des neutrophiles et des cellules HL-60 adhérents à la paroi d'une chambre d'écoulement à parois parallèles, un flux générant une contrainte de cisaillement à la paroi (5 dyn/cm^2) induit une diminution rapide de l'aire de contact cellule-substrat et une rétraction des pseudopodes (Makino *et al.*, 2005). Ils ont également testé l'effet d'un flux sur des leucocytes de souris mutantes privées de Rac1 et Rac2 : de tels leucocytes adhérents à la paroi de la chambre d'écoulement ne se rétractent pas sous l'effet du flux, mais continuent à accroître leur aire sur le substrat.
- Cao *et al.* ont étudié des lymphocytes soumis à des contraintes similaires en chambre d'écoulement à parois parallèles. Ils ont mis en évidence un comportement biphasique : dans une première phase, les neutrophiles poursuivent leur étalement sur le substrat, la surface de contact croît, puis dans une deuxième phase leur aire de contact se réduit et ils se décolent progressivement du substrat (Cao *et al.*, 1998).
- D'autres expériences en chambre d'écoulement parallélépipédique ont permis d'observer l'appâtissement de cellules HL60 sous l'effet d'un flux, puis leur roulement sur le substrat (Dong et Lei, 2000).

1.4.6.4 Les micropipettes

A la différence des chambres d'écoulement où l'écoulement génère des contraintes de cisaillement homogènes et contrôlées dans tout le volume de la chambre, les micropipettes permettent d'appliquer un flux de façon localisée sur une cellule adhérente (Fig. 1.27). La contrainte de cisaillement sur la cellule visée dépend alors de la distance entre la pointe de la micropipette et la cellule (typiquement $10\ \mu\text{m}$) et de la vitesse du fluide à la sortie de la micropipette (Moazzam *et al.*, 1997; Coughlin et Schmid-Schönbein, 2004). Elle est contrôlée par le réservoir de pression qui alimente la micropipette.

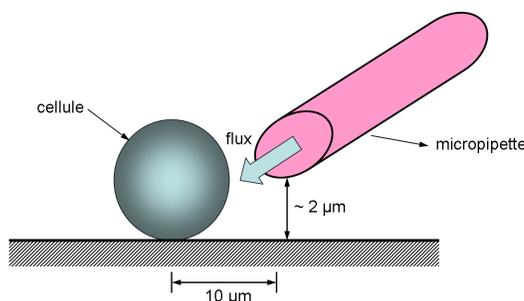


FIG. 1.27: Micropipette utilisée pour appliquer un flux sur une cellule. La pointe de la pipette est située à environ $10\ \mu\text{m}$ du centre de la cellule.

Bohnet *et al.* ont utilisé des micropipettes pour stopper la migration d'une cellule : en focalisant de façon précise le flux sortant de la micropipette sur une zone du bord avant d'une cellule en migration, ils ont observé une indentation dans le lamellipode : au niveau du jet de la pipette, l'étalement de la cellule est bloqué par la force hydrodynamique engendrée par le flux sortant. Ils ont ainsi pu estimer à quelques piconewtons par micromètre la force d'arrêt de la cellule en migration (Bohnet *et al.*, 2006).

Ce dispositif a également permis de montrer la complexité des phénomènes adhésifs, la réponse d'un leucocyte soumis au jet d'une micropipette étant différente selon son état d'activation. En effet, dans les travaux de Coughlin *et al.*, des leucocytes adhérant de façon passive, i. e. ayant initialement une forme sphérique, s'étaient lorsqu'ils sont soumis au flux sortant d'une pipette ($2\ \text{dyn}/\text{cm}^2$), ce comportement nécessitant un réseau d'actine intact et des molécules de myosine activées (Coughlin et Schmid-Schönbein, 2004). Au contraire, dans le cas de leucocytes étalés et formant des pseudopodes, le flux ($1\ \text{dyn}/\text{cm}^2$) a l'effet inverse : les leucocytes adhérents se rétractent (Moazzam *et al.*, 1997).

1.4.6.5 Les dispositifs microfluidiques

Les développements récents de la microfluidique ont rendu possible l'étude dans des environnements confinés de certains phénomènes cellulaires tels que la migration et l'adhésion, ce qui permet de se rapprocher des conditions dans lesquelles se déroulent ces phénomènes *in vivo*. Les dispositifs microfluidiques, dont la précision atteint aujourd'hui le micron, sont fabriqués en PDMS à partir de moules obtenus selon la méthode de photolithographie douce (McDonald *et al.*, 2000; Duffy *et al.*, 1998). Les parois sont fonctionnalisées de façon à être biocompatibles.

Dans un canal microfluidique de forme parallélépipédique (section $w \times h$), l'écoulement est parabolique dans la direction du canal. La contrainte de cisaillement à la paroi est obtenue par la formule :

$$\sigma_{zy \text{ wall}} = \frac{\eta Q \pi^2}{2h^2} \frac{\sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{1}{n^2} \left[1 - \frac{\cosh\left(\frac{n\pi x}{h}\right)}{\cosh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)} \right]}{\sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{1}{n^4} \left[w - \frac{2h}{n\pi} \tanh\left(\frac{wn\pi}{2h}\right) \right]} \quad (1.39)$$

Dans le cas d'un microcanal de section aplatie ($w \gg h$), la contrainte de cisaillement à la paroi est donnée par la formule simplifiée : $\sigma = \frac{6\eta Q}{wh^2}$ (voir les calculs dans le paragraphe 1.4.4).

La plupart des expériences sous flux en microcanaux consistent en une quantification de l'adhésion ou de la migration à la fin d'une période de cisaillement, adaptée au dispositif et au protocole utilisés :

- Un moyen de quantification est le comptage du nombre de cellules restant adhérentes à la paroi d'un microcanal après une période de flux. Lu *et al.* ont par exemple étudié l'influence de la fonctionnalisation en dénombrant la fraction de cellules (fibroblastes) restant adhérentes après une période de flux pour des canaux fonctionnalisés avec des solutions de fibronectine de concentrations comprises entre 0 et $10 \mu\text{g/mL}$, démontrant ainsi la nécessité de fonctionnaliser les parois pour avoir une adhésion résistante au flux (Lu *et al.*, 2004). L'effet du flux peut également être évalué en appliquant des contraintes de cisaillement plus ou moins élevées en variant soit le débit dans le canal (Wankhede *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2007), soit la dimension du canal (Lu *et al.*, 2004; Gutierrez et Groisman, 2007), ce qui permet de montrer que le nombre de cellules adhérentes diminue lorsque la contrainte de cisaillement

augmente.

- La quantification peut aussi se faire en mesurant la distance parcourue à la fin d’une expérience de migration. Cette méthode a été utilisée pour quantifier le phénomène de chimiotaxie en géométrie confinée : grâce à une géométrie judicieuse, Saadi *et al.* ont créé un gradient non linéaire d’EGF¹³ dans la direction transverse à l’écoulement au sein de leur dispositif microfluidique, et étudié la migration de cellules cancéreuses dans ce dispositif (Saadi *et al.*, 2006). Avec un dispositif différent, Irimia *et al.* ont créé un gradient dans la direction d’un canal de section très petite (comprise entre 15 et 100 μm^2), ce qui leur a permis de mesurer la distance parcourue par des cellules leucémiques HL60 très confinées et soumises à un gradient de chimioattractant (Irimia *et al.*, 2007).
- Certaines expériences consistent à compter le nombre de cellules qui franchissent un rétrécissement, comme dans les travaux de Chaw *et al.* qui ont construit un dispositif microfluidique comportant une série de microcanaux en parallèle, modélisant les microcapillaires sanguins, pour étudier l’extravasation des cellules cancéreuses (Chaw *et al.*, 2007). Ils ont ainsi mesuré le pourcentage de cellules qui traversent cette zone très confinée, dans différentes conditions de fonctionnalisation et/ou présence d’une couche de cellules endothéliales sur les parois des microcanaux.

1.4.7 Observations en fluorescence du cytosquelette d’une cellule adhérente sous écoulement

Pour compléter les résultats présentés précédemment (partie 1.4.6), concernant les conséquences du flux sur l’aspect extérieur d’une cellule (forme, aire d’adhésion, résistance au flux), le marquage de protéines dans la cellule par transfection ou immunofluorescence (voir les parties 2.3.2 et 2.3.2 pour la description des différents procédés), permet d’obtenir des informations sur l’évolution de la structure interne d’une cellule soumise à un flux, en particulier celle de son cytosquelette.

Dalous *et al.* ont ainsi suivi en fluorescence la localisation de la myosine II et de l’actine filamenteuse lors de renversements de la direction du flux sur deux types de *dictyostelium discoïdeum* transfectés (Dalous *et al.*, 2008). A chaque changement de sens de l’écoulement

¹³Epidermal Growth Factor

(correspondant à une contrainte de cisaillement de 0.9 à 2.1 Pa), l'actine filamenteuse disparaît de l'ancien front puis apparaît au nouveau front après un certain délai (de l'ordre de quelques dizaines de secondes) pendant lequel le taux d'actine filamenteuse est minimum. La myosine quant à elle quitte la zone nouvellement exposée (le nouveau front) pour l'arrière de la cellule (l'ancien front), cette transition passant par une répartition uniforme de la myosine dans la cellule. Des comparaisons avec des expériences en présence d'un gradient chimique ont montré que la réponse à un stimulus mécanique, i. e. un renversement de la direction de l'écoulement, présente des similarités avec le chimiotactisme.

Dans le cas de cellules métastatiques de l'œsophage, Lawler *et al.* ont montré que l'actine et la tubuline, réparties en un anneau cortical à la périphérie de la cellule étalée en conditions statiques, se réorganisent de façon différente lorsqu'un flux est appliqué : l'actine adopte une répartition ponctuelle dans toute la cellule, alors que la tubuline se concentre vers le bord avant de la cellule (Lawler *et al.*, 2006). Korb *et al.* ont observé des comportements similaires sur des cellules de carcinome du colon : les filaments d'actine sont relocalisés en plaque, ainsi que la protéine FAK et les intégrines activées (Korb *et al.*, 2004). Leurs expériences montrent aussi une diminution des adhérences focales chez les cellules soumises à un flux.

2

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.1 *Les cellules*

2.1.1 *Présentation des T24*

Au cours de cette thèse, hormis les toutes premières expériences d'élaboration du dispositif microfluidique menées avec des cellules CHO¹, toutes les expériences ont été réalisées avec des cellules de type T24. Il s'agit d'une lignée tumorale humaine dérivant de carcinomes (tumeur d'un tissu épithélial) de la vessie.

2.1.2 *Entretien des cellules*

Les cellules sont maintenues en culture continue dans une étuve thermostatée à 37°C en présence de 5% de CO₂ et en atmosphère humide. Elles sont cultivées dans du milieu RPMI² 1660 à 10% de SVF³, 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine (GIBCO). La procédure d'entretien consiste à repiquer une partie des cellules dans une nouvelle boîte de culture lorsque les cellules sont confluentes. Pour les T24, dont la vitesse de division est de l'ordre de 24 heures, 1\10^e des cellules est repris dans un nouveau flask tous les 3 jours, selon le protocole suivant :

- La première étape est l'élimination du milieu de culture (qui neutraliserait l'action de l'enzyme servant à détacher les cellules). Pour cela, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS⁴. Cette étape permet également d'évacuer les éventuelles cellules mortes en suspension dans le milieu de culture.

¹Chinese Hamster Ovary

²Roswell Park Memorial Institute

³Sérum de Veau Fétal

⁴Phosphate Buffered Saline

- Les cellules sont ensuite détachées de la boîte de culture par action de la trypsine, une enzyme digestive du suc pancréatique capable de digérer les protéines. Pour un flask T25 (surface 25 cm^2), $500\ \mu\text{L}$ de trypsine-EDTA⁵ sont introduits, puis l'excès est éliminé. Au bout de quelques minutes à l'étuve, la trypsine a dégradé les liaisons cellule-substrat et les cellules ne sont plus adhérentes.
- Un ajout de milieu (5 mL pour un flask T25) stoppe l'action de l'enzyme.
- La suspension cellulaire obtenue est alors centrifugée à 1200 rpm pendant 5 minutes.
- Après la centrifugation, le culot est repris dans du milieu de culture puis $1\ \times 10^6$ de la suspension cellulaire obtenue est placé dans une nouvelle boîte avec un complément de milieu (jusqu'à un volume de 5 mL pour un flask T25).

2.1.3 Mise en solution des cellules

Avant chaque expérience, il est nécessaire de mettre en solution des cellules T24 cultivées dans une boîte de culture afin de pouvoir les introduire dans le microcanal. La procédure est similaire à celle de l'entretien, mais les cellules sont trypsinées à demi-confluence (pour l'entretien, les cellules sont trypsinées à confluence) :

- 2 rinçages au PBS
- Ajout de trypsine, puis incubation pendant quelques minutes à l'étuve
- Ajout de milieu pour stopper l'action de la trypsine
- Centrifugation

Après la centrifugation, le culot est repris dans une petite quantité de milieu (typiquement 1 mL pour un T25 semi-confluent) afin d'obtenir une suspension de cellules concentrée prête à être introduite dans le dispositif microfluidique. Un comptage des cellules avec une cellule de Neubauer permet de vérifier la concentration, qui doit être de l'ordre de $1 - 5 \cdot 10^6$ cellules/ mL .

2.2 Les microcanaux

Cette thèse fait partie des premiers travaux effectués au laboratoire dans le domaine de la microfluidique. Par conséquent, elle a participé à toutes les évolutions qui ont permis d'aboutir à la fabrication de microcanaux de bonne qualité. Au cours de ces trois années,

⁵Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique

les conditions de propreté en salle blanche, le matériel ainsi que les moyens humains mis en œuvre ont bénéficié de grandes améliorations.

2.2.1 Méthode de fabrication des microcanaux

2.2.1.1 Fabrication des moules par photolithographie

Les moules sont fabriqués par la méthode de photolithographie. La résine utilisée (SU8, GM 1060, Gersteltec) est une résine photosensible négative, i. e. les zones exposées aux flux lumineux sont polymérisées et rendues insolubles au développement. Le protocole de fabrication des moules en silicone comprend 4 étapes (Fig. 2.1) :

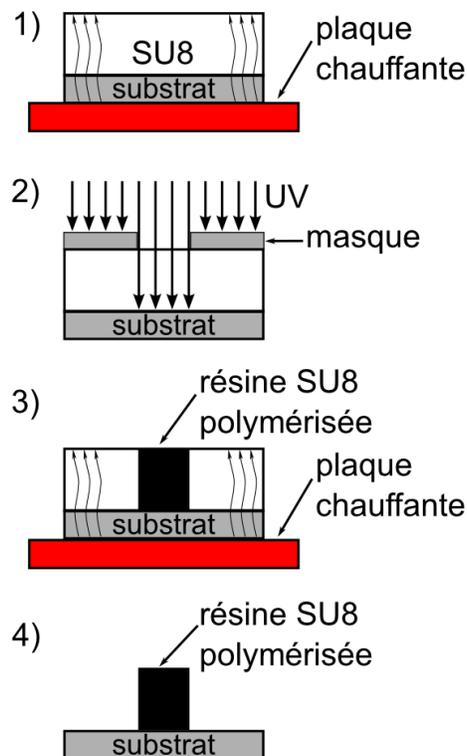


FIG. 2.1: Différentes étapes de fabrication des moules pour microcanaux par photolithographie

- Etape 1 : Après une phase de séchage (20 minutes à 130°C sur la plaque chauffante pour enlever l'eau adsorbée à la surface de la plaquette de silicium (« wafer »), la résine photosensible SU8 est étalée sur la plaquette de silicium pendant

40 secondes. La vitesse de rotation de la tournette est fonction du type de résine et de l'épaisseur désirée. La courbe d'étalonnage donnant la vitesse de rotation de la tournette en fonction de l'épaisseur souhaitée est donnée sur la figure 2.2. Les éventuelles bulles présentes sur la résine après cette phase d'étalement (« spin-coating ») peuvent être percées avec une aiguille. Un temps de repos (30 minutes) permet d'améliorer l'uniformité de la couche de résine. La résine subit alors une première cuisson « douce » (progressive de 20°C jusqu'à un premier palier de 5-10 minutes à 65°C puis augmentation jusqu'à 135°C pour un deuxième palier d'une heure).

- Etape 2 : Le substrat en silicium recouvert de résine SU8 est exposé au rayonnement ultraviolet à travers le masque représentatif du moule à réaliser. Le temps d'exposition est déterminé en fonction de l'épaisseur de résine et de l'intensité de la lampe UV (voir Fig.2.2). A l'issue de la phase d'exposition, la réaction de polymérisation de la résine (très lente à température ambiante) a été initiée dans les zones exposées au rayonnement.
- Etape 3 : Après un temps de repos nécessaire à l'homogénéisation du processus chimique, la cuisson post-exposition accélère la polymérisation. Elle suit le même profil de température que la cuisson précédant l'exposition. Cette deuxième cuisson rend les zones polymérisées (celles qui ont été exposées aux UV) insolubles au développeur.
- Etape 4 : La résine est développée dans une solution de PGMEA⁶, un solvant de la résine) puis le « wafer » est rincé à l'isopropanol et séché à température ambiante. Le moule est alors prêt à servir d'empreinte pour la fabrication de microcanaux (Fig. 2.3).

⁶Propylen Glycol Methyl Ether Acetate

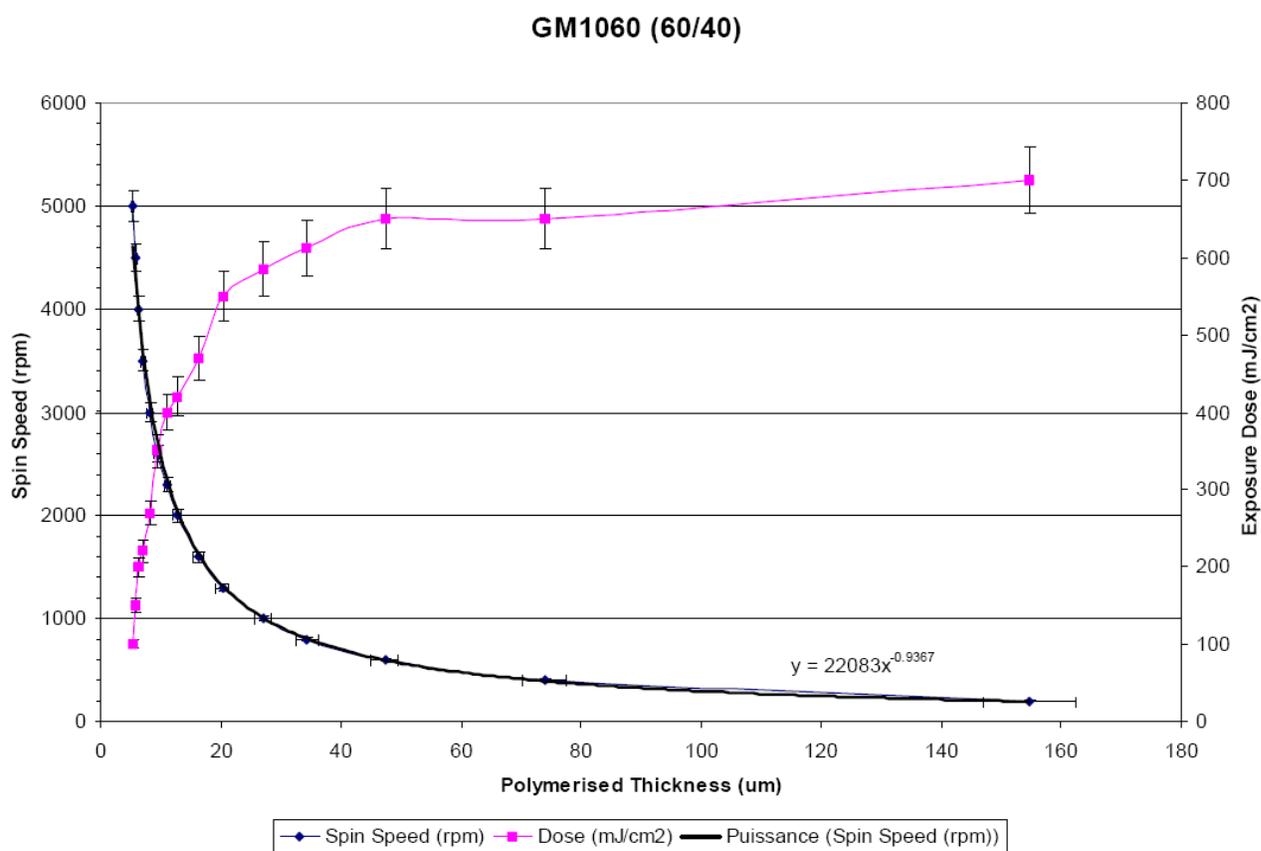


FIG. 2.2: Courbes d'étalonnage de la résine SU8 (GM 1060, Gersteltec) donnant la vitesse de rotation et la dose d'exposition en fonction de l'épaisseur de résine souhaitée à $20.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ et $45 \pm 1\%$ d'humidité relative. D'après GM 1060 Datasheet, Gersteltec Sarl.

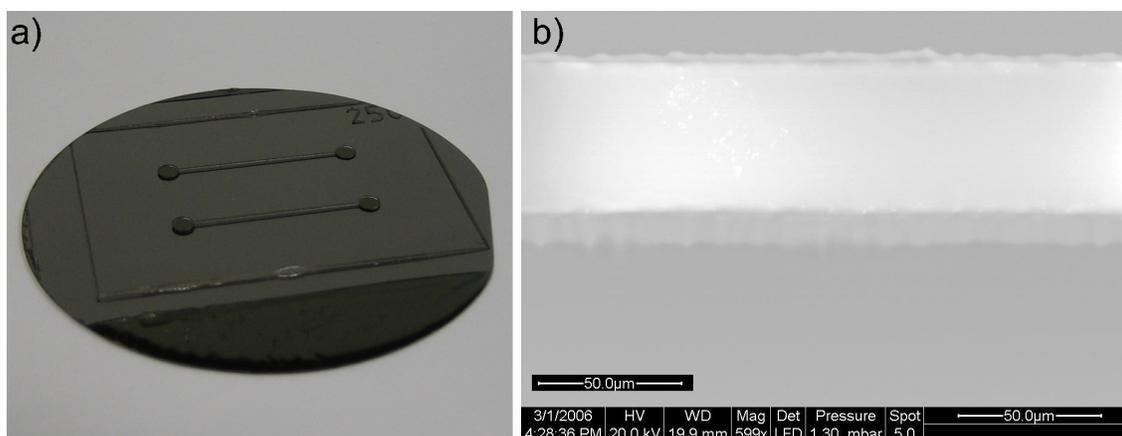


FIG. 2.3: Moules en résine photosensible SU8 utilisés pour la fabrication de microcanaux en silicone. a) Moule pour microcanal sur un « wafer » en silicium. b) Vue au MEB du moule en résine.

2.2.1.2 Fabrication des microcanaux en silicone

Les microcanaux utilisés au cours des expériences sont en PDMS⁷, à usage unique. Ils sont fabriqués par moulage sur un moule en résine réutilisable. Les différentes étapes sont les suivantes :

- Le PDMS est préparé en mélangeant 2 constituants (10% en masse d'agent réticulant et 90% en masse de base). Après 5 minutes d'agitation manuelle dans un bécher, les bulles d'air présentes dans le mélange sont éliminées en plaçant le mélange dans une pompe à vide. Le PDMS est alors coulé sur le moule en résine (dans une boîte de pétri) puis cuit pendant une heure au four préalablement chauffé à 65°C.
- A la sortie du four, l'empreinte est décollée du moule en découpant une large zone entourant le canal. Les trous qui serviront à l'insertion des tuyaux d'arrivée et de sortie du fluide sont percés avec un petit tube métallique ($\phi = 1.5\text{ mm}$).
- Le canal est fermé par une lame en verre collée sur le PDMS. Ce collage est réalisé avec une nettoyeuse à plasma : après 40 secondes sous plasma dans l'enceinte, les deux surfaces sont rapidement plaquées l'une contre l'autre puis collées irréversiblement.
- Les tuyaux d'arrivée et de sortie (tuyaux Tygon R3603, $\phi_{int} = 0.8\text{ mm}$, $\phi_{ext} = 2.4\text{ mm}$) sont insérés dans les trous prévus à cet effet, puis collés avec de l'araldite pour garantir l'étanchéité.

2.2.2 Fonctionnalisation des parois

Afin de permettre l'adhésion des cellules cancéreuses au fond du microcanal après leur sédimentation, il est nécessaire de fonctionnaliser les parois (trois côtés en PDMS, un côté en verre), c'est à dire adsorber à la surface des molécules présentes dans la matrice extracellulaire qui facilitent l'attachement des cellules *in vivo*. La matrice extracellulaire contient un certain nombre de protéines pourvues de sites spécifiques de liaison sur les récepteurs cellulaires de surface, parmi lesquelles figure la fibronectine, une grosse glycoprotéine.

2.2.2.1 Présentation de la fibronectine

La fibronectine est un dimère composé de deux très grosses sous unités repliées en une série de domaines distincts fonctionnellement, eux même constitués de plus petits modules

⁷PolyDiMéthylSiloxane

(Fig. 2.4). Un de ces modules, la répétition de type III, se fixe sur les intégrines, récepteurs présents à la surface des cellules qui reconnaissent les séquences RGD⁸ formant une partie du principal site de fixation sur la répétition de type III (Fig. 2.5).

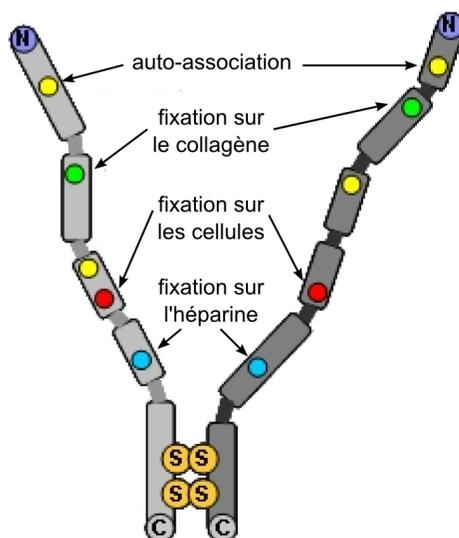


FIG. 2.4: Structure d'un dimère de fibronectine montrant ses principaux domaines de liaisons, inspiré de Alberts *et al.*. Chaque chaîne a près de 2500 acides aminés de long et est repliée en cinq à six domaines reliés par des segments peptidiques souples. Chaque domaine est spécialisé dans une liaison avec une molécule particulière ou une cellule particulière comme cela est indiqué pour quatre d'entre-eux, tous les sites n'étant pas représentés ici pour des raisons de clarté (Alberts *et al.*, 2002).

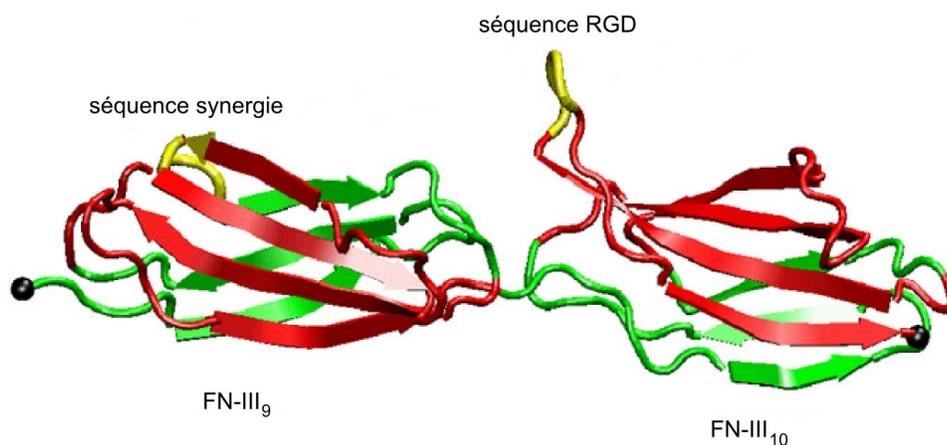


FIG. 2.5: Structure tridimensionnelle de deux types de répétitions de type III de fibronectine avec les séquences RGD et « synergie » constituant une partie du principal site de liaison aux cellules (source : [//www.ks.uiuc.edu/Research/namd/spotlight/](http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/spotlight/)).

⁸Arginine-Glycine-Acide Aspartique

2.2.2.2 Protocole de fonctionnalisation

L'adsorption de fibronectine sur les parois du microcanal est réalisée en faisant circuler une solution de fibronectine ($20\mu\text{g}/\text{mL}$) dans le canal pendant une heure. Le débit, de l'ordre de $0,5\text{ mL}/\text{h}$, est contrôlé par le pousse-seringue. Après une heure de fonctionnalisation, le canal est rincé en faisant circuler du milieu de culture.

2.2.3 Propriétés (visco)élastiques du PDMS

La rigidité du substrat sur lequel les cellules adhèrent joue un rôle prépondérant dans l'adhésion et la migration car les cellules sont capables de sonder le milieu environnant et de répondre à la résistance mécanique du matériau qu'elles rencontrent, par une réorganisation de leur cytosquelette. Pour cette raison, il était important de déterminer les propriétés mécaniques du substrat sur lequel les cellules adhèrent pendant les expériences. Des mesures rhéométriques ont donc été effectuées au laboratoire sur un échantillon de PDMS identique à celui qui constitue les microcanaux utilisés au cours des expériences. Grâce à un rhéomètre (Malvern Gemini 150 à contrainte imposée), nous avons mesuré le module de cisaillement G' du PDMS. Sa valeur est pratiquement constante sur la plage de fréquence $0.01 - 10\text{ Hz}$: $G' \sim G_0 \sim 2.10^5\text{ Pa}$. Le module d'Young E est donné par la relation : $E = 2(1 + \nu)G$. Pour un matériau incompressible, $\nu = \frac{1}{2}$, donc $E \sim 3G_0$ soit $E \sim 0.6\text{ MPa}$. Avec un module élastique de l'ordre de 0.2 MPa et un module visqueux négligeable (Fig. 2.7), le PDMS peut donc être considéré comme un matériau relativement rigide en comparaison des gels de polyacrylamide (Fig. 2.6).

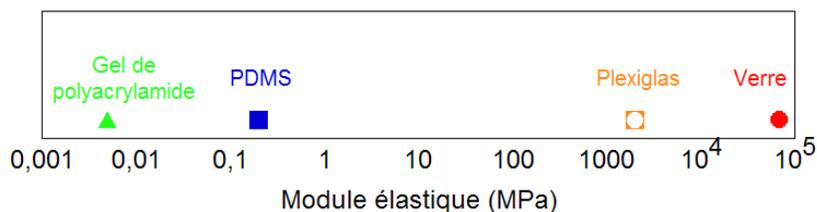


FIG. 2.6: Echelle de comparaison des modules élastiques de différents matériaux

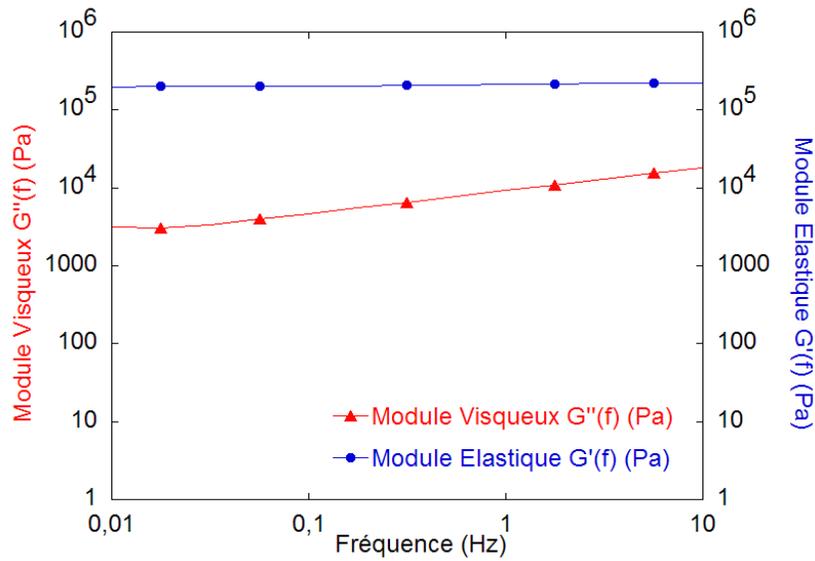


FIG. 2.7: Modules élastique $G'(f)$ et visqueux $G''(f)$ du PDMS constituant les microcanaux

2.3 Techniques d'observations

2.3.1 Microscopie à contraste de phase

2.3.1.1 Principe de la microscopie en contraste de phase

Les cellules animales ne sont pas seulement minuscules (diamètre typique de 10 à 20 μm , environ 10^{-5} de la taille de la plus petite particule visible à l'oeil nu), elles sont aussi transparentes et incolores. Elles sont donc difficilement observables en microscopie classique (fond clair) où l'image est obtenue par simple transmission de la lumière. Les cellules présentent cependant un indice de réfraction inhomogène. Par conséquent, lorsque la lumière la traverse, la phase de l'onde lumineuse est modifiée selon l'indice de réfraction local de la cellule : la lumière qui traverse une partie relativement épaisse ou dense, comme le noyau, est retardée, sa phase est décalée par rapport à celle de la lumière qui traverse une partie adjacente cytoplasmique, plus fine. Or l'oeil humain n'est sensible qu'aux différences d'amplitude (luminosité) et de longueur d'onde (couleur) de la lumière qui lui parvient, il ne perçoit pas les différences de phase.

Le microscope à contraste de phase, imaginé en 1930 par le hollandais Frits Zernike (1888-1966), transforme en niveaux de gris les différences d'indices de réfraction responsables des déphasages, et permet ainsi la visualisation de structures transparentes quand leurs indices de réfraction diffèrent. Le principe du microscope à contraste de phase est basé sur la théorie de la diffraction. Le spectre de l'objet, dans le plan de diffraction, est modifié de sorte que l'intensité restituée dans le plan image dépende linéairement de la phase, donc de l'indice de réfraction. Ceci est réalisé en pratique grâce à deux dispositifs, appelés anneaux de phase, l'un placé dans le condenseur (le système optique qui focalise la lumière sur l'objet), l'autre dans l'objectif (Fig. 2.8). Ces anneaux filtrent les rayons déphasés et il en résulte sur l'image un contraste accentué de la structure : les détails apparaissent sur fond lumineux, brillants ou sombres selon le signe de la phase.

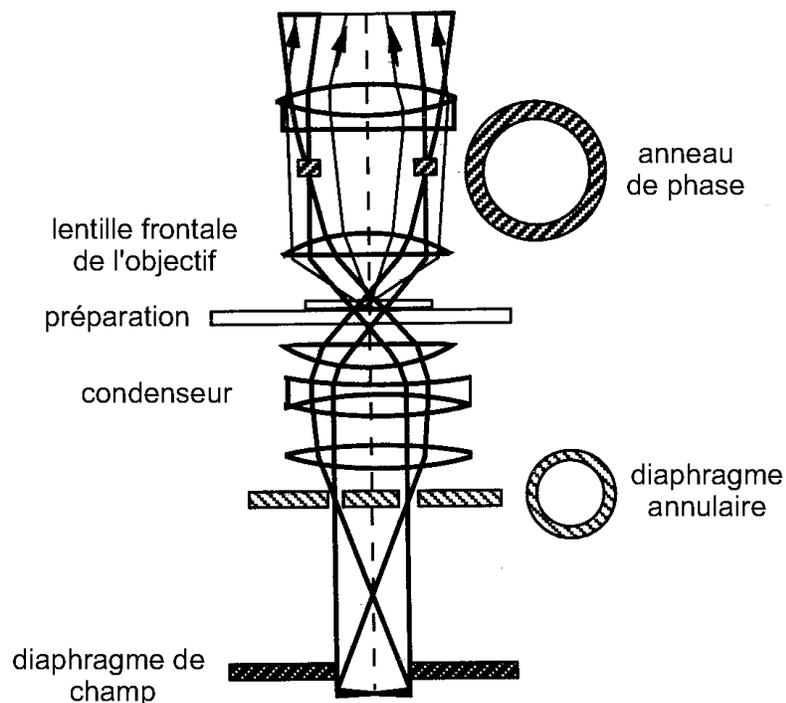


FIG. 2.8: Eléments optiques spécifiques du microscope à contraste de phase. La lumière se propage de bas en haut sur le schéma. Le diaphragme annulaire laisse passer un cône creux de lumière vers la préparation. Au niveau du condenseur, un objet de phase produit une onde déphasée de 90 degrés par rapport à l'onde d'éclairage. L'objet diffracte la lumière. La plus grande partie de la lumière diffractée par l'objet évite l'anneau de phase et remonte vers le plan de formation de l'image intermédiaire. La lumière d'éclairage converge au plan focal arrière de l'objectif où se trouve un anneau de phase qui l'atténue et engendre un déphasage de 90 degrés.

2.3.1.2 Microscope à contraste de phase au Laboratoire de Spectrométrie Physique

Le microscope à contraste de phase utilisé au Laboratoire de Spectrométrie Physique (LSP) pour réaliser les expériences est un microscope droit Olympus BX51 (Fig. 2.9), équipé de 3 objectifs ($\times 10$, $\times 20$, $\times 40$), et des anneaux de phase correspondants. Afin d'obtenir une résolution suffisante dans un champ assez grand pour contenir plusieurs cellules isolées adhérentes à la paroi du microcanal, les observations ont été réalisées avec l'objectif $\times 20$. Les expériences sur cellules vivantes nécessitant une température de 37°C , nous avons construit une enceinte qui se fixe sur la platine chauffante du microscope, afin de créer une chambre thermostatée. Une sonde de platine installée à l'intérieur de la chambre permet le contrôle en temps réel de la température à l'intérieur de l'enceinte. Les images sont acquises grâce à une caméra CCD (Hamamatsu ORCA-ER), et enregistrées avec le logiciel Wasabi. Au vu de ce qui nous intéresse, la fréquence d'acquisition est d'une image toutes les 15 secondes, la mise au point pouvant être réajustée si nécessaire entre deux images.

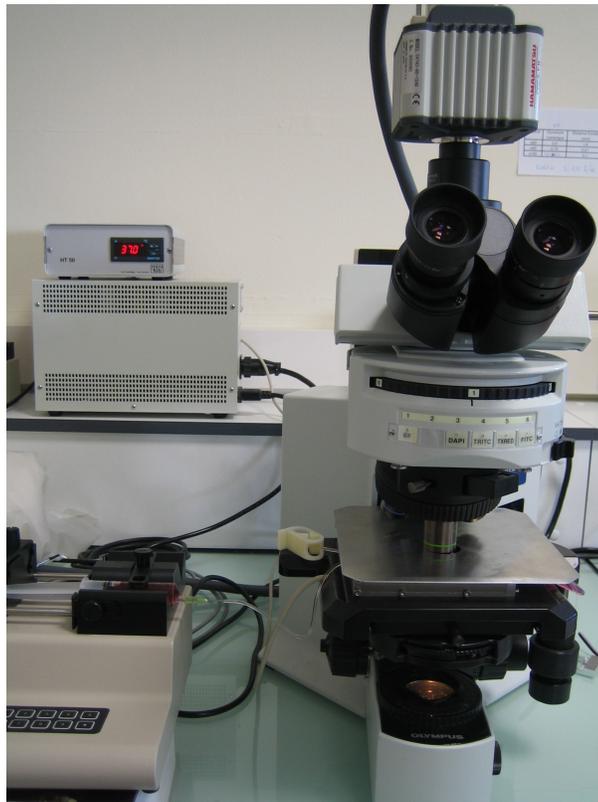


FIG. 2.9: Microscope à contraste de phase utilisé au Laboratoire de Spectrométrie Physique pour les observations de cellules tumorales adhérentes à la paroi d'un microcanal soumises à un flux, et système chauffant doté d'une enceinte fermée contrôlant à $\pm 0.5^\circ\text{C}$.

2.3.2 Microscopie de fluorescence

2.3.2.1 Principe de la microscopie de fluorescence

Certaines substances, lorsqu'elles sont soumises à un faisceau électromagnétique dont la fréquence ν est située dans la lumière visible ou l'ultraviolet, émettent un autre rayonnement de fréquence ν plus petite, donc moins énergétique. Ces substances sont qualifiées de fluorescentes si cette émission se situe dans le domaine de la lumière visible. Cette propriété de fluorescence est due à la présence dans la structure de ces molécules de groupements chimiques appelés chromophores, tels que benzène, liaisons C=O, C=C, C=S, C=N, C=C-C=O, C=C-C=C, N=N, N=O, NO₂, S=O. Sous l'impact des photons, le chromophore passe à un état excité, puis revient presque instantanément à son état fondamental en émettant de la lumière. Si le composé est illuminé à sa longueur d'onde d'absorption, puis observé à travers un filtre qui ne laisse passer que la lumière de la longueur d'onde d'émission, il apparaît brillant sur fond noir, permettant la détection d'une quantité très faible de molécules fluorescentes.

Dans un microscope à fluorescence (Fig. 2.10), la lumière d'excitation est issue d'une source très puissante (de l'ordre de 100 Watts). Elle traverse deux jeux de filtres :

- Le premier filtre la lumière avant qu'elle atteigne l'objet à observer, il est choisi tel qu'il ne laisse passer que les longueurs d'onde qui excitent le colorant fluorescent.
- Le second filtre la lumière qui provient de l'objet, il est choisi de façon à bloquer la lumière d'excitation et à ne laisser passer que les longueurs d'onde émises lorsque l'objet devient fluorescent.

Si l'objet n'est pas naturellement fluorescent, comme c'est le cas pour les cellules biologiques, il est possible d'accrocher des fluorophores à certains sites chimiques de fixation. Ainsi, le marquage de certaines protéines spécifiques des cellules ou tissus par des colorants ou protéines fluorescentes (Fig. 2.11), permet leur localisation précise en microscopie de fluorescence.

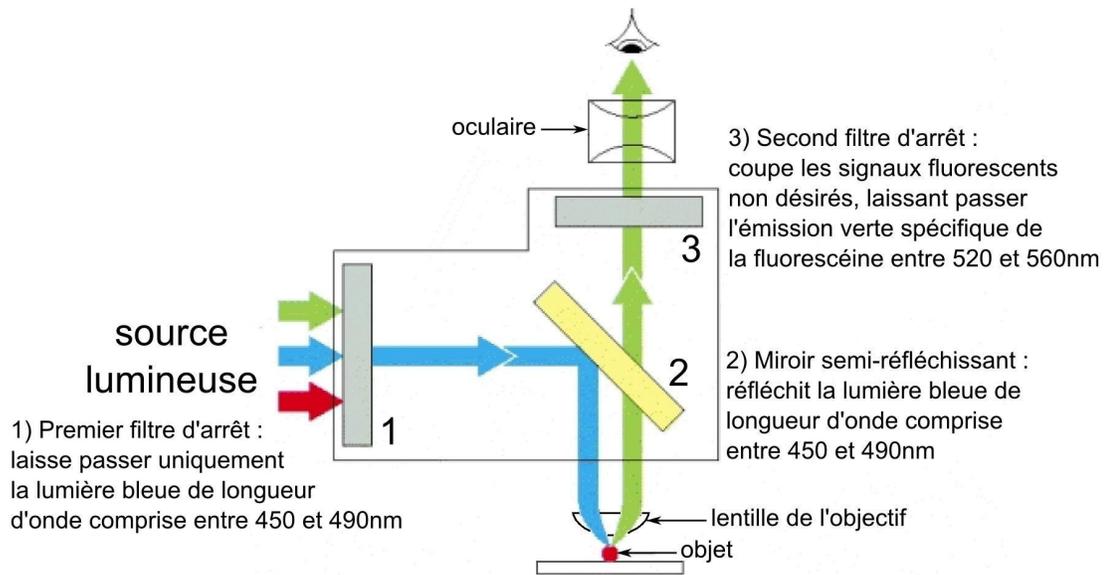


FIG. 2.10: Principe du microscope à fluorescence, avec le jeu de filtres adaptés à la détection de la fluorescéine, composé de deux filtres d'arrêt (1 et 3) et d'un miroir semi-réfléchissant (2).

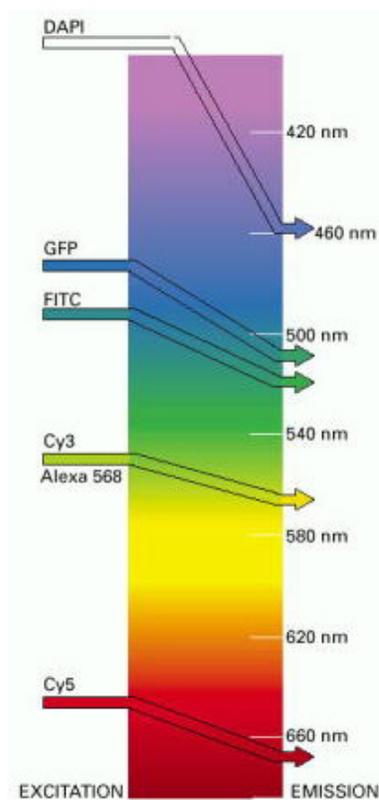


FIG. 2.11: Plages de longueurs d'onde d'absorption et d'émission de divers colorants et protéines habituellement utilisés en microscopie de fluorescence.

Différentes techniques sont utilisées pour marquer les protéines, deux d'entre elles utilisées au cours de cette thèse seront développées dans la partie 2.3.2 :

- Le marquage par immunofluorescence indirecte
- Le marquage par transfection

2.3.2.2 Immunofluorescence indirecte

Une technique de coloration, basée sur la spécificité antigénique des anticorps, consiste à coupler les colorants fluorescents à des molécules d'anticorps, qui se fixent spécifiquement aux macromolécules qu'ils reconnaissent dans la cellule (vivante ou fixée) ou la matrice extracellulaire. Il est possible de coupler la molécule de marquage directement à un anticorps utilisé pour la reconnaissance spécifique (anticorps primaire), cependant, le signal de fluorescence recueilli est plus fort en utilisant un anticorps primaire non marqué et en le détectant par un groupe d'anticorps secondaires marqués qui se fixent sur lui (Fig. 2.12).

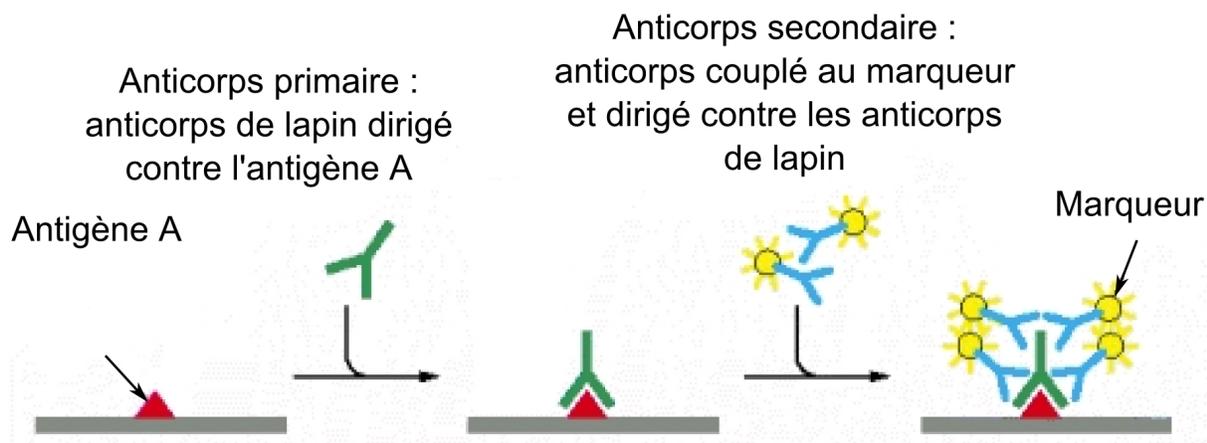


FIG. 2.12: Principe de l'immunofluorescence indirecte : l'anticorps secondaire est fixé de façon covalente à une molécule de marquage qui le rend facilement détectable

Cette technique de marquage a été utilisée au cours de cette thèse pour marquer la paxilline, une protéine intervenant dans les complexes focaux d'adhésion des cellules. Le protocole suivi pour fixer et marquer les cellules adhérentes à la paroi des microcanaux (après les paliers de flux) est le suivant :

- Les cellules sont tout d'abord fixées en injectant dans le microcanal une solution de PBS contenant 3% de PFA⁹ pendant 10 minutes.

⁹ParaFormAldéhyde

- Les membranes sont ensuite perméabilisées par une solution de PBS-Triton pendant 10 minutes.
- Le système est alors rincé au PBS, puis avec une solution de PBS contenant 0.2% de saponine et 2% de BSA.
- Une solution d'anticorps primaire, un anticorps de souris dirigé contre la paxilline humaine, est introduite dans le canal pour 30 minutes d'incubation puis les cellules sont à nouveau rincées avec une solution de PBS contenant 0.2% de saponine et 2% de BSA.
- Le second anticorps, un anticorps de chèvre dirigé contre l'immunoglobuline de souris et couplé au TRITC¹⁰ est alors introduit dans le canal pendant 30 minutes à l'obscurité, avant un dernier rinçage avec la solution de PBS, 0.2% saponine, 2% BSA.
- Le canal est rempli avec une solution d'indice de réfraction très proche de celui du verre (DAKO), pour éviter la réfraction du faisceau lumineux à l'interface entre le verre et le canal.

2.3.2.3 Fluorescence par transfection

A la différence des marquages avec des colorants classiques (FITC, TRITC, DAPI, etc), qui doivent être fabriqués en dehors de la cellule puis artificiellement introduits à l'intérieur, la fluorescence par transfection consiste à introduire dans le génome de la cellule le gène codant pour une protéine fluorescente, la GFP¹¹ (Fig. 2.13), qui sera alors exprimée directement par la cellule.

Issue d'une méduse (*Aequorea victoria*), cette protéine est intrinsèquement fluorescente. Son gène peut être fusionné *in vitro* au gène d'une protéine à étudier. Le gène recombinant est ensuite réintroduit dans une cellule, qui va synthétiser la protéine de fusion, alors fluorescente, donc observable en microscopie de fluorescence. Le marquage par la GFP montre clairement la distribution et la dynamique d'une protéine dans une cellule vivante.

¹⁰Tetramethyl Rhodamine Iso Thio Cyanate, ou rhodamine

¹¹Green Fluorescent Protein

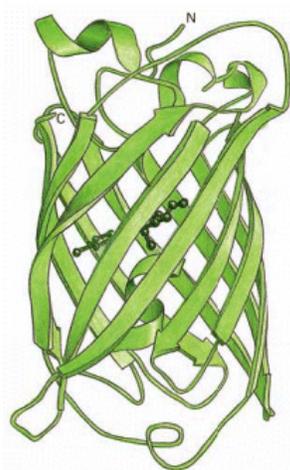


FIG. 2.13: Structure de la GFP : onze feuillets β forment les planches d'un tonneau, au milieu duquel est enfoui le chromophore actif (en vert foncé) (Alberts *et al.*, 2002).

Afin d'observer les effets du flux sur la réorganisation du cytosquelette de la cellule, il était important de visualiser les éléments de son cytosquelette au cours des expériences en microcanaux. Deux lignées de cellules transfectées ont pour cela été utilisées :

- T24 actine GFP. L'actine est un des composants principaux du cytosquelette des cellules. Elle existe sous forme de filaments : la F-actine (Filamenteuse), et sous forme monomérique : la G-actine (Globulaire).
- T24 α -actinine 4-GFP. L' α -actinine 4 est une protéine de liaison de la F-actine qui relie les filaments d'actine en un faisceau parallèle régulier.

Dans chaque cas, différents clones ont été testés pour sélectionner le plus fluorescent. Pour l' α -actinine 4, parmi les 4 clones différents que nous avons testés, l'un était faiblement à moyennement fluorescent, et 3 étaient très peu fluorescents. Sur les deux clones testés pour l'actine GFP, l'un donnait un signal de fluorescence élevé, l'autre donnant un signal plus faible. A la suite de ces tests, nous avons utilisé le clone de l' α -actinine 4 et celui de l'actine GFP émettant la fluorescence la plus élevée.

2.3.2.4 Microscope de fluorescence à l'Institut Albert Bonniot

Nous avons réalisé les expériences de fluorescence sur la station de vidéo-microscopie automatisée de l'Institut Albert Bonniot (IAB) dédiée à l'étude de la dynamique de migration cellulaire de longue durée (Fig. 2.14) qui comprend un microscope inversé motorisé Axiovert (Carl Zeiss) équipé de 3 objectifs ($\times 10$, $\times 32$, $\times 40$), des anneaux de phase

correspondants, de différents filtres interférentiels (FITC, TRITC, DAPI), d'une caméra CCD MicroMAX (Princeton Instruments) et du logiciel MetaMorph (Roper Scientific). Nous avons choisi d'utiliser ce dispositif car il possède une platine automatisée qui permet l'enregistrement de plusieurs champs au cours d'une même expérience. Les observations sont été faites avec l'objectif $\times 40$. Une lampe au mercure sert de source lumineuse aux expériences de fluorescence. Une chambre d'incubation isolée et thermostatée permet de maintenir le microcanal à $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Nous avons utilisé le logiciel d'acquisition Metamorph, grâce auquel plusieurs champs peuvent être enregistrés au cours de la même expérience, la platine du microscope étant commandée numériquement par l'ordinateur. Typiquement, lors d'une expérience sous flux, 4 positions sont mémorisées dans le canal, puis les images de ces champs sont prises en contraste de phase puis en fluorescence (FITC), en faisant pour chacune 3 acquisitions en z (à $z - 1 \mu\text{m}$, z et $z + 1 \mu\text{m}$) car le flux peut engendrer des fluctuations de la position de la lamelle (d'épaisseur $170 \mu\text{m}$ donc flexible). La fréquence d'acquisition est plus lente qu'en contraste de phase : une acquisition ($2 \times 4 \times 3 = 24$ images) toutes les 100 secondes, afin de pouvoir affiner le réglage de la mise au point en z pour chacun des 4 champs.



FIG. 2.14: Microscope de fluorescence utilisé à l'Institut Albert Bonniot pour les observations en fluorescence de cellules tumorales adhérentes à la paroi d'un microcanal, et soumises à un flux

2.4 *Ecoulement dans le microcanal*

2.4.1 *Le pousse-seringue*

Au cours d'une expérience, le débit dans le microcanal est contrôlé grâce à un pousse-seringue (Kd Scientific) dont le moteur fait tourner une vis sans fin qui pousse le piston de la seringue remplie de milieu de culture. La vitesse de rotation de la vis sans fin est calculée selon le débit et le modèle de seringue, la taille et la contenance de la seringue étant à programmer sur le pousse-seringue. La plage de débits utilisés au cours des expériences s'étend du 10^{-6} de mL/h à plusieurs centaines de mL/h . La taille de la seringue est adaptée au flux : seringue de $5 mL$ à faible flux ($< 10 mL/h$), seringue de 20 et $60 mL$ à flux élevé, afin de ne pas avoir une vitesse de rotation du moteur trop faible et de limiter les à-coups du moteur. Le rechargement ou changement de seringue est effectué en arrêtant le pousse-seringue et en clampant le tuyau avant l'entrée dans le canal. La mise en place d'une seringue pleine prend environ une minute.

2.4.2 *Le piège à bulles*

Le microscope utilisé au LSP étant droit, le côté supérieur du canal est celui fermé par la lame de verre (l'objectif $\times 20$ au LSP a une distance de travail de $1.6 mm$, supérieure à l'épaisseur d'une lame : $1 mm$). Dans cette configuration, toutes les bulles d'air présentes dans le tuyau d'arrivée fixé sur le côté du canal en PDMS, remontent par gravité dans le canal, et peuvent endommager les cellules adhérentes. Pour limiter l'entrée des bulles d'air dans le microcanal, un piège à bulles a été mis au point (Fig. 2.15). Il est constitué d'un sas rempli de milieu de culture placé avant l'entrée dans le canal. Au fond de ce piège à bulle se trouve le tuyau de jonction avec le canal. Ainsi, les bulles restent en haut du piège (contre la paroi en verre), et ne pénètrent pas dans le canal.

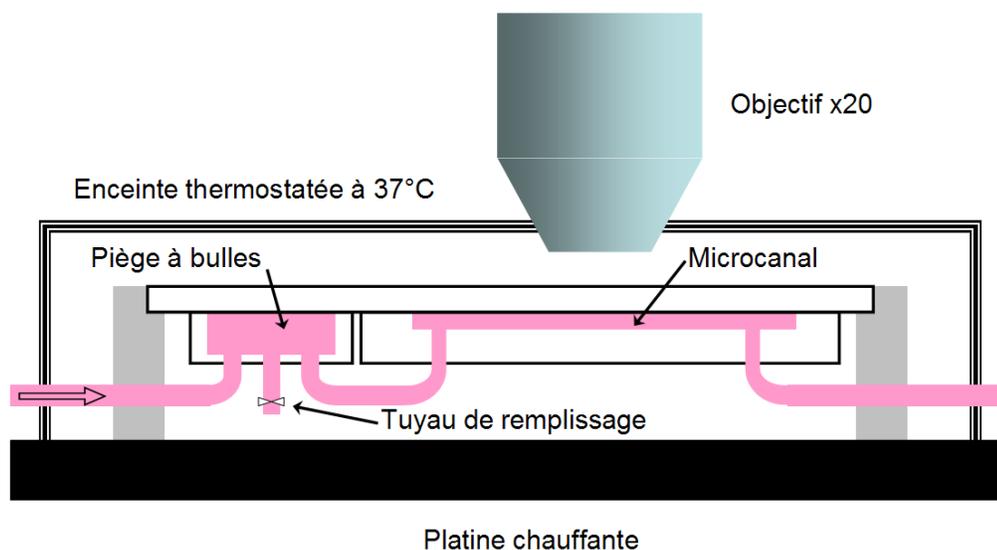


FIG. 2.15: Schéma du dispositif microfluidique utilisé au LSP pour observer des cellules tumorales adhérentes à la paroi d'un microcanal soumises à un flux. Le microcanal est placé sur un support afin que le côté en verre soit face à l'objectif du microscope droit. Un piège à bulles est placé avant le microcanal de façon à éviter leur passage dans le canal. Le tuyau de remplissage de ce piège à bulles est clampé pendant les expériences. La flèche indique le sens du flux.

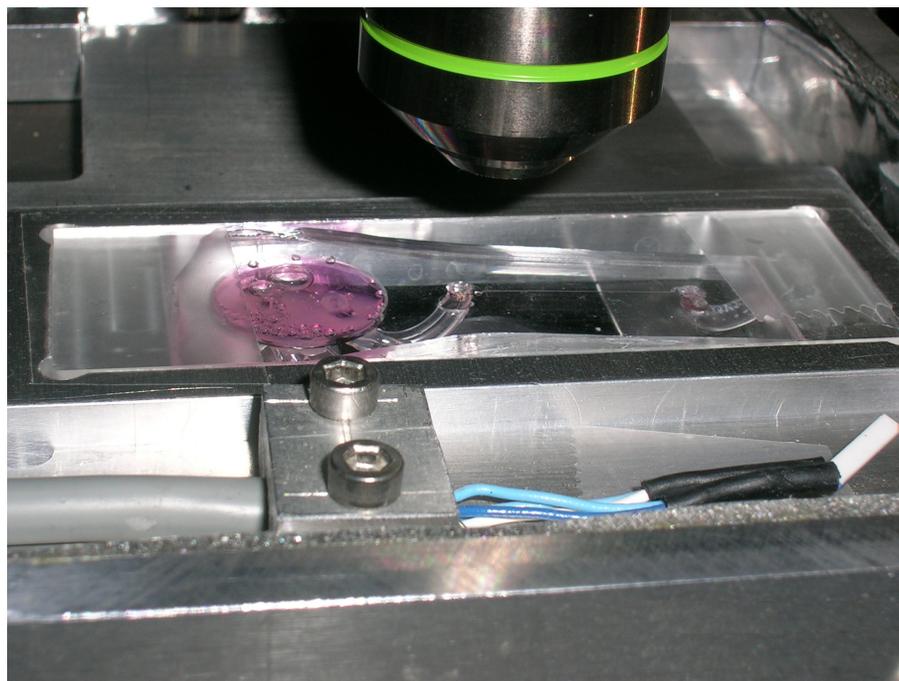


FIG. 2.16: Piège à bulles en fonctionnement (photo sans le couvercle de l'enceinte thermostatée) : les bulles restent piégées dans le piège et ne rentrent pas dans le canal.

2.5 Dérroulement d'une expérience

2.5.1 Introduction des cellules dans le microcanal

2.5.1.1 Dispositif au Laboratoire de Spectrométrie Physique

Le dispositif expérimental au LSP comportant un piège à bulles avant le canal, il n'est pas possible d'injecter les cellules en les poussant grâce à une seringue, elles resteraient en partie dans le piège. Le pousse-seringue pouvant fonctionner dans les deux sens (injection et aspiration), les T24 sont donc introduites dans le microcanal par aspiration : le tuyau de sortie est plongé dans un tube eppendorf contenant environ 1 mL de solution concentrée de cellules ($1 - 5 \cdot 10^6$ cellules/mL) puis l'aspiration est commandée par le pousse seringue. Le débit d'aspiration est lent pour que les contraintes de cisaillement subies par les cellules pendant cette phase de l'expérience restent faibles : typiquement 10 mL/h, ce qui correspond à une contrainte de cisaillement dans le tuyau (rayon intérieur $r = 0.4$ mm) : $\sigma = (4\eta Q)/(\pi r^3) = 0.055$ Pa (avec $\eta \sim 10^{-3}$ Pa.s $\pm 30\%$ à 37 °C).

2.5.1.2 Dispositif à l'Institut Albert Bonniot

Dans le dispositif expérimental de l'IAB, les cellules sont introduites avec une seringue branchée sur un T avant l'entrée dans le canal : une branche du T est reliée au pousse-seringue, une autre au canal, et la troisième à la seringue contenant les cellules. Lors de l'introduction des cellules, la branche du T reliée au pousse-seringue est fermée de façon à empêcher le retour en arrière des cellules. Une fois les cellules introduites dans le canal, la branche reliée à la seringue est bloquée, celle reliée au pousse-seringue est réouverte. Le microscope étant inversé, nous n'avons pas eu besoin d'introduire un piège à bulles dans le dispositif microfluidique.

2.5.2 Sédimentation et début d'étalement au fond du microcanal

Une fois introduites dans le microcanal, les cellules sont laissées au repos pendant 15 minutes pour permettre la sédimentation et l'adhésion au fond du canal. Lorsque les cellules sont adhérentes, un ou plusieurs champs sont choisis pour l'acquisition (un sur le

dispositif du LSP, 4 à l'IAB) d'après les critères suivants :

- Le champ n'est pas situé près des bords verticaux du canal, car la contrainte de cisaillement n'est pas constante dans une région proche des parois verticales, et pour prévenir tout effet de bord.
- La ou les cellule(s) présentes dans ce champ sont isolées (pas d'aggrégats).
- Dans le cas des expériences en fluorescence, la fluorescence de la ou des cellule(s) du champ doit être la plus intense possible.

Dans certains cas, nous avons observé des cellules qui gardaient une forme sphérique après sédimentation et formaient des « blebs », des petits gonflements de la membrane. Notre but étant l'étude de l'étalement des cellules sous flux, nous n'avons pas pris en compte ces cellules présentant du blebbing. L'annexe C présente nos observations de ce phénomène.

2.5.3 Paliers de flux

2.5.3.1 Déroulement des paliers de flux au Laboratoire de Spectrométrie Physique

Lorsque les régions à enregistrer sont choisies, l'acquisition commence en même temps que les paliers de flux : les expériences de cisaillement consistent à imposer un flux croissant par paliers sur les cellules. Le flux imposé par le pousse seringue est augmenté toutes les 5 minutes, engendrant progressivement des contraintes de cisaillement de plus en plus élevées sur les cellules adhérentes. Au début de l'expérience, la contrainte de cisaillement à la paroi (ou Wall Shear Stress, noté WSS) augmente à raison de deux paliers par décade ($0.1 Pa$, $0.3 Pa$, $1 Pa$, $3 Pa$), les paliers suivants sont ensuite plus rapprochés ($5 Pa$, $7 Pa$, $9 Pa$).

Les valeurs des débits correspondants à ces valeurs de contraintes ($0.1 Pa$, $0.3 Pa$, $1 Pa$, $3 Pa$, $5 Pa$, $7 Pa$, $9 Pa$) sont déterminées en fonction de la hauteur du canal : en effet, nous avons vu dans la partie 1.4.4 que la contrainte de cisaillement à la paroi du canal dépend du débit et des dimensions du canal. Pour le calcul des débits, nous avons utilisé la formule simplifiée correspondant au cas d'un canal fin de section $w \times h$ avec $w \gg h$ (equation 1.31) : $Q = \frac{\sigma w h^2}{6\eta}$, où η est la viscosité dynamique du fluide, σ la contrainte

de cisaillement, w la largeur du canal et h sa hauteur. Cette formule est applicable ici car $w = 1\text{ mm}$ et $h < 250\text{ }\mu\text{m}$. Les expériences sont réalisées avec des canaux de hauteurs différentes comprises entre $50\text{ }\mu\text{m}$ et $300\text{ }\mu\text{m}$. Les débits à imposer sont calculés à partir d'une valeur approximative de la hauteur du canal (hauteur du moule en résine). La hauteur du canal est ensuite mesurée précisément une fois l'expérience terminée et le canal sec. Pour cela, nous faisons la mise au point sur la paroi inférieure du microcanal, puis sur la paroi supérieure, et mesurons l'écart entre ces deux positions. Connaissant les débits imposés pendant les paliers de flux, les contraintes exactes peuvent alors être recalculées. Le flux reste laminaire à tous les paliers, le nombre de Reynolds n'excédant pas 130 ($Re = (\rho V D_h)/\eta$ où $D_h = (wh)/(2w + 2h)$ est le diamètre hydraulique, V la vitesse moyenne du fluide, ρ sa masse volumique et η sa viscosité dynamique). Les images en contraste de phase sont acquises à intervalles de temps réguliers (1 image toutes les 15 secondes).

2.5.3.2 Déroulement des paliers de flux à l'Institut Albert Bonniot

Nous avons reproduit des expériences identiques à l'IAB. Le microscope étant plus performant et automatisé, les expériences sont simplifiées et de meilleure qualité. A l'IAB, toutes les expériences de fluorescence sont réalisées avec des canaux de même hauteur. Celle-ci a été mesurée avec précision au microscope confocal : $h = 231\text{ }\mu\text{m}$. Cette valeur est utilisée pour calculer directement les débits des paliers de flux. Nous avons réalisé une première série d'expériences, avec des cellules T24 α -actinine 4-GFP, en suivant la même succession de paliers qu'au LSP (paliers de 5 minutes) correspondant à des contraintes de 0.1 Pa , 0.3 Pa , 1 Pa , 3 Pa , 5 Pa , 7 Pa . Les images sont acquises toutes les 100 secondes pour permettre le déplacement de la platine d'un champ à l'autre entre deux acquisitions (l'acquisition est décrite dans la partie 2.3.2).

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons utilisé des cellules T24 actine GFP. Nous avons également imposé des paliers de flux d'une durée de 5 minutes. Cependant, nous avons commencé le cisaillement au palier de contrainte 1 Pa , suivi des paliers 3, 5, et 7 Pa . Le protocole de marquage par immunofluorescence indirecte utilisé pour localiser la paxilline a nécessité de réaliser 4 fois l'expérience en l'arrêtant à différents stades de l'augmentation de la contrainte de cisaillement :

- après le premier palier (contrainte de cisaillement 1 Pa)

- après le deuxième palier (contrainte de cisaillement $3 Pa$)
- après le troisième palier (contrainte de cisaillement $5 Pa$)
- après le quatrième palier (contrainte de cisaillement $7 Pa$)

Dans chaque cas, les cellules sont fixées et leurs membranes perméabilisées immédiatement après l'arrêt du cisaillement. Pendant l'application de l'écoulement, les images sont acquises toutes les 100 secondes (comme dans la première série d'expériences). Après la fixation des cellules, la perméabilisation de leurs membranes et la coloration de la paxilline, une autre acquisition est réalisée, en contraste de phase, FITC (filtre vert pour la GFP) et TRITC (filtre rouge pour la rhodamine).

2.6 *Expérience témoin (en conditions statiques)*

Afin de pouvoir comprendre le comportement de cellules T24 soumises à un flux, il est nécessaire d'avoir une référence en conditions statiques. Pour cette raison, une expérience témoin a été réalisée en conditions statiques. Des cellules T24 ont été mises en culture sur une lamelle de verre recouverte d'une fine couche de PDMS ($< 0.5 mm$) traitée à la fibronectine ($20 \mu g/mL$) pendant une heure. Nous avons laissé ces cellules sédimenter et s'étaler en condition statiques, puis des images en contraste de phase ont ensuite été acquises toutes les 5 minutes pendant 24 heures. Le substrat et la fonctionnalisation étant les mêmes que dans les microcanaux, cette expérience en conditions statiques sert de témoin aux expériences sous flux.

3

INFLUENCE DE L'ÉCOULEMENT SUR L'AIRE D'ADHÉSION

Cette partie fait l'objet d'un article soumis dans « Annals of Biomedical Engineering » (voir annexe B) et une partie des résultats a été publiée dans « Journal of Mathematical Biology »(voir annexe A).

Comme nous l'avons vu précédemment, nous cherchons à quantifier l'effet d'une contrainte de cisaillement sur des cellules adhérentes en géométrie confinée. Pour cela, nous avons mis au point un dispositif microfluidique et réalisé les expériences présentées dans le chapitre 2. Nous présentons ici le traitement des données et analysons les résultats obtenus.

3.1 Traitement des données (images en contraste de phase)

Le traitement des images en contraste de phase a été réalisé en traçant le contour des cellules avec une palette graphique. A partir de ce contour, le logiciel ImageJ (NIH Image, Bethesda, USA) donne l'aire, le périmètre, la circularité et les paramètres de l'ellipse représentant le mieux la cellule (petit et grand axes, angle) de la cellule analysée. Afin de suivre de façon suffisamment précise le comportement des cellules soumises à un flux, nous avons mesuré ces paramètres toutes les minutes sur l'enregistrement effectué au cours des expériences en microcanaux.

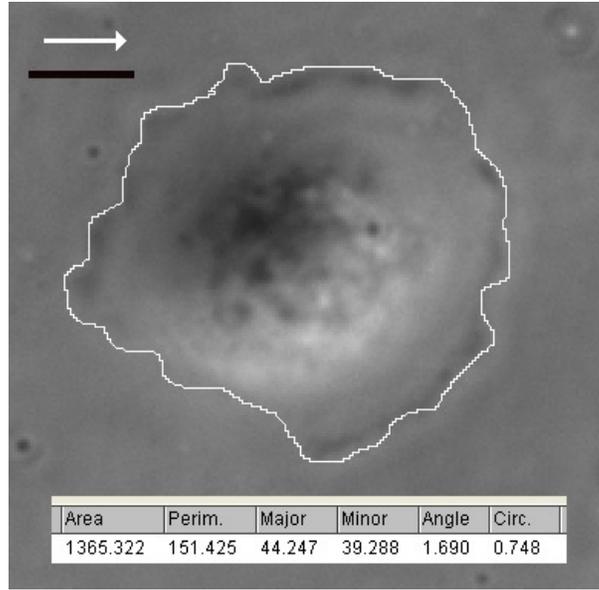


FIG. 3.1: Contour d'une cellule T24 dessiné avec une palette graphique, et détermination des paramètres (aire A , périmètre p , index de circularité défini par $\frac{4\pi A}{p^2}$, axes majeur et mineur de l'ellipse ainsi que son angle). Le noyau de la cellule est entouré du lamellipode. La direction du flux est indiquée par la flèche blanche. La barre noire représente $10 \mu m$. (dimensions du canal : $h = 82 \mu m$, $w = 1 mm$, contrainte de cisaillement à la paroi : $WSS = 0.26 Pa$).

3.2 *Expérience témoin (en conditions statiques)*

L'expérience en conditions statiques décrite dans le paragraphe 2.6 nous a permis de déterminer les échelles de taille et de temps caractéristiques de l'étalement des T24. En conditions statiques, les cellules sédimentent et s'étaient sur le substrat (Fig. 3.2).

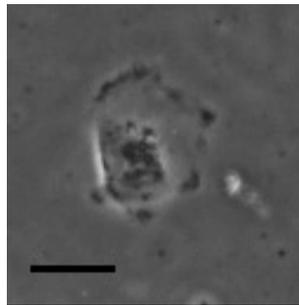


FIG. 3.2: Cellule T24 adhérente sur un substrat en PDMS en conditions statiques. La barre représente $20 \mu m$.

Le début de l'étalement n'est pas synchronisé : l'étalement ne se produit pas en même temps pour toutes les cellules. Dans la majorité des cas, l'étalement est rapide : typique-

ment, l'aire maximale est atteinte en moins de 45 minutes (Fig. 3.3). Suite à la phase d'étalement durant laquelle l'aire croît, la cellule explore son environnement en migrant aléatoirement sur le substrat. La cellule enclenche alors le processus de division cellulaire. Celui-ci commence par une rétraction des protrusions, qui se traduit par une décroissance de l'aire (Fig. 3.3). La cellule reprend l'aspect d'une sphère très réfringente, puis se sépare en deux cellules filles.

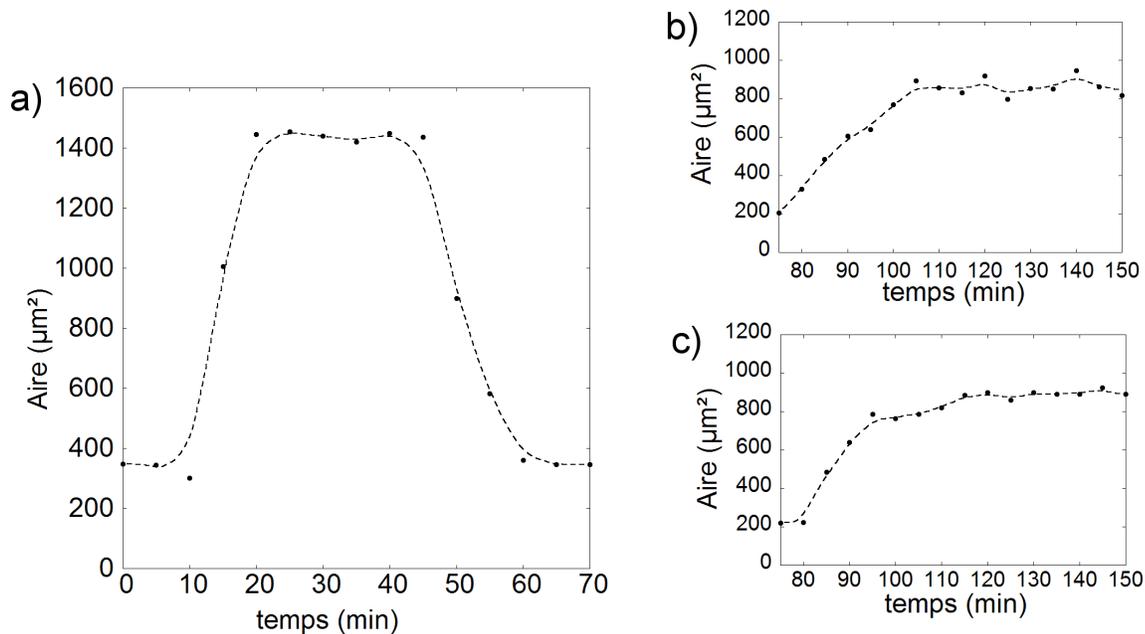


FIG. 3.3: Aire d'une cellule T24 en conditions statiques : l'étalement initial est rapide jusqu'à atteindre un plateau. L'aire décroît ensuite juste avant la division cellulaire. b) et c) Aires des deux cellules filles issues de la division de la cellule du graphique a). Les traits pointillés servent à guider l'œil du lecteur.

Nous avons pu observer un grand nombre de cellules au cours de cette expérience en conditions statiques. Cependant, nous avons choisi d'étudier uniquement des cellules filles. En effet, une cellule ne peut se diviser que lorsqu'elle est dans de bonnes conditions de culture, la division cellulaire donnant ensuite deux cellules filles saines. En procédant ainsi, nous avons éliminé de l'étude les cellules « malsaines » et pris en compte seulement des cellules saines. Pendant cette expérience en conditions statiques, 16 divisions cellulaires ont eu lieu. Parmi elles, seulement 11 ont pu être analysées, les autres n'étant pas bien focalisées et donc difficiles à mesurer. Pour chaque division, nous avons tracé le contour des cellules filles. Nous avons alors mesuré l'aire des deux cellules filles une heure après la

division. Ainsi, sur la figure 3.3 la division ayant lieu à $t = 60$ minutes, nous mesurons l'aire des cellules filles à l'instant $t = 120$ minutes. Nous avons alors fait une étude statistique de cette population de cellules filles saines, afin de fixer les critères de sélection pour le choix des cellules observées en microcanaux. La répartition d'aire de ces cellules (Fig. 3.4) montre que l'aire d'une cellule est comprise entre 800 et 1600 μm^2 , avec une probabilité maximale dans l'intervalle 900 – 1200 μm^2 . L'aire moyenne est $1118 \pm 248 \mu m^2$. Les résultats de cette expérience témoin nous permettent de fixer des critères pour les cellules observées : dans les expériences en conditions de flux, nous décidons de ne garder dans l'analyse que les cellules dont l'aire atteint la plage 800 – 1600 μm^2 après une heure, en excluant les cellules dont l'aire dépasse 2000 μm^2 . En effet, une surface trop importante est un signe d'absence ou retard de la division cellulaire, qui est un comportement anormal pour une cellule.

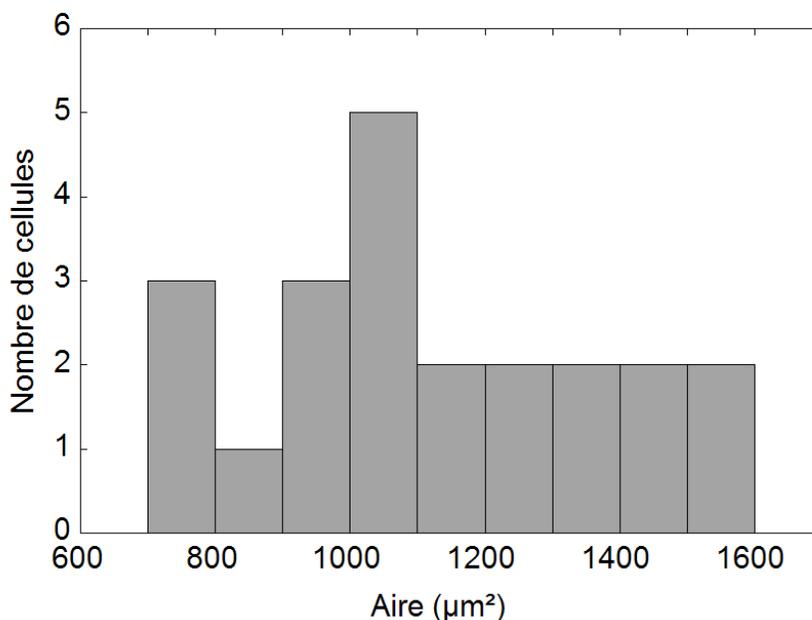


FIG. 3.4: Répartition de l'aire de 22 cellules filles (T24) une heure après la division cellulaire

3.3 Expériences sous écoulement

Nous avons suivi l'aire de cellules T24 adhérentes à la paroi d'un microcanal et soumises à un flux croissant par paliers : toutes les 5 minutes, le débit de l'écoulement est augmenté, générant des contraintes de cisaillement de plus en plus élevées à la paroi inférieure du

microcanal (protocole détaillé dans la partie 2.5.3). L'aire des cellules observées montre un comportement biphasique (Fig. 3.5) :

- A faible contrainte de cisaillement, l'aire augmente. La cellule adhère puis s'étale au fond du microcanal, en gardant une forme ronde, avec un noyau proéminent entouré d'un lamellipode.
- Lorsque la contrainte atteint des valeurs plus élevées, la cellule perd sa forme ronde, l'aire décroît jusqu'à un éventuel détachement de la cellule.

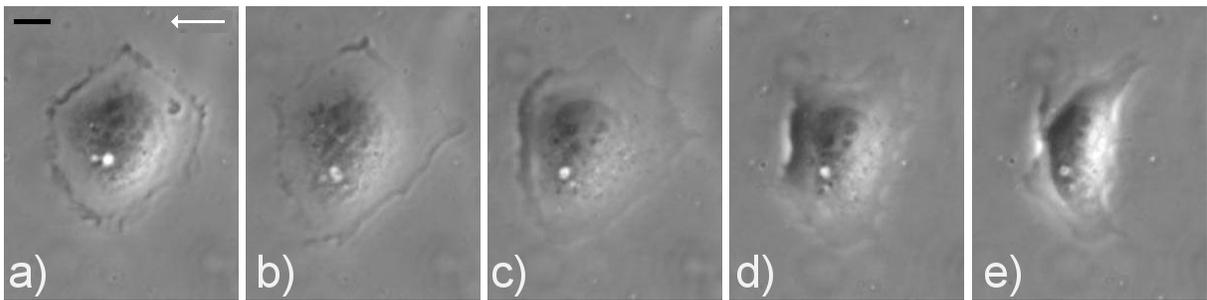


FIG. 3.5: Images en contraste de phase d'une cellule T24 adhérente à la paroi d'un microcanal ($w = 1\text{ mm}$, $h = 64\text{ }\mu\text{m}$) soumise à un flux de cisaillement croissant. La flèche blanche indique la direction du flux. La barre noire représente $10\text{ }\mu\text{m}$. Contraintes de cisaillement à la paroi : a) 0.64 Pa , b) 6.36 Pa , c) 19.1 Pa , d) 31.7 Pa , e) 50.8 Pa . D'après Verdier *et al.* (Verdier *et al.*, 2008)

3.3.1 Evolution de l'aire $A(t)$ sous cisaillement croissant

Afin de déterminer quantitativement l'effet de l'augmentation de la contrainte de cisaillement sur l'étalement d'une cellule T24 à la paroi d'un microcanal, nous avons représenté l'évolution de l'aire en fonction du temps et les paliers de contraintes correspondantes. Les courbes « aire en fonction du temps » confirment l'augmentation de surface à faible contrainte ($< 3\text{ Pa}$), le ralentissement de cette croissance lorsque la contrainte augmente, puis la diminution de surface lorsque la contrainte est élevée. Un exemple est donné sur la figure 3.6 pour 5 cellules soumises à un flux croissant dans un microcanal de section $w = 1\text{ mm}$, $h = 61\text{ }\mu\text{m}$. Pour chaque cellule, les données expérimentales (surface d'adhésion mesurée en fonction du temps) ont été ajustées par un polynôme, le degré de ce polynôme étant choisi de façon à optimiser l'accord entre les points expérimentaux et l'ajustement. Typiquement, le meilleur ajustement est obtenu avec un polynôme de degré compris entre 4 et 6.

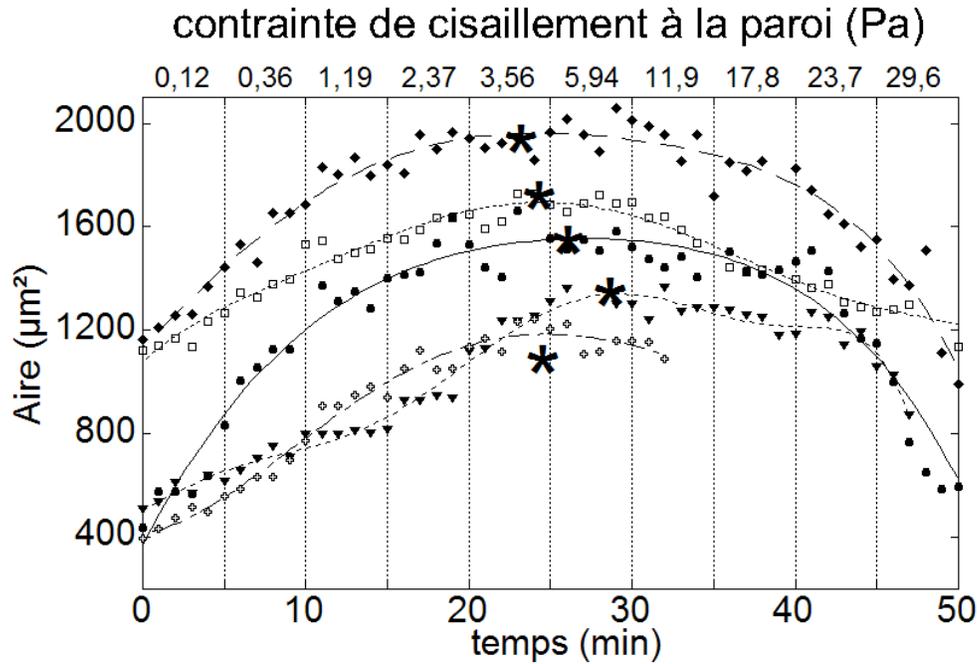


FIG. 3.6: Evolution de l'aire pour 5 cellules adhérentes soumises à un flux croissant dans un microcanal ($w = 1 \text{ mm}$, $h = 61 \mu\text{m}$). Les contraintes correspondantes sont données sur l'axe supérieur. Les symboles représentent les données expérimentales (mesurées sur les images en contraste de phase comme expliqué dans la partie 3.1), estimées à l'aide d'un polynôme (lignes). Pour chaque courbe, l'étoile indique l'aire maximum.

3.3.2 Evolution du taux de croissance de l'aire $\frac{dA(t)}{dt}$ en fonction du cisaillement

L'ajustement des points expérimentaux de l'aire d'adhésion en fonction du temps nous fournit l'équation d'une courbe estimant bien ces données. En dérivant cette équation (polynôme de degré 4 à 6), puis en calculant la valeur de cette dérivée à intervalles réguliers (à chaque minute de l'expérience), nous avons ainsi accès au taux de croissance de l'aire des cellules adhérentes. Cette analyse des données montre qu'au cours d'une expérience sous flux pendant laquelle la contrainte de cisaillement croît par paliers, le taux de croissance de l'aire des cellules adhérentes diminue avec le temps :

- Pendant la phase d'étalement, l'aire des cellules augmente, le taux de croissance est positif mais il décroît.
- L'aire maximale correspond à un taux de croissance nul : $\frac{dA(t)}{dt} = 0$.
- Lorsque la cellule diminue sa surface d'adhésion avec le substrat, le taux de croissance est négatif (en valeur absolue, il augmente).

Après cette étape du traitement, nous disposons donc de l'aire de la cellule à chaque minute, ainsi que du taux de croissance à cet instant. Dans la suite de l'analyse, nous supposons que, sur chaque palier de 5 minutes, durant lequel un cisaillement constant est appliqué, le taux de croissance varie peu. Par conséquent, nous calculons sa valeur pour chaque contrainte de cisaillement en faisant la moyenne sur la durée du palier correspondant (moyenne sur les 5 points du palier, distants de 1 minute). Connaissant le taux de croissance correspondant à chaque valeur de contrainte, nous pouvons alors représenter graphiquement ces résultats en traçant le taux de croissance en fonction de la contrainte de cisaillement (Fig. 3.7). Nous retrouvons sur ce graphe les deux phases d'étalement et de rétraction de la cellule :

- Sous un cisaillement faible, le taux de croissance est positif (phase d'étalement).
- L'aire maximale correspond à un taux de croissance nul : $\frac{dA(t)}{dt} = 0$.
- Sous fort cisaillement, la cellule diminue son aire et le taux de croissance est négatif.

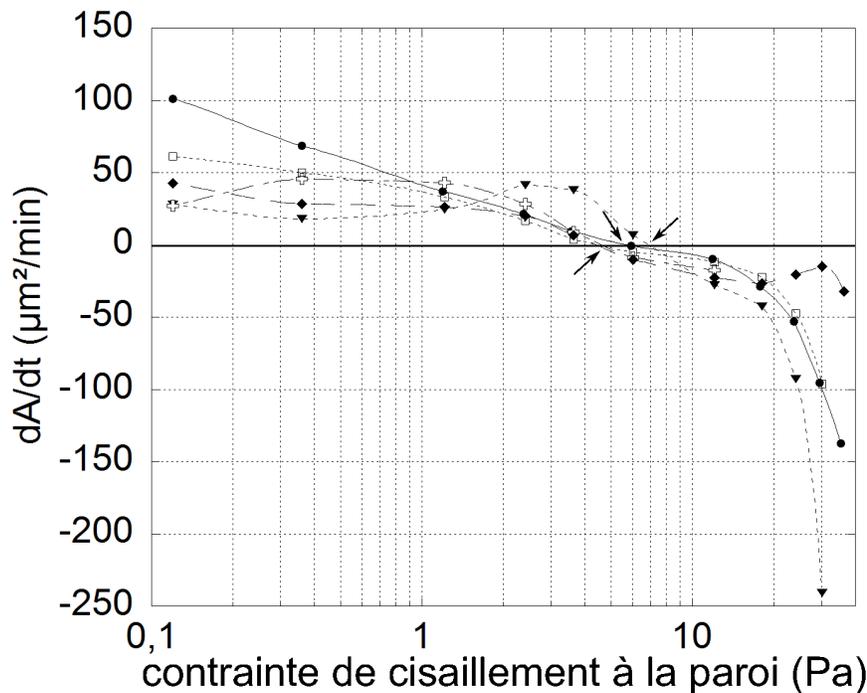


FIG. 3.7: Evolution du taux de croissance de l'aire pour 5 cellules adhérentes soumises à un flux croissant dans un microcanal ($w = 1 \text{ mm}$, $h = 61 \text{ }\mu\text{m}$) en fonction de la contrainte de cisaillement à la paroi. Les symboles représentent les points calculés à partir des données expérimentales (partie 3.3.2), les lignes sont une interpolation pour guider l'œil du lecteur, les flèches correspondent aux maxima d'aire ($\frac{dA(t)}{dt} = 0$).

3.3.3 Définition et détermination de la contrainte de cisaillement critique

Le taux de croissance de l'aire ($\frac{dA(t)}{dt}$) diminue lorsque la contrainte (ou Wall Shear Stress, WSS) augmente. Il coupe l'axe horizontal pour une valeur de contrainte appelée contrainte critique, notée WSS_c . Pour cette valeur de contrainte, $\frac{dA(t)}{dt} = 0$ et l'aire de la cellule est maximale. Sur chaque graphe « taux de croissance en fonction de la contrainte de cisaillement », la contrainte critique a été évaluée en repérant l'intersection avec l'axe horizontal (Fig. 3.7). Pour cela, nous avons fait un zoom de la région proche de l'axe horizontal puis évalué la contrainte critique à 0.1 Pa près. Typiquement, les valeurs de contrainte critique sont comprises entre 3 Pa et 6 Pa.

3.3.4 Influence du confinement

Afin de tester l'effet du confinement les expériences sous flux ont été réalisées dans trois microcanaux de hauteurs différentes dans l'intervalle 60 – 260 μm (mais de même largeur égale à 1 mm). Nous avons comparé les valeurs des contraintes critiques obtenues pour ces différentes hauteurs : la moyenne des contraintes critiques a été calculée pour chaque hauteur de canal, en prenant en compte au moins 5 cellules : 10 cellules ont été mesurées dans le canal de hauteur 68 μm , 5 cellules dans le canal de hauteur 155 μm et 6 cellules dans le canal de hauteur 264 μm (Fig. 3.8). Nous avons représenté ces valeurs sur un graphe représentant la contrainte de cisaillement critique en fonction de la hauteur du canal. Nous notons une augmentation de la contrainte critique avec la hauteur du canal (Fig. 3.8) : la limite de résistance de la cellule à l'écoulement est atteinte pour des contraintes de cisaillement à la paroi plus faibles dans des canaux plus petite hauteur. Une explication de ce phénomène est proposée ci-après.

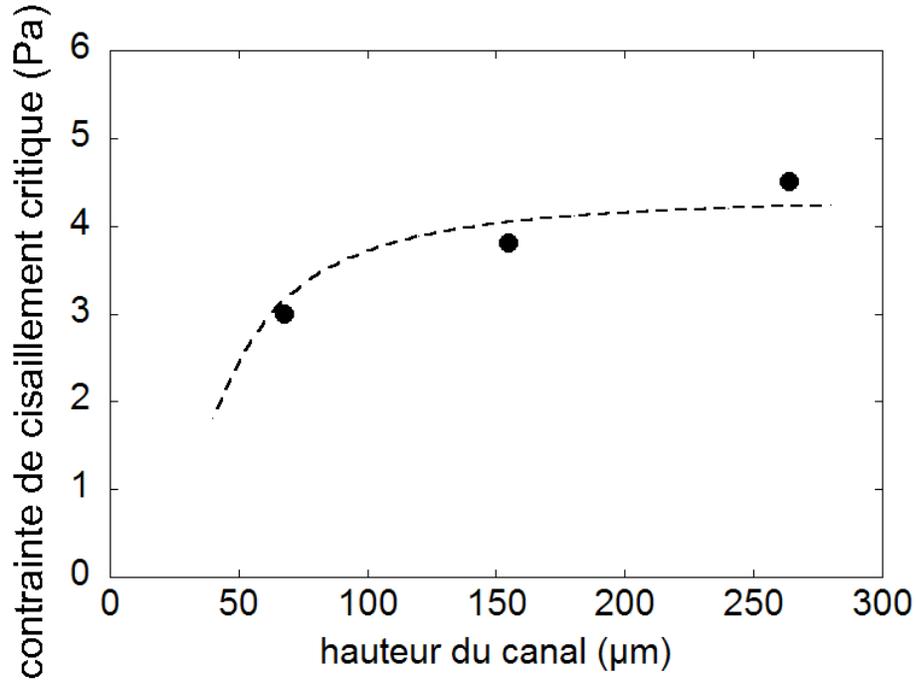


FIG. 3.8: Contrainte critique (WSS_c) en fonction de la hauteur du canal (largeur constante $w = 1\text{mm}$). Les points représentent les moyennes des contraintes critiques mesurées pour toutes les cellules testées (10, 5 et 6 cellules pour les canaux de hauteurs respectives 68, 155 et 264 μm). La ligne pointillée est un ajustement des résultats à partir du modèle présenté dans la discussion, basé sur l'hypothèse d'équilibre entre l'adhésion et les forces hydrodynamiques : $F_{flow} = F_{adh}$. Les résultats du calcul donnent : $Nf_{adh} = 18 \text{ nN}$.

3.4 Compétition entre liaisons adhésives et forces hydrodynamiques

3.4.1 Présentation du modèle

Dans des géométries confinées, l'écoulement est contraint par les parois qui imposent des conditions aux limites particulières. Lorsque le canal est obstrué partiellement, la résistance de la cellule au flux augmente. Par conséquent, la contrainte de cisaillement réellement sentie par les cellules adhérentes dans des microcanaux est plus élevée que la contrainte de cisaillement appliquée au fond d'un canal sans obstacle. Des modèles théoriques en deux dimensions (voir la partie 1.4.5) ont évalué à un facteur 3 l'augmentation de la contrainte sur un objet adhérent par rapport à la contrainte à la paroi d'un canal vide (Gaver et Kute, 1998). Ces mêmes travaux, généralisés en trois dimensions, proposent des expressions de la force hydrodynamique \vec{F}_{flow} et du couple hydrodynamique \vec{T}_{flow} (calculé par rapport

au centre de la surface de contact cellule-substrat) causés par le fluide sur un obstacle semi-circulaire fixé à la paroi d'un microcanal :

$$\overrightarrow{F}_{flow} = 24\eta\gamma^2 \frac{Q}{w} \frac{3.19 + 0.65\gamma + 4.34\gamma^2}{(1 - \gamma^2)^{5/2}} \overrightarrow{e}_z \quad (3.1)$$

$$\overrightarrow{T}_{flow} = 12\pi\eta\gamma^2 \frac{RQ}{w} \frac{1.15 + 0.7\gamma}{(1 - \gamma^2)^{5/2}} \overrightarrow{e}_x \quad (3.2)$$

où η est la viscosité du fluide, R le rayon de la cellule, Q le débit, et $\gamma = \frac{R}{h}$ le degré de confinement (h étant la hauteur du canal).

Dans les expériences que nous avons réalisées en microcanaux, les cellules peuvent être assimilées à des demi-sphères, et nous pouvons appliquer ces résultats. La force hydrodynamique subie par une cellule adhérente à la paroi d'un microcanal est donc donnée par l'équation (3.1). Nos observations ne nous permettent pas d'établir précisément le processus du décollement de la cellule : sur les images en contraste de phase, il est difficile de déterminer s'il y a roulement ou non, et si oui autour de quel axe. Nous ne sommes donc pas certains d'être dans les conditions du modèle proposé par Gaver et Kute. De ce fait, nous ne pouvons pas exploiter la formule donnant le couple hydrodynamique.

Pour comprendre le comportement de cellules adhérentes à une paroi et soumises à un flux, il est important de faire le lien entre la contrainte de cisaillement causée par le flux et la résistance de la cellule, c'est à dire sa capacité à former des liaisons avec le substrat pour contrer la force hydrodynamique :

- Nos observations montrent que sous faible flux, les cellules s'étalent. Dans cette phase d'adhésion, le nombre de liaisons adhésives avec le substrat augmente.
- Au contraire, l'aire des cellules diminue à fort cisaillement (proportionnel au flux). Cela signifie que le nombre de liaisons adhésives détruites est supérieur au nombre de liaisons formées, entraînant une diminution de la force adhésive totale.
- A la valeur critique de la contrainte de cisaillement déterminée expérimentalement, l'aire est maximale, il y a donc équilibre entre les forces hydrodynamiques et les forces adhésives dans la direction du flux (dans la direction normale au substrat, les forces adhésives étant équilibrées par les forces exercées par les liaisons cellule-substrat). Le

nombre de liaisons adhésives est stable, les formations et les destructions de liaisons s'équilibrent.

En vue de déterminer la force adhésive de la cellule qui contrebalance la force hydrodynamique, nous modélisons la cellule par une demi-sphère de rayon R . N sites d'adhésion sont répartis sur toute la surface de contact cellule-substrat S , supposée circulaire de rayon R_t ($R_t > R$ en raison de la présence d'un lamellipode fin entourant la partie bombée contenant le noyau et le cytoplasme). La valeur moyenne de R_t a été estimée grâce aux mesures expérimentales des aires maximales des cellules adhérentes : $R_t \sim 26 \pm 2 \mu m$. Une force \vec{f}_{ad} (qui se décompose en une composante verticale $f_{ad_y} \vec{e}_y$ et une composante horizontale $f_{ad_z} \vec{e}_z$) est appliquée sur chaque site d'adhésion focale (Fig. 3.9). La force adhésive totale \vec{F}_{ad} est la somme des forces individuelles \vec{f}_{ad} : $\vec{F}_{ad} = \sum \vec{f}_{ad}$, ses composantes pouvant être déterminées en sommant les composantes des forces individuelles supposées identiques :

$$\begin{cases} F_{ad_z} = \sum f_{ad_z} = N f_{ad_z} \\ F_{ad_y} = \sum f_{ad_y} = N f_{ad_y} \end{cases} \quad (3.3)$$

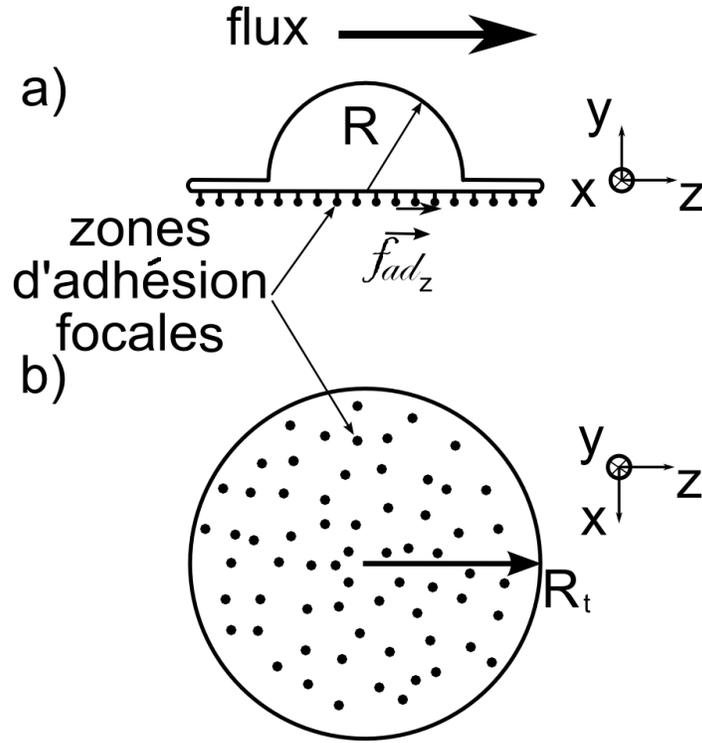


FIG. 3.9: Modélisation d'une cellule adhérente à une paroi et soumise à un flux (flux de gauche à droite). a) Vue de côté : la cellule est représentée par une demi-sphère (rayon R) entourée d'un lamellipode (rayon R_t). Une force adhésive \vec{f}_{ad_z} (composante z) est appliquée en chacun des N sites focaux d'adhésion. b) Vue de dessous : les points représentent les zones d'adhésion focales distribuées aléatoirement, où chacune des forces individuelles \vec{f}_{ad_z} est exercée.

A l'équilibre, les forces adhésives contrebalancent les effets hydrodynamiques, la surface de contact cellule-substrat n'augmente plus mais la cellule reste adhérente au substrat. Par conséquent, la force hydrodynamique \vec{F}_{flow} , qui est sur l'axe z ($\vec{F}_{flow} = F_{flow}\vec{e}_z$), s'oppose exactement à la composante horizontale de la force adhésive F_{ad_z} :

$$F_{flow} = F_{ad_z} \quad (3.4)$$

L'estimation de la force hydrodynamique, où la cellule est représentée par une demi-sphère de rayon R donne :

$$F_{flow} = 24\eta\gamma^2 \frac{Q}{w} \frac{3.19 + 0.65\frac{R}{h} + 4.34\left(\frac{R}{h}\right)^2}{\left(1 - \left(\frac{R}{h}\right)^2\right)^{5/2}} \quad (3.5)$$

D'après les équations 3.4 et 3.5, nous obtenons :

$$24\eta \left(\frac{R}{h}\right)^2 \frac{Q}{w} \frac{3.19 + 0.65\frac{R}{h} + 4.34\left(\frac{R}{h}\right)^2}{\left(1 - \left(\frac{R}{h}\right)^2\right)^{5/2}} = Nf_{ad_z} \quad (3.6)$$

La contrainte de cisaillement (WSS) peut être introduite dans l'équation (3.6) en utilisant l'expression trouvée au 1.4.4 : $WSS = 6\eta Q/wh^2$. Ainsi, la valeur critique de la contrainte de cisaillement, i. e. à l'équilibre, devient :

$$WSS_c = Nf_{ad_z} \frac{1}{4R^2} \frac{\left(1 - \left(\frac{R}{h}\right)^2\right)^{5/2}}{3.19 + 0.65\frac{R}{h} + 4.34\left(\frac{R}{h}\right)^2} \quad (3.7)$$

Les valeurs de contrainte critique ont été calculées et représentées graphiquement grâce à cette formule pour trois valeurs du paramètre d'adhésion : $Nf_{ad_z} = 10 nN$, $30 nN$ et $50 nN$ avec $R = 18 \mu m$, ce qui est une valeur pertinente pour la hauteur d'une cellule (Fig. 3.10).

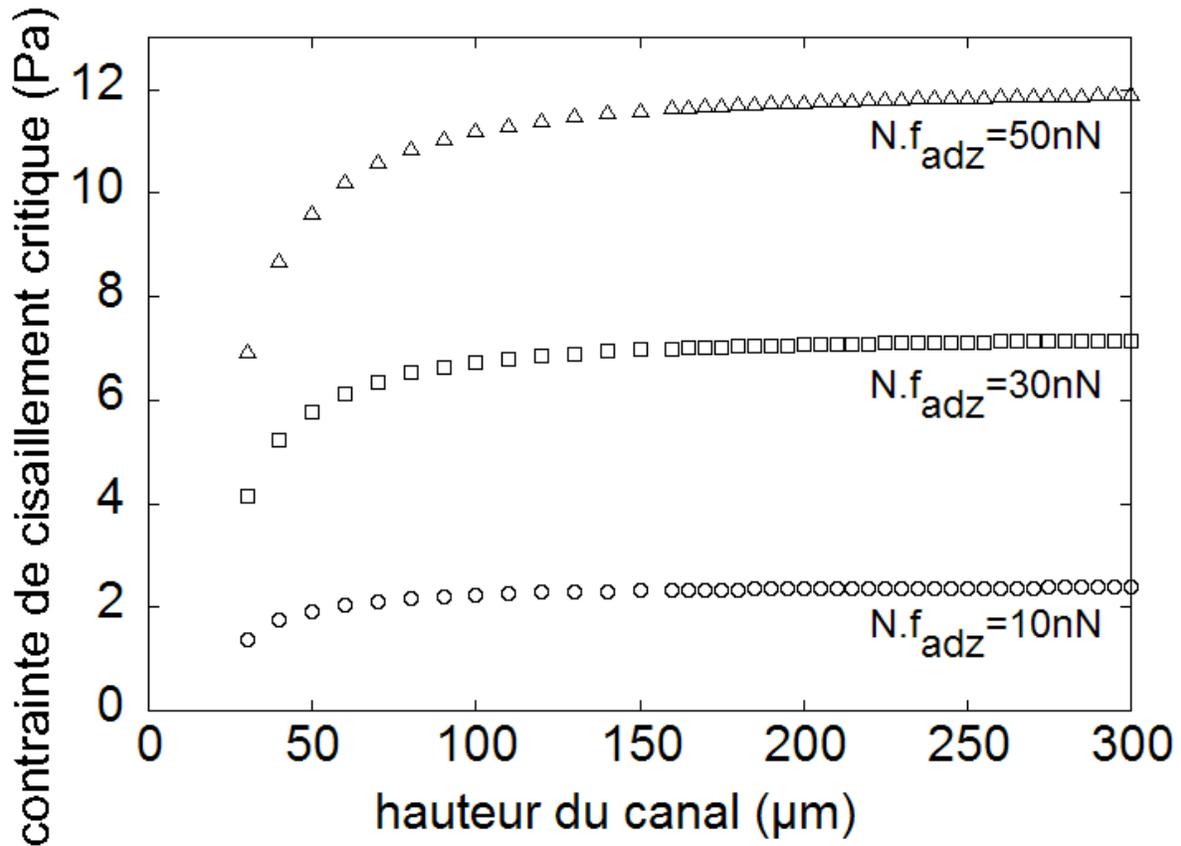


FIG. 3.10: Contraintes de cisaillement critiques (WSS_c) calculées à partir de l'équation (3.7) pour différentes valeurs du paramètre d'adhésion Nf_{adz} : cercles : $Nf_{adz} = 10 \text{ nN}$, carrés : $Nf_{adz} = 30 \text{ nN}$, triangles : $Nf_{adz} = 50 \text{ nN}$. Dans les trois cas, $R = 18 \mu\text{m}$.

Nous notons une augmentation de la contrainte critique avec la hauteur du canal (Fig. 3.10) :

- Dans des canaux de hauteur grande devant la taille d'une cellule ($h > 100 \mu\text{m}$), la contrainte de cisaillement critique augmente faiblement avec la hauteur jusqu'à un plateau lorsque la hauteur du canal est grande. L'expression (3.7) tendant vers une valeur limite lorsque h tend vers $+\infty$: $\lim_{h \rightarrow +\infty} WSS_c = \frac{Nf_{adz}}{12.76R^2}$. Ceci peut se justifier par le fait que plus le canal est haut, moins la cellule adhérente obstrue celui-ci. Dans un canal de grande hauteur, la cellule perturbe peu l'écoulement. Par conséquent, elle ressent une contrainte de cisaillement proche de celle existant à la paroi d'un canal vide.
- Pour de faibles hauteurs des canaux ($h < 100 \mu\text{m}$), la contrainte critique décroît plus rapidement lorsque la hauteur diminue. Ceci signifie que la limite de résistance de la cellule à l'écoulement est atteinte pour des contraintes de cisaillement à la

paroi plus faibles comme observé expérimentalement. Nous pouvons expliquer ces observations par le fait que dans de tels canaux, la cellule adhérente à la paroi obstrue une plus grande partie de la section du canal. L'écoulement est perturbé par la présence de la cellule, qui subit alors des contraintes de cisaillement très supérieures à la contrainte de cisaillement à la paroi d'un canal vide, Gaver et Kute ayant estimé cette augmentation à un facteur 3 dans le cas d'un confinement faible ($\frac{R}{h} < 0.4$). Ce phénomène s'amplifie avec le confinement : plus la cellule est confinée dans le canal, plus les contraintes qui lui sont appliquées sont fortes par rapport à la contrainte au fond d'un canal vide. Ceci explique pourquoi la contrainte de cisaillement critique est plus faible dans les canaux les moins hauts, pour lequel le confinement est supérieur.

3.4.2 Confrontation avec les résultats expérimentaux

Les résultats du modèle sont en accord avec les données expérimentales : pour les trois tailles de canaux utilisés dans les expériences, la contrainte critique WSS_c augmente avec la hauteur du canal. Un ajustement des points expérimentaux basé sur les résultats du modèle avec pour paramètre d'ajustement Nf_{ad_z} a été réalisé (Fig. 3.8). En prenant $R = 18\mu m$, ce qui est une bonne approximation de la hauteur d'une cellule, l'ajustement est bon. Il donne pour la composante horizontale de la force d'adhésion : $F_{ad_z} = Nf_{ad_z} = 18 nN$.

Bien que les propriétés adhésives soient influencées par le substrat, cette estimation de la force d'adhésion dans le plan de contact cellule-substrat $F_{ad_z} = 18 nN$ peut être comparée avec des résultats obtenus par d'autres méthodes. Différentes techniques ont été mises au point pour déterminer les forces de traction exercées par la cellule en migration sur un substrat donné. On peut alors estimer que la force nécessaire à une cellule pour se déplacer sur un substrat rigide est la même que celle lui permettant de résister à un écoulement contrôlé et de rester à l'équilibre. Ces différentes techniques ont donné les résultats suivants :

- Le déplacement de billes fluorescentes insérées dans un gel de polyacrylamide sur lequel adhèrent les cellules permet de déterminer le champ de traction, i.e. la force locale par unité de surface (ou par site d'adhésion), imposé par la cellule. Cette méthode a été utilisée pour étudier l'adhésion de cellules T24, HASM, et des fibroblastes 3T3 étalés sur des gels de polyacrylamide de module élastique environ égal à $2kPa$. Pour ces trois types cellulaires, les forces de traction maximales ont été

estimées respectivement à 0.05 kPa (Ambrosi *et al.*, 2008), 0.4 kPa (Butler *et al.*, 2002) et 2 kPa (Munevar *et al.*, 2001). D'autre part, des observations en fluorescence montrent que la taille des zones d'adhésion focales est généralement dans l'intervalle $[1 - 5 \mu\text{m}^2]$ (Paul *et al.*, 2008; Bershadsky *et al.*, 2003; Balaban *et al.*, 2001). Ces données permettent d'estimer la valeur des forces de traction : au niveau de chaque site d'adhésion focale, la cellule exerce une force comprise entre 0.05 nN et 10 nN .

- La flexion de microplots flexibles sur lesquels des cellules sont adhérentes (« tapis de fakir ») permet également de remonter aux forces de traction exercées par la cellule au niveau des zones d'adhésion localisées sur les sommets des plots. Des fibroblastes et des cellules musculaires lisses (SMC) étalés sur de tels tapis de microplots développent des forces de traction comprises entre 1 et 10 nN (Li *et al.*, 2007; Balaban *et al.*, 2001), la contrainte de traction étant comprise dans l'intervalle $0.3 - 5 \text{ kPa}$. Pour des cellules épithéliales isolées migrant sur ce même type de substrat, les forces maximales atteintes sont de 3 nN (du Roure *et al.*, 2005), pour des contraintes proches de 3 kPa . Bien que ces résultats concernent des cellules en migration, il est intéressant de comparer ces valeurs à celle obtenue dans les expériences que nous avons réalisées sous flux dans les microcanaux car il est important d'avoir une estimation des forces de traction qu'une cellule peut exercer sur un substrat.

Pour comparer ces résultats aux nôtres, nous devons déterminer la contrainte adhésive générant la force de 18 nN dans le cas des cellules T24 soumises à un écoulement dans un microcanal. Pour cela, nous considérerons que la contrainte adhésive, notée σ_{ad} , est la même au niveau de toutes les zones d'adhésion. La force adhésive totale F_{ad_z} est alors proportionnelle à cette contrainte adhésive moyenne. En effet, F_{ad_z} est la somme de toutes les forces adhésives individuelles f_{ad_z} dont l'intensité dépend de la taille de la zone focale A_{zf} et de la contrainte d'adhésion σ_{ad} : $f_{ad_z} = \sigma_{ad} \times A_{zf}$. Par conséquent, $F_{ad_z} = \sigma_{ad} \times \sum A_{zf}$. Une estimation du nombre de zones focales et de leur taille est donc nécessaire afin de déterminer la contrainte adhésive moyenne au niveau des sites d'adhésion. Pour cela, nous avons tout d'abord réalisé quelques expériences préliminaires : à la suite des paliers de flux, nous avons fixé les cellules au voisinage du maximum d'aire, perméabilisé leurs membranes puis marqué la paxilline, une protéine présente au niveau des zones focales, avec un marqueur fluorescent : la rhodamine. Nous avons ainsi pu observer en fluorescence les zones d'adhésion (Fig. 3.11).

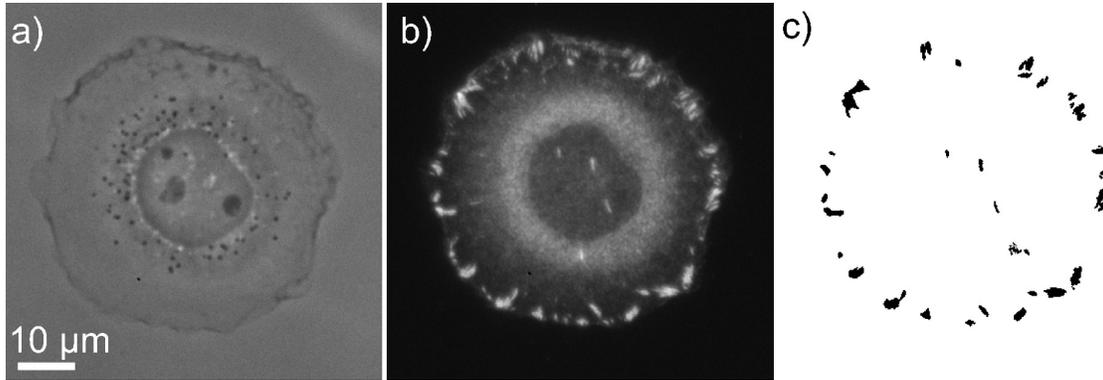


FIG. 3.11: Images d'une cellule adhérente après application d'un flux de cisaillement croissant jusqu'à la contrainte critique, lorsque l'aire de la cellule est maximale. a) Image en contraste de phase. b) Image en fluorescence de la paxilline marquée à la rhodamine. c) Zones d'adhésion focales obtenues après seuillage de l'image en fluorescence (b). 31 zones focales sont dénombrées, correspondant à une aire totale d'adhésion de $78 \mu\text{m}^2$. L'aire totale de la cellule est $2140 \mu\text{m}^2$.

Ces premières expériences nous ont permis d'évaluer approximativement le nombre de zones focales et leur taille afin de calculer la contrainte adhésive. Pour l'exemple présenté sur la figure 3.11, nous dénombrons 31 zones focales, occupant une surface totale de $78 \mu\text{m}^2$. Ces résultats préliminaires sont en accord avec des observations faites sur d'autres types cellulaires : environ 30 sites d'adhésion pour des leucocytes adhérents à l'endothélium *in vivo* (House et Lipowsky, 1998), et une cinquantaine pour des fibroblastes de rat adhérents sur du verre (Paul *et al.*, 2008). En se basant sur ces valeurs, nous obtenons une force par zone focale égale à $f_{ad_z} = 0.58 \text{ nN}$, et une contrainte adhésive moyenne de $\sigma_{ad} = 230 \text{ Pa}$ au niveau de chaque site. Cette valeur de contrainte est comparable à celle de 200 Pa obtenue par Ambrosi *et al.* pour des cellules T24 adhérentes sur un substrat en polyacrylamide de module d'Young 10 kPa (Ambrosi *et al.*, 2008). Bien que le PDMS constitutif des microcanaux soit plus rigide, avec un module d'Young de l'ordre de 600 kPa , cette valeur nous semble être une estimation réaliste de la contrainte adhésive au niveau des zones d'adhésion focales. Afin d'obtenir une valeur plus précise du nombre et de l'aire des zones focales ainsi que leur localisation sous l'effet d'un flux croissant, une seconde série d'expériences a été effectuée. Le protocole de ces expériences est détaillé dans la partie 2.5.3, et les résultats font l'objet du chapitre 4.

3.5 Synthèse des résultats

Les expériences décrites dans ce chapitre nous ont permis d'étudier, en géométrie confinée, le comportement de cellules T24 adhérentes et soumises à des contraintes de cisaillement croissantes par paliers. Nous avons observé une phase d'étalement à faible contrainte de cisaillement, un comportement qui est similaire à celui en conditions statiques. Lorsque la contrainte de cisaillement croît, le taux de croissance de l'aire $\frac{dA}{dt}$ diminue, jusqu'à devenir nul pour la valeur de contrainte de cisaillement critique WSS_c . En comparant la valeur de contrainte critique obtenue pour les différentes hauteurs de microcanaux, il ressort que celle-ci croît avec la taille des canaux : dans des canaux de hauteurs 68, 155 et 264 μm (nos expériences ne concernent que le confinement dans une direction : la hauteur), la contrainte de cisaillement critique vaut respectivement 3 Pa, 3.8 Pa et 4.5 Pa. Ces résultats expérimentaux sont en accord avec les précédents travaux théoriques qui démontrent que la contrainte effectivement ressentie par une cellule adhérente augmente avec le confinement (Gaver et Kute, 1998). Ceci est dû au fait que plus un canal est étroit, plus une cellule adhérente à sa paroi en obstrue la section et limite le passage de l'écoulement. Par conséquent, une contrainte de cisaillement à la paroi d'égale intensité dans deux canaux de hauteurs différentes génère une contrainte plus importante sur une cellule adhérente à la paroi du canal dans le cas le plus confiné. Ceci explique donc pourquoi la cellule cesse de s'étaler pour des valeurs de contraintes de cisaillement de plus en plus faibles lorsque la hauteur des canaux diminue : le cisaillement que la cellule subit réellement a atteint la valeur maximale à laquelle la cellule peut résister avant d'amorcer le décollement.

Pour la valeur de cisaillement critique (WSS_c), l'aire de la cellule est maximale : la cellule a cessé de s'étaler mais ne se rétracte pas encore. Pour décrire cet état d'équilibre, nous avons élaboré un modèle dans lequel les forces adhésives contrebalancent la force hydrodynamique générée par l'écoulement sur la cellule. L'expression de la force hydrodynamique est issue du calcul de Gaver et Kute (Gaver et Kute, 1998), et la force adhésive totale est simplement une somme de toutes les forces adhésives présentes au niveau des zones focales d'adhésion. L'ajustement de nos résultats expérimentaux basé sur ce modèle, nous a permis de déterminer la force adhésive totale exercée par la cellule sur son substrat. Comme le confirment nos observations en fluorescence, cette force adhésive n'est pas exercée de façon homogène sur toute la surface de la cellule, mais de façon locale au niveau des zones focales. Nous avons donc réalisé une estimation de l'aire cumulée des zones

focales afin d'obtenir une valeur de contrainte adhésive au niveau des sites d'adhésion. Une première série d'expériences d'observation des zones d'adhésion focales conduit à une contrainte adhésive par zone focale de $230 Pa$, ce qui est en accord avec d'autres travaux de la littérature pour ce type cellulaire (Ambrosi *et al.*, 2008).

Afin de mieux comprendre les mécanismes de l'adhésion, nous avons réalisé une seconde série d'expériences consistant à observer les zones focales et leur évolution lorsque la contrainte de cisaillement croît. Celle-ci fait l'objet du chapitre 4.

EVOLUTION DU CYTOSQUELETTE ET DES ZONES FOCALES SOUS FLUX

La première série d'observations, en contraste de phase, nous a permis de déterminer l'effet d'un écoulement sur l'adhésion d'une cellule, ainsi que les conséquences du confinement. Nous avons vu que lorsque les contraintes de cisaillement augmentent, la cellule répond en diminuant son aire de contact avec le substrat. Afin de comprendre cette réaction de la cellule, et surtout les mécanismes sous-jacents, nous avons mis au point une série d'expériences de fluorescence. Le but est ici de visualiser le remodelage du cytosquelette et des zones focales. Pour cela, nous avons observé la quantité et la localisation de certaines protéines impliquées, ce qui nous a permis de mettre en évidence la réponse biologique face à un stimulus mécanique.

Cette partie fera prochainement l'objet d'un article, actuellement en cours de rédaction.

4.1 *Traitement des données (images en fluorescence)*

Nous avons effectué plusieurs expériences en fluorescence à l'IAB, détaillées dans la partie 2.5.3. Nous avons ensuite procédé au dépouillement des données recueillies : de façon qualitative pour les images de l' α -actinine 4-GFP, dont la qualité ne permettait pas une quantification, et de façon plus quantitative pour l'actine et la paxilline pour lesquelles nous avons effectué un traitement des images avec le logiciel ImageJ (NIH Image, Bethesda, USA).

La paxilline est une protéine présente au niveau des zones focales : elle fait partie des complexes protéiques servant d'intermédiaire entre les intégrines et le cytosquelette d'actine (voir la partie 1.3.3).

Le but des expériences dans lesquelles la paxilline et l'actine sont fluorescentes, est

d'obtenir des informations sur la répartition et la nature des zones focales (la paxilline présente au niveau des zones focales étant marquée à la rhodamine), et de l'actine (les cellules T24 utilisées synthétisent de l'actine marquée à la GFP). Pour cela, le processus de traitement comporte plusieurs étapes, détaillées ci-dessous

- Etape 1 : Dans un premier temps, il faut régler l'échelle du logiciel (dans ce cas, $1 \text{ pixel} = 0.1675 \mu\text{m}$) et choisir les paramètres à mesurer lorsqu'une zone est sélectionnée : l'aire, la position du centre géométrique, les paramètres de l'ellipse la plus adaptée à la forme de la cellule.
- Etape 2 : Pour chaque cellule observée, il faut ensuite sélectionner la même zone sur les trois images (TRANS, RHOD et FITC correspondant respectivement au contraste de phase, à la fluorescence de la rhodamine et à la fluorescence de la GFP). La commande « restore selection » dans le logiciel ImageJ permet de sélectionner des zones identiques sur plusieurs images. Sur chaque image, la zone sélectionnée est ensuite découpée avec l'outil « crop ».
- Etape 3 : Sur l'image en contraste de phase, le contour de la cellule est tracé à la main, donnant accès à l'aire de la cellule et à la position de son barycentre. Les résultats de cette mesure sont alors enregistrés au format Excel.
- Etape 4 : Sur l'image en fluorescence de la rhodamine (RHOD), le traitement commence par une soustraction du bruit de fond, grâce à l'outil « subtract background » dans ImageJ. L'image est ensuite seuillée : tous les pixels au delà d'une certaine intensité deviennent noirs, le reste est blanc. Ceci permet d'isoler les zones de plus forte intensité lumineuse correspondant à la présence de la paxilline (donc les zones focales). Le seuil est choisi par l'expérimentateur de façon à garder le maximum d'information, i. e. de zones focales. En faisant une analyse des particules dont la taille est comprise entre 0.2 et $100 \mu\text{m}^2$ (et en demandant le masque des zones analysées), on obtient une image en noir et blanc (Fig. 4.2) avec les zones focales en noir sur fond blanc ainsi que les caractéristiques de toutes les zones focales (aire, position, paramètres de l'ellipse). Le critère de taille sert à exclure de l'analyse les zones de fluorescence diffuse. Le tableau de résultats est ensuite copié dans Excel. La position de chaque zone focale obtenue lors de l'analyse de l'image RHOD étant repérée par rapport à l'extrémité en haut à gauche de l'image dans ImageJ, il est nécessaire de faire un changement de repère avec pour nouvelle origine le centre de la cellule trouvé en contraste de phase. On passe ensuite en coordonnées polaires : la distance de chaque zone au centre de la cellule (le rayon r en coordonnées polaires) est calculé par le théorème de Pythagore et l'angle (θ) est déterminée avec le sinus

et le cosinus (en veillant aux signes). L'axe fixant l'origine des angles (correspondant à $\theta = 0$ degré) est ensuite placé à la verticale (orienté vers le bas) en faisant subir une rotation au système de coordonnées. Ainsi, l'angle $\theta = 0$ degrés correspond aux zones face au flux, qui va de bas en haut sur les images RHOD. Il prend des valeurs comprises entre 0 et 180 degrés sur le côté droit et entre 0 et -180 degrés sur le côté gauche (Fig. 4.1).

- Etape 5 : Disposant de la position du centre de chaque zone focale, ainsi que de son aire, l'étape suivante est la représentation graphique de ces résultats. Les valeurs sont exportées dans le logiciel Kaleidagraph, avec lequel nous traçons les répartitions angulaires du nombre de zones focales et de leurs aires (Fig. 4.2). Ce traitement est réalisé pour chaque cellule, ce qui permet de faire ensuite une moyenne pour chacun des quatre groupes de cellules (cisailées jusqu'à $1 Pa$, $3 Pa$, $5 Pa$, $7 Pa$).

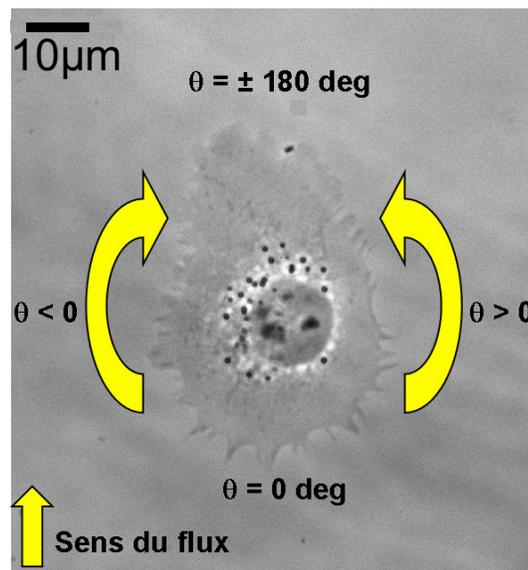


FIG. 4.1: Direction du flux et conventions choisies pour l'angle θ pour repérer la position des zones focales et de l'actine sur les cellules observées après cisaillement : sur toutes les images en contraste de phase et en fluorescence (rhodamine et GFP) acquises à l'IAB (partie 4), le flux est dirigé de bas en haut. La position sur les cellules est repérée par l'angle θ , dont l'origine correspond au point de la cellule qui fait face au flux. θ prend des valeurs entre -180 degrés et 0 degré sur la partie gauche de la cellule, et entre 0 degré et 180 degrés sur la partie droite de la cellule.

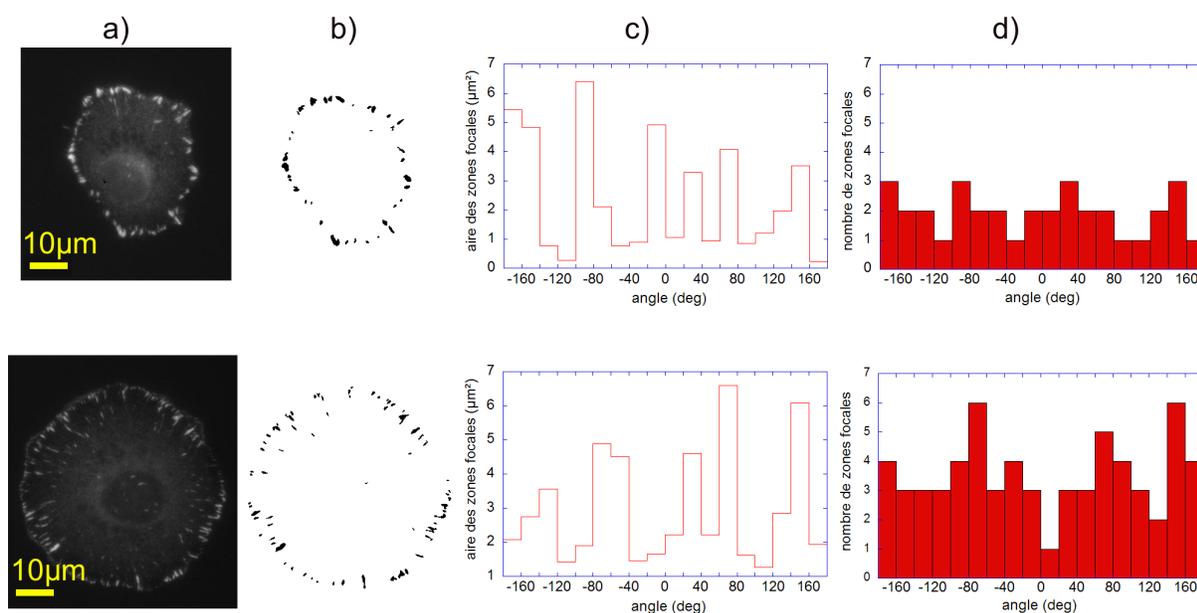


FIG. 4.2: Deux exemples de traitement d'images en fluorescence (rhodamine) de cellules T24 fixées après un palier de 5 minutes de cisaillement de 1Pa. a) Images en fluorescence de la paxilline marquée à la rhodamine (RHOD) après fixation des cellules et perméabilisation des membranes. b) Masques des zones obtenues après seuillage. c) Histogrammes représentant l'aire de paxilline fluorescente, i. e. des zones focales en fonction de l'angle par rapport à la direction de l'écoulement. d) Histogrammes représentant le nombre de zones focales en fonction de l'angle par rapport à la direction de l'écoulement.

- Etape 6 : Sur l'image en fluorescence de la GFP (FITC), le début du traitement est identique à celui des images RHOD : le bruit de fond est soustrait de l'image, grâce à l'outil « subtract background » dans ImageJ, puis l'image est seuillée, le seuil étant choisi par l'expérimentateur de façon à garder le maximum d'information, i. e. de zones d'actine. Une analyse des particules (critère de taille : $0.2 - 100 \mu m^2$) permet d'obtenir le masque des zones d'actine (en noir sur fond blanc). La commande « save coordinates » dans l'onglet « analyze » donne la position (les coordonnées x et y) de chaque pixel noir. On obtient ainsi un tableau de valeurs où seules apparaissent les pixels correspondant à la présence d'actine. Il faut ensuite faire des changements de repère et d'échelle car avec l'outil « save coordinates » l'origine du repère est prise en bas à gauche alors que sur les autres images elle est en haut à gauche. Pour faire ce changement de repère, on fait une translation selon l'axe y d'une distance égale à la dimension de l'image en pixels, qui est donnée par imageJ. Les coordonnées en pixels sont transformées en microns, puis un second changement de repère permet de faire coïncider la nouvelle origine avec le centroïde trouvé en contraste de phase. La suite du traitement est la même que pour les images RHOD : pour trouver l'angle de chaque pixel du tableau Excel, il faut faire un passage en coordonnées polaires,

calculer l'angle en radians, passer en degrés puis faire une rotation pour placer l'angle $\theta = 0$ degré face au flux. De cette manière, on obtient pour chaque cellule un tableau contenant tous les pixels correspondant à de l'actine fluorescente. On réalise alors un dénombrement pour chaque secteur angulaire (de largeur 20 degrés), ce qui permet d'obtenir l'aire d'actine en fonction de l'angle (Fig. 4.3). Les données de toutes les cellules d'un même groupe sont rassemblées puis la moyenne est calculée pour chaque groupe (cellules cisailées jusqu'à $1 Pa$, $3 Pa$, $5 Pa$, $7 Pa$).

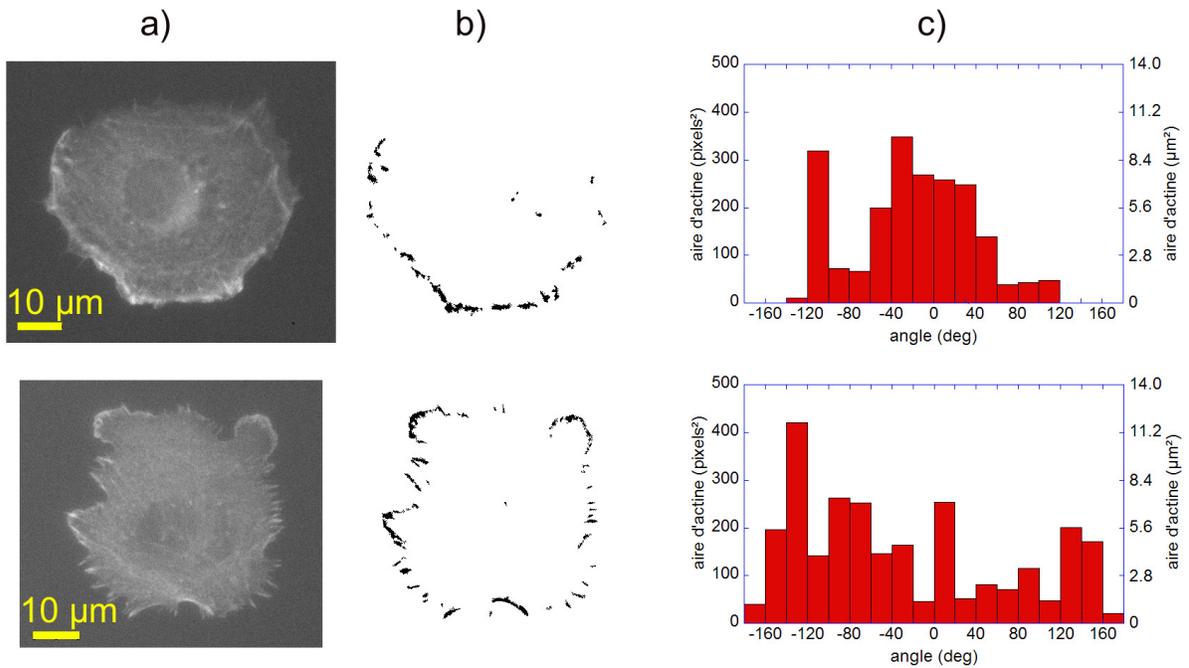


FIG. 4.3: Deux exemples de traitement d'images en fluorescence (GFP) de cellules T24 fixées après le palier à $5 Pa$ faisant suite aux deux paliers à $1 Pa$ et $3 Pa$. a) Images en fluorescence de l'actine marquée à la GFP (FITC). b) Masque des zones obtenues après seuillage. c) Aire d'actine fluorescente en fonction de l'angle. On vérifie bien que sur la première cellule, l'actine se trouve essentiellement à l'avant (dans l'intervalle angulaire $-80 < \theta < 60$ degrés) et que pour la seconde cellule, l'actine est localisée à gauche ($-160 < \theta < -20$ degrés).

4.2 Evolution des zones d'adhésion focales en fonction du cisaillement

Pour étudier la présence et l'évolution de zones focales sur des cellules adhérentes soumises à un cisaillement, nous avons observé en fluorescence la localisation de deux protéines : la paxilline et l' α -actinine 4. Ces deux protéines intervenant au niveau des complexes protéiques liant les intégrines au cytosquelette d'actine (voir la partie 1.3.3), elles sont présentes au niveau des zones d'adhésion focales. Nous avons accès à la localisation des zones focales sur les images en fluorescence de cellules dont d' α -actinine 4 ou la paxilline sont marquées.

4.2.1 Observation de l' α -actinine 4

Dans la présentation des méthodes expérimentales (paragraphe 2.3.2), nous avons évoqué la faible fluorescence des clones T24 α -actinine 4-GFP. Au cours des expériences sous flux, le signal de fluorescence diminue (Fig. 4.5). Une des causes de cette baisse d'intensité est le « photobleaching », mais nous ne pouvons pas estimer si elle est la seule cause, ou si l'écoulement intervient également. Le phénomène de « photobleaching » correspond à la destruction des fluorophores lors d'une exposition à la lumière. Il est possible de limiter ce phénomène en réduisant le temps d'exposition, mais avec certaines limites :

- Ayant un signal de fluorescence peu élevé, le temps d'exposition doit être assez long pour permettre de collecter suffisamment de photons.
- A cause des fluctuations de la lamelle dues au flux, il est nécessaire de faire plusieurs acquisitions à des z différents pour obtenir une image dans le plan de focalisation, ce qui occasionne un temps d'exposition plus long.

Nous avons récolté des données et fait des remarques d'ordre qualitatif sur nos observations. Dès l'adhésion au substrat, l' α -actinine 4 est principalement localisée à la périphérie de la cellule (Fig. 4.4 et 4.5). Sur les clichés de fluorescence, on ne voit pas de taches bien délimitées, l' α -actinine 4 est répartie en un « anneau diffus » sur le bord de l'aire de contact. Nous pouvons donc supposer qu'il n'y a pas, à ce stade de l'adhésion, de structures très organisées dans lesquelles serait concentrée l' α -actinine 4. Ayant effectué des expériences relativement courtes (< 30 minutes), il serait intéressant de suivre sur une durée plus longue l'évolution de la localisation de cette protéine, qui est recrutée au niveau

du pourtour de la cellule dès le début de l'adhésion, afin de voir si elle forme des structures plus organisées sur des échelles de temps plus longues (quelques heures). Pour cela, il sera nécessaire de remédier au problème d'intensité de fluorescence, car comme nous l'avons évoqué précédemment, nous avons été limités par la faible fluorescence de ces cellules.

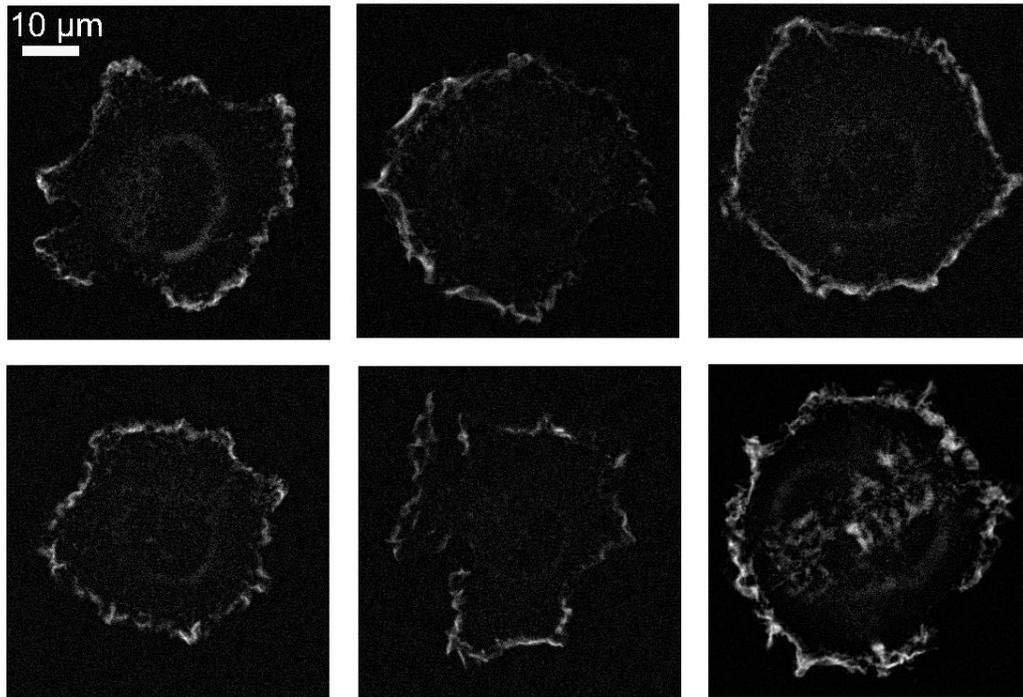


FIG. 4.4: Images en fluorescence (après soustraction du bruit de fond) de 6 cellules T24 α -actinine 4-GFP étalées sur la paroi d'un microcanal en PDMS en conditions statiques. L' α -actinine 4 est principalement localisée à la périphérie des cellules.

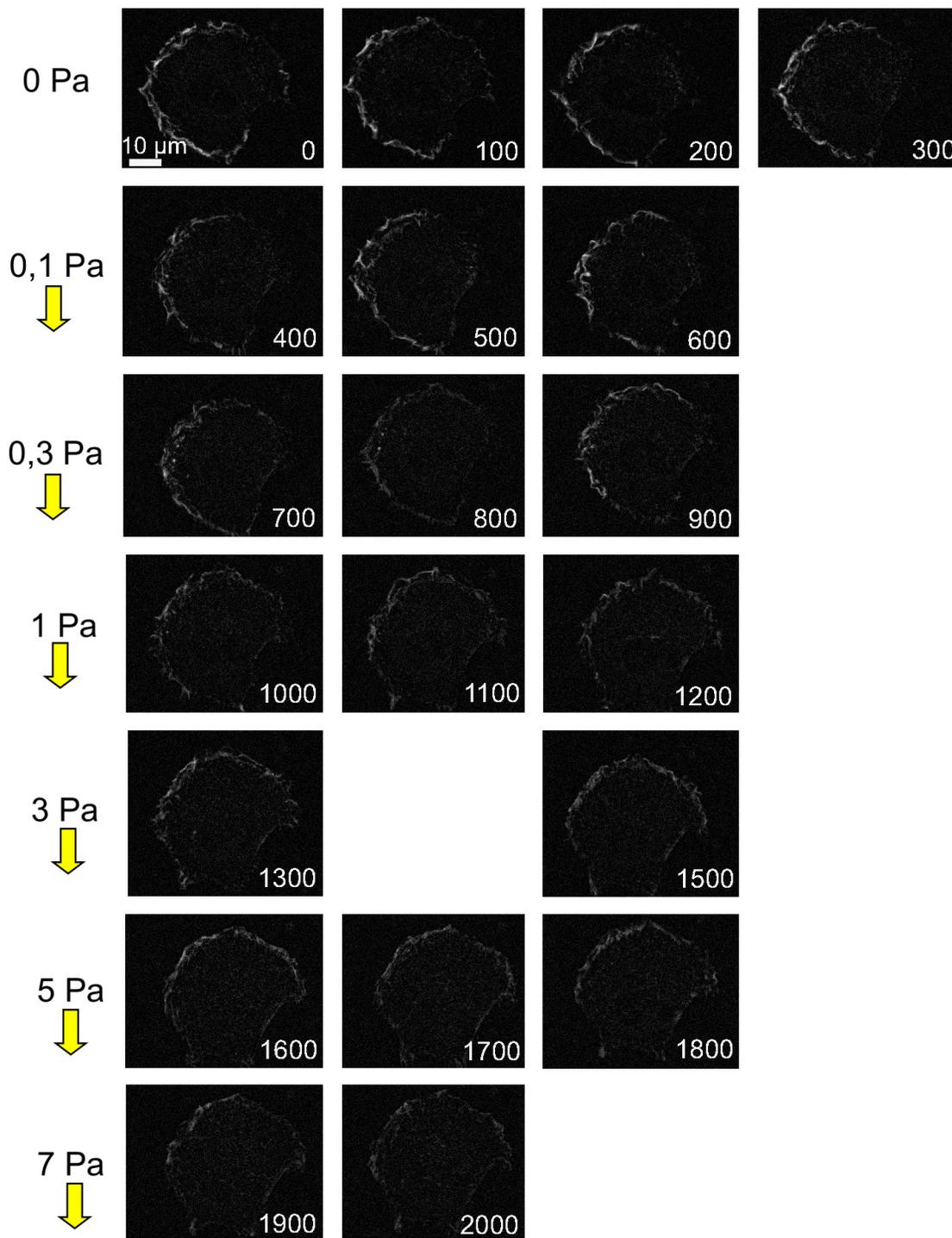


FIG. 4.5: Localisation de l' α -actinine 4 dans le temps sur une cellule T24 soumise à un cisaillement croissant : images obtenues après soustraction du bruit de fond grâce à l'outil « subtract background » dans le logiciel ImageJ. Chaque ligne correspond à un palier de flux (paliers de contraintes 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 5, 7 Pa, le temps est indiqué en secondes sur chaque image (une acquisition toutes les 100 secondes). L'image manquante ($t = 1400$ secondes) correspond au remplissage de la seringue avec du milieu de culture et son remplacement dans le pousse-seringue. Sur les images, le flux est dirigé de haut en bas.

4.2.2 Observation de la paxilline

Sur les images en fluorescence où la paxilline est marquée à la rhodamine, nous n'observons pas une répartition diffuse dans la cellule, mais des petites taches fluorescentes à la périphérie de la cellule (Fig. 4.6), ce qui correspond aux zones focales. Ces observations sur des cellules T24 sont similaires à la localisation des zones focales sur d'autres types cellulaires : Paul *et al.* ont également observé une répartition ponctuelle de la paxilline sur le bord de la cellule (Paul *et al.*, 2008).

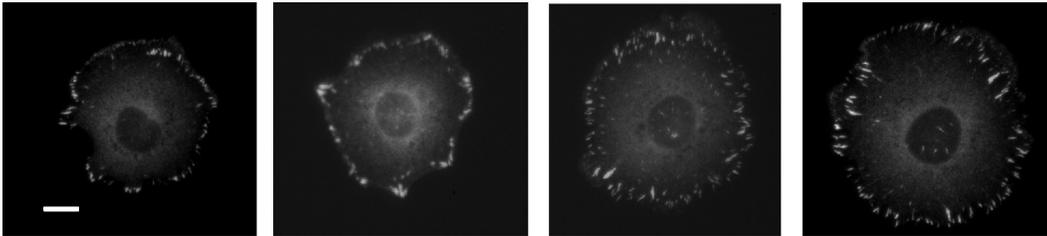


FIG. 4.6: Exemples d'images en fluorescence de cellules T24 dont la paxilline est marquée à la rhodamine. Les cellules ont subi un palier de cisaillement de 5 minutes à $1 Pa$. La barre représente $10 \mu m$.

A partir de l'analyse d'image décrite précédemment (voir la partie 4.1), nous avons accès aux caractéristiques des zones focales de chaque cellule. Nous avons regroupé les données des cellules ayant subi des conditions de flux identiques : cisaillement jusqu'à $1 Pa$, $3 Pa$, $5 Pa$, et $7 Pa$ d'après le protocole présenté dans la partie 2.5.3. Nous avons ensuite comparé ces 4 groupes de cellules, en nous intéressant particulièrement à différents paramètres observables :

- le nombre de zones focales par cellule
- la taille des zones focales
- la surface cumulée des zones focales d'une cellule
- la répartition des zones focales sur la cellule par rapport à la direction de l'écoulement

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

4.2.3 Taille des zones focales

Les taches de paxilline fluorescente correspondant aux zones focales ont une aire moyenne de $1 \mu m^2$, avec une répartition de taille très similaire pour les 4 conditions de cisaillement (Fig. 4.7 et Fig. 4.8).

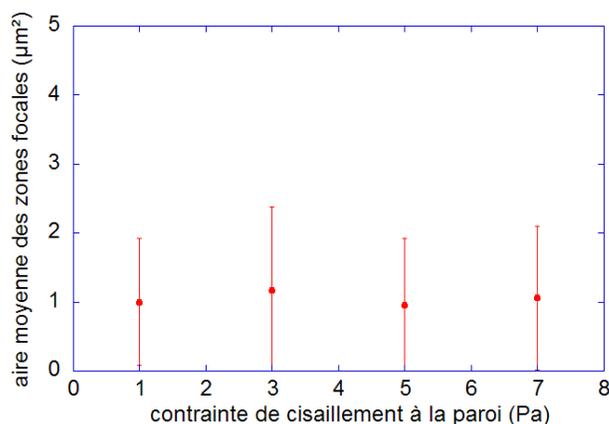


FIG. 4.7: Taille moyenne des zones focales pour des cellules T24 en fonction de la contrainte de cisaillement maximale subie : le flux, croissant par paliers de 5 minutes, génère des contraintes de cisaillement de plus en plus élevées. 35 cellules T24 ont subi un seul palier de 1 Pa. 33 cellules T 24 ont subi un palier à 1 Pa puis un palier à 3 Pa. 24 cellules ont subi des paliers successivement à 1 Pa, 3 Pa et 5 Pa. 31 cellules T24 ont subi des paliers successivement à 1 Pa, 3 Pa, 5 Pa et 7 Pa.

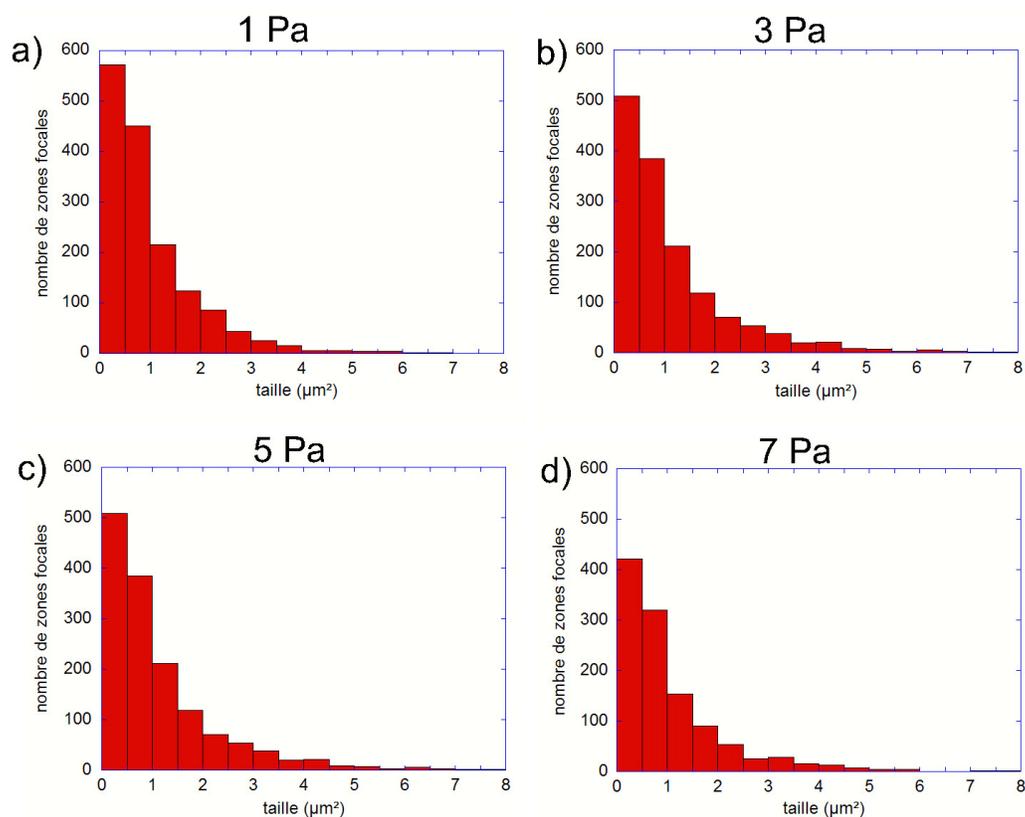


FIG. 4.8: Répartition des tailles des zones focales pour des cellules T24 ayant subi différentes contraintes de cisaillement : a) 35 cellules T24 ayant subi un palier de cisaillement de 5 minutes à 1 Pa, b) 33 cellules T24 ayant subi un palier de cisaillement de 5 minutes à 1 Pa puis un palier de cisaillement de 5 minutes à 3 Pa, c) 24 cellules T24 ayant subi des paliers de cisaillement de 5 minutes successifs à 1 Pa, 3 Pa et 5 Pa, d) 31 cellules T24 ayant subi des paliers de cisaillement de 5 minutes successifs à 1 Pa, 3 Pa, 5 Pa et 7 Pa.

4.2.4 Nombre de zones focales par cellule

Nous avons étudié la répartition du nombre de zones focales pour chacun des 4 groupes de cellules ayant subi des contraintes de cisaillement croissantes par paliers de 5 minutes jusqu'à $1 Pa$, $3 Pa$, $5 Pa$ et $7 Pa$ (Fig. 4.9). Dans chaque cas, la répartition présente un maximum, autour duquel elle est plus ou moins symétrique selon la contrainte maximale subie (distribution la plus symétrique pour les cellules ayant subi un seul palier de cisaillement de 5 minutes).

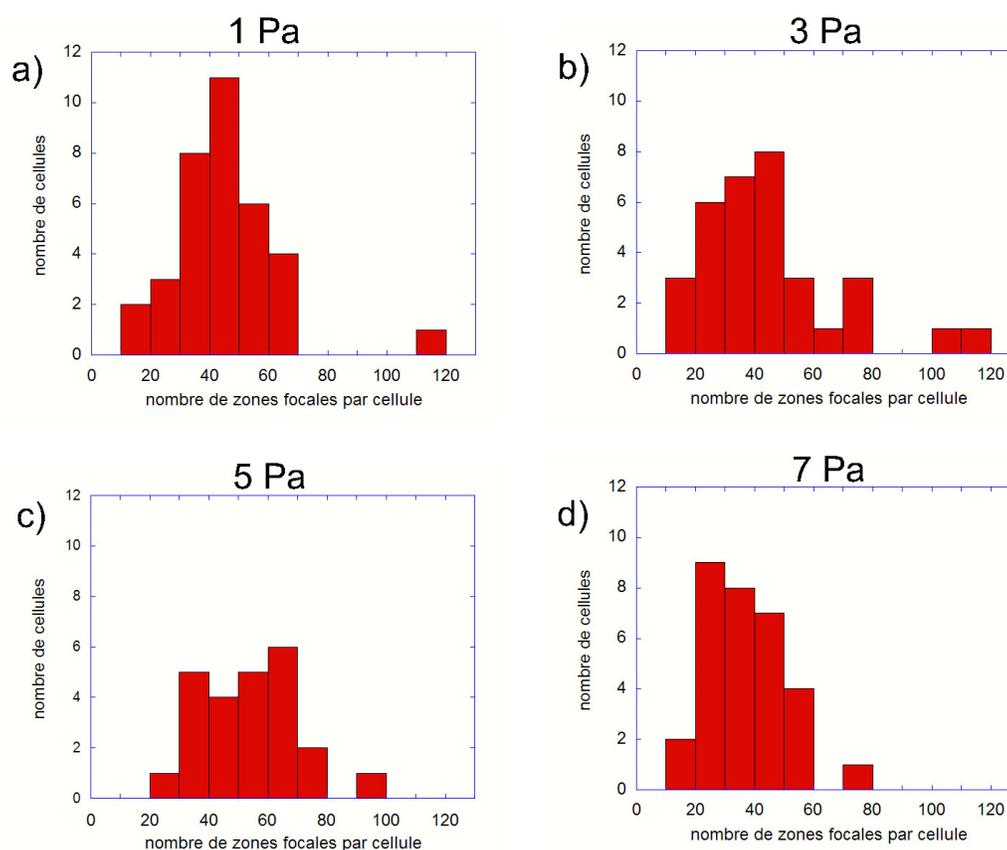


FIG. 4.9: Comparaison du nombre de zones focales pour des cellules T24 ayant subi différentes contraintes de cisaillement (par paliers de 5 minutes). a) 35 cellules T24 ayant subi un palier de cisaillement à $1 Pa$. b) 33 cellules T24 ayant subi deux paliers de cisaillement à $1 Pa$ puis à $3 Pa$. c) 24 cellules T24 ayant subi des paliers de cisaillement à $1 Pa$, $3 Pa$ et $5 Pa$. d) 31 cellules T24 ayant subi des paliers de cisaillement à $1 Pa$, $3 Pa$, $5 Pa$ et $7 Pa$.

Nous avons ensuite calculé la moyenne pour chacun des 4 groupes de cellules (cisailées jusqu'à $1 Pa$, $3 Pa$, $5 Pa$ et $7 Pa$), ainsi que l'écart type correspondant à cette moyenne (Fig. 4.10). Le nombre de zones focales par cellule varie légèrement avec la contrainte de

cisaillement : les cellules T24 ayant subi les paliers de cisaillement jusqu'à $5 Pa$ présentent plus de zones focales que celles cisailées jusqu'à $1 Pa$ ou $3 Pa$: 54 zones focales en moyenne pour un cisaillement maximum de $5 Pa$, 44 zones focales pour un cisaillement maximum de $1 Pa$ ou $3 Pa$. Lorsque le cisaillement se poursuit (cellules cisailées jusqu'à $7 Pa$), le nombre de zones focales diminue (37 zones focales pour un cisaillement maximum de $7 Pa$). Ceci sous-entend que la cellule réagit à l'écoulement en diminuant le nombre de zones focales, ce qui correspond à un schéma de décollement, en accord avec les résultats précédents (Fig. 3.8) dans lesquels on obtenait une aire maximale pour une contrainte de cisaillement à la paroi de $4.2 Pa$.

Nous pouvons comparer ces résultats à d'autres présentés dans la littérature. Bien que les types cellulaires soient différents, le nombre de zones focales est du même ordre de grandeur. Ainsi dans les travaux sur des fibroblastes de rat adhérents sur du verre de Paul *et al.*, on dénombre environ cinquante zones focales sur leurs clichés de paxilline fluorescente (Paul *et al.*, 2008). Schwartz *et al.* ont visualisé en fluorescence la vinculine chez des fibroblastes humains, cette protéine étant également présente au niveau des complexes adhésifs. Ils obtiennent ainsi une quarantaine de taches fluorescentes correspondant aux zones d'adhésion focales (Schwartz *et al.*, 2002).

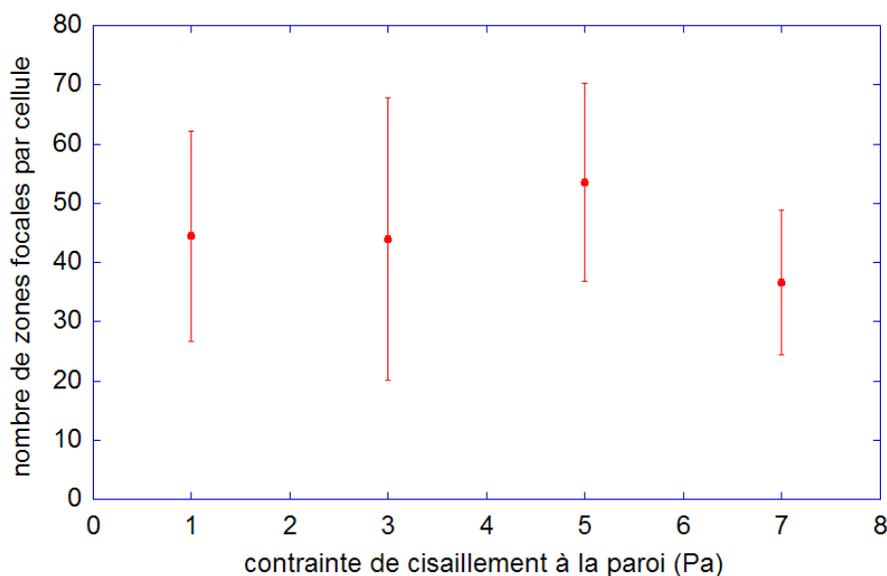


FIG. 4.10: Nombre moyen de zones focales pour des cellules T24 en fonction de la contrainte de cisaillement maximale subie : le flux croissant par paliers de 5 minutes, génère des contraintes de cisaillement de plus en plus élevées. 35 cellules T24 ont subi un seul palier de $1 Pa$, 33 cellules T 24 ont subi un palier à $1 Pa$ puis un palier à $3 Pa$, 24 cellules ont subi des paliers successivement à $1 Pa$, $3 Pa$ et $5 Pa$, et 31 cellules T24 ont subi des paliers successivement à $1 Pa$, $3 Pa$, $5 Pa$ et $7 Pa$.

4.2.5 Surface cumulée des zones focales par cellule

L'intensité de la force adhésive exercée par la cellule pour résister au flux étant la somme de toutes les forces individuelles au niveau des zones focales, nous nous sommes intéressés à l'aire totale des zones focales d'une cellule, i. e. la somme des aires de toutes les zones focales, en fonction du taux de cisaillement appliqué. Cependant, il est important de noter que dans les mêmes conditions de flux, une cellule très étalée a besoin de former plus de liaisons pour résister aux flux qu'une cellule dont l'aire d'étalement est plus faible. Il est donc normal qu'elle possède plus de zones focales. Pour s'affranchir de ce paramètre taille, nous avons choisi d'étudier la fraction d'aire correspondant à des zones focales, i. e. le rapport entre la surface cumulée des zones focales et l'aire totale de la cellule. Nous avons donc calculé la moyenne de la fraction d'aire correspondant aux zones focales, pour chacun des groupes de cellules, qui ont respectivement subi un cisaillement jusqu'à $1 Pa$, $3 Pa$, $5 Pa$, et $7 Pa$ (Fig. 4.11).

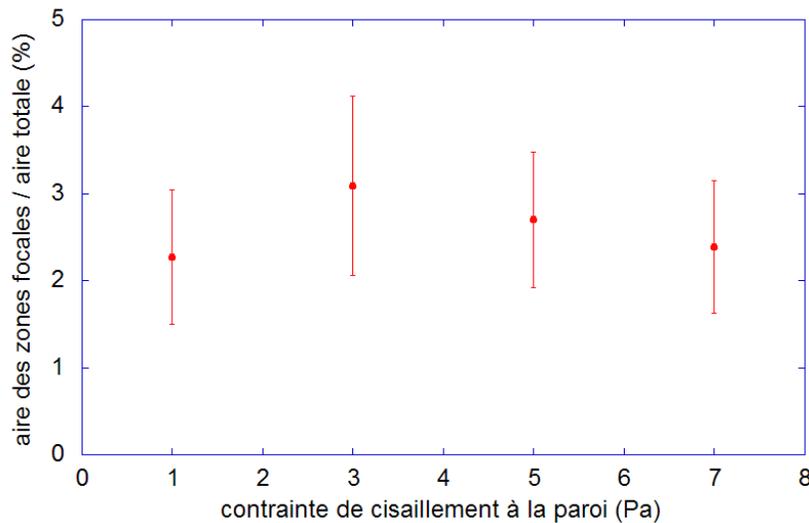


FIG. 4.11: Evolution de la fraction d'aire occupée par des zones focales en fonction de la contrainte maximale subie : le flux, croissant par paliers de 5 minutes, génère des contraintes de cisaillement de plus en plus élevées. 35 cellules T24 ont subi un seul palier de 5 minutes de $1 Pa$, 33 cellules T24 ont subi un palier de 5 minutes à $1 Pa$ puis un palier de 5 minutes à $3 Pa$, 24 cellules ont subi des paliers de 5 minutes successivement à $1 Pa$, $3 Pa$ et $5 Pa$, et 31 cellules T24 ont subi des paliers de 5 minutes successivement à $1 Pa$, $3 Pa$, $5 Pa$ et $7 Pa$.

La fraction d'aire occupée par les zones focales présente un maximum pour les cellules ayant subi deux paliers de cisaillement : 5 minutes sous une contrainte de $1 Pa$, puis 5 minutes sous une contrainte de $3 Pa$: dans ce cas, les zones focales représentent plus de

3% de l'aire totale de la cellule (Fig. 4.11). Ces résultats ne permettent pas de déterminer exactement la contrainte exacte à partir de laquelle la fraction d'aire occupée par les zones focales diminue, mais ils montrent qu'entre 3 et 5 Pa , elle décroît. Ceci est en accord avec les résultats obtenus dans la partie 3.3.4 (Fig. 3.8) pour lesquels on obtenait une aire maximale pour une contrainte de cisaillement à la paroi de 4.2 Pa pour un canal de 231 μm de hauteur.

4.2.6 Localisation des zones focales sur la cellule

Pour localiser les zones focales, nous avons déterminé la surface qu'elles occupent en moyenne dans chaque secteur angulaire de la cellule pour les 4 cas de cisaillement. Il ressort de cette étude que les zones focales sont positionnées de façon symétrique par rapport à l'écoulement : sur les diagrammes polaires de la figure 4.12 où l'écoulement est dirigé du bas vers le haut selon la verticale, les parties gauche et droite sont très similaires (Fig. 4.12).

Lorsque le cisaillement augmente, on observe une évolution de la localisation et de la surface cumulée des zones focales :

- Sur les cellules ayant subi un seul palier de contrainte 1 Pa , les zones focales occupent entre 2 et 3 μm^2 par secteur angulaire de 20 degrés dans toutes les directions (Fig. 4.12 a).
- Les cellules qui ont subi un palier supplémentaire à 3 Pa présentent une légère augmentation des zones focales à l'avant. La surface qu'elles occupent est environ égale à 3 μm^2 par secteur angulaire de 20 degrés à l'avant tandis qu'à l'arrière elles représentent entre 2 et 3 μm^2 (Fig. 4.12 b).
- Lorsque le cisaillement atteint 5 Pa , il apparaît une nette dissymétrie avant-arrière de la cellule : à l'arrière le cumul d'aire des zones focales avoisine à 1 μm^2 alors qu'à l'avant il dépasse 3 μm^2 . Sur les côtés de la cellule (secteurs angulaires allant de -120 à -60 et de 60 à 120 degrés), les zones focales représentent entre 3 et 4 μm^2 par secteur angulaire de 20 degrés. Les zones focales se concentrent et se renforcent donc dans les zones les plus exposées au flux : l'avant et les côtés (Fig. 4.12 c).
- Pour la contrainte la plus élevée que nous avons testée (7 Pa), la répartition de l'aire cumulée des zones focales est à nouveau indépendante de la position et de l'orientation face au flux. Cependant, l'aire occupée par les zones focales diminue (Fig. 4.12 d).

Ces observations laissent supposer que la cellule répond au flux en intensifiant ses ancrages adhésifs dans les zones les plus exposées, jusqu'à ce que le seuil de décollement soit atteint. Une fois le décollement initié, les zones focales disparaissent d'abord à l'avant de la cellule, qui est la zone la plus sollicitée pour arriver de nouveau à une répartition uniforme des zones focales dans toutes les directions.

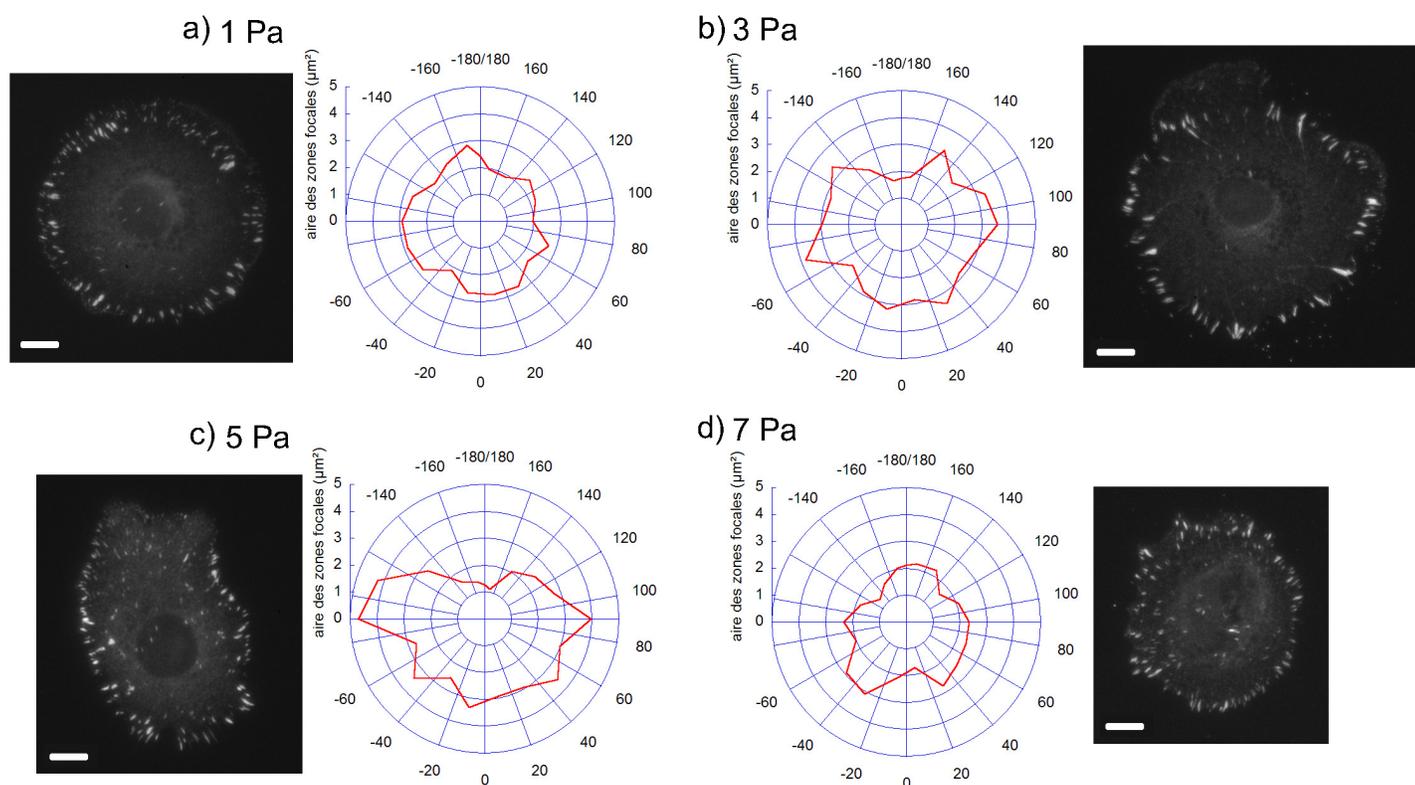


FIG. 4.12: Répartition angulaire moyenne des zones focales chez des cellules T24 soumises à différentes contraintes de cisaillement : a) Un palier de 5 minutes sous une contrainte de $1 Pa$, b) Un palier de 5 minutes sous une contrainte de $1 Pa$ puis un palier de 5 minutes sous une contrainte de $3 Pa$, c) Trois paliers de 5 minutes successivement aux contraintes $1 Pa$, $3 Pa$ et $5 Pa$, d) Quatre paliers de 5 minutes successivement aux contraintes $1 Pa$, $3 Pa$, $5 Pa$ et $7 Pa$. L'aire cumulée des zones focales est calculée pour chaque secteur angulaire de 20 degrés, puis représentée sous forme de diagramme polaire. L'orientation sur les cellules est repérée par l'angle θ , dont l'origine correspond au point de la cellule qui fait face au flux, qui est dirigé de bas en haut : θ prend des valeurs entre -180 degrés et 0 degré sur la partie gauche de la cellule, et entre 0 degré et 180 degrés sur la partie droite de la cellule. Pour chaque cas de cisaillement, un exemple d'image en fluorescence figure à côté du graphique (la barre représente $10 \mu m$).

4.2.7 Estimation de la contrainte adhésive au niveau d'une zone focale

La première série d'expériences réalisées au LSP a permis de déterminer, en fonction de la taille du canal, la contrainte de cisaillement au delà de laquelle la cellule ne s'étale plus

et diminue son aire d'adhésion. Cette valeur de contrainte, appelée contrainte critique, correspond à l'adhésion la plus forte de la cellule sur son substrat. En effet, la cellule est capable de résister à un tel écoulement (son aire ne diminue pas tant que la contrainte de cisaillement ne dépasse pas la contrainte critique), mais pour des débits plus élevés l'aire de la cellule décroît et la cellule commence ainsi à se décoller (dans les mêmes conditions de confinement). La courbe obtenue à partir des résultats expérimentaux (Fig. 3.8) donne la contrainte critique en fonction de la hauteur du canal. Elle permet de prédire que dans un tel canal, de hauteur $231 \mu m$, la contrainte critique vaut $4.2 Pa$.

Dans des conditions de cisaillement critique (contrainte de cisaillement égale à la contrainte critique), la force adhésive totale, déterminée grâce au modèle établi dans la partie 3.3.4, vaut environ $18 nN$. Comme expliqué dans le paragraphe 3.4.2, cette force adhésive totale est la somme de toutes les forces adhésives individuelles présentes au niveau de chaque zone focale : $\vec{F}_{ad} = \sum \vec{f}_{ad}$. L'intensité de chaque force adhésive individuelle f_{ad} s'écrit comme le produit de la contrainte adhésive σ_{ad} par la surface d'adhésion, égale à la taille de la zone focale (notée A_{zf}) : $f_{ad} = \sigma_{ad} \times A_{zf}$. En supposant que la contrainte adhésive σ_{ad} a une valeur identique pour toutes les zones focales, la force adhésive totale peut donc s'écrire, en factorisant par σ_{ad} : $F_{ad} = \sigma_{ad} \times \sum A_{zf}$ où la somme porte sur toutes les zones focales. La contrainte adhésive exercée par la cellule sur le substrat peut donc être estimée en connaissant la force adhésive totale et l'aire cumulée de toutes les zones focales.

La seconde série d'expériences, réalisée à l'IAB, a permis de mettre en évidence la présence de zones focales plus précisément, de les dénombrer et de les localiser sur la cellule lorsque la contrainte de cisaillement augmente progressivement par paliers de 5 minutes en prenant les valeurs $1 Pa$, $3 Pa$, $5 Pa$ et $7 Pa$. Etant donné la configuration différente du dispositif (microscope inversé à l'IAB et droit au LSP), les cellules n'adhèrent pas sur le même substrat après avoir sédimenté au fond du canal : les T24 adhèrent sur du PDMS dans les expériences réalisées au LSP tandis qu'elles adhèrent sur du verre dans les expériences réalisées à l'IAB. En ce qui concerne l'adhésion cellulaire, ces deux matériaux peuvent cependant être classés dans la famille des matériaux durs, en comparaison d'autres types de substrats, tels que les gels de polyacrylamide. Nous pouvons donc considérer que le comportement des cellules sur du PDMS est proche de celui sur du verre. Ceci justifie pourquoi nous utilisons les résultats des expériences en fluorescence (adhésion sur du verre) pour déterminer la contrainte adhésive générant la force adhésive

estimée lors des expériences d'adhésion sur PDMS.

Pour le calcul de la contrainte adhésive, nous avons besoin des caractéristiques de l'adhésion lorsqu'elle est la plus forte, c'est à dire pour la contrainte de cisaillement critique, égale à $4.2 Pa$ dans le cas du canal de hauteur $231 \mu m$ que nous avons utilisé. Ne disposant pas de données pour cette valeur de contrainte, nous allons utiliser les résultats des paliers les plus proches ($3 Pa$ et $5 Pa$), pour faire une moyenne pondérée. Pour les cellules ayant subi un palier de cisaillement de 5 minutes à $1 Pa$ puis un palier de cisaillement de 5 minutes à $3 Pa$, l'aire totale des zones focales est $50 \mu m^2$. La contrainte adhésive correspondante est donc égale à $0.36 kPa$. Pour les cellules ayant subi des paliers de cisaillement de 5 minutes à $1 Pa$, $3 Pa$ et $5 Pa$, les zones focales occupent une surface de $51 \mu m^2$, ce qui donne une contrainte adhésive égale à $0.35 kPa$. Ces résultats nous permettent de faire une estimation de la contrainte adhésive pour des cellules subissant un cisaillement de $4.2 Pa$, qui est la contrainte critique pour le canal utilisé : $\sigma_{ad} = 0.36 kPa$. Cette valeur est supérieure à celle de $0.2 kPa$ obtenue par Ambrosi *et al.* qui ont étudié des cellules T24 migrant sur des substrats en polyacrylamide plus mous (module d'Young égal à $9.9 kPa$) que le PDMS constituant les microcanaux (module d'Young égal à $600 kPa$). Ils ont également montré que la contrainte adhésive exercée par les T24 croît linéairement avec la rigidité du substrat (Ambrosi *et al.*, 2008) : $\sigma_{ad} = 0.05 kPa$ sur un gel de module d'Young égal à $1.95 kPa$, $\sigma_{ad} = 0.14 kPa$ sur un gel de module d'Young égal à $6.3 kPa$ et $\sigma_{ad} = 0.2 kPa$ sur un gel de module d'Young égal à $9.9 kPa$. Notre résultat :

$$\sigma_{ad} = 0.36 kPa$$

pour des T24 adhérentes à un substrat en PDMS de module d'Young égal à $600 kPa$ est donc tout à fait cohérent, à condition d'accepter l'idée d'une saturation à fort module d'Young. En effet, sur la figure 4.13, qui reprend ces différentes valeurs concernant le même type cellulaire (des cellules T24), on observe une augmentation de la contrainte adhésive avec la rigidité du substrat. Cette augmentation est plus rapide aux faibles valeurs de module d'Young E (correspondant aux substrats les plus mous) que pour les substrats plus durs : σ_{ad} passe de $0.05 kPa$ à $0.2 kPa$ lorsque E passe de $1.95 kPa$ à $9.9 kPa$, alors qu'entre $E = 0.2 kPa$ et $E = 600 kPa$, la hausse de σ_{ad} n'est que de 0.2 à $0.36 kPa$. La courbe en pointillé sur la figure 4.13 montre cette tendance. Bien que cette courbe ne soit pas suffisante pour définir précisément la relation entre la contrainte adhésive et le module d'Young du substrat, elle suggère que la capacité des cellules à exercer des forces

de traction sur son substrat atteint une saturation lorsque le substrat devient de plus en plus rigide.

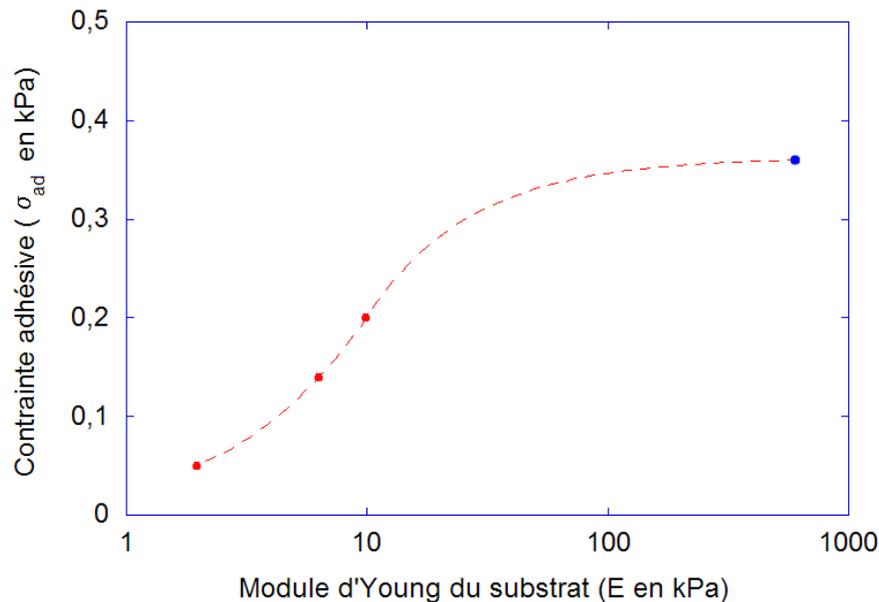


FIG. 4.13: Contrainte adhésive σ_{ad} exercée par des cellules T24 en fonction de la rigidité du substrat. Les points en rouge ($E = 1.95 \text{ kPa}$, $E = 6.3 \text{ kPa}$ et $E = 9.9 \text{ kPa}$) proviennent des travaux de Ambrosi *et al.* sur des gels de polyacrylamide mous (Ambrosi *et al.*, 2008). Le point en bleu ($E = 600 \text{ kPa}$) a été obtenu au cours de nos expériences réalisées dans des microcanaux en PDMS. La ligne pointillée sert de guide pour l'œil.

Nous pouvons également souligner que la contrainte adhésive exercée par une cellule sur son substrat dépend fortement du type cellulaire. Pour des cellules HASM¹ migrant sur un gel de polyacrylamide de module d'Young $E = 1.2 \text{ kPa}$, Butler *et al.* ont obtenu une contrainte de traction maximale de l'ordre de 0.4 kPa (Butler *et al.*, 2002), ce qui reste du même ordre de grandeur que la contrainte adhésive que nous obtenons pour des cellules T24 adhérentes sur du PDMS de module d'Young $E = 600 \text{ kPa}$. La contrainte adhésive est cependant beaucoup plus élevée pour des fibroblastes (d'un facteur 10) : Paul *et al.* l'ont en effet estimé à 3.8 kPa pour des fibroblastes de rat adhérents sur du verre (Paul *et al.*, 2008).

¹Human Airway Smooth Muscle

4.3 Evolution du cytosquelette d'actine en fonction du cisaillement

Nous avons collecté des clichés de T24 dont l'actine est marquée à la GFP, ayant subi des contraintes croissantes comprises entre $1 Pa$ et $7 Pa$ (description du protocole dans la partie 2.5.3), puis traité ces données (détails du traitement d'image dans la partie 4.1). Cette analyse montre dans la grande majorité des cellules observées une localisation de l'actine sur les bords cellulaires, au niveau du lamellipode, et dans quelques cas une présence d'actine plus homogène dans la cellule (Fig. 4.14). La présence d'actine en périphérie est en accord avec les observations de l' α -actinine 4 : en effet l' α -actinine 4 servant à relier entre eux des filaments d'actine pour former des faisceaux (Alberts *et al.*, 2002), il est normal de retrouver l'actine aux mêmes endroits dans la cellule.

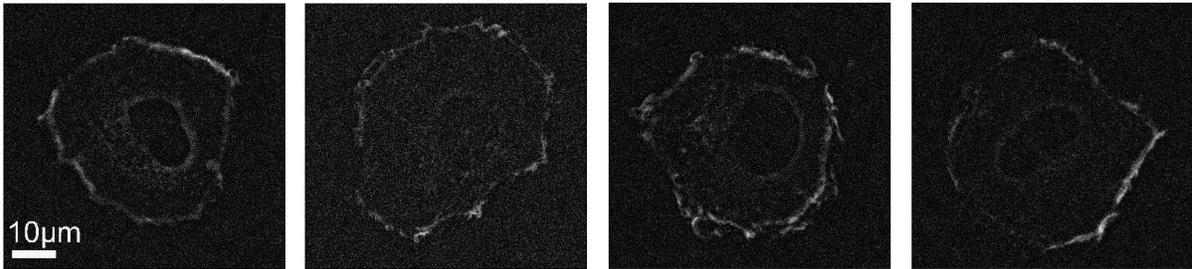


FIG. 4.14: Images en fluorescence (après soustraction du bruit de fond) de 4 cellules T24 actine GFP étalées sur la paroi d'un microcanal en PDMS en conditions statiques. L'actine est principalement localisée à la périphérie des cellules.

4.3.1 Surface cumulée des zones comportant de l'actine

Nous avons ensuite regroupé les résultats pour les cellules ayant subi les mêmes contraintes et déterminé pour chacune de ces populations la fraction d'aire moyenne où est présente l'actine. Pour cela, nous avons fait le rapport entre l'aire des zones fluorescentes et l'aire totale de la cellule. Les résultats sont présentés sur la figure 4.15, qui montre que la surface comportant de l'actine est maximale pour les cellules ayant subi deux paliers de cisaillement (à $1 Pa$ puis à $3 Pa$). Ce résultat est similaire à celui obtenu pour les zones focales : l'aire occupée par les zones focales (en % de l'aire totale) est également maximale dans le groupe de cellules cisailées jusqu'à $3 Pa$.

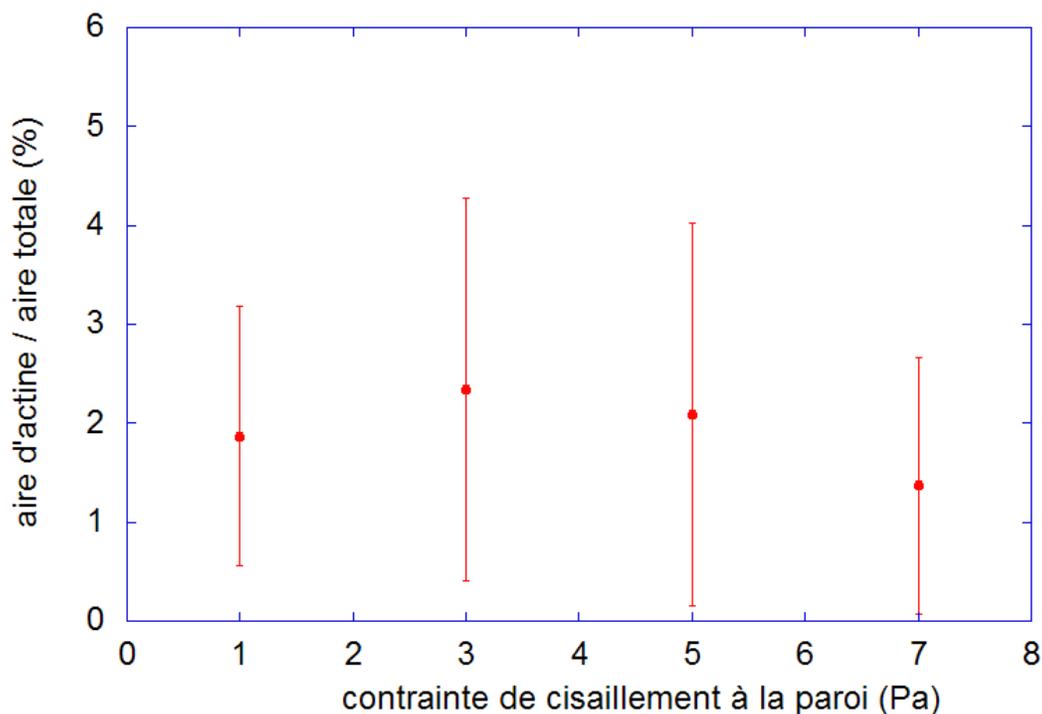


FIG. 4.15: Evolution de la fraction d'aire où est présente l'actine en fonction de la contrainte maximale subie : le flux, croissant par paliers de 5 minutes, génère des contraintes de cisaillement de plus en plus élevées. 23 cellules T24 ont subi un seul palier de 1 Pa, 33 cellules T24 ont subi un palier de 5 minutes à 1 Pa puis un palier de 5 minutes à 3 Pa, 24 cellules ont subi des paliers de 5 minutes successivement à 1 Pa, 3 Pa et 5 Pa, et 31 cellules T24 ont subi des paliers de 5 minutes successivement à 1 Pa, 3 Pa, 5 Pa et 7 Pa.

Nous avons également remarqué que l'expression de l'actine fluorescente est très variable d'une cellule à l'autre. Pour quantifier ces observations, nous avons tracé pour chaque cellule un histogramme représentant l'aire comportant de l'actine fluorescente (voir la partie 4.1 pour le traitement des images). Il ressort de ces courbes que les cellules ont des degrés d'expression de l'actine fluorescente très différents : certaines cellules ont plusieurs secteurs angulaires dont la fluorescence occupe une surface importante, supérieure à $10 \mu m^2$ (Fig. 4.16 b), tandis que d'autres cellules n'ont pas de secteurs angulaires dont l'aire fluorescente dépasse $2 \mu m^2$ (Fig. 4.16 a). Nous avons tenu compte de ces inégalités de fluorescence dans l'étude de la répartition angulaire de l'actine dans la cellule, présentée au paragraphe suivant.

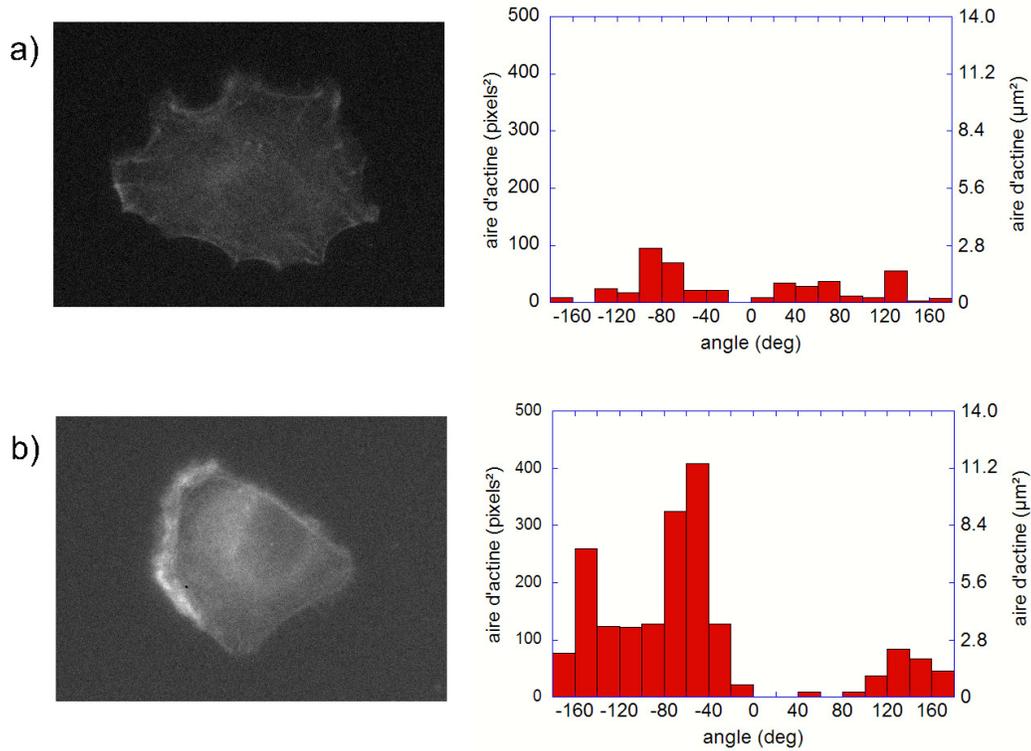


FIG. 4.16: Niveaux d'expression de l'actine GFP chez 2 cellules T24 actine GFP ayant subi deux paliers de contraintes successifs de 5 minutes à 1 et 3 Pa successivement. a) Cellule T24 actine GFP exprimant faiblement l'actine fluorescente et histogramme de répartition angulaire des zones d'actine. b) Cellule T24 actine GFP exprimant fortement l'actine fluorescente et histogramme de répartition angulaire des zones d'actine.

4.3.2 Localisation de l'actine sur la cellule

Comme pour les zones focales, nous nous sommes intéressés à la localisation angulaire de l'actine par rapport à la direction du flux. Cependant, les cellules ont des degrés d'expression de l'actine fluorescente très différents. Pour éviter que la répartition angulaire des cellules très fluorescentes écrase celle des cellules plus faiblement fluorescentes dans le regroupement des données pour un même palier, nous avons donc déterminé pour chaque cellule la répartition de l'actine normalisée par la surface totale d'actine de cette cellule. De cette façon, nous prenons en compte toutes les cellules avec le même poids dans le calcul de la répartition moyenne. Nous avons ensuite représenté la répartition moyenne de l'actine pour les 4 valeurs de cisaillement sous forme de diagramme polaire : le disque est découpé en 18 secteurs angulaires de 20 degrés, et pour chaque secteur le rayon correspond à l'aire cumulée des zones d'actine (Fig. 4.17).

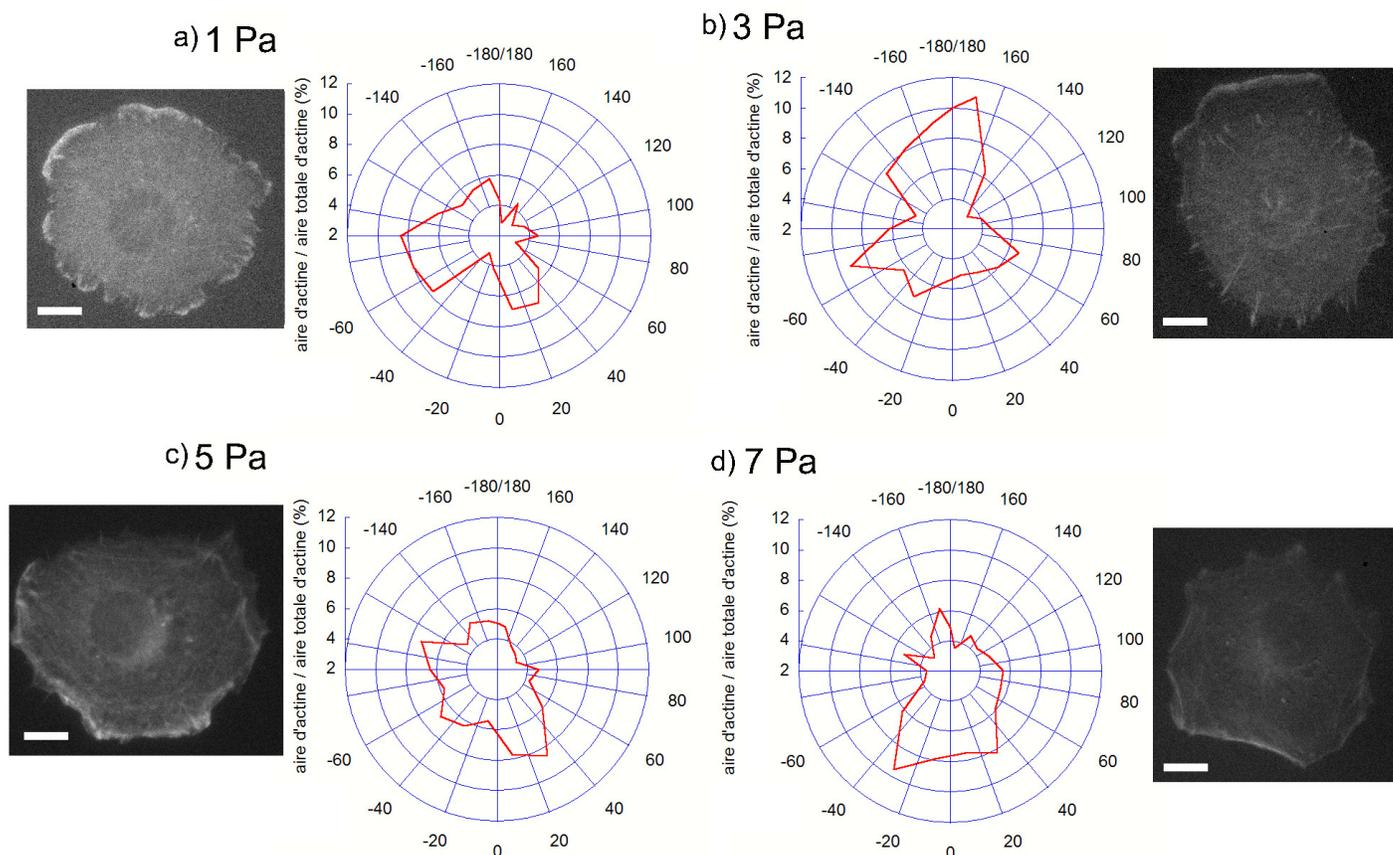


FIG. 4.17: Répartition angulaire moyenne de l'actine chez des cellules T24 actine GFP soumises à différentes contraintes de cisaillement : a) Un palier de 5 minutes sous une contrainte de $1 Pa$, b) Un palier de 5 minutes sous une contrainte de $1 Pa$ puis un palier de 5 minutes sous une contrainte de $3 Pa$, c) Trois paliers de 5 minutes successivement aux contraintes $1 Pa$, $3 Pa$ et $5 Pa$, d) Quatre paliers de 5 minutes successivement aux contraintes $1 Pa$, $3 Pa$, $5 Pa$ et $7 Pa$. L'orientation sur les cellules est repérée par l'angle θ , dont l'origine correspond au point de la cellule qui fait face au flux, qui est dirigé de bas en haut : θ prend des valeurs entre -180 degrés et 0 degré sur la partie gauche de la cellule, et entre 0 degré et 180 degrés sur la partie droite de la cellule. Pour chaque cas de cisaillement, un exemple d'image en fluorescence figure à côté du graphique (la barre représente $10 \mu m$).

Ces courbes présentent globalement une symétrie par rapport à l'axe vertical, ce qui signifie que l'actine est répartie de façon relativement symétrique par rapport à l'écoulement : la partie gauche et la partie droite de la cellule sont équivalentes, à tous les niveaux de cisaillement. On remarque cependant une différence entre l'avant de la cellule, c'est à dire la région qui fait face au flux, et l'arrière de la cellule. Sur les cellules ayant subi successi-

vement des cisaillements de 1 et 3 Pa , l'actine est majoritaire dans la partie arrière de la cellule (Fig. 4.17 b). En poursuivant le cisaillement avec un palier supplémentaire à 5 Pa , la fraction d'actine à l'arrière de la cellule a nettement diminué (de plus de 10% à moins de 6%), tandis qu'elle a légèrement augmenté à l'avant (Fig. 4.17 c). Lorsque les cellules sont cisailées jusqu'à 7 Pa (après les paliers de 5 minutes successifs à 1, 3, et 5 Pa), la relocalisation de l'actine vers l'avant continue : les secteurs angulaires compris entre -40 et 40 degrés rassemblent plus de 30% de l'actine de la cellule alors qu'à l'arrière, entre -180 et -140 et entre 140 et 180 degrés, on compte moins de 20% de l'actine fluorescente (Fig. 4.17 d).

4.4 Discussion

4.4.1 Evolution des zones focales sous cisaillement croissant

Les expériences de fluorescence réalisées montrent que les zones focales sont situées en périphérie de la cellule. Leur nombre et surface évoluent lorsque le cisaillement auquel sont soumises les cellules augmente :

- A faible contrainte (1 Pa), les zones focales sont réparties de façon isotrope (Fig. 4.12 a).
- Le nombre des zones focales ainsi que la fraction d'aire qu'elles occupent sont à leur maximum pour les cellules cisailées jusqu'à 3 Pa (Fig. 4.11). Nous pouvons comparer cette valeur de contrainte à la contrainte critique obtenue dans la première série d'expériences : pour un canal de dimensions identiques à celui utilisé dans ces expériences de fluorescence (1 mm de largeur et 231 μm de hauteur), nous avons estimé à 4.2 Pa la contrainte critique. Nous rappelons que la contrainte critique est la contrainte pour laquelle l'étalement de la cellule adhérente soumise à un flux est maximum : elle marque la transition entre la phase d'étalement et celle de rétraction, la capacité de résistance de la cellule est donc maximale pour cette valeur de contrainte. Nous pouvons supposer que pour des contraintes proches de cette valeur de 4.2 Pa , les zones focales sont présentes en plus grand nombre et qu'elles occupent une fraction plus élevée de l'aire de la cellule. Les résultats issus des expériences de fluorescence vont dans ce sens : En effet, nous observons qu'entre 1 et 3 Pa le nombre de zones focales et la fraction d'aire qu'elles occupent augmentent. Au delà de 5 Pa , ces deux valeurs diminuent (Fig. 4.11). Ceci corrobore donc notre hypothèse d'une présence

renforcée des zones focales aux alentours de $4.2 Pa$. En observant la localisation angulaire des zones focales, on voit apparaître une dissymétrie avant-arrière à partir du palier $3 Pa$, qui devient nette après le palier $5 Pa$: la surface des zones focales est plus grande à l'avant et sur les côtés de la cellule qu'à l'arrière (Fig. 4.12 b, c). Ceci traduit le recrutement des zones focales vers l'avant et les côtés de la cellule. Nous pouvons supposer que cette accumulation des zones focales dans la zone la plus exposée au flux est la réponse de la cellule aux contraintes mécaniques qu'elle subit : pour résister au décollement, la cellule intensifie ses points d'ancrage dans la partie la plus sollicitée.

- Les cellules cisailées jusqu'à $7 Pa$ présentent moins de zones focales que les cellules cisailées moins fortement, qui sont réparties de façon plus isotrope : la dissymétrie avant-arrière est très faible (Fig. 4.11 et Fig. 4.12 d). Ceci laisse donc supposer que sous de fortes contraintes de cisaillement, l'écoulement a arraché des liaisons cellule-substrat, entraînant la baisse du nombre et de la surface des zones focales.

4.4.2 Evolution du cytosquelette d'actine sous cisaillement croissant

Les observations de l'actine fluorescente permettent de mettre en évidence les modifications du cytosquelette d'actine filamenteuse des cellules T24 sous écoulement. Les clichés en fluorescence montrent une localisation de l'actine à la périphérie de la cellule. L'exploitation des données montre que lorsque la contrainte de cisaillement augmente, le cytosquelette d'actine subit des modifications :

- Entre 1 et $3 Pa$, le cytosquelette d'actine se renforce (Fig. 4.15), avec une augmentation de la présence d'actine fluorescente (en pourcentage par rapport à l'aire d'adhésion). Cette augmentation est plus importante à l'arrière de la cellule (Fig. 4.17 a, b). Au cours des précédentes expériences de cisaillement (voir la partie 3.3.4), nous avons montré qu'en dessous de $4.2 Pa$ l'aire des cellules augmentait. Dans ces conditions, la cellule forme donc de nouvelles structures d'actine pour soutenir les protrusions membranaires qu'elle étend. Ceci est donc cohérent avec l'augmentation de la proportion d'actine observée chez les cellules cisailées à $3 Pa$ par rapport à celles cisailées jusqu'à $1 Pa$.
- Chez les cellules ayant subi une contrainte de cisaillement de $5 Pa$, globalement, la présence d'actine diminue (Fig. 4.15). Si l'on s'intéresse à la répartition angulaire, on voit que la baisse est significative à l'arrière de la cellule tandis qu'à l'avant l'actine

augmente légèrement (Fig. 4.17c).

- Lorsque les cellules sont cisailées jusqu'à $7 Pa$, elles présentent un taux d'actine plus élevé à l'avant (Fig. 4.17 d). Nous pouvons supposer qu'aux forts cisaillements, la cellule renforce son cytosquelette dans la région la plus exposée à l'écoulement pour résister au décollement.

Ces observations montrent qu'un cisaillement fort (supérieur à la contrainte critique) entraîne une relocalisation de l'actine vers l'avant de la cellule. Ces résultats peuvent être mis en relation avec les travaux de Dalous *et al.*, bien que le type cellulaire et le protocole expérimental soient différents (Dalous *et al.*, 2008). En effet, Dalous *et al.* ont inversé le sens de l'écoulement appliqué à des cellules *dictyostelium discoïdeum* adhérentes à un substrat. Ils ont montré qu'une inversion du flux entraîne une relocalisation de l'actine qui disparaît à l'ancien front et apparaît au nouveau front, face au flux, en passant par un minimum. Dans notre cas, l'augmentation du flux produit un effet qui va dans ce sens : une accumulation à l'avant de la cellule, la zone exposée à l'écoulement. De plus, nous démontrons ici que le phénomène dépend de l'intensité du flux

4.4.3 Corrélation entre les zones focales et le cytosquelette d'actine

La paxilline et l'actine fluorescentes sont toutes deux localisées sur le pourtour de la cellule. La répartition de la paxilline est ponctuelle, alors que l'actine occupe des zones plus diffuses formant une sorte d'anneau au bord de la cellule. Sachant que la paxilline fait partie des complexes focaux liant les intégrines au cytosquelette d'actine, il est tout à fait cohérent de retrouver ces deux protéines aux mêmes endroits sur la cellule adhérente. On peut justifier la répartition en « taches fluorescentes » bien délimitées de la paxilline par le fait que lorsque les intégrines se lient à leurs ligands, elles se rapprochent entre elles, formant ainsi des contacts focaux (Burrige *et al.*, 1992; Bockhölt et Burrige, 1993).

La quantification de la paxilline et de l'actine fluorescente en fonction de la contrainte appliquée permet de voir qu'elles suivent une évolution relativement semblable : les courbes des figures 4.11 et 4.15, qui montrent les proportions respectives de ces deux protéines dans la cellule, ont la même allure. La paxilline et l'actine filamenteuse augmentent de façon concomitante lorsque la cellule est cisailée faiblement (de 1 à $3 Pa$). Pour des cisaillements plus forts (5 et $7 Pa$), le taux de ces deux protéines dans la cellule diminue. Nous pouvons

relier cette diminution à la rétraction de la cellule : en effet, la première série d'expériences avait permis de montrer que la transition entre la phase d'étalement et la rétraction des prolongements de la cellule se situe vers $4 Pa$ pour le type de canal utilisé ici (partie 3.4.2). Nous pouvons donc supposer que la diminution d'aire d'adhésion de la cellule est causée par la destruction de ses complexes d'adhésion et de la structure d'actine filamenteuse qui est essentielle dans la formation du lamellipode.

Nous avons également observé que la présence de la paxilline et de l'actine se renforce à l'avant de la cellule lorsque le cisaillement croît. Cette prédominance à l'avant apparaît cependant de façon décalée pour les deux protéines :

- La courbe de la figure 4.12 montre une hausse de la paxilline à l'avant de la cellule dès $3 Pa$. Le taux d'actine fluorescente est plus élevé à l'arrière pour les cellules cisailées jusqu'à $3 Pa$, puis l'actine devient majoritaire à l'avant de la cellule aux cisaillements plus élevés (Fig. 4.17).
- La proportion de paxilline augmente à l'avant et également sur les côtés des cellules cisailées jusqu'à $5 Pa$, tandis que pour l'actine, l'augmentation est surtout dans la zone directement exposée au flux.
- Aux contraintes maximales testées ($7 Pa$), la paxilline a presque retrouvé une répartition isotrope (Fig. 4.12 d), tandis que l'actine reste très majoritaire à l'avant de la cellule (Fig. 4.17 d).

Cette augmentation de la proportion d'actine à l'avant de la cellule subissant des contraintes de cisaillement croissantes était prévisible au vu de travaux précédents (Dalous *et al.*, 2008). Nous confirmons que sous l'effet d'un flux, la cellule tend à consolider le réseau d'actine qui soutient la membrane dans la zone la plus exposée. Nous avons également mis en évidence le recrutement de paxilline dans cette zone, ce qui montre que la cellule renforce aussi ses contacts focaux. Pour les valeurs de cisaillement les plus élevées testées ici, les structures d'actine résistent mieux que celles comportant de la paxilline : sur les cellules cisailées jusqu'à $7 Pa$, la dissymétrie vers l'avant persiste pour l'actine mais pas pour la paxilline. Ces différences dans la localisation de la paxilline et de l'actine en fonction du cisaillement appliqué à la cellule peuvent s'expliquer par le fait que les cinétiques de formation de structures constituées de ces deux protéines sont différentes. Ainsi, aux contraintes élevées, nous pouvons supposer que l'actine est recrutée vers l'avant de la cellule et polymérise pour stabiliser la membrane de la cellule. Cette hypothèse est en accord avec l'augmentation de la proportion d'actine à l'avant observée aux contraintes les plus fortes. Quant à la paxilline, sa proportion à l'avant diminue aux fortes contraintes : la cellule n'a

pas le temps de remplacer et renforcer ses contacts focaux détruits par l'écoulement. En effet, la formation des contacts focaux résulte de la maturation des complexes focaux suite à une série de réactions biochimiques.

5

CONCLUSION

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la réponse d'une cellule cancéreuse adhérente en présence d'un écoulement en géométrie confinée. Le dispositif microfluidique conçu et réalisé pour les expériences a permis une étude quantitative de l'adhésion cellulaire en conditions de flux. Nous rappelons les principaux résultats avant d'élargir la discussion sur les perspectives concernant ce sujet.

Dans un premier temps, nous avons déterminé l'évolution de l'aire d'adhésion cellule-substrat lorsque la cellule est soumise à un écoulement de plus en plus fort. Nous avons mis en évidence un comportement biphasique avec un étalement de la cellule lorsque les contraintes hydrodynamiques sont faibles, puis une diminution de l'aire de contact lorsque le flux est fort. La transition entre l'étalement et la rétraction des extensions de membrane de la cellule se produit à la contrainte de cisaillement critique de l'ordre de $4 Pa$. Nous avons déterminé la valeur de cette contrainte critique en fonction du confinement, i. e. de la hauteur du canal. Le dispositif expérimental que nous avons mis au point nous a permis de valider l'hypothèse que la contrainte critique est plus faible dans un espace confiné. Nos résultats expérimentaux ont ensuite été pris en compte dans un modèle physique nous permettant de donner un ordre de grandeur de la force adhésive totale exercée par la cellule sur le substrat. Ce modèle repose sur l'équilibre entre la force hydrodynamique, qui a tendance à décoller la cellule du substrat, et la composante horizontale de la force adhésive qui la maintient adhérente. Nous avons estimé l'intensité de la composante horizontale de la force adhésive lorsque l'aire de la cellule est maximale, c'est à dire dans des conditions d'écoulement correspondant à la contrainte de cisaillement critique.

Nous avons ensuite utilisé les techniques de fluorescence pour observer les modifications des zones d'adhésion focales et du cytosquelette de la cellule lorsque le flux augmente dans le microcanal :

- Le marquage de protéines intervenant dans les complexes d'adhésion telles que l' α -

actinine 4 et la paxilline pour localiser les zones d'adhésion focales.

- Le marquage de l'actine pour visualiser le cytosquelette d'actine.

Nous avons ainsi pu observer la colocalisation des zones focales et de l'actine à la périphérie de la cellule : les zones focales forment des structures ponctuelles disposées en couronne sur le pourtour de la cellule, tandis que l'actine est présente sous forme plus diffuse, formant un anneau à la périphérie de la cellule. Sachant que les complexes d'adhésion servent à relier les intégrines, liées aux ligands sur le substrat, au cytosquelette d'actine, il est normal de retrouver les zones focales et l'actine polymérisée aux mêmes endroits dans la cellule.

Nous avons dénombré les zones focales par cellule, d'une taille proche du micron². La fraction d'aire d'adhésion occupée par les zones focales est comprise entre 2 et 4 % en fonction de la contrainte de cisaillement, avec un maximum lorsque la contrainte de cisaillement à la paroi vaut $3 Pa$. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus lors des observations de l'aire d'adhésion en contraste de phase. La diminution de l'aire correspond à une diminution de la fraction occupée par des zones focales. Nous avons aussi caractérisé la répartition angulaire des zones focales par rapport à la direction du flux grâce à un traitement d'images adapté. Les résultats montrent que les zones focales sont réparties de façon isotrope à faible flux, puis se concentrent vers la région la plus exposée au flux aux conditions de cisaillement critique, à l'avant et sur les côtés. Lorsque le flux devient plus fort, on retrouve une répartition isotrope, les zones focales occupant alors une surface plus faible.

En ce qui concerne le cytosquelette, nous avons observé une relocalisation de l'actine lorsque les contraintes de cisaillement augmentent : majoritaire à l'arrière de la cellule à faible flux, l'actine s'accumule à l'avant de la cellule lorsque le cisaillement dépasse le cisaillement critique. Le recrutement de la paxilline, molécule intervenant dans les complexes focaux, et de l'actine à l'avant de la cellule lorsque le flux s'intensifie montre que la cellule cherche à renforcer ses ancrages dans la zone la plus exposée au flux. Nous pouvons supposer que les décalages observés dans la réorganisation des zones focales et de l'actine sont dues aux cinétiques de formation différentes pour les complexes focaux et la polymérisation d'actine. En effet, la polymérisation de l'actine suite à la reconnaissance récepteur-ligand est plus rapide que la maturation des points focaux en zones focales, qui résulte d'une voie de signalisation faisant intervenir plusieurs réactions en chaîne.

S'agissant du premier travail portant sur ce sujet au laboratoire, nous avons dû nous

limiter dans le choix des conditions expérimentales et des modes opératoires. Nous avons par exemple utilisé un mode d'application du flux unique, constitué de paliers de flux de 5 minutes. Il serait intéressant d'appliquer des plateaux de cisaillement plus longs afin de déterminer le temps nécessaire à l'établissement de l'équilibre pour chaque valeur de contrainte. Des paliers plus courts permettraient de voir l'effet d'une augmentation continue de la contrainte de cisaillement. D'autre part, au cours des expériences, nous avons toujours utilisé le même substrat fonctionnalisé, nous n'avons pas testé l'effet de la rigidité ni celui de la fonctionnalisation du PDMS constituant les microcanaux. Nous pourrions ainsi comparer l'adhésion sous différentes conditions en faisant varier ces caractéristiques du dispositif expérimental. Ayant démontré la faisabilité de notre protocole avec des cellules cancéreuses T24, il serait également intéressant de comparer plusieurs lignées cellulaires afin de voir si elles répondent de la même façon à l'écoulement. Est-ce que des cellules naturellement soumises à un flux de cisaillement répondent comme les T24 que nous avons testées, qui sont des cellules constitutrices d'un tissu de la vessie ? Le comportement de cellules plus invasives que les T24 (considérées peu invasives) est-il le même ? Les dernières expériences en fluorescence nous ont ouvert des perspectives pour poursuivre l'étude des effets d'un écoulement sur des cellules adhérentes. Nous envisageons en effet de suivre l'évolution de l'actine et des contacts focaux sur une même cellule au cours du temps au fur et à mesure que les contraintes hydrodynamiques augmentent afin de déterminer les temps caractéristiques des modifications du cytosquelette d'actine et des zones focales. Cela nécessite des transfections de cellules avec des plasmides codant pour des protéines fluorescentes présentes au niveau des complexes focaux, telles que la vinculine, ou des moteurs protéiques, comme la myosine. Une étape ultérieure pour se rapprocher des conditions de diapédèse *in vivo* serait de tapisser la paroi du microcanal de cellules endothéliales et de visualiser l'adhésion de cellules tumorales sur cette monocouche de cellules endothéliales.

Ce travail de thèse au Laboratoire de Spectrométrie Physique a donc permis de valider un dispositif expérimental microfluidique permettant de tester la réponse de cellules adhérentes soumises à un flux en géométrie confinée. A plus grande échelle, il s'inscrit dans le cadre des biotechnologies, domaine qui fait maintenant largement appel à la microfluidique. On pourrait envisager par exemple la caractérisation de cellules tumorales par leur réaction vis à vis d'un flux...

Modeling cell interactions under flow

**Claude Verdier · Cécile Couzon ·
Alain Duperray · Pushendra Singh**

Received: 26 July 2007 / Revised: 20 November 2007
© Springer-Verlag 2008

Abstract In this review, we summarize the current state of understanding of the processes by which leukocytes, and other cells, such as tumor cells interact with the endothelium under various blood flow conditions. It is shown that the interactions are influenced by cell–cell adhesion properties, shear stresses due to the flow field and can also be modified by the cells microrheological properties. Different adhesion proteins are known to be involved leading to particular mechanisms by which interactions take place during inflammation or metastasis. Cell rolling, spreading, migration are discussed, as well as the effect of flow conditions on these mechanisms, including microfluidic effects. Several mathematical models proposed in recent years capturing the essential features of such interaction mechanisms are reviewed. Finally, we present a recent model in which the adhesion is given by a kinetics theory based model and the

C. Verdier (✉) · C. Couzon
Laboratoire de Spectrométrie Physique, UMR 5588, CNRS and Université Grenoble I,
140 avenue de la physique, BP 87, 38402 Saint-Martin d'Hères Cedex, France
e-mail: verdier@ujf-grenoble.fr

C. Couzon
e-mail: ccouzon@spectro.ujf-grenoble.fr

A. Duperray
INSERM, U823, Grenoble, France

A. Duperray
Université Grenoble I, Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche Ontogénèse,
Oncogénèse Moléculaires, Grenoble, France
e-mail: alain.duperray@ujf-grenoble.fr

P. Singh
Department of Mechanical Engineering, New Jersey Institute of Technology,
University Heights, Newark, NJ 07102-1982, USA
e-mail: singhp@njit.edu

cell itself is modeled as a viscoelastic drop. Qualitative agreement is found between the predictions of this model and in vitro experiments.

Keywords Adhesion kinetics theory · Flow conditions · Cell rheology

Mathematics Subject Classification (2000) 65N30 · 70F35 · 76A10 · 92C17 · 92C45

1 Introduction

For several years, many researchers have devoted considerable effort to understand the interactions between cells and the endothelium occurring as the former travel through the blood stream, especially during inflammation or cancer metastasis. Cell–cell interactions are essential for circulating cells to make contact with the vessel walls (since a cell simply moves away from the wall in a pressure driven flow when no interactions exist) and eventually penetrate through the endothelial barrier [57,96]. This process is called extravasation and is influenced by several important factors:

- Cell adhesion properties and cell signaling,
- Flow conditions,
- Capillary geometry or the role of confinement,
- Cell’s rheological properties.

The mechanisms involved in the above processes are usually divided into several steps. Cells (i.e. leukocytes or cancer cells) first interact with the endothelium through the formation of weak bonds related to specific adhesion molecules, thus resulting in the rolling process. This process is well understood for leukocytes but is still under investigation for cancer cells. After this initial step, stronger bonds are required for the cell to be arrested [68]. Then cells are able to resist the flow, spread and migrate to reach potential sites where they are able to extravasate. This can happen either at cell–cell junctions [27] or directly through endothelial cells [79]. A typical sketch of the mechanisms is shown in Fig. 1. This figure also shows the relevant adhesion molecules for each stage. These adhesion molecules belong to four different superfamilies, namely selectins, integrins, immunoglobulins and cadherins.

We next describe the effect of shear flow on the migration of cells. It is known that circulating cells are usually located near the center of blood vessels. During inflammation neutrophils interact with erythrocytes and drift closer to the endothelium, a process known as margination [52,83], where interactions with the endothelium become more effective. This process is not well understood and seems to be due to RBCs aggregation tending to push neutrophils closer to the endothelium while the shear rate is lowered due to the presence of RBCs [83]. Furthermore, margination is also affected by cytokines which induce an increase in neutrophils migration. Finally, the confinement (in small capillaries) enhances the frequency of interaction between neutrophils and the endothelium.

In light of recent studies, the influence of the flow field on adhering cells under physiological conditions (in typical post-capillary venules shear stresses are between 0.1 and 20 dyn/cm² or 0.01–2 Pa) is better understood. The effect of flow on adherent

Modeling cell interactions under flow

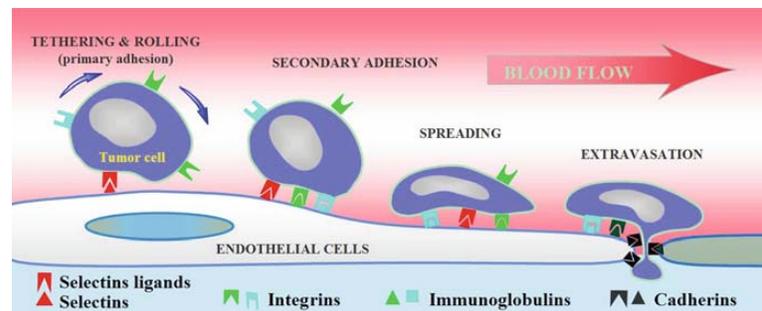


Fig. 1 Mechanisms involved in cell transmigration under flow. Identification of the major adhesion molecules

cells such as neutrophils can lead to either retraction of pseudopods [74,80] or the opposite [28] in the case of passive leukocytes. This means that depending on the state of cells' cytoskeleton, different cells behave differently because their microrheological properties are controlled by the cytoskeleton.

There are differences between leukocytes and cancer cells, some of which arise due to the fact that leukocytes are smaller and more motile. Also the mechanisms involved during transmigration suggest that cancer cells have smaller rigidities as compared to leukocytes [70,88]. Modeling this problem is therefore a considerably difficult task, as it requires taking into account all of the above effects.

Cell–cell adhesion has been considered previously in terms of energy landscapes [8] to explain how bonds can be broken when subjected to a force, such as that arising from hydrodynamic shear stress. This has led to the development of theories for the rate-dependence of forces, bond lifetimes and rolling velocities, and experiments have been performed to verify these theories for example using micropipettes [36] and AFM [39,76]. The rolling of cells is a subject of particular interest and has been studied extensively both experimentally and theoretically. In particular, it has been postulated recently that bonds between molecules can exhibit different mechanical behaviors when stressed, responsible for the tethering and rolling of leukocytes [76]. Such bonds can either show a shorter lifetime when subjected to mechanical forces, or exhibit a prolonged lifetime when possible interlocking between molecules occurs (i.e. the so-called “catch-bonds”). The debate on this issue is still ongoing [20], and is critical for addressing the major question of the threshold effect, i.e. the minimum level of shear rate necessary to achieve cell rolling [23]. Applications to cell rolling problems have been considered from different points of views. For example, adhesion phenomena have been treated in idealized situations where cells adhere to a wall. One can model the attraction or repulsion using a simple potential energy [97] corresponding to attraction when cells are not to close. As a cell comes closer to the wall, a repulsive force acts such that it cannot get closer than a critical distance. Another way to model cell adhesion is to consider the associated kinetics equation leading to bonds formation and dissociation (forward and reverse reactions between receptor and ligand molecules). This allows to predict the bond density and therefore the force necessary for cell detachment [31,46]

but other models like stochastic ones are also of interest, relying on predictions based on probabilistic events [42, 105].

To model adhesive forces accurately, it is necessary to account for the cell flattening under flow, since it leads to the formation of an increased number of bonds [32]. Therefore in recent more realistic models the cell is described as a composite drop [82] with a nucleus and a cytoplasm or as a capsule with a viscous fluid surrounded by a membrane [6, 55, 66]. The literature about membranes is quite rich and also relevant for modeling vesicles (viscous fluid with a membrane allowing for bending effects only, together with a conserved area) [12, 90], which are more suitable models of red blood cells (RBCs). In recent years, the deformation of cells has been simulated numerically using these more realistic models, employing several different numerical approaches [56, 62, 82], leading to quite realistic comparisons with experimental data for leukocytes.

In this paper, we will review the main issues important for the understanding of cell–endothelium interactions. In Sect. 2, we analyze the different adhesion proteins and signaling events taking place during cell transmigration. In Sect. 3, the effect of the flow on cell rolling is investigated as well as its influence on cell adhesion in view of our recent experiments. Possible explanations are presented. Then we describe models leading to kinetic adhesion theories [8, 31, 47] which have been used extensively (Sect. 4). Finally, the importance of cell deformability described by several viscoelastic cell models is discussed (Sect. 5). Some of the results obtained using a model proposed by us for investigating the rolling behavior of a composite viscoelastic cell under flow [56] are described.

2 Adhesion molecules involved in cellular interactions

In most cellular systems, cells are subjected to different forces giving rise to a competition between repulsion effects (electrostatic, steric ones) and attractive effects (specific bonding), also influenced by the presence of long polymeric macromolecules called adhesion molecules. Thermodynamic theories offer an interesting basis to study this competition [9] and allow one to predict how two cells get in contact, deform and adhere to each other. Cells are usually surrounded by a glycocalyx layer (typically 5–10 nm) which is thin enough for macromolecules to penetrate and create stable links. These links or bonds can become quite strong, especially when they involve mechanical interlocking, and are often named **receptor–ligand** bonds. Individual bonds come from a combination of van der Waals attraction, hydrophobic contact and hydrogen bonding, thus leading to a high binding energy, and require conformational recognition by both receptor and ligand molecules (or macromolecules). Receptors are usually transmembrane proteins, also named **Cell Adhesion Molecules** (CAMs) usually divided into several families or superfamilies. These families of molecules are responsible for the formation of cell–cell junctions, cell recognition, migration, growth, metabolism and cell signaling.

2.1 Adhesion molecules superfamilies

The four main families of molecules are shown in Table 1 and have the following properties [25, 71, 84, 102] :

Modeling cell interactions under flow

Table 1 Main adhesion molecule superfamilies with description and interactions

Molecule family	Type of bonds formed	Associated receptors
Cadherins (E-Cadh, N-Cadh)	Homotypic	Cadherins (E-Cadh, N-Cadh)
Integrins (LFA-1, Mac-1)	Heterotypic	Immunoglobulins, ECM
Immunoglobulins (ICAM-1, PECAM-1)	Homo/Heterotypic	Immunoglobulins/Integrins
Selectins (E-selectin, P-selectin)	Heterotypic	Glycoproteins (PSGL-1)

Examples of molecules involved in cell transmigration are indicated in parenthesis

- Cadherins (E-Cadherins, etc.). They interact with themselves (homotypic bonds) and create strong bonds like in the case of cell–cell junctions (for example at the junctions between the endothelial cells making the vascular wall). E-Cadherins are important as their down-regulation seems to be responsible for the loss of adhesion involved when tumor cells escape from an initial tumor [81] to become invasive. Differential expression of Cadherins might also be involved during cell segregation into tissues [40].
- Integrins. They form heterotypic bonds usually with the immunoglobulins molecules or the Extra-Cellular Matrix (ECM). Typical integrins present on the leukocyte (LFA-1 or Mac-1) or tumor cell (Fig. 1) interact with immunoglobulins such as ICAM-1 or PECAM-1 on the endothelial cells side and form strong bonds responsible for cell arrest. Integrins are composed of two subunits (α and β chains) enabling to modify their conformation to adapt to the ligand, for example when intracellular signals make them switch from an inactive form to an active one. By interacting with the ECM, integrins are particularly involved in cell migration [41].
- Immunoglobulins. They can form both heterotypic and homotypic bonds. For example N-CAM binds with N-CAM and similarly PECAM-1 binds with PECAM-1. On the other hand VCAM-1 (an immunoglobulin) binds with VLA-4 of the integrin family. These bonds, as indicated above, can lead to firm cell–cell adhesion.
- Selectins. They are heterotypic molecules. P-selectin and E-selectin form bonds with glycoprotein PSGL-1, ESL-1 and CD44 (carbohydrate sites on the leukocytes) whereas L-selectin interacts with CD34. Such interactions are responsible for the rolling of leukocytes, a prerequisite for the activation of integrin bonds [68]. The mechanical anchorage of P-selectins with PSGL-1 seems to be responsible for the “catch-bond” effect [76].

2.2 Interactions at the cell–cell level and signaling

As discussed earlier, at the molecular level, adhesion proteins are responsible for the receptor–ligand bonds which lead to microscopic adhesion at the cellular scale.

Cooperative effects are necessary to obtain higher levels of forces [39,104] and a simplified cooperative model indicates that such effects can be additive [17,39]. This can be measured by different techniques such as optical tweezers, AFM, the Surface Force Apparatus (SFA) and micropipettes [69]. To sum up, typical bonds are in the range 5–100 pN [78] depending on loading rates, but cell–cell contacts requiring the recruitment of interconnected multiple bonds may range up to 0.1–10 nN, depending on cell contact area [10]. Cells in contact with a substrate form focal contacts [11] whose size and number increase with a stiffening of the matrix elasticity [24]. Such focal contacts (around $1\ \mu\text{m}^2$ in size) usually develop forces in the range of $5\ \text{nN}/\mu\text{m}^2$ representing about 250 molecular bonds. These contacts contain mainly proteins of the integrin type linked to molecular clusters containing many intracellular proteins (FaK, α -actinin, vinculin, talin, paxilin) connecting these areas with the cytoskeleton. Thus cells can use molecular clusters to exert traction forces on the substrate. When different cells are connected with each others, it is likely that the breaking of bonds can be done either in a cooperative or independent way, in a stochastic manner. Kinetic models of bond breakup and formation will therefore be presented in Sect. 4. Cell adhesion molecules also play an important role in the structure of tissues through mechanical interactions, and permit communications between adjacent cells.

As soon as cells are in contact, signaling events take place. This, for example, occurs during the first leukocyte–endothelial cell interaction (rolling for example). Adhesion proteins then play the role of mechanical transducers producing outside-in signals, and signals induce the activation of proteins required to make firm bonds or to reinforce adhesion sites [2]. Signaling also takes place through smaller soluble molecules (cytokines, growth factors) released by cells acting over long distances. Together with CAMs, the complete picture leads to arrays of signaling pathways whose complexity is still under investigation, but it is understood that they influence the mechanisms governing cell–cell interactions, deformation and migration.

3 Influence of flow on cell motion

Many studies have attempted to analyze the influence of blood flow on the motion and interactions among cells. Blood is constituted mainly of red blood cells (RBCs), platelets and a few leukocytes (neutrophils, eosinophils, monocytes, lymphocytes or basophils) contained within the blood plasma. Usually there is ratio of 1:700 of leukocytes as compared to red blood cells. Blood is known to be a Yield stress fluid, and so it can flow only when shear stresses are strong enough to break interactions between cells, such as “rouleaux” structures formed by RBCs through cell aggregation. Interactions between cells can therefore lead to a rather complex rheology [101] and contact between circulating cells and the endothelium are only possible under certain circumstances, like during inflammation, or in cancer metastasis.

3.1 Rolling motion

During inflammation, a larger number of leukocytes are recruited at the inflammation sites. The process of margination relies on the separation of RBCs and leukocytes,

Modeling cell interactions under flow

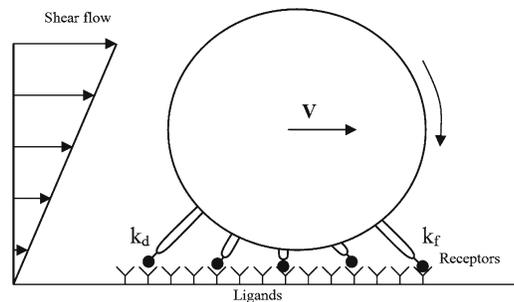


Fig. 2 Sketch of the motion of a cell rolling at velocity V with formation and dissociation of receptor–ligand bonds. Receptors are assumed to be located at the end of tethers (redrawn from [23])

which leads to the relocation of leukocytes close to the vascular wall. Inflammation cytokines are responsible for the expression of E-selectins and P-selectins on the endothelium, interacting with their ligands (Fig. 1), i.e. carbohydrate receptors on the leukocyte membrane. Thus the rolling motion of the margined leukocytes can take place. This phenomenon has been observed *in vivo* using techniques like intravital microscopy in rat mesentery venules [52] and has been combined with confocal microscopy to study cancer micrometastasis [53].

In vitro experiments have been carried out to investigate the rolling of leukocytes on functionalized surfaces [23] (E or P-selectin coated surfaces) or along an endothelium monolayer [25]. Such studies are achieved in flow chambers allowing simultaneous microscopic observations. The flow rates and pressure drops can usually be monitored as well [26]. Physiological conditions encountered in post-capillary venules, are also achieved in these experiments.

When subjected to a flow field, corresponding to an almost linear gradient [61] close to the wall, circulating cells exhibit adhesive transient interactions with the selectin-coated wall. They roll, with the center of mass velocity V , by rapidly forming new receptor–ligand bonds at the front and breaking them at the rear. In fact, reactions between ligands and receptors seem to happen at the end of tethers or microvilli (typical diameter $0.1 \mu\text{m}$), as sketched in Fig. 2. The rolling velocities V are in the range of a few $\mu\text{m/s}$ [68], whereas blood velocity is in the range of $10\text{--}10^3 \mu\text{m/s}$. Because rolling velocities are small, the expression of chemoattractants on the endothelial side is possible, leading to activation of the heterotrimeric G-protein which drives the activation of integrins until the cell is arrested [96]. There is a critical phenomenon, namely, the shear threshold effect, which occurs at low levels of shear stresses [23]. Cells like leukocytes are unable to roll at small shear stresses. Above this critical level, cells begin to roll with a velocity approximately independent of the shear stress. According to these authors it seems that the wall shear rate increases the rate of dissociation of receptor–ligand bonds but this effect is compensated by an increase of the number of bonds thus resulting in a slowly varying rolling velocity as a function of shear rate [4], in agreement with Bell's model [8] (see Sect. 4.1). Rolling on a surface coated with L-selectins is much faster than on those coated with E-selectins

and P-selectins. This can be explained in terms of kinetics of dissociation but also in terms of compliance, i.e. the sensitivity of the dissociation with respect to the applied force [3]. Transient behaviors have been observed by measuring rolling velocities undergoing rapid fluctuations [3,56] due to the fact that few tethers are necessary to achieve cell attachment, and that binding is quite fast, i.e. happens in a second or less. Investigating the effect of P-selectin densities during rolling of leukocytes, Alon et al. [4] also observed a linear dependence of the number of bond cells per unit area as a function of time and confirmed that the receptor–ligand bond formation is a first order reaction.

3.2 Effects of flow on an adhering cell

Several different approaches have been used to investigate the influence of the fluid shear stress on adherent cells, both *in vivo* and *in vitro*. Two types of responses have been observed.

- Neutrophils adherent to the wall of a fluid chamber retract their surface projections when subjected to a laminar shear flow (5 dyn/cm^2 or 0.5 Pa) [74]. Applying fluid shear stress (0.4 dyn/cm^2 or 0.04 Pa) with a pipette on an adherent leukocyte also has the same effect [80]. Cessation of blood flow in a microvessel leads to the emission of pseudopods by leukocytes, which retract when flow is restored [80]. When flow is applied locally onto the lamellipodium, cell protrusions also stop very abruptly in the region of hydrodynamic load (10 dyn/cm^2 or 1 Pa) [14]. Mechanical stress generated by cyclic variations of the substrate area [34] seems to make the cell volume smaller.
- An opposite response has also been observed: individual adherent leukocytes respond to the flow applied by a micropipette (corresponding to shear stresses between 0.2 and 4 dyn/cm^2 or 0.02 – 0.4 Pa) by projecting pseudopods and spreading on the coverglass [28].

The differences observed in response to a fluid shear stress may be due to the initial state of the cells: passively adherent [28] (i.e. round cells not adhering specifically to the substrate), or actively adherent [80] (cells already showing protrusions). The role of the cytoskeleton in a cell's response to fluid shear is also ambiguous. Treating cells with actin-disrupting agent and myosin inhibitors demonstrate that the spreading response to shear stress application requires an intact cytoskeleton and active myosin filaments. The glycocalyx could be washed away by the fluid, revealing previously hidden receptors and sites for adhesion, and also reduce the electrostatic, osmotic and steric forces between the cell and the substrate, thus enhancing spreading. For the retracting case, the effect of the flow on the cytoskeleton is not as clear. Fluid stress leads to F-actin breakdown [80], whereas chemical composition in the stressed region is not altered and actin polymerization is not abolished by the flow [14]. For cells stressed mechanically, F-actin organization is modified with the appearance of radial stress fibers converging to the actin-rich center [34]. The cause of this cytoskeleton alteration is not well understood. On the one hand, the rapidity of the cell response (in the range of seconds, which is not enough for protein synthesis [80]) suggests that some signal transmission occurs across the cell membrane via ionic channels.

Modeling cell interactions under flow

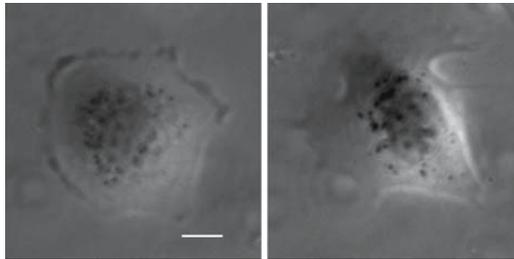


Fig. 3 Cell subjected to an increasing shear flow in our experimental microfluidic chamber. Walls are coated with fibronectin (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 1 h). *Left* $\sigma = 0.7 \text{ dyn}/\text{cm}^2 = 0.07 \text{ Pa}$, *right* $\sigma = 350 \text{ dyn}/\text{cm}^2 = 35 \text{ Pa}$. The flow direction is from right to left. Scale bar is 10 μm

On the other hand, the small GTPases of the Rho family may play a role in the shear-induced signaling pathway [74]. Finally, this alteration could still be a result of a purely mechanical response.

Experiments with cells adhering to microchannel walls coated with different fibronectin concentrations and subjected to flow show that ligand density strengthens cell adhesion. This is consistent with the slower detachment of an adherent cell by a fluid flow due to an increase in the ligand density [19]. The influence of the shear intensity has also been studied. An increased fluid shear stress leads to a larger cell deformation leading to a faster detachment, in agreement with other studies where the percentage of detached cells is higher at higher shear stresses [72]. The dynamics of cell detachment seems to be progressive, following a peeling process [30–32], as observed in side-view microchannels [19].

The role of confinement has not been fully understood. In fact, in small microvessels for which the channel and cell dimensions are of the same order, the flow can considerably alter the behavior of adherent cells subjected to shear stresses. To mimic the microvessel environment, we performed experiments in our lab using a microfluidic device. After inserting cells in the microfluidic parallelepipedic functionalized chamber (fibronectin, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 1 h), we allowed them to sediment and adhere on the wall and then they were subjected to an increasing shear stress σ (Fig. 3). It appears that cell area first increases with time at low shear stresses ($\sigma < 20 \text{ dyn}/\text{cm}^2$), then exhibits a maximum and finally decreases at high shear stresses ($\sigma > 210 \text{ dyn}/\text{cm}^2$) as shown in Fig. 4. The positive linear slope of the “area-time” plot at low flow rate means that an adherent cell responds to the flow by spreading on the substrate, which is in agreement with the previous observations of passively adherent cells [28]. This probably allows the cell to reinforce its anchoring to counterbalance the drag force due to the flow. Thus an adherent cell can resist the flow by increasing its area. The maximum of the cell area observed could correspond to an equilibrium where the cell–substrate adhesion torque exactly equilibrates the torque exerted by the flow on the cell. For higher shear stress values, the anchoring torque is not strong enough and the cell cannot resist the flow, its area begins to decrease until detachment from the substrate.

C. Verdier et al.

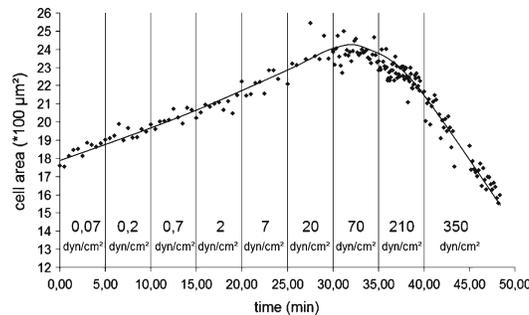


Fig. 4 Evolution of the area of a cell subjected to an increasing shear stress in our microfluidic channel (height $\sim 230 \mu\text{m}$ and width $\sim 1 \text{mm}$). The line is to guide the eye

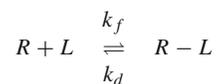
Further studies are under way to link the observed cell response to the mechanisms governing adhesion, spreading and migration, like the formation of focal adhesion sites and the reorganization of the cytoskeleton.

4 Models for adhesion kinetics

The development of models for bond formation and rupture is a prerequisite to understand cell–cell interactions at rest or under flow conditions. Bell [8] proposed a theoretical framework for the study of reversible bonds.

4.1 Bell's model [8] and its improvements [37]

The basis of the theory is to consider interactions between a receptor R (located on the cell membrane for example) and a ligand L (on an adhesive plane or on another cell membrane) resulting in the formation of a bond $R - L$. The reversible reaction can be written as:



where k_f and k_d are the respective formation and dissociation constants of the reaction. Possible intermediate states may be required, corresponding to positioning (or diffusion) of the receptors and ligands along the membrane so that encounters are possible. These processes may therefore imply a dependence of k_f and k_d on diffusion constants, as a prerequisite for bond association. Such ideas have been used in combination with the geometric constraints to predict the shear threshold effect [20]. In general, we limit ourselves to the only one first-order reaction noted above. The overall constant at equilibrium is defined as $K = \frac{k_f}{k_d}$. Depending on the value of this constant K , the reaction might enhance formation or dissociation of bonds.

We now consider that N_1 receptors and N_2 ligands per unit area react according to the above reaction and that N bonds are formed. Therefore, the time evolution of the bond density N can be written:

$$\frac{dN}{dt} = k_f(N_1 - N)(N_2 - N) - k_d N \quad (1)$$

The long-term equilibrium solution of this equation for N_∞ is given by $N_\infty = \frac{1}{2}(N_1 + N_2 + \frac{1}{K}) - \frac{1}{2}\sqrt{(N_1 + N_2 + \frac{1}{K})^2 - 4N_1N_2}$. Notice that the other solution of the above quadratic equation is not physical [8,56]. It can be shown that the analytical solution of (1) evolves with time to reach N_∞ in steady state. To investigate the dependence of k_d on force F , we suppose that bonds can be broken faster when a larger force is applied, and that their lifetimes will be reduced exponentially with an increase in the applied force F . Therefore we assume :

$$k_d = k_d^0 \exp(\gamma F/kT) \quad (2)$$

where γ is a typical distance, k is the Boltzmann constant, T is temperature. For a given applied force F balanced by N bonds, the steady solution of Eq. (1), using (2) after replacing F by F/N , gives equilibrium solutions only if F is larger than some typical value F_c necessary to detach the cell. This may be one of the necessary conditions for obtaining cell rolling, in relation to the shear threshold.

Bell also proposed to consider the free energy associated with a single bond, against the distance separating ligands and receptors. The energy landscape is displaced as long as a force is applied, therefore lowering the energy barrier necessary to achieve separation. This idea has been developed further by Evans and Ritchie [37,39] by applying Kramers' theory for reaction kinetics to bond rupture [65]. By definition, the breakage force is the most probable force that can be obtained during bond breakage tests. Using Monte Carlo simulations [37], they tested the ability of the model to predict peaks in the force at rupture, as a function of the loading rate. First they find a slowly increasing regime of force, in relation with the binding potential. Then a second regime shows a rapid increase independent of the attraction (range of usual experiments such as AFM). Finally, a very fast increasing regime appears corresponding to difficult molecular dynamics simulations. They modeled the results of their simulations in terms of the energy landscape including the application of the force F to the bond (see Fig. 5), and obtained a formula for the off-rate frequency ν , which is found to vary like:

$$\nu \sim \nu_0 \left(\frac{F}{F_\beta} \right)^b \quad (3)$$

where ν_0 is a typical frequency, F_β is a characteristic force, and b is an exponent. Finally the most probable breakage force F^* is found to scale as $F^* \sim \ln(r_f)$, where r_f is the loading rate used in the experiments. Such results with three different slopes in the force-rate diagram $F - \nu$ have also been confirmed experimentally [78] in the case of the biotin-avidin complex.

C. Verdier et al.

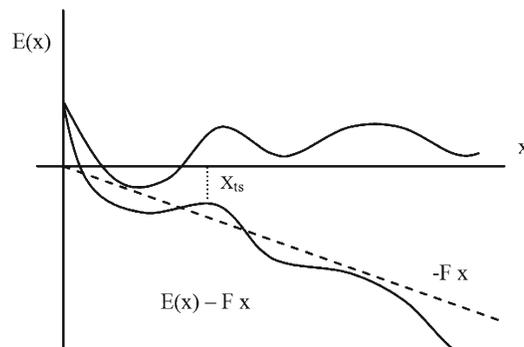


Fig. 5 Typical energy landscape for receptor–ligand bond. Bonds are easier to break under application of a force F . The shape of the well(s) depends on the types of forces and the possible close presence of other bonds. E is the free energy, X is the reaction coordinate. X_{ts} is the position of the transition state under applied force F

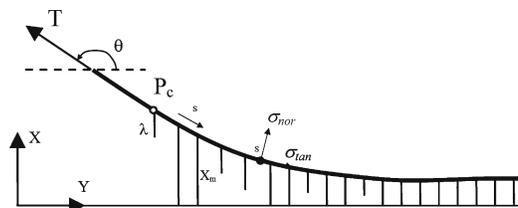


Fig. 6 Sketch of the membrane pulled by force T . P_c is the point where the bond density is vanishing (or is very small). P_c moves in time and is the origin of curvilinear coordinates ($s = 0$). The velocity of P_c is the peeling velocity. The equilibrium of the membrane is written at any point given by its arc length s . Tangential and normal forces σ_{tan} and σ_{nor} (respectively) exerted by bonds are also shown. λ represents the free length of a bond and x_m is the bond length under stress. θ is the angle under which force T is applied. Redrawn from [31]

4.2 Adhesion kinetics model [31,38]

The work of Bell was used later by Dembo et al. [31] in an approach combining the mechanical aspects of membranes, considered to be elastic, together with the adhesion model described above. The basic idea is to assume that the cell membrane is in close contact with a rigid substrate, when bonds already exist. The membrane is supposed to be pulled by a force T applied at one end, while it is fixed at the other end. A membrane element is assumed to be elastic, and submitted to a tension $T(s)$ and bending moment $M_b(s)$. s is the arc length in the frame moving with the contact point P_c between the membrane and substrate (see Fig. 6).

The equations of motion for the membrane are given by use of beam theory for a thin membrane layer [31,38]:

$$\frac{\partial(T + \frac{1}{2}MC^2)}{\partial s} = -\sigma_{\text{tan}} \quad (4)$$

$$M \frac{\partial^2 C}{\partial s^2} - CT = -\sigma_{\text{nor}} \quad (5)$$

where C is the curvature, and M is the bending modulus. The contact point P_c is not fixed and can move with a certain velocity. In these equations, the quantities σ_{tan} and σ_{nor} correspond to the tangential and normal forces exerted by the bonds in the normal direction $\sigma_{\text{tan}} = N\kappa(x_m - \lambda) \cos \theta$ and $\sigma_{\text{nor}} = N\kappa(x_m - \lambda) \sin \theta$, where κ is the elastic bond constant, N the density of bonds as introduced in Sect. 4.1, x_m and λ are respectively the bond lengths after stretch and under zero-load, and finally θ is the angle between the membrane and the substrate. These equations can be solved together with the proper boundary conditions: (1) At the fixed end of the beam (i.e. the elastic membrane sheet), there is no displacement nor any normal stress. (2) At the free end, the applied force and angle are imposed. The density of bonds is assumed to follow Eq. (1) while the formation and dissociation constants k_f and k_d are given, respectively, by:

$$k_f = k_f^0 \exp\left(-\frac{\kappa_{\text{ts}}(x_m - \lambda)^2}{2kT}\right) \quad (6)$$

$$k_d = k_d^0 \exp\left(\frac{(\kappa - \kappa_{\text{ts}})(x_m - \lambda)^2}{2kT}\right) \quad (7)$$

where k_f^0 and k_d^0 are constants, and κ_{ts} is the spring constant of the transition state, so that the only difference between the transition and bonded states is a change in the spring constants used in Eq. (7), corresponding to different bonds:

- For $\kappa_{\text{ts}} > \kappa$, the bonds have a stiffer spring at the transition state therefore $k_d \rightarrow 0$ for large x_m . Bonds are mechanically locked: “**catch-bonds**”.
- For $\kappa_{\text{ts}} = \kappa$ bonds are dissociated easily and are called “**slip-bonds**”.

This work resolves the coupling between micromechanical effects (i.e. forces within the bonds) and the macroscopic effects, i.e. the global force necessary to achieve “peeling” of the membrane. The main results obtained in the paper of Dembo et al. [31], using mathematical and numerical formulations are the following:

- There is a minimum value of the tension required to move the membrane, which can be regarded as a surface tension like effect as in the case of liquids.
- For a constant peeling force, the peeling velocity (motion of point of contact P_c) reaches a steady state after some time.
- Experiments conducted for rolling granulocytes [5] are in good agreement with the above model.

The assumption of “catch-bonds” suggested in [31] has been a source of interest but it was only after the advent of new methods for measuring small forces such as the Atomic Force Microscope (AFM) [13], the Surface Force Apparatus (SFA) [54] or micropipettes [38] that the existence of catch bonds could be confirmed.

C. Verdier et al.

Zhu et al. [76] combined the use of AFM and flow chamber experiments. Using AFM, they showed that selectin–ligand bonds lifetimes first increased (catch-bond) and then decreased (slip-bonds) as force increases. This was verified for leukocytes subjected to shear stresses. The lifetime increased with increasing shear stress and then decreased, which is a signature of catch bonds.

A further approach [32] based on the above model to study the whole cell deformation will be discussed in Sect. 5.1.

4.3 Models for describing cell rolling—stochastic models

There have been a number of attempts to model the rolling motion and adherence especially in the case of leukocytes on selectin-coated surfaces. Initial attempts were from Hammer and Apte [46] who proposed to model cells by including microvilli where adhesive springs are located. Then, using statistical fluctuations of receptor–ligand binding, they modeled the whole range of phenomena, including rolling, transient attachment and firm adhesion. To do so, they assumed that the probability P_f for a receptor located at a distance x_m from the substrate to bind the ligand is given by:

$$\frac{dP_f}{dt} = k_f (1 - P_f) \quad (8)$$

For a single time step Δt , the solution of (8) is given by:

$$P_f = 1 - \exp(-k_f \Delta t) \quad (9)$$

During each time step, the probability P_f is calculated for each microvilli and compared with a random number generated between 0 and 1; if this number is less than P_f , only then a bond is created. Similarly, the probability for a bond to break P_d is given by:

$$P_d = 1 - \exp(-k_d \Delta t) \quad (10)$$

The contribution of each bond, as explained previously in Sect. 4.2 is given by a force $F = \kappa(x_m - \lambda)$ in the direction of the bond. Then the contribution of each bond is inserted into the total force and torque exerted on the cell, to which is added the contribution of colloidal forces (van der Waals, electrostatic interactions, steric stabilization forces), hydrodynamic forces and gravity. The velocity field \mathbf{v} is obtained from the mobility tensor \mathbf{M} through:

$$\mathbf{v} = \mathbf{M}\mathbf{F} \quad (11)$$

where \mathbf{F} is the total force corresponding to colloidal, hydrodynamic and bond forces. The mobility tensor \mathbf{M} is known [15, 44, 45] in the case of a sphere traveling through a fluid close to a wall. Finally, the new position of the bonds is calculated from the known velocity field. At each subsequent time interval Δt , the process is repeated and

all variables including the rolling velocity are updated. Simulations [46] provide interesting fluctuating velocities as observed experimentally [56]. Different parameters, such as the receptor density on microvilli, ligand densities, reaction rates, stiffnesses and the hydrodynamic effects, can be obtained and compared with experiments. For example, an increase in the number of microvilli has been shown to reduce the rolling velocities. Satisfactory agreement was found with previous experiments [68].

Such models have been used to predict the influence of shear rate and ligand and receptor densities on the rolling velocity [21]. Another systematic approach suggested by the same group [22] is to represent all results on a state-diagram where different constants, such as the biophysical adhesion properties, are plotted. This mapping allows us to find regimes of transient adhesion, rolling and no adhesion. In a complementary approach [64], simulations of multiparticle adhesive dynamics are produced, including hydrodynamic interactions to explain the effect of collisions to enhance the capture of leukocytes on adhesive walls.

A final more exact model of this type has been introduced recently [20], in order to explain the shear threshold effect. Indeed, when submitted to a slow shear flow, neutrophils roll and the rolling velocity attains a minimum when plotted against the shear rate, which as noted before is known as the shear threshold effect [23]. The recent model [20] uses two supplementary ideas: the first one is to assume an off-rate k_d which enables the description of a catch bond as mentioned earlier [36]. The second idea is to take into account the possibility of encounters between receptors and ligands through a geometry-dependent probabilistic function, i.e. receptors can only encounter those ligands being in a close range and only if the interaction time is sufficient. This model has been tested using parameters from the literature and seems to be in fair agreement (base case), but is in even closer connection with experiments when parameters are adjusted (best case). In particular a clear minimum in the rolling velocity is found as a function of the shear rate, thus explaining the threshold effect.

Another approach had been proposed by Zhao et al. [105], based on a stochastic model for the micromechanical description of the rolling motion of a cell. The cell's trajectory is considered to be a stepwise function of time with stepsize h and waiting time t_2 . The velocity distribution function $p(v, t)$ is assumed to obey a Fokker–Planck equation using drift and diffusion coefficients $A(v)$ and $B(v)$ respectively:

$$\frac{\partial p(v, t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial v} A(v)p(v, t) + \frac{1}{2} \frac{\partial^2}{\partial v^2} [B(v)p(v, t)] \quad (12)$$

$A(v)$ and $B(v)$ are estimated by ensemble averaging over the whole cell population. $A(v) = (\bar{v} - v)/\Delta t$, where $\bar{v} = \bar{h}/\tau_2$ is the moving average velocity. \bar{h} is the mean of the step size jumps h , τ_2 is the mean waiting time (release of bond clusters) and Δt is the observation time for ensemble averaging (time window). They find $B(v) = 2\bar{h}/(\Delta t)^2(1 + (\sigma_h/\bar{h})^2)v$, where σ_h is the variance of h . Analytical expressions can then be obtained for the mean rolling velocity and its variance in the case of homogeneous populations, and separation of temporal fluctuations and heterogeneity can be obtained in other more general cases. Results are in good agreement with experiments [58]. Note that similar approaches based on the concept of master equations [86] have also been developed and tested successfully. To illustrate the fluctuation effects, we

C. Verdier et al.

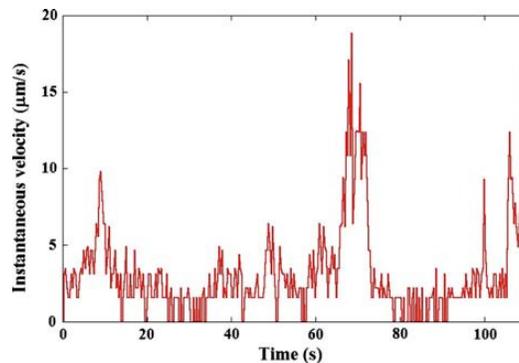


Fig. 7 Instantaneous velocity of a leukocyte rolling on the endothelium in a flow chamber. Fluctuations are clearly visible. Velocities are measured using the time-lapse images taken from a movie of a rolling cell. The flow velocity is around 1 mm/s, and the average rolling velocity is estimated to be 3 $\mu\text{m/s}$

present our experiments that were performed in a flow chamber where an endothelial cell monolayer has been cultured. Leukocytes are injected into the stream. As seen in Fig. 7, the instantaneous velocity of a rolling leukocyte undergoes fluctuations which we believe are mainly due to irregular bond densities, roughness of the endothelium, and irregular formation and breakup of tethers.

To conclude, we observe that the predictions for the rolling motion of a cell are now reasonably well understood, but there is still a need for introducing the effect of cell deformability, which is discussed in the next Sect. 5.

5 Effect of cell deformability on cellular interactions under flow

In Sect. 5.1, we present different ways to model cells at the microscopic or macroscopic levels. Then, in Sect. 5.2, we present the cell-interaction models.

5.1 Description of cell models [101]

There has been considerable interest in the mechanical modeling of cells during the past 40 years. A cell is a very sophisticated system [101] that cannot be modeled as a continuum although it might be convenient to do so, depending on the scale of the problem considered. Recently, advanced techniques for measuring microrheology have been developed, some of which are quite similar to the ones used by researchers interested in measuring cell–cell adhesion. AFM [1,16], micropipettes [51,103], optical tweezers [13,49], particle tracking microrheology [29,77] have been applied for the investigation of local cellular properties, like the ones involved in cell migration [67].

Cells change their rheological properties continuously. Their cytoplasm exhibits a frequency-dependent behavior, close to that of a physical gel. Its essential properties

depend on the organization of filaments, in particular actin. Recent studies [7] on the rheology of model biopolymer networks showed that such systems are highly heterogeneous in space and time and in close relation to biological functions. The cell nucleus can be considered to be elastic or viscoelastic. The membrane has bending properties but elastic properties as well and is extensible like a capsule [6]. Note that this extensibility is more likely due to membrane traffic or unfolding of the membrane. The membrane bending effect, as described by vesicle models with constant area [90], is enough to describe a rich variety of cell motions, in relation with RBCs. “Tank-treading” and “tumbling” motions have indeed been simulated [12] and were previously reported in experiments [73,89]. Describing the cell’s intrinsic behavior as a function of time and space is still rather difficult to do. Therefore, there have been a few attempts to describe the cell heterogeneity in the literature, one such example is the modeling of cell division based on a nonhomogeneous cytoskeleton [48].

In order to study cell interactions, cells were first modeled as beads covered by adhesion molecules [22,64]. This is in fact no surprise since leukocytes are usually round and rigid and the main objective was to look at adhesion forces to model such interactions. These studies allowed researchers to construct cell adhesion diagrams and the possibility to model cell interactions. Then other studies considered cell deformation [32,60,91,100] by using numerical methods designed for tracking moving boundaries. The idea of the composite droplet model for describing a cell with cytoplasm and nucleus was initiated by Tran-Son-Tay’s group [60]. They mainly studied the cell rolling behavior in the two-dimensional case and estimated rolling velocities. Another study [32] used a capsule model [6] coupled with Dembo’s adhesion kinetics model to look at the influence of flow on adhering cells. They found that an increase of flow rate or a decrease in membrane elasticity both enhance cell deformation, inducing the formation of new bonds, thus increasing adhesion forces, which was verified experimentally.

In the past decades, several new techniques have been developed to study the motion of cells in three dimensions [55,56,62]. Two basic cell models have been investigated: the cell is either a composite droplet made of two viscoelastic fluids [56,62] or is considered as a capsule [55]. In both cases, the adhesion kinetics model [31] was coupled with deformation theories in order to predict how cells interact with an adhesive wall under flow. Major differences were found: in the first model [55], cells took a flat shape with large surface contact area, whereas in the second one [62] cells interacted with the wall by forming only a few tethers at contact and the cell shape became quite elongated, in contrast with the first model [55].

5.2 An example: the viscoelastic cell composite model [56]

In this final section, we consider the problem of a deformable cell in contact with the endothelium, modeled as a planar surface. The cell itself is modeled as a viscoelastic composite droplet, with interfacial tension acting on the cell and nucleus surfaces. Both nucleus and cytoplasm can be considered to be viscoelastic. The adhesive interactions with the wall will be considered in two different ways: either with an attractive-repulsive potential [97], or using the kinetic adhesion model [31] described in Sect. 4.2.

C. Verdier et al.

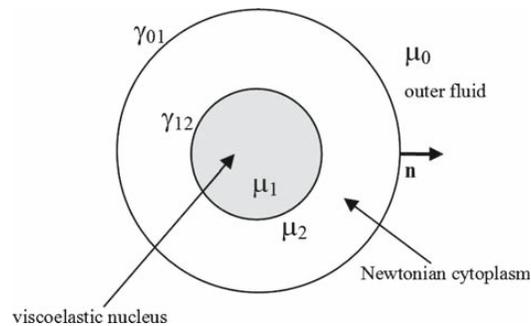


Fig. 8 Sketch of the cell composite droplet. Interfacial tensions γ_{01} and γ_{12} are indicated, as well as viscosities μ_0, μ_1, μ_2

Let us first describe the problem. A composite droplet as in Fig. 8 is considered to have a viscoelastic nucleus with viscosity $\mu_1 \approx 100$ Pa s whereas the surrounding cytoplasm has viscosity $\mu_2 \approx 35$ Pa s [33,99], which is smaller than μ_1 . The suspending fluid (plasma) has viscosity $\mu_0 \approx 0.001$ Pa s which is much smaller than the other two viscosities. The equations of motion to be solved are the conservation of mass and momentum equations together with a constitutive law for the viscoelastic fluid. Mass conservation is written as:

$$\nabla \cdot \mathbf{v} = 0 \quad (13)$$

Conservation of momentum reads:

$$\rho \left(\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \nabla \mathbf{v} \right) = -\nabla p + \text{div} \mathbf{T}_t + \rho \mathbf{g} + \gamma C \delta(\phi) \mathbf{n} + \delta(\phi) \mathbf{F}_a \quad (14)$$

where \mathbf{v} is the velocity field, ρ is the density, p is the pressure field, \mathbf{g} is gravity, C is curvature, \mathbf{n} is the unit normal to the surface of the cell (drop), γ is the interfacial tension acting on the interface, ϕ is the level-set function of the cell boundary (re-initiated to make it a distance function from the interface), δ is the Dirac function, and \mathbf{F}_a is the adhesive force at the wall.

The function ϕ is a solution of the advection equation, and satisfies:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \nabla \phi = 0 \quad (15)$$

The total stress \mathbf{T}_t is given as the sum of a Newtonian contribution (due to solvent viscosity μ_s) and an additional stress: $\mathbf{T}_t = 2\mu_s \mathbf{D} + \mathbf{T}$, where \mathbf{D} is the symmetric part of the velocity gradient tensor and $\mathbf{T} = \frac{c\mu_s}{\tau} \mathbf{A}$ is the viscoelastic contribution, \mathbf{A} being the configuration tensor satisfying Maxwell's equation:

$$\frac{\partial \mathbf{A}}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \nabla \mathbf{A} - \mathbf{A} \cdot \nabla \mathbf{v} - \nabla \mathbf{v}^T \cdot \mathbf{A} = \frac{1}{\tau} (\mathbf{I} - \mathbf{A}) \quad (16)$$

Here τ is the relaxation time of the viscoelastic fluid. The contribution of the polymer viscosity has been introduced here through c which is usually taken as the fractional contribution of the polymer to the zero-viscosity of the fluid μ_s . Therefore, the polymer viscosity is $\mu = c\mu_s$, and the total viscosity of the nucleus is $\mu_1 = \mu + \mu_s = (1 + c)\mu_s$. Details can be found in a previous paper [85]. Going back to the adhesive part, two possibilities exist for \mathbf{F}_a .

- First case. An adhesion potential $W = w(\frac{d_0}{x})^2[(\frac{d_0}{x})^2 - 2]$ [97] is used and the force is $\mathbf{F}_a = -\partial W/\partial \mathbf{x}$. d_0 is the separation length between the attractive and repulsive regions, w a constant potential and \mathbf{x} is the distance vector from the surface to the point considered (with x being its magnitude).
- Second case. Adhesion kinetics theory. We solve the relationships presented in Eqs. (1, 6, 7). We use an unstressed length including the presence of microvilli, therefore λ is replaced by the length of the unstressed microvilli and bond in Eqs. (6, 7). Then $\mathbf{F}_a = N\kappa(x_m - \lambda)\mathbf{n}_0$ as previously shown. \mathbf{n}_0 is the unit normal to the adhesion plane.

The variables in the equations are made dimensionless as follows: lengths by R (cell outer radius), velocities by U (maximum velocity of corresponding Poiseuille flow), stresses by $\mu_0 U/R$. The relevant dimensionless numbers in this problem are the Reynolds number $Re = \rho_0 U R/\mu_0$, the capillary number $C_a = U\mu_0/\gamma_{01}$, the Deborah number for viscoelasticity $De = U\tau/R$, the viscosity ratios μ_2/μ_0 and μ_1/μ_0 and the adhesion number $Ad = F_a/\rho_0 U^2$. We will assume that the most two relevant dimensionless numbers are the capillary number C_a and the adhesion number Ad , and keep the other parameters constant. The fluid velocity at the domain walls is assumed to be zero. The level-set function ϕ is reinitialized at each step according to previous procedures [85]. The method used has been presented previously [59, 94]. The problem is solved everywhere for \mathbf{v} and ϕ using a code based on the level-set method. A Marchuk–Yanenko operator splitting method is used to decouple the difficulties, i.e. incompressibility, nonlinear convection term, interface motion and viscoelastic problem. A detailed description of the methods used for solving the above subproblems can be found in [43, 93] and the details of the numerical code in [92].

Three-dimensional computations of time-dependent cell shapes and streamlines are presented in Figs. 9, 10. Parameter values for the two cases considered here have been taken from previous studies [31, 33, 50, 60, 62, 63, 68, 87, 95, 98].

The deformation appears to be an essential factor in modeling of the problem. Several noticeable features are:

- The nucleus is deformed and follows the rest of the cell. It seems to have no further effect. Nevertheless complementary experiments based on enucleated cells [35, 75] may be carried out to address this idea further.
- Flattening increases the adhesion area below the cell and therefore increases adhesive forces or the number of bonds (Fig. 9). This is similar to previous works [32, 55, 56] but different from another one [62] using the concept of composite drop model.
- The differences are not so marked in these two models. They both describe qualitatively the attraction, with an increased adhesion for the adhesion potential model.

C. Verdier et al.

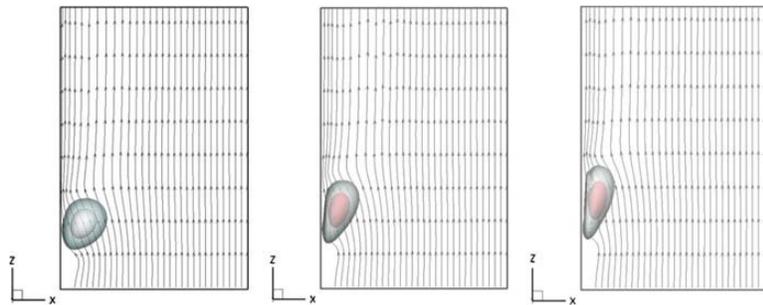


Fig. 9 3D Droplet-wall interaction in the case of an adhesive potential (*side view*). $Re = 0.5$, $C_a = 0.167$, $De = 0.1$, $Ad = 50$, times = 0.82–2.46–3.94

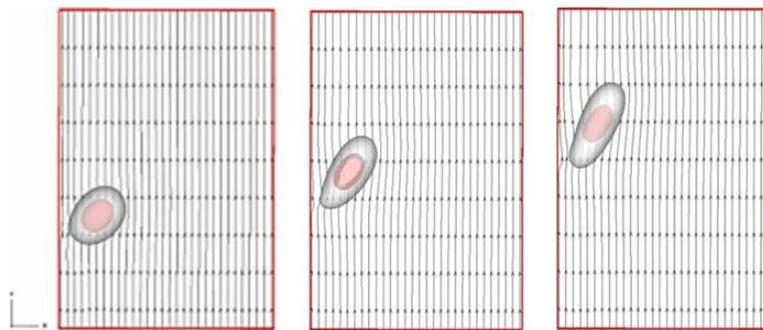


Fig. 10 3D Droplet-wall interaction in the case of the adhesion kinetics model (*side view*). $Re = 0.5$, $C_a = 0.167$, $De = 0.1$, $Ad = 50$, times = 0.6–3.0–6.0

- The rolling velocity from Fig. 10 is in the range of a few $\mu\text{m/s}$, as observed in our experiments [25,56], and previously shown in Fig. 7.
- If the flow rate is large enough, or the adhesion number Ad is sufficiently small, then the cell can be lifted by the flow as already observed in previous works [18].
- Cases with large Ad (Fig. 9) lead to cell arrest and a flattened cell adhering to the wall.

6 Conclusions

In this review, we have summarized the important new developments that have taken place in recent years to build a mathematical framework for modeling cell–cell interactions under flow conditions. Using Bell’s theory [8] and improvements by [31], we have argued that it is now possible to qualitatively predict and describe the rolling motion of cells on ligand-coated surfaces. Although there have been several interesting computational studies conducted in the recent years, including our own, the problem

of cell deformation and interaction under more complex flow conditions is still a major challenge that cannot be resolved without further understanding of the following issues:

- Interactions between cells can be far more complex than those between a cell and a flat wall, which have been considered in this article.
- Cell deformation must take into account the local changes in the rheological and adhesive properties, and not assume the entire cell to be a continuum.
- Cells interact with each other by activating signaling pathways which can induce changes in cell behavior and this should be included in more advanced models.

The above summary of the state-of-the-art should stimulate further interest in this subject, but the new ideas should be first validated in less complex biological systems before they are used to describe the behavior of real cells.

Acknowledgments The authors thank the European Commission Marie Curie Research Training Network MRTN-CT-2004-503661 “Modeling, mathematical methods and computer simulation of tumor growth and therapy” (<http://calvino.polito.it/~mcrtn/>) for its support.

References

1. A-Hassan, E., Heinz, W.F., Antonik, M.D., D’Costa, N.P., Nageswaran, S., Schoenenberger, C.A., Hoh, J.H.: Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **74**(3), 1564–1578 (1998)
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.: *Molecular biology of the cell*, 3rd edn. Garland Science, Oxford (1994)
3. Alon, R., Chen, S., Puri, K.D., Finger, E.B., Springer, T.A.: The kinetics of I-selectin tethers and the mechanics of selectin-mediated rolling. *J. Cell Biol.* **138**, 1169–1180 (1997)
4. Alon, R., Hammer, D.A., Springer, T.A.: Lifetime of the p-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature* **374**(6522), 539–542 (1995)
5. Atherton, A., Born, G.V.: Relationship between the velocity of rolling granulocytes and that of the blood flow in venules. *J. Physiol.* **233**(1), 157–165 (1973)
6. Barthès-Biesel, D., Rallison, J.M.: The time-dependent deformation of a capsule freely suspended in a linear shear flow. *J. Fluid Mech.* **113**, 251–267 (1981)
7. Bausch, A.R., Kroy, K.: A bottom-up approach to cell mechanics. *Nat. Phys.* **2**, 231–238 (2006)
8. Bell, G.I.: Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* **200**(4342), 618–627 (1978)
9. Bell, G.I., Dembo, M., Bongrand, P.: Cell adhesion. competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys. J.* **45**(6), 1051–1064 (1984)
10. Benoit, M., Gabriel, D., Gerisch, G., Gaub, H.E.: Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat. Cell Biol.* **2**(6), 313–317 (2000)
11. Bershadsky, A.D., Tint, I.S., Neyfakh, A.A., Vasiliev, J.M.: Focal contacts of normal and rsv-transformed quail cells. hypothesis of the transformation-induced deficient maturation of focal contacts. *Exp. Cell Res.* **158**(2), 433–444 (1985)
12. Biben, T., Misbah, C.: Tumbling of vesicles under shear flow within an advected-field approach. *Phys. Rev. E* **67**(3), 031, 908 (2003)
13. Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, C.: Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**(9), 930–933 (1986)
14. Bohnet, S., Ananthkrishnan, R., Mogilner, A., Meister, J.J., Verkhovskiy, A.B.: Weak force stalls protrusion at the leading edge of the lamellipodium. *Biophys. J.* **90**, 1810–1820 (2006)
15. Brenner, H.: The slow viscous motion of a sphere through a fluid toward a plane surface. *Chem. Eng. Sci.* **16**, 242–251 (1961)
16. Canetta, E., Duperray, A., Leyrat, A., Verdier, C.: Measuring cell viscoelastic properties using a force-spectrometer: influence of protein-cytoplasm interactions. *Biorheology* **42**(5), 321–333 (2005)
17. Canetta, E., Leyrat, A., Verdier, C.: A physical model for studying adhesion between a living cell and a spherical functionalized substrate. *Math. Comp. Model.* **37**, 1121–1129 (2003)

C. Verdier et al.

18. Cantat, I., Misbah, C.: Lift force and dynamical unbinding of adhering vesicles under shear flow. *Phys. Rev. Lett.* **83**(4), 880–883 (1999)
19. Cao, J., Donell, B., Deaver, D.R., Lawrence, M.B., Dong, C.: In vitro side-view imaging technique and analysis of human t-leukemic cell adhesion to icam-1 in shear flow. *Microvasc. Res.* **55**, 124–137 (1998)
20. Caputo, K.E., Lee, D., King, M.R., Hammer, D.A.: Adhesive dynamics simulations of the shear threshold effect for leukocytes. *Biophys. J.* **92**, 787–797 (2007)
21. Chang, K.C., Hammer, D.A.: Adhesive dynamics simulations of sialyl-lewis(x)/e-selectin-mediated rolling in a cell-free system. *Biophys. J.* **79**(4), 1891–1902 (2000)
22. Chang, K.C., Tees, D.F.J., Hammer, D.A.: The state diagram for cell adhesion under flow: Leukocyte rolling and firm adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(21), 11,262–11,267 (2000)
23. Chen, S., Springer, T.A.: An automatic braking system that stabilizes leukocyte rolling by an increase in selectin bond number with shear. *J. Cell Biol.* **144**(1), 185–200 (1999)
24. Choquet, D., Felsenfeld, D.P., Sheetz, M.P.: Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell* **88**(1), 39–48 (1997)
25. Chotard-Ghodsnia, R., Drochon, A., Duperray, A., Leyrat, A., Verdier, C.: Static and dynamic interactions between circulating cells and the endothelium in cancer. In: Preziosi, L. (ed.) *Cancer Modelling and Simulation*, Chap. 9, pp. 243–267. CRC Press, Boca Raton, FL (2003)
26. Chotard-Ghodsnia, R., Drochon, A., Grebe, R.: A new flow chamber for the study of shear stress and transmural pressure upon cells adhering to a porous biomaterial. *J. Biomech. Eng.* **124**, 258–261 (2002)
27. Chotard-Ghodsnia, R., Haddad, O., Leyrat, A., Drochon, A., Verdier, C., Duperray, A.: Morphological analysis of tumor cell/endothelial cell interactions under shear flow. *J. Biomech.* **40**(2), 335–344 (2007)
28. Coughlin, M.F., Schmid-Schönbein, G.W.: Pseudopod projection and cell spreading of passive leukocytes in response to fluid shear stress. *Biophys. J.* **87**, 2035–2042 (2004)
29. Crocker, J.C., Valentine, M.T., Weeks, E.R., Gisler, T., Kaplan, P.D., Yodh, A.G., Weitz, D.A.: Two-point microrheology of inhomogeneous soft materials. *Phys. Rev. Lett.* **85**(4), 888–891 (2000)
30. Décavé, E., Garrivier, D., Bréchet, Y., Fourcade, B., Brückert, F.: Shear flow-induced detachment kinetics of dictyostelium discoideum cells from solid substrate. *Biophys. J.* **82**(5), 2383–2395 (2002)
31. Dembo, M., Torney, D.C., Saxman, K., Hammer, D.: The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment. *Proc. R. Soc. Lond. B* **234**, 55–83 (1988)
32. Dong, C., Cao, J., Struble, E.J., Lipowski, H.H.: Mechanics of leukocyte deformation and adhesion to endothelium in shear flow. *Ann. Biomed. Eng.* **27**, 298–312 (1999)
33. Drury, J.L., Dembo, M.: Hydrodynamics of micropipette aspiration. *Biophys. J.* **76**(1), 110–128 (1999)
34. Endlich, N., Endlich, K.: Stretch, tension and adhesion—adaptive mechanisms of the actin cytoskeleton in podocytes. *Eur. J. Cell Biol.* **85**(3–4), 229–234 (2006)
35. Euteneuer, U., Schliwa, M.: Persistent, directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of microtubules. *Nature* **310**(5972), 58–61 (1984)
36. Evans, E., Leung, A., Heinrich, V., Zhu, C.: Mechanical switching and coupling between two dissociation pathways in a p-selectin adhesion bond. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**(31), 11,281–11,286 (2004)
37. Evans, E., Ritchie, K.: Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys. J.* **72**(4), 1541–1555 (1997)
38. Evans, E.A.: Detailed mechanics of membrane-membrane adhesion and separation. i. continuum of molecular cross-bridges. *Biophys. J.* **48**(1), 175–183 (1985)
39. Evans, E.A.: Probing the relation between force-lifetime-and chemistry in single molecular bonds. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 105–128 (2001)
40. Foty, R.A., Steinberg, M.S.: The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation. *Dev. Biol.* **278**(1), 255–263 (2005)
41. Friedl, P., Bröcker, E.B.: The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol. Life Sci.* **57**(1), 41–64 (2000)
42. Gardiner, C.W.: *Handbook of Stochastic Methods for Physics, Chemistry and the Natural Sciences*. Springer, Berlin (1985)
43. Glowinski, R., Pan, T.W., Hesla, T.I., Joseph, D.D.: A distributed lagrange multiplier/fictitious domain method for particulate flows. *Int. J. Multiphase Flows* **25**, 201–233 (1998)

44. Goldman, A.J., Cox, R.G., Brenner, H.: Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall. i. motion through a quiescent fluid. *Chem. Eng. Sci.* **22**, 637–652 (1967)
45. Goldman, A.J., Cox, R.G., Brenner, H.: Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall: ii. couette flow. *Chem. Eng. Sci.* **22**, 653–659 (1967)
46. Hammer, D.A., Apte, S.M.: Simulation of cell rolling and adhesion on surfaces in shear flow: general results and analysis of selectin-mediated neutrophil adhesion. *Biophys. J.* **63**(1), 35–57 (1992)
47. Hammer, D.A., Lauffenburger, D.A.: A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces. *Biophys. J.* **52**(3), 475–487 (1987)
48. He, X., Dembo, M.: On the mechanics of the first cleavage division of the sea urchin egg. *Exp. Cell Res.* **233**(2), 252–273 (1997)
49. Hénon, S., Lenormand, G., Richert, A., Gallet, F.: A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophys. J.* **76**(2), 1145–1151 (1999)
50. Herant, M., Heinrich, V., Dembo, M.: Mechanics of neutrophil phagocytosis: behavior of the cortical tension. *J. Cell Sci.* **118**(9), 1789–1797 (2005)
51. Hochmuth, R.M.: Micropipette aspiration of living cells. *J. Biomech.* **33**(1), 15–22 (2000)
52. Hussain, M.A., Merchant, S.N., Mombasawala, L.S., Puniyani, R.R.: A decrease in effective diameter of rat mesenteric venules due to leukocyte margination after a bolus injection of pentoxifylline—digital image analysis of an intravital microscopic observation. *Microvasc. Res.* **67**(3), 237–244 (2004)
53. Iguchi, K., Oh, G., Ookawa, K., Yanagi, K., Sakai, M., Yamamoto, T., Ishikawa, S., Onizuka, M.: In vivo observation of pulmonary micrometastasis of colon cancer in normal rats. *Microvasc. Res.* **73**(3), 206–213 (2007)
54. Israelachvili, J.N., Tabor, D.: The measurement of van der waals dispersion forces in the range 1.5 to 130 nm. *Proc. Roy. Soc. Lond. A* **331**(1584), 19–38 (1972)
55. Jadhav, S., Eggleton, C.D., Konstantopoulos, K.: A 3-d computational model predicts that cell deformation affects selectin-mediated leukocyte rolling. *Biophys. J.* **88**, 96–104 (2005)
56. Jin, Q., Verdier, C., Singh, P., Aubry, N., Chotard-Ghodsni, R., Duperray, A.: Migration and deformation of leukocytes in pressure driven flows. *Mech. Res. Commun.* **34**, 411–422 (2007)
57. Johnson-Léger, C., Aurand-Lions, M., Imhof, B.A.: The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J. Cell Sci.* **113**(6), 921–933 (2000)
58. Jones, D.A., Abbassi, O., McIntire, L.V., McEver, R.P., Smith, C.W.: P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. *Biophys. J.* **65**(4), 1560–1569 (1993)
59. Kadaksham, J., Singh, P., Aubry, N.: Dynamics of pressure driven flows of electrorheological suspensions subjected to spatially non-uniform electric fields. *J. Fluids Eng.* **126**, 170–179 (2004)
60. Kan, H.C., Udaykumar, H.S., Shyy, W., Tran-Son-Tay, R.: Hydrodynamics of a compound drop with application to leukocyte modeling. *Phys. Fluids* **10**(4), 760–774 (1998)
61. Kaplanski, G., Farnier, C., Tissot, O., Pierres, A., Benoliel, A.M., Alessi, M.C., Kaplanski, S., Bongrand, P.: Granulocyte-endothelium initial adhesion. analysis of transient binding events mediated by e-selectin in a laminar shear flow. *Biophys. J.* **64**(6), 1922–1933 (1993)
62. Khismatullin, D.B., Truskey, G.A.: A 3d numerical study of the effect of channel height on leukocyte deformation and adhesion in parallel-plate flow chambers. *Microvas. Res.* **68**, 188–202 (2004)
63. Khismatullin, D.B., Truskey, G.A.: Three-dimensional numerical simulation of a receptor-mediated leukocyte adhesion to surface: effects of cell deformability and viscoelasticity. *Phys. Fluids* **17**(3), 53–73 (2005)
64. King, M.R., Hammer, D.A.: Multiparticle adhesive dynamics: hydrodynamic recruitment of rolling leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**(26), 14,919–14,924 (2001)
65. Kramers, H.A.: Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica* **7**, 284–304 (1940)
66. Lac, E., Morel, A., Barthès-Biesel, D.: Hydrodynamic interaction between two identical capsules in simple shear flow. *J. Fluid Mech.* **573**, 149–169 (2007)
67. Laurent, V.M., Kasas, S., Yersin, A., Schäffer, T.E., Catsicas, S., Dietler, G., Verkhovskiy, A.B., Meister, J.J.: Gradient of rigidity in the lamellipodia of migrating cells revealed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **89**(1), 667–675 (2005)
68. Lawrence, M.B., Springer, T.A.: Leukocytes roll on a selectin at physiological flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through Integrins. *Cell* **65**, 859–873 (1991)
69. Leckband, D.: Measuring the forces that control protein interactions. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 1–26 (2000)

C. Verdier et al.

70. Lekka, M., Laidler, P., Gil, D., Lekki, J., Stachura, Z., Hryniewicz, A.Z.: Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *Eur. Biophys. J.* **28**(4), 312–316 (1999)
71. Leyrat, A., Duperray, A., Verdier, C.: Adhesion mechanisms in cancer metastasis. In: Preziosi, L. (ed.) *Cancer Modelling and Simulation*, Chap. 8, pp. 221–242. CRC Press, Boca Raton, FL (2003)
72. Lu, H., Koo, L.Y., Wang, W.M., Lauffenburger, D.A., Griffith, L.G., Jensen, K.F.: Microfluidic shear devices for quantitative analysis of cell adhesion. *Anal. Chem.* **76**(18), 5257–5264 (2004)
73. Mader, M.A., Vitkova, V., Abkarian, M., Viallat, A., Podgorski, T.: Dynamics of viscous vesicles in shear flow. *Eur. Phys. J. E. Soft. Matter* **19**(4), 389–397 (2006)
74. Makino, A., Glogauer, M., Bokoch, G.M., Chien, S., Schmid-Schönbein, G.W.: Control of neutrophil pseudopods by fluid shear: role of rho family gtpases. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**, 863–871 (2005)
75. Malawista, S.E., Chevance, A.D.B.: The cytokineplast: purified, stable, and functional motile machinery from human blood polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* **95**(3), 960–973 (1982)
76. Marshall, B.T., Long, M., Piper, J.W., Yago, T., McEver, R.P., Zhu, C.: Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature* **423**(6936), 190–193 (2003)
77. Mason, T.G., Weitz, D.A.: Optical measurements of frequency-dependent linear viscoelastic moduli of complex fluids. *Phys. Rev. Lett.* **74**(7), 1250–1253 (1995)
78. Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K., Evans, E.: Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature* **397**(6714), 50–53 (1999)
79. Milln, J., Hewlett, L., Glyn, M., Toomre, D., Clark, P., Ridley, A.J.: Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial icam-1 to caveola- and f-actin-rich domains. *Nat. Cell Biol.* **8**(2), 113–123 (2006)
80. Moazzam, F., DeLano, F.A., Zweifach, B.W., Schmid-Schönbein, G.W.: The leukocyte response to fluid stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(10), 5338–5343 (1997)
81. Moll, R., Mitze, M., Frixen, U.H., Birchmeier, W.: Differential loss of e-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Am. J. Pathol.* **143**(6), 1731–1742 (1993)
82. N'Dri, N.A., Shyy, W., Tran-Son-Tay, R.: Computational modeling of cell adhesion and movement using a continuum-kinetics approach. *Biophys. J.* **85**(4), 2273–2286 (2003)
83. Pearson, M.J., Lipowsky, H.H.: Influence of erythrocyte aggregation on leukocyte margination in post-capillary venules of rat mesentery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**(4), H1460–H1471 (2000)
84. Pierres, A., Benoliel, A.M., Bongrand, P.: Adhesion molecules and cancer. *Rev. Med. Interne.* **20**(12), 1099–1113 (1999)
85. Pillapakkam, S.B., Singh, P.: A level-set method for computing solutions to viscoelastic two-phase flow. *J. Comput. Phys.* **174**, 552–578 (2001)
86. Piper, J.W., Swerlick, R.A., Zhu, C.: Determining force dependence of two-dimensional receptor-ligand binding affinity by centrifugation. *Biophys. J.* **74**(1), 492–513 (1998)
87. Ramachandran, V., Nollert, M.U., Qiu, H., Liu, W.J., Cummings, R.D., Zhu, C., McEver, R.P.: Tyrosine replacement in p-selectin glycoprotein ligand-1 affects distinct kinetic and mechanical properties of bonds with p- and l-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(24), 13,771–13,776 (1999)
88. Rosenbluth, M.J., Lam, W.A., Fletcher, D.A.: Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability. *Biophys. J.* **90**(8), 2994–3003 (2006)
89. Schmid-Schönbein, H., Wells, R.: Fluid drop-like transition of erythrocytes under shear. *Science* **165**, 288–291 (1969)
90. Seifert, U., Lipowski, R.: Adhesion of vesicles. *Phys. Rev. A* **42**(8), 4768–4771 (1990)
91. Shyy, W., Francois, M., Udaykumar, H.S., Ndi, N., Tran-Son-Tay, R.: Moving boundaries in micro-scale biofluid dynamics. *Appl. Mech. Rev.* **54**(5), 405–453 (2001)
92. Singh, P., Joseph, D.D.: Fluid dynamics of floating particles. *J. Fluid Mech.* **530**, 31–80 (2005)
93. Singh, P., Joseph, D.D., Hesla, T.I., Glowinski, R., Pan, T.W.: Direct numerical simulation of viscoelastic particulate flows. *J. Non-Newtonian Fluid Mech.* **91**, 165–188 (2000)
94. Singh, P., Leal, L.G.: Finite element simulation of the start-up problem for a viscoelastic problem in an eccentric cylinder geometry using third-order upwind scheme. *Theor. Comput. Fluid Dyn.* **5**, 107–137 (1993)
95. Springer, T.A.: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**(6283), 425–434 (1990)
96. Springer, T.A.: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**(2), 301–314 (1994)
97. Sukumaran, S., Seifert, U.: Influence of shear flow on vesicles near a wall: A numerical study. *Phys. Rev. E* **64**(1), 011, 916 (2001)

Modeling cell interactions under flow

98. Tran-Son-Tay, R., Needham, D., Yeung, A., Hochmuth, R.M.: Time-dependent recovery of passive neutrophils after large deformation. *Biophys. J.* **60**(4), 856–866 (1991)
99. Tsai, M.A., Frank, R.S., Waugh, R.E.: Passive mechanical behavior of human neutrophils: power-law fluid. *Biophys. J.* **65**(5), 2078–2088 (1993)
100. Udaykumar, H.S., Kan, H.C., Shyy, W., Tran-Son-Tay, R.: Multiphase dynamics in arbitrary geometries on fixed cartesian grids. *J. Comput. Phys.* **137**, 366–405 (1997)
101. Verdier, C.: Review. rheological properties of living materials: From cells to tissues. *J. Theor. Med.* **5**(2), 67–91 (2003)
102. Vestweber, D.: Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol. Rev.* **218**, 178–196 (2007)
103. Yeung, A., Evans, E.: Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets. *Biophys. J.* **56**(1), 139–149 (1989)
104. Zhang, X., Moy, V.T.: Cooperative adhesion of ligand-receptor bonds. *Biophys. Chem.* **104**(1), 271–278 (2003)
105. Zhao, Y., Chien, S., Skalak, R.: A stochastic model of leukocyte rolling. *Biophys. J.* **69**(4), 1309–1320 (1995)

ARTICLE SOUMIS DANS ANN BIOMED ENG. (MAI 2008)



Author manuscript, published in "preprint (2008) xx-xx"

A critical stress to detach cancer cells in microchannels

Cécile Couzon^(a), Alain Duperray^{(b),(c)}, Claude Verdier^(a)

^(a) Laboratoire de Spectrométrie Physique, CNRS-Université Grenoble I (UMR 5588)
140 avenue de la physique, BP 87, 38402 Saint-Martin d'Hères cedex, France

^(b) INSERM, U823, Grenoble, France

^(c) Université Joseph Fourier-Grenoble I, Faculté de Médecine
Institut d'oncologie/développement Albert Bonniot et Institut Français du Sang,
UMR-S823, Grenoble, France

Abstract- We present experiments involving T24 cancer cells adhering at the bottom of functionalized microchannels, and subjected to increasing shear rates. Morphological studies have been carried out at different shear stresses. Cells exhibit spreading patterns similar to the ones observed in static conditions, as long as the shear stress is not too high. At a critical value of the wall shear stress, cells start to decrease their area until detachment is achieved for the larger stresses. The influence of microchannel size is also analyzed and shows a slight effect, enhanced for high confinement. To analyze such data, we propose a model to determine the 3D-shear stress necessary to achieve cell area decrease (leading to detachment), as a function of focal adhesion contacts present at the cell-substrate interface. Using this method, the determination of typical forces exerted at each focal contact can be achieved.

Keywords- Microfluidics, cancer cells, critical stress, focal adhesions

INTRODUCTION

The response of cells to mechanical stresses is a key factor in many biological processes like cell division, embryogenesis, cell migration, diapedesis, etc. Typical examples concern the reaction to shear stresses exerted as cells travel through the blood, or when they adhere to the vascular wall, but also within tissues, since cells are submitted to various forces due to the environment. As a first sketch, cells exert a different response as a function of substrate stiffness¹⁵ and develop stronger forces when the substrate is more rigid²⁷. They also develop larger forces as they spread^{13,37} or as the ligand concentration increases. Cells might also change their orientation as a function of environmental anisotropy, leading to cell polarization as shown in recent experiments on specific micropatterned surfaces⁴¹. But their orientation might also depend on the type of forces to which they are subjected to, like static, quasistatic or periodic stresses¹³. Reaction to mechanical stresses involves mechanotransduction, the reorganization of the cytoskeleton, as well as the formation or disruption of focal adhesions. For example focal contacts can act as mechanosensors and enable growth of further adhesion sites³⁸ in the case of adhering fibroblasts. An additional effect is the actin reorganization of a cell under flow, as shown for example with *Dyctiostelium discoideum*¹². Flow reversal leads to a change in cell polarity, corresponding to relocalization of an actin-rich region opposite of the flow. In other words, cells are able to modify their local rheological properties⁴³ in order to achieve a particular response.

Many experiments have been achieved in the past for studying cell behaviour under flow, as a particular way to apply mechanical stresses to adhering cells. This aspect is particularly important when trying to model leukocyte/cancer cell interactions with the endothelium⁴⁴. Indeed, circulating cells first interact with the endothelium and cells activate to form weak bonds leading to cell rolling²⁵, followed by mechanotransduction and the formation of stronger bonds, allowing cells to adhere, spread and eventually transigrate across the endothelial monolayer. During this process, it is important to determine what forces are necessary to detach such bonds (i.e. when tumor cells adhere to the endothelium), and to determine whether cells are able to resist against the flow¹⁰. Another important application is the transport of cells in microchannels which is now becoming very promising, especially with the recent advances of microfluidics which could allow the sorting of normal cells vs. cancer cells. Experiments on the influence of a controlled flow rate (or shear stress) on adhering cells have been performed in parallel plate flow chambers^{6,9,35} or radial flow experiments¹⁴, or with micropipettes^{4,11,31}. Such devices allow to control the applied shear stresses, usually chosen in the range [0.1-2 Pa] as in physiological conditions. Particular attention has been given to endothelial cells under flow conditions. Thoumine et al.⁴² showed that endothelial cells become elongated in the flow direction in an almost regular manner, and that the underlying actin cytoskeleton also seems to align in the same direction. Chachisvilis et al.⁷ finally demonstrated the role of G-protein coupled receptors, which act as mechanosensors.

To further investigate the response of a cell exposed to a flow field, it is necessary to find out theoretically which forces and torques are applied to the adhering cell, depending on flow geometry. Pozrikidis³⁶ determined numerically forces and torques exerted by a 3D shear flow on an adhering cell, assuming the cell to be a spherical cap or an ellipsoid, but the study was limited to an infinite flow domain. Gaver and Kute¹⁹ studied analytically

and numerically the effect of flow on a 2D adherent cell in a microchannel and generalized this idea to the 3D-case, coming up with simple formulas depending on confinement. Once the flow field is known, models of adhesion and detachment can then allow to determine dissociation rate constants²¹, since cell detachment is controlled by the ability of cells to form bonds between its receptors and the corresponding ligands on the surface. Still it is not known what are the precise mechanisms by which cells spread and adhere under flow.

Therefore the purpose of the present study is to focus on experimental results where cells adhering to the walls of a microchannel are subjected to an increasing shear flow until detachment. This implies modifications of the cells morphology, in relation with their adhesion properties and the flow characteristics. This is not only relevant for microfluidics, but is also a true situation encountered in post capillary venules ($5 - 200 \mu m$ in size) where circulating cells interact with the vessel walls and adhere. Recent developments have enabled the study of cell migration^{8,23,39} and adhesion strength^{20,24,28,45} in confined geometries. Most of these studies consist in end-point assays, i.e. measuring the total distance the cells migrate or counting the fraction of remaining adherent cells at the end of the experiment. The present motivation is here to analyze carefully the cell behaviour, in particular what exact stresses or forces are necessary to achieve cell detachment, and how this can be related to cell adhesion. We will focus on a particular type of cancer cells (T24, an epithelial bladder type) and investigate the action of a flow field while comparing it with the adhesion sites formed below the cell. This study can serve as an interesting tool for estimating the typical force per adhesion site by which this type of cell adheres to a given substrate. This can be obtained thanks to fluorescence microscopy observations of focal adhesions, enabling the count of such adhesion sites and their size.

The paper is organized as follows. In the first part, we describe materials and methods, in particular cells, microchannels build-up, fluorescence microscopy, and the working equations governing flow parameters. Then results are collected to describe cell spreading and detachment, in order to propose a new method for determining the critical stress for cell retraction. In the final part, the effect of confinement on the critical shear stress is discussed, then we use a model based on previous work¹⁹ to interpret our data and come up with the missing parameters in the adhesion model. This enables us to determine typical forces involved at each focal adhesion site. Such results obtained for this type of cells are then compared with previous studies.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

T24 is a human epithelial bladder cancer cell line. In our experiments, T24 cells were cultured in 25 cm^2 tissue culture flasks (T25) at 37° C , in a humidified atmosphere with 5% CO_2 . The cells were incubated in RPMI supplemented with 100 U/mL penicillin and $100 \mu\text{g/mL}$ streptomycin and 10% fetal calf serum. Cells were grown to near confluence in the culture flasks and then suspended with 0.05% trypsin-EDTA solution. The concentration of suspended cells was determined using a Neubauer cell, before being introduced into the microfluidic chip.

Long term experiments under static conditions

T24 cells in culture medium were placed on a glass slide recovered by a thin layer of PDMS ($< 0.5mm$). Cells were left to sediment and spread in static conditions. Phase-contrast images were taken every five minutes. The substrate and the coating were the same as in microchannels, consequently these experiments under static conditions can be used as a control for the experiments under flow conditions.

Design of microfluidic devices

The microfluidic devices were made using the PDMS rapid photolithographic technique according to previous works¹⁷. The photolithography masks bearing the channel design were printed on high resolution films. The negative masters were then created from a photo-patternable epoxy (SU-8, Gersteltec) spin-coated onto silicon wafers, and exposed to UV light through the film negative of the desired channel size. The silicon was then etched with inverse structures of the microfluidic channels : typically $1mm$ width (w) and $50 - 300 \mu m$ height (h). The PDMS elastomer devices were molded from the masters using two-part Sylgard silicon elastomer (a mixture of 1:10 silicon elastomer and curing agent degased and poured against the silicon master). Once cured, each PDMS device was punched with inlet/outlet holes, treated with air plasma (2.10^{-4} bar at $6.8W$ coil power for 40 seconds), bonded to the glass slide by putting both treated surfaces in contact to each other immediately after, and connected to tubes which were sealed with glue (Araldite). In order to prevent bubbles from entering the channel, a bubble trap was also included into the microfluidic device as shown in Fig. 1.

Channel coating and cell loading for shearing experiments

Prior to each experiment, the microchannel walls were functionalized with a fibronectin solution ($20\mu g/mL$) for one hour at a typical flow rate of $0.8mL/h$ in order to allow fibronectin adsorption onto the treated PDMS surfaces. The bubble trap was then filled with culture medium. Finally the channel was rinsed for 15 minutes with culture medium.

Cells in suspension at a concentration adapted to the channel size (in the range $1 - 5.0 \cdot 10^6$ cells/ mL) were pumped into a microfluidic device at a small flow rate Q corresponding to a small wall shear stress (in the connection tube) less than $0.1Pa$. Typically $Q = 10 mL/h$ in a cylinder of radius $r = 0.4mm$, $\eta \sim 10^{-3} Pa.s$ at $37^\circ C$, which leads to a wall shear stress in the connection tube $\sigma = 4\eta Q/\pi r^3 = 0.055Pa$. Once located in the channel, cells were left at rest for 15 minutes to allow attachment to the channel wall.

Experiments under controlled flow conditions

Shearing experiments were performed to investigate cells responses and their ability to resist the flow. In particular, measurement of the cell area over a range of shear stresses is important to determine the effect of flow on adherent cells. During measurements, a continuous flow was applied and a region of interest (ROI) in the center of the channel was investigated at fixed time intervals (15 seconds). The flow rate was changed regularly every 5 minutes, starting at low flow rates and then increasing, inducing higher shear stresses progressively. In all cases, the Reynolds number given by $Re = \rho V D_h/\eta$ was less than

130 (where $D_h = wh/2(w + h)$ is the hydraulic diameter and V the mean fluid velocity), indicating that the flow was laminar. Images were taken at the center of the channel, away from the side walls, to ensure the full development of the velocity profile. Individual cell morphologies (area, angle, aspect ratio, etc.) were recorded in real time using phase contrast microscopy. A global view of the experimental set-up can be seen in Fig. 1.

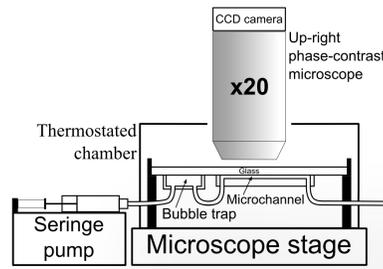


FIG. 1: Full view of the experimental set-up. The microfluidic device is placed in a thermostated chamber at 37° C under the x20 objective of an up-right phase contrast microscope. Fluid flow is controlled by a syringe-pump. Before reaching the microchannel, the fluid first passes through the bubble trap (completely filled with medium before the experiment), where bubbles remain trapped.

Determination of the Wall Shear Stress

To determine the Wall Shear Stress (WSS), the stress vector on an oriented facet (normal unit vector \vec{n}) is introduced: $\vec{t}(\vec{n}) = \Sigma \cdot \vec{n}$. Σ is the shear stress tensor, given by $\Sigma = -p\mathbf{I} + 2\eta\mathbf{D}$ for a Newtonian incompressible fluid, η is the fluid viscosity, \mathbf{D} is the symmetrical part of the fluid velocity gradient tensor and p is the pressure. \vec{v} is the fluid velocity and only has a z -component depending on x and y , in the coordinate system shown in Fig. 2 because of the translational invariance.

Consequently the shear stress depends on the velocity field \vec{v} which is described by the Stokes equation. In the case of an incompressible Newtonian fluid, the fluid velocity \vec{v} and the pressure p are solutions of the system:

$$\begin{cases} \operatorname{div} \vec{v} = 0 \\ -\operatorname{grad} p + \eta \Delta \vec{v} = 0 \end{cases} \quad (1)$$

together with boundary conditions $\vec{v}(-\frac{w}{2}, y, z) = \vec{v}(\frac{w}{2}, y, z) = \vec{v}(x, 0, z) = \vec{v}(x, h, z) = \vec{0}$, where ρ is the fluid density.

The previous system (1) can be solved using Fourier series decomposition⁴⁶. Assuming a constant pressure gradient $\Delta p/L$ (where Δp is the pressure drop over the length of the channel L) corresponding to the channel sketched in Fig. 2, the solution reads :

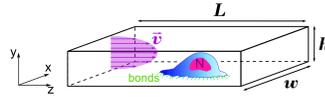


FIG. 2: Schematic view of the microchannel (height h , width w and length L) used in the experiments, with a cell (nucleus N) adhering to the bottom wall. The system of coordinates chosen to describe the flow field ($-w/2 < x < w/2$, $0 < y < h$ and $0 < z < L$) and the velocity profile in a cell free channel are represented on the left.

$$v_z(x, y) = \frac{\Delta p 4h^2}{\eta L \pi^3} \sum_{n=1,3,\dots}^{\infty} \frac{1}{n^3} \left(1 - \frac{\cosh(\frac{n\pi x}{h})}{\cosh(\frac{n\pi w}{2h})} \right) \sin\left(\frac{n\pi y}{h}\right) \quad (2)$$

with $-w/2 < x < w/2$ and $0 < y < h$.

This allows to determine the component of the stress tensor Σ of interest, i.e. $\sigma_{zy} = \eta \frac{\partial v_z}{\partial y}$, related to the wall shear stress at $y = 0$ in the absence of cells :

$$\sigma_{zy} = \frac{\eta Q \pi^2 \sum_{n=1,3,\dots}^{\infty} \left[\frac{1}{n^2} \left(1 - \frac{\cosh(\frac{n\pi x}{h})}{\cosh(\frac{n\pi w}{2h})} \right) \cos\left(\frac{n\pi y}{h}\right) \right]}{2h^2 \sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{1}{n^4} \left[w - \frac{2h}{n\pi} \tanh\left(\frac{wn\pi}{2h}\right) \right]} \quad (3)$$

Q is flow rate, w and h are respectively the channel width and height. σ_{zy} is the stress felt by the cell if it were flat, since it corresponds to the main shear forces exerted by the fluid. We will see in the final section that this value can be affected by the presence of a cell. To determine the evolution of the shear stress in the microchannel, calculations were made using the *Scilab* software.

For a thin channel ($w \gg h$), the equation (3) can be simplified and the WSS has an almost constant value across the channel x -axis (except in a narrow region close to the vertical edges) given by equation (4) and also shown in Fig. 3.

$$\sigma_{zy} \sim \frac{6\eta Q}{wh^2} \quad (4)$$

This is usually a good assumption in our experiments, with w of the order of 1 mm and h ranging between 50 and $250 \mu\text{m}$.

Data analysis

Measurements were done on time-lapse images of the cells by drawing contours using a graphical pad (see Fig. 4). Area, perimeter, circularity and ellipse parameters (axes,

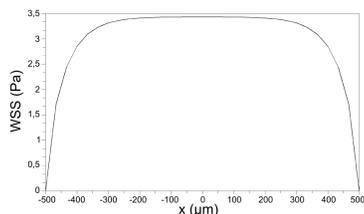


FIG. 3: Absolute isovalues of the WSS (σ_{xy}) in a (xy) cross section of parallelepipedic channel ($w = 1 \text{ mm}$, $h = 50 \text{ }\mu\text{m}$, $Q = 2.10^{-8} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, $\eta = 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$). The WSS is maximum at the top and the bottom walls of the channel ($y = 0$ and $y = h$), and equal to zero in the middle of the channel ($y = h/2$).

angle) were obtained using the ImageJ software (NIH Image, Bethesda, USA). The cell area $A(t)$ was plotted versus time as shown for instance in Fig. 5a (flow rate increased every 5 minutes). $A(t)$ was fitted by a polynomial and the mean slope was calculated from this polynomial fit for each flow rate corresponding to a determined WSS. Thus the slope $\frac{dA}{dt}$ (corresponding to the area change) was plotted versus the WSS for each value of the applied flow rate or WSS giving rise to discrete data (Fig. 5b). Since the applied duration of each flow rate was short, this allowed to obtain sufficient data for determining the critical value of the WSS (i.e. WSS_c), this value being the WSS that gives a zero-slope, therefore a maximum in cell area.

Immunofluorescence

After application of the stress cycle, right on the plateau (after 3 Pa), cells were fixed using PBS containing 3% of Paraformaldehyde (PFA) for 10 min . Membranes were permeabilized with PBS containing 1% Triton X100 for 10 min . Then the system was rinsed with PBS. A first wash was made with a solution of PBS containing 0.2% Saponine and 2% BSA. A first antibody was used (human antipaxillin) for 30 min , followed by a second wash (same as before). The second antibody TRITC (Tetramethyl Rhodamine Iso Thio Cyanate) was then used for 30 min under darkness conditions, followed by a third wash. The channel was then filled with a DAKO mounting medium. Microscopic observations were made using combined phase contrast and fluorescence.

RESULTS

In order to understand how cells behave under flow conditions, we first need to have a reference which is the spreading behaviour with no applied flow. This will allow to determine relevant cell shapes and typical times. Under static conditions, cells sediment, then they

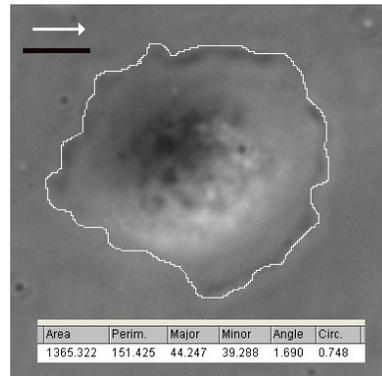


FIG. 4: Contour of T24 cell drawn with a graphic pad and measurement of cell parameters (area, perimeter, ellipse axes and angle, circularity index defined as $\frac{4\pi \text{ area}}{\text{perimeter}^2}$). The nucleus of the cell is surrounded by the lamellipodium. White arrow shows the flow direction. Black bar represents $10 \mu\text{m}$. (channel dimensions: $h = 82 \mu\text{m}$, $w = 1 \text{ mm}$, $\text{WSS} = 0,26 \text{ Pa}$)

spread on the substrate (spreading does not occur at the same time for all cells). In most cases, spreading is fast and the maximum area is reached in less than 45 minutes as shown in Fig. 6a. After this spreading step, eventually followed by random migration on the substrate, some cells retract their protrusions (corresponding to the area decrease in Fig. 6a) to reach a round shape and divide into two daughter cells.

To take into account only viable cells, we decided to observe only daughter cells. Actually, a cell divides only when under good culture conditions, and cell division gives two healthy daughter cells. During the experiment in static conditions, eleven divisions were recorded, which means twenty-two daughter cells. For each division, the contour of the daughter cells was drawn and the cell areas were measured one hour after division. To decide which areas are to be selected, we determined the statistics of our population of daughter cells. The distribution of viable cells area is given in Fig. 7. Cell areas were in the range $800\text{--}1600 \mu\text{m}^2$, with a maximum in the range $1000\text{--}1100 \mu\text{m}^2$. The mean area is $1118 \pm 248 \mu\text{m}^2$. This is the range that we selected in our experiments.

T24 cells adherent at the bottom of microchannels were submitted to increasing shear flows. We observed a biphasic behaviour: cell area first increases at low WSS, then decreases for higher values of the WSS. Typical phase-contrast images are shown in Fig. 8. The cell first adheres and spreads along the channel wall as in Fig. 8(a)-(b), while keeping a round shape with a prominent nucleus and a large lamellipodium around it. As the flow rate is increased (i.e. WSS increases), the cell area starts to decrease (Figs 8(c)-(d)) until the cell eventually loses its adherence as shown in Fig. 8(e) just before detachment.

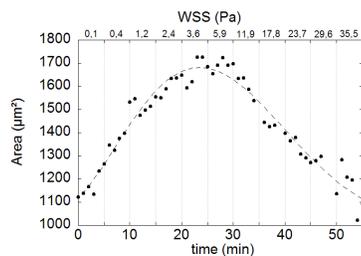


FIG. 5: a) Area versus time $A(t)$ for a T24 cell adhering to the bottom wall of a microchannel ($w = 1 \text{ mm}$, $h = 61 \text{ }\mu\text{m}$) and submitted to a flow increasing every 5 minutes. The black dots represent measurements using the ImageJ software (NIH Image, Bethesda, USA) and the thin dashed line is the polynomial fit. Wall shear stress values are given on the top axis. b) Corresponding area change $\frac{dA}{dt}$ versus WSS. The black dots represent the mean slope of $A(t)$ for a shear stress value and the thick dashed line guides the eye.

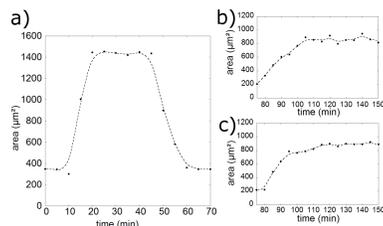


FIG. 6: T24 area in static conditions: a) Initial spreading is fast until reaching a plateau, then the area decreases just before cell division (time has been rescaled to $t = 0$ corresponding to the beginning of spreading). b) and c) Areas of the two daughter cells after the cell in graph a) has divided.

To analyze this data further, the time evolution of the area $A(t)$ of five cells is presented. Area versus time plots confirm that cell areas first increase at low WSS values (WSS values less than 3 Pa), as it can be seen in Fig. 9 which illustrates the behaviour of five cells under the same flow conditions. When the WSS is increased further, cell area increases slowly until the area reaches a maximum (as shown by the stars in Fig. 9). When the WSS increases

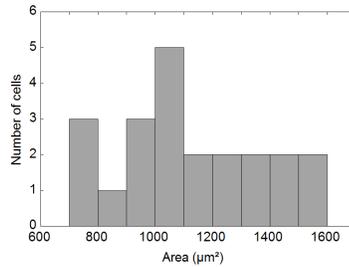


FIG. 7: Repartition of daughter cells' area in static conditions one hour after cell division

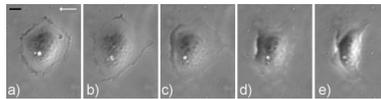


FIG. 8: Phase contrast images of a T24 cell adherent to the bottom of a microchannel ($w = 1 \text{ mm}$, $h = 64 \text{ }\mu\text{m}$) submitted to an increasing shear flow. White arrow shows the flow direction. Black bar represents $10 \text{ }\mu\text{m}$. a) $\text{WSS} = 0.64 \text{ Pa}$, b) $\text{WSS} = 6.36 \text{ Pa}$, c) $\text{WSS} = 19.1 \text{ Pa}$, d) $\text{WSS} = 31.7 \text{ Pa}$, e) $\text{WSS} = 50.8 \text{ Pa}$.

further, the area decreases with time. The maximum area corresponds to a zero-slope for $\frac{dA}{dt}$ i.e. the transition between positive and negative values of the area rate of change $\frac{dA}{dt}$ (as shown for example in Fig. 10 where the slope is plotted against the applied WSS). From the polynomial fit and its derivative, we determine the slopes $\frac{dA}{dt}$. We assume a constant slope for each 5 min time interval during which a constant WSS is applied ($0.1 - 29.6 \text{ Pa}$) as in the example shown in Fig. 10. The slope cuts the zero axis at a critical value of the WSS (WSS_c) corresponding to the maximum area (arrows in Fig. 10). Typical values of WSS_c are between 1 and 5 Pa , as shown in Fig. 11.

To investigate the influence of the confinement, experiments were carried out (at least five cells) to measure $\text{Mean} \pm \text{SD}$ of the WSS_c in channels with three different heights in the range $60 - 260 \text{ }\mu\text{m}$. We found that WSS_c slowly increases when channel height increases as shown in Fig. 11. We note that for very small heights h , the critical stress for the onset of detachment becomes smaller, since larger stresses are involved in confined channels.

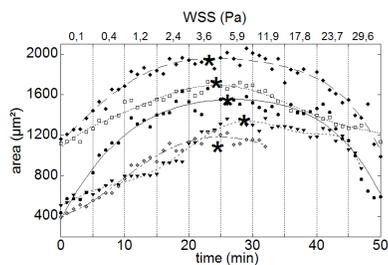


FIG. 9: Area evolution for five cells submitted to an increasing flow rate in a microchannel ($w = 1\text{ mm}$, $h = 61\text{ }\mu\text{m}$). Corresponding WSS are given on the top axis. Symbols represent experimental data (measured from phase-contrast images of the cells), which have been fitted by a standard polynomial fit (lines). For each fit, the star indicates the maximum area.

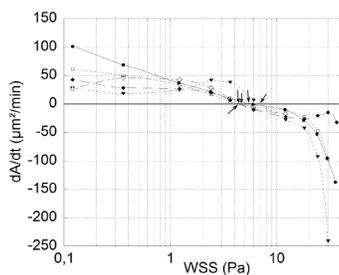


FIG. 10: Area change versus WSS for five cells submitted to an increasing flow rate in a microchannel ($w = 1\text{ mm}$, $h = 61\text{ }\mu\text{m}$). Arrows correspond to the location of the cell maximum

DISCUSSION

We need to correlate the WSS to the adhesion resistance, i.e. the forces generated by cells adhering at the wall to resist the flow. In confined geometries, the fluid is constrained by the channel walls, which leads to an increase in the flow resistance when an object partially blocks the channel. Consequently, the shear stress (WSS) really felt by adherent cells in the microchannel is roughly three times higher than the shear stress at the bottom of a cell-free channel¹⁹. The same studies have shown that for a semi-circular bulge attached to a microchannel wall in a confined vessel, the force \vec{F}_{flow} and the torque value \vec{T}_{flow} (around

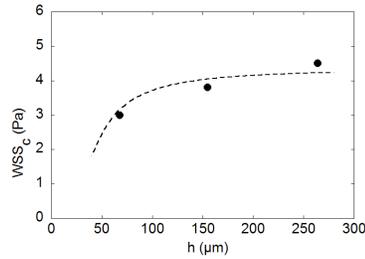


FIG. 11: WSS_c vs. channel height h (at constant $w = 1 \text{ mm}$). Insert : distribution of WSS_c for the different cells tested at different heights h

the axis going through the center of mass) induced by the flow can be generalized from 2D-simulations to the 3D-case. Explicit formulas for such force and torque are given by:

$$\vec{F}_{flow} = 24\eta\gamma^2 \frac{Q}{w} \frac{3.19 + 0.65\gamma + 4.34\gamma^2}{(1-\gamma^2)^{5/2}} \vec{e}_z \quad (5)$$

$$\vec{T}_{flow} = 12\pi\eta\gamma^2 \frac{RQ}{w} \frac{1.15 + 0.7\gamma}{(1-\gamma^2)^{5/2}} \vec{e}_x \quad (6)$$

where η is the fluid viscosity, R the cell radius, Q the flow rate, and $\gamma = \frac{R}{h}$ is the degree of confinement (h being the channel height).

In this case, due to the fact that the channel width is larger and according to the WSS calculation (see § *WSS calculation*), we can assume that this result is quite relevant.

Since the cell area decreases above a certain typical hydrodynamic force, we conclude that, above this typical value of the hydrodynamic stress, bonds are more likely to break than to form, leading to a decrease in total adhesive force. Thus there exists an equilibrium between the effect of hydrodynamic forces and adhesive forces, corresponding to the critical stress that was determined by this method. The hydrodynamic force is given in equation (5). Let us try to determine the force due to adhesive resistance of the cell that counterbalances the hydrodynamic force. We consider a cell as a half-sphere of radius R , and assume a distribution of N adhesion sites on the whole cell-substrate contact area S , which is supposed to be circular (radius R_t). An estimation of R_t was obtained in the experiments $R_t \sim 26 \pm 2 \mu\text{m}$, as will be justified later. A force \vec{f}_{ad} (which can be decomposed into a vertical component $f_{ad_y} \vec{e}_y$ and an horizontal component $f_{ad_x} \vec{e}_x$) is applied at each focal adhesion site (see Fig. 12). The total adhesion force \vec{F}_{ad} is the sum of the individual forces \vec{f}_{ad} : $\vec{F}_{ad} = \sum \vec{f}_{ad}$, and its components can be determined by summing the components of individual adhesion forces as done in the system (7):

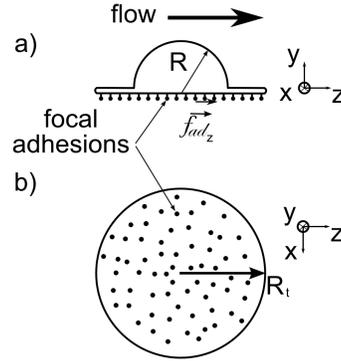


FIG. 12: Schematic views of a cell adhering to a flat surface submitted to a shear flow (flow is from left to right). a) Side view: the cell is modeled as a half-sphere (radius R). An adhesive force \vec{f}_{ad} is applied at each of the N focal adhesion sites. b) Bottom view: dots represent randomly distributed focal adhesion sites, where the individual forces \vec{f}_{ad} are exerted.

$$\begin{cases} F_{adz} = \sum f_{adz} = N f_{adz} \\ F_{ady} = \sum f_{ady} = N f_{ady} \end{cases} \quad (7)$$

When in equilibrium, adhesion forces counterbalance hydrodynamic effects and the cell does not spread any longer but still holds onto the substrate, therefore the hydrodynamic force \vec{F}_{flow} , which is along the z axis ($\vec{F}_{flow} = F_{flow} \vec{e}_z$), is balanced by the horizontal component of the adhesion force F_{adz} :

$$F_{flow} = F_{adz} \quad (8)$$

In the hydrodynamic force estimation¹⁹, the cell is represented by a semi-circular bulge of radius R and F_{flow} reads:

$$F_{flow} = 24\eta\gamma^2 \frac{Q}{w} \frac{3.19 + 0.65\frac{R}{h} + 4.34\left(\frac{R}{h}\right)^2}{\left(1 - \left(\frac{R}{h}\right)^2\right)^{5/2}} \quad (9)$$

Using equation (8)–(9), we obtain:

$$24\eta \left(\frac{R}{h}\right)^2 \frac{Q}{w} \frac{3.19 + 0.65\frac{R}{h} + 4.34\left(\frac{R}{h}\right)^2}{\left(1 - \left(\frac{R}{h}\right)^2\right)^{5/2}} = N f_{adz} \quad (10)$$

where WSS can be introduced using its value $6\eta Q/wh^2$ from equation (4). So the critical value of the WSS becomes:

$$WSS_c = Nf_{ad_z} \frac{1}{4R^2} \frac{\left(1 - \left(\frac{R}{h}\right)^2\right)^{5/2}}{3.19 + 0.65\frac{R}{h} + 4.34\left(\frac{R}{h}\right)^2} \quad (11)$$

The values of WSS_c versus h are calculated for three values of the adhesion parameter $Nf_{ad_z} = 10 nN$, $30 nN$ and $50 nN$ using $R = 18 \mu m$. Results are shown in Fig. 13.

For small channels ($h < 100 \mu m$), the WSS increases rapidly with channel height h . The increase for higher channels is much slower and shows a plateau when h becomes large: $\lim_{h \rightarrow \infty} WSS_c = \frac{Nf_{ad_z}}{12.76R^2}$. This is in agreement with our experimental data: for the three channel sizes used in the experiments, WSS_c increases with h . Fitting of the experimental data with the results of the model (11) has been carried out using Nf_{ad_z} as a parameter (see Fig. 11). Results of the fit give a good correlation (using $R = 18 \mu m$ as a good estimation of the cell height), corresponding to an approximate horizontal component of the adhesion force $F_{ad_z} = Nf_{ad_z} = 18 nN$.

Thus our modeling approach leads to the total adhesion force component in the plane corresponding to the cell-substrate contact $F_{ad_z} = 18 nN$. Although cell adhesion properties are cell and matrix-dependent⁴⁷, estimates of the forces involved can be discussed. Different techniques have been elaborated to determine cell traction forces exerted by cells on a given substrate. For example, the displacement of fluorescent beads embedded in a soft polyacrylamide gel onto which cells adhere allow to determine the traction field, i.e. the local force per unit area (or per unit adhesion site) imposed by the cell. Maximum traction forces for T24 cells, HASM cells, and 3T3 fibroblasts spread on polyacrylamide gels (elasticity modulus around $2kPa$) have been found to be respectively $0.05 kPa^1$, $0.4 kPa^5$ and $2 kPa^{32}$. As it can be seen on fluorescent images^{2,3,34}, focal adhesion sizes are usually in the range $[1 - 5 \mu m^2]$. These observations lead to traction forces between $0.05 nN$ and $10 nN$ per focal adhesion site.

Other studies using cells adhering to flexible micropillars give access to the same traction forces, correlated to focal adhesion sites located on the top of such micropillars. Fibroblasts and smooth muscle cells grown on such PDMS microposts develop cellular traction forces comprised between $1 nN$ and $10 nN^{2,26}$, whereas for individual epithelial cells migrating on micropillars¹⁸, maximal forces reached $3 nN$. Although the present situation is not that of a migrating cell, it can be useful to compare the data given above to our case, since it is important to find out how much traction a cell can exert on a substrate.

In order to be more accurate, we carried out immunofluorescence experiments after fixing the T24-cells, following the application of the previous stress cycle. Then cells were stained for immunofluorescence recognition of the paxillin molecule involved in the focal adhesion complexes. This is shown in Fig. 14, where three images are provided after application of stresses until the area plateau is reached. The first image is a phase contrast one for identification of cell contours thus providing the area, whereas the second one shows the location of paxillin, which appears mainly at the cell edges through several focal contacts. Finally we used image processing to determine the number of adhesion zones (third image), their average area and their total size. This leads to the identification of 31 such zones,

with an average area of $2.5 \mu\text{m}^2$, for a total area of $78 \mu\text{m}^2$. Meanwhile, the cell area is around $2140 \mu\text{m}^2$, corresponding to a radius $R_t = 26 \mu\text{m}$. Note that the number of focal adhesions (31) is in agreement with previous *in vivo* observations of leukocytes adhering to the endothelium²² giving rise to about 30 sites, or to a similar number (around 50) in the case of adhering rat embryonic fibroblast cells³⁴.

Therefore, based on the number of focal adhesions and their size (as determined from Fig. 14), we can estimate the average force per focal site to be about 0.58 nN , or an equivalent stress of about 230 Pa at each focal adhesion site. This is in the range of the maximum stresses found for migrating T24-cells¹ on a 10 kPa -substrate, where a maximum value of 200 Pa was found for the traction stress. In the present case, the PDMS Young's modulus used for the microchannel is roughly 0.6 MPa . Therefore, the present results seem to be quite realistic. Finally, let us note that the forces exerted by such cancer cells are rather small, as compared to fibroblasts².

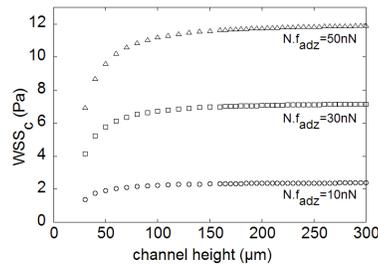


FIG. 13: WSS_c versus h calculated with the equation (9) for different values of the $N * f_{adz}$ parameter: circles $N f_{adz} = 20 \text{ nN}$, squares $N f_{adz} = 30 \text{ nN}$, triangles $N f_{adz} = 40 \text{ nN}$. In three cases, $R = 22 \mu\text{m}$.

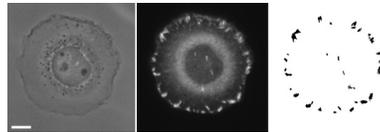


FIG. 14: WSS_c versus h . Experimental values (black dots) are fitted with the hypothesis of equilibrium of adhesion and hydrodynamic forces: $F_{flow} = F_{adz}$. Results of the fit give: $N f_{adh} = 28 \text{ Pa}$.

CONCLUSIONS

A microfluidics experiment has been carried out to detach cancer cells adhering to the bottom of a micro-fabricated channel. The analysis of the cell morphology has revealed the cell resistance to increasing flow, until a critical stress WSS_c is reached. This critical stress is a function of the product $N f_{ad_z}$ of adhesion sites number N with their strength f_{ad_z} , as well as the ratio h/R , h being the channel height and R the cell height. When h/R decreases, the sensitivity of WSS_c to h/R becomes more pronounced, whereas it reaches a constant limit at large h/R . This rather simple experiment was combined with fluorescent assays to allow the determination of the forces developed at each focal site. Although this analysis contains estimates, it seems to be able to predict adhesion parameters rather well, when compared to previous studies related to traction forces exerted by adhering/migrating cells. It also confirms a previous result showing that such cancer cells exert small forces, therefore they can move faster. Further fluorescence studies are now needed to correlate more precisely the distribution of adhesion sites (size, number, position) as a function of the applied shear stress.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the European Commission Marie Curie Research Training Network MRTN-CT-2004-503661 "Modelling, mathematical methods and computer simulation of tumour growth and therapy" (<http://calvino.polito.it/mcrtn/>) for its support. We are also thankful to V. M. Laurent for helpful discussions and reading of the manuscript.

REFERENCES

-
1. Ambrosi, D., A. Duperray, V. Peschetola, C. Verdier. Traction patterns of tumor cells. *J. Math. Biol.* in press, doi 10.1007/s00285-008-0167-1, 2008.
 2. Balaban, N. Q., U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Gochberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi and B. Geiger. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micro-patterned substrates. *Nat. Cell Biol.* 3:466–472, 2001.
 3. Bershadsky, A. D., N. Q. Balaban and B. Geiger. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19:677–695, 2003.

4. Bohnet, S., R. Ananthakrishnan, A. Mogilner, J.-J. Meister and A. B. Verkhovskiy. Weak force stalls protrusion at the leading edge of the lamellipodium. *Biophys. J.* 90:1810–1820, 2006.
5. Butler, J. P., I. M. Tollic-Norrelykke, B. Fabry and J. Fredberg. Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am. J. Physiol.* 282:C595–C1605, 2002.
6. Cao, J., B. Donell, D. R. Deaver, M. B. Lawrence and C. Dong. In vitro side-view imaging technique and analysis of human T-leukemic cell adhesion to ICAM-1 in shear flow. *Microvasc. Res.* 55:124–137, 1998.
7. Chachivilis, M., Y.-L. Zhang and J. A. Frangos. G-protein coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:15463–15468, 2006.
8. Chaw, K. C., M. Manimaran, E. H. Tay and S. Swaminathan. Multi-step microfluidic device for studying cancer metastasis. *Lab Chip* 7:1047–1047, 2007.
9. Chotard-Ghodsnia, R., A. Drochon, N. Faucheux, M. D. Nagel and R. Grebe. Effect of shear stress and of transmural pressure on cAMP-dependent responses of cells adhering to a biomaterial. *Eur. Phys. J. AP* 17:155–162, 2002.
10. Chotard-Ghodsnia, R., O. Haddad, A. Leyrat, A. Drochon, C. Verdier and A. Duperay. Morphological analysis of tumor cell/endothelial cell interactions under shear flow. *J. Biomech.* 40:335–344, 2007.
11. Coughlin, M. F., and G. W. Schmid-Schönbein. Pseudopod projection and cell spreading of passive leukocytes in response to fluid shear stress. *Biophys. J.* 87:2035–2042, 2004.
12. Dalous, J., E. Burghardt, A. Müller-Taubenberger, F. Bruckert, G. Gerisch and T. Bretschneider. Reversal of cell polarity and actin-myosin cytoskeleton reorganization under mechanical and chemical stimulation. *Biophys. J.* 94:1063–1074, 2008.
13. De, R., A. Zemel and S. A. Safran. Dynamics of cell orientation. *Nature Physics* 3 :655–659, 2007.
14. Decave, E., D. Garrivier, Y. Bréchet, B. Fourcade and F. Bruckert. Shear flow-induced detachment kinetics of dictyostellium discoideum cells from solid substrate. *Biophys. J.* 82:2383–2395, 2002.
15. Discher, D.E., P. Janmey and Y. Wang. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* : 310:1139–1143, 2005.

16. Dong, C., X. X. Lei. Biomechanics of cell rolling: shear flow, cell-surface adhesion, and cell deformability. *J. Biomech.* 33:35–43, 2000.
17. Duffy, D. C., J. Cooper McDonald, O. J. A. Schueller and G. M. Whitesides. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal. Chem.* 70:4974–4984, 1998.
18. du Roure, O., A. Saez, A. Buguin, R. H. Austin, P. Chavrier, P. Silberzan and B. Ladoux. Force mapping in epithelial cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:2390–2395, 2005.
19. Gaver, D. P. and S. M. Kute. A theoretical model study of the influence of fluid stresses on a cell adhering to a microchannel wall. *Biophys. J.* 75:721–733, 1998.
20. Gutierrez, E. and A. Groisman. Quantitative measurements of the strength of adhesion of human neutrophils to a substratum in a microfluidic device. *Anal. Chem.* 79:2249–2258, 2007.
21. Hammer, D.A. and D. A. Lauffenburger. A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces. *Biophys. J.* 52:475–487, 1987.
22. House, S. D., H. H. Lipowsky. In vivo determination of the force of leukocyte-endothelium adhesion in the mesenteric microvasculature of the cat. *Circ. Res.* 63:658–668, 1998.
23. Irima, D., G. Charras, N. Agrawal, T. Mitchison and M. Toner. Polar stimulation and constrained cell migration in microfluidic channels. *Lab Chip* 7:1783–1790, 2007.
24. Kwon, K. W., S. S. Choi, S. H. Lee, B. Kim, S. N. Lee, M. C. Park, P. Kim, S. Y. Hwang and K. Y. Suh. Label-free, microfluidic separation and enrichment of human breast cancer cells by adhesion difference. *Lab Chip* 7:1461–1468, 2007.
25. Lawrence, M.B. and T. A. Springer. Leukocytes roll on a selectin at physiological flow rates: Distinction from and Prerequisite for Adhesion through Integrins. *Cell* 65:859–873, 1991.
26. Li, B., L. Xie, Z. C. Starr, Z. Yang, J. L. Lin and J. H. C. Wang. Development of micropost force sensor array with culture experiments for determination of cell traction forces. *Cell Motil. Cytoskeleton* 22:509–518, 2007.
27. Lo, C. M., H. B. Wang, H.B., M. Dembo and Y. L. Wang. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* 79:144–152, 2000.
28. Lu, H., L. Y. Koo, W. M. Wang, D.A. Lauffenburger, L. G. Griffith and K. F. Jensen. Microfluidic shear device for quantitative analysis of cell adhesion. *Anal. Chem.* 76:5257–5264, 2004.
29. Makino, A., M. Glogauer, G. M. Bokoch, S. Chien and G. W. Schmid-Schönbein. Control

- of neutrophil pseudopods by fluid shear: role of Rho family GTPases. *Am. J. Physiol.* 863:C871–C1674, 2005.
30. Miles, F. L., F. L. Pruitt, K. L. van Golen and C. R. Cooper. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* online first, 2007.
31. Moazzam, F., F. A. DeLano, B. Zweifach and G. W. Schmid-Schönbein. The leukocyte response to fluid stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5338–5343, 1997.
32. Munevar, S., Y-L. Wang and M. Dembo. Distinct roles of frontal and rear cell-substrate adhesions in fibroblast migration. *Mol. Biol. Cell* 12:3947–3954, 2001.
33. Okada, T., H. Okuno, H. Mitsui. A novel in vitro assay system for transendothelial tumor cell invasion: significance of E-selectin and alpha 3 integrin in the transendothelial invasion by HT1080 fibrosarcoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 12:305–314, 1994.
34. Paul, R., P. Heil, J. P. Spatz and U. S. Schwartz. Propagation of mechanical stress through the actin cytoskeleton toward focal adhesions: model and experiment. *Biophys. J.* 94:1470–1482, 2008.
35. Pierres, A., A. M. Benoliel and P. Bongrand. Measuring the lifetime of bonds made between surface-linked molecules. *J. Biol. Chem.* 270:26586–26592, 1995.
36. Pozrikidis, C. Shear flow over a protuberance on a plane wall. *J. Eng. Math.* 31:29–42, 1997.
37. Reinhart-King, C. A., M. Dembo and D. H. Hammer. The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. *Biophys. J.* 89:676–689, 2005.
38. Riveline, D., E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger and 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.* 153:1175–1186, 2001.
39. Saadi, W., S-J. Wang, F. Lin and N. L. Jeon. A parallel-gradient microfluidic chamber for quantitative analysis of breast cancer cell chemotaxis. *Biomed. Microdev.* 8:109–118, 2006.
40. Springer T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301–314, 1994.
41. Théry, M. V. Racine, M. Piel, A. Pépin, A. Dimitrov, Y. Chen, J. Sibarita and M. Bornens. Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:19771–19776, 2006.
42. Thoumine, O., T. Ziegler, P. R. Girard and R. M. Nerem. Elongation of confluent endothe-

- lial cells in culture: the importance of fields of force in the associated alterations of their cytoskeletal structure. *Exp. Cell Research* 219:427–441, 1995.
43. Verdier, C. Review. Rheological properties of living materials: From cells to tissues J. Theor. Med. 5:67–91, 2003.
 44. Verdier, C., C. Couzon, A. Duperray and P. Singh. Modelling cell interactions under flow. *J. Math. Biol.* in press, doi 10.1007/s00285-008-0164-4, 2008.
 45. Wankhede, S. P., Z. Du, J. M. Berg, M. W. Vaughn, T. Dallas, K. H. Cheng and L. Golahon. Cell detachment model for an antibody-based microfluidic cancer screening system. *Biotechnol. Prog.* 22:1426–1433, 2006.
 46. White, F. M. Fluid mechanics. New York : McGraw-Hill, 2003.
 47. Young, E. W. K., A. R. Wheeler and C. A. Simmons. Matrix-dependant adhesion of vascular endothelial cells in microfluidic channels. *Lab Chip* 7:1759–1766, 2007.

PHÉNOMÈNE DE BLEBBING

Le terme « blebbing » est utilisé pour décrire la formation de bleb(s), i. e. des gonflements localisés de la membrane de la cellule. Ce phénomène se produit généralement pendant l'apoptose, la migration cellulaire et la mitose (Charras *et al.*, 2008). Il correspond à un décollement de la membrane plasmique du cytosquelette à certains endroits où celui-ci est brisé. La membrane entraîne alors avec elle une partie du cytoplasme, ce qui forme une petite « cloque » à la périphérie de la cellule. Nous avons observé du blebbing à plusieurs reprises lors de la phase de mise au point du dispositif expérimental (Fig. C.1), lorsque les conditions expérimentales n'étaient pas encore optimales pour les cellules T24. Ce comportement se produisait lors de la phase d'étalement en conditions statiques, précédant l'application du flux : certaines cellules gardaient une forme sphérique au lieu de s'étaler, elles restaient par conséquent très réfringentes en contraste de phase. La membrane de ces cellules non étalées formait ensuite rapidement des blebs, ce phénomène se poursuivant lors de l'application du flux. Le temps de formation de ces gonflements de membrane était assez court : un bleb apparaissait généralement en quelques secondes, puis disparaissait au bout d'une à quelques minutes. La taille caractéristique d'un bleb est plusieurs microns (typiquement 2 à 10 μm de diamètre). Nos travaux portant sur le comportement de cellules T24 étalées et soumises à un flux, nous nous sommes intéressés à des cellules bien étalées et n'avons pas fait d'étude sur le blebbing. Nous pouvons cependant émettre des hypothèses sur la ou les cause(s) de ce phénomène : nous pensons que les conditions de température et d'éclairage pourraient être en cause. Nous avons en effet observé que les blebs étaient plus fréquents lorsque la chambre thermostatée n'était pas bien isolée (isolation de la chambre thermostatée pas encore optimale ou chambre thermostatée mal fermée). Le fait d'éclairer en permanence les cellules afin de suivre leur étalement semble également augmenter la probabilité d'avoir du blebbing à la périphérie des cellules.

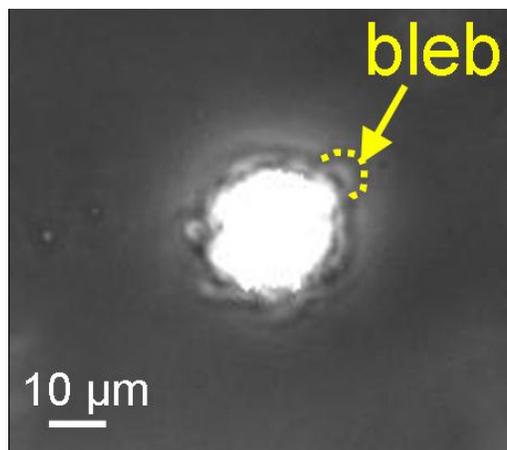


FIG. C.1: Phénomène de blebbing : des gonflements de membrane (blebs) apparaissent à la surface de certaines cellules pas ou peu étalées et très réfringentes.

Le phénomène de blebbing a fait l'objet de plusieurs travaux expérimentaux et théoriques. Charras *et al.* ont mis en évidence une phase d'expansion et une phase de rétraction distinctes (Charras *et al.*, 2005). Ils ont montré l'absence de cytosquelette d'actine au niveau de la membrane pendant la phase d'expansion des blebs (l'actine étant localisée à la base du bleb) tandis que pendant la phase de rétraction, le cortex d'actine se dissocie à la base du bleb et un nouveau cytosquelette cortical se forme au niveau de la membrane du bleb. En inhibant la myosine II et dépolymérisant l'actine localement, ils ont prouvé que la pression générée par la contraction du cortex agit localement pour créer des blebs. Ces résultats sont en accord avec ceux de Cunningham (Cunningham, 1995) qui avait montré dix ans plus tôt que l'origine des blebs ne résidait pas dans la polymérisation de l'actine, mais dans des effets dus à un écoulement (le flux en question étant le cytoplasme). Le blebbing serait donc un phénomène physique, dépendant de facteurs tels que la tension de membrane, la pression cytosolique et l'énergie d'adhésion entre la membrane et le cortex d'actine (Charras *et al.*, 2008).

Le blebbing a également été reconnu comme un mode d'invasivité de certaines cellules cancéreuses (Lawler *et al.*, 2006) : Lawler *et al.* ont en effet mis en évidence que l'activation de cellules métastatiques de l'œsophage sous l'effet d'un flux se traduit par la formation de blebs, contrôlée par une protéine kinase Rho : ROCK. Leurs travaux montrent que le phénomène de blebbing augmente avec l'intensité du flux, indépendamment de l'adhésion via les intégrines.

BIBLIOGRAPHIE

- ABERCROMBIE, M. et DUNN, G. A. (1975). Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Exp Cell Res*, 92:57–62.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. et WALTER, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell. Fourth Edition*. Garland Publishing.
- AMBROSI, D., DUPERRAY, A., PESCHETOLA, V. et VERDIER, C. (2008). Traction patterns of tumor cells. *J Math Biol*.
- AMOS, L. A. et SCHLIEPER, D. (2005). Microtubules and maps. *Adv Protein Chem*, 71:257–289.
- BALABAN, N. Q., SCHWARTZ, U. S., RIVELINE, D., GOICHBURG, P., TZUR, G., SABANAY, I., MAHALU, D., SAM SAFRAN, BERSHADSKY, A., ADDADI, L. et BENJAMIN GEIGER, B. (2001). Force and focal adhesion assembly :a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature Cell Biology*, 3:466–472.
- BEIL, M., MICOULET, A., von WICHERT, G., PASCHKE, S., WALTHER, P., OMARY, M. B., VELDHOFEN, P. P. V., GERN, U., WOLFF-HIEBER, E., EGGERMANN, J., WALTENBERGER, J., ADLER, G., SPATZ, J. et SEUFFERLEIN, T. (2003). Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and visco-elastic properties of human cancer cells. *Nat Cell Biol*, 5:803–811.
- BELL, G. I. (1978). Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200(4342):618–627.
- BELL, G. I., DEMBO, M. et BONGRAND, P. (1984). Competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys J*, 45:1051–1064.
- BERSHADSKY, A., CHAUSOVSKY, A., BECKER, E., LYUBIMOVA, A. et GEIGER, B. (1996). Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr Biol*, 6:1279–1289.
- BERSHADSKY, A. D., BALABAN, N. Q. et GEIGER, B. (2003). Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19:677–695.

- BOCKHÖLT, S. M. et BURRIDGE, K. (1993). Cell spreading on extracellular matrix proteins induces tyrosine phosphorylation of tensin. *J Biol Chem*, 268:14565–14567.
- BOHNET, S., ANANTHAKRISHNAN, R., MOGILNER, A., MEISTER, J.-J. et VERKHOVSKY, A. B. (2006). Weak force stalls protrusion at the leading edge of the lamellipodium. *Biophys J*, 90(5):1810–1820.
- BROWN, M. J. et LOEW, L. M. (1994). Electric field-directed fibroblast locomotion involves cell surface molecular reorganization and is calcium independent. *J Cell Biol*, 127.
- BRUDER, J. L. J., HSIEH, T., LEREA, K. M., OLSON, S. C. et DAVIES, J. M. W. F. (2001). Induced cytoskeletal changes in bovine pulmonary artery endothelial cells by resveratrol and the accompanying modified responses to arterial shear stress. *BMC Cell Biology*, 2 :1.
- BRUINSMA, R., GOULIAN, M. et PINCUS, P. (1994). Self-assembly of membrane junctions. *Biophys J*, 61:746–750.
- BURRIDGE, K. et CHRZANOWSKA-WODNICKA, M. (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12:463–518.
- BURRIDGE, K., FATH, K., KELLY, T., NUCKOLLS, G. et TURNER, C. (2007). Focal adhesions : transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*, 4:487–525.
- BURRIDGE, K., TURNER, C. E. et ROMER, L. H. (1992). Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125fak accompanies cell adhesion to extracellular matrix : a role in the cytoskeletal assembly. *J Cell Biol*, 119:893–903.
- BUTLER, J. P., TOLIC-NORRELYKKE, I. M., FABRY, B. et FREDBERG, J. J. (2002). Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282:C595–C605.
- CAO, J., DONELL, B., DEEVER, D. R., LAWRENCE, M. B. et DONG, C. (1998). In vitro side-view imaging technique and analysis of human t-leukemic cell adhesion to icam-1 in shear flow. *Microvasc Res*, 55(2):124–137.
- CHARRAS, G. T., COUGHLIN, M., MITCHISON, T. J. et MAHADEVAN, L. (2008). Life and times of a cellular bleb. *Biophys J*, 94:1836–1853.
- CHARRAS, G. T., YARROW, J. C., HORTON, M. A., MAHADEVAN, L. et MITCHISON, T. J. (2005). Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature*, 435(7040):365–369.

- CHAW, K. C., MANIMARAN, M. et SWAMINATHAN, S. (2007). Multi-step microfluidic device for studying cancer metastasis. *Lab on a chip*, 7:1041–1047.
- CHOTARD-GHODSNIA, R., DROCHON, A., DUPERRAY, A., LEYRAT, A. et VERDIER, C. (2003). *Static and dynamic interactions between circulating cells and the endothelium in cancer*, chapitre 9, pages 243–267. "Cancer modelling and simulation", L. Preziosi Eds. CRC Press.
- CHOTARD-GHODSNIA, R., DROCHON, A., FAUCHEUX, N., NAGEL, M. D. et GREBE, R. (2002). Effect of shear stress and of transmural pressure on camp-dependent responses of cells adhering to a biomaterial. *Eur Phys J AP*, 17:155–162.
- CINAMON, G. et ALON, R. (2003). A real time in vitro assay for studying leukocyte trans-endothelial migration under physiological flow conditions. *Journal of Immunological Methods*, 273:53–62.
- COHEN, C. R., MILLS, I., KAMAL, K. et SUMPPIO, E. (1997). Activation of the adenylyl cyclase/cyclic amp/protein kinase a pathway in endothelial cells exposed to cyclic strain. *Exp Cell Res*, 231:184–189.
- COUGHLIN, M. F. et SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. (2004). Pseudopod projection and cell spreading of passive leukocytes in response to fluid shear stress. *Biophys J*, 87(3):2035–2042.
- COZENS-ROBERTS, C., QUINN, J. A. et LAUFFENBERGER, D. A. (1990). Receptor-mediated adhesion phenomena. model studies with the radical-flow detachment assay. *Biophys J*, 58(1):107–125.
- CUNNINGHAM, C. C. (1995). Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *The Journal of Cell Biology*, 129:1589–1599.
- CURTIS, A. S. (1962). Cell contact and adhesion. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 37:82–129.
- CURTIS, A. S. G. (1960). Cell contacts : Some physical considerations. *Am Naturalist*, 94:37–56.
- CUVELIER, D., THÉRY, M., CHU, Y. S., DUFOUR, S., THIÉRY, J. P., BORNENS, M., NASSOY, P. et MAHADEVAN, L. (2007). Adhesion induced by mobile stickers : A list of scenarios. *Current Biology*, 17:694–699.
- DALOUS, J., BURGHARDT, E., MÜLLER-TAUBENBERGER, A., BRUCKERT, F., GERISCH, G. et BRETSCHNEIDER, T. (2008). Reversal of cell polarity and actin-myosin cytoskeleton reorganization under mechanical and chemical stimulation. *Biophys J*, 94:1063–1074.

- DAN, N., PINCUS, P. et SAFRAN, S. A. (1993). Membrane-induced interactions between inclusions. *Langmuir*, 9:2767–2771.
- DÉCAVÉ, E., GARRIVIER, D., BRÉCHET, Y., FOURCADE, B. et BRUCKERT, F. (2002). Shear flow-induced detachment kinetics of dictyostelium discoideum cells from solid substrate. *Biophys J*, 82(5):2383–2395.
- DEMBO, M. et WANG, Y. L. (1999). Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J*, 76(4):2307–2316.
- DEPLANO, V. et SIOUFFI, M. (2005). Experimental and numerical study of pulsatile flows through stenosis : Wall shear stress analysis. *J Biomech*, 4:236–246.
- DEWEY, C. F. J., BUSSOLARI, S. R., GIMBRONE, M. A. J. et DAVIES, P. F. (1981). The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomed Eng*, 103:177–185.
- DISCHER, D. E., JANMEY, P. et WANG, Y.-L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310(5751):1139–1143.
- DONG, C., CAO, J., STRUBLE, E. J. et LIPOWSKY, H. H. (1999). Mechanics of leukocyte deformation and adhesion to endothelium in shear flow. *Ann Biomed Eng*, 27(3):298–312.
- DONG, C. et LEI, X. X. (2000). Biomechanics of cell rolling : shear flow, cell-surface adhesion, and cell deformability. *J Biomech*, 33(1):35–43.
- du ROURE, O., SAEZ, A., BUGUIN, A., AUSTIN, R. H., CHAVRIER, P., SILBERZAN, P. et BENOIT LADOUX, B. (2005). Force mapping in epithelial cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:2390–2395.
- DUFFY, D. C., McDONALD, J. C., SCHUELLER, O. J. A. et WHITESIDES, G. M. (1998). Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem*, 70:4974–4984.
- EVANS, E. A. et HOCHMUTH, R. M. (2003). Membrane viscoelasticity. *Biophys J*, 16:1–11.
- FISCELLA, M., ULLRICH, S. J., ZAMBRANO, N., SHIELDS, M. T., LIN, D., LEES-MILLER, S. P., ANDERSON, C. W., MERCER, W. E. et APPELLA, E. (1993). Mutation of the serine 15 phosphorylation site of human p53 reduces the ability of p53 to inhibit cell cycle progression. *Oncogene*, 8:1519–1528.
- FUCHS, E. et WEBER, K. (1994). Intermediate filaments : structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, 63:345–382.

- FUDGE, D. S., GARDNER, K. H., FORSYTH, V. T., RIEKEL, C. et JOHN M. GOSLINE (2003). The mechanical properties of hydrated intermediate filaments : Insights from hagfish slime threads. *Biophys J*, 85:2015–2027.
- FUNG, Y. C. (1984). *Biodynamics : Circulation*. Springer—Verlag, New York.
- GALBRAITH, C. G., SKALAK, R. et CHIEN, S. (1998). Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton*, 40(4):317–330.
- GAVER, D. P. et KUTE, S. M. (1998). A theoretical model study of the influence of fluid stresses on a cell adhering to a microchannel wall. *Biophys J*, 75(2):721–733.
- GIANCOTTI, F. G. et RUOSLAHTI, E. (1999). Integrin signaling. *Science*, 285.
- GLASS, W. F. et KREISBERG, J. I. (1993). Regulation of integrin-mediated adhesion at focal contacts by cyclic amp. *J Cell Physiol*, 157:296–306.
- GUTIERREZ, E. et GROISMAN, A. (2007). Quantitative measurements of the strength of adhesion of human neutrophils to a substratum in a microfluidic device. *Anal Chem*, 79(6):2249–2258.
- HAMMER, D. et LAUFFENBURGER, D. A. (1987). A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces. *Biophys J*, 52:475–487.
- HAN, J. D. et RUBIN, C. S. (1996). Regulation of cytoskeleton organization and paxillin dephosphorylation by camp. *J Biol Chem*, 271:29211–29215.
- HARRIS, A. (1973). Behavior of cultured cells on substrata of variable adhesiveness. *Experimental Cell Research*, 77.
- HELFRICH, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers : theory and possible experiments. *Z Naturforsch [C]*, 28:693–703.
- HOUSE, S. D. et LIPOWSKY, H. H. (1998). In vivo determination of the force of leukocyte-endothelium adhesion in the mesenteric microvasculature of the cat. *Circ Res*, 63:658–668.
- HUANG, H. W. (1986). Deformation free energy of bilayer membrane and its effect on gramicidin channel lifetime. *Biophys J*, 50:1061–1070.
- HUXLEY, H. E. (1963). Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J Mol Biol*, 7:281–308.
- HYNES, R. O. (1992). Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69:11–25.

- INGBER, D. E. (2003). Tensegrity ii. how structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci*, 116:1397–1408.
- IRIMIA, D., CHARRAS, G., AGRAWAL, N., MITCHISON, T. et TONER, M. (2007). Polar stimulation and constrained cell migration in microfluidic channels. *Lab Chip*, 7(12): 1783–1790.
- ISRAELACHVILI, J. N. (1985). *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, London.
- IZZARD, C. S. et LOCHNER, L. R. (1976). Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts : an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J Cell Sci*, 21:129–159.
- JADHAV, S., EGGLETON, C. D. et KONSTANTOPOULOS, K. (2005). A 3-d computational model predicts that cell deformation affects selectin-mediated leukocyte rolling. *Biophys J*, 88(1):96–104.
- KHISMATULLIN, D. B. et TRUSKEY, G. A. (2004). A 3d numerical study of the effect of channel height on leukocyte deformation and adhesion in parallel-plate flow chambers. *Microvasc Res*, 68(3):188–202.
- KORB, T., SCHLÜTER, K., ENNS, A., SPIEGEL, H.-U., SENNINGER, N., NICOLSON, G. L. et HAIER, J. (2004). Integrity of actin fibers and microtubules influences metastatic tumor cell adhesion. *Exp Cell Res*, 299(1):236–247.
- KWON, K. W., CHOI, S. S., LEE, S. H., KIM, B., LEE, S. N., PARK, M. C., KIM, P., HWANG, S. Y. et SUH, K. Y. (2007). Label-free, microfluidic separation and enrichment of human breast cancer cells by adhesion difference. *Lab Chip*, 7:1461–1468.
- LADYZHENSKAYA, O. A. (1969). *The mathematical theory of viscous incompressible flow*. Gordon and Breach.
- LAWLER, K., FORAN, E., O’SULLIVAN, G., LONG, A. et KENNY, D. (2006). Mobility and invasiveness of metastatic esophageal cancer are potentiated by shear stress in a rock-and ras-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291:C668–C677.
- LEACH, F. S., TOKINO, T., MELTZER, P., BURRELL, M., OLINER, J. D., SMITH, S., HILL, D. E., SIDRANSKY, D., KINZLER, K. W. et VOGELSTEIN, B. (1993). p53 mutation and mdm2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res*, 15:2231–2234.
- LEGENDRE, P., SALSMANN, A., RAYES, J., TRASSARD, O., KIEFFER, N. et BARUCH, D. (2005). Cho cells expressing the high affinity $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin demonstrate enhanced adhesion under shear. *J Biomechanics*, 32:1081–1090.

- LI, B., XIE, L., STARR, Z. C., YANG, Z., LIN, J.-S. et WANG, J. H.-C. (2007). Development of micropost force sensor array with culture experiments for determination of cell traction forces. *Cell Motil Cytoskeleton*, 64(7):509–518.
- LIU, B. P., CHRZANOWSKA-WODNICKA, M. et BURRIDGE, K. (1998). Microtubule depolymerization induces stress fibers, focal adhesions, and dna synthesis via the gtp-binding protein rho. *Cell Adhes Commun*, 5:249–255.
- LO, C. M., WANG, H. B., DEMBO, M. et WANG, Y. L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*, 79:144–152.
- LOWE, B. (1997). The role of ca²⁺ in deflection-induced excitation of motile, mechano-responsive balancer cilia in the ctenophore statocyst. *J Exp Biol*, 200.
- LU, H., KOO, L. Y., WANG, W. M., LAUFFENBURGER, D. A., GRIFFITH, L. G. et JENSEN, K. F. (2004). Microfluidic shear devices for quantitative analysis of cell adhesion. *Anal Chem*, 76(18):5257–5264.
- MAKINO, A., GLOGAUER, M., BOKOCH, G. M., CHIEN, S. et SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. (2005). Control of neutrophil pseudopods by fluid shear : role of rho family gtpases. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(4):C863–C871.
- MANOLOPOULOS, V. G. et LELKES, P. I. (1993). Cyclic strain and forskolin differentially induce camp production in phenotypically diverse endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 191:1379–1385.
- MCDONALD, J. C., DUFFY, D. C., ANDERSON, J. R., CHIU, D. T., WU, H., SCHUELLER, O. J. A. et WHITESIDES, G. M. (2000). Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 21:27–40.
- MCMAMEE, C. J., PENNINGTON, S. R. et SHETERLINE, P. (1995). Cell cycle-dependant morphological changes in the actin cytoskeleton induced by agents which elevate cyclic amp. *Cell Biol Int*, 19:769–775.
- MENES, R. et SAFRAN, S. A. (1997). Nonlinear response of membranes to pinning sites. *Physical Review E*, 56:1891–1899.
- MILES, F. L., PRUITT, F. L., van GOLEN, K. L. et COOPER, C. R. (2008). Stepping out of the flow : capillary extravasation in cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 25:304–324.
- MITCHISON, T. et KIRSCHNER, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312:237–242.

- MIZUNO, D., TARDIN, C., SCHMIDT, C. F. et MACKINTOSH, F. C. (2007). Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks. *Science*, 315:370–373.
- MOAZZAM, F., DELANO, F. A., ZWEIFACH, B. W. et SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. (1997). The leukocyte response to fluid stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(10):5338–5343.
- MUNEVAR, S., WANG, Y. L. et DEMBO, M. (2001). Distinct roles of frontal and rear cell-substrate adhesions in fibroblast migration. *Mol Biol Cell*, 12(12):3947–3954.
- NOBES, C. D. et HALL, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 gtpases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81:53–62.
- P. G. de GENNES, P. H. P. et BROCHARD-WYART, F. (2003). Adhesion induced by mobile stickers : A list of scenarios. *Langmuir*, 19:7112–7119.
- PANTALONI, D., CLAINCHE, C. L. et CARLIER, M. F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science*, 103:1502–1506.
- PAUL, R., HEIL, P., SPATZ, J. P. et SCHWARZ, U. S. (2008). Propagation of mechanical stress through the actin cytoskeleton toward focal adhesions : model and experiment. *Biophys J*, 94(4):1470–1482.
- PEEL, M. M. et DIMILLA, P. A. (1999). Effect of cell-cell interactions on the observable strength of adhesion of sheets of cells. *Ann Biomed Eng*, 27:236–246.
- PELHAM, R. J. J. et WANG, Y. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:13661–13665.
- PETTIT, E. J. et FAY, F. S. (1998). Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiological Reviews*, 78:949–967.
- POLLARD, T. D. (1986). Rate constants for the reactions of atp- and adp-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol*, 103:2747–2754.
- POLLARD, T. D. et BORISY, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 16:453–465.
- POZRIKIDIS, C. (1997). Shear flow over a protuberance on a plane wall. *J Eng Math*, 31:29–42.
- REICH, K. M., GAY, C. V. et FRANGOS, J. A. (1990). Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production. *J Cell Physiol*, 143:100–104.
- RENEMAN, R. S., ARTS, T. et HOEKS, A. P. G. (2006). Wall shear stress—an important determinant of endothelial cell function and structure—in the arterial system in vivo. discrepancies with theory. *J Vasc Res*, 43(3):251–269.

- RIDLEY, A. J., PATERSON, H. F., JOHNSON, C. L., DIEKMANN, D. et A., H. (1992). The small gtp-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70:401–410.
- RIEU, J.-P., BARENTIN, C., MAEDA, Y. et SAWADA, Y. (2005). Direct mechanical force measurements during the migration of dictyostelium slugs using flexible substrata. *Biophys J*, 89(5):3563–3576.
- RIVELINE, D., ZAMIR, E., BALABAN, N. Q., SCHWARZ, U. S., ISHIZAKI, T., NARUMIYA, S., KAM, Z., GEIGER, B. et BERSHADSKY, A. D. (2001). Focal contacts as mechanosensors : externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mdia1-dependent and rock-independent mechanism. *J Cell Biol*, 153:1175–1186.
- SAADI, W., WANG, S.-J., LIN, F. et JEON, N. L. (2006). A parallel-gradient microfluidic chamber for quantitative analysis of breast cancer cell chemotaxis. *Biomed Microdevices*, 8(2):109–118.
- SAEZ, A., GHIBAUDO, M., BUGUIN, A., SILBERMAN, P. et LADOUX, B. (2007a). Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:8281–8286.
- SAEZ, A., GHIBAUDO, M. et LADOUX, B. (2007b). Les cellules vivantes répondent à la rigidité de leur substrat. *Publications du CNRS, Images de la Physique*, 2:94–100.
- SARANAK, J. et FOSTER, K. W. (1997). Rhodopsin guides fungal phototaxis. *Nature*, 387:465–466.
- SCHWARTZ, U. S., BALABAN, N. Q., RIVELINE, D., BERSHADSKY, A., b. GEIGER et SAFRAN, A. (2002). Calculation of forces at focal adhesions from elastic substrate data : The effect of localized force and the need for regularization. *Biophys J*, 83:1380–1394.
- SHARP, D. J., ROGERS, G. C. et SCHOLEY, J. M. (1985). Cytoplasmic dynein is required for poleward chromosome movement during mitosis in drosophila embryos. *Nat Cell Biol*, 2:922–930.
- SHEETZ, M. P. (2001). Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:392–396.
- SHEETZ, M. P., SABLE, J. E. et DÖBEREINER, H.-G. (2006). Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 35:417–434.

- SIMSON, R., WALLRAFF, E., FAIX, J., NIEWÖHNER, J., GERISCH, G. et SACKMANN, E. (1998). Membrane bending modulus and adhesion energy of wild-type and mutant cells of dictyostelium lacking talin or cortexillins. *Biophys J*, 74(1):514–522.
- SINGER, S. J. et NICOLSON, G. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175:720–731.
- SU, S. S. et SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. (2008). Fluid stresses on the membrane of migrating leukocytes. *Ann Biomed Eng*, 36:298–307.
- SURESH, S. (2007). Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomater*, 3(4):413–438.
- THERIOT, J. A., MITCHISON, T. J., TILNEY, L. G. et PORTNOY, D. A. (1992). The rate of actin-based motility of intracellular listeria monocytogenes equals the rate of actin polymerization. *Nature*, 16:257–260.
- THIERY, J. P. (2003). Cell adhesion in cancer. *Comptes Rendus de Physique*, 4:289–304.
- TROYER, D. A., BOUTON, A., BEDOLLA, R. et PADILLA, R. (1996). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125fak) : regulation by camp and thrombine in mesengial cells. *Am soc Nephrol*, 7:415–423.
- VALE, R. D., SCHNAPP, B. J., REESE, T. S. et SHEETZ, M. P. (1985). Organelle, bead, and microtubule translocations promoted by soluble factors from the squid giant axon. *Cell*, 40:559–569.
- VERDIER, C., COUZON, C., DUPERRAY, A. et SINGH, P. (2008). Modelling cell interactions under flow. *J Math Biol*.
- WANKHEDE, S. P., DU, Z., BERG, J. M., VAUGHN, M. W., DALLAS, T., CHENG, K. H. et GOLLAHON, L. (2006). Cell detachment model for an antibody-based microfluidic cancer screening system. *Biotechnol Prog*, 22(5):1426–1433.
- WEGNER, A. (1976). Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol*, 108:139–150.
- WHITE, F. M. (2003). *Fluid mechanics*. McGraw-Hill, New York.
- WITTON, C. J., REEVES, J. R., GOING, J. J., COOKE, T. G. et BARLETT, J. M. S. (2003). Expression of the her1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol*, 200:290–297.
- WOODBURN, J. R. (1999). The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Biophys J*, 82:241–250.
- ZHU, C., BAO, G. et WANG, N. (2000). Cell mechanics : Mechanical response, cell adhesion, and molecular deformation. *Ann Rev Biomed Eng*, 2:189–226.

- ZUCKERMAN, D. M. et BRUINSMA, R. F. (1998). Vesicle-vesicle adhesion by mobile lock-and-key molecules : Debye-hückel theory and monte carlo simulation. *Physical Review E*, 57:964–977.