



**HAL**  
open science

## Adhérence de cellules uniques sur supports micro-structurés

Benoit Vianay

► **To cite this version:**

Benoit Vianay. Adhérence de cellules uniques sur supports micro-structurés. Biophysique [physics.bioph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00455350

**HAL Id: tel-00455350**

**<https://theses.hal.science/tel-00455350>**

Submitted on 10 Feb 2010

**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.

# Thèse

présentée par

**Benoit VIANAY**

Pour obtenir le titre de docteur de l'Université Joseph Fourier - Grenoble 1

(Arrêté ministériel du 30 mars 1992)

Discipline : **Physique**

Spécialité : **Physique pour les sciences du vivant**

## *Adhérence de cellules uniques sur supports micro-structurés*

Date de soutenance : Le 16/12/2009 à Grenoble

Composition du jury :

M. Marc BLOCK

M. François GALLET    Rapporteur

M. François GRANER

M. Hervé GUILLOU

M. Jean-Paul RIEU    Rapporteur

Thèse dirigée par Hervé GUILLOU et préparée au sein de l'Institut Néel

CNRS/UJF, BP 166, 25 rue des martyrs, 38042 Grenoble cedex 09



*A Anne-Laure*



”QU’EST-CE AU FAIT QUE LA CELLULE, CET ÉLÉMENT DONT SONT FAITS TOUS LES ÊTRES VIVANTS, QUE NOUS AVIONS CRU SI SIMPLE ET QUE LES ÉTUDES RÉCENTES NOUS MONTRENT SI COMPLIQUÉE, JUSQU’À CE QUE D’AUTRES ÉTUDES À VENIR LA RAMÈNE À UNE SIMPLICITÉ PLUS GRANDE ENCORE EN TROUVANT LA FORMULE DES ACTIONS MÉCANIQUES AUXQUELLES SE RÉDUISENT LES FORCES QUI AGISSENT EN ELLE ?”

L’hérédité et les grands problèmes de la Biologie Générale (1903)

Yves Marie Delage (1854 - 1920)

Zoologiste français



## Remerciements

Cette thèse a été pour moi une véritable aventure. D'une part car le sujet était très éloigné de mes cours de physique quantique, physique statistique ou encore de nanophysique qui m'ont passionné durant mes dernières années d'étude, d'autre part parce qu'il m'a fallu apprendre de nouveaux langages afin de pouvoir être à l'aise et compréhensible pour les biologistes, chimistes, biophysiciens en plus des physiciens. Les échanges, discussions ou débats que j'ai pu avoir avec nombre de personnes ont toujours été passionnants et ont constitué une véritable source d'inspiration pour mes travaux. Je remercie les nombreuses personnes qui ont contribué à cet épanouissement scientifique, qui restera pour moi une période inoubliable.

Je tiens tout d'abord à remercier les permanents de l'équipe *Thermodynamique des Petits Systèmes*, qui ont été d'une aide précieuse à certains moments importants : Olivier Bourgeois "le boss" toujours à l'écoute et prodigateur de bons conseils, Jean-Luc Garden à qui je réserve une caisse de beaujolais à ma prochaine visite, Jacques Richard et enfin Catherine Villard, autre biophysicienne du groupe qui m'a ouvert une salle de culture proche de mes manips, m'évitant des transports de cellules dans les poches à travers la ville. Un grand merci également aux non permanents (par le statut mais pas vraiment par le nombre d'heures passées au labo) de l'équipe : Libertad Abad-Munoz, Ghislain Bugnicourt, Aitor Lopendia-Fernandez, Aurélien Sikora et Germain Souche, tous ceux avec qui je n'ai malheureusement pas passé autant de temps que je l'aurais souhaité à discuter sciences ou autre.

Merci au pôle *Capteurs thermométriques et calorimétrie* pour la salle blanche que j'ai pu utiliser autant que je le souhaitais, casque de musique vissé aux oreilles : Emmanuel André pour les heures que tu m'as accordées à me former et m'expliquer les rouages du plasma à oxygène, de l'aligneur et autres machines de guerre microélectroniqueuses, Pierre Lachkar pour ces fameux thermomètres sur lamelles de verre qui m'ont permis de caractériser les micro-incubateurs que nous avons développés, outils ultimes pour la vidéo-microscopie. Ces prototypes n'auraient jamais pu être fabriqués sans l'aide de Gregory Garde de l'atelier. Merci à toi pour les heures passées à la fabrication des pièces, aux modifications constantes que nous leur apportions. Bien que j'ai manqué de temps pour concrétiser cet aspect de ma thèse, ton aide a été extrêmement précieuse. Pour terminer sur cet outil, je remercie également Florent Argod, jeune stagiaire de deuxième année de l'ENSPG, école chère à mon cœur. Les quelque dix semaines que nous avons passées ensemble à améliorer une énième version du micro-incubateur m'ont rappelé mes débuts d'ingénieur physicien, merci pour ce court retour en arrière.

Enfin, je remercie Hervé Guillou, qui m'a offert la possibilité de changer de domaine. Tu as souligné ma prise de risque pour avoir tenté cette reconversion en biophysique, tu as également pris des risques en acceptant un physicien fondamentaliste, qui n'avait pour seules connaissances en biologie que les souvenirs de terminale. Merci de m'avoir laissé autant de liberté, j'ai pu graviter entre différentes matières comme la chimie de surface, la biologie cellulaire, le traitement statistique d'images, la modélisation énergétique, autant de domaines divers et variés qui, je crois, font de notre sujet une véritable force. Merci de m'avoir transmis toutes tes connaissances en biophysique, tes programmes que j'ai pu modifier à ma guise, d'avoir pris parfois le temps de revenir sur certaines bases scientifiques dont j'avais sensiblement oublié le sens. J'ai été ton premier thésard,

nous avons ainsi tous les deux découvert un nouvel aspect de la recherche scientifique. Je souhaite que beaucoup d'autres me succèdent à tes côtés, te permettant d'assouvir ta constante boulimie d'expériences innovantes. Enfin, merci d'avoir toujours voulu conserver un esprit physique lors de nos discussions quand je me perdais dans des considérations biologiques, et toi seul sais comme parfois je pouvais me perdre.

En plus d'être un véritable travail de fond, une thèse est également un incroyable vivier de rencontres, l'ambiance conviviale du laboratoire comme de l'institut facilitant cet aspect, je remercie les nombreuses personnes rencontrées au détour d'un couloir, d'une salle de conférence, d'un café ou tout simplement de l'arrêt du 34 qui tardait parfois à arriver. Un grand merci aux lointains spintroniqueurs que j'ai côtoyés plus particulièrement de par ma proximité avec un certain Gros Mocteur, certains d'entre vous promettent une relève de haut niveau : Romain Maurand, Raoul Piquerel, Sébastien Liatard, Mathias Urdempilleta qui sera le premier bifleur que j'ai rencontré, Romain Vincent "Mon général" et Clemens Winkelmann. Il y a également eu les lointains opticiens du laboratoire de Spectrométrie Physique, déménagés tardivement à l'institut, du fait de mon autre proximité avec un certain Maxi Munsch. Je remercie tous les thésards et post docs de cette équipe de *Nanophysique et semiconducteurs* qui ont participé à cette excellente ambiance des pauses parfois à rallonge que nous effectuions Mat et moi. Je remercie plus particulièrement Gregory Sallen qui a été le premier thésard en chair et en os que j'ai vu à l'oeuvre lors de ma formation expérimentale de Master 2, tu as été un déclic pour moi dans le choix de faire une thèse.

Je remercie également les permanents en lien avec ces équipes qui m'ont vu peut-être trop souvent traîner dans leur couloir. Merci à : Franck Balestro pour avoir été à l'écoute lors de certains craquages en compagnie de Nico, Vincent Bouchiat pour m'avoir fait découvrir ton sujet du temps de mon Master 2 et pour avoir été mon ticket d'entrée pour rencontrer Hervé lors de ma recherche de thèse (via l'aide d'un certain N. Roch), Thierry Fournier pour avoir critiqué mes présentations trop cinématographiques, Tristan Meunier pour m'avoir écouté me plaindre pendant cette période douloureuse de rédaction, Jean-Philippe Poizat et Wolfgang Wensdorfer, chefs de mes deux comparses, vous avez été une source d'inspiration, peut-être sans le savoir, je vous remercie pour ça.

Comment ne pas remercier le groupe le plus imposant de l'institut, la horde de thésards et post-docs, adeptes du départ "fanachiste" de 12h15 pour le H2, membres du club café-manger-festoyer, vous avez été un lien primordial avec la vie réelle. Un big up pour : David Yannick Baines - "Yannou", tu m'as permis de tenir des horaires de mule pendant la période rédactrice et tu es devenu un incontournable des soirées en ville, Aurélien Bideaud, bien que croisé trop rarement, tes photos en 3D resteront immortelles, Christophe Blanc, arrivé trop tard, tu constitues la relève de l'équipe, sois-en digne, Fabien Bonnet - "Fab", véritable montagnard, je regretterai toujours de ne pas avoir trouvé le temps de t'accompagner sur les cimes grenobloises, Oana Bunau, tu as su supporter mes blagues vaseuses et mes moqueries "fanachistes", merci d'avoir su garder le sourire, Thibaut Capron et Sylvain Hermelin, merci pour cet excellent moment passé sur le tableau à griffonner des équations en outdoor, un souvenir inoubliable et merci pour l'ambiance du bâtiment M, Aurélien Cuhe - "Auré", merci pour la découverte du Saxo qui a été un de mes derniers bons moments festifs à Gre, Florian Ong, parti trop tôt de l'équipe, tu as tout de même su insuffler une

ambiance cool aux thésards de la team, Pascale Diener - "Paqual", merci à toi, doyenne du groupe, tu as été une référence en terme d'horaires pour moi, Jean-Savin Héron - "Pinpin", merci pour cette loi de la bière du vendredi puis celle du jeudi & vendredi qui adoucissait la fin de semaine, Florian Martin - "Flo", merci pour ton personnage de metalieu non fumeur, non buveur et tes idées anarcho-écolo-bretonnes, un must du genre, Mathieu Melich, salsasseur du jeudi, merci à ton caractère souriant et jovial qui mettait du baume au cœur des matins difficiles, Florent Lecocq - "Poul", mon fillot de prépa, qui m'a suivi sans le faire exprès à PG puis dans le même institut, merci à ton sens de l'humour et ton répondant au repas de midi lorsque les autres étaient endormis, Romain Thalineau, tu constitues toi aussi la relève du bâtiment M, que la musique swingue dans le hall de manips !

Ces travaux de thèse ont été réalisés en association avec des (bio)physiciens et des biologistes que je remercie particulièrement pour le temps qu'ils ont consacré au projet ainsi que pour les échanges que nous avons entretenus tout au long de ma thèse. Merci à Jos Käfer pour avoir été si patient pendant un mois et pour m'avoir coaché sur le code que tu m'as légué, pour avoir toujours été disponible et pour cette joie de vivre si communicative dont tu as le secret. Un grand merci à François Graner du laboratoire de Spectrométrie Physique de Grenoble, aujourd'hui à l'Insitut Curie, les discussions très riches que nous avons eues ont permis d'ajouter les fonctions nécessaires à l'amélioration du code. Enfin, les résultats des simulations ont également été soumis à débat et vos avis et critiques, à Jos et toi, m'ont fortement aidé dans la compréhension des phénomènes. Je remercie également Marc Block et Emmanuelle Planus, les biologistes de l'Institut Albert Bonniot. Vos connaissances approfondies des processus impliqués dans l'adhérence et la motilité cellulaire m'ont permis de rapidement combler mes lacunes en biologie et les discussions que nous avons eues sur les comportements cellulaires m'ont été d'une grande aide. Les cellules que vous avez cultivées durant toutes ces années dans le laboratoire et que vous m'avez par la suite confiées ont été les principaux acteurs de mes travaux, sans elles et par la force des choses sans vous, les observations que j'ai effectuées n'auraient pas été possibles.

J'ai également eu l'opportunité de voyager à travers la France et le monde lors de conférences, je remercie d'ailleurs à nouveau Hervé de m'avoir poussé à aller présenter mes travaux le plus possible, à partager les connaissances. Durant ces périodes hautement scientifiques, j'ai pu rencontrer de nombreuses personnes, certaines ont pris le temps de m'écouter, de m'expliquer leurs sujets, leur point de vue sur l'adhérence cellulaire et m'ont encouragé dans mes travaux. Je remercie Manuel Théry pour toutes les conversations que nous avons eues, pour les conseils que tu m'as prodigués et les informations que nous avons partagées. Je souhaite également remercier François Gallet qui m'a ouvert les yeux sur la capacité que peuvent avoir les cellules à se comporter comme des systèmes physiques loin d'être aussi complexes qu'elles ne le paraissent (mais pas trop simples non plus quand même). Merci de m'avoir fait visiter ton laboratoire, fait partager ta vision des énergies et des forces que sont capables de développer les cellules.

Les scientifiques ne sont pas les seules personnes que j'ai été amené à côtoyer durant toutes ces années. Je remercie Sandrine Ferrari de l'école doctorale de physique pour avoir rendu les aspects administratifs côté université si faciles, en conservant toujours le sourire. Merci aux dames de l'administration du MCBT, je remercie plus particulièrement Christine Martinelli et Patricia

Poirier qui ont été d'une grande aide pour les missions ou les différents problèmes administratifs que j'ai pu rencontrer. Un grand merci à Cécile Nemiche de la reprographie qui a toujours été disponible pour imprimer un poster les veilles de départ en conférence malgré un emploi du temps surchargé et pour son aide concernant la version finale de ce manuscrit.

Je remercie enfin Jean-Paul Rieu et François Gallet pour avoir pris le temps de lire ce manuscrit et avoir accepté d'être mes rapporteurs. Merci également à Marc Block et François Graner pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Une nouvelle fois, merci à Hervé pour son aide concernant la finalisation du manuscrit, les multiples retouches dont il a été l'objet et les corrections. Merci à l'équipe TdPS ainsi qu'à Thierry pour les conseils portant sur la soutenance, ils ont été très constructifs pour cette dernière ligne droite.

Pour finir, je remercie les personnes qui me connaissent depuis bien avant mes débuts de thésard. Merci aux potos grenoblois qui sont trop nombreux pour les nommer (et surtout cela m'évite d'être honteux en cas d'oubli) : ingénieurs, docteurs, thésards ou ~~chômeurs~~; ces longues années dans les montagnes iséroises m'ont appris que l'on peut être toulousain, alsacien, parisien, breton ou tout simplement citadin ou campagnard et avoir tout de même un point commun et universel : l'amitié, constituée des joies, des craquages, des aventures de la vie qui font de ces années folles des souvenirs gravés éternellement dans ma mémoire. Je remercie également les potos campagnards, lycéens lointains, vous avez suivi d'un œil toujours curieux les avancées scientifiques d'un ovni maintenant docteur parmi vous, merci de cette longue amitié qui nous permet encore de nous croiser, pas assez souvent malgré tout. Un grand merci supplémentaire aux grenoblois qui ont su rester dans cette belle ville durant les années thèse (désolé pour ceux qui ont choisi de faire du PIB ailleurs, fallait choisir les sciences fondamentales), merci pour ces soirées endiablées à base de poker, jeux de plateau ou encore coinche, qui m'ont permis de décompresser et de vider mon sac quand nécessaire.

Je remercie tout particulièrement Sophie Roth - "S.O.", nous avons été les deux premiers thésards en biophysique de cette équipe, en se serrant les coudes, en discutant de nos travaux et en s'échangeant des idées, des programmes, des publis, nous avons pu surmonter cet isolement et avancer dans un institut entourés de physiciens adeptes du frigo à 20 mK (pour les plus performants...). Merci d'avoir été toujours disponible pour répondre à mes questions les plus bêtes en biologie que je n'osais poser aux biologistes et d'avoir été de bons conseils pour la rédaction de mon projet de recherche qui m'a permis de m'expatrier au pays du chocolat et du gruyère (du vrai, sans trou). Un grand merci à Johan Olofsson - "Jo", grand maître stellaire et wower hors-pair, nous avons eu des périodes prolifiques en repos du guerrier lors des soirées difficiles, voisins de boulevard et maintenant de frontière, nous n'avons pas fini ce partenariat musical et plus généralement culturel, j'en suis très heureux. Pour conclure sur les amis, les meilleurs pour la fin : merci à Mathieu Munsch *a.k.a* Mat *a.k.a* MM *a.k.a* Maxi Munsch *a.k.a* Monster Munsch et Nicolas Roch *a.k.a* Nico *a.k.a* Prez *a.k.a* Gros Moche *a.k.a* Grom *a.k.a* Gros Mocteur ; que dire de notre amitié, six ans durant nous avons tout partagé (jusqu'à un certain point, on est d'accord...), merci pour ces soirées enfumées (par nos cerveaux en ébullition), les discussions aussi bien physiques (scientifiquement parlant) que physiques (car parfois mouvementées), les trips, les entraides, les encouragements qui ont formé un trio invincible, à l'épreuve des années difficiles de recherche

que nous avons tous vaillamment surmontées. Que ce soit l'électronique moléculaire et autre effet Kondo pour toi Gros ou l'optique quantique et autre effet Purcell pour toi Mat, vous m'avez fait rêver jusqu'au bout en restant dans la physique dure. Je ne doute pas que les meilleures années en votre compagnie restent à venir. Je regretterai une seule chose, ne pas vous avoir démonté en snow de rando face à vos lattes en peaux de phoque ! *See you soon guys!* Un grand merci aux chéries de mes deux compères. Claire et Marion se sont révélées être des bulles d'oxygène lors de certaines noyades psychologiques. Vous avez également su trouver les mots réconfortants pour ma doudou. Merci enfin pour ces soirées passées à discuter de tout sauf de science.

Enfin, je remercie ma famille pour avoir supporté durant toutes ces années ma boulimie d'études. Merci à vous Maman et Papa, pour avoir su me mettre la pression au bon moment pendant mes années "djeuns", d'avoir toujours été de bons conseils, d'avoir été un soutien inconditionnel dans mes choix, merci d'avoir coché les bonnes cases (enfin un maximum de cases pas trop mauvaises) sur le bon de commande de la cigogne (ou du chou c'est selon). Merci à ma tite sœur de trois ans mon aînée, boulimiques du travail chacun à notre manière (je sais qu'on ne dirait pas à voir notre silhouette), tu as su être également de bons conseils à certains moments fatidiques, et bien que cela soit difficile à admettre pour moi, tu as été un modèle (là encore jusqu'à un certain point...). Je remercie également tout le reste de ma famille, grand-mères, tantes et oncles, cousins et cousines ainsi que ma belle-famille, qui, par leurs questions sur mon sujet de thèse, ont à leur insu, influencé ma manière de présenter mes travaux et m'ont permis d'être le plus pédagogique possible. Mon dernier merci sera le plus important et le plus infini, il est pour toi Anne. Tes encouragements, ton soutien et ta compréhension face à cette immense montagne que représente une thèse en physique ont été fondamentaux pour moi. Tu m'as souvent sorti la tête de l'eau pour me ramener les pieds sur terre, ta patience et ces petites attentions dont tu as le secret m'ont donné la force nécessaire à gravir la falaise, encore merci pour ça.

Je conclurai par les non-remerciements, histoire de terminer sur une pointe d'humour. Humour qui je l'espère est un des premiers mots qui vient à l'esprit des personnes me connaissant qui tenteraient de me définir. Je ne remercie pas ASUS pour le plantage de mon disque dur d'ordinateur portable au bout d'un an de thèse, provoquant une perte brute d'environ six mois de traitement de données, de présentations, de rapports... Je ne remercie toujours pas ASUS pour le crashage de l'écran de ce même ordinateur à deux mois de la fin de la rédaction de ce manuscrit. Je ne remercie pas le gardien de but de l'équipe de handball de l'université de Savoie de Chambéry, pour avoir effectué une sortie lors de ma tentative de shoot en extension, me valant un ligament croisé disparu à l'IRM et deux mois d'arrêt à faire des brasses et soulever des poids après opération, deux mois de perte brute de temps de travail. Je ne remercie pas la TAG pour l'absence de bus après 20 heures qui m'obligeait à pédaler, cela a été fatiguant. Enfin, je ne remercie pas la mairie de Grenoble pour la fermeture des bars à minuit, les vrais travailleurs que nous avons été, nous, thésards, ont dû jongler avec ces restrictions d'horaires. Dure vie que celle d'un thésard, non ?

Encore une fois merci à tous, vous avez été ma plus belle expérience.



# Table des matières

<b>Préface</b>	<b>1</b>
<b>1 Introduction générale</b>	<b>5</b>
1.1 Généralités sur les cellules . . . . .	9
1.2 Les acteurs de l'adhérence cellulaire . . . . .	10
1.3 Les processus clefs de l'adhérence . . . . .	16
1.4 La régulation biochimique . . . . .	21
1.5 La biophysique de l'adhérence cellulaire . . . . .	28
1.6 Les objectifs de la thèse . . . . .	42
<b>2 Matériel et méthodes, les substrats micro-structurés</b>	<b>47</b>
2.1 État de l'art . . . . .	51
2.2 Notre méthode de fabrication . . . . .	54
2.3 Caractérisations des supports micro-structurés . . . . .	58
2.4 Conclusion . . . . .	69
<b>3 Du désordre vers l'ordre</b>	<b>73</b>
3.1 Introduction . . . . .	77
3.2 Influence de la densité de la matrice sur l'adhésion . . . . .	79
3.3 Classification des formes . . . . .	85
3.4 Conclusion . . . . .	98
<b>4 Recherche d'un équilibre, la modélisation de l'adhérence</b>	<b>101</b>
4.1 Le Modèle de Potts Cellulaire . . . . .	105
4.2 Fonctionnement du modèle . . . . .	108
4.3 Utilisation des résultats . . . . .	117
4.4 Expériences et simulations . . . . .	122
4.5 Formes d'équilibre . . . . .	124
4.6 Conclusion . . . . .	129
<b>5 La courbure des fibres de stress, conséquence d'une compétition de forces</b>	<b>133</b>
5.1 Modéliser la courbure d'une fibre de stress . . . . .	137
5.2 Simulations . . . . .	138
5.3 Loi de Laplace et diagramme de phase . . . . .	141

5.4	Expérience préliminaire . . . . .	146
5.5	Conclusion . . . . .	148
<b>6</b>	<b>Aspects dynamiques de l'adhérence</b>	<b>151</b>
6.1	Dynamique sur un plot adhésif . . . . .	155
6.2	Le CPM et les transitions forme-forme . . . . .	159
6.3	Conclusion . . . . .	164
<b>7</b>	<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>167</b>
7.1	Conclusions . . . . .	170
7.2	Perspectives : Organisations dynamiques du cytosquelette d'actine . . . . .	172
	<b>Bibliographie</b>	<b>176</b>
<b>A</b>	<b>Matériel et méthodes, les autres outils</b>	<b>185</b>
A.1	Biologie cellulaire . . . . .	185
A.2	Protocoles de microfabrication . . . . .	187
<b>B</b>	<b>Calculs</b>	<b>189</b>
B.1	Chapitre 5 - Loi de Laplace . . . . .	189
	<b>Résumé &amp; Abstract</b>	<b>192</b>

## Préface

L'étude des phénomènes biologiques a quelque chose de fascinant, particulièrement pour le physicien qui les découvre. En effet, contrairement aux systèmes passifs, traditionnels objets d'étude en physique, les systèmes vivants évoluent et s'adaptent à leur environnement en utilisant une machinerie issue de l'évolution. L'adhérence cellulaire est un processus vital pour les cellules intervenant dans de nombreux phénomènes biologiques fondamentaux tels que la différenciation, le développement cellulaire ou la réparation tissulaire.

La machinerie complexe qui dirige ce processus est basée sur plusieurs protéines structurales et de signalisation faisant intervenir le cytosquelette d'actine et les complexes adhésifs. La mécano-transduction les reliant permet à une cellule d'exercer des forces et d'adapter sa morphologie en fonction de contraintes extérieures. Nous avons dans cette thèse étudié l'adhérence de cellules uniques sur des supports micro-structurés.

Le premier chapitre servira d'introduction biologique au processus d'adhérence cellulaire. Il mettra en évidence certains processus clés et leurs acteurs. Puis nous aborderons un point de vue physique du processus en évoquant certains travaux de biophysique qui ont contribué à la compréhension de certaines étapes de l'adhérence.

Nous expliquerons notre méthode de fabrication des supports micro-structurés dans le chapitre 2. La micro-fabrication s'est révélée cruciale dans cette thèse, pour obtenir des supports reproductibles ayant une résolution proche du micron. Des caractérisations à chaque étape de fabrication permettent de comprendre les processus impliqués et de vérifier les caractéristiques physico-chimiques des substrats.

Nos observations présentées dans le chapitre 3 montrent qu'une cellule en adhérence sur un support micro-structuré comportant un motif à contraste adhésif va adapter sa morphologie à la géométrie du substrat adhésif. L'auto-organisation remarquable et reproductible du cytosquelette des cellules qui en résulte, lorsque les zones adhésives sont éloignées de plus de 10  $\mu\text{m}$ , contraste avec le désordre apparent de cette organisation sur un support non structuré.

Le chapitre 4 présente le modèle avec lequel nous reproduisons les morphologies expérimentales. Nous montrerons que des considérations énergétiques permettent de modéliser l'adhérence cellulaire. Nous mettrons en évidence une séparation des échelles de temps entre les processus à l'équilibre, telle que la réorganisation du cytosquelette et les processus hors-équilibre telles que les émissions des protrusions membranaires.

Notre modèle introduit une compétition entre la contractilité des fibres de stress et l'élasticité du gel d'actine qui se révélera déterminante dans la régulation de la morphologie des cellules. Nous montrerons dans le chapitre 5 qu'il est possible, à partir du modèle développé, de relier les évolutions des paramètres du modèle aux évolutions de paramètres biologiques en construisant un diagramme de phase des formes.

Nous montrerons enfin que la séparation des zones adhésives limite l'adhésion en perturbant l'exploration des protrusions membranaires. Le filopode, qui se révèle être le seul moyen pour les cellules d'adhérer sur nos supports micro-structurés sera étudié en détail dans le chapitre 6, qui conclura sur les limites de notre modélisation vis à vis de la dynamique de l'adhérence cellulaire.



# Chapitre 1

## *Introduction générale*

”L’HOMME NE CRÉE PAS... IL DÉCOUVRE.”

Antonio Gaudi (1885 - 1926)

Architecte et designer espagnol



# Chapitre 1

## Introduction générale

Une cellule biologique est considérée comme l'un des plus petits éléments vivants. Les bactéries et les levures sont d'autres formes de systèmes vivants faisant partie de cette catégorie. Cette "brique élémentaire de la vie" est fascinante et reste mal comprise, notamment dans les différentes étapes de son développement. L'adhésion cellulaire (ou adhérence cellulaire) sur un support extracellulaire ou sur d'autres cellules, est un phénomène biologique vital pour la plupart des cellules. En effet, peu de types cellulaires arrivent à se développer en suspension dans un milieu liquide, même nutritif. Ce processus peut être nécessaire à leur prolifération, à leur déplacement et à l'organisation d'un tissu.

La forme des cellules va changer durant le développement, aussi bien au niveau d'une cellule unique que d'un organisme formé de multiples cellules. Ces changements résultent en partie des forces générées par les cellules adhérentes ou par le milieu extérieur. L'adhérence cellulaire contribue à la morphogénèse des organismes ou à la réparation de blessures dans le cadre de la cicatrisation. C'est donc un phénomène fondamental.

Dans ce travail, nous considérerons qu'une cellule est un système physique. L'adhérence implique des forces et des mouvements qui sont l'objet d'études physiques. Par exemple, son mouvement doit obéir aux lois de la mécanique. Mais la biologie est plus complexe car le système est actif, cela signifie que la réponse à une contrainte extérieure est à la fois due aux propriétés du système vivant mais aussi à la signalisation cellulaire. Cette dernière, par le biais de réseaux de réactions biochimiques, adapte son comportement à la sollicitation extérieure.

Ce premier chapitre introduit plusieurs aspects de l'adhérence cellulaire, utilisant successivement des considérations biologiques puis physiques. Les quatre premières sections :

- *Généralités sur les cellules*
- *Les acteurs de l'adhérence*
- *Les processus clefs de l'adhérence*
- *La régulation biochimique*

portent sur une description issue de la biologie cellulaire des processus impliqués dans l'adhérence cellulaire. Un lecteur biologiste, à l'aise dans le domaine, possède toutes les connaissances présentées dans ces parties. Nous conseillons tout de même la lecture de la partie *La "stabilité hors-équilibre"* de la dernière section *La régulation biochimique* qui résume succinctement la complexité d'une cellule en train d'adhérer. La section suivante, *La biophysique de l'adhérence cellulaire*, présente plusieurs méthodes et techniques développées grâce à la physique pour expliquer la biologie. Certains résultats et conclusions des travaux abordés dans cette partie ont été utilisés pour les travaux présentés et mettent en évidence la diversité des domaines étudiés en biophysique cellulaire. *Les objectifs de la thèse* concluront ce chapitre introductif et aborderont les questions fondamentales auxquelles nous tentons de répondre dans le reste du manuscrit.

---

## Sommaire

---

1.1	Généralités sur les cellules . . . . .	<b>9</b>
1.2	Les acteurs de l'adhérence cellulaire . . . . .	<b>10</b>
1.2.1	La matrice extra-cellulaire . . . . .	11
1.2.2	Les intégrines . . . . .	11
1.2.3	Le cytosquelette . . . . .	12
1.3	Les processus clefs de l'adhérence . . . . .	<b>16</b>
1.3.1	L'exploration de l'environnement . . . . .	16
1.3.2	La condensation des points d'ancrage . . . . .	18
1.3.3	La contraction du cytosquelette . . . . .	19
1.4	La régulation biochimique . . . . .	<b>21</b>
1.4.1	L'activation des protrusions . . . . .	21
1.4.2	L'agrégation des adhérences focales et développement de la contractilité	24
1.4.3	La "stabilité hors-équilibre" . . . . .	26
1.5	La biophysique de l'adhérence cellulaire . . . . .	<b>28</b>
1.5.1	Le modèle thermodynamique . . . . .	28
1.5.2	La tenségrité cellulaire . . . . .	30
1.5.3	La viscoélasticité du cytosquelette . . . . .	31
1.5.4	Comment la cellule exerce-t-elle des forces sur la membrane? . . . . .	34
1.5.5	Comment les cellules exercent-elles des forces sur le substrat? . . . . .	38
1.5.6	Les structurations de la MEC . . . . .	39
1.6	Les objectifs de la thèse . . . . .	<b>42</b>

---



### 1.1 Généralités sur les cellules

Dans un premier temps, il est important de bien comprendre le système étudié. Cette section permet de découvrir, pour les non-initiés, la structure d'une cellule dans son ensemble. Les éléments ayant une part active dans le processus d'adhésion seront ensuite détaillés. La complexité d'un système biologique nécessite d'avoir une vision globale. Elle requiert également une vision moléculaire pour comprendre les liens biochimiques et physicochimiques entre les différents constituants qui permettent à la cellule de survivre.

Les cellules sont classées en deux catégories : les eucaryotes d'une part, présentes dans les animaux, les végétaux et les champignons et les procaryotes d'autre part, constituant les bactéries de manière générale. La différence importante entre ces deux classes est le noyau cellulaire présent uniquement dans les eucaryotes. Les procaryotes sont les êtres vivants primitifs de notre planète. La séparation entre ces deux types de cellules a eu lieu à un moment bien déterminé de l'évolution.

Nous avons étudié dans nos travaux uniquement des cellules de mammifères. Nous nous focaliserons donc sur les cellules eucaryotes. Un organisme multicellulaire est composé de cellules identiques génétiquement qui se sont, lors du développement, différenciées en cellules spécialisées : cellules hépatiques, cellules neuronales, cellules musculaires, cellules épithéliales, cellules mesenchymales. Les fibroblastes font partie de ce dernier type de cellules spécialisées et sécrètent la matrice extra-cellulaire, c'est à

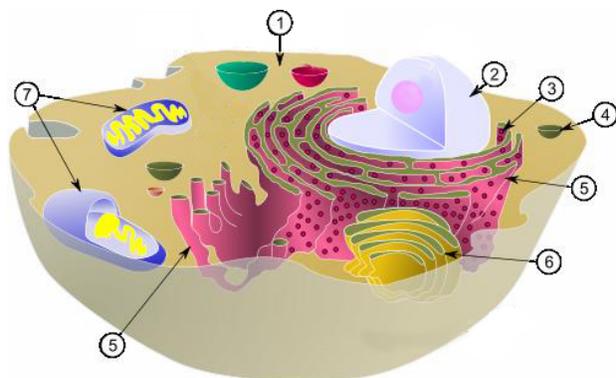


FIGURE 1.1: Schéma d'une cellule eucaryote

dire les constituants des tissus conjonctifs généralement assemblés en fibres de protéines. Le fibroblaste est capable de se déplacer seul dans le corps humain contrairement aux cellules épithéliales par exemple, qui forment un tissu (regroupement de cellules) pour survivre. Toutes les expériences présentées ici concernent des fibroblastes de souris du type 3T3, une lignée de cellules modèles. Le sujet général de cette thèse porte sur l'adhérence de cellules isolées sur un support micro-structuré.

Pour bien comprendre la complexité d'une cellule eucaryote (Figure 1.1), nous décrirons rapidement ses constituants et leurs fonctions. La frontière d'une cellule est définie par sa membrane plasmique. Celle-ci est composée d'une bicouche lipidique épaisse d'environ 10 nanomètres comportant de multiples canaux protéiques pour laisser passer différentes substances ou incorporant

des protéines servant de récepteurs aux composants extérieurs. La membrane plasmique, via des phénomènes d'endocytose et d'exocytose, est capable d'absorber ou de sécréter de la matière. A l'intérieur de la cellule se trouvent le cytoplasme, les organites cellulaires et le cytosquelette. Le cytoplasme est formé du cytosol (1 - Fig. 1.1), gel dans lequel se trouvent les organites cytoplasmiques pouvant être relativement grands par rapport à la taille d'une cellule. Les organites cellulaires les plus importants sont définis dans le paragraphe suivant. Le cytosquelette, qui sera notre principal objet d'étude sera présenté en détail dans la partie suivante.

Le noyau est le plus grand des organites (2 - Fig. 1.1). Il renferme l'ADN (Acide Désoxy-riboNucléique), véritable carte d'identité de la cellule. L'ADN est organisé en chromosomes qui regroupent les gènes. Chaque protéine exprimée dans la cellule correspond à une séquence d'acides aminés codée par un gène. Plusieurs organites sont impliqués dans l'expression des protéines, leur transport et leur modification :

- le réticulum endoplasmique (5 - Fig. 1.1) utilise les ribosomes (3 - Fig. 1.1) pour transcrire des segments d'ADN copiés (ARN) à partir du noyau afin de synthétiser les protéines.
- les vésicules (4 - Fig. 1.1), stockées dans le réticulum endoplasmique, mais aussi présentes dans le cytosol les transportent.
- l'appareil de Golgi (6 - Fig. 1.1) concentre et modifie les protéines.
- les mitochondries (7 - Fig. 1.1), de la taille du micromètre, fabriquent et stockent l'Adénosine TriPhosphate, (ATP), dont l'hydrolyse libère l'énergie nécessaire à la survie de la cellule. Nous verrons que certains complexes protéiques (moteurs moléculaires, réplicateurs d'ADN...) utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse pour exercer des forces et se déplacer.

## 1.2 Les acteurs de l'adhérence cellulaire

Le processus d'adhérence cellulaire implique différents composants cellulaires et extra-cellulaires. Nous les classerons en trois groupes. La première partie décrira le support externe sur lequel les cellules adhèrent. Une seconde partie développera les complexes faisant le lien entre le support extérieur et le cytosquelette de la cellule. Ce dernier sera expliqué dans la dernière partie. Cette section s'inspire largement du livre (Alberts *et al.*, 1999) et de travaux plus récents.

## 1.2. Les acteurs de l'adhérence cellulaire

---

### 1.2.1 La matrice extra-cellulaire

La matrice extracellulaire ou MEC est la structure sur laquelle les cellules adhèrent. Elle contient un ensemble de macromolécules telles que les glycoprotéines : fibronectine, vitronectine, laminine et collagène. Les glycosaminoglycanes sont également présentes en abondance dans la matrice. Elles permettent la rétention d'eau et forment les gels responsables des résistances mécaniques. Selon la composition de cette matrice, son aspect peut être liquide comme le liquide interstitiel, gélatineux comme les tendons ou solide comme l'os. La MEC joue un rôle de support à l'adhérence et à la migration cellulaire. La diversité de ses composants ainsi que ses propriétés mécaniques vont jouer un rôle primordial dans le comportement des cellules. Elle est essentielle pour la constitution de l'architecture tissulaire, mais aussi son maintien et son remodelage. Les fibroblastes utilisent la MEC pour se déplacer et effectuer les diverses fonctions inhérentes à leur spécificité telle que la réparation tissulaire.

Les glycoprotéines sont les protéines avec lesquelles les cellules vont interagir de manière spécifique via des récepteurs membranaires afin de créer des interactions fortes permettant d'exercer des forces, de se déplacer et de modifier leur arrangement. Ces protéines transmembranaires sont classées en six familles à partir d'homologie de séquences. Cette classification a également un aspect fonctionnel. La famille des cadhérines par exemple est mise en jeu durant les interactions cellule/cellule tandis que les intégrines interviennent pour les liens cellule/MEC et sont les protéines transmembranaires les plus importantes pour notre étude. Ces interactions sont créées grâce aux motifs présents sur les protéines de la MEC reconnus par les intégrines, tel le motif RGD (Arg-Gly-Asp), notamment impliqué dans la reconnaissance de la fibronectine par les intégrines.

### 1.2.2 Les intégrines

Les intégrines sont des protéines hétérodimériques capables d'interagir spécifiquement avec des protéines de la matrice. Elles comportent des domaines extra-cellulaires pour interagir avec leur cible et des domaines intra-cellulaires qui permettent la transmission d'un signal. Elles jouent un rôle important dans la cohésion des tissus et interviennent au cours de nombreux processus telle que l'embryogenèse, la réponse inflammatoire ou encore l'invasion tumorale (Giancotti & Ruoslahti, 1999). Constituées de deux glycoprotéines transmembranaires formant un couple  $\alpha - \beta$ , 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  ont été trouvées chez les vertébrés. Chaque sous-unité  $\beta$  peut être associée avec un certain nombre de sous-unités  $\alpha$ , créant ainsi des récepteurs avec des spécificités différentes.

L'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  reconnaît spécifiquement la fibronectine tandis que l' $\alpha_v\beta_3$  implique la reconnaissance et la liaison avec la vitronectine. Il est donc possible, en changeant le type de matrice extra-cellulaire de changer le type de récepteur mis en jeu durant l'adhérence. Lors de la reconnaissance de la protéine de la MEC par les intégrines, des voies de signalisation se mettent en place en réponse à cette liaison nouvellement créée.

Lors de l'engagement des intégrines, le domaine intra-cellulaire change de conformation modifiant ses interactions avec des molécules de signalisation. Cela déclenche une signalisation cellulaire impliquant les kinases de la famille Src et FAK\*. La région cytoplasmique des intégrines réagit également avec différentes protéines structurales comme la vinculine, la taline et la paxiline qui permettent de réaliser un lien mécanique avec le cytosquelette. Les intégrines apparaissent réellement comme des molécules de transduction mécanique et l'activation des protéines de signalisation dépend, comme nous le verrons dans la suite, de la force appliquée sur ces molécules.

### 1.2.3 Le cytosquelette

Le cytosquelette est le squelette interne présent chez les cellules eucaryotes. Il est responsable de la forme d'une cellule et de sa motilité, mais aussi de son organisation interne. Il est formé de filaments protéiques de 3 types différents (Figure 1.2), interagissant entre eux grâce à des protéines de liaison, mais aussi avec d'autres structures de la cellule (membrane, vésicules, ...). Ces trois types de filaments sont différents de part leur diamètre et leur composition et diffèrent dans leur fonction au sein de la cellule.

Les filaments intermédiaires sont encore peu étudiés mais il semblerait qu'ils donnent une certaine rigidité à la cellule. Les protéines constituant ce réseau sont extrêmement variées et leur nature chimique diffère selon le type cellulaire et la localisation intracellulaire. Ainsi, les filaments intermédiaires peuvent être constitués de kératine dans les cellules épithéliales, de vimentine dans les cellules mésenchymateuses, de neurofilament, de péricéphérine et d'interneuxine dans les neurones ou encore de lamine dans le noyau. Ces différences dans les protéines constituant les filaments intermédiaires leur permettraient d'avoir des fonctions variées suivant le type cellulaire tels que le soutien de l'enveloppe nucléaire pour la lamine, la participation au stress mécanique pour la vimentine... A la différence des microtubules et des filaments d'actine, les filaments intermédiaires n'ont aucune polarité et sont les structures les plus stables du cytosquelette.

---

\*. FAK (pour Focale Adhesion Kinase) et Src interagissent avec les intégrines et déclenchent de nombreuses activations ou désactivations des protéines du complexe adhésif

## 1.2. Les acteurs de l'adhérence cellulaire

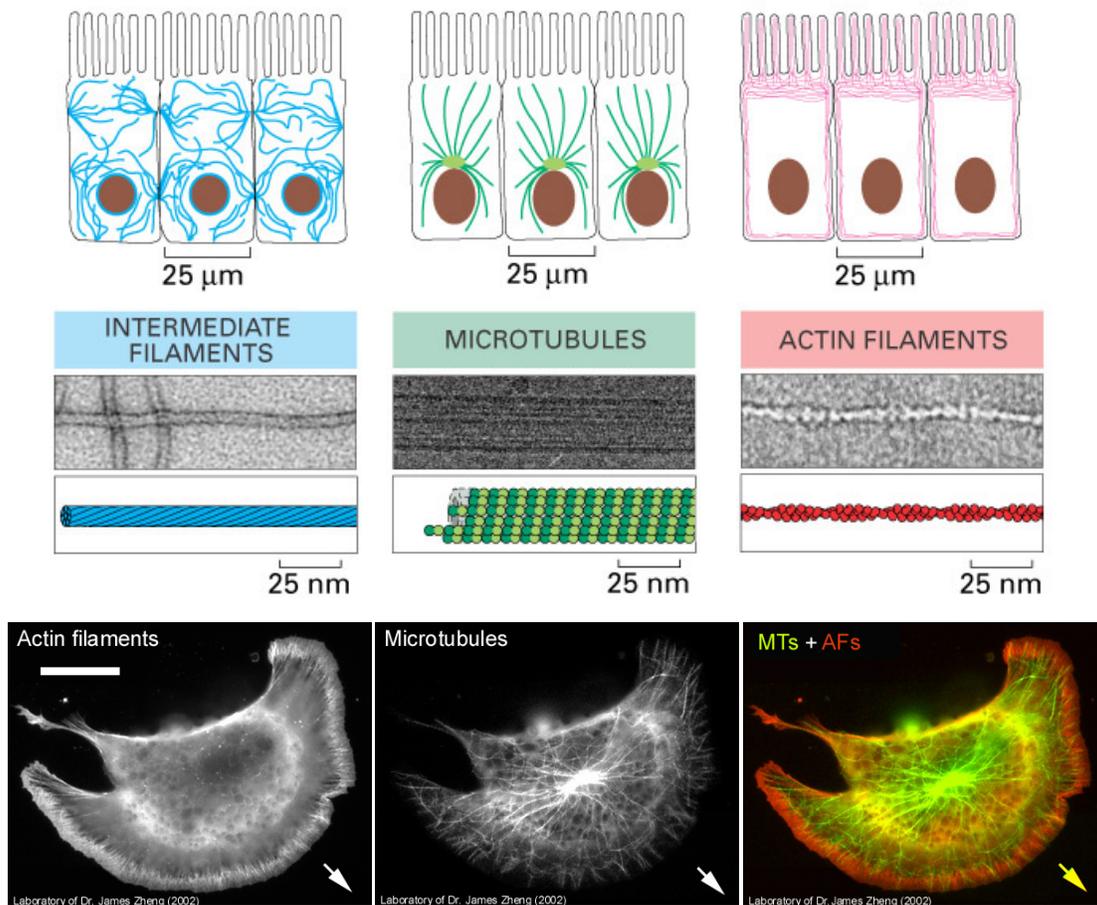


FIGURE 1.2: **Haut** : Schémas des trois types de filaments protéiques du cytosquelette présents dans des cellules épithéliales formant un tissu. **Milieu** : Micrographies électroniques à balayage et schémas des structures des différents filaments avec leur taille caractéristique. Source : (Alberts *et al.*, 1999). **Bas** : Les photographies représentent un fibroblaste en migration dont l'actine F (gauche) et les microtubules (milieu) ont été marqués. La direction de la migration est donnée par la flèche. Barre : 20 μm. Source : Dr. J. Zheng. <http://cellbio.emory.edu/lab/zheng/gallery.htm>

Le deuxième type de filaments constituant le cytosquelette sont les microtubules. Ces filaments sont creux et les plus épais des trois types avec 25 nm de diamètre. Ils sont constitués de dimères de tubuline (tubuline- $\alpha$  et  $\beta$ ) reliés par des liaisons covalentes. Les microtubules ont été l'objet d'intenses études biophysiques dans le cadre de leur instabilité dynamique (Nogales, 1999; van der Vaart *et al.*, 2009). Beaucoup plus rigides que les filaments d'actine, ils sont généralement nucléés à partir du centrosome qui semble être leur centre organisateur (Luders & Stearns, 2007). Les microtubules ont un rôle important lors de la division cellulaire pendant laquelle ils ont une fonction de tri des chromosomes. Dans certains types cellulaires comme les neurones, le centrosome pourrait être responsable de la différenciation des neurites en axone (de Anda *et al.*, 2005). Le rôle

des microtubules dans l'adhérence cellulaire n'est pas encore clair. Ils apparaissent comme ayant une part de responsabilité dans la création et la dynamique des contacts avec la MEC (Kaverina *et al.*, 1999).

Les filaments d'actine, le dernier type de filaments du cytosquelette, sont responsables de la génération de mouvement et de force. Ils jouent un rôle très important dans l'adhérence et la génération de protrusions membranaires ainsi que dans la génération de la contractilité et ont été très étudiés dans ce cadre. Ces filaments (actin-F pour filamenteuse) appelés aussi microfilaments sont constitués de monomères d'actine (actin-G pour globulaire) présents en grande quantité dans le cytoplasme. Ces derniers s'organisent en polymères hélicoïdaux à deux brins d'un diamètre de 5 à 9 nm avec une période hélicoïdale de 37 nm.

La polarité des filaments d'actine et des microtubules provient d'une asymétrie de leur structure qui engendre des vitesses de polymérisation et de dépolymérisation différentes aux deux extrémités. L'extrémité +, appelée extrémité barbée pour les filaments d'actine, a une vitesse de polymérisation supérieure à celle de dépolymérisation, alors que ce rapport des vitesses est inversé à l'extrémité – dite extrémité pointue.

Une grande variété d'organisations de ces filaments sous forme de faisceaux plus ou moins serrés ou encore de gel tridimensionnel est possible grâce à une large gamme de protéines de liaison. Celles-ci peuvent se lier à l'actine et modifier sa dynamique et son organisation.

Les monomères d'actine peuvent être stabilisés dynamiquement pour limiter la polymérisation avec la thymosine. Une autre manière de stabiliser un filament est la liaison d'une protéine de coiffe avec l'extrémité + qui empêche l'ajout de nouveaux monomères. La gelsoline permet de fragmenter les filaments. Ces protéines fonctionnent lorsqu'elles sont activées par des signaux extérieurs.

Le gel d'actine présent dans le cytosol est formé de filaments réticulés par de la filamine. Une autre organisation dans laquelle les filaments sont branchés avec des angles de  $70^\circ$  est réalisée par la protéine Arp2/3. Cette organisation se trouve essentiellement sur les bords cellulaires. Les filaments d'actine peuvent être reliés entre eux, de manière parallèle grâce à la fimbrine ou à l' $\alpha$ -actinine.

Il existe d'autres structures dans lesquelles deux filaments d'actine peuvent se déplacer l'un par rapport à l'autre en présence de myosin II, une classe de moteurs moléculaires utilisant de l'ATP pour générer une force. Cela permet de former des faisceaux contractiles.

Toutes ces protéines sont présentes dans le cytoplasme et interagissent directement avec le cytosquelette d'actine. Celui-ci est donc extrêmement dynamique, d'une part à cause de la po-

## 1.2. Les acteurs de l'adhérence cellulaire

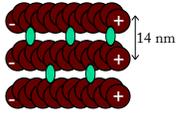
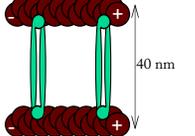
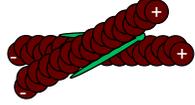
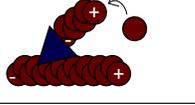
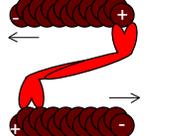
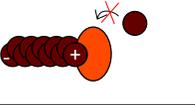
Exemple de protéine	Fonction	Schématisation
Filament d'actine	Formation des filaments	
Fimbrine	Formation de faisceaux serrés de filaments	
$\alpha$ -actinine	Formation de faisceaux de filaments	
Filamine	Réticulation des filaments en gel	
Arp2/3	Initiation et liaison de filaments	
Myosine I	Transport de vésicules sur les filaments	
Myosine II	Glissement des filaments	
Cap Z	Blocage de la polymérisation/dépolymérisation	
Thymosine	Rétention des monomères d'actine	
Gelsoline	Fragmentation des filaments	

FIGURE 1.3: Tableau récapitulatif des protéines interagissant avec l'actine.

lymérisation/dépolymérisation à ses extrémités et d'autre part grâce aux diverses configurations possibles avec les différentes protéines de liaison dans la cellule. Quelques protéines importantes dans les structures d'actine sont reportées dans le tableau de la Figure 1.3. Le terme cytosquelette décrira pour la suite le seul type de filaments capable d'interagir avec les complexes formés au

niveau des sites d'adhésions et d'appliquer des forces, à savoir le cytosquelette d'actine.

Dans la partie suivante, nous allons préciser de quelles manières le cytosquelette d'actine est impliqué à tous les niveaux de l'adhérence cellulaire, en identifiant certains des processus clefs de l'adhérence.

## 1.3 Les processus clefs de l'adhérence

L'adhérence d'une cellule est un processus séquentiel qui implique tout d'abord l'exploration de l'environnement par des protrusions membranaires. Lorsque les intégrines établissent un premier contact avec la MEC, un signal est activé, induisant la formation d'un point d'ancrage robuste. Celui-ci permet ensuite à la cellule d'exercer une force, en activant la contractilité actine-myosine et en assemblant des fibres de stress. Dans cette partie, nous allons décrire ces processus.

### 1.3.1 L'exploration de l'environnement

Des structures extrêmement dynamiques à base d'actine permettent d'exercer une force suffisante pour déformer et déplacer la membrane. Les protrusions ainsi créées sont de deux types : les lamellipodes et les filopodes.

Le lamellipode est une organisation bidimensionnelle de filaments d'actine branchés par Arp2/3 visible sur la Figure 1.4 **B** et **C**. Nous pouvons observer sur ces images de long filaments initiés dans la lamelle (en cyan) connectés à de plus petits filaments (en mauve). L'angle de branchement des petits filaments de  $70^\circ$  imposé par Arp2/3 est remarquable.

La dynamique du lamellipode est souvent comparée à une "vague". Formé au niveau du front cellulaire, il explore l'environnement de manière isotropique. Il permet d'explorer une zone dans le pourtour immédiat du bord cellulaire. Sa dynamique implique les processus de polymérisation et de dépolymérisation de l'actine, consommateurs d'ATP, et est régulé biochimiquement. Le rôle d'Arp2/3 est primordial car il sert de nucléateur à la polymérisation et permet de réticuler les filaments.

Le couplage entre le lamellipode et le reste du cytosquelette est réalisé dans une zone appelée lamelle à l'arrière du lamellipode qui semblerait être le lieu d'une contraction des complexes actine-myosine et des liaisons fortes avec le substrat (Heath & Holifield, 1991).

Le filopode, quant à lui, est une structure allongée quasiment unidimensionnelle. Il est constitué d'un faisceau de filaments d'actine parallèles. D'un diamètre proche de  $0,5 \mu\text{m}$ , le filopode

### 1.3. Les processus clés de l'adhérence

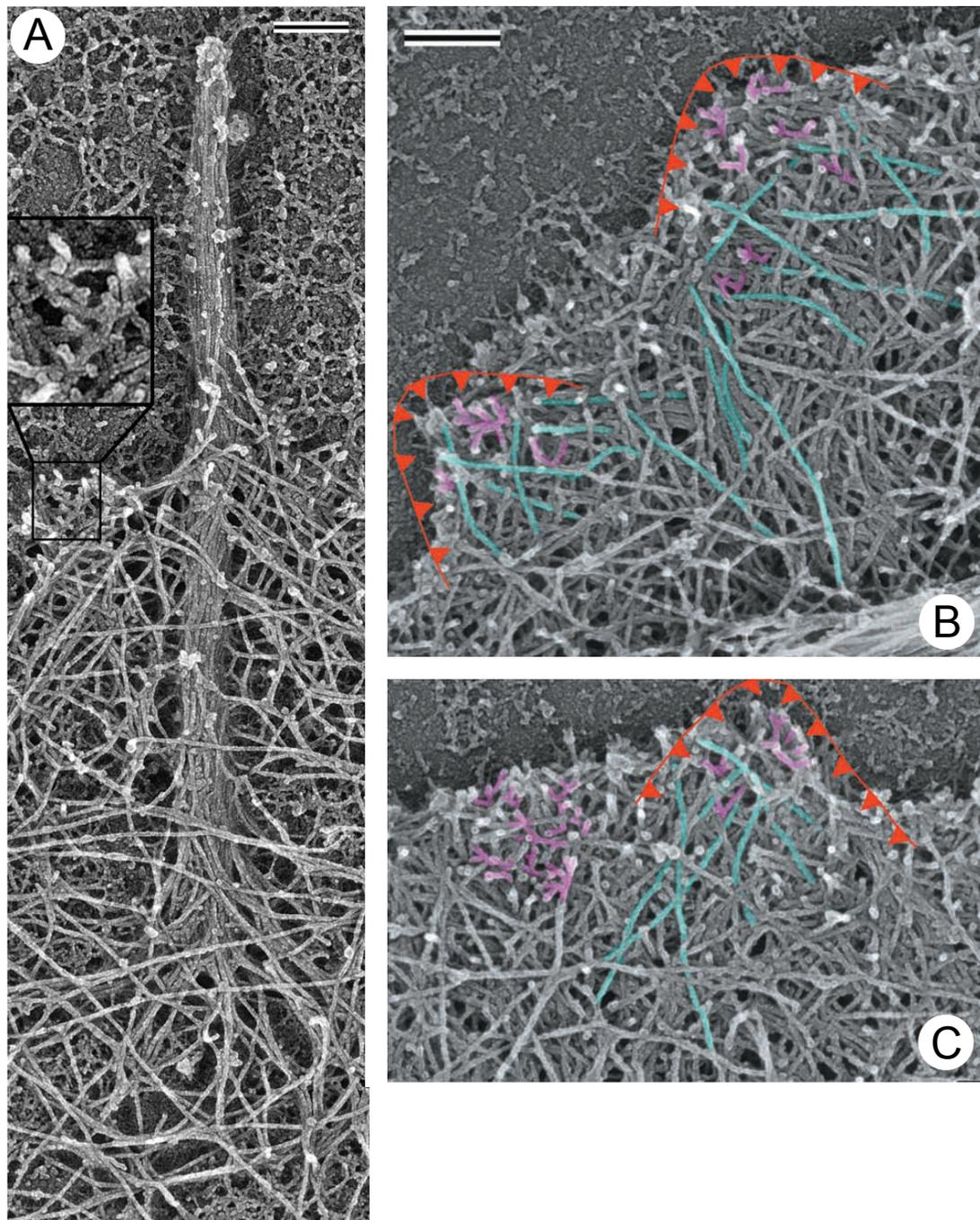


FIGURE 1.4: Micrographies électroniques à balayage de la formation d'un filopode (A) et de l'organisation de lamellipodes (B & C). Barres :  $0.2 \mu\text{m}$ . Source : (Svitkina *et al.*, 2003)

peut explorer l'environnement à de grandes distances (plusieurs dizaines de  $\mu\text{m}$ ) suivant le type cellulaire. Nous verrons dans ce travail qu'il joue un rôle primordial dans l'adhérence lorsque les sites adhésifs sont discrets.

Dans un filopode, l'organisation des filaments en faisceau serré est réalisée par des protéines de liaison telle que la fimbrine ou la fascine. La proximité des filaments semble limiter le passage des moteurs moléculaires. Le filopode n'est donc pas une structure contractile, contrairement au lamellipode.

La nucléation des filopodes a été observée à partir de différentes structures d'actine. Celles-ci peuvent être le gel d'actine, un lamellipode ou bien le cône de croissance dans le cas de neurone. S. Gupton et F. Gerther résument l'état des connaissances actuelles et les mécanismes possibles utilisant des protéines qui restent à déterminer (Gupton & Gertler, 2007). Des travaux de T. Svitkina (Svitkina *et al.*, 2003) ont mis en évidence la nucléation d'un filopode à partir du réseau dendritique de lamellipodes (Figure 1.4 A).

### 1.3.2 La condensation des points d'ancrage

Cette seconde étape suit l'engagement des intégrines après exploration. Une intégrine liée spécifiquement à une protéine de la MEC n'est qu'un contact isolé et mécaniquement faible entre la membrane et le milieu extérieur. Cette première liaison entraîne un regroupement d'autres intégrines, qui diffusent sur la membrane. Cela permet de renforcer mécaniquement le site adhésif.

Lors de l'engagement d'une intégrine avec son ligand, la partie intra-cellulaire va changer de conformation (Hughes & Pfaff, 1998). Cela transmet un signal qui induira la contractilité et associera des intégrines avec un complexe de protéines incluant la vinculine, la taline, la paxilline, la tensine (BurrIDGE & Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Geiger & Bershadsky, 2001; DeMali *et al.*, 2002) qui assureront la liaison mécanique avec le cytosquelette.

Les premiers contacts créés par les cellules avec la MEC, appelés complexes focaux, ont une taille inférieure au micron et sont localisés dans les lamellipodes (Geiger & Bershadsky, 2001). De taille supérieure (3-10  $\mu\text{m}$ ), les adhérences focales (ou contacts focaux) sont les structures réellement utilisées par la cellule pour adhérer et exercer des forces. C'est avec les adhérences focales que les faisceaux de filaments d'actine contractiles, les fibres de stress, interagissent.

Il existe d'autres formes de sites adhésifs, comme par exemple les adhésions fibrillaires. Celles-ci, plus riches en tensine, serviraient à modifier la MEC en tissant des fibres de fibronectine (Zamir & Geiger, 2001). Dans les géométries utilisées pour ce travail, ce type d'adhésion n'est pas pertinent. Nous ne considérerons dans la suite que les adhérences focales puisqu'elles se révèlent être le lieu de l'application des forces sur le substrat et à l'origine d'un grand nombre de régulations intervenant dans l'adhérence cellulaire.

### 1.3. Les processus clefs de l'adhérence

#### 1.3.3 La contraction du cytosquelette

Après l'exploration, la maturation des points d'ancrage et l'établissement de la contractilité sont difficilement dissociables et se font en parallèle. Les responsables structurels de la contraction du cytosquelette sont les moteurs moléculaires du type myosine II qui interagissent avec les filaments d'actine.

Dans cette partie, nous allons décrire le fonctionnement de la myosine II et la structure des faisceaux d'actine contractiles, appelés fibres de stress qui sont responsables de la contraction.

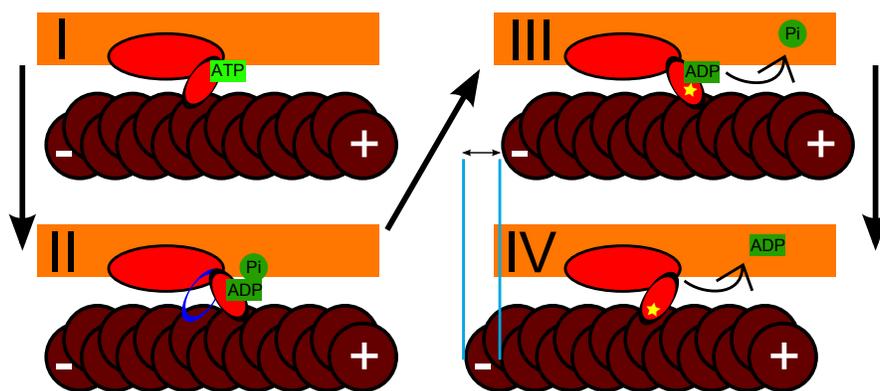


FIGURE 1.5: Schéma du cycle des modifications de la tête de myosine déplaçant un filament d'actine. Les étapes de I à IV représentent les modifications de la tête de myosine respectivement : libérée, armée, génératrice de force puis attachée. La présence de l'étoile indique si la tête de myosine est liée ou non au filament. La forme en bleu foncé indique la position précédente avant l'armement (II) et le trait en bleu clair l'avancement du filament lors de la génération de force (III et IV). Inspiré de (Rayment *et al.*, 1993)

La myosine II est constituée de deux têtes et d'une longue queue en bâtonnet. Chaque tête a à la fois une activité ATPase et une activité motrice dont le cycle générateur de force est schématisé par la Figure 1.5. Le moteur moléculaire effectue un cycle consommateur d'ATP pour déplacer un filament d'actine. Le cycle commence par le décrochement de la tête de myosine du filament lors de l'arrivée d'une molécule d'ATP sur la myosine (étape I). L'hydrolyse de l'ATP en ADP+Pi provoque un changement de conformation de la tête de myosine qui va induire un déplacement de la tête relativement au filament (étape II). La liaison de la tête de myosine sur le filament provoque le rejet du phosphate inorganique (étape III), induisant un retour à la conformation originale de la tête de myosine. Ce déplacement générateur de force (entre l'étape III et IV) libère l'ADP. A la fin du cycle, la tête de myosine est toujours attachée au filament. Seule l'arrivée d'une molécule d'ATP peut relancer le cycle à l'étape I.

La structure modèle de contraction en biologie est le sarcomère des fibres musculaires. K.

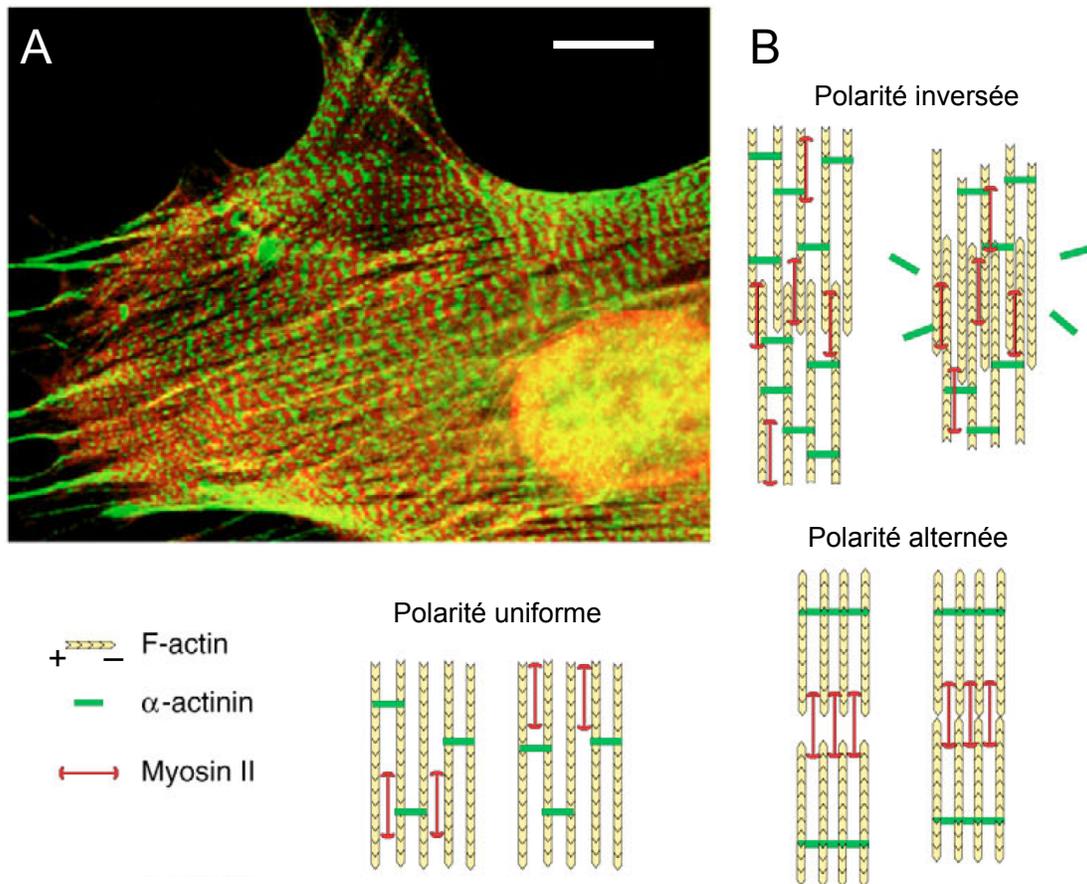


FIGURE 1.6: **A** : Images en fluorescence de l'organisation des fibres de stress où l' $\alpha$ -actinine est marquée en vert et la myosine en rouge. Barre : 10  $\mu\text{m}$ . Source : (Peterson *et al.*, 2004). **B** : Représentation schématique des trois organisations de filaments avec différentes polarités. La polarité inversée de deux fibres uniformément polarisées oblige l' $\alpha$ -actinine à se déplacer ou se détacher lorsqu'une contraction par la myosine II intervient. Une zone où la polarité des filaments est mélangée apparaît au centre de la fibre. Sur une fibre polarisée uniformément, les myosines II se déplacent le long des filaments, pouvant jouer le rôle de cargos. La polarité inversée entre des fibres organisées en sarcomères rapproche les blocs de filaments entre eux lors de la contraction. Source : (Pellegrin & Mellor, 2007)

Burridge a été le premier à comparer les fibres de stress contractiles des cellules à des sarcomères (Burridge, 1981). Ces structures comportent des filaments d'actine parallèles reliés par l' $\alpha$ -actinine. Les myosines II, organisées en filaments bipolaires, viennent s'intercaler entre les faisceaux. Le glissement des myosines relativement aux filaments est à l'origine de la contraction. Des observations représentées sur la Figure 1.6 **A** montrent l'organisation sarcomérique à l'échelle de la cellule des fibres de stress (Cramer *et al.*, 1997; Peterson *et al.*, 2004). Il existe d'autres structures possibles représentées dans la Figure 1.6 **B** permettant d'établir une contraction. Les fibres de stress sont

## 1.4. La régulation biochimique

---

reliées aux structures adhésives par un assemblage macro-moléculaire complexe et dynamique permettant d'assurer un lien mécanique fort entre le support et les fibres (Bershadsky *et al.*, 2006). La myosine II est également présente dans le gel d'actine du cytosol, qui joue aussi un rôle, moins étudié, dans la contraction.

Nous allons voir dans la prochaine partie quelques-uns des acteurs de la régulation biochimique de la cellule qui permettent d'activer les différents processus clefs impliqués dans l'adhésion.

## 1.4 La régulation biochimique

Pour terminer cette introduction des connaissances de biologie cellulaire sur l'adhérence, nous évoquerons un point central des processus : la régulation biochimique permanente qui les dirige. En effet, nous avons jusqu'ici développé l'aspect structural de l'adhérence à travers ses diverses structures, des multiples organisations du cytosquelette aux contacts créés avec la matrice extérieure. Mais comme cela a déjà été évoqué précédemment, l'organisation autour des liaisons des intégrines, le renforcement des sites d'adhésion comme la contraction et l'organisation du cytosquelette sont des processus émetteurs comme récepteurs de signaux. Les signaux consistent en des réseaux de réactions biochimiques couplées dans lesquelles de nombreuses protéines sont impliquées. Il est impossible d'identifier toutes ces protéines et nous nous focaliserons sur celles qui nous semblent importantes pour notre travail. Pour illustrer cette complexité, la Figure 1.7 représente les différentes étapes de la migration et des protéines impliquées dans leur régulation.

Nous discuterons en détail des GTPases (pour Guanosine TriPhosphatases) de la famille Rho affectant principalement la dynamique du cytosquelette d'actine et notamment les protrusions membranaires et les fibres de stress. Mais ces protéines sont également impliquées dans les adhérences focales en interagissant avec d'autres protéines (Hall, 1998; Ridley, 2001). Nous reprenons les trois étapes discutées dans la partie précédente en discutant de leur régulation.

### 1.4.1 L'activation des protrusions

Les protéines de la famille des Rho GTPases (pour Guanosine TriPhosphatases) ont été mises en évidence par Ridley et Hall comme étant les clefs de régulation des processus de l'adhérence (Hall, 1998).

Un membre de cette famille est la protéine Rac. Celle-ci favorise l'assemblage du réseau de filaments d'actine composant les lamellipodes à la périphérie de la cellule (Figure 1.8 **E**) (Nobes

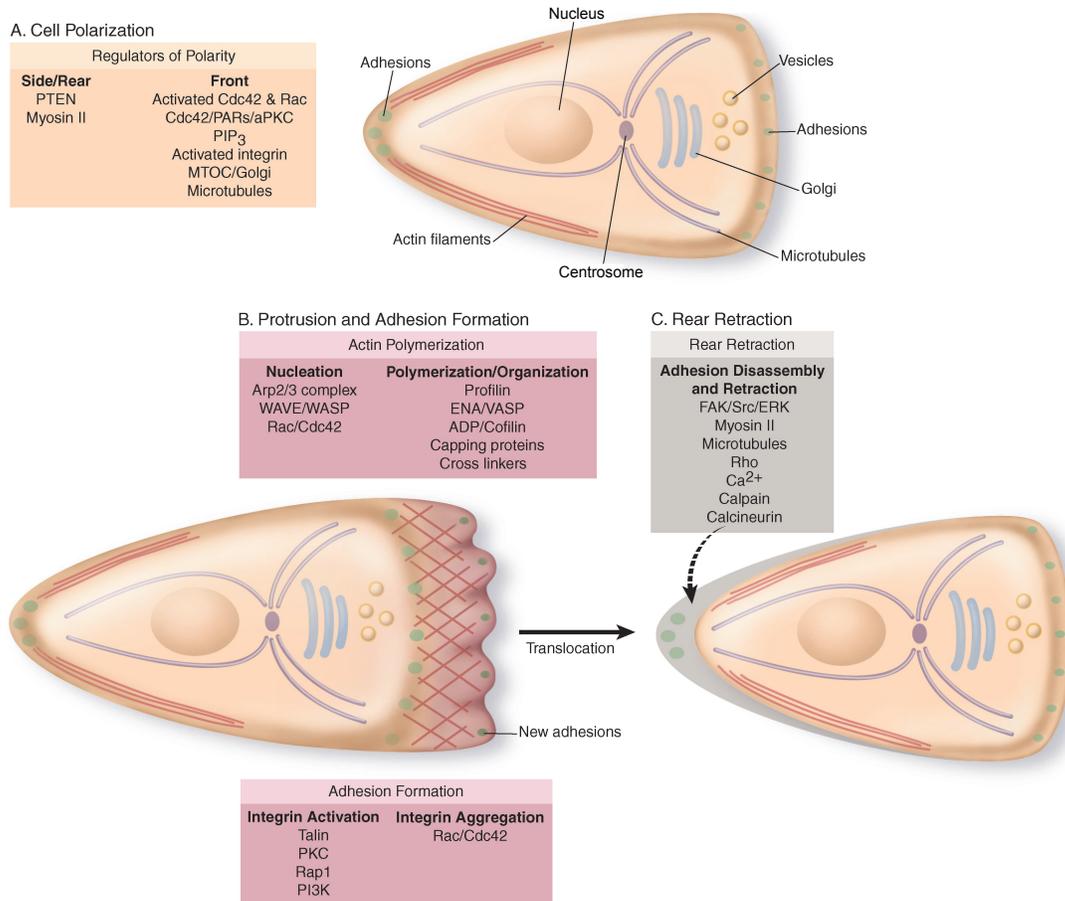


FIGURE 1.7: Représentation schématique de la migration cellulaire divisée en trois étapes. **A** : la polarisation, **B** : l'utilisation des protrusions membranaires pour l'acquisition de nouveaux sites adhésifs et **C** : la rétraction à l'arrière. Les protéines structurales et de signalisation utilisées pour chaque étape sont indiquées dans les cadres résumant leur fonction. Source : (Ridley *et al.*, 2003)

& Hall, 1995). Rac, en activant le facteur de nucléation WAVE de la famille des WASP (pour Wiscott-Aldrich Syndrome Protein), déclenche l'activation d'Arp2/3 qui, comme nous l'avons vu, joue un rôle important dans la nucléation de filaments. Rac provoque donc la polymérisation de l'actine en réseau de filaments branchés formant les lamellipodes. Des protéines de coiffe viennent empêcher la croissance des filaments d'actine dans les lamellipodes pour prévenir de l'accroissement trop important de leur masse. Cela consiste en une régulation négative des lamellipodes et stabilise le réseau (Ridley *et al.*, 2003).

Une autre protéine de la même famille, appelée CDC42, va quant à elle induire l'émission des filopodes (Figure 1.8 **G**). Un des modèles associerait CDC42 à la liaison du complexe Arp2/3/WASP (Arp2/3 activé) avec des regroupements de PIPs (pour PhosphInosites Phosphate) présents sur

## 1.4. La régulation biochimique

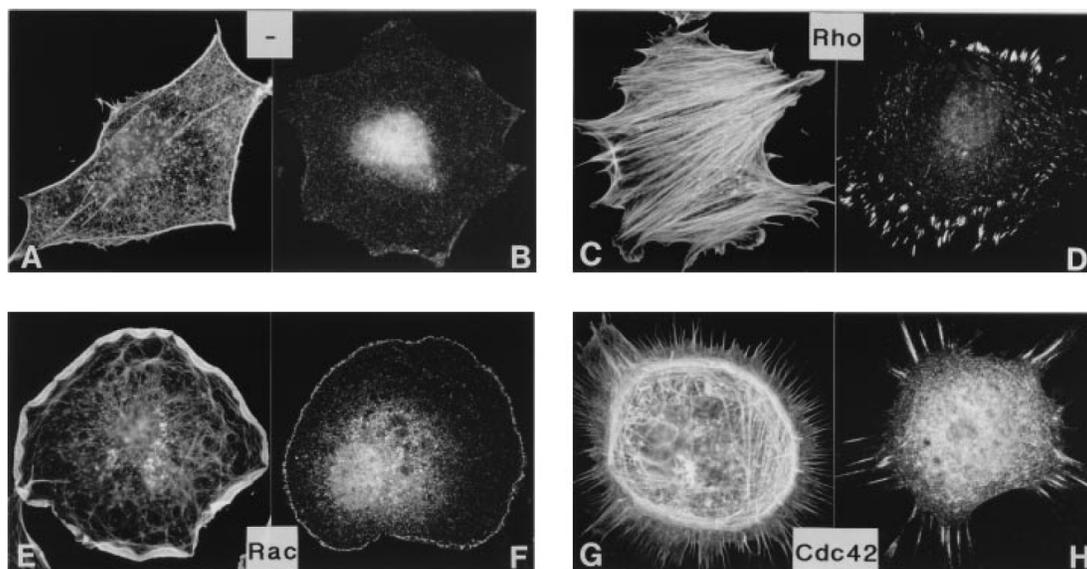


FIGURE 1.8: Images en fluorescence de cellules adhérentes où la régulation de l'adhérence a été modifiée. L'actine a été marquée sur les premières images de chaque cas et la vinculine sur les secondes. **A & B** : Contrôle. **C & D** : Rho est sur-exprimée, la cellule développe de nombreuses fibres de stress contractées. **E & F** : Rac est sur-exprimée, un large lamellipode est développé et entoure la cellule. **G & H** : CDC42 est sur-exprimée, la formation de filopode est stimulée. Source : (Hall, 1998)

la membrane plasmique. Les PIPs serviraient de supports membranaires aux complexes Arp2/3 pour initier directement des filaments à partir de la membrane (DeMali *et al.*, 2002). L'activation de WASP provoque l'émission de filopodes et leur extension par la promotion d'Arp2/3 (Rohatgi *et al.*, 1999).

D'autres protéines régulatrices seraient impliquées dans la stabilisation du filopode, à sa pointe ou à l'arrière, influençant la dépolymérisation, la stabilisation et la coiffe des filaments. Par exemple, un modèle impliquerait les formines comme nucléateurs de filaments d'actine. La famille de protéines Ena/VASP<sup>†</sup> apparaît jouer un rôle primordial dans les processus de coiffe et d'élongation des faisceaux de filaments parallèles (Faix *et al.*, 2009).

Une partie de ces réseaux de régulations complexes est représentée sur la Figure 1.9 qui résume quelques interactions et boucles de rétroaction entre les Rho GTPases, les kinases FAK et Src et leurs effecteurs. Leurs conséquences sur la dynamique du cytosquelette sont également précisées. Nous retiendrons pour les protrusions membranaires que les protéines régulatrices Rac et CDC42 provoquent des modifications dans l'organisation du cytosquelette notamment en augmentant les

<sup>†</sup>. (Ena/VASP (pour Enable Vasodilator-stimulated phosphoprotein) est apparemment présente à l'avant des lamellipodes et des filopodes et régule la polymérisation de l'actine (Rottner *et al.*, 1999))

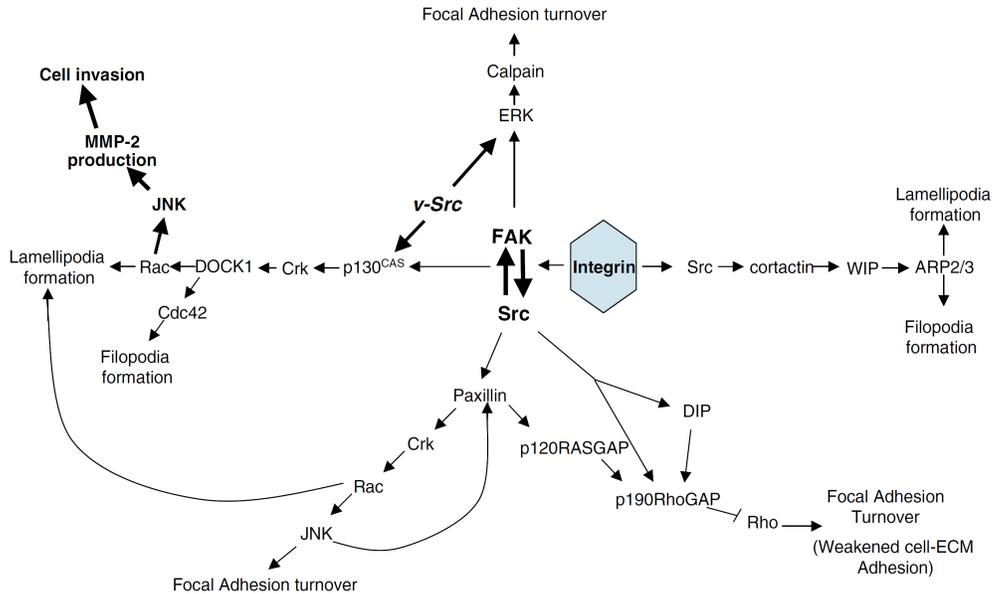


FIGURE 1.9: Schéma des régulations croisées des Rho GTPases et des kinases avec les complexes du cytosquelette et leur conséquence sur le comportement cellulaire. Source : (Playford & Schaller, 2004)

activations des complexes initiateurs de nouveaux filaments. De plus, des régulations croisées entre ces protéines existent. Par exemple, CDC42 active Rac, liant intimement les lamellipodes aux filopodes. Une modification par des outils génétiques de ces régulations est possible en sur-exprimant des formes constitutivement activées ou inactivées des protéines de signalisation. Toutefois, en raison des couplages, l'interprétation des résultats doit être réalisée avec précaution.

#### 1.4.2 L'agrégation des adhésions focales et développement de la contractilité

Le changement de conformation du domaine intra-cellulaire des intégrines qui suit leur engagement est le processus de base de la transmission du signal qui va déclencher l'agrégation des intégrines pour former des plaques. De nombreuses protéines comme l' $\alpha$ -actinine, la paxiline, la vinculine et la taline sont nécessaires pour relier mécaniquement les plaques d'adhérence au cytosquelette contractile (Zamir & Geiger, 2001). Leur assemblage et désassemblage sont notamment régulés par les kinases Src et FAK (DeMali & Burridge, 2003).

La GTPase Rho active la contractilité actine-myosine comme le montre la Figure 1.8 C et favorise également la maturation des complexes focaux en adhésions focales (Figure 1.8 D). Plus finement, cette maturation serait contrôlée par ROCK (pour Rho-associate Kinase). La protéine

## 1.4. La régulation biochimique

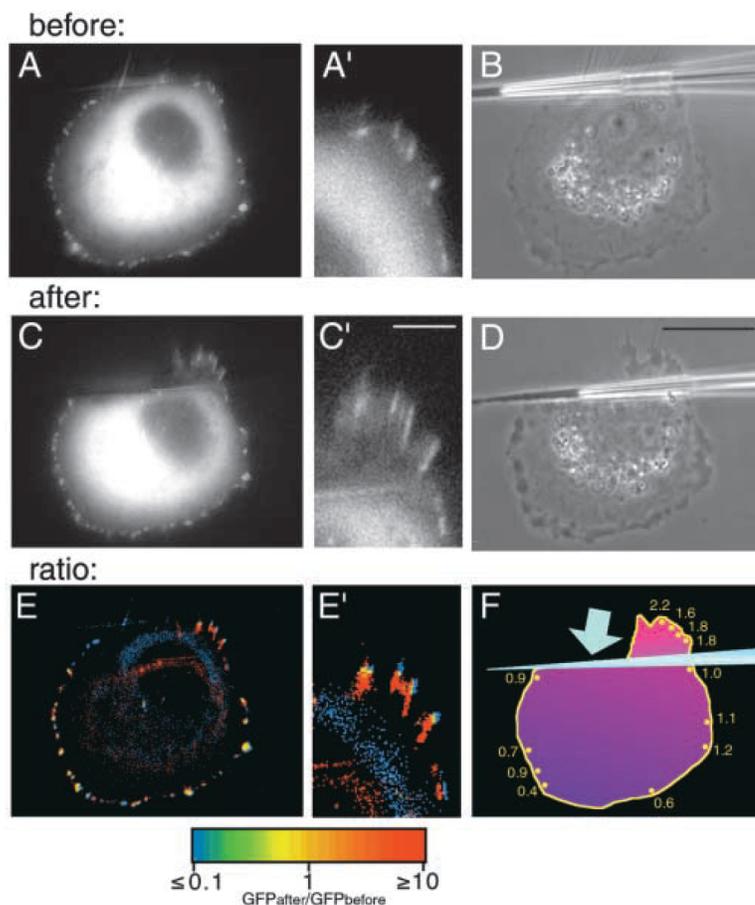


FIGURE 1.10: Images d'une cellule avant et après l'application d'une force extérieure à l'aide d'une micropipette. **A-A'** & **C-C'** : visualisations en fluorescence de la vinculine, **B** & **D** : la même cellule en contraste de phase respectivement avant et après la perturbation. **E** : Image représentant le ratio entre l'intensité de la fluorescence de la vinculine 5 minutes après la perturbation et 20 secondes avant. Le zoom sur **E'** permet de visualiser les nouveaux sites d'adhérences focales créées en rouge, les stationnaires en jaune et les sites disparus en bleu. Source : (Riveline *et al.*, 2001)

ROCK et son homologue pour les formines mDia1 seraient les cibles des régulateurs de la famille des G-protéines Rho dans cette régulation croisée (Geiger & Bershadsky, 2001). Tandis que Rho induit l'assemblage et la création de forces par la contraction des complexes actine-myosine dans les faisceaux de filaments grâce à ROCK, mDia1 serait impliquée dans la réponse des adhérences focales à ces forces (Bershadsky *et al.*, 2006). Il apparaît donc un lien étroit entre la maturation des adhérences focales et les tensions appliquées par les fibres de stress sur ces complexes (Burrige & Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Bershadsky *et al.*, 2003). L'expérience effectuée par D. Riveline (Riveline *et al.*, 2001) a permis d'observer directement cette dépendance en mesurant le changement de morphologie des adhérences focales suite à une augmentation de la tension appliquée à l'aide d'une micropipette (Figure 1.10). Le recrutement des complexes protéiques pour la formation de nouveaux sites en adhérences focales dépendrait donc de la tension des fibres reliées aux adhérences pré-existantes.

Le désassemblage des adhérences focales est nécessaire pour la migration. Ce processus est

dépendant du calcium, des FAK et Src. Les microtubules sembleraient également jouer un rôle important dans cette étape (Kaverina *et al.*, 1999).

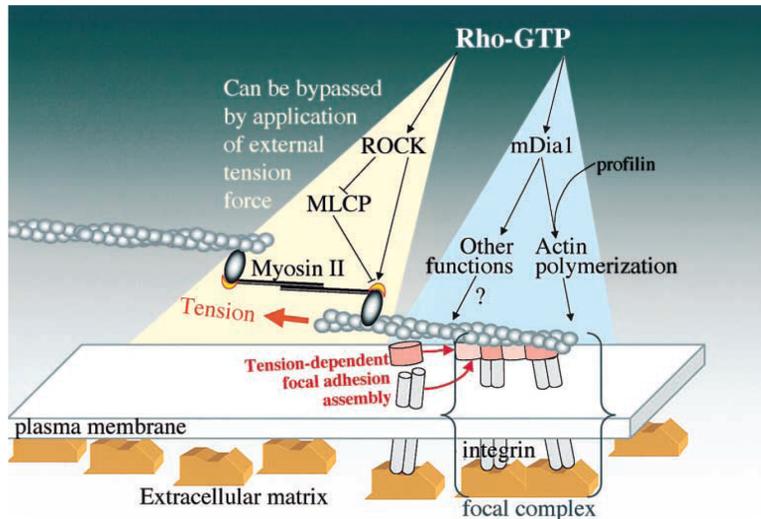


FIGURE 1.11: Schéma de la régulation de Rho sur l'augmentation de la tension induite par ROCK et le renforcement de l'adhérence focale grâce à mDia1. Source : (Riveline *et al.*, 2001)

A travers ROCK et mDia1, les GTPases de la famille Rho interviennent ainsi directement dans ce qui est appelé la "mechanosensitivité" des complexes fibre de stress - adhérence focale (Burridge & Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Geiger & Bershadsky, 2001; Bershadsky *et al.*, 2003). Une représentation phénoménologique consisterait à voir l'assemblage macro-moléculaire relié aux intégrines comme un ressort dont les spires, en s'écartant les unes des autres lorsqu'une force est appliquée, expose des sites d'interactions aux protéines de régulation.

Par des boucles de régulations, la cellule réagit aux informations extérieures collectées par les intégrines qui jouent un rôle central en se comportant comme des capteurs. Le changement de phénotype : renforcement de l'état stationnaire, migration cellulaire, apoptose, morphogénèse est le résultat de cette mechanotransduction (Wozniak & Chen, 2009). Une illustration de l'imbrication des boucles de rétro-action est représentée sur la Figure 1.11.

### 1.4.3 La "stabilité hors-équilibre"

Il est important de garder à l'esprit que l'adhérence cellulaire n'est pas une simple succession linéaire d'événements. En effet, les composants qui structurent la cellule sont aussi des senseurs qui activent ou inhibent des voies de signalisation. La construction du cytosquelette et des sites adhésifs est une succession permanente d'assemblages et de désassemblages influencés par des jeux de signalisations croisées. Les boucles de signalisation-assemblage ne sont pas propres à chaque

## 1.4. La régulation biochimique

---

élément. Ces assemblages sont dynamiques et dépendent les uns des autres. Ces interactions se stabilisent finalement autour de positions d'équilibre dynamique. La cellule consomme en permanence de l'énergie pour entretenir son adhésion au substrat. Cet état est donc temporellement stable, bien que hors-équilibre au sens thermodynamique.

Prenons par exemple une cellule qui commence à s'étaler sur un substrat. Après l'engagement des intégrines avec la MEC, les sites adhésifs vont activer les kinases Src et FAK qui activent à leur tour Rac et CDC42. Rho est légèrement inhibé durant cette phase par les complexes focaux nouvellement créés. Un premier état d'adhérence stable est ainsi dégagé. La maturation des complexes en adhérences focales active alors Rho, déclenchant la contraction du cytosquelette. Parallèlement, les intégrines recrutent et activent les processus déclencheurs des protrusions membranaires pour poursuivre l'étalement vers un nouvel état plus stable pour la cellule. Le désassemblage des anciennes adhésions est dirigé par l'activité des RhoGTPases, notamment Cdc42 qui peut induire une polarité à la cellule et déclencher la migration grâce à son activation de Rac et l'inhibition de Rho à l'avant de la cellule (Etienne-Manneville, 2004). Ce changement de phénotype peut être assimilé à une transition entre un état stable d'étalement et un deuxième état stable plus dynamique sous forme de motilité. Ces régulations, dirigeant le remodelage du cytosquelette, sont donc localisées sur certaines zones de la cellule.

Comme autre exemple, M. Sheetz et collaborateurs ont identifié deux phénotypes d'étalement cellulaire, l'un sous forme d'étalement isotrope, l'autre anisotrope. Les processus d'étalement se révèlent différents dans les vitesses et les temps caractéristiques d'adhésion (Dubin-Thaler *et al.*, 2004). Le cas des cellules à étalement isotropique a été caractérisé plus finement et des transitions de phases dynamiques ont été mises en évidence (Döbereiner *et al.*, 2004). Les trois phases dégagées : basale, continue et contractile auraient des fonctions différentes et n'utiliseraient pas les mêmes régulations de protéines. Elles seraient reliées à des états utilisés par la cellule durant l'adhésion, tout comme le cycle cellulaire est divisé en différentes phases.

La régulation des processus biologiques est un phénomène complexe, impliquant des réseaux de réactions biochimiques couplés et fortement non linéaires.

Cette première partie introductive de biologie nous a permis d'aborder les deux aspects (structure et régulation) intimement liés de l'adhérence cellulaire. Nous allons maintenant discuter des approches physiques utilisées pour aborder les systèmes biologiques.

## 1.5 La biophysique de l'adhérence cellulaire

Les systèmes biologiques sont complexes et l'approche du physicien va consister à les simplifier en faisant des modèles ou en développant des outils de contrôle. Nous allons présenter ceux qui nous ont permis d'aborder l'étude de l'adhérence cellulaire sur un support micro-structuré.

### 1.5.1 Le modèle thermodynamique

Une des premières modélisations de l'adhérence cellulaire fut développée par G. Bell (Bell *et al.*, 1984) en partant d'une observation : l'adhésion de deux cellules résulte de la compétition entre des forces de liaisons spécifiques et des forces de répulsion (électrostatiques et osmotiques) entre cellules (Figure 1.12).

Les hypothèses du modèle considèrent que les échelles de temps concernant la diffusion des récepteurs et la création des liaisons sont beaucoup plus rapides que les processus métaboliques de la cellule (expression de nouveaux récepteurs, division et ré-organisation du cytosquelette). Il est certain que l'expression de nouveaux récepteurs et la division sont des processus lents par rapport aux vitesses d'interactions. En revanche, cela est moins évident pour le cytosquelette qui est comme nous l'avons vu beaucoup plus dynamique.

Le système est décrit par une énergie libre, dépendante des récepteurs libres de la première cellule : équation (1.1a), ceux de la deuxième : équation (1.1b), des récepteurs liés : équation (1.1c) et d'une répulsion non spécifique : équation (1.1d) :

$$\Delta G = N_{1,libre}\mu_1(n_{1,libre}) - N_{1,tot}\mu_1(n_{1,tot}) \quad (1.1a)$$

$$+ N_{2,libre}\mu_2(n_{2,libre}) - N_{2,tot}\mu_2(n_{2,tot}) \quad (1.1b)$$

$$+ N_{liés}\mu_{liés}(n_{liés}, S) \quad (1.1c)$$

$$+ A\Gamma(S) \quad (1.1d)$$

Un résultat important du travail de G. Bell a consisté à expliciter la dépendance en  $S$  (la distance entre deux cellules) du potentiel chimique  $\mu_{liés}(n_{liés}, S)$ . Cette dépendance implique l'élasticité du lien cellule-cellule. Cela correspond à une mécano-transduction passive.

La minimisation de l'énergie libre du système par rapport aux trois paramètres d'état  $N_{liés}$ ,  $A$  et  $S$  permet de trouver les équations d'état de l'équilibre thermodynamique. Leur résolution permet d'établir un diagramme de phases de l'adhésion cellule-cellule dans lequel deux paramètres jouent

## 1.5. La biophysique de l'adhérence cellulaire

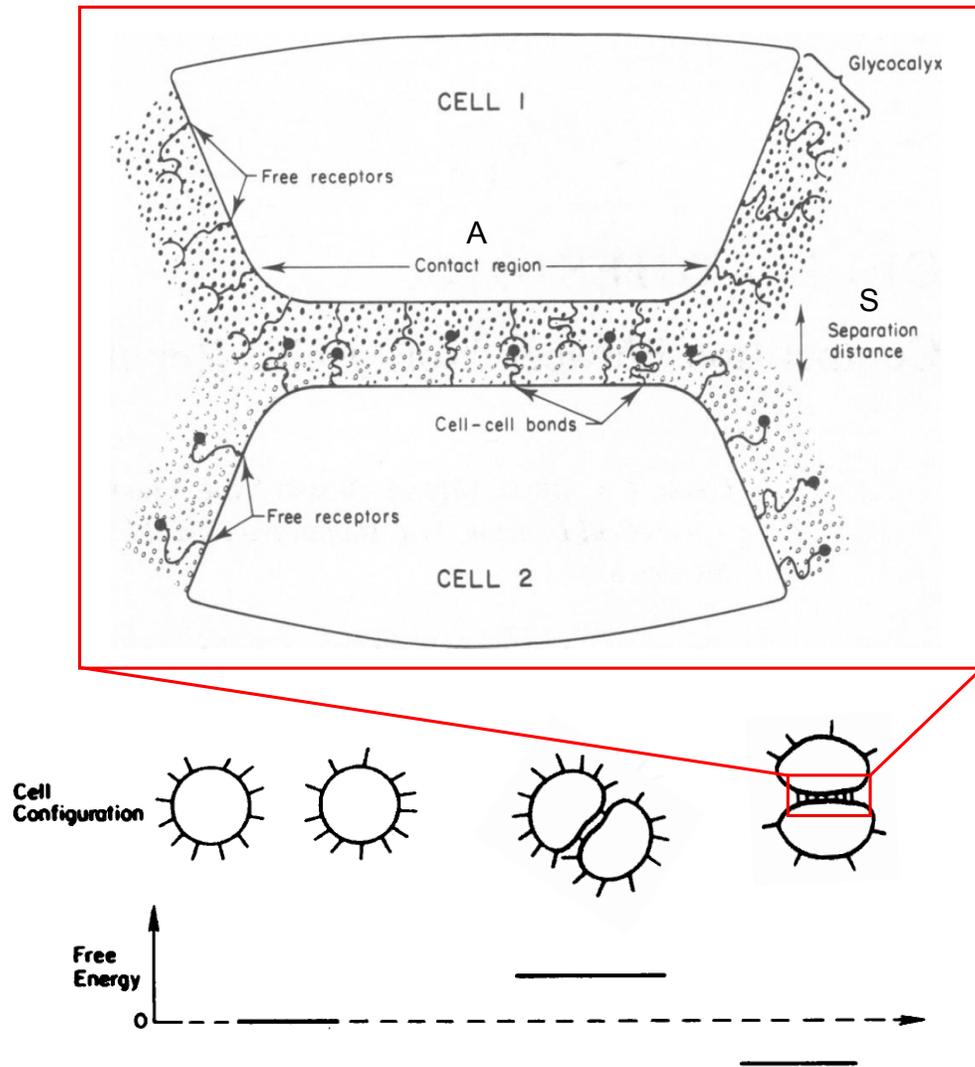


FIGURE 1.12: Schéma représentant l'augmentation de l'énergie libre du système lors du rapprochement des deux cellules puis sa diminution lorsqu'une accumulation de récepteurs se sont liés dans la zone de contact. Un zoom sur cette zone est donné en haut de la figure. Source : (Bell *et al.*, 1984)

un rôle important :

- le nombre total de récepteurs sur les membranes et leur affinité
- la compétition entre l'élasticité du lien cellule-cellule, la répulsion et la température

Ce type de modèle a été étendu à l'adhésion d'une cellule avec un substrat en supprimant la mobilité des récepteurs au niveau du substrat (Torney *et al.*, 1986). Cette modélisation, bien que simpliste, montre d'une part que la représentation thermodynamique de systèmes vivants se révèle valable d'un point de vue macroscopique et d'autre part que le processus d'adhésion

peut être considéré comme une compétition entre forces attractives et répulsives. Toutefois, ce type de modèle ne tient pas compte de la dynamique de l'adhésion et n'est valable que pour des configurations stables (autrement dit à l'équilibre). Ce modèle a été essentiellement utilisé pour décrire les premières étapes de l'adhérence. Il a également permis l'étude de la transition entre des leucocytes mobiles dans le flux sanguin et des leucocytes immobilisés sur la surface des vaisseaux (Hammer & Apte, 1992; Kuo *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2000).

### 1.5.2 La tenségrité cellulaire

La représentation mécanique de l'adhérence d'une cellule dans sa globalité a été abordée par D. Ingber dans les années 90 (Ingber, 1993). Il a nommé ce modèle tenségrité cellulaire.<sup>‡</sup> La tenségrité caractérise la faculté d'une structure à se stabiliser par le jeu des forces de tension et de compression qui se répartissent et s'équilibrent dans la structure. Ce modèle a été amélioré (Ingber, 2003) et de nombreuses fois invoqué pour analyser les résultats de mesures mécaniques sur des tissus ou des cellules uniques (Laurent *et al.*, 2002b; Luo *et al.*, 2008). Il est basé sur des éléments soumis à une compression ou à une tension qui assurent une pré-contrainte dans le matériau. La transposition de ce modèle au cytosquelette considère les fibres de stress comme les éléments sous tension et les microtubules comme les éléments sous compression comme représenté sur la Figure 1.13 **A**. Le changement de leur arrangement permet d'exercer des forces sur le support.

Le désassemblage des microtubules supprime théoriquement la compression dans ce modèle et laisse les forces de tension effectives comme le montre la Figure 1.13 **B** puisqu'une force plus importante appliquée sur le support a été mesurée après cette destruction des éléments de compression (Wang *et al.*, 2001). La tenségrité multi-échelle est une des dernières évolutions du modèle (Ingber, 2006) et considère un équilibre de forces de compression et de tension à l'intérieur des éléments du cytosquelette (fibres de stress et microtubules). Cet équilibre serait également composé d'éléments sous tension et d'autres sous compression, mais à une échelle plus petite, et ainsi de suite. Même si les expériences pour vérifier de telles hypothèses sont compliquées, il apparaît que la mécanique dans le cytosquelette et plus généralement durant l'adhérence, relève d'un équilibre entre les compressions et les tensions internes dans la cellule.

La limitation de ce modèle provient de la réduction à deux composants du cytosquelette de la cellule. En effet, les régulations croisées, les complexes de formation et de contraction des

---

<sup>‡</sup>. La tenségrité est un terme d'architecture, qui serait l'invention de Richard Buckminster Fuller en 1949. Le mot provient de la contraction du terme tensile integrity.

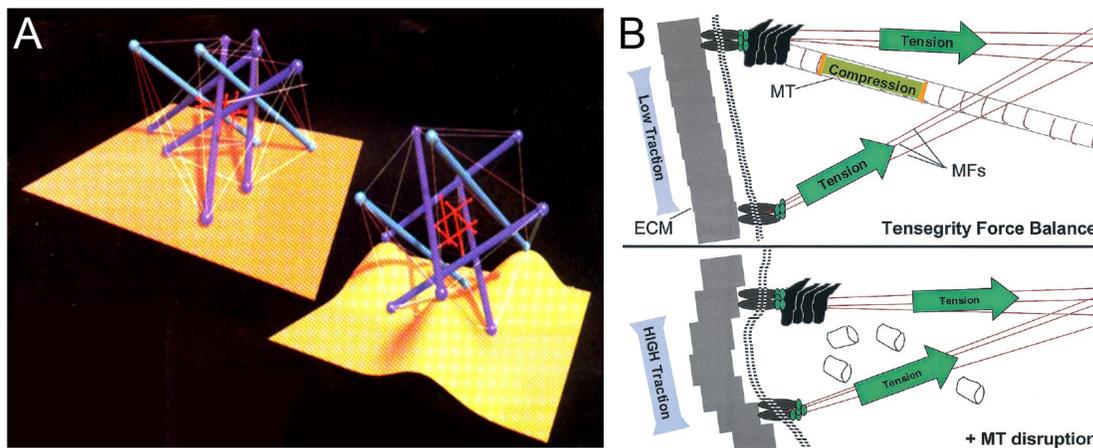


FIGURE 1.13: **A** : Représentation schématique du modèle de tensegrité. Ce dernier inclut des barres et des câbles reliés à des points de connexions. Les barres (en bleu) sont soumises à une compression interne tandis que les câbles (en rouge) à une tension. Un changement de configuration induit une répartition différente des forces internes, et modifie les forces appliquées sur les nœuds de connexion en contact avec le support. Source : (Ingber, 1993). **B** : Schémas représentant l'organisation des microtubules, des fibres de stress et des contacts focaux et leur force respective. La destruction des microtubules supprime les contraintes de compression. Les tensions générées par les fibres de stress étant toujours actives, la force de traction appliquée sur le support devient plus importante. Source : (Wang *et al.*, 2001)

fibres de stress comme les protrusions membranaires ne sont pas considérés dans leur intégralité. Malgré tout, cette vision globale de l'adhérence cellulaire a permis de dégager des comportements mécaniques des éléments du cytosquelette.

### 1.5.3 La viscoélasticité du cytosquelette

La cellule n'est ni un liquide ni un solide. Ses composants ont des propriétés mécaniques intermédiaires entre les deux, étudiées par rhéologie. La rhéologie correspond à l'étude de la déformation d'un matériau en fonction d'une contrainte appliquée. Pour le cytosquelette, la réponse à cette perturbation extérieure se révèle être une combinaison de comportements provenant d'un solide élastique et d'un fluide visqueux. Le modèle de Maxwell et celui de Kelvin-Voigt sont les deux modèles de base de la viscoélasticité. Le premier combine un ressort représentant le caractère élastique du matériau à un dissipateur représentant le caractère visqueux placés en série. Le second possède les deux mêmes éléments disposés en parallèle. Des mesures rhéologiques consistant à appliquer une déformation constante ou une contrainte, puis à la retirer, permet d'obtenir le temps de relaxation relié aux paramètres viscoélastiques par  $\tau = \eta/E$  avec  $E$  le coefficient élastique appelé aussi module d'Young et  $\eta$  la viscosité.

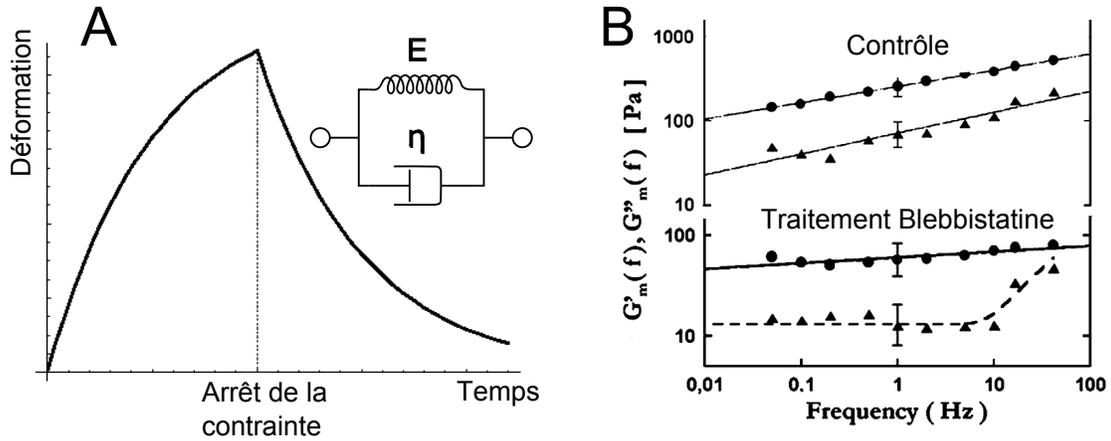


FIGURE 1.14: **A** : Schéma du modèle de Kelvin-Voigt et représentation de la déformation dans le temps lorsqu'une contrainte constante est appliquée sur le matériau, puis retirée. Source : [http://en.wikipedia.org/wiki/Kelvin-Voigt\\_material](http://en.wikipedia.org/wiki/Kelvin-Voigt_material). **B** : Graphiques présentant les mesures des modules élastiques et de perte en fonction de la fréquence d'excitation dans deux cas, le contrôle et avec un traitement de Blebbistatine. Les ordres de grandeurs des modules sont cinq fois plus faibles dans le second cas, ainsi que la soudaine augmentation de la dissipation pour des fréquences supérieures à 10 Hz. Source : (Balland *et al.*, 2005)

Différentes méthodes expérimentales ont été élaborées pour effectuer ces mesures rhéologiques. Nous présenterons des travaux (Laurent *et al.*, 2002a) qui ont mis en évidence un facteur déterminant dans les calculs des coefficients élastiques et de perte : le lien des sondes avec le cytosquelette. Les coefficients élastiques et la viscosité du milieu intra-cellulaire ont été mesurés en utilisant une pince optique appliquant une contrainte tangentielle à la membrane proche de la surface basale. Le deuxième dispositif applique un couple sur la surface apicale de cellules grâce à des billes magnétiques. Les modules élastiques mesurés sont du même ordre de grandeur, de l'ordre de  $E \sim 10-100$  Pa avec des temps de relaxation  $\tau \sim 1$  s.

Les valeurs des coefficients élastiques mesurés par d'autres techniques dépendent beaucoup du type cellulaire, de l'échelle de contrainte appliquée ainsi que de la taille et du couplage des sondes.

Une autre méthode applique une contrainte oscillante et mesure la réponse  $G(f)$  en fonction de la fréquence d'excitation  $f$ . Ce module dynamique  $G(f)$  relie la contrainte  $\sigma$  à la déformation  $\varepsilon$  du système tel que  $\sigma(f) = G(f)\varepsilon(f)$ . Dans le cas d'un modèle de Kelvin-Voigt (Figure 1.14 **A**), le ressort et le dissipateur sont soumis à la même déformation  $\varepsilon$  et la somme des contraintes des deux éléments est égale à la contrainte appliquée  $\sigma$  :

$$\sigma(t) = E\varepsilon(t) + \eta \frac{d\varepsilon(t)}{dt} = G(t)\varepsilon(t) \quad (1.2)$$

## 1.5. La biophysique de l'adhérence cellulaire

---

La contrainte peut s'écrire :

$$F = F_0 \exp(2i\pi ft) \quad (1.3)$$

D'où avec le module viscoélastique dynamique :

$$\sigma(f) = G(f)\varepsilon(f) \quad (1.4)$$

$$G(f) = E + 2i\pi f\eta \quad (1.5)$$

La partie réelle de ce module noté  $G'(f)$  est la réponse en phase de l'excitation et correspond au module élastique du système. La partie imaginaire  $G''(f)$  est la composante en quadrature et correspond au module de perte et caractérise la dissipation due à la viscosité.

Des travaux ont montré une dépendance en loi de puissance des modules élastiques et de perte en fonction de la fréquence (Figure 1.14 **B**). Cette loi de puissance a été observée dans d'autres systèmes viscoélastiques, des systèmes modèles inactifs telles que des solutions de polymères ou de colloïdes ou encore des micelles. Ce résultat est cohérent avec la modélisation plus élaborée développée par B. Fabry qui compare le cytoplasme à un matériau vitreux mou comme des mousses (Fabry *et al.*, 2001). La loi de puissance se résume à  $G', G'' \propto f^\alpha$  avec  $\alpha$  proche de 0,2 dans les résultats présentés. Il est à noter que lorsque  $\alpha$  vaut 0, le système est considéré comme un solide purement élastique et lorsqu'il vaut 1 comme un fluide purement visqueux.

Les mêmes cellules ont été traitées avec de la blebbistatine, un inhibiteur de myosine II empêchant son hydrolyse. Cette drogue engendre un temps plus long pendant lequel la tête de myosine est non liée au filament (voir Figure 1.5 étape I et II). Cela diminue le glissement des filaments entre eux tout en induisant une augmentation de l'élasticité du réseau d'actine et une diminution de sa rigidité (Balland *et al.*, 2005). Ce phénomène est observable sur la Figure 1.14 **B** avec un coefficient  $\alpha$  de 0,06 pour le module élastique et presque nul pour le module de perte jusqu'à 10 Hertz. Cette réponse mécanique est proche de celle d'un solide purement élastique. Enfin, la forte augmentation du module de perte pour des fréquences supérieures à 10 Hertz suggère une forte dissipation par un mécanisme visqueux dû à la diminution de l'activité des myosines II liée à celle du glissement des filaments.

Le même genre d'analyse peut s'appliquer aux fibres de stress. Elles seront représentées comme une suite d'éléments viscoélastiques incorporant une force de contraction active due aux moteurs moléculaires (Figure 1.15). Le couplage entre la fibre et le cytosol apparaît comme essentiel (Besser & Schwarz, 2007).

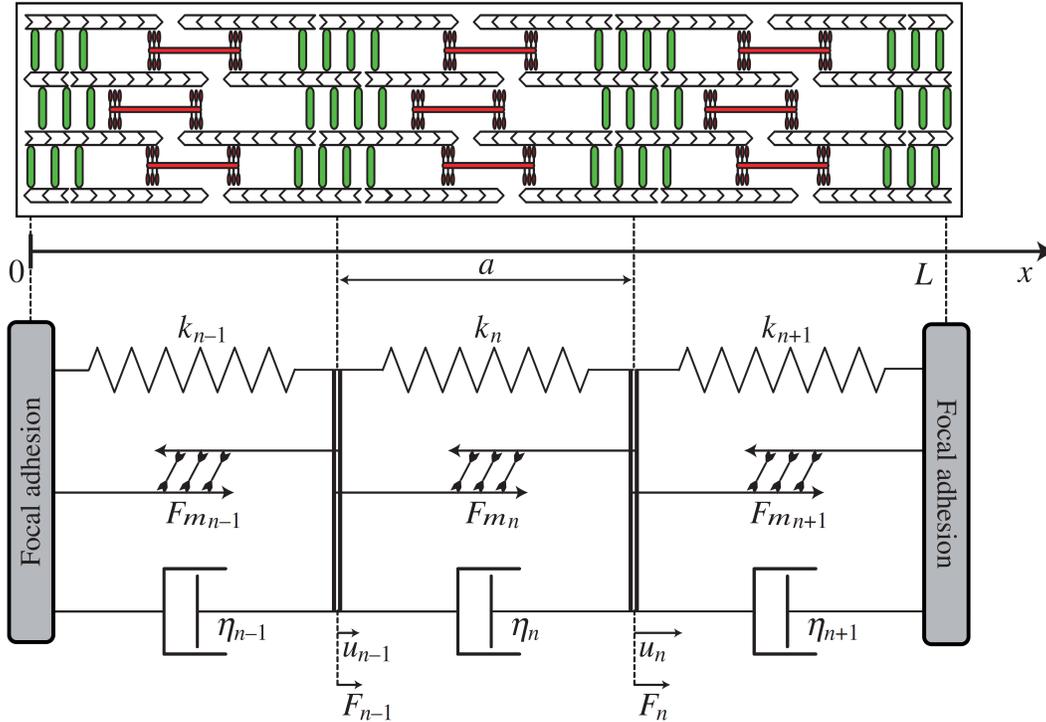


FIGURE 1.15: Schéma d'une fibre de stress avec l'organisation des filaments d'actine en faisceau effectué par l' $\alpha$ -actinine et les positions périodiques des moteurs moléculaires. La correspondance avec la modélisation en dessous montre qu'un sarcomère de fibre est représenté par un élément viscoélastique, composé d'un ressort de raideur  $k$  et d'un dissipateur de viscosité  $\eta$  basé sur le modèle de Kelvin-Voigt, où une force contractile  $F_m$  a été ajoutée. Source : (Besser & Schwarz, 2007)

En conclusion, le réseau d'actine sous ses différentes formes se comporte comme un solide complexe. En modifiant certaines régulations biochimiques comme l'activité des complexes actine-myosine, les changements observés dans les réponses mécaniques permettent de relier les mécanismes responsables de la dissipation ou de l'élasticité du réseau. Ces études du cytosquelette sont nécessaires pour déterminer quels sont les processus dominants responsables de la rigidité et de l'élasticité de la cellule.

Un autre aspect du cytosquelette est également en pleine investigation depuis quelques années : la polymérisation de l'actine permet d'exercer des forces capables de déformer des membranes.

#### 1.5.4 Comment la cellule exerce-t-elle des forces sur la membrane ?

Bien que les mécanismes de base contrôlant la polymérisation de l'actine dans les lamellipodes aient été compris (Pantaloni *et al.*, 2001; Marcy *et al.*, 2004), la formation complète d'un lamel-

## 1.5. La biophysique de l'adhérence cellulaire

---

lipode et sa dynamique sont encore l'objet d'hypothèses qui n'ont pas encore été toutes vérifiées (Mitchison & Cramer, 1996). Une expérience a permis de relier l'extension des lamellipodes à la tension de la membrane plasmique (Raucher & Sheetz, 2000). Cela met en évidence la résistance de la membrane vis à vis de la polymérisation rapide des filaments. Des processus de polymérisation et de dépolymérisation ont été observés (Ponti *et al.*, 2005), mettant en évidence un flux rétrograde d'actine durant l'extension des lamellipodes. Ainsi, l'important dynamisme du lamellipode semble être relié à la dynamique de la polymérisation de l'actine (Small *et al.*, 2002).

Nous verrons dans cette partie par quels procédés moléculaires il est possible pour une cellule d'exercer une force sur une membrane et de la déformer. Ces processus impliquent la polymérisation et dépolymérisation de l'actine et sont donc sensibles à la régulation biochimique (Danuser, 2009).

Une première approximation grossière peut être obtenue par un argument très simple. Il suppose que la force exercée sur la membrane est due à la polymérisation d'un filament d'actine en contact avec celle-ci. Pour ajouter un monomère d'actine à l'extrémité du filament, il faut qu'une fluctuation de la membrane libère de l'espace. Les fluctuations thermiques sont associées à des énergies de l'ordre de  $k_B T$ , qui, divisées par une distance caractéristique fixée par la taille  $a$  d'un monomère, donnent une force :

$$F = \frac{k_B T}{a} \approx \frac{10^{-21}}{10^{-9}} = 10^{-12} N \sim pN \quad (1.6)$$

Cette analyse suppose que le filament est fixé. La membrane s'opposant à la croissance du filament, celui-ci pourrait également reculer. Les études menées par J. Prost sur le mouvement de la bactérie *Listeria* ont permis de faire des avancées importantes et de mettre en évidence le rôle des contraintes dans le gel d'actine dans les forces générées par la polymérisation.

La *Listeria* utilise l'actine d'une cellule contaminée pour se déplacer et infecter d'autres cellules. Elle possède des nucléateurs de filaments à sa surface qui permettent la croissance d'un gel branché, similaire au lamellipode. Ce gel forme une comète à l'arrière de la bactérie qui la propulse. C'est en tentant de mimer cette propulsion en utilisant des billes recouvertes du même nucléateur que les contraintes du gel se sont révélées comme responsables de ce déplacement. Sur une bille sphérique, le gel croît de manière isotropique. Un état stationnaire, représenté par une polymérisation des filaments contre la bille et une dépolymérisation à l'extérieur du gel, a été observé (Figure 1.16 (a)) (Noireaux *et al.*, 2000) et correspond au phénomène du tapis roulant. En présence de milieu purifié, la contrainte dans le gel devient supérieure à une valeur critique de rupture : le gel se brise

(Figure 1.16 (b)). Cette rupture de symétrie engendre une comète similaire à celle de la bactérie, qui va propulser la bille (Bernheim-Groswasser *et al.*, 2002) (Figure 1.16 (c)).

D'autres travaux utilisant des nucléateurs modifiés faisant intervenir soit le complexe Arp2/3 soit VASP ont permis de différencier leur rôle dans l'organisation du gel (Plastino *et al.*, 2004). Une goutte d'huile a été utilisée pour remplacer la bille rigide (Boukellal *et al.*, 2004). La goutte est déformée sous l'effet de la polymérisation de l'actine. L'élasticité du gel d'actine change la pression appliquée sur la goutte et crée le mouvement (Figure 1.16 (d)). La force de propulsion est estimée à 100 pN. Cet effet appelé "squeezing" peut être comparé à une savonnette qui glisse entre nos mains lorsqu'on tente de la serrer.

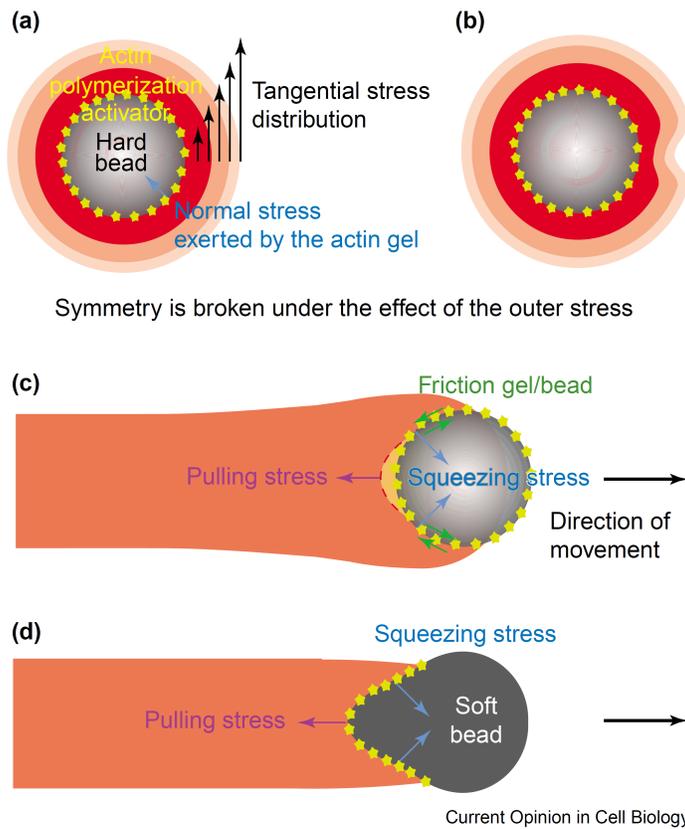


FIGURE 1.16: Schémas décrivant l'effet de la pression exercée par les propriétés élastiques du gel d'actine et ses conséquences sur la brisure de symétrie et le mouvement. (a) : La croissance d'un gel d'actine sur une bille rigide (gris) est obtenue en recouvrant la bille d'activateurs de polymérisation d'actine (étoiles jaunes). La couche en rouge nouvellement créée déforme les couches précédentes et provoque une contrainte dans le gel. (b) : La symétrie est brisée à cause de la contrainte tangentielle devenue trop importante dans la couche externe du gel. (c) : La propulsion d'une bille rigide est la conséquence des forces de pression (flèches bleues) exercées par le gel qui s'opposent à la friction entre la bille et le gel (flèches vertes). (d) : Le même effet est observé sur une goutte d'huile où les forces de pression sont directement observables par le changement de courbure de l'interface goutte/gel. Source : (Plastino & Sykes, 2005)

Enfin, grâce à un dispositif expérimental permettant de mesurer les forces exercées par la comète sur la bille, un diagramme force/vélocité a pu être développé. Celui-ci conclut sur un comportement élastique du système et donne des valeurs caractéristiques de certaines propriétés

## 1.5. La biophysique de l'adhérence cellulaire

---

mécaniques d'un tel gel (Marcy *et al.*, 2004), comme un module d'élasticité de l'ordre de  $10^3$  Pa, proche des valeurs mesurées pour la *Listeria*. Un très bon résumé de ces travaux in vitro (Plastino & Sykes, 2005) conclut sur la responsabilité des ruptures du réseau d'actine sur la motilité. Plus récemment, le lien avec les processus d'émission de protrusions membranaires a été également étudié (Paluch *et al.*, 2006). L'intérêt de ces études in vitro sur des systèmes modèles porte sur la compréhension locale des mécanismes et permet de tenter de relier les processus biologiques faisant intervenir une quantité importante d'éléments avec des mécanismes simples basés sur un faible nombre de protéines.

Afin de modéliser le filopode, certains mécanismes sont pris en compte tels que la diffusion des monomères d'actine de la base du filopode vers sa pointe, les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation des filaments d'actine du filopode, la fluctuation de membrane et le fait que les filaments sont repoussés vers le corps cellulaire (Lan & Papoian, 2008), ce qui pourrait expliquer le flux retrograde observé. Mais la manière dont ils poussent la membrane reste encore inconnue. Plusieurs hypothèses sont avancées. La polymérisation de l'actine est de nouveau considérée comme l'élément clef de cette génération de forces. Les filaments pourraient pousser la membrane par polymérisation à leur extrémité barbée dirigée vers la membrane. L'accessibilité des monomères à l'extrémité des filaments proviendrait des fluctuations de membrane. L'autre hypothèse serait une initiation de petits filaments à partir de la membrane qui se connecteraient aux filaments des protrusions.

En recouvrant une bille piégée optiquement de protéines adhésives, il est possible de laisser la cellule adhérer à la bille et de mesurer la force développée. D. Cojoc et V. Torre ont ainsi pu mesurer la force générée par un filopode proche de 3 pN et par un lamellipode égale à 20 pN sur un cône de croissance de neurone (Cojoc *et al.*, 2007). L'inhibition de la myosine II n'a pas affecté les forces générées par les filopodes mais a considérablement réduit celles générées par les lamellipodes ainsi que leur mouvement. Ces processus n'impliquent pas directement des moteurs moléculaires et montrent comment à partir de la polymérisation de l'actine, une force peut être engendrée.

Ces différents travaux représentent une contribution majeure de la physique pour la biologie. Ils ont ouvert de vastes domaines de recherche. Nous allons, dans la partie suivante, nous intéresser aux forces exercées sur le substrat.

### 1.5.5 Comment les cellules exercent-elles des forces sur le substrat ?

La manière dont les cellules exercent des forces sur le substrat implique les adhérences focales et l'activation de la contractilité des fibres de stress. Ces forces ont été mises en évidence pour la première fois grâce à l'utilisation de substrats mous (Oliver *et al.*, 1995). Les déformations induites pour la contraction des cellules produisaient des vaguelettes sur le support comme le montre la Figure 1.17. Les mesures de forces consistaient à inverser les déformations pour en déduire les contraintes.

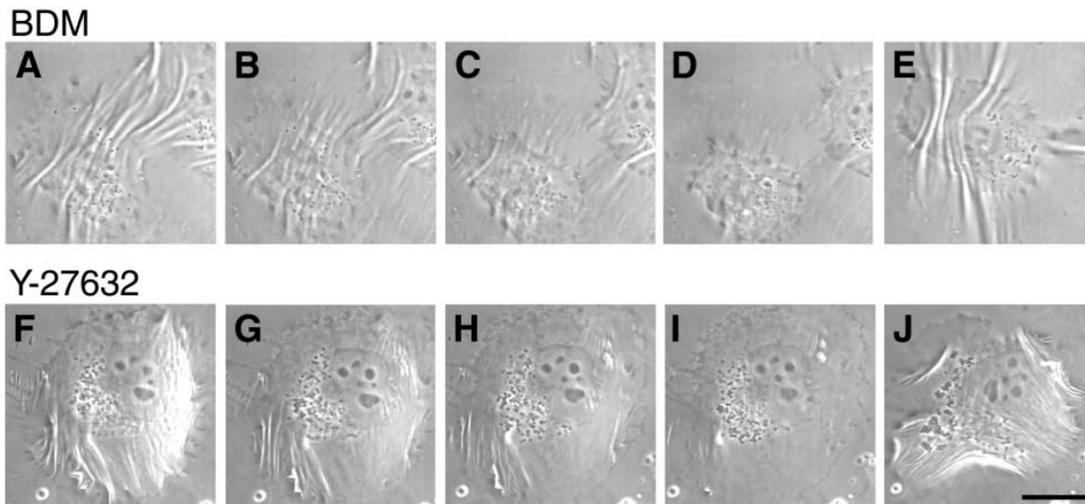


FIGURE 1.17: Images en contraste de phase où des cellules adhérentes sur un gel de silicone exercent des forces et déforment le gel (**A & F**). Après un traitement de BDM (2,3-butanedione monoxime) stoppant l'hydrolyse de l'ATP par les complexes actine-myosine (suppression de la contractilité) et de l'Y27632 un inhibiteur de ROCK, les cellules perdent leur contractilité et n'exercent plus de force sur le substrat (images effectuées à 2,5 min (**B & G**), 5 min (**C & H**) et 9,5 min (**D & I**) après début du traitement). Le retrait des drogues dans le milieu permet aux cellules de retrouver leur contractilité d'origine (**E & J**). Source : (Riveline *et al.*, 2001)

Ce problème complexe a été grandement simplifié en utilisant des supports micro-structurés (Balaban *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002) ou des tapis de micro-piliers comme présentés dans la Figure 1.18 (du Roure *et al.*, 2005). Dans ce cas, la mesure de la force est directement proportionnelle à la déformation du pilier.

Ces méthodes de fabrication de supports ouvrent de grandes perspectives dans le contrôle et la caractérisation de l'adhérence cellulaire, comme nous allons le voir dans la partie qui suit.

## 1.5. La biophysique de l'adhérence cellulaire

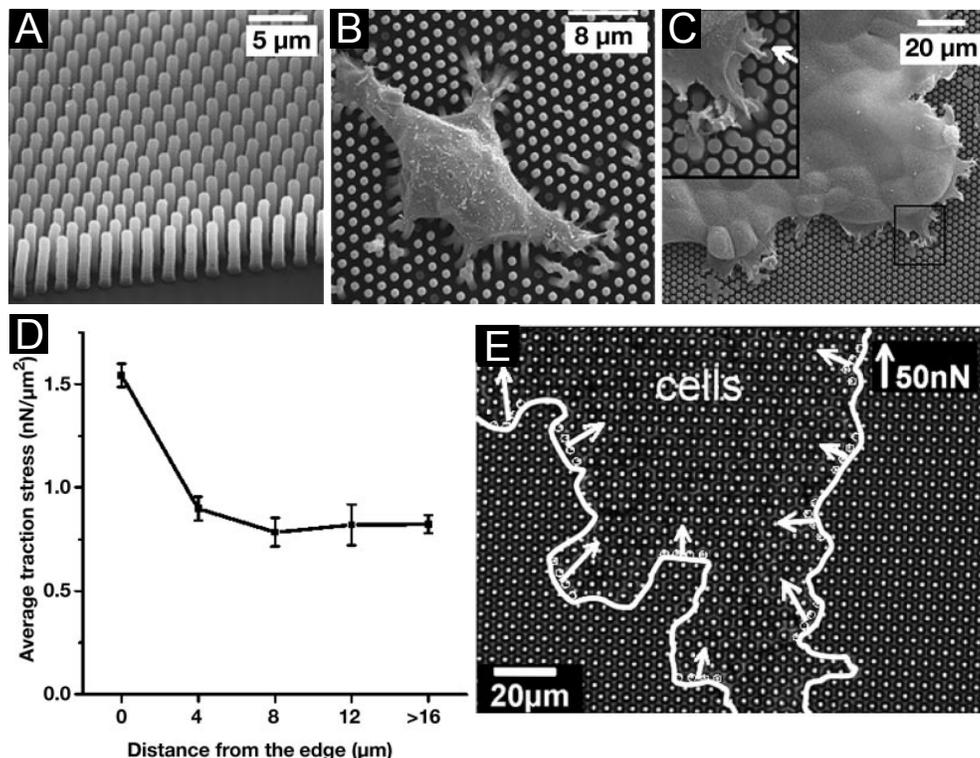


FIGURE 1.18: **A**, **B** & **C** : Micrographies électroniques à balayage. **A** : Champ de micro-piliers. **B** & **C** : Cellule unique en adhérence sur un champ de micro-piliers respectivement de largeur 1 μm et 2 μm espacés de centre à centre de 2 μm et 3 μm. **D** : Champ de forces dû au stress (ou pression) émis par la cellule en fonction de la distance du bord cellulaire. **E** : Cellule adhérente sur des micro-piliers larges de 2 μm et de distance centre à centre de 4 μm. La flèche rend compte de la force exercée par la cellule sur 4 piliers voisins indiqués par les cercles blancs. Source : (du Roure *et al.*, 2005)

### 1.5.6 Les structurations de la MEC

Tout au long de cette introduction, nous avons souligné l'importance des interactions spécifiques entre les récepteurs membranaires et les protéines de la MEC. Il semble naturel d'utiliser la matrice comme outil de contrôle des processus cellulaires. Les premiers travaux de G. Whitesides et D. Ingber (Singhvi *et al.*, 1994) ont permis de dégager le rôle important de la surface d'adhésion sur la survie ou la mort des cellules (Chen *et al.*, 1997). D'autres études ont mis en évidence, le lien entre la géométrie du motif et la direction de la motilité cellulaire (Brock *et al.*, 2003). L'organisation des cellules à l'échelle sub-cellulaire, particulièrement au niveau du cytosquelette d'actine, comme nous le verrons dans ce travail, est également influencée par la géométrie du motif (Théry *et al.*, 2006).

Les motifs de protéines immobilisées sur une surface sont obtenus à partir de méthodes de

fabrication sur lesquelles nous reviendront dans le chapitre suivant. Elles permettent de réaliser des motifs à des échelles de taille correspondant aux tissus (100 à 1 000 cellules) (Nelson *et al.*, 2005), à la cellule unique (Parker *et al.*, 2002) ou à des assemblages sub-cellulaires comme les adhérences focales (Figure 1.19).

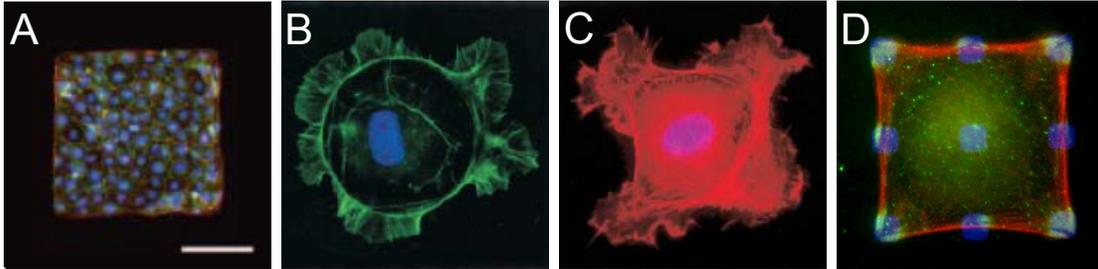


FIGURE 1.19: Images en fluorescence d'actine de cellules en adhérence sur des motifs adhésifs. **A** : Motif carré multicellulaire. Barre : 100  $\mu\text{m}$ . Source : (Nelson *et al.*, 2005). **B & C** : Cellules uniques en adhérence sur un motif respectivement circulaire (diam=50  $\mu\text{m}$ ) et carré (côté=40  $\mu\text{m}$ ). L'émission de protrusion membranaire n'est localisée que dans le cas du carré. Source : (Parker *et al.*, 2002). **D** : Cellule unique en adhérence sur des plots adhésifs de largeur 4  $\mu\text{m}$  espacés de 12  $\mu\text{m}$  obtenue dans ce travail de thèse.

Il est remarquable de noter sur l'image de la Figure 1.19 **C** que la cellule émet des protrusions membranaires préférentiellement à partir des points anguleux de la membrane. Sur les images que nous avons obtenues (Figure 1.19 **D**), l'organisation simplifiée du cytosquelette est exceptionnelle. Dans un autre registre, certaines méthodes de micro-structuration développées permettent d'imaginer des systèmes de tri cellulaire (Kandere-Grzybowska *et al.*, 2007; Mahmud *et al.*, 2009) basés sur les propriétés adhésives sélectionnant les directions de migrations préférentielles en fonction du type cellulaire (Figure 1.20).

Outre le fait que ces supports fabriqués en grand nombre autorisent des moyennages conséquents pour diminuer les dispersions biologiques, ils vont exacerber les comportements cellulaires et nous permettre de développer des modèles simples. Cela a été très bien mis à profit dans des travaux sur l'orientation du faisceau mitotique dirigé par la géométrie du motif lors de la division cellulaire (Théry *et al.*, 2007).

Dans une autre thématique, la différenciation de cellules souches a été observée comme dépendante de la tension du cytosquelette. Des cellules souches mésenchymateuses déposées sur des motifs adhésifs de taille variable ont montré une différenciation préférentielle en ostéoblastes sur les motifs de grandes tailles et en adipocytes<sup>§</sup> sur les motifs de petites tailles. (McBeath *et al.*,

§. Les ostéoblastes sont les cellules présentes dans les os alors que les adipocytes sont des cellules grassieuses.

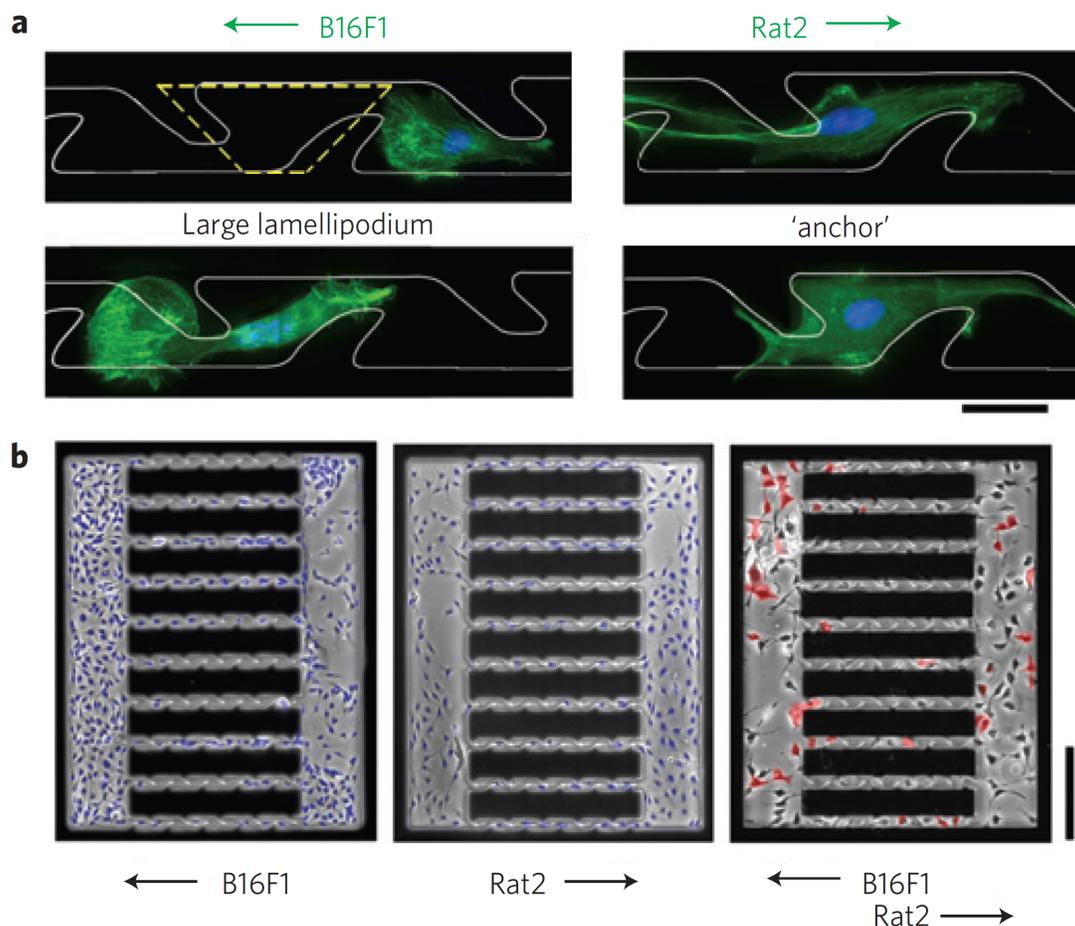


FIGURE 1.20: **a** : Les cellules cancéreuses B16F1 et saines Rat2 migrent dans des directions différentes. Les premières utilisent de larges lamellipodes pour envahir la nouvelle zone adhésive (trapèze jaune) tandis que les secondes utilisent de longues protrusions pour s'accrocher au bord du motif. Barre : 30  $\mu\text{m}$ . **b** : Distribution des cellules B16F1 (à gauche), Rat 2 (au milieu) et un mélange des deux types cellulaires (à droite) sur des supports comportant des canaux avec des réservoirs. Barre : 250  $\mu\text{m}$ . Source : (Mahmud *et al.*, 2009)

2004). Des travaux plus récents ont d'ailleurs montré que c'est en fait la tension induite par la géométrie du support qui serait responsable de cette différenciation sélective (Ruiz & Chen, 2008).

Lorsque ces techniques de structurations seront adaptées à des substrats de rigidité variable, elles offriront une gamme d'outils de contrôle et d'études très vaste de la mécanotransduction, puisque l'élasticité du substrat a été montrée comme déterminante dans la différenciation (Discher *et al.*, 2009) et l'établissement de la contractilité (Discher *et al.*, 2005).

## 1.6 Les objectifs de la thèse

Les premiers travaux de D. Ingber ont montré que la surface adhésive utilisée par une cellule déterminait son destin (mort ou prolifération) (Chen *et al.*, 1997). Les motifs utilisés étaient compacts (grand motif homogène, Figure 1.19 C). Que se passe-t-il si la même surface adhésive proposée à une cellule est maintenant fractionnée en plus petites surfaces (Figure 1.21)?

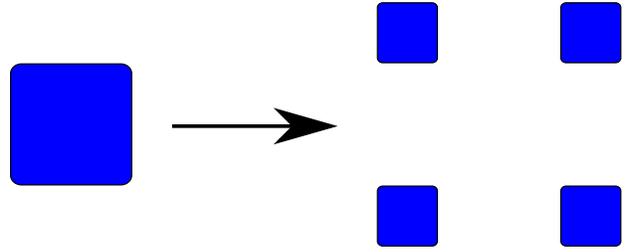


FIGURE 1.21: Fractionnement de la zone adhésive.

La première partie du travail de thèse s'est focalisée sur cette question. Cela était également motivé par l'approche de Bell qui a montré l'importance de la densité de ligands dans un diagramme de phase de l'adhésion (Bell *et al.*, 1984). Pour cela nous avons développé une méthode originale de structuration de la matrice, présentée dans le chapitre 2, qui permet un contrôle de la densité de protéines adhésives.

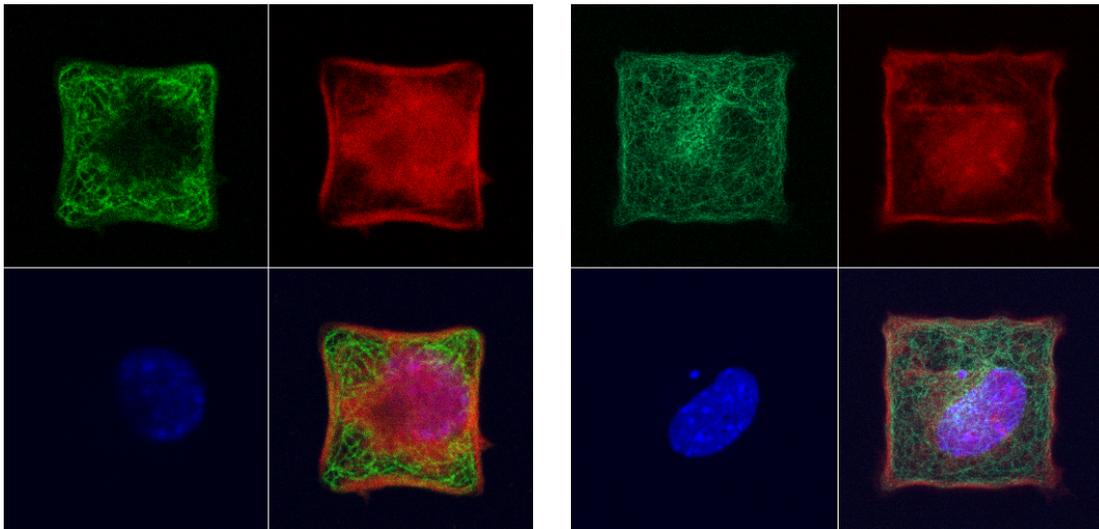


FIGURE 1.22: Images en fluorescence de l'actine (rouge), des microtubules (vert) et du noyau (bleu) de cellules en adhérence sur des supports microstructurés composés de plots adhésifs organisés en réseau carré et entourés de surface anti-adhésive. Le cytosquelette d'actine apparaît très organisé par rapport aux microtubules qui ne montrent aucune sensibilité à la géométrie imposée par le substrat à contraste adhésif. Avec la permission de E. Planus.

Les résultats obtenus sont abordés dans le chapitre 3. Ce fractionnement induit une très forte organisation du cytosquelette d'actine mais pas des microtubules comme le montre la Figure 1.22.

## 1.6. Les objectifs de la thèse

---

La robustesse des formes géométriques observées suggère qu'il existe des lois physiques simples auxquelles les cellules obéissent. Nous avons cherché à établir ces lois.

Pour cela, nous avons adapté le modèle de Potts Cellulaire décrit dans le chapitre 4 aux contraintes adhésives imposées par les substrats. Les résultats ont montré que les cellules adhérentes sur les supports micro-structurés se comportent de manière similaire à des gouttes. Ces systèmes intrinsèquement hors-équilibre sont donc stabilisés par le motif dans des configurations métastables comme nous le montrerons. Notre dernier objectif a été de relier les paramètres du modèle à des paramètres biologiques.

Le modèle développé, de manière similaire à Bell, nous a permis d'établir un diagramme de phase de cellules adhérentes. Dans ce diagramme, l'état d'une cellule est déterminé par deux paramètres que nous allons relier aux propriétés physiologiques des cellules. Il est alors possible, en comparant les observations expérimentales avec les résultats numériques du modèle, d'en déduire des informations sur l'activation des voies de signalisation de l'adhérence, ce que nous aborderons dans le chapitre 5.

Le paramètre biologique limitant l'adhérence cellulaire qui induit l'auto-organisation du cytosquelette de cellules adhérentes sur des supports micro-structurés est impliqué dans l'exploration de l'environnement par les cellules. La dynamique de l'adhérence sera donc abordée dans le chapitre 6 dans un premier temps en fonction des observations expérimentales pour identifier précisément le facteur limitant. Nous considérerons enfin les processus impliqués dans le cycle exploratoire de l'adhérence à partir du modèle de Potts Cellulaire. La représentation énergétique de l'exploration de l'environnement obtenue sera enfin comparée à la méthode utilisée dans le modèle afin de déterminer ses limites.

Nous rappellerons dans le dernier chapitre les résultats et conclusions importantes. Certaines perspectives qui nous semblent pertinentes et qui permettraient de comprendre certains phénomènes observés durant la thèse seront ensuite abordées.



# Chapitre 2

## *Matériel et méthodes*

"YES WE CAN."

Barack Obama (1961 - )

Président américain, prix Nobel de la Paix (2009)



## Chapitre 2

# Matériel et méthodes, les substrats micro-structurés

Dans ce chapitre, nous aborderons la méthode de fabrication des supports structurés utilisée dans le cadre de cette thèse. Elle permet de fabriquer des échantillons dont la résolution spatiale atteint  $1\ \mu\text{m}$ . Elle a été un développement expérimental conséquent de ces travaux. Ce procédé original, dont le principe a été mis au point avant le début de cette thèse, a été optimisé régulièrement pour aboutir à une méthode extrêmement robuste et reproductible.

Néanmoins, la fabrication des supports micro-structurés n'est pas le seul aspect technique qui a été développé durant la thèse comme nous le verrons dans les chapitres suivants. Les autres méthodes expérimentales mises en place, bien qu'également très importantes sont plus standards dans leur développement et leur utilisation. Un effort important a été réalisé pour automatiser l'acquisition et le traitement des très grandes quantités d'images acquises pour effectuer des statistiques pertinentes. Les programmes ont permis de caractériser automatiquement les morphologies cellulaires et d'obtenir des mesures précises de courbures d'interface. Ces développements seront présentés au fur et à mesure dans les chapitres concernés. La culture cellulaire, les marquages d'immunofluorescence et les perturbations biochimiques engendrées par des drogues sont des protocoles standards du laboratoire DySAD avec lequel nous avons interagi pour ces travaux.

Nous allons d'abord présenter brièvement l'état de l'art concernant la structuration de couches de protéines. Nous décrirons ensuite la méthode que nous avons développée puis les caractérisations que nous avons réalisées.



---

## Sommaire

---

2.1	État de l'art . . . . .	<b>51</b>
2.1.1	La lithographie douce . . . . .	51
2.1.2	Autres procédés . . . . .	52
2.2	Notre méthode de fabrication . . . . .	<b>54</b>
2.2.1	Hydrophobicité du support initial . . . . .	55
2.2.2	Lithographie . . . . .	57
2.2.3	Limitations et avantages de la lithographie . . . . .	58
2.3	Caractérisations des supports micro-structurés . . . . .	<b>58</b>
2.3.1	La silanisation . . . . .	58
2.3.2	Le dépôt des protéines adhésives . . . . .	63
2.3.3	La blocage de la surface . . . . .	67
2.4	Conclusion . . . . .	<b>69</b>

---



## 2.1 État de l'art

Les technologies de micro-fabrication sont issues du monde de la micro-électronique pour lequel elles ont été adaptées. Le principal problème lors de leur application à des systèmes biologiques est de conserver la fonctionnalité des molécules biologiques lorsqu'elles sont soumises à des traitements agressifs. Il a fallu inventer des techniques de "lithographies douces" que nous allons présenter en premier. Une revue récente (Falconnet *et al.*, 2006) dénombre, dans leurs principes, diverses méthodes, en s'employant à dégager les avantages et inconvénients de chacune. Nous conseillons sa lecture pour plus de détails.

### 2.1.1 La lithographie douce

Ces procédés sont appelés doux car ils n'utilisent pas les solvants et produits acides des technologies de la micro-électronique. Un élastomère est utilisé pour "tamponner" une surface. Un premier moule est créé par une méthode de lithographie standard. Un élastomère en phase liquide est déposé sur ce moule puis recuit pour le rigidifier comme le montre la Figure 2.1 (A). Une fois démoulé, il forme un tampon, copie négative du moule, qui pourra être utilisé théoriquement un nombre illimité de fois.

La Figure 2.1 (B) représente le procédé de transfert de protéines sur la surface : le tamponnage (microcontact printing -  $\mu$ CP). La première étape d'encrage consiste à adsorber de manière non spécifique des molécules sur le tampon. Celui-ci est ensuite appliqué sur l'échantillon afin de transférer "l'encre" sur le substrat (étapes II à III). Le motif est ainsi reproduit sur le support. La dernière étape consiste à recouvrir les zones non fonctionnalisées de molécules qui vont empêcher l'immobilisation d'autres molécules sur la surface. Si l'encre est constituée par des protéines de la MEC, alors la dernière étape servira à bloquer la surface de manière à empêcher toute interaction non spécifique avec les cellules.

Bien que cette méthode possède l'énorme avantage de la simplicité, de nombreuses limitations apparaissent. La résolution spatiale est limitée par la nature élastique du tampon qui impose des contraintes sur la conception des motifs. L'impression du tampon peut être très délicate. Ensuite, l'efficacité du transfert n'est pas forcément bien contrôlée et peut nécessiter une chimie de surface importante. L'affinité entre l'encre et le substrat doit être meilleure qu'avec l'élastomère. Ce procédé est aussi limité lorsque les motifs doivent être alignés avec des structures existantes car le tampon n'est pas transparent.

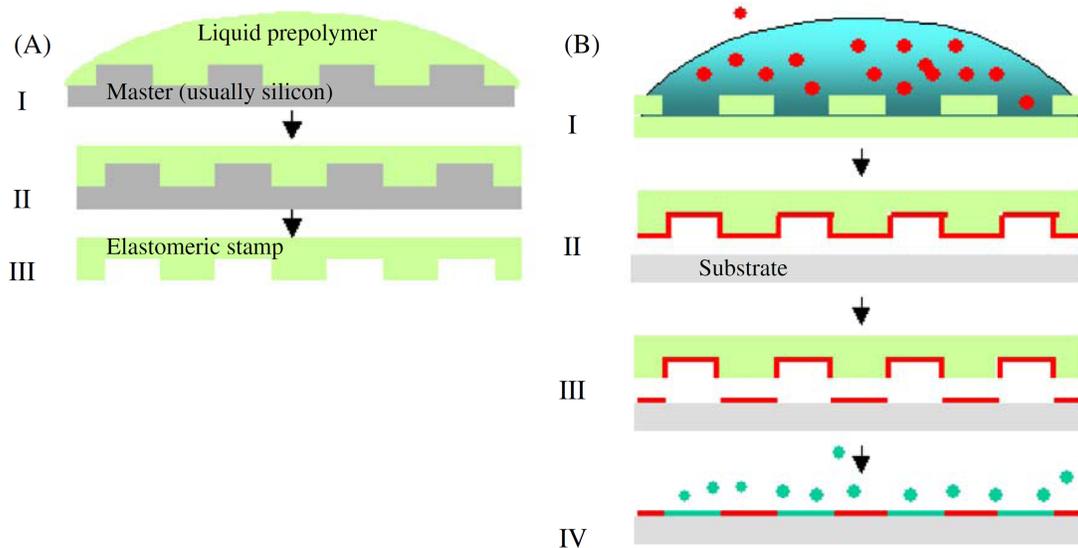


FIGURE 2.1: Représentation schématique de la technique de lithographies douces appelée microcontact. (A) Étape représentant la création du tampon. (B) Séquence d'impression par microcontact, le tampon est recouvert de biomolécules (encre), puis appliqué sur la surface du substrat (impression). Une passivation à l'aide de molécules anti-adhésives recouvre le reste de la surface. Source : (Falconnet *et al.*, 2006)

La méthode originale a été développée par D. Ingber et G. Whitesides (Singhvi *et al.*, 1994) en se basant sur des surfaces recouvertes d'or. Les encres étaient alors constituées de solution à base de thiols qui s'adsorbent de manière irréversible et cristalline sur l'or. Ces molécules peuvent être fonctionnalisées de manière à empêcher l'adsorption de protéines et l'adhérence cellulaire : PEG-thiol (PEG : Poly-Éthylène Glycol), ou pour favoriser l'immobilisation non spécifique des protéines sur une surface hydrophobe :  $C_{18}$ -thiol. Cela avait deux inconvénients majeurs : le support n'était pas transparent ce qui ne permettait pas l'observation en microscopie de transmission et la synthèse des PEG-thiols était très coûteuse. Ces molécules ont été petit à petit remplacées par la famille de silanes, disponibles commercialement et réagissant sur des surfaces de verre.

### 2.1.2 Autres procédés

D'autres procédés ont été développés pour essayer de répondre aux problèmes posés par la lithographie douce, soit pour contrôler de manière parfaite la densité de protéines immobilisées à la surface pour s'affranchir du problème du transfert d'encre, soit pour obtenir une résolution spatiale ultime.

### Contrôle parfait de la densité

Une technique a été développée pour obtenir un contrôle parfait de la densité de complexes immobilisés. Huang et collaborateurs (Herbert *et al.*, 1997) ont réussi à immobiliser des oligopeptides contenant le site RGD\* sur des molécules d'éthylène glycol (EG) par photocouplage (UV ou via un faisceau laser)<sup>†</sup>. Ils ont montré qu'il existe une corrélation linéaire entre le temps d'exposition et la quantité d'oligopeptides immobilisés. Cela permet, en passant le laser sur la surface à différentes vitesses, de créer des gradients de concentration de peptides sur le support.

### Résolution ultime

Un procédé basé sur l'utilisation de billes d'or colloïdales a été développé (Arnold *et al.*, 2004). Des billes d'or d'un diamètre inférieur à 8 nm sont recouvertes de PEG dont le nombre de monomères est contrôlé. Les billes ainsi préparées s'auto-organisent en réseau hexagonal sur la surface dont le pas est déterminé par la taille des PEG. En brûlant le PEG par un plasma, les billes restent séparées suivant la même organisation hexagonale. Les billes d'or sont ensuite recouvertes de tri-peptides RGD. La taille nanométrique de ces plots ne permet qu'à une seule intégrine de se lier avec les complexes RGD.

Cette technique astucieuse constitue la résolution maximale à l'échelle moléculaire, puisque chaque plot d'or ne peut interagir qu'avec une seule intégrine. Ces expériences ont montré que lorsque la distance entre deux billes d'or était supérieure à 60 nm, les cellules ne s'étaient pas. Les voies de signalisation ne sont activées par les intégrines que lorsque celles-ci sont liées à des protéines adhésives et distantes de moins de 60 nm. Cela a permis de déterminer la distance maximum entre deux intégrines engagées qui permet de déclencher l'aggrégation des complexes focaux.

### Technique simplifiée

Une méthode récente et très prometteuse permet, en une étape, d'immobiliser des protéines sur un support selon un motif déterminé (Fink *et al.*, 2006). Elle est basée sur un couplage photo-activé des protéines avec des PEG immobilisés de manière homogène sur la surface du substrat. Le principe de cette méthode est représenté sur la Figure 2.2.

---

\*. Rappel : le site RGD est présent sur la fibronectine et permet la reconnaissance de celle-ci par les intégrines.

†. Cette exposition va changer les propriétés de molécules (benzophenone) en solution qui permettent l'immobilisation des ligands

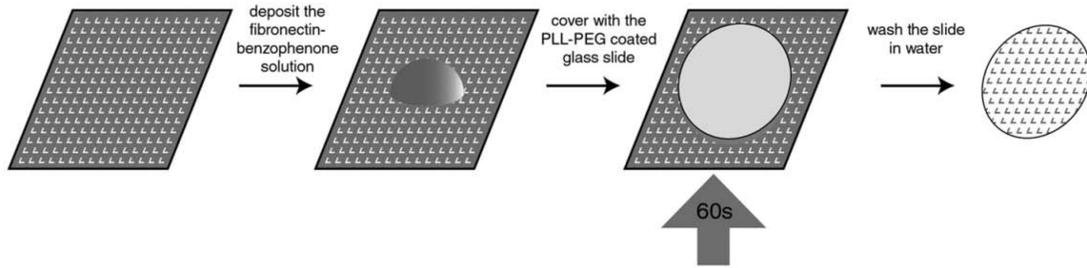


FIGURE 2.2: Schéma de la méthode de micro-structuration par illumination direct sous UV.  
Source : (Fink *et al.*, 2006)

Une goutte de solution contenant les protéines adhésives ainsi que la benzophénone, une molécule de couplage, est déposée sur le masque de lithographie. Une lamelle de verre recouverte de PEG est ensuite appliquée sur la goutte. Une exposition d'une minute à une lampe UV (310 – 460 nm) va produire une activation du PEG à travers les zones transparentes du masque qui permet un couplage de la protéine par l'intermédiaire de la benzophénone. La lamelle de verre est ensuite rincée à l'eau distillée. Sa robustesse, sa reproductibilité et sa simplicité de fabrication classent cette méthode parmi les plus intéressantes pour les études *in vitro* de cellules sur des supports micro-structurés, d'autant plus qu'elle est applicable à des supports mous.

## 2.2 Notre méthode de fabrication

L'objectif initial de la thèse étant d'étudier l'effet de la densité de ligands immobilisés sur l'adhérence, notre souci était de contrôler le mieux possible la quantité de protéines déposées. Nous allons utiliser de la fibronectine de manière à déclencher les régulations biochimiques de l'adhérence. Il est également très important de conserver des surfaces non adhésives en bloquant toute nouvelle adsorption de protéines. Cela est d'autant plus important que le modèle cellulaire que nous allons utiliser dans la thèse sont des fibroblastes qui synthétisent leur propre matrice. Si cette dernière peut s'immobiliser à la surface, la contrainte adhésive initiale imposée par le motif disparaît rapidement. Les substrats doivent donc comporter :

- des protéines adhésives pouvant être liées de manière spécifique à la cellule afin que la régulation de l'adhérence se déclenche et permette la contraction cellulaire
- des molécules anti-adhésives qui doivent empêcher la formation de sites adhésifs ailleurs que sur le motif et l'immobilisation de protéines synthétisées par les cellules
- des motifs adhésifs et anti-adhésifs de taille sub-cellulaire : de l'ordre du micromètre

## 2.2. Notre méthode de fabrication

---

- une bonne stabilité des couches de molécules immobilisées pour éviter toute dénaturation durant l'expérience.
- un contrôle de la quantité de protéines adsorbées

Comme, à terme, nous souhaitons interfacier ces motifs avec des capteurs physiques nécessitant des alignements avec des structures existantes, le choix des tampons a été éliminé. Afin d'éviter une chimie compliquée, nous avons éliminé les méthodes qui impliquait des couplages covalents. Nous nous sommes donc tournés vers une immobilisation non spécifique. Cela peut être réalisé par l'intermédiaire de surface hydrophobe. Il était également important pour nous de visualiser les cellules sur des supports en verre transparents, le choix de la chimie de surface s'est porté sur les silanes.

Nous allons dans la suite aborder le protocole de fabrication des supports micro-structurés utilisés tout au long de la thèse. Notre méthode est inspirée des travaux de H. Sorribas et collaborateurs (Sorribas *et al.*, 2002). Nous allons d'abord expliquer pourquoi une surface hydrophobe permet une immobilisation robuste des protéines. Nous présenterons ensuite les différentes grandes étapes du protocole. Nous terminerons par une discussion sur ses avantages et inconvénients.

### 2.2.1 Hydrophobicité du support initial

Une protéine soluble est composée de domaines hydrophiles et hydrophobes. Le principe d'immobilisation est lié à l'attractivité des domaines hydrophobes des protéines pour les surfaces hydrophobes. C'est grâce à cette interaction de nature essentiellement entropique qu'il est possible d'immobiliser différentes molécules de manière non spécifique sur une surface hydrophobe. Dans le cas d'une protéine où les domaines hydrophobes sont présents au cœur, lorsque celle-ci vient en contact avec la surface, elle va se dénaturer en exposant ses domaines hydrophobes à la surface. Bien que la protéine soit éloignée de sa configuration optimale, l'énergie libre totale et relative à la surface, à l'eau et à la protéine a été globalement diminuée dans ce processus (Israelachvili, 1991).

L'objectif est de contrôler le mieux possible la densité de protéines adhésives immobilisées, puisque d'après G. Bell (Bell *et al.*, 1984), celle-ci va jouer un rôle important dans l'adhésion. Pour cela, nous avons choisi de contrôler la densité en structurant la couche par lithographie. Il est indispensable d'obtenir des couches de protéines homogènes. Des monocouches compactes seront nécessairement homogènes. D'après la Figure 2.3 la quantité de protéines immobilisées en surface, augmente avec l'hydrophobicité du support. Afin d'obtenir des couches de densité maximum, il est important d'avoir une surface la plus hydrophobe possible.

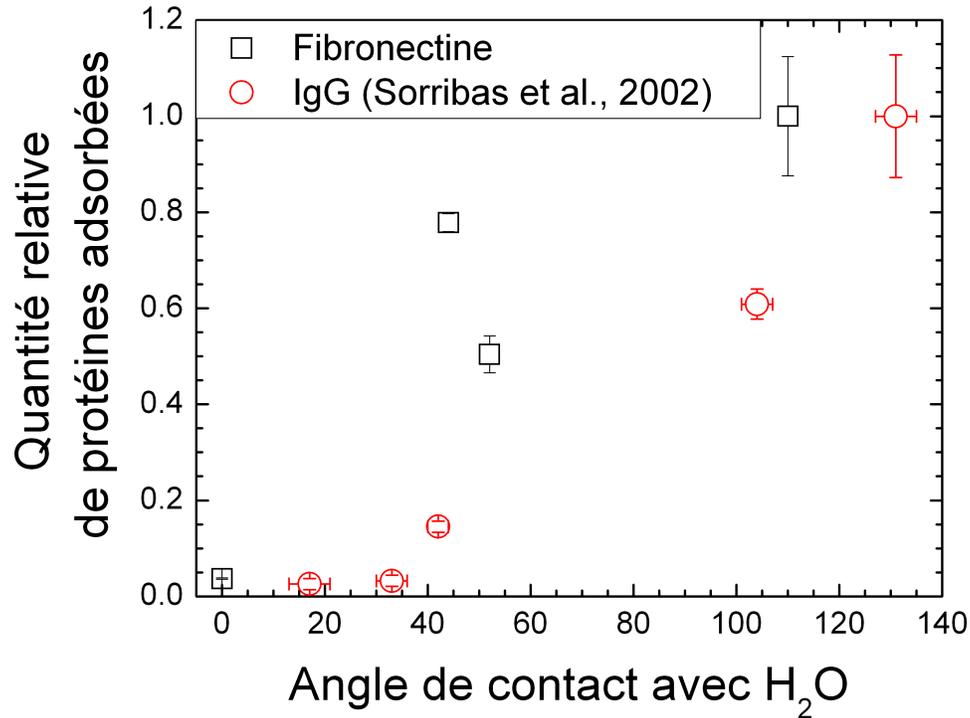


FIGURE 2.3: Quantité relative de protéines immobilisées en fonction de l'angle de contact d'une goutte d'eau déposée sur le substrat. L'angle de contact est directement relié à l'hydrophobicité du substrat. La quantité de protéines immobilisées dépend de l'hydrophobicité du support. Source de (Sorribas *et al.*, 2002)

Différentes techniques de traitement de surfaces ont été développées pour obtenir des surfaces hydrophobes (Blawas & Reichert, 1998). Notre choix s'est porté sur les silanes qui, par couplage avec le verre, permettent d'obtenir une surface hydrophobe. Bien que les réactions de silanisation nécessitent un protocole rigoureux dû à leur sensibilité à l'eau, elles représentent un moyen efficace de traitement de surfaces. Nous détaillerons ces réactions dans la partie concernant la caractérisation de la surface. Nous avons mis en place un protocole de chimie de surfaces basé sur l'OctaDecylTrichloroSilane (ODTS) :  $CH_3 - (CH_2)_{17} - SiCl_3$  (Sigma-Aldrich) détaillé dans l'Annexe A : *Matériel et méthodes, les autres outils*. L'ODTS est reconnu comme un silane très réactif grâce à ses trois groupes chlore et très hydrophobe grâce à sa longue chaîne carbonnée de 18 atomes. Nous avons mesuré par fluorescence les quantités de protéines adsorbées sur des couches d'hydrophobicité variable, nos résultats ont confirmé ceux de Sorribas et Padeste (Figure 2.3).

## 2.2. Notre méthode de fabrication

### 2.2.2 Lithographie

Les étapes de la lithographie sont représentées sur la Figure 2.4 étapes I, II et III. Les protocoles utilisés sont standards. La résine photosensible a été choisie pour sa très faible épaisseur  $0,5 \mu\text{m}$  qui permet d'obtenir une résolution spatiale de l'ordre du micron. Après développement, les zones irradiées par les UV sont libres de résine et exposent les silanes hydrophobes. Celles-ci sont mises en contact avec une solution de protéines adhésives qui vont s'adsorber (étape IV). Le reste de la résine est dissoute dans de l'éthanol avec des ultrasons ce qui ne laisse à la surface que les protéines en contact avec le silane (étape V). La dernière étape consiste à venir bloquer la surface avec une molécule anti-adhésive, dans notre cas, du Pluronic (étape VI). Une molécule de Pluronic est un trimère formé d'un groupement PPO (poly-oxypropylene) fortement hydrophobe entouré de deux groupements PEO : poly-oxyethylene, un autre nom du PEG. Les molécules de pluronic, constituées du groupe hydrophobe (PPO) au centre et des groupements anti-adhésifs (PEO) à chaque extrémité vont s'immobiliser de la même manière que les protéines qui possèdent des domaines hydrophobes et hydrophiles.

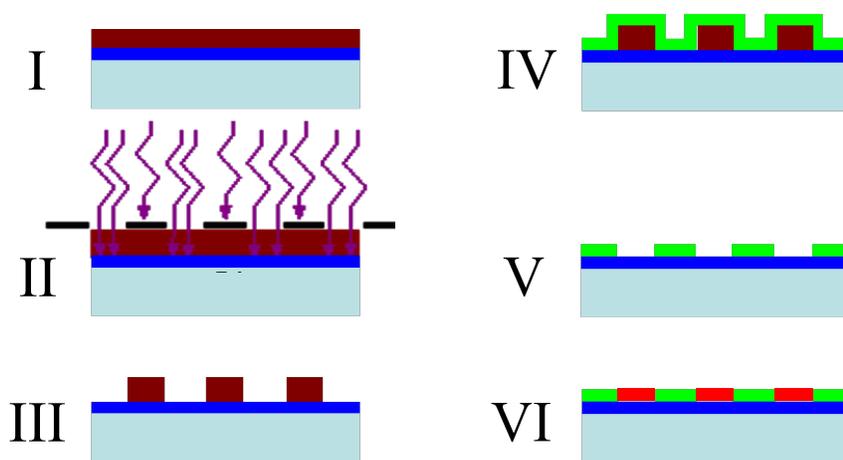


FIGURE 2.4: Schéma des étapes de lithographie optique puis des dépôts de biomolécules. I Résine déposée sur le substrat ou sur une couche de biomolécules préalablement adsorbées. II Insolation aux UV de la résine à travers le masque. III Suppression de la résine insolée à l'aide d'un révélateur. IV Immobilisation des protéines adhésives. V Suppression du résidu de résine. VI Adsorption des molécules anti-adhésives.

Cette méthode étant basée sur une adsorption non spécifique, différents types de protéines ont été testés avec succès (fibronectine, vitronectine, collagène, anti-corps...). Cela démontre son caractère général.

### 2.2.3 Limitations et avantages de la lithographie

La limitation majeure de la lithographie optique réside dans les contraintes d'utilisation d'une salle blanche. Un travail préalable de chimie est également primordial pour rendre la surface hydrophobe.

Les avantages sont multiples. Un nombre important de protéines, de peptides, de promoteurs ou de métaux oxydés sont compatibles avec cette technique du fait des liaisons non spécifiques créées avec les silanes. Les substrats utilisés peuvent également être très différents, allant de la simple lamelle de verre à des couches métalliques. Enfin, la taille des motifs créés peut s'avérer bien meilleure que celle obtenue par l'utilisation des tampons. Dans ce travail, nous avons utilisé essentiellement des UV à 460 nm pour lesquels la résolution est de 1  $\mu\text{m}$ . L'utilisation d'UV lointains (DUV pour Deep UV,  $\lambda < 365\text{nm}$ ) ou d'un faisceau d'électrons permet d'améliorer cette résolution jusqu'à des échelles de l'ordre de quelque centaines de nm. Il nous reste maintenant à caractériser les couches immobilisées.

## 2.3 Caractérisations des supports micro-structurés

Dans cette partie, nous allons détailler les étapes clés du protocole : la silanisation, le dépôt de protéines adhésives et le blocage de la surface.

### 2.3.1 La silanisation

Comme nous l'avons vu, la silanisation a pour but de rendre hydrophobe le support. De nombreux silanes sont disponibles commercialement. Ils diffèrent par les trois groupes chimiques autour du silicium tétravalent et par le groupe fonctionnel. Les trichlorosilanes que nous avons utilisés sont les plus réactifs. Afin d'optimiser l'hydrophobicité des couches, il est nécessaires de comprendre les étapes de la réaction chimique qui vont coupler les silanes à la surface. Celles-ci sont détaillées dans la suite.

#### Réaction

La réaction de couplage du silane avec la surface peut-être décrite en plusieurs étapes (Figure 2.5) :

- Le silane va tout d'abord subir une hydrolyse en solution pour générer des silanols intermédiaires. Les atomes de chlore vont se lier à des groupes hydroxides, laissant les groupes

### 2.3. Caractérisations des supports micro-structurés

fonctionnels (notées R et dans notre cas 18 carbonés) disponibles pour réagir avec les protéines et dégageant de l'acide chlorhydrique.

- Une condensation a lieu sur les atomes de silicium en bout de chaîne qui se lient les uns aux autres par réaction des groupes hydroxydes entre eux. Cela provoque en solution un regroupement en oligomères des molécules de silanes.
- Les oligomères de silanes vont réagir avec la surface de verre. Comme pour la condensation, des liaisons entre les atomes de silicium des silanes et ceux du verre sont créées par l'intermédiaires des groupes hydroxydes.

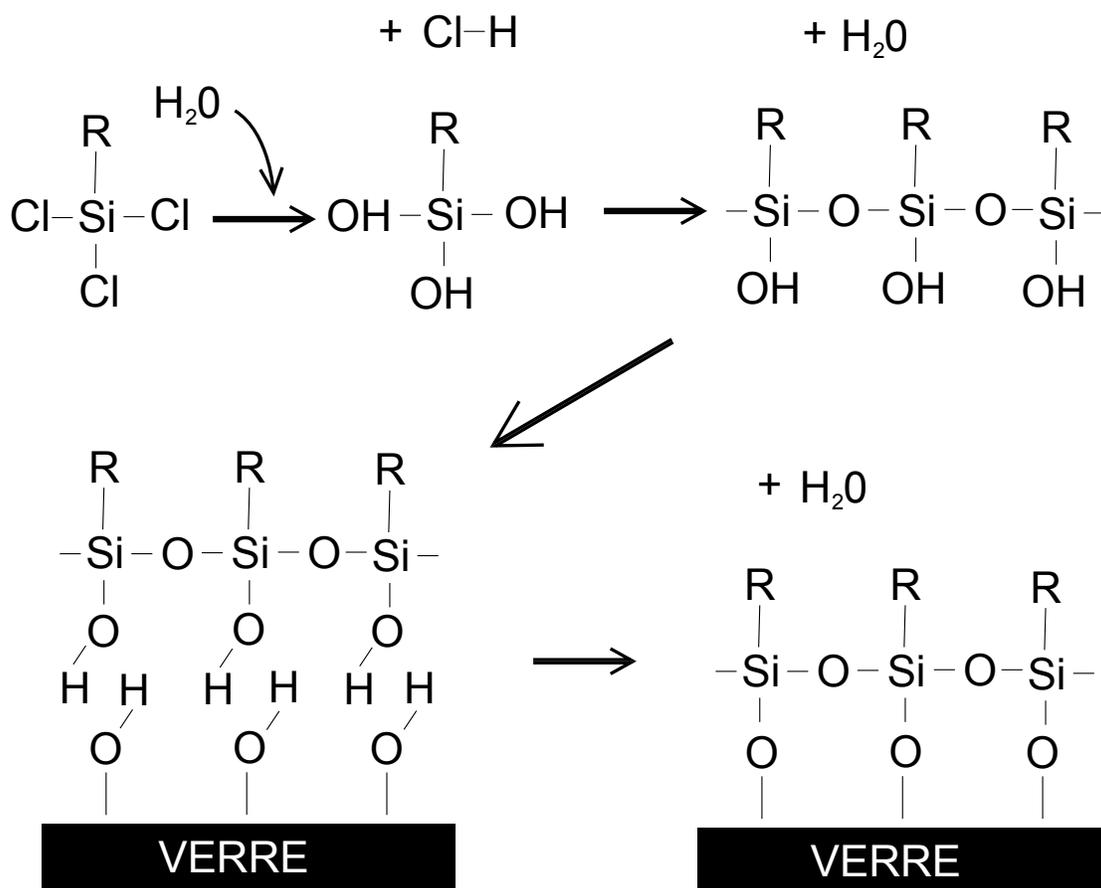


FIGURE 2.5: Les molécules de silanes vont réagir tout d'abord avec l'eau environnante, les groupements hydroxide (OH) remplacent les atomes de chlore, c'est l'hydrolyse. Les groupes OH vont ensuite se recombiner en eau permettant aux atomes de silicium d'être liés par des atomes d'oxygène, c'est la condensation. Des liaisons fortes se créent entre les oligomères et la surface via les atomes d'hydrogène.

Dans les conditions optimales de réaction (Sagiv, 1980; Wasserman *et al.*, 1989), les couches ainsi formées peuvent être cristallines, limitées à une monocouche et très hydrophobes. Cela dépend

essentiellement des vitesses d'oligomérisation en solution et de couplage à la surface qui sont toutes deux contrôlées par la quantité d'eau en solution et adsorbée sur la surface.

Dans nos conditions de réaction, la quantité d'eau est mal contrôlée et le plus souvent les oligomères ne se lient pas tous à la surface et forment des couches désordonnées. Cette rugosité diminue l'hydrophobicité globale de la surface. Cela ne s'avère pas contraignant dans notre cas, puisque l'ODTS, sous forme de monocouche, devient trop hydrophobe pour la résine qui n'adhère pas. Nous avons également testé d'autres silanes moins réactifs permettant un meilleur contrôle structural des couches selon des protocoles trouvés dans la littérature (Sagiv, 1980; Wasserman *et al.*, 1989). Cependant, les surfaces se sont révélées trop hydrophobes pour la résine photosensible qui n'adhérerait plus. L'ODTS s'est révélé être le seul compromis entre l'adhésion de la résine et l'immobilisation des protéines.

Pour obtenir des couches de qualité reproductibles, des précautions doivent être prises. Il faut tout d'abord utiliser des lamelles de verres propres, dont la surface a été nettoyée par plasma afin d'obtenir une densité de groupe hydroxyde maximum en surface. Cela permet un couplage dense. L'eau s'avère être un élément important dans la réaction, mais perturbateur si elle est présente en trop grande quantité. Trop d'eau en solution va faire interagir les molécules de silanes entre elles formant alors des micelles qui diminue la capacité des couches à adsorber les protéines. La réaction doit être effectuée en prenant toutes les précautions lors de l'utilisation de la verrerie, souvent nettoyée à l'eau déionisée et séchée. L'eau présente dans l'air et adsorbée à la surface du verre étant suffisante à la réaction.

### Caractérisations

Pour vérifier les qualités de la couche de silane, nous avons mesuré l'angle de contact formé par des gouttes de différents liquides. Cela permet d'en déduire la tension de surface du substrat silanisé en utilisant la méthode de Zisman.

Dupré a défini le travail de cohésion  $W_{ll}$  comme étant le travail, par unité de surface produite, nécessaire pour séparer un liquide homogène de tension de surface  $\gamma_l$ . Au cours de cette séparation, deux nouvelles surfaces individuelles, mais d'aire identique, sont créées, ainsi :

$$W_{ll} = 2\gamma_l \quad (2.1)$$

### 2.3. Caractérisations des supports micro-structurés

Le travail d'adhésion  $W_{sl}^{\ddagger}$ , nécessaire à la formation de l'interface liquide-solide dans le cas d'une goutte de liquide déposé sur un solide de tension de surface  $\gamma_s$ , est également défini par Dupré comme :

$$W_{sl} = \gamma_s + \gamma_l - \gamma_{sl} \quad (2.2)$$

où  $\gamma_{sl}$  est la tension interfaciale solide-liquide. Lorsque le travail de cohésion  $W_{ll}$  est inférieur au travail d'adhésion  $W_{sl}$ , le liquide mouille complètement la surface. Autrement dit, deux cas de figure se présentent :

$$\begin{aligned} W_{sl} > W_{ll} & \text{ --> } \textit{mouillage total} \\ W_{sl} < W_{ll} & \text{ --> } \textit{mouillage partiel} \end{aligned}$$

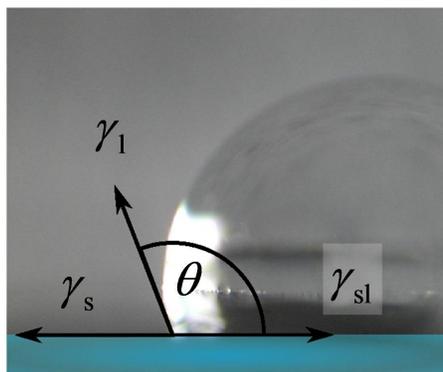


FIGURE 2.6: Schéma représentant la situation d'équilibre d'une goutte de liquide déposée sur un solide, décrit par Young.

La Figure 2.6 schématise la formation d'un angle de contact, dans le cas d'un mouillage partiel, d'après la description de Young. Ce dernier propose une équation décrivant l'équilibre ainsi formé au point sur la ligne triphasique :

$$\gamma_l \cos \theta - \gamma_s + \gamma_{sl} = 0 \quad (2.3)$$

Le travail d'adhésion (2.2) peut être simplifié grâce à l'équation d'Young (2.3) :

$$W_{sl} = \gamma_l (\cos \theta + 1) \quad (2.4)$$

Le travail de cohésion (2.1) est donc égale au travail d'adhésion (2.4) lorsque  $\cos \theta = 1$ , soit lorsque l'angle de contact est nul.

Dans la méthode de Zisman, la tension de surface d'un solide est déterminé en utilisant la

---

‡. Toujours par unité de surface produite.

tension de surface critique du liquide. Cette méthode consiste à mesurer l'angle de contact  $\theta$  pour différents liquides, puis extrapoler la courbe  $\cos\theta = f(\gamma_l)$  jusqu'à  $\cos\theta = 1$ . La valeur de la tension de surface correspondante  $\gamma_c$  est assimilée à  $\gamma_s$ .

$\gamma_l$ ( $mJ/m^2$ )	Eau : 72,8		Formamide : 58		Ethyl. Glyc. : 48	
	moy	dev	moy	dev	moy	dev
22/03/06	98,6 °	6,8 °	76,1 °	8,2 °	59,9 °	6,6 °
04/04/06	108,8 °	4,6 °	83,5 °	3,6 °	68,3 °	5,7 °

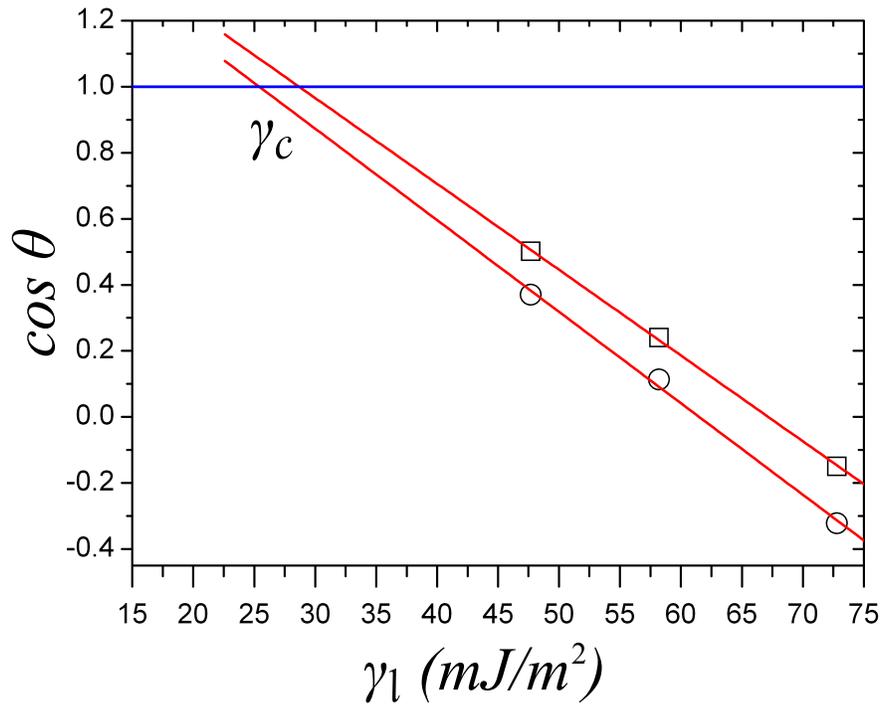


FIGURE 2.7: Tableau des angles de contact moyens mesurés avec leurs déviations standards respectives. Graphique de Zisman pour les mesures du tableau.

Dans notre cas, cette méthode nous a permis d'obtenir des informations importantes sur la qualité de nos substrats. La Figure 2.7 contient les angles de contact pour différents liquides pour deux échantillons testés ainsi que les courbes  $\cos\theta = f(\gamma_l)$  correspondantes. La régression linéaire effectuée pour chaque groupe de mesures donne des tensions de surface des couches d'ODTS entre 25 et 28  $mJ/m^2$ . Ces valeurs sont proches de celles trouver dans la littérature pour une monocouche idéale d'ODTS sur du silicium : 20,7  $mJ/m^2$  (Kulkarni *et al.*, 2005).

## 2.3. Caractérisations des supports micro-structurés

### 2.3.2 Le dépôt des protéines adhésives

Nous détaillons dans cette partie pourquoi nous avons immobilisé des fragments de fibronectine plutôt que la protéine entière et les caractérisations réalisées sur les couches ainsi formées.

#### Choix de la molécule adhésive

Le principe d'immobilisation est lié à l'attractivité des domaines hydrophobes des protéines pour une surface hydrophobe. Les récepteurs membranaires du modèle cellulaire utilisé pendant ces travaux sont essentiellement les intégrines  $\alpha_5\beta_1$  qui reconnaissent la fibronectine. Les premiers essais d'immobilisation de fibronectine entière ont montré qu'il était difficile d'obtenir une monocouche de protéines. Cela, en plus de rendre difficile l'évaluation exacte du nombre de récepteurs immobilisés à la surface, ne facilitait pas la structuration des motifs (Figure 2.8 **A**). Lors du lift-off, la couche de protéine restait attachée aux plots adhésifs, formant des draps.

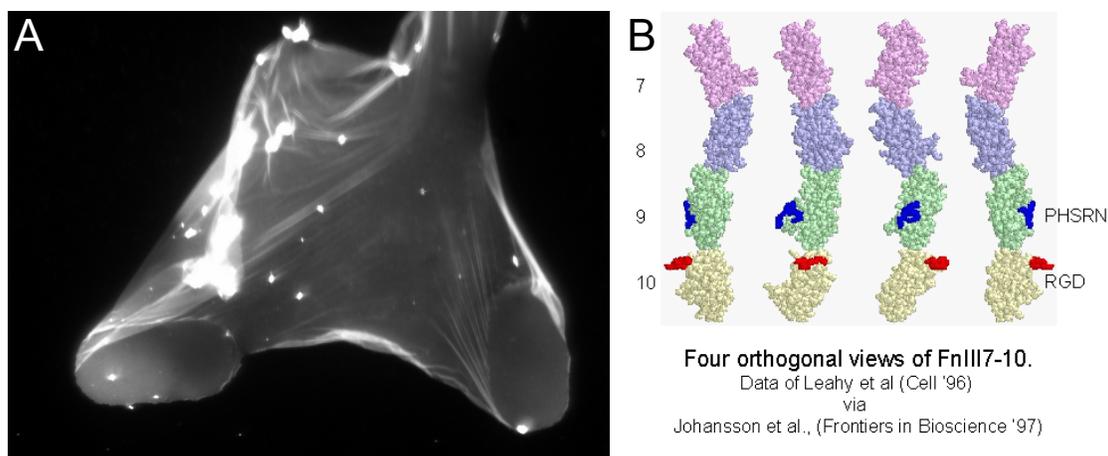


FIGURE 2.8: **A** : Image en fluorescence de fibronectine entière immobilisée. Un surplus de fibronectine est visible sous forme de pont entre les plots malgré la suppression de la résine non insolée, révélant la forte interaction entre les protéines. **B** : Vue tridimensionnelle du fragment de fibronectine 7-10 (Fn710). Les sites nécessaires au bon déroulement de la création des adhésions focales sont notés RGD et PHSRN. Le site fibronectine-fibronectine est absent du fragment et empêche les interactions entre eux.

En effet, les protéines de fibronectine entière interagissent entre elles, réduisant l'efficacité de l'adsorption en couche auto-limitée. Pour supprimer cet effet, nous avons utilisé un fragment de la protéine (noté Fn710 dans la suite) comportant le site de liaison aux intégrines de la cellule : site RGD sur la Figure 2.8 **B** ainsi que le site d'activation des intégrines : le domaine de synergie PHSRN mais où le site d'interaction spécifique fibronectine-fibronectine a été enlevé. La conservation des

sites spécifiques permet à la cellule de se lier avec les fragments comme avec la protéine entière et de déclencher les régulations biochimiques ad-hoc à l'adhésion. Ces fragments présentent également une forte affinité avec les surfaces hydrophobes, facilitant l'adsorption et la création de couche auto-organisée.

### Homogénéité de la couche

L'objectif de cette partie est de vérifier que la densité de la couche de protéines immobilisées est bien contrôlée, c'est un point essentiel de cette méthode. Des caractérisations du dépôt de protéines adhésives ont d'abord été effectuées de manière grossière par fluorescence en utilisant des protéines marquées; puis, de manière plus précise et quantitative à l'aide d'une balance à quartz ainsi que d'un AFM (Microscope à Force Atomique). Enfin, nous verrons que la couche immobilisée est bien compacte et homogène.

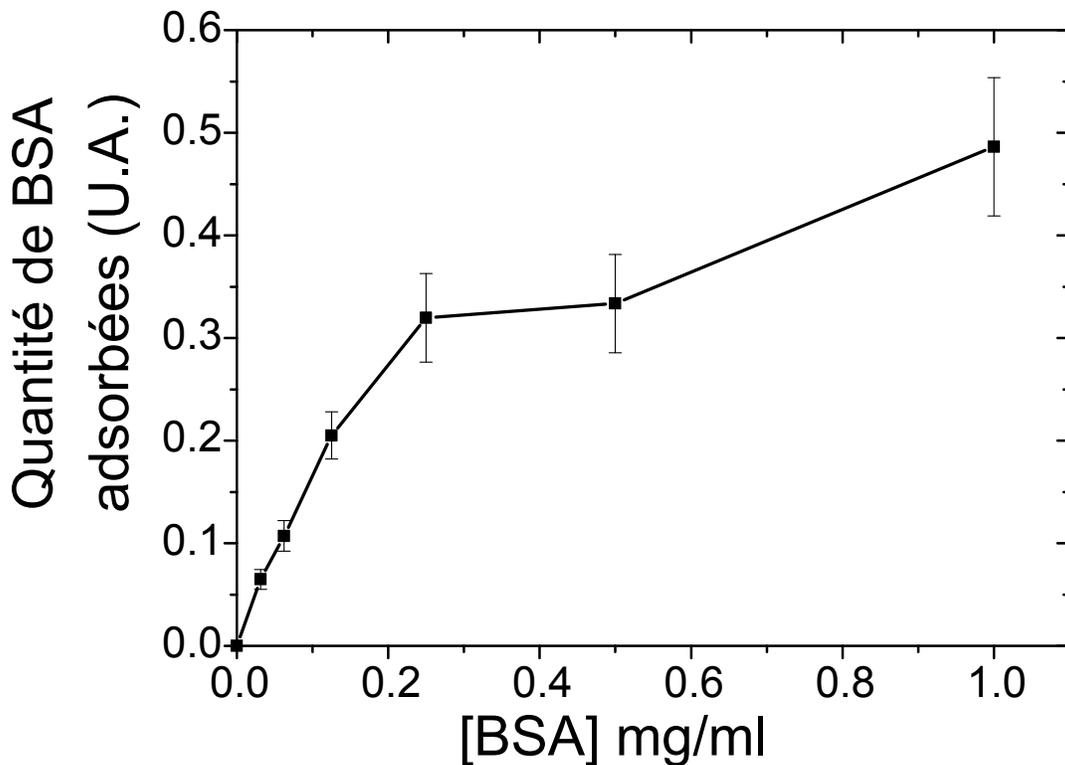


FIGURE 2.9: Isotherme d'adsorption de BSA sur un substrat silanisé (ODTS). Pour différentes concentrations initiales de protéines, la quantité de BSA adsorbée est mesurée par fluorescence.

Des isothermes d'adsorption ont été effectuées avec de la BSA (Bovine Serum Albumine). La Figure 2.9 présente une isotherme après une heure d'immobilisation sur une couche d'ODTS. Il ap-

### 2.3. Caractérisations des supports micro-structurés

paraît que pour des concentrations supérieures à 0,3 mg/ml, la quantité de protéines immobilisées se stabilise. Cela suggère que l'adsorption sur une surface hydrophobe est auto-limitée.

Pour vérifier que nous sommes en présence d'une monocouche compacte, nous avons réalisé avec le fragment Fn710, une cinétique d'adsorption pour une concentration initiale supérieure à la saturation. Ces mesures ont été effectuées en collaboration avec P. Labbé du Département de Chimie Moléculaire de l'Université de Grenoble. Le principe de la micro-balance à quartz est de mesurer la fréquence de résonance d'un cristal. Cette fréquence évolue en fonction de la masse immobilisée en surface. Il est possible, à partir de cette mesure, d'obtenir la densité de protéines adsorbées en fonction du temps. La Figure 2.10 présente ces résultats.

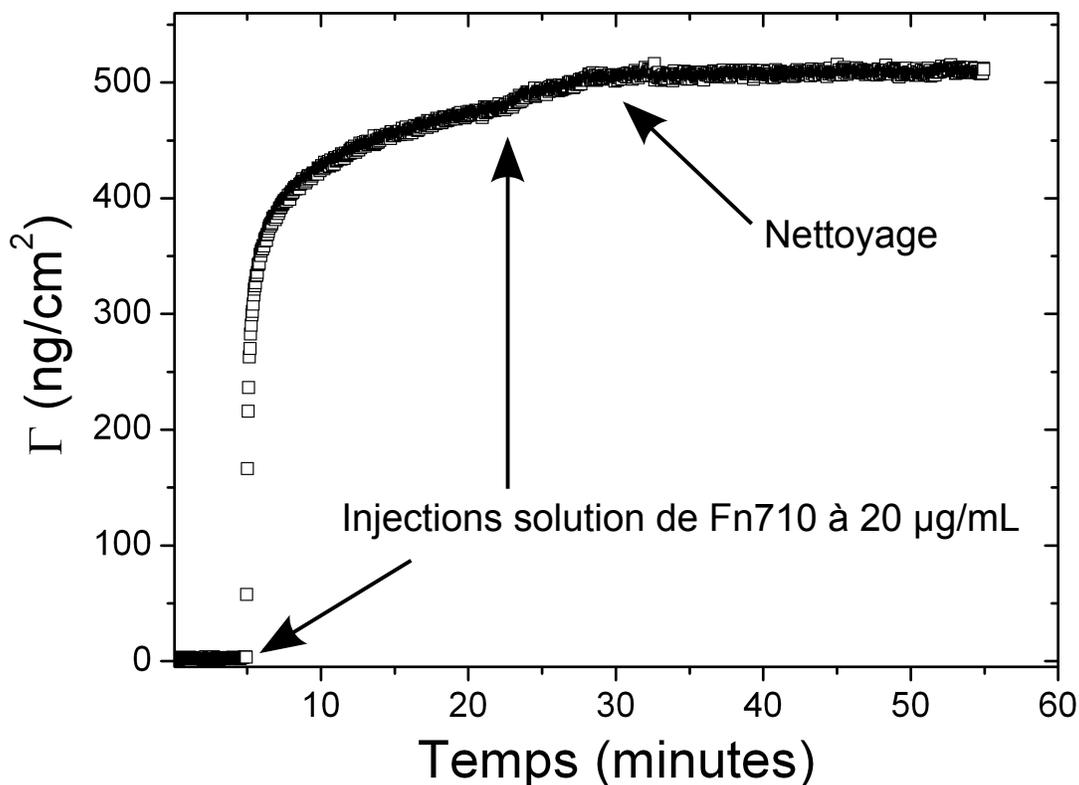


FIGURE 2.10: Mesure de la densité de Fn710 adsorbés sur un substrat silanisé d'ODTS à l'aide d'une balance à quartz. Les molécules immobilisées sur le quartz fonctionnalisés changent la fréquence de résonance, permettant de déterminer avec précision la densité de protéines adsorbées dans le temps.

Une première injection de solution contenant des fragments Fn710 d'une concentration de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  est ajoutée cinq minutes après le début de la mesure. Après une rapide augmentation de la densité de protéines sur la surface du quartz, la vitesse d'adsorption diminue. Un ajout

supplémentaire de solution de Fn710 ne change pas le phénomène, la densité étant stable au bout d'une demi-heure de réaction. Cela permet de vérifier que la diminution de la vitesse d'adsorption ne dépend pas d'un appauvrissement de protéines et que les protéines sont immobilisées de manière irréversible puisque leur densité reste constante après avoir rincé l'échantillon avec le tampon. Cette mesure permet de confirmer le fait que la formation de la couche est auto-limitée, irréversible et d'obtenir une valeur quantitative de la densité de protéines immobilisées en surface.

Nous avons utilisé un AFM pour mesurer l'épaisseur de cette couche (Figure 2.11 **A**). L'AFM permet de mesurer les différentes forces d'interaction entre une pointe atomique fixée à l'extrémité d'un bras de levier élastique et une surface (forces de répulsion ionique, forces de van der Waals, forces électrostatiques, forces de friction, forces magnétiques...). La déflexion du cantilever est suivie en positionnant un faisceau laser sur la face supérieure du cantilever. Grâce à une électronique de régulation qui maintient la force constante, il est possible de mesurer la topographie de la surface à l'échelle du nm.

Un de nos motif de protéines a été imagé avec cette technique. La hauteur du plot mesurée correspond à l'épaisseur de la couche de protéines adsorbées qui est de 4 nm comme le montre la Figure 2.11 **B**.

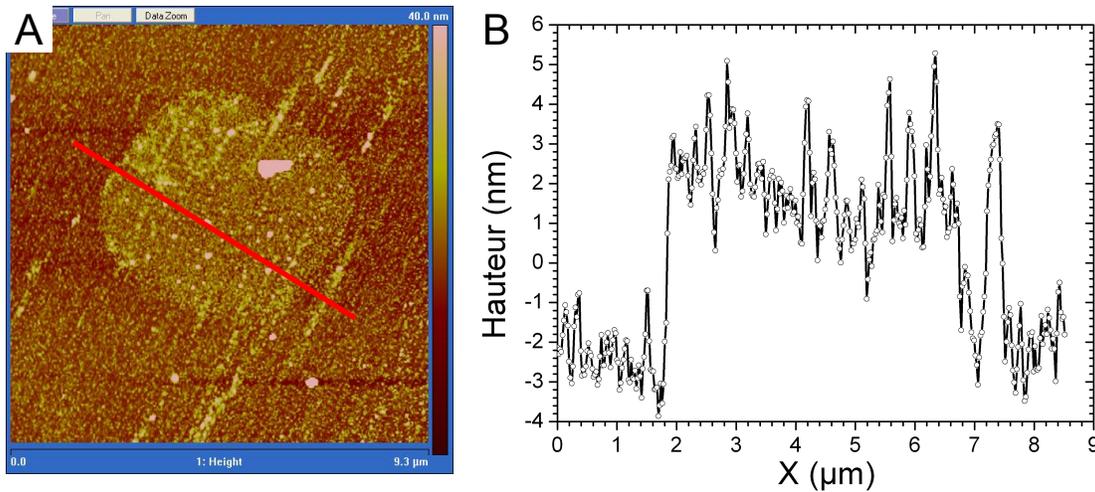


FIGURE 2.11: **A** : Image topographique d'un plot carré de  $5 \mu\text{m}$  de largeur après dépôt de Fn710 et suppression de la résine restant obtenue par AFM. **B** : Mesure de la hauteur du plots adhésif par AFM (ligne rouge sur **A**). Mesures effectuées en collaboration avec E. Richard et V. Bouchiat de l'Institut Néel.

Cela nous permet d'en déduire la compacité des couches puisque nous connaissons leur densité surfacique grâce aux mesures de micro-balance à quartz. Nous supposons que les fragments Fn710

### 2.3. Caractérisations des supports micro-structurés

---

sont des sphères. La faible épaisseur suggère que les fragments sont organisés en monocouche. En partant de cette hypothèse, leur diamètre est de 4 nm. La section d'un fragment est de :

$$s_{fn710} = \pi \frac{d^2}{4} = 12,6 \cdot 10^{-18} \text{ m}^2 \quad (2.5)$$

La masse d'un fragment peut être calculée à partir de sa masse molaire :  $32 \cdot 10^3$  g/mole et du nombre d'Avogadro  $N_A = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ mole}^{-1}$  telle que :

$$m_{fn710} = \frac{M_{molaire}}{N_A} = 5,4 \cdot 10^{-20} \text{ g} \quad (2.6)$$

La densité de fragments est donc de :

$$\begin{aligned} d_{fn710} &= \frac{m_{fn710}}{s_{fn710}} \\ &= 0,5 \cdot 10^{-2} \text{ g/m}^2 \\ \text{soit} &= 500 \text{ ng/cm}^2 \end{aligned} \quad (2.7)$$

La densité calculée dans l'équation (2.7) est identique à celle trouvée à l'aide de la balance à quartz. Cela montre bien que c'est une monocouche compacte et donc homogène.

Notre objectif d'obtenir des couches de densité contrôlée est atteint.

#### 2.3.3 La blocage de la surface

Nous avons commencé par imiter les biologistes qui utilisaient la BSA pour bloquer les surfaces. Cette protéine est efficace lorsque les temps d'expériences sont courts (inférieurs à 4 heures). Au delà, les cellules digèrent cette protéine laissant disponible la surface pour les protéines du milieu environnant ou qu'elles synthétisent. Des molécules à base de PEG ont souvent été utilisées comme anti-adhésifs. Comme des silanes couplés avec des PEG ne sont pas disponibles commercialement, nous nous sommes tournés vers le Pluronic, un produit utilisé pour bloquer l'adhésion de cellules (Liu *et al.*, 2002). Les domaines centraux hydrophobes de cette molécule font que son adsorption sur la surface de silane suit les mêmes principes que les protéines.

### Principe anti-adhésif du Pluronic

Une première théorie considérait une conformation des groupements PEO formant une sorte de brosse empêchant l'adsorption de protéines par une répulsion stérique. Cette vision a été remise en cause par une étude rigoureuse de la capacité à empêcher l'adsorption de protéines par le Pluronic (McPherson *et al.*, 1998). En faible concentration de l'anti-adhésif, les groupements PEO vont eux-aussi être attirés par la surface hydrophobe et créer une barrière d'énergie prévenant toute nouvelle adsorption. Une forte concentration de Pluronic stimulant la configuration en brosse n'est donc pas nécessaire pour obtenir une non adhésivité efficace. De plus, le domaine central hydrophobe du Pluronic va préférentiellement s'immobiliser sur la surface hydrophobe et compléter le motif de protéines déjà immobilisées.

### Durabilité de la couche

Nous avons caractérisé la capacité du substrat à maintenir la contrainte adhésive sur plusieurs jours. Pour cela, nous avons préparé des supports recouverts de BSA, de fragments Fn710 ou de Pluronic. La même quantité de cellules a étéensemencée sur chaque substrat et leur prolifération a été mesurée en dénombrant les cellules adhésives en fonction du temps. Les résultats sont représentés sur la Figure 2.12.

Le caractère anti-adhésif du Pluronic est maintenu au delà de trois jours contrairement à la prolifération sur la BSA identique à celle sur les fragments Fn710. Cela fonctionne également sur un support structuré, à contraste adhésif, pour lequel la contrainte est également maintenue plus de trois jours (photos en insert de la Figure 2.12).

Il apparaît donc que pour des expériences ne dépassant pas les 75 heures, les cellules ne réussissent pas à adhérer sur le Pluronic. Après cette période, les cellules présentes dans le champ d'observation arrivent à se développer. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Par exemple, le Pluronic a pu se détacher de la couche silanisée sous l'influence de processus cellulaires invasifs, laissant cette dernière découverte. Les cellules ont ensuite synthétisé de la matrice qui s'est fixée sur le silane. Il est également possible que le Pluronic se dégrade au bout d'un certain temps ce qui altérerait ses propriétés anti-adhésives.

Nous nous intéressons dans ce travail à des temps d'adhérence dépassant rarement la journée. Nous considérerons donc que le Pluronic maintient efficacement les contraintes adhésives du support micro-structuré.

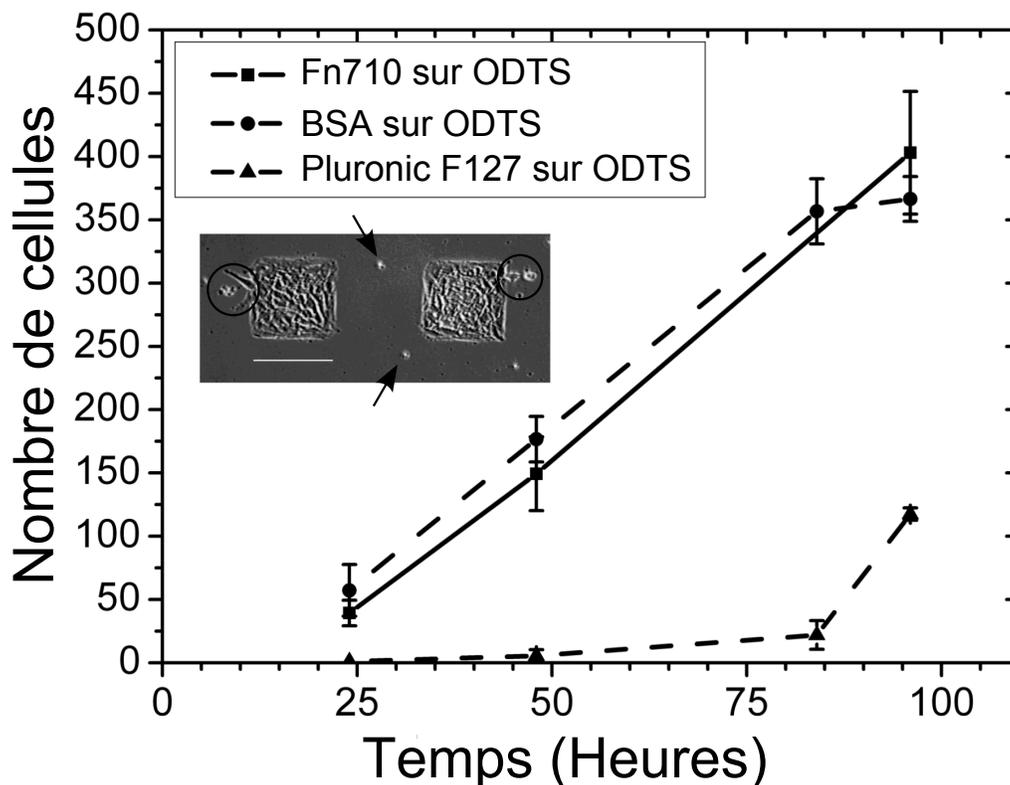


FIGURE 2.12: Evolution du nombre de cellules dans un champ d'observation sur un substrat recouvert de BSA, de fragments Fn710 et de Pluronic. Les photos en contraste de phase en insert présentent des cellules en adhérences au bout de trois jours d'ensemencement sur des plots de Fn710 où le reste de la surface a été bloqué avec du Pluronic. Les groupes de cellules (cercles noirs) ou les cellules uniques (flèches noires) n'adhèrent pas sur la surface anti-adhésive. Barre :  $100\mu\text{m}$

## 2.4 Conclusion

Les nombreux procédés de microfabrication abordés dans la partie *État de l'art* présentent tous des avantages et des inconvénients. Dans notre cas, l'accès à une salle blanche avec du matériel de microélectronique rend la technique de lithographie UV très attractive. Sa bonne résolution proche du micron, ainsi que la possibilité d'obtenir une grande quantité de substrats identiques, représentent également des avantages intéressants.

Un résultat typique de la méthode de fabrication utilisée est représenté sur la Figure 2.13. Des anti-corps primaires ont été immobilisés sur la surface puis couplés avec des anti-corps secondaires fluorescents. Cela montre que différentes protéines peuvent être immobilisées et que la fonctionnalité des protéines immobilisées est conservée.

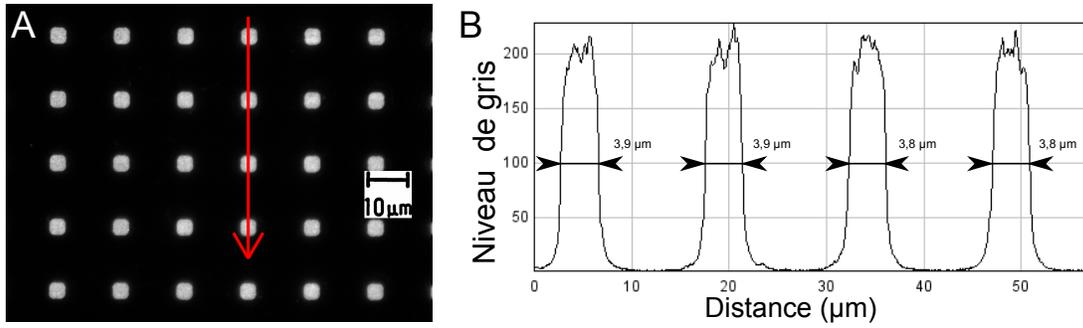


FIGURE 2.13: **A** : Image en fluorescence d'un support micro-structuré constitué de plots adhésifs de largeur  $4 \mu\text{m}$  recouverts d'anti-corps couplés à des fluorophores séparés par une surface anti-adhésive de Pluronic. **B** : Mesure du profil d'intensité selon la flèche sur l'image. La mesure de la taille des plots :  $3,85 \pm 0,05 \mu\text{m}$ , à partir du profil d'intensité montre la qualité en résolution de la technique de fabrication. L'utilisation d'anti-corps démontre la capacité d'utiliser divers ligands pour les zones adhésives.

En résumé, notre méthode de fabrication peut se décrire comme une succession de 4 étapes :

- une couche de silane hydrophobe est couplée sur le substrat en verre
- une structuration est réalisée par lithographie optique en exposant aux UV le substrat à travers un masque puis en retirant la résine insolée
- les protéines adhésives sont directement immobilisées sur le silane mis à jour
- le reste de la résine est dissoute et des complexes anti-adhésifs sont alors adsorbés sur le reste de la surface silanisée

La couche de protéines immobilisées est compacte et homogène. La surface anti-adhésive est effective pendant plusieurs dizaines d'heures et maintient un bon contraste adhésif. Elle n'est également pas altérée par des processus cellulaires. Enfin, les supports s'avèrent de bonne qualité en terme de résolution et de reproductibilité, principaux objectifs énoncés.

# Chapitre 3

## *Du désordre vers l'ordre*

"DU POINT DE VUE DE L'HOMME, L'ORDRE EST NÉ DU DÉSORDRE."

Pierre Lecomte du Noüy (1843 - 1947)

Mathématicien, biophysicien, écrivain et philosophe français



## Chapitre 3

# Du désordre vers l'ordre

Les précédents chapitres ont permis de découvrir certains des outils et notions nécessaires à l'étude de systèmes vivants. La méthode du physicien est d'imposer une perturbation au système et d'en étudier la réponse. L'objectif initial des expériences réalisées dans cette partie était de quantifier l'effet de la densité de ligands sur l'adhésion cellulaire. Cette approche se justifie par les considérations de Bell d'une influence de la densité de récepteurs engagés par la cellule sur son énergie interne.

Pour cela, des motifs de protéines en réseau carré de pas différents ont été réalisés. La distance entre chaque plot définit la densité moyenne. Ainsi, grâce à la micro-fabrication, nous allons étudier l'effet de la densité de surface adhésive sur l'adhésion d'une cellule. Nous avons en effet observé une influence très importante de la densité sur la surface des cellules. Nous allons détailler dans cette partie les analyses développées pour étudier cette influence.

Nos résultats expérimentaux montrent que l'aire des cellules adhérentes sur de tels substrats micro-structurés est bien plus petite que la moyenne des cellules sur un support homogène. Ce résultat en soi ne paraît pas surprenant du fait de la diminution de la densité de protéines adhésives sur ces motifs même s'il s'avère, comme nous le démontrerons dans la suite, que la variation de la densité n'est pas le facteur déterminant de ce comportement.

Un résultat plus spectaculaire nous a mobilisés : l'adhésion sur un support micro-structuré est associé à une auto-organisation remarquable du cytosquelette d'actine. Nous avons développé une méthode pour classifier les morphologies adoptées par les cellules, suggérant que l'auto-organisation des cellules est pilotée par des lois physiques favorisant certaines organisations plutôt que d'autres. Nos études statistiques montrent qu'il existe des formes plus utilisées que d'autres.



---

## Sommaire

---

3.1	Introduction . . . . .	<b>77</b>
3.1.1	Le réseau carré . . . . .	77
3.1.2	Matériel et Méthodes expérimentales . . . . .	78
3.2	Influence de la densité de la matrice sur l'adhésion . . . . .	<b>79</b>
3.2.1	Évolution de l'aire moyenne . . . . .	80
3.2.2	La densité de protéines peut-elle limiter l'adhésion? . . . . .	83
3.2.3	Le développement de la contractilité sur un support structuré . . . . .	84
3.3	Classification des formes . . . . .	<b>85</b>
3.3.1	Le diagramme compacité/aire . . . . .	85
3.3.2	L'ordre naît du désordre . . . . .	87
3.4	Conclusion . . . . .	<b>98</b>

---



### 3.1 Introduction

Après une description succincte des caractéristiques des supports micro-structurés utilisés dans cette partie, nous aborderons les conditions expérimentales ainsi que les méthodes de mesures des données morphologiques. Nous considérerons qu'une cellule est adhérente lorsque des adhérences focales sont formées et que la contractilité actine-myosine est activée, c'est à dire que des fibres de stress relient les adhérences focales entre elles et apparaissent tendues.

#### 3.1.1 Le réseau carré

Les motifs utilisés comprennent neuf zones adhésives différentes. Chaque zone est un carré de 4,5 mm de côté. Une zone correspond à une surface homogène de Fn710 qui servira de contrôle. Les huit autres zones sont des réseaux et comportent des champs de plots adhésifs de forme carrée de 4  $\mu\text{m}$  de côté. La distance entre les plots adhésifs est variable d'un réseau à l'autre, de 4  $\mu\text{m}$  à 18  $\mu\text{m}$  (Figure 3.1).

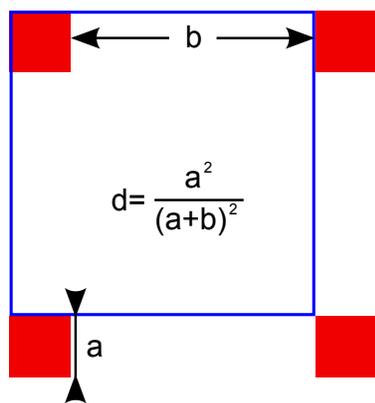


FIGURE 3.1: Schéma de la géométrie des réseaux  $Rb$ . L'aire élémentaire est représentée par le carré bleu, les plots adhésifs sont en rouge.

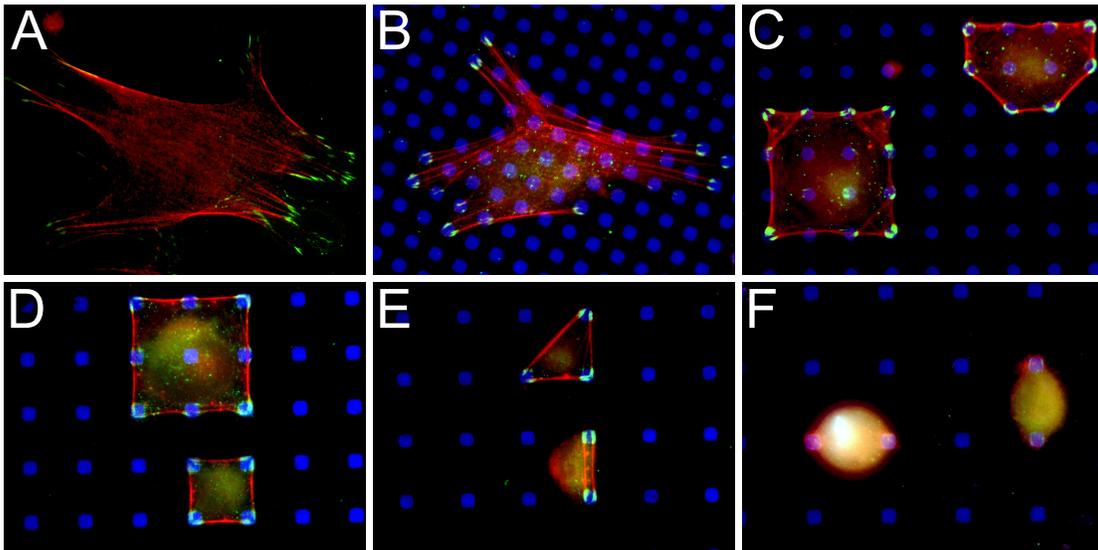
L'aire élémentaire de chaque réseau est définie comme étant l'aire du carré élémentaire de côté  $(a + b)$  où  $b$  est la distance entre les plots et  $a$  la taille d'un plot. Elle est à chaque fois bien inférieure aux tailles caractéristiques des cellules en adhérence sur des substrats adhésifs homogènes. En effet, sur de tels supports, les cellules utilisées atteignent des tailles de l'ordre de  $10^3 \mu\text{m}^2$  qui sont supérieures aux aires élémentaires du support allant de 64 à 484  $\mu\text{m}^2$  (Figure 3.2). La notation pour ces réseaux est la suivante :  $R0$  correspond au réseau homogène adhésif,  $R10$  au réseau de plots carrés distants de 10  $\mu\text{m}$  etc... La densité de surface adhésive pour un réseau donné est définie comme le rapport entre l'aire adhésive et l'aire élémentaire  $A_{Rb}$ . Elle représente le taux de couverture adhésive pour un motif donné qui va donc varier de 3% à 25% pour le plus petit écart entre les plots. La zone de contrôle permet d'obtenir les caractéristiques de la population de cellules en adhérence sur une surface homogène (saturation de protéines).

Réseau	$R0$	$R4$	$R6$	$R8$	$R10$	$R12$	$R14$	$R16$	$R18$
a ( $\mu\text{m}$ )	4								
b ( $\mu\text{m}$ )	0	4	6	8	10	12	14	16	18
$A_{Rb}$ ( $\mu\text{m}^2$ )	$\emptyset$	64	100	144	196	256	324	400	484
$d_{Rb}$ (%)	100	25	16	11	8	6	5	4	3

FIGURE 3.2: Tableau récapitulatif des caractéristiques des réseaux carrés de plots carrés.

### 3.1.2 Matériel et Méthodes expérimentales

Les expériences mises en place dans ce chapitre ont permis de caractériser les morphologies cellulaires en effectuant des mesures sur une grande population de cellules ( $N > 500$  par réseau). Elles consistaient à imager un réseau entier avec des cellules fixées pour un temps d'adhérence déterminé (Figure 3.3). Le cytosquelette d'actine, la vinculine des adhérences focales, ainsi que soit la matrice adhésive, soit le noyau étaient immuno-marqués, ce qui rendait possible leur visualisation par microscopie (voir Annexe A : *Matériel et Méthodes, les autres outils*).


 FIGURE 3.3: A à F : Images en fluorescence de cellules fixées sur respectivement  $R0$ ,  $R4$ ,  $R8$ ,  $R12$ ,  $R14$  et  $R18$  dont l'actine (rouge) et la vinculine (vert) ont été marqués. Le réseau de plots de protéines adhésives (Fn710), de largeur  $4 \mu\text{m}$ , est également visible en bleu.

Pour caractériser la forme des cellules, nous utilisons l'aire, le périmètre et la compacité. Ces données sont obtenues à partir des images de fluorescence de l'actine. Un seuillage est effectué pour supprimer le bruit de fond et transformer les images en niveaux de gris, en images binaires. Malgré les précautions prises durant l'acquisition des images, le niveau de seuillage doit être réglé

### 3.2. Influence de la densité de la matrice sur l'adhésion

---

manuellement car la qualité de l'image peut varier d'une zone à l'autre.

Une combinaison d'opérations binaires est effectuée sur l'image pour améliorer sa qualité. Une érosion puis une dilatation puis une nouvelle érosion sont appliquées successivement à l'image binaire et supprime les pixels isolés. Ce processus gomme le bruit de l'interface entre les objets. Les cellules touchant le bord de l'image sont supprimées car elles ne sont pas considérées dans leur intégralité. Deux cellules en contact sur l'image ne seront pas sélectionnées puisque le réseau n'est plus la seule contrainte adhésive. Une méthode de remplissage des trous dans les objets est ensuite mise en place. Toutes ces opérations sont effectuées grâce à la bibliothèque Labview/Imaq Vision (National Instruments) et sont effectuées parallèlement au choix de la valeur de seuil, ce qui rend ces opérations semi-automatiques.

### 3.2 Influence de la densité de la matrice sur l'adhésion

Nous avons procédé à une série d'expériences (Figure 3.4) menées en parallèle avec deux lignées différentes de fibroblastes pour étudier l'effet de la densité de protéines adhésives. La première est une souche de fibroblastes de type 3T3 de l'ATCC (pour American Type Culture Collection). C'est un modèle cellulaire de référence de type fibroblastique pour la biologie. La seconde est une souche de fibroblaste 3T3 utilisée depuis longtemps au laboratoire Dysad (anciennement Ledac) avec qui nous avons collaboré. Cette souche a probablement dérivé au cours des années, ces cellules ont gardé leur caractère fibroblastique et sont très contractiles. Les fixations ont été effectuées après trois temps d'adhérence différents : 2, 4 et 6 heures. Cela permet de caractériser l'évolution morphologique d'une grande population de cellules sur les supports structurés en fonction du temps d'adhérence.

Lignée	Type d'expérience	Temps d'adhérence	Nombre de cellules
ATCC	fixées	2h	9 122
		4h	5 690
		6h	9 612
Ledac	fixées	2h	6 861
		4h	5 835
		6h	7 025

FIGURE 3.4: Tableau récapitulatif des expériences relatives à ce chapitre.

### 3.2.1 Évolution de l'aire moyenne

Nous allons vérifier que les supports sont bien fonctionnels et que les cellules adhérentes ont déclenché leur régulation biochimique. Cela confirmera que la matrice immobilisée à la surface est active et reconnue spécifiquement par les intégrines. Nous allons ensuite étudier l'effet de la séparation des plots sur l'aire moyenne des cellules.

Les images de la Figure 3.3 montrent des fibres de stress bien marquées et des adhérences focales uniquement sur les plots. Cela est la preuve que les supports sont fonctionnels et que la contrainte adhésive est effective. Les fibres de stress tendues confirment l'activation de la signalisation par l'intermédiaire de Rho. De plus, des images obtenues sur d'autres types cellulaires moins contractiles (Figure 3.5), montrent que les émissions des protrusions membranaires sont visibles et localisées dans les coins, ce qui a déjà été observé (Parker *et al.*, 2002). Ceci est révélateur du bon fonctionnement des régulations croisées Rac et Cdc42.

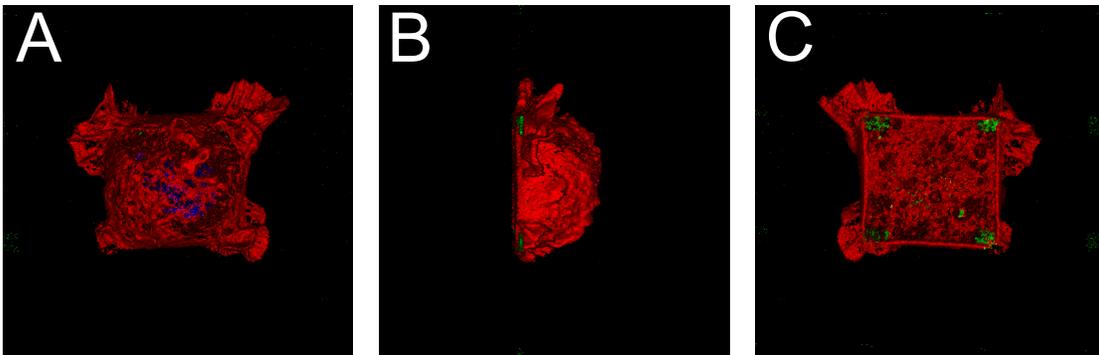


FIGURE 3.5: Reconstruction 3D d'une cellule en adhérence sur 4 plots adhésifs (en vert) où l'actine est marquée en rouge et le noyau en bleu. Les protrusions membranaires dans les coins et les fibres de stress reliant les adhérences focales sont caractéristiques de l'adhésion cellulaire sur ce type de réseau. **A** : Vue de dessus, **B** : Vue de côté et **C** : Vue de dessous. Avec la permission de E. Planus.

Les images de cellules présentées dans la Figure 3.3 montrent des cellules en adhérence sur des réseaux où la distance entre les plots est de plus en plus grande. On remarque que pour des morphologies n'utilisant que deux plots adhésifs (Figure 3.3 **E** & **F**), l'organisation interne de la cellule est la même que pour des formes plus complexes :

- les fibres de stress relient les plots se trouvant dans les coins
- très peu de fibres (ou aucune) se trouvent à l'intérieur
- les adhérences focales aux extrémités des fibres de stress sont préférentiellement au bord des plots adhésifs
- les fibres de stress sont courbées, révélant une tension interne à la cellule

### 3.2. Influence de la densité de la matrice sur l'adhésion

On remarque l'extraordinaire simplification de l'organisation du cytosquelette et des sites adhésifs des cellules. Nous discuterons dans une autre partie de l'aspect statistique de cette simplification.

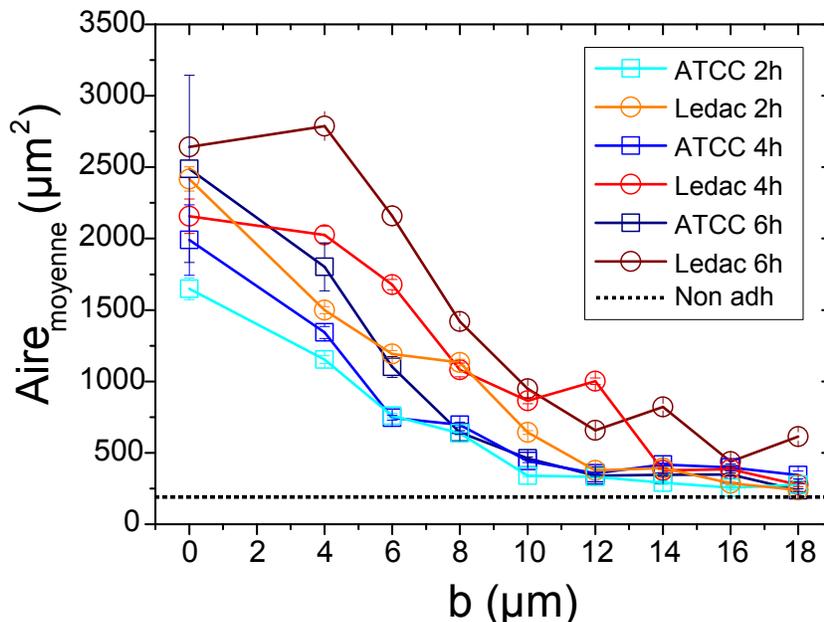


FIGURE 3.6: Graphique représentant l'aire moyenne des cellules en fonction de la distance inter-plots (du réseau). Le cas des cellules en suspension correspond à la droite en pointillé (noir).

Pour chaque réseau ( $R_0, R_4 \dots$ ), l'aire de toutes les cellules adhérentes est mesurée. Les moyennes obtenues sont représentées sur la Figure 3.6 en fonction de la distance  $b$  entre les plots, pour chaque type cellulaire et temps d'adhésion. De manière générale, dès qu'une distance finie sépare les zones adhésives, l'aire moyenne décroît. Nous avons vérifié que les caractéristiques morphologiques des populations en suspension étaient bien définies.

Pour cela, nous avons mesuré l'aire projetée moyenne de cellules déposées sur un substrat non adhésif. La distribution obtenue, représentée sur la Figure 3.7, est gaussienne de valeur moyenne :  $186 \pm 51 \mu\text{m}^2$ . Dans le cas des grandes distances entre les plots, l'aire moyenne des cellules est au moins deux fois supérieure à l'aire des cellules non adhésives. Cela met en évidence que, bien qu'extrêmement contraintes par le réseau, les cellules sont adhérentes sur au moins deux plots.

Nous remarquons que la dispersion d'aire des cellules adhérentes sur le support homogène est bien plus importante et ne peut pas être décrite par une gaussienne. La courbe correspondante au réseau  $R_{10}$  montre que cette dispersion est réduite par rapport au contrôle. Deux maximum sont visibles, suggérant qu'il existe des regroupements de morphologie. Nous analyserons cette caractéristique dans la prochaine section.

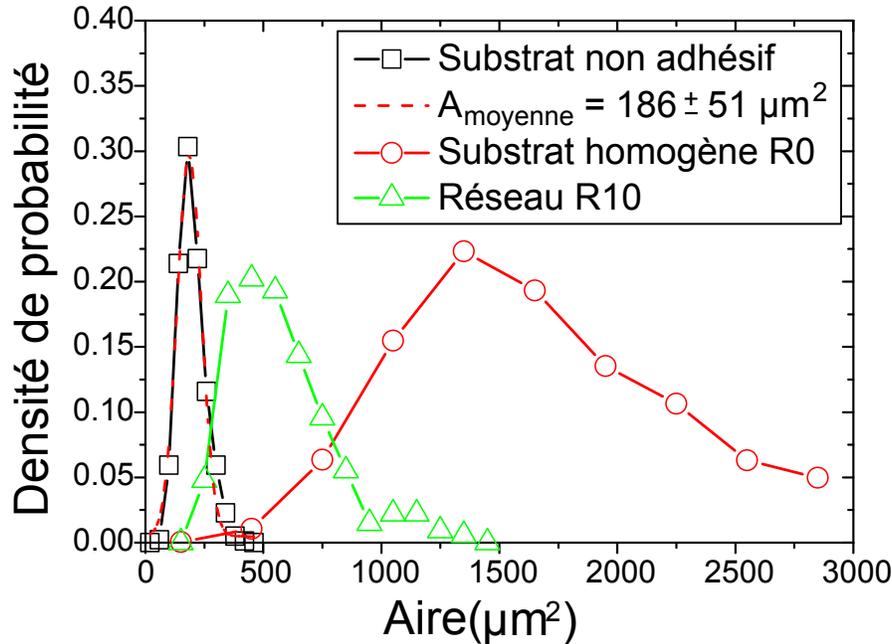


FIGURE 3.7: Graphique représentant les distributions d'aires pour une population de cellules sur un substrat anti-adhésif (noir), homogène (rouge) et  $R10$  (vert). La distribution d'aire des cellules non adhésives a été ajustée par une gaussienne (rouge en pointillé).

A première vue, le temps d'adhérence semble augmenter les surfaces moyennes pour les plus petites distances de séparation ( $R4$  et  $R6$ ). Nous pouvons donc penser que le processus d'adhérence est ralenti en présence d'une séparation entre les points d'ancrages. Puisque la densité de matrice diminue lorsque nous augmentons la distance entre les plots, une première hypothèse serait d'invoquer une modification de la régulation de l'adhérence. Cela n'est pas vérifié puisque les cellules adhérentes sur les réseaux à faible densité développent la contractilité. Or, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, la contractilité est activée en dernier dans le processus adhésif.

Une autre hypothèse invoque une raison mécanique limitant l'extension des cellules. Les aires des cellules adhérentes sur les réseaux à grandes distances inter-plots ( $R14$  à  $R18$ ) sont de l'ordre des aires élémentaires des réseaux (Figure 3.6). Or ces aires sont 5 fois plus petites que les aires moyennes des cellules sur un support homogène. Les cellules se révèlent élastiquement capables de s'étirer sur plusieurs aires élémentaires. Aucune limitation mécanique ne les contraint à rester sur peu de plots.

La dernière hypothèse implique une perturbation fine de la régulation associée à la diminution de la densité moyenne de protéines adhésives comme les travaux réalisés dans le groupe de J. Spatz (Arnold *et al.*, 2004) le suggèrent. Nous allons développer cette idée dans la partie suivante.

## 3.2. Influence de la densité de la matrice sur l'adhésion

### 3.2.2 La densité de protéines peut-elle limiter l'adhésion ?

D'après J. Spatz et collaborateurs (Arnold *et al.*, 2004), une densité minimale d'intégrines est requise pour la création de complexes focaux, les initiateurs des adhérences focales. Une distance de 60 nm se révèle être la distance maximale que peuvent avoir deux intégrines activées pour déclencher la signalisation d'agrégation des points d'ancrages. Nous avons évoqué le fait que les fragments de fibronectine Fn710 utilisés dans ces expériences formaient une couche compacte dont le diamètre était estimé à 4 nm. La densité de protéines adhésives sur un plot ( $62,5 \cdot 10^3$  Fn710/ $\mu\text{m}^2$ ) est donc bien supérieure à la densité minimale de création d'un site adhésif (250 fibro/ $\mu\text{m}^2$ ). Par contre, le fait d'espacer les plots adhésifs va diminuer fortement la densité totale de protéines adhésives accessibles à la cellule durant son étalement.

$$d_{Fn710}^{moyenne} = d_{Rb} \times d_{Fn710\text{-plot}} \quad (3.1)$$

Réseau	$R0$	$R4$	$R6$	$R8$	$R10$	$R12$	$R14$	$R16$	$R18$
$d_{Fn710}^{moyenne}$ ( $10^3$ Fn710/ $\mu\text{m}^2$ )	62,5	15,6	10	6,9	5,1	3,9	3,1	2,5	2

FIGURE 3.8: Tableau présentant la densité de Fn710 totale en prenant en compte la monocouche compacte de fragments sur les plots adhésifs et la distance séparant les plots adhésifs.

Cependant, même pour la distance maximale entre les plots de 18  $\mu\text{m}$ , la densité de protéines adhésives est encore supérieure d'un ordre de grandeur (Figure 3.8) à la valeur critique de création d'un site adhésif. L'argument de l'étalement limité par la densité de protéine adhésive ressentie par la cellule au contact du substrat n'est pas justifié dans notre cas.

Des travaux sur les mêmes types de réseaux carrés comportant des plots carrés ont montré qu'une densité de surface ( $d_{Rb}$  dans notre cas) égale à 0,4% stimulait l'émission de protrusions membranaires sans permettre aux cellules de s'étaler (Lehnert *et al.*, 2004). D'après leurs mesures, la densité de protéines adhésives sur les plots est elle aussi proche de  $62,5 \cdot 10^3$  fibro/ $\mu\text{m}^2$ . En prenant en compte la géométrie de leur motif, la densité moyenne de protéines adhésives sur le support est de 250 fibro/ $\mu\text{m}^2$ . C'est la valeur critique en dessous de laquelle les activations des intégrines ne sont pas effectives et ne démarrent pas la création des complexes focaux. Or des adhérences focales sont visibles sur le peu de plots utilisés par les cellules et parfois des fibres de stress sont également observées, suggérant que le développement de la contractilité est possible.

La densité moyenne de protéines est biaisée par la présence de zones non adhésives et par

des zones adhésives avec une très haute densité de Fn710. En effet, l'influence du support est déjà observable par la diminution de l'aire moyenne sur le réseau ( $R4$ ) comportant la plus faible distance entre les plots :  $4 \mu\text{m}$  (Figure 3.6). Pourtant, cette distance est trop faible pour être reliée à la densité de protéines ou à la quantité d'intégrines engagées. Nous verrons à l'aide d'autres expériences que l'exploration de l'environnement par les protrusions membranaires est le facteur limitant et donc que la distance entre les plots est le paramètre pertinent et non la densité moyenne de protéines.

### 3.2.3 Le développement de la contractilité sur un support structuré

Les images de la Figure 3.3 montrent que des cellules adhérentes sur seulement deux plots développent des fibres de stress alors qu'elles sont d'une taille très inférieure à la taille de contrôle. Les intégrines sont les capteurs mécaniques de la cellule qui activent la contraction lorsqu'elles sont sous tension (Riveline *et al.*, 2001). Comment une cellule dont la taille est similaire à une cellule en suspension peut-elle déclencher cette signalisation ?

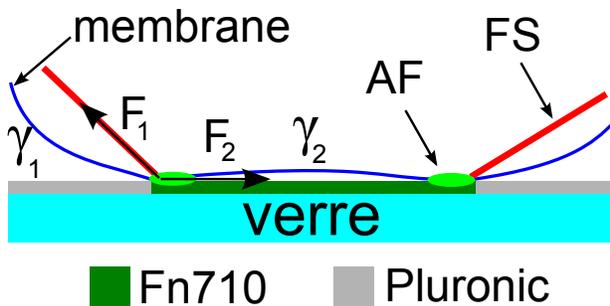


FIGURE 3.9: Schéma de la création de force en bordure d'un plot adhésif résultant du changement d'interface entre la cellule et la surface du support (adhésive ou anti-adhésive).

Nous proposons que l'établissement de la contractilité malgré la petite taille cellulaire, est dû au changement d'énergie d'interface cellule/plot adhésif ( $\gamma_2$ ) et cellule/zone non adhésive ( $\gamma_1$ ) comme décrit sur la Figure 3.9. Ainsi, la force résultante en périphérie du plot pourrait initier la création d'une fibre de stress au niveau de l'adhérence focale (notée  $F_1$ ). La voie de signalisation Rho, activée par cette initiation va ensuite réguler la contraction de la fibre pour maintenir la force appliquée sur l'adhérence focale.

Pour conclure cette première section, nous avons observé une très forte influence de la densité de zones adhésives sur l'aire moyenne des cellules. Nos analyses montrent que ce résultat est biaisé par la nature discrète du motif. Nous verrons en effet dans le chapitre 6 que c'est la distance entre les plots qui est le facteur limitant. Dans la prochaine partie, nous revenons sur la caractérisation des morphologies simplifiées, observées sur les réseaux.

## 3.3 Classification des formes

Un effet remarquable de la structuration de la matrice est la très grande simplification de l'architecture cellulaire. Sur un réseau carré de zones adhésives, le nombre de formes géométriques est dénombrable. Pour quantifier le nombre de formes différentes, nous avons développé une méthode de classification. L'approche utilisée dans la partie précédente ne considérait que l'aire de la cellule. La distribution des aires pour le réseau *R10* (Figure 3.7) est bimodale, suggérant différentes classes de populations. Nos observations visuelles suggéraient également que certaines formes étaient plus fréquentes que d'autres. Une classification basée uniquement sur l'aire ne permet pas d'identifier l'ensemble des formes observées : un autre paramètre est nécessaire pour séparer deux formes différentes d'aire identique.

Nous présentons dans cette section notre méthode de classification. Nous verrons qu'elle permet d'identifier les formes les plus probables en fonction des réseaux et du temps d'adhérence.

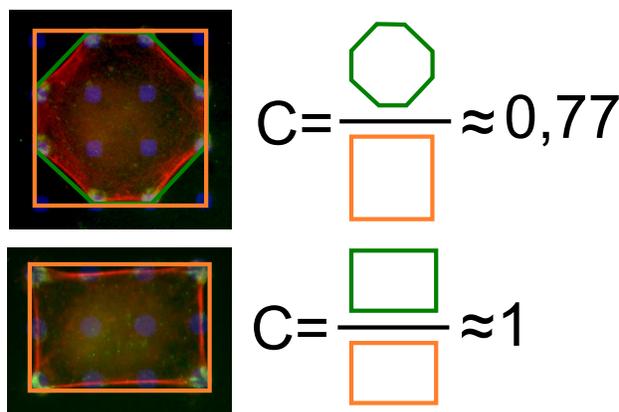


FIGURE 3.10: Schéma de la définition de la compacité. L'aire du plus petit rectangle englobant la cellule (orange) est divisée par l'aire de la cellule (vert).

Afin de discrétiser les formes géométriques entre elles, la compacité carrés est introduite. Lorsque la forme observée est rectangulaire, cette compacité doit être égale à 1, et inférieure pour toute autre forme. Nous prendrons donc une compacité correspondant au rapport entre l'aire projetée de la cellule divisée par l'aire du plus petit rectangle englobant la cellule (Figure 3.10). Ce facteur  $C$  est donc proche de  $1/2$  lorsque la cellule adopte une forme triangulaire, proche de 1 pour une forme carrée ou rectangulaire et inférieure à 1 pour des formes plus exotiques.

### 3.3.1 Le diagramme compacité/aire

Pour une population de cellule en adhérence sur un réseau donné, un diagramme Compacité/Aire ( $C/A$ ) peut être tracé. Cela consiste à représenter chaque cellule dans le diagramme par un point dont les coordonnées sont : son aire projetée ( $x$ ) et sa compacité ( $y$ ). Les diagrammes correspondants au réseau de contrôle (*R0*) et au réseau *R10* sont représentés sur la Figure 3.11.

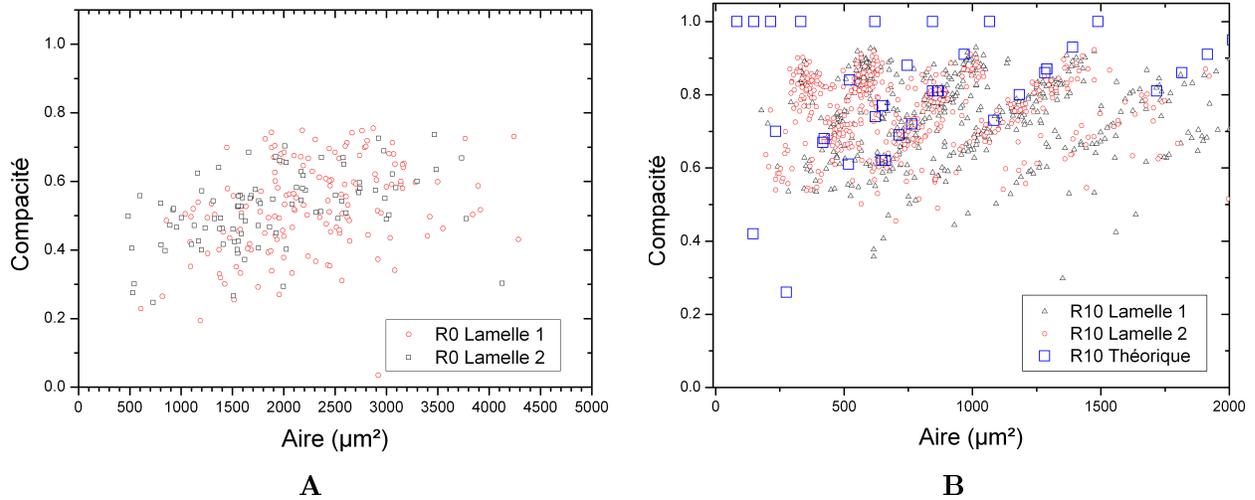


FIGURE 3.11: Diagrammes Compacité/Aire pour une population de cellules en adhérence sur une surface adhésive homogène **A** et sur un réseau de plots adhésifs carrés distant de  $10 \mu\text{m}$  **B**. Les carrés bleus sur **B** sont les formes géométriques théoriques disponibles sur le réseau de plots. Temps d'adhérence avant fixation : 4 heures, type cellulaire : Ledac.

Nous remarquons que la population de cellules sur le support contrôle est dispersée de manière relativement homogène avec une compacité moyenne de l'ordre de 0,5 correspondant à des formes désordonnées (Figure 3.3 **A**). Sur le diagramme correspondant au réseau *R10* nous avons également représenté les formes géométriques idéales.

Les formes géométriques recouvrant jusqu'à 5 fois l'aire élémentaire du réseau se limitent à couvrir neuf plots adhésifs au maximum. Nous avons calculé l'aire, l'aire normalisée par  $A_{Rb}$  et la compacité de ces formes théoriques. Ces caractéristiques ainsi que leur représentation sont reportées dans le tableau de la Figure 3.12, dans lequel nous considérons que les cellules en adhérence sur un unique plot ont la même forme ronde que des cellules non adhésives (en suspension). Les valeurs pour les réseaux *R0*, *R10* et *R18* sont données à titre indicatif.

Il apparaît clairement que les regroupements de points dans le diagramme C/A pour *R10* forment des lignes autour des points correspondant aux formes théoriques. Les cellules utilisent certaines formes les unes après les autres pour augmenter leur aire lors de l'adhésion. Ces lignes témoignent des transitions d'une forme à l'autre qui se passent durant le processus adhésif. Le fait d'observer ces lignes sur une population de cellules fixées montrent que certaines transitions lors de l'adhérence sont plus probables que d'autres. Nous remarquons également que la compacité moyenne des cellules adhérentes sur *R10* est plus élevée que le contrôle.

Ces résultats montrent que les cellules adhérentes sur un réseau carré s'auto-organisent en

### 3.3. Classification des formes

Forme	$A$ ( $\mu m^2$ )	$A/A_{Rb}$	$C$
[R4-R10-R18]			
1A	[200 – 200 – 200]	[3.12 – 1.02 – 0.41]	[0.78 – 0.78 – 0.78]
2A	[48 – 72 – 104]	[0.75 – 0.37 – 0.21]	[1 – 1 – 1]
3A	[112 – 226 – 434]	[1.75 – 1.15 – 0.89]	[0.78 – 0.7 – 0.64]
4A	[144 – 324 – 676]	[2.25 – 1.65 – 1.39]	[1 – 1 – 1]
5A	[208 – 478 – 1006]	[3.25 – 2.44 – 2.08]	[0.87 – 0.83 – 0.8]
6A	[240 – 576 – 1248]	[3.75 – 2.94 – 2.58]	[1 – 1 – 1]
7A	[336 – 828 – 1820]	[5.25 – 4.22 – 3.76]	[0.84 – 0.8 – 0.79]
8A	[368 – 926 – 2062]	[5.75 – 4.72 – 4.26]	[0.92 – 0.9 – 0.89]
9A	[400 – 1027 – 2304]	[6.25 – 5.22 – 4.76]	[1 – 1 – 1]

FIGURE 3.12: Tableau récapitulatif des aires, aires normalisées et compacités de neuf formes géométriques élémentaires.

formes géométriques très simples et compactes imposées par la contrainte adhésive.

#### 3.3.2 L'ordre naît du désordre

Dans cette partie, nous allons utiliser les diagrammes  $C/A$  des cellules Ledac pour établir une transition dans l'adhésion entre des formes géométriques ordonnées bien identifiables dans le diagramme et des formes désordonnées. Pour cela, nous représentons les diagrammes  $C/A$  par des images de couleurs. Un point de couleur dans ces images représente la densité locale de cellules ayant la même aire et la même compacité. Ces nouveaux diagrammes, appelés  $C/A$  normalisée dans la suite, sont représentés sur les Figures 3.13, 3.14 et 3.15.

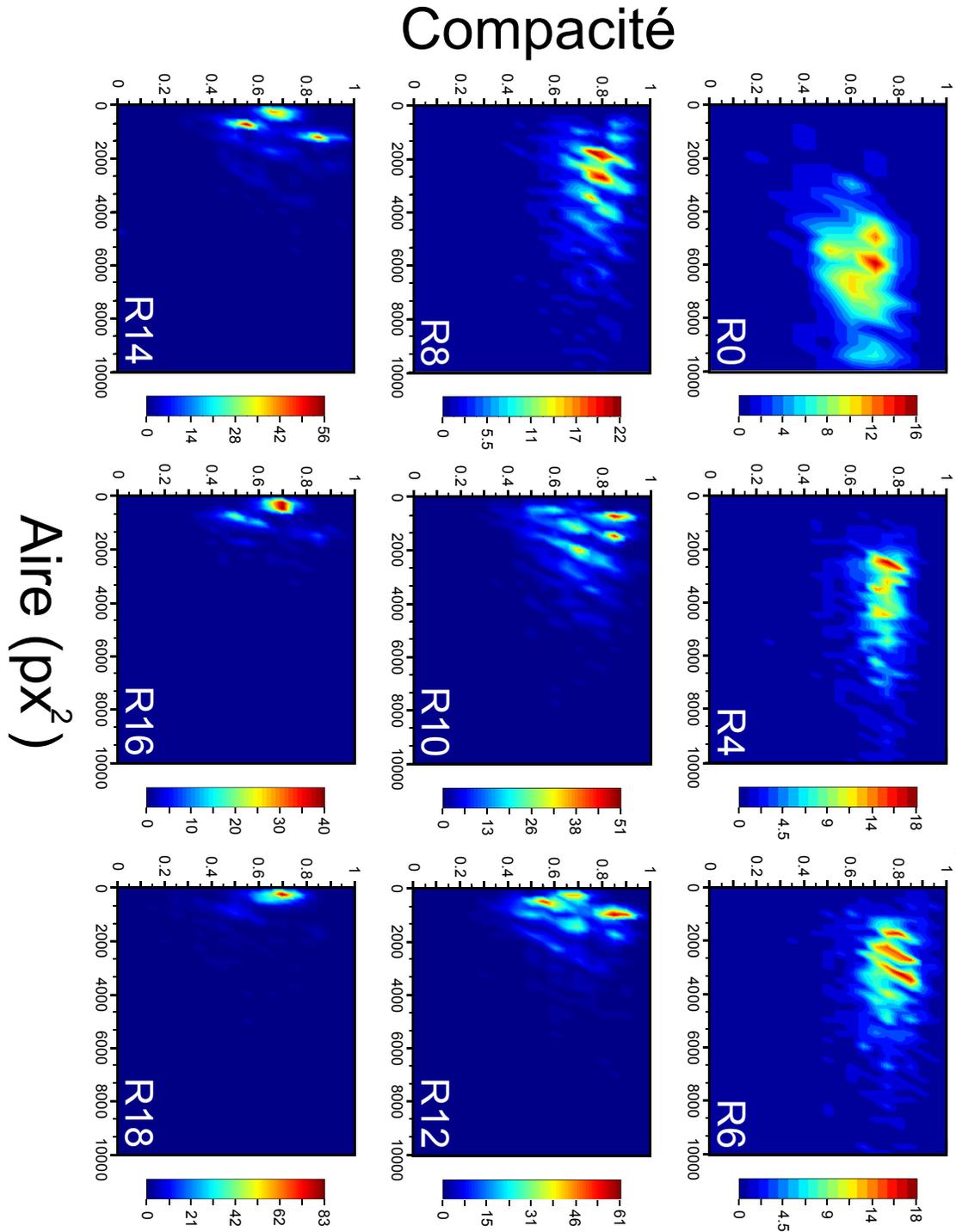


FIGURE 3.13: Diagrammes Compacité/Aire pour les neuf réseaux étudiés, de gauche à droite et de haut en bas lorsque la figure est tournée : R0, R4 à R18. Temps d'adhérence : 2 h, lignée cellulaire : Ledac.

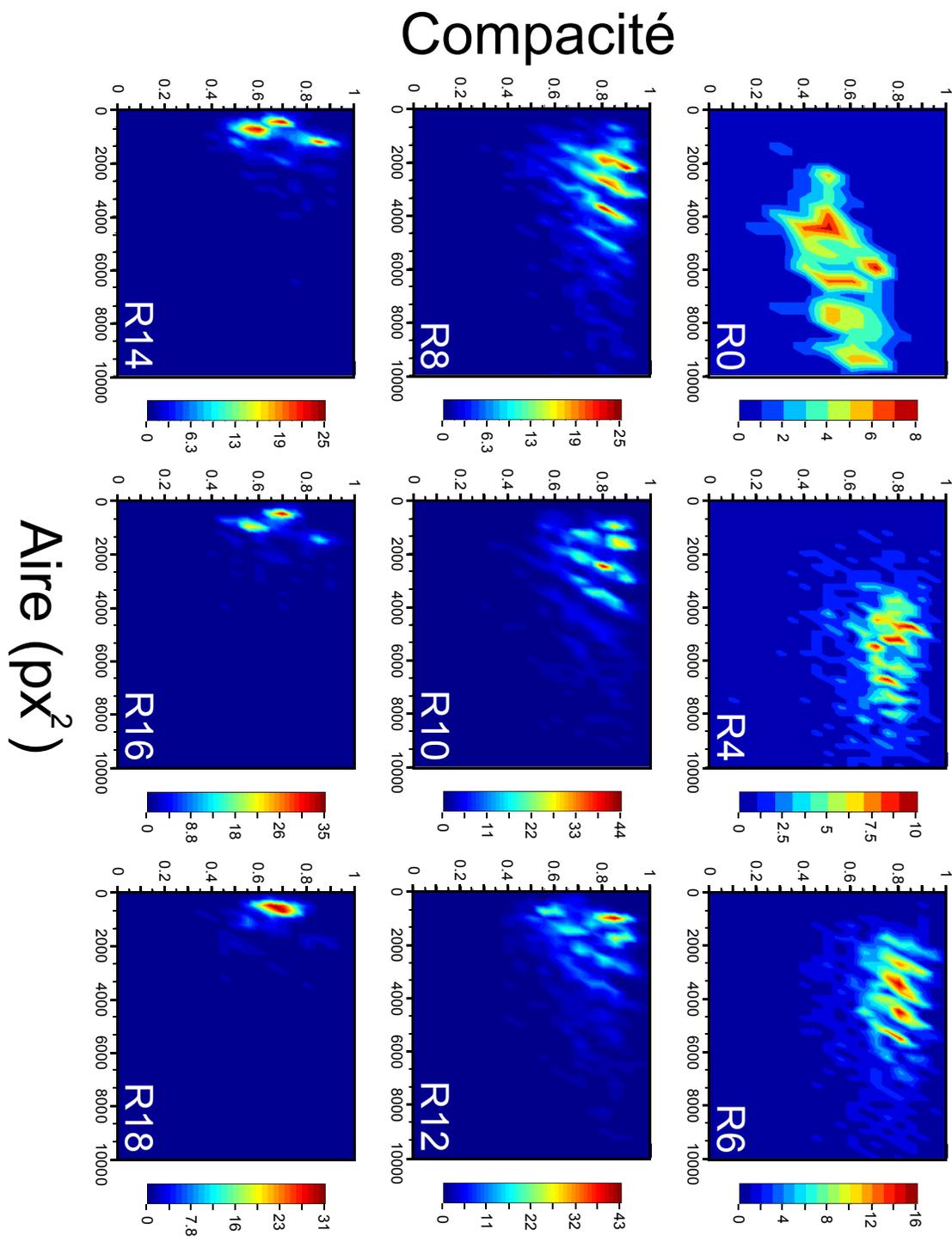


FIGURE 3.14: Diagrammes Compacité/Aire pour les neuf réseaux étudiés, de gauche à droite et de haut en bas lorsque la figure est tournée : R0, R4 à R18. Temps d'adhérence : 4 h, lignée cellulaire : Ledac.

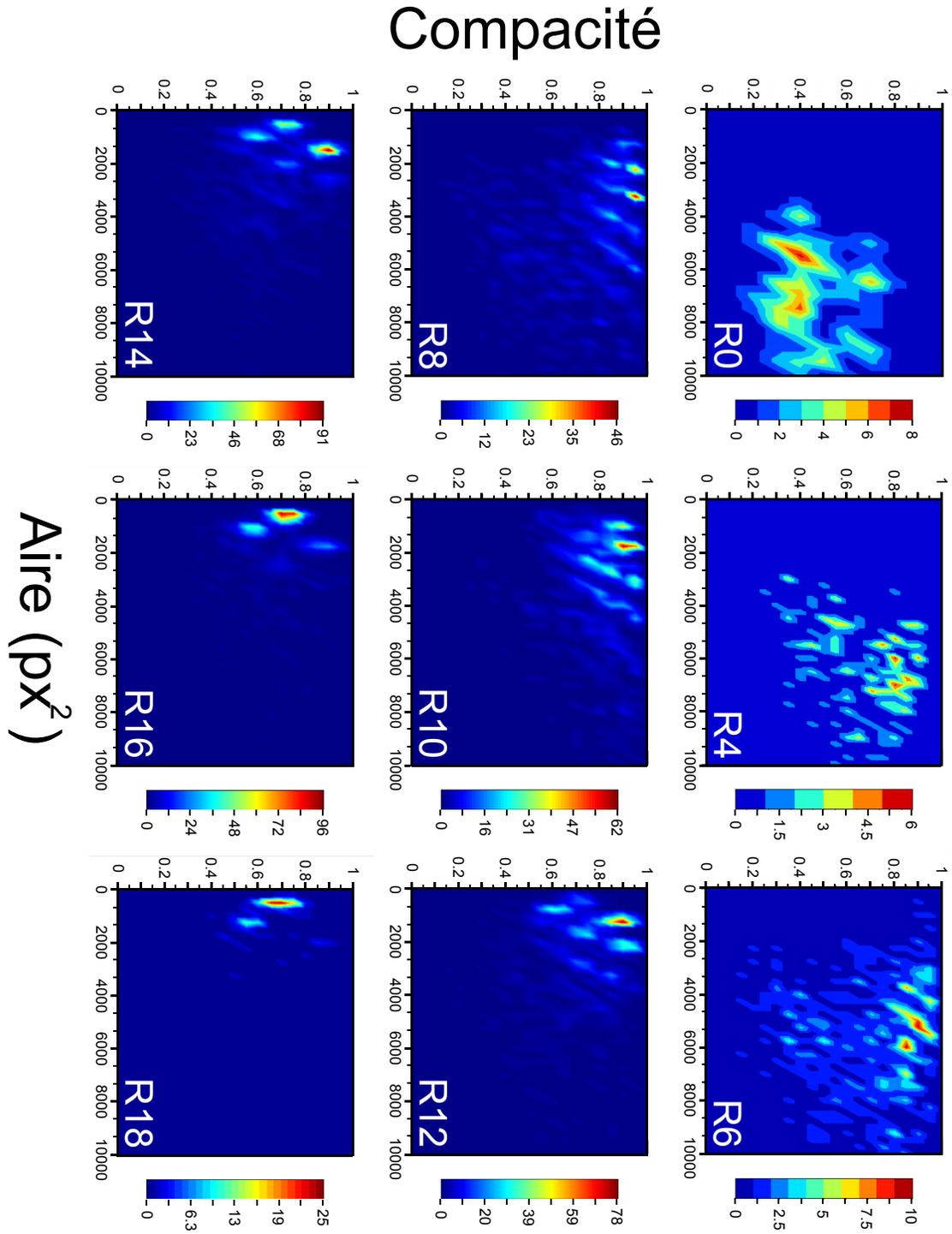


FIGURE 3.15: Diagrammes Compacité/Aire pour les neuf réseaux étudiés, de gauche à droite et de haut en bas lorsque la figure est tournée : R0, R4 à R18. Temps d'adhérence : 6 h, lignée cellulaire : Ledac.

### 3.3. Classification des formes

---

Nous allons discuter de l'effet de la distance entre les plots sur l'évolution des distributions de formes pour un temps d'adhérence fixé. Nous étudierons ensuite l'effet du temps d'adhérence.

#### Effet de la distance entre les plots

Deux régimes peuvent être identifiés. Le premier que nous appellerons régime désordonné représente les cas où les zones de fortes densités correspondent à plusieurs formes différentes. Ce régime est proche de ce qui est observé pour le cas de contrôle sur un support homogène : les cellules disposent d'un grand nombre de plots adhésifs rapprochés et peuvent donc s'étaler de différentes manières en prenant des formes désordonnées. Ce régime est observé pour les réseaux :  $R0$ ,  $R4$ ,  $R6$  et  $R8$ .

Le second régime, le régime ordonné, est atteint pour des distance de plots supérieures à  $10 \mu\text{m}$ . Il est caractérisé par le fait que les zones de fortes densités correspondent à une seule forme géométrique recouvrant un faible nombre de plots, généralement compris entre 1 et 9. Ce régime permet d'identifier en fonction de la distance de séparation entre les plots une forme statistiquement dominante (Figure 3.16).

	$R0$	$R4$	$R6$	$R8$	$R10$	$R12$	$R14$	$R16$	$R18$
$N$	234	647	889	983	1038	1076	398	304	266
$N_{max}$	4	10	16	25	44	43	25	35	31
$V_{max} = N_{max}/N$ (%)	1,7	1,5	1,8	2,5	4,2	4	6,3	11,5	11,7

FIGURE 3.16: Tableau récapitulatif pour les cellules Ledac et 4h d'adhérence des valeurs maximales d'occupation.

Une forme géométrique déterminée n'a pas la même aire et compacité suivant le réseau (Figure 3.12). Aussi, il est difficile d'évaluer l'évolution de la population d'une forme donnée en fonction de la distance de séparation des plots. En normalisant l'aire par l'aire élémentaire  $A_{Rb}$  de chaque réseau, une forme donnée possède une aire normalisée pratiquement constante. La Figure 3.17 présente les diagrammes C/A normalisée suivant les aires élémentaires de chaque réseau pour un temps d'adhérence de 4h. La transition entre les deux régimes est plus marquée : dans le cas du réseau  $R10$ , chaque pic dans la densité correspond à une seule forme par rapport à  $R8$ , où un pic regroupe plusieurs formes.

En traçant les aires moyennes normalisées en fonction de la distance entre les plots, on observe le centre de gravité des distributions dans les diagrammes C/A normalisée (Figure 3.18). Pour une distance de séparation supérieure à  $10 \mu\text{m}$  dans le cas des cellules Ledac, et  $8 \mu\text{m}$  pour les

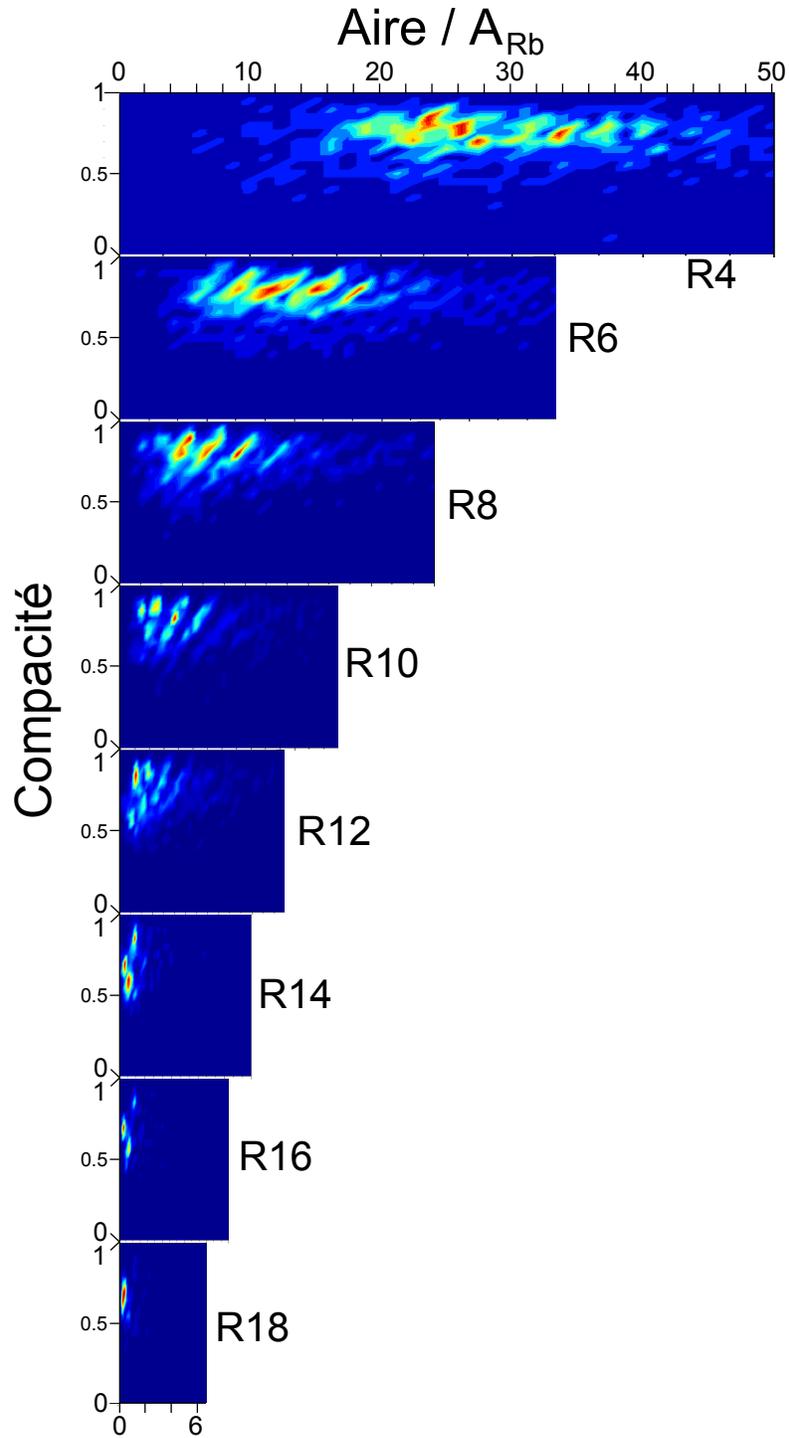


FIGURE 3.17: Diagrammes Compacité/Aire normalisée après 4 heures d'adhérence pour les cellules L929. Le code couleur des densités correspond aux valeurs des Figures 3.13, 3.14 et 3.15.

### 3.3. Classification des formes

ATCC, la plus grande forme peuplée de manière significative correspond au maximum à un carré occupant 9 plots. D'après le tableau de la Figure 3.12, cette forme correspond à une aire normalisée inférieure à 5 (ligne en pointillé sur la figure).

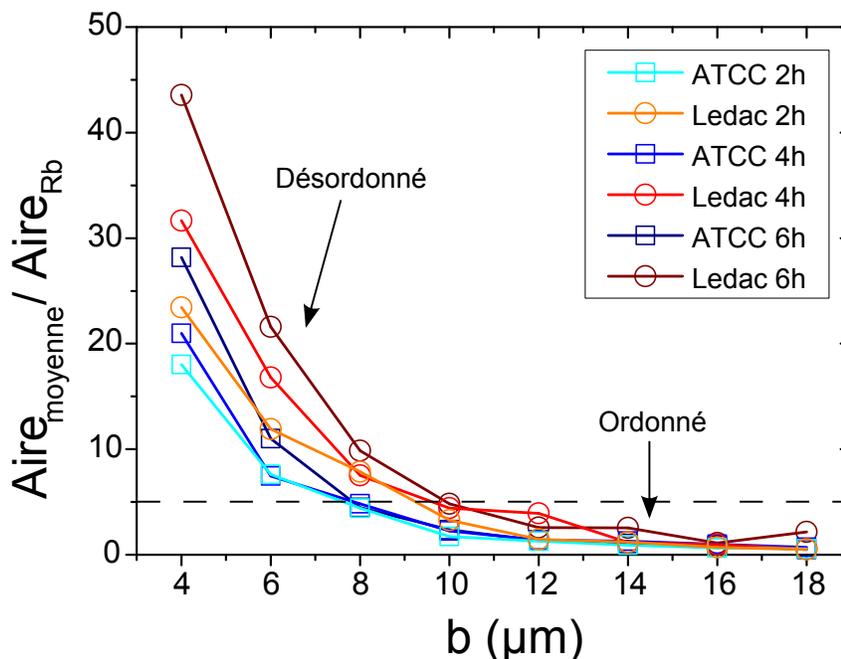


FIGURE 3.18: Graphique représentant l'aire moyenne des cellules sur chaque réseau, normalisée par l'aire élémentaire du réseau en fonction de la distance inter-plots.

Dans le régime ordonné, la majorité des cellules se répartissent sur un nombre très faible de formes géométriques, bien séparées dans le diagramme  $C/A$  normalisée. Il est donc possible de les identifier individuellement.

#### Effet du temps d'adhérence

Le temps d'adhérence, bien qu'ayant un effet observable sur les résultats ne se révèle pas aussi limitant que la distance entre les plots. Il influe essentiellement sur l'évolution de la compacité des cellules. Celle-ci est révélatrice de la tension développée par les fibres de stress. Une forte tension interne à la cellule va avoir pour effet de tendre les fibres de stress et ainsi d'augmenter la compacité. Inversement, si la tension interne de la cellule est faible, les fibres de stress vont être plus courbées (moins contractées) ce qui va diminuer la compacité d'une même forme géométrique observée.

La Figure 3.19 représente l'évolution de la compacité moyenne en fonction du temps et de la

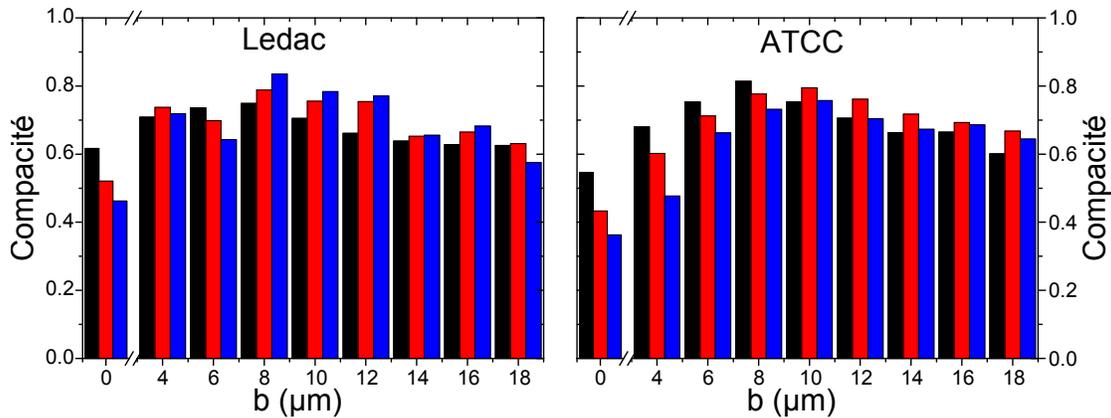


FIGURE 3.19: Graphique représentant la compacité moyenne des cellules sur chaque réseau en fonction de la distance entre les plots. Les lignées cellulaires ont été séparées pour une meilleure visualisation des temps d'adhérence (2h en noir, 4h en rouge et 6h en bleu).

distance inter-plots. Les deux régimes correspondent à deux évolutions différentes de la compacité en fonction du temps d'adhérence :

- en dessous de la transition désordre/ordre, la compacité diminue avec le temps
- au delà de la transition, elle augmente pour les cellules Ledac, cette évolution est plus contrastée pour les ATCC

Cette baisse de compacité peut s'expliquer par la migration cellulaire. En effet, sur les supports correspondant au régime désordonné, la séparation des plots adhésifs étant faible, la contrainte adhésive n'est pas assez importante pour obliger la cellule à s'organiser suivant un faible nombre de formes. La profusion de plots disponibles leur permet de déclencher un phénotype migratoire lorsqu'elles ont atteint une certaine aire d'adhésion. Les formes cellulaires lors de la migration ont généralement une compacité faible du fait de la polarisation de la cellule qui va briser la symétrie initiale que la cellule possédait grâce au réseau.

Pour les réseaux du régime ordonné, la compacité augmente ou stagne avec le temps. Cela signifie que la migration des cellules est bloquée. Puisque nous pouvons identifier grâce aux diagrammes C/A normalisée chaque forme peuplée par les cellules, nous allons observer individuellement l'évolution de la compacité de chaque forme en fonction du temps. Pour cela, nous avons représenté sur la Figure 3.20 les diagrammes C/A normalisée des réseaux du régime ordonné pour les trois temps d'adhérence des cellules Ledac. La compacité a été tronquée de 0,5 à 1 pour se focaliser sur les formes peuplées.

Sur ces diagrammes, les positions des formes géométriques idéales sont reportées pour chaque

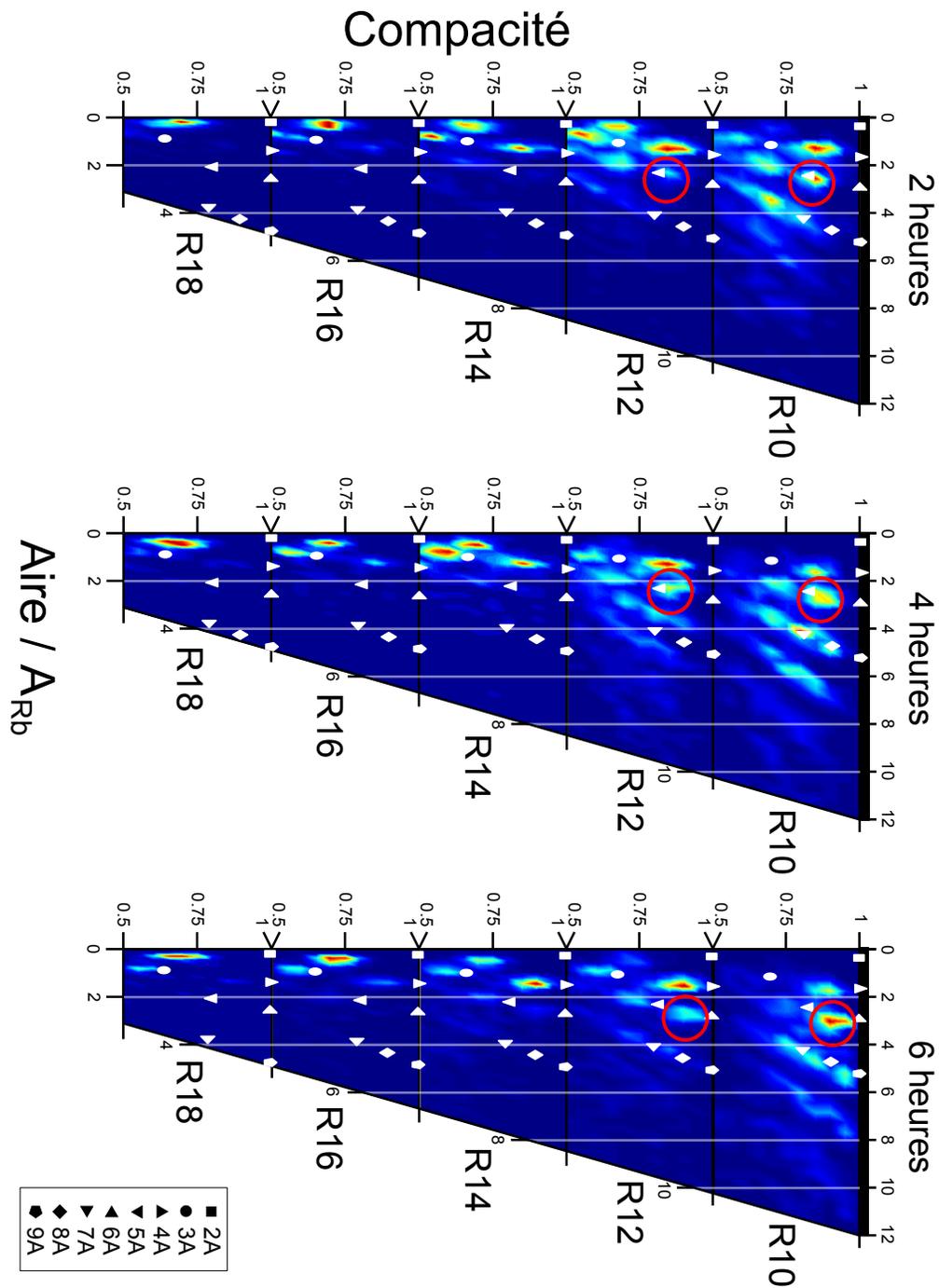


FIGURE 3.20: Diagrammes Compacité/Aire normalisée de la lignée Ledac pour les trois temps d'adhérence. Le code couleur de l'occupation correspond aux valeurs reportées dans le tableau de la Figure 3.16. Les points représentant les formes théoriques (en blanc) sont placés en respectant les différentes aires normalisées et compacités de chaque réseau (tableau de la Figure 3.12). Les zones de forte densité correspondant au rectangle 6A sont indiquées par les cercles rouges.

réseau. Le raisonnement suivant portera sur la forme rectangulaire 6A (Figure 3.12) mais il sera transposable à toutes les autres formes. Nous observons que les formes théoriques et mesurées ne se superposent pas complètement. Cela peut être dû aux fibres de stress courbées s'éloignant de la forme idéale ou aux protrusions membranaires qui sortent du périmètre de la forme théorique, les deux diminuant la compacité. Malgré tout, pour les réseaux *R10* et *R12* pour lesquels cette forme est peuplée, on observe une augmentation de la compacité, indiquant que la contractilité augmente avec le temps. Cela peut être expliqué par l'inhibition des émissions de protrusions par le biais d'une régulation antagoniste (Rottner *et al.*, 1999), ce qui a tendance à augmenter la compacité.

Les formes préférentielles en fonction des deux paramètres importants

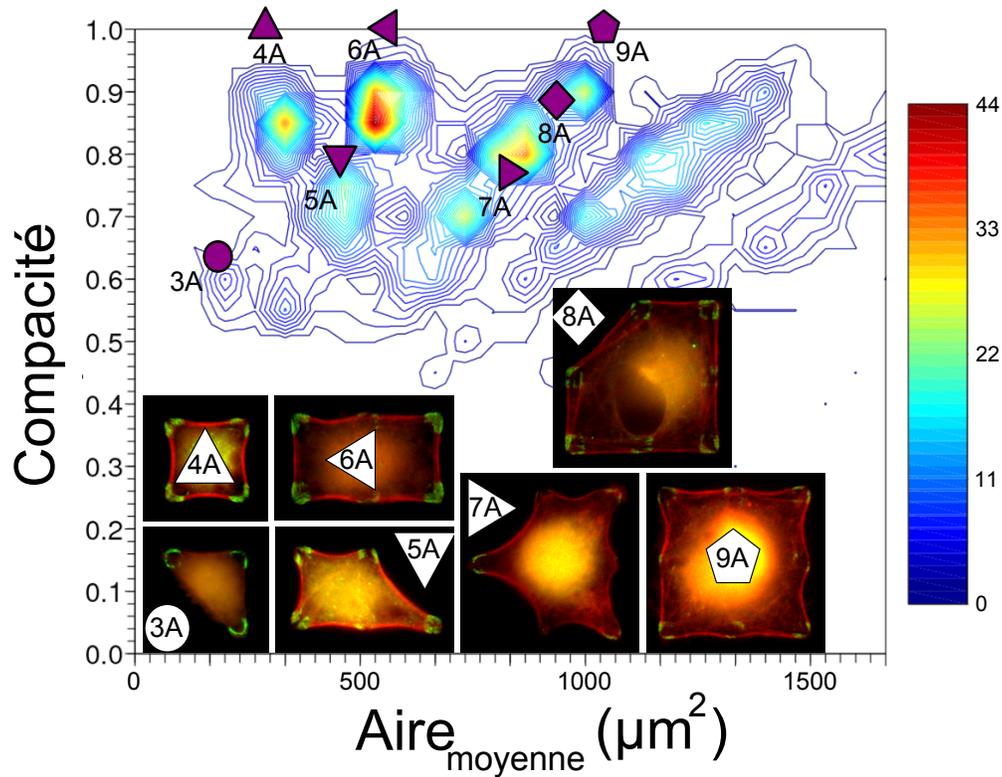


FIGURE 3.21: Diagramme Compacité/Aire de la lignée Ledac sur *R10* après 4h d'adhérence. Chaque regroupement de points correspond à une forme géométrique précise dont une image en fluorescence est reportée où l'actine a été marqué en rouge et la vinculine en vert.

Nous nous focalisons ici sur les formes les plus utilisées par les cellules en fonction des conditions expérimentales : distance entre les plots et temps d'adhérence. L'objectif est de trouver quelles sont les formes utilisées par les cellules pour observer les effets du temps d'adhérence et de la

### 3.3. Classification des formes

distance entre les plots. La Figure 3.21 présente le diagramme C/A de densité des cellules Ledac adhérentes sur le réseau  $R10$  après 4h d'adhérence. Chaque forme géométrique élémentaire définie par le réseau est utilisée par les cellules selon une distribution très marquée entre des formes très utilisées :  $6A$ ,  $8A$  et  $4A$  et les autres.

Nous déterminons donc quelles sont les formes les plus utilisées par chaque réseau du régime ordonné pour les trois temps d'adhérence. Les deux formes les plus probables sont reportées dans le tableau de la Figure 3.22. Les formes les plus utilisées, en gras dans le tableau, sont carrées et rectangulaires pour la plupart des réseaux. Cette forte utilisation de formes à compacité maximale suggère une préférence des cellules à utiliser la géométrie du réseau carré pour adhérer sur des zones discrètes adhésives. Ces formes correspondant à un grand nombre de cellules fixées à un temps donné, elles représentent des configurations nécessaires aux cellules pour s'étaler.

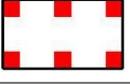
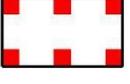
	$R10$	$R12$	$R14$	$R16$	$R18$
$2h$	<b>4A,6A</b> 	<b>4A,3A</b> 	<b>3A,4A</b> 	<b>2A,3A</b> 	<b>2A</b> 
$4h$	<b>6A,8A</b> 	<b>4A,3A</b> 	<b>3A,4A</b> 	<b>2A,3A</b> 	<b>2A</b> 
$6h$	<b>6A,4A</b> 	<b>4A,6A</b> 	<b>4A,3A</b> 	<b>2A,3A</b> 	<b>2A,3A</b> 

FIGURE 3.22: Tableau récapitulatif des deux configurations les plus utilisées pour les réseaux de plots du régime ordonné de la lignée Ledac. La forme théorique de la configuration la plus utilisée (en gras) est également reportée dans le tableau.

Le temps d'adhérence ne modifie pas la distribution des formes les plus probables. Les formes géométriques de plus forte compacité sont utilisées plus longtemps par les cellules. Elles représentent des configurations préférentielles durant l'étalement sur le support structuré. Ces formes préférentielles sont donc des configurations utilisées par un grand nombre de cellules, sur de longs temps. Cela suggère qu'elles correspondent à des états temporairement stables qui dépendent du réseau.

La distance entre les plots sépare de manière dramatique les classes de formes préférentielles : 6 plots pour  $R10$ , 4 plots pour  $R12$  et  $R14$  et 2 plots pour  $R16$  et  $R18$ . Ces résultats doivent être nuancés par le fait que, dans des conditions expérimentales similaires, la distribution des

formes préférentielles peut légèrement changée. Mais la forme la plus probable est toujours une combinaison de carré élémentaire  $4A$  pour des distances de plots comprises entre 10 et 14  $\mu\text{m}$ , comme par exemple :  $4A$ ,  $6A$  et  $9A$ . Lorsque la distance entre les plots devient supérieure à 14  $\mu\text{m}$ , la forme sur 2 plots devient la plus utilisée. La géométrie du réseau, en plus de limiter le nombre de formes utilisées, influence également les géométries des morphologies des cellules.

### 3.4 Conclusion

L'observation des morphologies cellulaires nous indiquent qu'une partie de l'organisation du cytosquelette d'actine est extrêmement reproductible pour une même morphologie. La disposition des fibres de stress est remarquable. Seules les fibres de stress en périphérie du corps cellulaire sont conservées et relient deux plots adhésifs. Les formes géométriques sont donc des systèmes modèles en considérant la géométrie de l'auto-organisation cellulaire.

L'effet du temps d'adhérence sur la compacité des cellules met également en évidence que l'auto-organisation des cellules évoluent dans le temps vers des morphologies tendues, correspondant de plus en plus aux formes théoriques. La régulation Rho relative à la contractilité est donc active. Le développement des fibres de stress et des adhérences focales suggère que le déroulement des voies de signalisation impliquées dans l'adhérence n'est pas modifiés par la contrainte géométrique du support adhésif.

Nous avons développé une méthode d'analyse évolutive dégageant un effet du support microstructuré sur l'adhérence. Les analyses des aires, puis des compacités et des aires nous a permis de déterminer une transition entre les morphologies désordonnées et ordonnées pour des distances de séparation de plots respectivement inférieures et supérieures à 10  $\mu\text{m}$ . Enfin, en analysant la compacité et l'aire normalisée des cellules, une classification des formes a été réalisée pour mettre en évidence les organisations préférentielles des cellules. En régime ordonné, on peut définir une forme majoritaire, qui est plus probable que les autres. Ces formes, pour chaque réseau, sont très reproductibles et correspondent à des formes dont la géométrie est identique à celle du réseau. Cela suggère que des lois physiques "simples" régissent ce phénomène dans les systèmes vivants.

Nous allons dans les deux prochains chapitres nous intéresser à la reproduction des morphologies afin de déterminer ces lois à partir de paramètres physiques liés à certains processus biologiques. Nous reviendrons dans le chapitre 6 sur celui qui limite l'étalement des cellules sur les réseaux de plots.

# Chapitre 4

## *Recherche d'un équilibre*

”LA VIE, C’EST COMME UNE BICYCLETTE, IL FAUT AVANCER POUR NE  
PAS PERDRE L’ÉQUILIBRE.”

Albert Einstein (1879 - 1955)

Physicien américain d’origine allemande, Prix Nobel de physique(1921)



## Chapitre 4

# Recherche d'un équilibre, la modélisation de l'adhérence

Les résultats du chapitre précédent suggère l'existence de lois physiques "simples" régissant l'auto-organisation des cellules sur les réseaux. Les formes de cellules observées doivent donc représenter les minima d'une fonctionnelle similaire à une énergie. L'organisation du système vivant optimiserait cette fonctionnelle en considérant les contraintes imposées par le réseau.

L'objectif de ce chapitre est d'identifier une forme possible de cette fonctionnelle. Nous avons choisi d'utiliser le modèle de Potts Cellulaire pour considérer l'énergie de la cellule. Ce modèle, réducteur ne reproduit pas directement toute la signalisation complexe des phénomènes biologiques. La méthode d'optimisation que nous avons choisie, basée sur l'algorithme de Métropolis, implique que les résultats correspondent à l'équilibre thermodynamique. Les résultats ne reproduiront donc pas la dynamique de l'adhérence.

Nous allons simplement démontrer qu'en utilisant ce modèle, les formes des cellules observées expérimentalement (voir chapitre précédent) correspondent à ses minima locaux d'énergie.

Après une brève présentation du Modèle de Potts et de son contexte dans la première partie, nous développons son fonctionnement en décrivant successivement les énergies impliquées dans la modélisation dans une seconde partie. Dans une troisième partie, nous discutons des interprétations physiques et biologiques des paramètres définis et mesurables dans le modèle. Les expériences et les simulations réalisées pour tester ce modèle sont présentées dans une quatrième partie. Enfin, une discussion des résultats dans la dernière partie conclut ce chapitre.



---

## Sommaire

---

4.1	Le Modèle de Potts Cellulaire . . . . .	<b>105</b>
4.1.1	La similitude avec une goutte d'eau . . . . .	106
4.1.2	Hypothèses . . . . .	107
4.2	Fonctionnement du modèle . . . . .	<b>108</b>
4.2.1	Un modèle énergétique . . . . .	108
4.2.2	L'adaptation du modèle . . . . .	110
4.2.3	La minimisation d'énergie . . . . .	113
4.3	Utilisation des résultats . . . . .	<b>117</b>
4.3.1	Les données mesurées . . . . .	117
4.3.2	Le déroulement d'une simulation . . . . .	119
4.3.3	Les minima d'énergie du modèle . . . . .	121
4.3.4	Les ressources informatiques . . . . .	121
4.4	Expériences et simulations . . . . .	<b>122</b>
4.4.1	Les conditions expérimentales . . . . .	122
4.4.2	Les simulations numériques . . . . .	122
4.5	Formes d'équilibre . . . . .	<b>124</b>
4.5.1	Le confinement énergétique des cellules . . . . .	124
4.5.2	Des formes plus observées que d'autres . . . . .	125
4.5.3	La correspondance des énergies . . . . .	127
4.6	Conclusion . . . . .	<b>129</b>

---



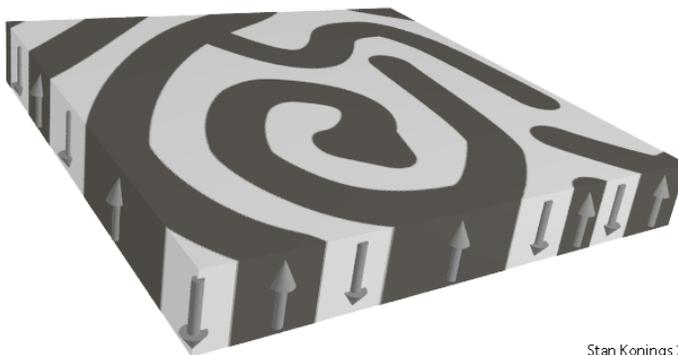
### 4.1 Le Modèle de Potts Cellulaire

Le modèle de Potts est dérivé du modèle d'Ising. Ce dernier a été développé pour étudier le magnétisme et les transitions de phase à l'aide de la physique statistique. Le modèle d'Ising ne prend en compte que les interactions entre deux états, spins en magnétisme, notés up et down le plus souvent. Le modèle étendu de Potts a été mis au point pour étudier les interactions entre les spins lorsqu'ils ont plus de deux configurations. Le Modèle de Potts Cellulaire (noté dans la suite CPM : Cellular Potts Model) ne fait pas référence aux cellules biologiques mais à des systèmes cellulaires comme les domaines magnétiques qui sont des regroupements de spins ayant la même configuration. Un matériau anti-ferromagnétique par exemple possède des domaines de taille macroscopique où tous les spins sont up ou down représentés sur la Figure 4.1. Cette modélisation considère les domaines comme des systèmes déformables soumis à des interactions entre eux au niveau de leurs interfaces.

Le CPM a été introduit dans de multiples domaines de recherche : de la croissance de grains métalliques (Zöllner & Streitenberger, 2008) à l'organisation de bulles dans les mousses (Glazier *et al.*, 1990). Il est utilisé pour la première fois en biophysique par Graner et Glazier (Graner & Glazier, 1992; Glazier & Graner, 1993) dans l'étude du tri cellulaire. L'idée est de modéliser uniquement les interactions aux interfaces des cellules. L'ajout de fluctuations

thermiques permet un réarrangement de la forme des cellules en vue d'atteindre la configuration d'énergie minimale (Graner & Sawada, 1993). En effet, le CPM est un modèle thermodynamique. L'état dans lequel le système a la plus faible énergie est recherché, ce qui correspond à une mise à l'équilibre.

Ainsi, les configurations finales obtenues après simulation correspondent aux observations expérimentales, dans le cas des arrangements de cellules mutées dans les rétines de drosophile (Käfer *et al.*, 2007) par exemple. D'autres sujets de biologie cellulaire ont également été abordés avec



Stan Konings 2007

FIGURE 4.1: Schéma simple de domaines magnétiques dans une couche mince de GdFe. Les flèches montrent la direction de l'aimantation, c'est à dire l'orientation des spins formant chaque domaine. Source : Stan Konings, Quantum Electron Matter Group, Amsterdam University.

cette modélisation, comme l'organisation de cellules cancéreuses (Bauer *et al.*, 2007) ou la déformation d'agrégats de cellules (Marmottant *et al.*, 2009). Les énergies mises en jeu aux interfaces cellule-cellule ou cellule-ECM sont considérées comme les éléments responsables de la forme et de l'arrangement de cellules biologiques. Nous conseillons la lecture d'un chapitre abordant les propriétés du formalisme du CPM pour modéliser les cellules biologiques (Marée *et al.*, 2007) pour les non-initiés.

### 4.1.1 La similitude avec une goutte d'eau

Une première comparaison simple consiste à considérer une cellule comme une simple goutte liquide. En effet, la forme utilisée par une goutte d'eau résulte directement des énergies d'interactions en jeu entre la goutte et l'air extérieur mais également vis à vis du substrat sur lequel elle est déposée. En suspension, une cellule est sphérique, tout comme une bulle de savon dans l'air ou une goutte d'eau dans de l'huile.

Considérons un faible volume d'eau dans l'air, sans prendre en compte les forces extérieures telles que la pesanteur. Afin de minimiser son énergie interne, l'eau en suspension dans l'air va prendre une forme sphérique. La sphère n'est autre que la forme de surface minimale pour un volume donné. Lorsque la même goutte d'eau est déposée sur un substrat comportant des zones hydrophiles entourées de zones hydrophobes, la forme de la goutte d'eau va changer, de nouvelles interactions entrent en jeu. La Figure 4.2 présente la forme de gouttes d'eau soumise à l'attraction des plots carrés hydrophiles entourés d'une surface silanisée, hautement hydrophobe.

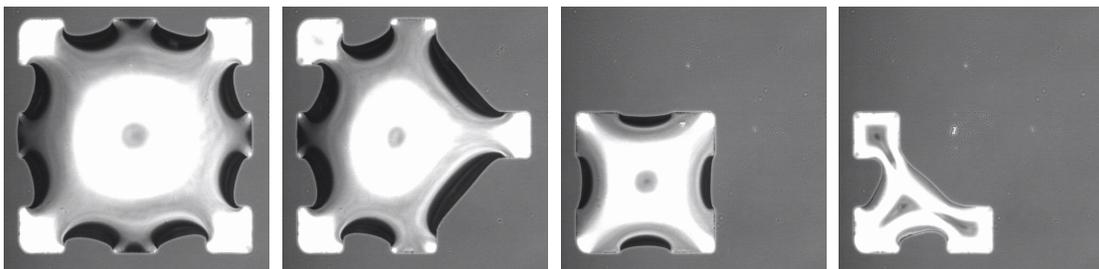


FIGURE 4.2: Image en contraste de phase de gouttes d'eau déposées sur un réseau de plots hydrophile de largeur  $100 \mu\text{m}$  et distants de  $100 \mu\text{m}$ . La surface entre les plots a un fort pouvoir hydrophobe.

Les morphologies observées, sont très similaires aux formes des cellules biologiques et sont dues à la minimisation de l'énergie de l'eau vis à vis : des tensions de surface de l'eau avec l'air, le substrat hydrophile, le substrat hydrophobe, et de la conservation de la masse. C'est en se basant

## 4.1. Le Modèle de Potts Cellulaire

---

sur cette comparaison que nous avons choisi d'utiliser le modèle de Potts pour représenter une cellule biologique. L'analogie entre la morphologie d'une cellule et la forme d'une goutte d'eau sur des supports à contraste adhésif suggère que les lois physiques appliquées à ces systèmes sont similaires. Il est également intéressant de noter que de tels parallèles ont été effectués entre l'organisation de tissus et celle des mousses, en considérant respectivement la morphologie des cellules et la forme des bulles (Käfer, 2008).

### 4.1.2 Hypothèses

Avant de décrire le fonctionnement et le comportement du CPM, il convient de définir les deux hypothèses de bases de notre modélisation. Le problème est considéré comme étant bidimensionnel : seule l'aire projetée de la cellule est considérée. Pour justifier cette première simplification, rappelons que les fibres de stress reliant les plots adhésifs et génératrices de forces se trouvent sur la face basale de la cellule, c'est à dire contre la surface du substrat comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent et comme le montre les images reportées dans la Figure 4.3. Nous considérons ainsi que les processus actifs durant l'adhérence cellulaire sont tous localisés au niveau de la face basale et peuvent donc être réduit à une modélisation bidimensionnelle.

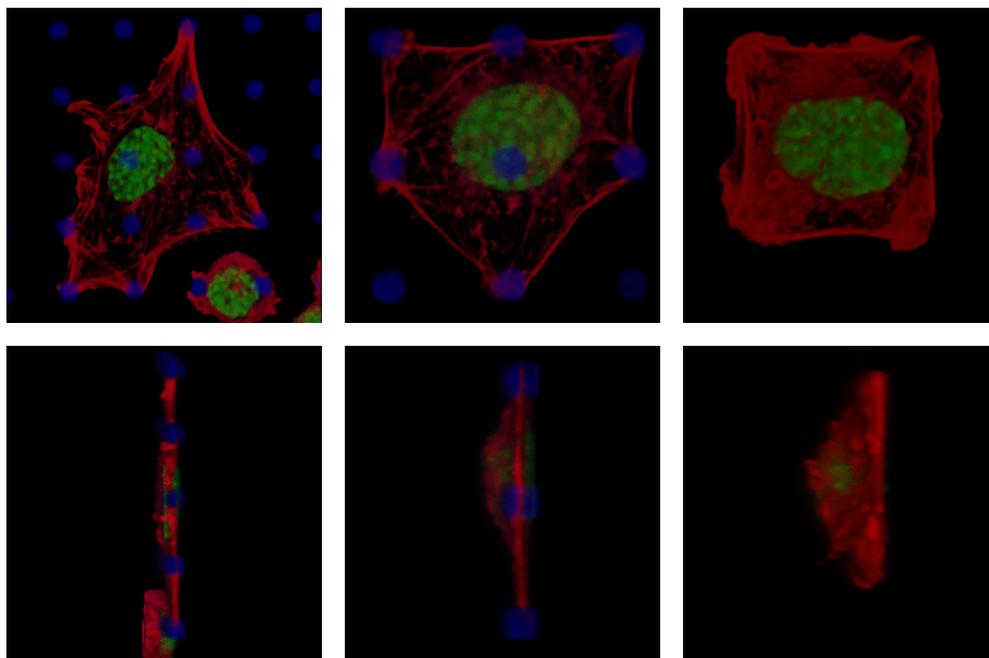


FIGURE 4.3: Reconstructions 3D de cellules en adhérence sur des réseaux de gauche à droite :  $R_{10}$ ,  $R_{12}$  et  $R_{18}$ . En haut : vues de dessous, en bas : vues de côté. Les cellules prennent rapidement une configuration bidimensionnelle sur le support. Avec la permission de E. Planus.

La cellule est également assimilée à un objet totalement homogène. Nous n'incluons dans le modèle que les effets des interactions et propriétés cellulaires. Nous avons vu que l'organisation du cytosquelette en fibre de stress ou en gel d'actine influence la réponse mécanique confrontée à une contrainte. Ici, il ne sera question que de simuler la contractilité d'une fibre de stress ou encore l'élasticité du gel d'actine. La cellule est un système déformable, s'adaptant aux contraintes extérieures. Les deux processus, contraction et élasticité, sont justifiés par le réseau d'actine s'organisant en fibre de stress à la périphérie de la cellule et constituant un réseau dense de filaments autour du noyau. Ce dernier, comprimé par le réseau d'actine comme le montre les images de la Figure 4.3 met en évidence la caractéristique élastique du cytosquelette d'actine à l'intérieur de la cellule.

## 4.2 Fonctionnement du modèle

### 4.2.1 Un modèle énergétique

La cellule, comme le milieu, sont considérés comme des groupes de pixels, la somme de ces deux groupes de pixels donnera le nombre de pixels total, donc constant, de l'image représentant la simulation. L'arrangement des pixels appartenant à la cellule parmi ceux représentant le milieu donnera la forme de la cellule et donc sa réponse à la contrainte induite par le motif adhésif du substrat. L'énergie cellulaire  $\varepsilon$ , comportant deux termes, l'un représentant les interactions aux interfaces cellules-environnement et l'autre propre à la cellule qui est relié à la conservation d'aire (l'équivalent bidimensionnel du volume) représente la cellule.

$$\varepsilon = \sum_{\text{interfaces}} E_{ij} + U_i \quad (4.1)$$

$$E_{cm} = \gamma_{cm} L_{cm} \quad (4.2)$$

$$E_{cs} = \sigma_{cs} A_A \quad (4.3)$$

$$U_c = \lambda_A (A - A_0)^2 \quad (4.4)$$

Dans l'équation (4.1),  $E_{ij}$  est l'énergie d'interface entre la cellule  $i$  et l'environnement divisé en deux parties, le milieu d'une part  $j = m$ , le substrat d'autre part  $j = s$ . Graner et Glazier (Graner & Glazier, 1992) définissent la densité d'énergie interfaciale  $\gamma_{ij}$  liée à la longueur du

## 4.2. Fonctionnement du modèle

---

contact  $L_{ij}$  entre deux cellules  $i$  et  $j$ . Dans notre cas de cellule unique, la cellule  $j$  devient le milieu, nous pouvons donc définir une densité d'énergie linéique : équation (4.2), liée au périmètre de la cellule, correspondant à la longueur d'interface entre la cellule et le milieu. Une deuxième densité d'énergie interfaciale, cette fois surfacique : équation (4.3), va représenter l'adhésion de la cellule sur le substrat.  $A_A$  correspond à l'aire adhésive, c'est à dire à la surface en contact aux plots adhésifs. Enfin, nous utilisons une aire cible  $A_0$  et un module de compression élastique d'aire  $\lambda_A$  pour obliger la cellule à se rapprocher de son aire minimale. La contribution de cette énergie est reportée dans l'équation (4.4). Ce paramètre est utilisé de deux manières différentes dans les travaux. Ce chapitre présente une utilisation variable de  $A_0$  afin de reproduire une distribution importante de cellules. Dans le chapitre 5, l'aire cible est constante et correspond à l'aire moyenne d'une population de cellules.

Comme il n'y a qu'une longueur d'interface  $L_{cm}$ , nous la nommerons plus communément  $L$ . En reportant les trois équations précédentes dans l'Hamiltonien (4.1), la fonction énergétique résultante est celle utilisée dans toute la suite des travaux :

$$\varepsilon = \gamma_{cm}L + \sigma_{cs}A_A + \lambda_A(A - A_0)^2 \quad (4.5)$$

L'aire  $A$ , le périmètre  $L$  ainsi que l'aire adhésive  $A_A$  sont les variables d'état de la cellule. Comme indiqué précédemment, les effets de l'adhésion de la cellule sont modélisés sans pour autant inclure dans le modèle des données caractéristiques concernant les fibres de stress ou encore les tailles et géométries des adhésions focales. Nous prenons seulement en compte le fait que la cellule va s'attacher aux plots adhésifs sur le substrat.  $\sigma_{cs}$  correspond à l'énergie d'adhésion, elle est donc négative ( $\sigma_{cs} < 0$  tout au long des travaux). La surface en contact avec le support adhésif sera ainsi la plus importante possible.

La densité d'énergie interfaciale  $\gamma_{cm}$  est quant à elle positive : ( $\gamma_{cm} > 0$ ), pour que la cellule garde une certaine cohésion. Dans le cas contraire, la cellule tendrait à maximiser son contact avec le milieu comme le montre la Figure 4.4 **b** et donc à se diviser en une multitude de morceaux cellulaires. Il n'y a pas d'adhésion entre la cellule et le milieu extérieur, mais une répulsion du fait de la membrane plasmique. L'énergie de la cellule  $U_c$  définie dans la relation (4.4) permet d'obtenir des cellules cohérentes sur des supports non adhésifs comme sur la Figure 4.4 **a**. En effet, si l'aire cible de la cellule est nulle :  $A_0 = 0$  et lorsqu'aucune zone adhérente n'est présente ou détectée par la cellule :  $A_A = 0$ , l'Hamiltonien  $\varepsilon$  ne comporte que des termes positifs. Le minimiser revient

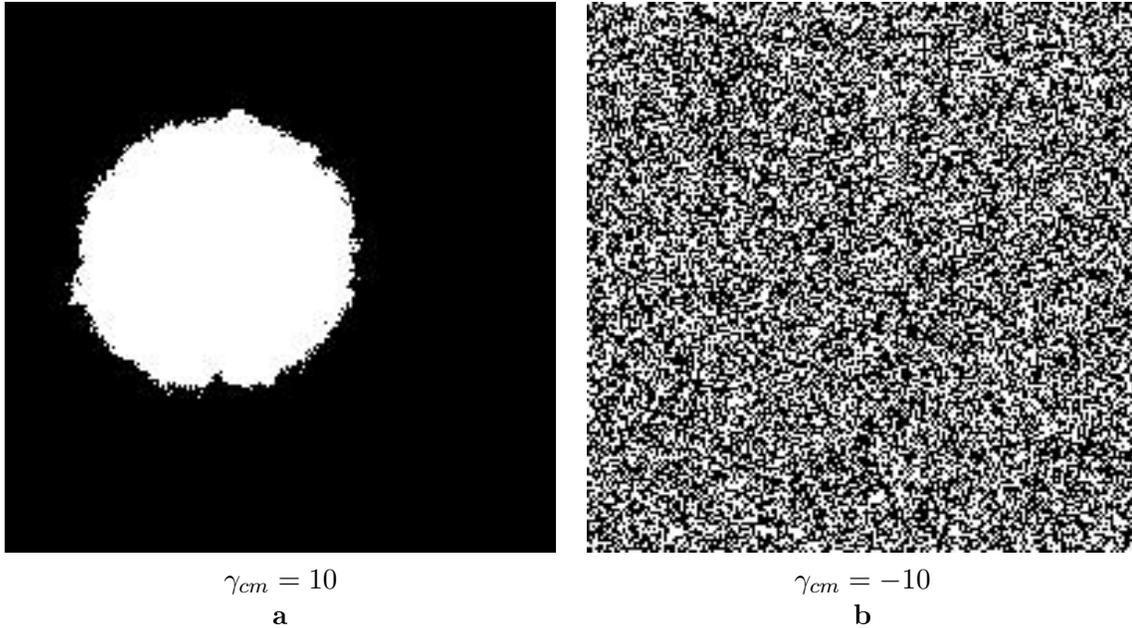


FIGURE 4.4: Les pixels appartenant à la cellule sont en blanc, ceux appartenant au milieu en noir. Les paramètres suivants sont les mêmes pour les deux cellules simulées :  $\lambda_A = 1e^{-3}$ ,  $A_0 = 10\,000\text{ px}^2$ ,  $\sigma_{cs} = 1\,000$ . **a** : Cellule simulée sur un support entièrement non adhésif avec  $\gamma_{cm} > 0$ , dont la morphologie trouvée par le simulateur est de forme circulaire. C'est la forme minimisant l'énergie d'une cellule non adhérente. **b** : Cellule simulée sur le même support, avec  $\gamma_{cm} < 0$ , le mélange des pixels de la cellule avec ceux du milieu s'observe facilement, cette situation n'ayant aucune correspondance avec la biologie.

à trouver une aire  $A$  et un périmètre  $L$  de la cellule nuls. Nous verrons dans la suite l'importance de cette énergie dans le modèle.

### 4.2.2 L'adaptation du modèle

Comme indiqué précédemment, le CPM provient au départ de modélisations de systèmes magnétiques par les spins (véritable information magnétique) du matériau et leurs interactions. La formation de domaines magnétiques peut ainsi être étudiée. La symétrie du réseau cristallin, donc l'agencement des atomes dans ce type de matériau, donne la symétrie des spins. Ils sont placés de manière organisée et périodique, la symétrie du réseau pouvant être carrée, triangulaire etc... Pour adapter le CPM à la biologie, les valeurs des spins\* sont remplacées par des valeurs de pixels différentes suivant s'ils appartiennent à la cellule, au milieu, au dessus d'une zone adhésive etc...

---

\*. Nous utilisons le terme valeur et non spin comme dans un modèle magnétique pour plus de clarté, mais les interactions entre les spins correspondent aux interactions entre les pixels représentant la cellule ou le milieu dans notre cas.

## 4.2. Fonctionnement du modèle

type support	anti-adhésif		adhésif	
système	milieu	cellule	milieu	cellule
couple	0 ; 0	1 ; 0	0 ; 1	1 ; 1
valeur CPM	0	1	2	3

FIGURE 4.5: Tableau récapitulatif des valeurs des pixels dans le modèle.

L'utilisation de ce genre de modélisation se base sur la comparaison avec des résultats expérimentaux, dont les données proviennent d'images. Une image expérimentale étant composée d'une matrice de pixels à symétrie carrée, nous prenons tout naturellement un réseau carré de pixels (eux-mêmes carrés) en simulation. L'objectif est d'avoir la même précision sur les images issues de simulation que sur celles provenant d'expérimentations. Le modèle considère donc un nombre de pixels de valeur identique lorsque ces pixels appartiennent au même objet. La situation est divisée en deux plans, l'un représentant le plan cellulaire, noté **A** sur la Figure 4.6, où deux valeurs de pixel co-existent, l'une pour le milieu et l'autre pour la cellule, et un deuxième plan contenant le substrat, où une valeur représente la surface adhésive, et une autre la surface non adhésive (plan **B** sur la Figure 4.6). Les quatre couples de valeurs possibles correspondent à une valeur dans le modèle (Figure 4.5).

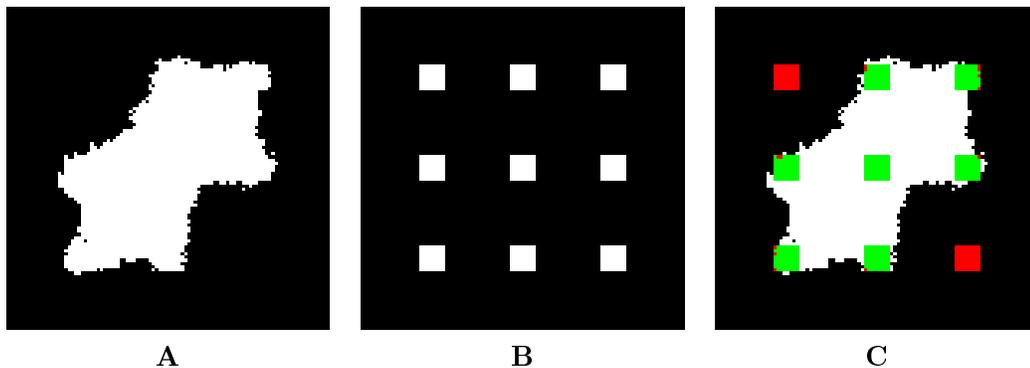


FIGURE 4.6: Plans utilisés dans les simulations. Les plans **A** et **B** sont binaires, les pixels de valeurs 1 sont en blanc, et 0 en noir. Le plan **C** est une combinaison des deux plans précédents et représente les images de sortie du CPM. Des opérations entre les plans **A** et **B** permettent d'obtenir les couleurs du plan **C** : vert pour cellule + substrat adhésif (1+1), rouge pour milieu + substrat adhésif (0+1), blanc pour cellule + substrat non adhésif (1+0) et noir pour milieu + substrat non adhésif (0+0).

Il est nécessaire d'aborder la question de la méthode de mesure d'une longueur d'interface. La pixellisation des images ne permet pas d'avoir la mesure exacte d'une telle longueur. Ainsi, les interactions intra-plan considérées dans l'équation (4.2) nécessitent de définir la méthode de

choix des pixels dits voisins, avec lesquels un pixel interagit. Prenons un pixel  $p$ , les voisins au premier ou second ordre sont organisés comme indiqué dans la Figure 4.7 **a**. La différence se situe dans la distance séparant le centre de ces premiers et seconds voisins avec le centre du pixel  $p$ . La première est de 1 pixel, l'autre de  $(\sqrt{2})$  pixels. Marée et collaborateurs ont montré que le choix de l'ordre de voisinage est important dans la mesure des longueurs d'interface (Marée *et al.*, 2007). De plus, plus l'ordre de voisinage est élevé, plus des pixels éloignés du pixel sélectionné viennent apporter leur contribution. Ainsi, l'anisotropie du réseau est directement ressentie suivant le choix de l'ordre, tout comme l'énergie  $\varepsilon$  dans la relation (4.5).

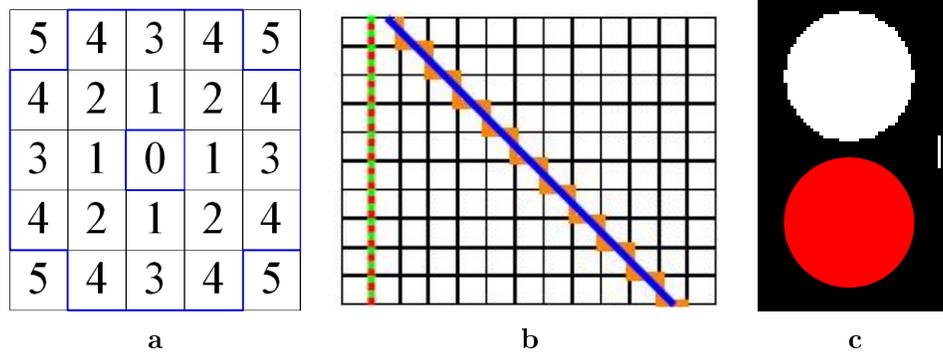


FIGURE 4.7: **a** : Schéma des pixels voisins d'un pixel  $p$  noté '0'. Les voisins du premier ordre sont notés '1', ceux du second notés '2' etc... La ligne bleue entourant les 20 premiers voisins considérés dans les simulations correspond au quatrième ordre choisi. **b** : Comment mesurer une longueur dans un réseau anisotrope? Deux interfaces sont représentées : une verticale (pointillés verts) et une diagonale (ligne bleue). Les lignes rouges et orange sont les mêmes interfaces mais représentées dans un réseau carré de pixels. Repris de J. Käfer, 2008 : <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00346418/fr/>. **c** : Cercle de diamètre 40 pixels. La contrainte due au passage au pixel (pixellisation) rend le contour du cercle beaucoup moins lisse que le cercle interpolé, en rouge. Barre : 10 pixels

La mesure du périmètre d'une interface est par exemple différente suivant la méthode utilisée. Calculer l'énergie d'une interface verticale ou horizontale (dans le sens de symétrie du réseau de pixels) ou d'une interface à  $45^\circ$  s'avère différent. La Figure 4.7 **b** présente le raisonnement. La longueur d'une interface verticale de  $h$  pixels (ligne en pointillés verts) est le nombre de pixels à l'interface (ligne rouge). Elle est donc égale à  $h$ . Par contre, pour une interface à  $45^\circ$  dont la hauteur et la largeur sont de  $h$  pixels (ligne bleue), la longueur réelle de l'interface est de  $\sqrt{2}h$ . Dans un réseau de pixels, tous les côtés des pixels à l'interface comptent dans la mesure (ligne orange). Deux côtés de chaque pixel sont ajoutés pour une diagonale de pixel. Elle sera donc de  $2 \times h$  pixels. Nous ne pouvons pas utiliser cette simple méthode de comptage des côtés de pixels à l'interface

## 4.2. Fonctionnement du modèle

---

pour mesurer sa longueur. Car elle serait obligatoirement surestimée :  $\frac{2 \times h \text{ px}}{\sqrt{2} \times h \text{ px}} = \sqrt{2}$  donne une erreur de 40% sur la mesure. Des interfaces de même longueur mais ayant une orientation différente dans l'image n'auraient pas le même "poids" lors de la multiplication par  $\gamma_{cm}$ .

Nous utiliserons le fait qu'augmenter l'ordre de voisinage diminue l'effet anisotropique (Glazier *et al.*, 1990), (Marée *et al.*, 2007). Bien que cela augmente le nombre d'interactions et donc le temps de calcul, le choix s'est porté sur l'utilisation jusqu'à l'ordre 4 des voisins. Ainsi, pour un pixel à l'interface appartenant à la cellule, les 20 premiers voisins de ce pixel sont considérés. Tous les voisins appartenant au milieu (valeur différente de celle des pixels de la cellule) ajouteront +1 au périmètre de la cellule. Un préfacteur sera donc utilisé, si besoin, lorsque l'on voudra comparer les paramètres du modèle avec la réalité ou lors de comparaisons internes au modèle lorsque l'utilisation de cet ordre de voisinage intervient dans le calcul de l'énergie. Ainsi, le cercle de diamètre 40 pixels de la Figure 4.7 **c** a un périmètre de :

$$p_t = 2\pi \left( \frac{D}{2} \right) \simeq 125 \text{ pixels}$$

Notre méthode de calcul de longueur d'interface, en utilisant les 20 premiers voisins (ordre 4), donne  $p_m = 1416$  pixels. La forme d'une cellule hors adhérence étant une sphère, il paraît judicieux d'utiliser ce rapport de périmètre réel sur périmètre mesuré pour déterminer le préfacteur.

$$r = \frac{p_m}{p_t} = 11,3$$

Pour confirmer ce choix, prenons un carré de 40 pixels de côté. Le périmètre d'un tel carré est de  $4 \times 40 = 160$  pixels. Le calcul du périmètre en utilisant toujours le quatrième ordre de voisinage donne 1740 pixels. Il existe donc bien un rapport 11,3 entre ces deux valeurs à 4% près. Cette méthode a été largement inspirée des travaux de J. Käfer (thèse disponible sur <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00346418/fr/>).

### 4.2.3 La minimisation d'énergie

L'énergie de la cellule étant définie par l'équation (4.5), il nous reste à définir par quelle méthode le simulateur va la minimiser. En effet, nous avons discuté dans le chapitre introductif de l'utilité des protrusions membranaires pour explorer l'environnement proche de la cellule, pour trouver de nouvelles zones favorables à l'adhérence et enfin pour créer de nouveaux contacts avec l'ECM.

Nous discuterons plus en détail de ces outils cellulaires et de la manière dont nous les incluons à nos travaux dans le chapitre 6. Nous allons ici aborder la partie de l'algorithme décrivant la méthode utilisée pour minimiser l'énergie de la cellule  $\varepsilon$ .

L'algorithme de Metropolis, qui utilise une méthode de Monte Carlo pour le tirage au sort, va nous permettre de prendre en compte tous les pixels de l'image, de taille  $N \times N$ , soit la totalité de la cellule et du milieu environnant. Une fois seulement par pas de Monte Carlo, un test sur chaque pixel est effectué. Au début de chaque pas de Monte Carlo, noté MCS (pour Monte Carlo Step), la liste de coordonnées des  $N^2$  pixels est obtenue par randomisation. La liste, de 1 à  $N^2$  est donc dans un ordre différent entre chaque pas de Monte Carlo. Plaçons nous durant un MCS, le  $p$ -ième pixel de la liste, noté  $p$  est sélectionné. Un de ses 20 premiers voisins  $p'$  comme défini dans la Figure 4.7 a va être choisi au hasard. Le changement de la valeur du pixel  $p$  en celle de son voisin  $p'$  peut avoir un coût énergétique. Si  $p$  et  $p'$  appartiennent tous les deux à la cellule ou au milieu, la différence d'énergie  $\Delta\varepsilon_{p \rightarrow p'}$  est nulle ; le programme choisit alors un nouveau pixel  $p$  dans la liste de coordonnées. Une seule comparaison entre le pixel sélectionné et son voisin est effectuée par MCS. Par contre, si  $p$  et  $p'$  sont différents, cela veut dire que l'étude se passe à proximité de l'interface,  $\Delta\varepsilon_{p \rightarrow p'}$  est donc différent de zéro.

Dans ce cas, les pixels n'appartiennent pas au même objet, si la différence d'énergie pour le changement  $p \rightarrow p'$  est négative, l'opération est immédiatement effectuée. L'énergie de la cellule se trouve diminuée par cette nouvelle configuration. Au contraire, si la différence d'énergie est positive, le changement peut-être accepté avec une probabilité de Boltzmann :

$$P_B = e^{\frac{-\Delta\varepsilon_{p \rightarrow p'}}{T_{CPM}}} \quad (4.6)$$

La température notée  $T_{CPM}$  joue le rôle de température de fluctuations thermiques. Elle permet de déterminer la limite d'acceptation d'un changement qui augmente l'énergie. Même si biologiquement, la cellule utilise des protrusions membranaires plus efficaces que de simples fluctuations de membrane, nous verrons plus loin que cette représentation de l'activité cellulaire sous forme de fluctuations thermiques donne des résultats acceptables dans le cas des motifs adhésifs utilisés.

Afin de comprendre comment la différence d'énergie est calculée à partir d'un changement test, notons l'équation (4.5) différemment en utilisant la méthode de calcul de la longueur d'interface

## 4.2. Fonctionnement du modèle

---

comme définie précédemment :

$$\varepsilon = \sum_{\text{pixels } p}^{N^2} \sum_{\text{voisins } v}^{20} (\delta_{pv} - 1) \gamma_{pv} + \sum_{\text{pixels } p} \delta_{ps} \sigma_{cs} + \lambda_A (A - A_0)^2 \quad (4.7)$$

$\delta_{pv}$  est le symbole de Kronecker, égal à 1 lorsque  $p = v$ , et zéro dans le cas contraire.  $\delta_{ps}$  est aussi égal à 1 lorsque le pixel  $p$  se situe au dessus d'un pixel adhésif  $s$  (de mêmes coordonnées donc) appartenant au substrat, et nul sur un pixel de surface non adhésive. Lorsque l'on se place dans le cas du calcul de  $\Delta\varepsilon_{p \rightarrow p'}$ , les seules données nécessaires sont le nombre de voisins  $v$  de valeur différente de  $p$  et l'état du pixel du substrat de mêmes coordonnées que  $p$ . La différence d'énergie entre la configuration avant et après changement devient donc :

$$\begin{aligned} \Delta\varepsilon_{p \rightarrow p'} &= \varepsilon_{\text{après}} - \varepsilon_{\text{avant}} \\ &= \sum_{\text{voisins } v}^{20} [(\delta_{p'v} - 1) \gamma_{p'v} - (\delta_{pv} - 1) \gamma_{pv}] \\ &\quad + \delta_{p's} \sigma_{cs} - \delta_{ps} \sigma_{cs} \\ &\quad + 2 [1 + \lambda_A (A_{p'} - A_{0p'} - A_p + A_{0p})] \end{aligned} \quad (4.8)$$

Il est à noter que  $A_p$  et  $A_{0p}$  (ou  $A_{p'}$  et  $A_{0p'}$ ) sont nuls lorsque le pixel  $p$  (ou  $p'$ ) appartient au milieu (soit  $p = m$  ou  $p' = m$ ). En effet, aucune contrainte n'est appliquée sur le milieu extérieur, seule la cellule possède une aire cible définie dans l'équation (4.8). C'est pour cela que nous utilisons les termes simplifiés  $A$  et  $A_0$  (ils correspondent implicitement à  $A_c$  et  $A_{0c}$ ).

Si la température  $T_{CPM}$  est faible, la cellule simulée va se retrouver rapidement "gelée". Tous les changements proches de la configuration initiale faisant diminuer l'énergie auront été effectués. Même si des configurations de plus basses énergies existent, ces niveaux d'énergie sont impossibles à atteindre au vu de la température qui ne permet pas de franchir la moindre barrière énergétique. L'utilisation de cette température permet de modéliser les petites fluctuations de membrane de la cellule. Pour de très hautes températures  $T_{CPM}$ , deux cas non biologiques sont atteints. Les fortes fluctuations thermiques vont autoriser la cellule à se morceler pour rester uniquement sur les zones adhésives comme le montre la Figure 4.8 **a**. Une température trop élevée peut également permettre un franchissement des bords de l'image. Un compromis doit donc être trouvé pour éviter ces phénomènes (Figure 4.8 **b**). Mais il ne faut pas perdre de vue qu'utiliser une forte température permet de réduire le nombre de pas de Monte Carlo nécessaire et donc d'accélérer la minimisation

d'énergie. Au contraire, utiliser une faible température permet d'obtenir une meilleure précision sur la forme de la cellule mais augmente considérablement le temps de calcul.

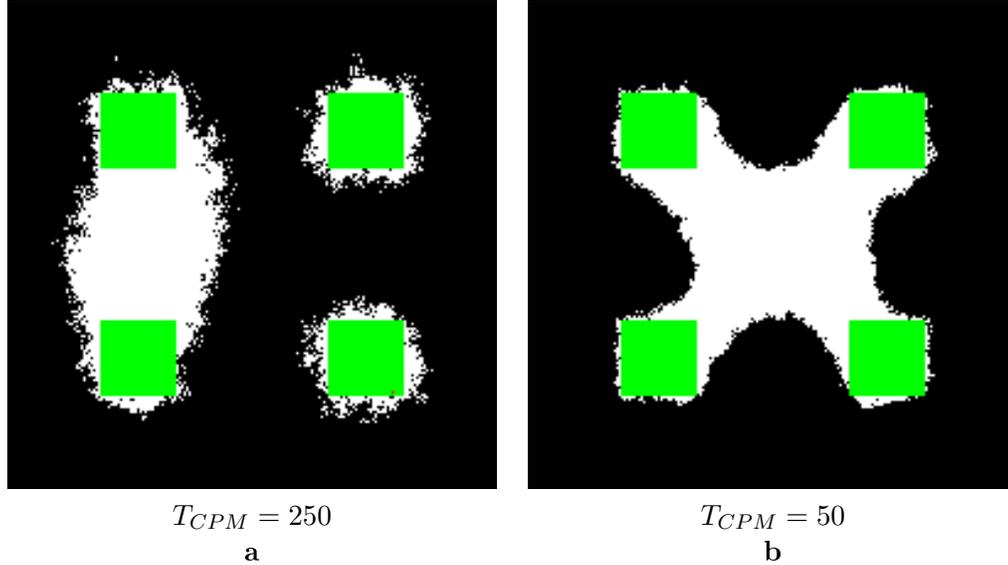


FIGURE 4.8: Les pixels appartenant à la cellule sont en blanc sur une surface non adhésive et vert sur le substrat adhésif. Ceux appartenant au milieu sont en noir sur une surface non adhésive et en rouge sur les plots adhésifs (le fait de ne pas voir de pixel rouge montre la forte attractivité de  $\sigma_{cs}$ ). Les paramètres suivants sont les mêmes pour les deux cellules simulées :  $\gamma_{cm} = 5$ ,  $\lambda_A = 2e^{-3}$ ,  $A_0 = 10\,000\text{ px}^2$ ,  $\sigma_{cs} = 1\,000$ . **a** : Cellule simulée à haute température, l'état de plus basse énergie trouvée représente une configuration où la cellule s'est divisée pour occuper tous les plots adhésifs. **b** : Cellule simulée sur le même support, à une température plus basse.

Certains paramètres du modèle :  $\gamma_{cm}$ ,  $\lambda_A$ ,  $T_{CPM}$  et  $\sigma_{cs}$ , peuvent être multipliés par un facteur sans changer les résultats. Pour pouvoir comparer correctement les valeurs arbitraires des paramètres intervenant dans l'énergie de la cellule, une énergie de référence a été choisie afin de fixer un paramètre. Ainsi, la densité d'énergie surfacique  $\sigma_{cs}$ , c'est à dire l'énergie de liaison des protéines de la matrice avec les intégrines de la cellule, est considérée comme la plus influente pendant l'adhésion comme la représentation thermodynamique de Bell le suggère (Bell *et al.*, 1984). Cette valeur sera élevée et restera inchangée pour une étude donnée. Deux rapports sont enfin définis, l'un représente le niveau de fluctuations :  $S = \frac{T_{CPM}}{\gamma_{cm} A_0^{1/2}}$ , l'autre permet d'obtenir un indice sur la compétition entre la tension interfaciale avec le milieu et le module élastique de l'aire :

$$M = \frac{\lambda_A A_0^{3/2}}{\gamma_{cm}}.$$

## 4.3 Utilisation des résultats

Il s'agit de définir les mesures effectuées sur les cellules simulées obtenues par le modèle afin de les comparer aux mesures expérimentales. Nous avons choisi d'utiliser la même résolution dans nos simulations que le grossissement de l'objectif utilisé en expériences. Ainsi, un pixel d'image issue de simulation représente la même taille qu'en expérience. Après avoir défini les grandeurs physiques pertinentes extraites des simulations, nous aborderons le domaine d'étude dans lequel le CPM s'inscrit. Ce dernier réalise une étude énergétique des configurations offertes par le substrat micro-structuré.

### 4.3.1 Les données mesurées

Les données issues des simulations que nous utilisons dans ce chapitre et le suivant sont pour la plupart similaires. Nous utilisons dans ce chapitre principalement des données morphologiques pour comparer qualitativement les résultats obtenus avec les expériences. Dans le chapitre 5, nous allons plus loin dans notre comparaison, en utilisant une meilleure précision sur les courbures d'interface, permettant de discuter de résultats quantitatifs sur les propriétés des cellules simulées comparées aux résultats expérimentaux. Les données présentées dans la suite sont les paramètres libres de la cellule : aire, aire adhésive et périmètre, et les termes énergétiques qui nous semblent être responsables de la forme d'une cellule.

#### Aire

Dans notre configuration bidimensionnelle, l'aire d'une cellule simulée se résume au nombre de pixels appartenant à la cellule.

$$A = \sum_{p=0}^{N^2} \delta_{pc} \quad (4.9)$$

$\delta_{pc}$  est égal à 1 lorsque  $p = c$  c'est à dire lorsque le pixel sélectionné appartient à la cellule ( $c = 1$ ). Dans le cas contraire, l'aire de la cellule reste identique,  $p$  s'avère appartenir au milieu.

### Aire adhésive

Elle correspond à l'aire de la cellule recouvrant les plots adhésifs. Elle est calculée comme l'aire de la cellule, avec une condition supplémentaire sur la valeur du pixel représentant le substrat.

$$A_A = \sum_{p=0}^{N^2} \delta_{ps} \delta_{ps} \quad (4.10)$$

Comme précédemment,  $\delta_{pc}\delta_{ps}$  est égal à 1 lorsque  $p = c$  et  $p = s$  c'est à dire lorsque le pixel sélectionné appartient à la cellule ( $c = 1$ ) et se trouve au dessus d'un plot adhésif ( $s = 1$ )

### Périmètre

Nous avons vu que la mesure du périmètre dépend de l'ordre de voisinage choisi. L'ordre quatre de voisinage suffit à réduire l'erreur sur la mesure de l'interface à moins de 4% en diminuant l'effet anisotropique du réseau de pixels. Le préfacteur 11,3 sera donc toujours ajouté lorsque des similitudes avec les résultats expérimentaux seront abordées ou lors de comparaisons entre l'énergie dépendant de l'aire et celle du périmètre.

$$L = \sum_{\substack{\text{pixels} \\ p}}^{N^2} \sum_{\substack{\text{voisins} \\ v}}^{20} (\delta_{pv} - 1) \quad (4.11)$$

### Énergie cellulaire

L'énergie totale de la cellule est calculée à partir de l'hamiltonien (4.5).

### Pression

La pression interne de la cellule est définie comme la dérivée de l'énergie de la cellule par rapport à son aire sans variation du périmètre ni des paramètres intrinsèques au modèle.

$$\Pi = -\frac{\partial \varepsilon}{\partial A} = -2\lambda_A (A - A_0) \quad (4.12)$$

Elle représente la compression ou l'allongement du gel d'actine à l'arrière de la membrane. La présence de protéines réticulant les filaments et de moteurs moléculaires dans cette organisation du cytosquelette apporte une certaine élasticité à la cellule. Le terme de conservation d'aire avec le module élastique de compression  $\lambda_A$  et l'aire cible  $A_0$  représente cet effet. Nous considérons que

### 4.3. Utilisation des résultats

---

les forces exercées par le gel sur la membrane et les fibres de stress périphériques sont des éléments déterminants dans la morphologie cellulaire.

#### Tension interfaciale

La tension interfaciale est considérée comme constante dans notre modèle. Plus le périmètre de la cellule est grand, plus l'énergie résultante de l'interface entre la cellule et son milieu est grande. Elle est définie comme la dérivée de l'énergie par rapport au périmètre de la cellule sans variation d'aire ni des autres paramètres.

$$\frac{\partial \varepsilon}{\partial L} = \gamma_{cm} \quad (4.13)$$

Tendant à rendre l'interface droite, la tension de ligne fait référence à la contractilité des fibres de stress. Lorsque les moteurs moléculaires des fibres de stress vont être activés, la tension générée va avoir tendance à tendre la fibre entre ses deux points d'ancrages, les adhérences focales. Nous pensons que la tension des fibres de stress détermine fortement l'état physiologique de la cellule, autrement dit sa forme.

#### Adhésion

L'énergie adhésive de surface nous servira de référence énergétique dans le modèle. C'est également la dérivée de l'énergie par rapport à la surface adhésive, en gardant les autres paramètres constants.

$$\frac{\partial \varepsilon}{\partial A_A} = \sigma_{cs} \quad (4.14)$$

Adsorber des protéines différentes ou changer l'affinité des intégrines reviendrait à modifier la valeur de  $\sigma_{cs}$  dans le modèle. Le fragment de fibronectine Fn710 étant exclusivement utilisé dans nos expériences, la valeur de ce terme ne change jamais. Il est le responsable majeur de l'effet du support micro-structuré observé sur les morphologies des cellules biologiques.

#### 4.3.2 Le déroulement d'une simulation

La Figure 4.9 présente des résultats typiques de simulations de deux cellules. Les valeurs des paramètres sont identiques, seule la position initiale change. L'aire initiale des cellules est supérieure à l'aire cible (MCS= 0 sur les images des cellules), nous discuterons de ce choix dans la partie suivante. Quelques MCS suffisent pour que la minimisation d'énergie des cellules provoque

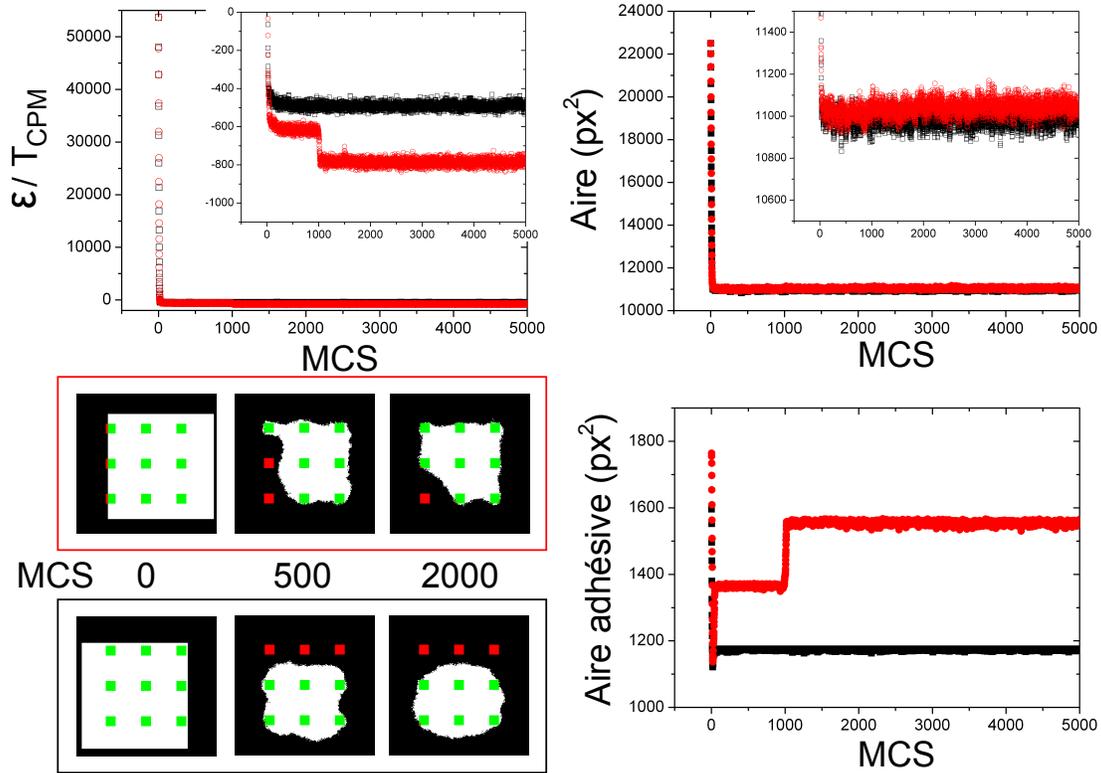


FIGURE 4.9: Graphiques présentant les énergies (haut à gauche), les aires (haut à droite) et les aires adhésives (bas à droite) de deux cellules modèles en fonction du nombre de pas de Monte-Carlo. Des images des configurations des cellules au pas 0, 500 et 2 000 sont également reportées (bas à gauche). Le code couleur des points sur les graphiques est le même que le cadre des images.

une chute importante de l'aire jusqu'à l'aire cible, ici définie à 11 000  $\text{px}^2$ . L'énergie diminue ainsi rapidement pour se stabiliser sur une valeur représentative de la morphologie. Après 500 MCS, les deux cellules n'ont pas trouvé le même nombre de plots adhésifs. Leur énergie est donc différente. Une cellule trouve un nouveau plot à MCS= 1 000, son énergie diminue à nouveau pour se stabiliser sur une nouvelle valeur. Les fluctuations d'énergie comme les fluctuations d'aire sont représentatives de la température.

Si des morphologies différentes sont obtenues pour un même jeu de paramètres<sup>†</sup>, cela veut dire qu'elles sont toutes les deux des minima locaux d'énergie. Les fluctuations thermiques ne permettant pas de passer d'une forme à l'autre.

<sup>†</sup>. Dans le cas présenté dans la Figure 4.9, si malgré un plus grand nombre de MCS, la cellule utilisant 6 plots ne termine pas sur une configuration à 8 plots.

#### 4.3.3 Les minima d'énergie du modèle

Les énergies des cellules forment un paysage d'énergie en fonction de leur configuration. Le réseau de plots est une composante essentielle de ce paysage. Les valeurs des paramètres intrinsèques au modèle :  $\gamma_{cm}$ ,  $\sigma_{cs}$ ,  $\lambda_A$ ,  $T_{CPM}$ ,  $A_0$  sont également déterminants dans sa topologie. Le paysage énergétique d'un système peut être représenté schématiquement par des vallées, des cols et des pics. Les vallées représentent les minima d'énergie locaux, les pics des barrières d'énergies séparant ces minima d'énergie. Les cols sont des passages entre les vallées, moins difficiles à franchir que les pics. La température  $T_{CPM}$  est utilisée pour explorer localement l'environnement énergétique. Durant la simulation, la cellule, pour minimiser son énergie, tente de trouver des états d'énergies inférieures. Cela revient à chercher le fond des vallées. Le passage d'une vallée à l'autre est effectué en franchissant certains cols, si les fluctuations thermiques le permettent.

Ainsi, si un nombre conséquent de MCS est utilisé pour une simulation, nous pouvons considérer que tous les états énergétiques accessibles proches de celui d'arrivée ont été explorés. Dans la suite, deux utilisations du modèle ont été explorées. Dans ce chapitre, nous ferons varier l'aire cible  $A_0$ , pour passer d'une vallée à l'autre car les cols sont inaccessibles aux fluctuations thermiques. Nous reproduisons ainsi la dispersion des aires d'une population de cellules. Nous nous plaçons dans une exploration large du paysage énergétique, où des petites cellules comme des plus grosses trouveront les morphologies minimisant leur énergie. Notre objectif ici est d'identifier l'ensemble des vallées.

Dans le chapitre 5 nous ferons varier les paramètres énergétiques du modèle en se focalisant sur une seule vallée. Notre objectif étant alors d'optimiser les paramètres du modèle en comparant les morphologies obtenues aux formes des cellules biologiques formant une population plus restreinte.

#### 4.3.4 Les ressources informatiques

Le code a été développé par J. Käfer et est basé sur la bibliothèque étendue CASH (pour Cellular Automata in Simulated Hardware disponible gratuitement sur : [www-binf.bio.uu.nl/rdb/software](http://www-binf.bio.uu.nl/rdb/software)), écrite par R. de Boer et A. Staritsky (Biologie théorique et bioinformatique - Université d'Utrecht, Hollande). Cette bibliothèque fonctionne sous UNIX et le développement graphique X11. Le format des images est le Portable Network Graphics (PNG) afin de conserver la meilleure précision sur les images. Il n'y a donc aucun lissage ni opération. Les pixels de l'image représentent exactement le cas étudié, leurs couleurs correspondent aux valeurs possibles (plan C de la Figure 4.6). Nous avons collaboré avec J. Käfer et F. Graner du Laboratoire de Spectrométrie Physique de Grenoble pour adapter le code à notre cas d'une cellule unique sur des motifs à contraste d'adhésion.

## 4.4 Expériences et simulations

Nous présentons dans cette partie les aspects expérimentaux et numériques.

### 4.4.1 Les conditions expérimentales

Nous avons utilisé dans cette partie des réseaux carrés adhésifs dont la séparation entre les plots est de  $10 \mu\text{m}$ . La taille des plots étant, elle, de  $5 \mu\text{m}$ . Cette géométrie nous place d'après les résultats du chapitre précédent dans le régime ordonné. Plutôt que de réaliser de vastes zones de plots, nous avons utilisé des motifs de carrés à 9 plots. Ces motifs sont séparés de plusieurs centaines de microns pour étudier des cellules bien isolées.

Les cellules de types Ledac ont été utilisées pour un temps d'adhérence de 4h. Le matériel et les méthodes expérimentales sont identiques aux expériences précédentes présentées dans le chapitre 3. Les mesures des morphologies des cellules observées expérimentalement sont effectuées avec le programme présenté dans la partie *Matériel et méthodes expérimentales* du chapitre 3.

### 4.4.2 Les simulations numériques

L'objectif des simulations est de trouver des minima d'énergie de l'hamiltonien du CPM. Nous souhaitons montrer, grâce à ces simulations, que les formes des cellules obtenues dans l'expérience correspondent bien à ces minima.

Afin de reproduire la dispersion d'aires de la population de cellules expérimentales, nous avons choisi de prendre une distribution d'aires cibles homogène allant de la plus petite cellule expérimentale à la plus grande. La distribution de  $A_0$  s'étend de  $50 \mu\text{m}^2$  à  $1\,200 \mu\text{m}^2$  avec un pas de  $25 \mu\text{m}^2$  entre chaque cas. Notre expérience numérique a donc à identifier les minima du paysage d'énergie en fonction de l'aire cible. 46 conditions seront ainsi testées pour lesquelles seule l'aire cible diffère d'un cas à l'autre. Nous avons lancé dix simulations par cas qui ont donné 460 formes. Parmi celles-ci, 119 se sont avérées instables, les 341 autres constituent la population que nous avons comparée aux résultats expérimentaux.

Chaque simulation comportait  $10^4$  MCS. En partant du principe qu'au bout d'un certain nombre de MCS, le minimum local d'énergie est proche de la configuration énergétique optimale de la cellule, un recuit est effectué en fin de simulation afin de laisser la cellule relaxer et d'obtenir des interfaces franches. Dans notre cas, après les  $10^4$  MCS de simulation à  $T_{CPM}$ , la température chute jusqu'à 20 avec  $\delta T = -3$  tous les dix MCS. Cela empêche les changements défavorables

#### 4.4. Expériences et simulations

---

énergétiquement. La simulation continue ensuite pendant  $4.10^3$  MCS, concluant le cycle de recuit. Cette technique permet d’obtenir des images directement comparables à l’expérience.

La taille de l’image a été choisie pour présenter la même résolution que celle des images obtenues expérimentalement. Une taille de  $100 \times 100$  pixels permet d’inclure un motif unique de neuf plots carrés avec une distance inter-plots de  $10 \mu\text{m}$ . Grâce à cette échelle, les images obtenues en simulation pourront directement être comparées aux clichés expérimentaux. Nous nous affranchissons des redimensionnements d’images qui peuvent altérer la qualité et le contraste.

L’aire initiale des cellules simulées est plus grande que la taille totale du motif :  $A_i = 1\,000 \mu\text{m}^2$ . Cette condition peu conventionnelle permet d’obtenir des résultats plus cohérents avec les observations expérimentales. Une cellule simulée bénéficie de cette aire initiale élevée pour rester sur un plus grand nombre de plots. Les évolutions typiques de l’énergie et de l’aire sont reportées sur la Figure 4.9. Dans le cas d’une aire initiale nulle, l’acquisition d’un nouveau plot est en effet dépendante uniquement des fluctuations. Celles-ci permettent difficilement d’explorer l’environnement lointain de la cellule, c’est à dire l’acquisition d’un nouveau plot adhésif. Les formes simulées ont dans ce cas toujours tendance à être gonflées plutôt que tendues, cela ne correspond pas à nos observations.

La première étape de simulation a consisté à tester le domaine de validité du modèle. Des simulations relativement courtes ont été effectuées en faisant varier  $\gamma_{cm}$ ,  $\lambda_A$  et  $T_{CPM}$  afin de trouver les intervalles de valeurs pour lesquels les cellules sont considérées comme stable. Cette stabilité est vérifiée lorsque la cellule ne se divise pas en morceaux, lorsqu’elle ne disparaît pas ou encore lorsqu’elle ne dépasse pas les frontières de l’image. Ces cas seront donc appelés instables dans la suite. La Figure 4.10 résume les intervalles de validité des paramètres. La grande variabilité des paramètres montre la robustesse du modèle. Ce dernier produit des formes stables pour des valeurs de paramètres variant sur plusieurs ordres de grandeur.

	$\sigma_{cs}$	$\gamma_{cm}$	$\lambda_A$	$T_{CPM}$
Min	ref	$5 \text{ UP}/px$	$0.1 \text{ UP}/px^4$	$1 \text{ UP}$
Max	ref	$50 \text{ UP}/px$	$100 \text{ UP}/px^4$	$1\,000 \text{ UP}$
Sel	$-250 \text{ UP}/px^2$	$30 \text{ UP}/px$	$0.1 \text{ UP}/px^4$	$300 \text{ UP}$

FIGURE 4.10: Tableau récapitulatif des paramètres de Potts avec leurs valeurs minimales et maximales au delà desquelles les résultats obtenus sont instables.  $\sigma_{cs}$  n’a pas de minimum ou maximum car elle est utilisée comme énergie de référence. La ligne *Sel* pour "sélectionné" indique le jeu de paramètres des simulations dont les résultats sont utilisés dans la suite. UP désigne les unités arbitraires énergétiques du modèle (Unités Pottsiennes).

Suite à ces simulations tests, des intervalles de valeurs plus restreints ont été définis en utilisant un accord visuel qualitatif entre les formes simulées et les formes des cellules biologiques. Ces simulations ont permis de sélectionner un jeu de paramètres énergétiques, reportés dans le tableau de la Figure 4.10, valides pour un nombre restreint de forme. Sur cette seule étude préliminaire, une série de simulation a été préparée avec une distribution homogène de  $A_0$ .

## 4.5 Formes d'équilibre

Nous présentons dans cette partie les résultats des simulations décrites dans la partie précédente et les comparons aux résultats expérimentaux.

### 4.5.1 Le confinement énergétique des cellules

La Figure 4.11 permet de comparer qualitativement quelques formes obtenues expérimentalement et en simulation. La seule différence ici entre les formes simulées est  $A_0$ . Cela montre qu'il est possible pour un seul jeu de paramètres de reproduire qualitativement avec le CPM l'aspect des formes observées expérimentalement. Autrement dit, même si les cellules simulées ont des tailles caractéristiques différentes (de  $50 \mu m^2$  à  $1\ 200 \mu m^2$ ), les valeurs des paramètres énergétiques correspondent à une population entière de cellules et non une seule morphologie.

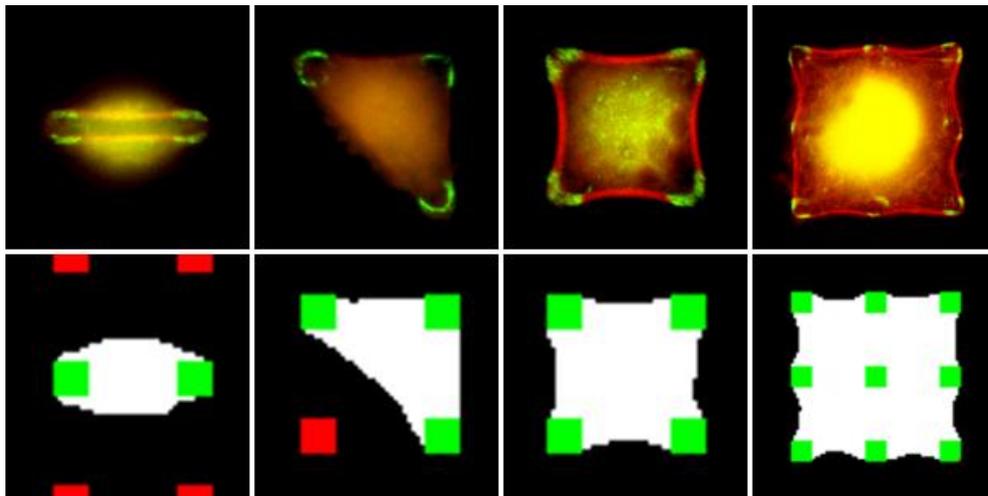


FIGURE 4.11: Comparaison des organisations cellulaires de cellules fixées et des résultats numériques. **Haut** : cellules en adhérence présentant une forme géométrique : 2A, 3A, 4A et 9A de gauche à droite sur un réseau de plots distant de  $10 \mu m$ . Temps d'adhérence avant fixation pour l'expérience : 4h. **Bas** : formes correspondantes issues de cellules simulées dont les paramètres sont reportés dans la Figure 4.10.

## 4.5. Formes d'équilibre

Une analyse statistique de cet accord qualitatif est représentée sur la Figure 4.12. Celle-ci compare les aires moyennes de chaque classe de forme (2A, 3A...) obtenue expérimentalement ou par simulations. Nous voyons une très grande corrélation qui confirme que toutes les formes des cellules observées expérimentalement correspondent à une forme obtenue avec le CPM et vice versa. Cela signifie que les organisations de cellules adhérentes sur un réseau de plots adhésifs correspondent à des minima locaux d'énergie.

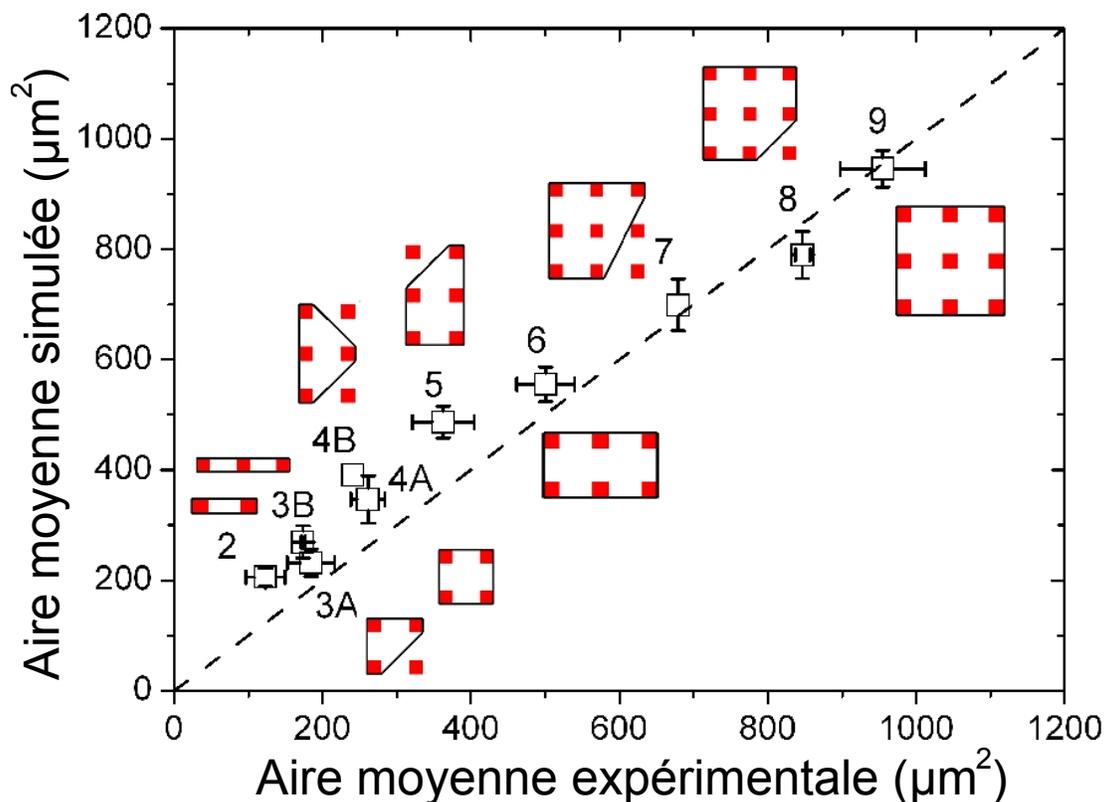


FIGURE 4.12: Comparaison pour chaque forme géométrique de l'aire moyenne des cellules observées expérimentalement et des cellules obtenues par simulation sur un réseau de plots  $R_{10}$ . Les barres d'erreur correspondent aux écarts types des distributions d'aires obtenues. Les formes théoriques (notées 2 pour 2A etc... si une seule morphologie est observée pour un nombre de plots donné) sont en insert.

### 4.5.2 Des formes plus observées que d'autres

Les méthodes de classification développées dans le chapitre précédent nous ont permis de déterminer la forme la plus probable statistiquement. Le CPM nous indique que toutes les formes résultent de la minimisation d'une fonctionnelle d'énergie. Le modèle permet-il de reproduire les distributions statistiques mesurées ?

La Figure 4.13 compare les taux d'occupation observés expérimentalement et obtenus avec les simulations. Dans le cas des cellules biologiques, la forme carrée 4A est très nettement majoritaire comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent. Elle est la forme préférentielle la plus observée dans une majorité d'expériences. Ce résultat n'est pas reproduit par le CPM pour lequel la forme carrée 9A est la plus probable. Cela s'explique simplement par le fait que la distribution des aires cibles des simulations est homogène alors que la distribution des aires expérimentales ne l'est pas, comme le rappelle la distribution sur un réseau *R10* de la Figure 3.7. Il n'y a donc aucune raison pour que les statistiques coïncident. Notons toutefois que le CPM trouve en majorité des formes élémentaires de compacité maximale qui sont des combinaisons de formes carrées 4A.

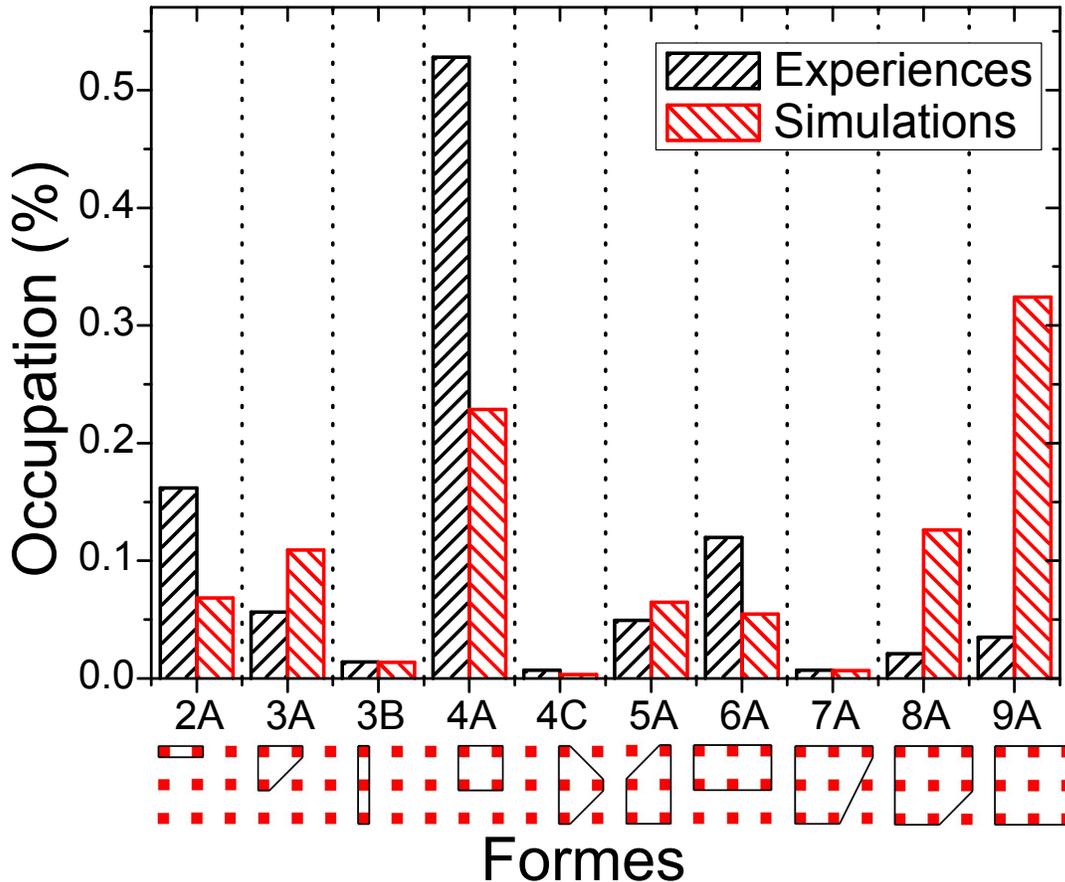


FIGURE 4.13: Taux d'occupation des formes reproduites par le modèle et des formes expérimentales.

## 4.5. Formes d'équilibre

---

### 4.5.3 La correspondance des énergies

En faisant le lien entre les valeurs des paramètres du modèle et leur correspondance biologique, nous avons accès à de nouvelles informations. Nous avons gardé la valeur de l'énergie d'adhésion  $\sigma_{cs}$  constante. Cela fixe une échelle d'énergie. Nous pouvons obtenir une estimation expérimentale de cette valeur. En effet, des travaux de mesure de force par AFM ont permis de déterminer l'énergie de dissociation intégrine/fibronectine sur des cellules musculaires (Sun *et al.*, 2005).

Une bille placée à la pointe du cantilever d'AFM et recouverte de fibronectine est mise au contact d'une cellule musculaire afin de créer un site adhésif. Le cantilever est ensuite retiré jusqu'à rupture des liaisons spécifiques entre les intégrines et les protéines adhésives. La force mesurée qui est nécessaire à la dissociation des complexes est de 39 pN. La rupture est observée pour un déplacement du cantilever  $l = 110$  nm. L'énergie  $E$  de la dissociation d'un complexe fibronectine/intégrine est définie comme :

$$\begin{aligned} E &= F \times l \\ &= 4,3 \cdot 10^{-18} \text{ J} \end{aligned} \tag{4.15}$$

D'autres travaux sur un autre type cellulaire (K562) basés sur le même principe ont déterminé l'énergie de dissociation d'une intégrine avec un fragment Fn710 (Li *et al.*, 2003). Une énergie de dissociation d'un complexe Fn710/intégrine de  $35 \cdot 10^{-18}$  J a été mesurée. Un ordre de grandeur nous permet d'avoir une estimation de l'énergie de l'interaction d'un complexe. Nous connaissons la densité de protéines immobilisées sur la surface (voir chapitre 2). Cela nous permet d'avoir une estimation de l'énergie de surface  $\Sigma_{adhésion}$  correspondante à  $\sigma_{cs}$  :

$$\Sigma_{adhésion} = 2,2 \cdot 10^{-12} \text{ J}/\mu\text{m}^2 = 2,2 \text{ J}/\text{m}^2 \tag{4.16}$$

Nous considérons également dans le modèle que l'énergie nécessaire à séparer le complexe Fn710/intégrine  $\alpha_1\beta_5$  est la même que celle pour les assembler. Faire le lien entre ce paramètre et sa valeur dans le réel permet d'obtenir toutes les autres correspondances, de la température de Potts au module élastique de compression.

$$\begin{aligned} \Sigma_{adhésion} &= \alpha \sigma_{cs} \\ \text{avec } \alpha &= 8,8 \cdot 10^{-3} \left[ \frac{\text{J px}^2}{\text{UP m}^2} \right] \end{aligned} \tag{4.17}$$

Le coefficient  $\alpha$  contient à la fois la correspondance des énergies et des distances. Nous définissons pour chaque paramètre de Potts :  $\gamma_{cm}$ ,  $\lambda_A$  et  $T_{CPM}$  son équivalent dans le réel :  $\Gamma_{interface}$ ,  $\kappa_{élastique}$  et  $T_{fluctuation}$ . Les relations pour ces paramètres<sup>‡</sup> sont :

$$\Gamma_{interface} = 11,3 \alpha e \gamma_{cm} \quad (4.18)$$

$$\kappa_{élastique} = \frac{\alpha}{e^2} \lambda_A \quad (4.19)$$

$$T_{fluctuation} = \alpha e^2 \frac{T_{CPM}}{k_B} \quad (4.20)$$

En utilisant les équations définies précédemment ((4.17), (4.18), (4.19) et (4.20)) les valeurs des paramètres sont calculées et reportées dans la Figure 4.14 avec : l'échelle  $e = 0,58.10^{-6} m/px$  et  $k_B = 1,38.10^{-23} J/K$  la constante de Boltzmann.

Potts	$\sigma_{cs}$	$\gamma_{cm}$	$\lambda_A$	$T_{CPM}$
	$-250 UP/px^2$	$30 UP/px$	$0,1 UP/px^4$	$300 UP$
Réel	$\Sigma_{adhésion}$	$\Gamma_{interface}$	$\kappa_{élastique}$	$T_{fluctuation}$
	$-2,2 J/m^2$	$1,7.10^{-6} J/m$	$2,6.10^9 J/m^4$	$6,4.10^{10} K$
	$-2,2.10^{-12} J/\mu m^2$	$1,7.10^{-12} J/\mu m$	$2,6.10^{-15} J/\mu m^4$	

FIGURE 4.14: Tableau des paramètres énergétiques de Potts avec leurs valeurs pour les simulations présentées et leurs correspondances énergétiques réelles.

On peut relier les paramètres de Potts à des grandeurs mesurables expérimentalement.  $\gamma_{cm}$  correspond à la contraction des fibres de stress. L'ordre de grandeur des forces exercées par des fibres de stress sur le support est de 10 à 20 nN pour des fibroblastes humains et des tailles d'adhérences focales de 3 à 5  $\mu m^2$  (Balaban *et al.*, 2001). Notre modèle considère une adhésion sur la totalité du plot adhésif. D'après la relation linéaire suggérée dans ces travaux de 5,5 nN/ $\mu m^2$ , la force correspondante à une taille d'adhérence focale de 16  $\mu m^2$  serait proche de 100 nN. Or la correspondance des énergies montre que la tension exercée dans les simulations est de l'ordre du  $\mu N$ , soit un ordre de grandeur supérieur. Cette différence est cohérente avec la dispersion des interactions fibronectine/intégrine mesurée.

<sup>‡</sup>. La présence du préfacteur 11,3 dans l'équation 4.18 a été expliqué précédemment, il est déterminé par la méthode de mesure du périmètre des cellules simulées.

### 4.6 Conclusion

L'objectif de cette partie était de reproduire à partir d'un modèle physique les organisations du cytosquelette d'actine observées sur des cellules adhérentes sur un réseau de plots adhésifs. Le CPM nous a permis de reproduire de manière qualitative l'ensemble de ces organisations. Il est donc clair que les formes prises par les cellules obéissent à une loi physique déterminée par la minimisation d'une énergie, de manière analogue aux formes prises par des gouttes d'eau sur un support à contraste hydrophobique. Les formes obtenues correspondent à des minima locaux d'énergie. Lors de l'adhérence, une cellule va transiter d'un minimum vers un autre. Ceux-ci sont donc des états d'équilibre métastables. L'extraordinaire organisation du cytosquelette que nous observons provient du fait que le temps de passage d'une forme à l'autre doit être beaucoup plus grand que le temps de relaxation du cytosquelette. Ce dernier a ainsi le temps de s'organiser de manière à minimiser la fonctionnelle d'énergie de Potts. Cela est cohérent avec les observations du chapitre 3 qui indiquent que les réseaux ralentissent l'adhésion.

Néanmoins, il est clair que le modèle de Potts Cellulaire tel que nous l'avons présenté ne décrit pas la machinerie complexe de la régulation biochimique de l'adhérence cellulaire. Pour tenir compte de cette régulation, il faudrait au cours d'une simulation changer les paramètres du modèle en fonction de la configuration du système. Par exemple, l'activation de la contractilité par Rho, serait similaire à une augmentation de la tension de ligne :  $\gamma_{cm}$ . Celle-ci doit suivre une période pendant laquelle Rac est activée et permet la recherche de nouveaux sites adhésifs. Cela pourrait également être associé à une variation de l'aire cible  $A_0$ . Nous pourrions de cette manière reproduire la succession des formes métastables utilisées par la cellule lors du processus d'adhésion.

A partir de données de la littérature, nous avons pu estimer certaines valeurs des paramètres du modèle. Dans le chapitre suivant, nous allons nous concentrer sur une seule classe de forme et ajuster finement les paramètres du CPM pour reproduire la morphologie des cellules. Nous pourrions en déduire des informations concernant les paramètres biologiques qui régulent cette formes.



# Chapitre 5

## *Courbure des fibres de stress*

”UN SYSTÈME VIVANT EST UN SYSTÈME OUVERT ET POURTANT STABLE.”

Léon Brillouin (1889 - 1969)

Physicien français



## Chapitre 5

# La courbure des fibres de stress, conséquence d'une compétition de forces

En nous basant sur le CPM, nous abordons dans ce chapitre le lien entre la courbure des fibres de stress et les paramètres du modèle. Nous verrons que cette courbure dépend de la compétition entre la contractilité des fibres de stress et l'élasticité du gel, toutes deux représentées respectivement par  $\gamma_{cm}$  et le couple  $(\lambda_A, A_0)$ . En effet, la tension de ligne tend à rendre les interfaces droites entre les plots adhésifs et s'oppose à la pression de la cellule qui la maintient proche de son aire cible grâce au coefficient d'élasticité. En développant ce lien dans le cadre du CPM, nous obtenons un diagramme de phase d'une forme en fonction de deux paramètres sans dimension.

Nous pouvons reproduire dans ce diagramme les classes de cellules, tendues, courbées ou gonflées observées expérimentalement. Une étude approfondie des paramètres du diagramme montre qu'il est possible de reproduire les résultats expérimentaux par des simulations. Nous démontrons donc la capacité du CPM à reproduire des morphologies expérimentales avec précision.

Nous terminerons en évoquant des expériences préliminaires dans lesquelles les paramètres biologiques ont été altérés par l'utilisation d'inhibiteurs de la myosine II. Le rapport de force entre la contractilité des fibres de stress et l'élasticité du gel est changé, ce qui a pour conséquence de modifier la courbure.

La motivation biologique provient du fait que tout au long des études expérimentales, nous avons remarqué que les fibres de stress étaient toujours courbées. Pourtant, la contraction d'une fibre de stress aurait tendance à la rendre droite. Ce phénomène a déjà été reporté sur des supports micro-structurés où le rayon de courbure d'une fibre de stress augmentait dans le temps (Théry

## Chapitre 5. La courbure des fibres de stress, conséquence d'une compétition de forces

---

*et al.*, 2006). Le gel d'actine est relié de manière encore inconnue aux fibres et exerce une force sur celle-ci qui induit la courbure. La compétition entre les forces, due aux moteurs moléculaires présents dans les deux organisations et au lien entre les fibres et le cytosquelette est une question ouverte, à laquelle ce chapitre apporte des éléments de réponse. Notre objectif est ici de proposer un formalisme pour étudier ces courbures.

---

## Sommaire

---

5.1	Modéliser la courbure d'une fibre de stress . . . . .	<b>137</b>
5.1.1	Hypothèse : courbure de fibre de stress constante . . . . .	137
5.1.2	Le CPM et la loi de Laplace . . . . .	137
5.2	Simulations . . . . .	<b>138</b>
5.2.1	La modélisation . . . . .	138
5.2.2	Mesures . . . . .	140
5.3	Loi de Laplace et diagramme de phase . . . . .	<b>141</b>
5.3.1	La simulation comparée au modèle . . . . .	141
5.3.2	La construction du diagramme de phase . . . . .	142
5.3.3	La correspondance avec l'expérience . . . . .	144
5.4	Expérience préliminaire . . . . .	<b>146</b>
5.5	Conclusion . . . . .	<b>148</b>

---



### 5.1 Modéliser la courbure d'une fibre de stress

Nous allons dans cette première partie vérifier que la loi de Laplace s'applique à notre modèle.

#### 5.1.1 Hypothèse : courbure de fibre de stress constante

Les modèles sur les fibres de stress sont assez répandus comme nous l'avons vu dans le chapitre introductif. U. Schwarz et I. Bischof ont développé un modèle reliant le rayon de courbure en fonction de l'écartement des plots adhésifs (Bischofs *et al.*, 2008). Ils supposent que l'équation de Laplace est valide et relie à la courbure de l'interface le rapport entre : la *tension de surface* qui tire la fibre vers l'intérieur de la cellule et la *tension de ligne* qui a pour effet de rendre la fibre droite. Les distances d'écartement des plots allant de 5 à 20  $\mu\text{m}$ , la précision de la mesure du rayon de courbure par microscopie est telle que cette hypothèse se vérifie à l'ordre 0. Ainsi, considérer la courbure de la fibre de stress comme constante, est raisonnable.

Dans le cadre du CPM, la cellule est considérée comme homogène. La pression qui représente la tension de surface ainsi que la tension de ligne doivent être identiques le long des interfaces cellule/milieu. Cela nous amène à considérer que la courbure obtenue par les simulations est constante. Nous allons donc vérifier qu'avec cette hypothèse, le modèle de Potts vérifie la loi de Laplace.

#### 5.1.2 Le CPM et la loi de Laplace

Nous nous basons sur une expression classique de l'énergie de la cellule d'après l'équation (4.5) du CPM. Nous allons considérer la cellule utilisant la forme carrée sur 4 plots adhésifs tout au long de ce chapitre pour plus de simplicité et parce que c'est la forme prédominante. Nous rappelons ici la multiplication par le préfacteur 11,3 du coefficient de tension de ligne  $\gamma_{cm}$  lorsque des résultats numériques seront donnés. La différentielle de l'énergie s'exprime dans le cas de ce système :

$$d\varepsilon = \gamma_{cm}dL + \sigma_{cs}dA_A + 2\lambda_A(A - A_0)dA \quad (5.1)$$

Pour un système à l'équilibre dont l'aire adhésive est constante, l'équilibre thermodynamique s'exprime par l'équation :

$$-\frac{2\lambda_A(A - A_0)}{\gamma_{cm}} = \frac{dL}{dA} \quad (5.2)$$

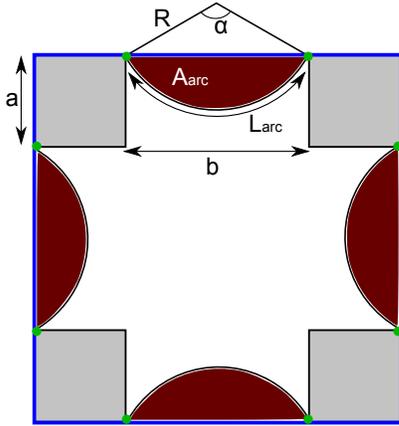


FIGURE 5.1: Schéma de la courbure entre 2 plots distants de  $b$  soit un arc de cercle de rayon  $R$ , de longueur  $L_{arc}$ .

En utilisant la géométrie de la forme d'une cellule en forme carrée utilisant 4 plots adhésifs (Figure 5.1), nous relierons  $dL/dA$  au rayon de courbure :

$$-\frac{2\lambda_A(A - A_0)}{\gamma_{cm}} = -\frac{1}{R} \quad (5.3)$$

Les calculs relatifs au lien entre  $dL/dA$  et  $1/R$  sont abordés dans l'Annexe B : *Calculs*. En utilisant la

pression de la cellule définie dans le chapitre 4 par l'équation (4.12), nous pouvons simplifier l'égalité (5.3) :

$$\frac{\Pi}{\gamma_{cm}} = -\frac{1}{R} \quad (5.4)$$

Nous retrouvons ici l'équation de Laplace pour une forme convexe. Nous avons obtenu à partir de l'énergie de notre modèle une reproduction de la loi de Laplace bidimensionnelle de manière rigoureuse. Nous verrons dans la suite que notre modèle respecte cette loi lorsque nous comparons des rayons de courbure mesurés sur des images provenant de simulation avec les rayons de courbures issus de ce calcul.

## 5.2 Simulations

Les simulations réalisées dans ce chapitre avaient pour objectif d'obtenir un diagramme de phase décrivant l'ensemble des morphologies possibles de la forme carrée sur 4 plots adhésifs. Elles ont également servi à vérifier la validité de l'équation (5.4).

### 5.2.1 La modélisation

L'aire de référence  $A_0$  sera constante tout au long de ce chapitre. Elle correspond à l'aire moyenne des populations de cellules adhérentes sur les champs de plots pour des écartements de plots supérieurs à  $10 \mu\text{m}$ . Elle sera donc égale à  $400 \mu\text{m}^2$ . En effet, ces aires moyennes expérimentales peuvent être assimilées à l'aire préférentielle des cellules soumises aux contraintes de plots adhésifs distants. Comme dans le chapitre précédent, l'aire initiale des cellules est supérieure à celle du motif adhésif (4 plots).

## 5.2. Simulations

---

Nous souhaitons trouver quelles courbures d'interface vont minimiser l'énergie de la cellule. La position d'initiation des cellules n'a aucune influence sur les résultats puisqu'au premier pas de Monte-Carlo, les cellules recouvrent largement les zones adhésives. Les paramètres suivants concernant l'initialisation sont donc identiques pour toutes les simulations présentées : le nombre de plots et leur largeur  $a$ , l'écartement des plots  $b$ , l'aire préférentielle  $A_0$ , l'aire et la position initiales.

La taille de l'image de 200 pixels de côté a été choisie pour correspondre à la résolution expérimentale de l'objectif utilisé pour l'expérience. Nous avons fixé le nombre de MCS à  $10^6$  qui nous assure de tester toutes les configurations. Pour chaque valeur des paramètres variables, nous testons 10 cellules pour vérifier la reproductibilité des résultats. L'énergie surfacique  $\sigma_{cs}$  est conservée comme énergie de référence.

Les trois paramètres énergétiques du modèle : la tension de ligne  $\gamma_{cm}$ , le coefficient élastique de compression  $\lambda_A$  relié à la pression interne de la cellule et la température de fluctuations thermiques notée  $T$  dans ce chapitre, vont être variables. Nous avons construit deux paramètres  $M$  et  $S$ , sans dimension, qui vont déterminer le rayon de courbure. Le premier  $M$  représente la compétition entre la tension de surface et la tension de ligne (compétition fibre de stress - gel). Le second  $S$  représente la compétition entre la tension et les fluctuations thermiques. Il reproduit la dispersion des morphologies lors de comparaisons avec une population expérimentale. Pour des raisons de dimension, ces deux paramètres font intervenir l'aire préférentielle. Ils sont définis de la manière suivante :

$$M = \frac{\lambda_A A_0^{3/2}}{\gamma_{cm}} \quad (5.5)$$

$$S = \frac{T}{\gamma_{cm} A_0^{1/2}} \quad (5.6)$$

Les résultats des simulations ont été classifiés en fonction des paramètres  $M$  et  $S$  à partir desquels nous construirons le diagramme de phase. Nous verrons que les domaines de validité de ces paramètres sont très larges, démontrant à nouveau la robustesse du modèle. La multiplication par un même facteur des paramètres, à l'exception d' $A_0$ , intervenant dans  $M$  et  $S$  donne des résultats identiques (vérifié dans la suite sur la Figure 5.7).

## 5.2.2 Mesures

Les mesures sont effectuées sur une image représentative d'un cas de simulation. A partir de chaque cellule simulée avec les mêmes paramètres  $M$  et  $S$ , 44 images sont sélectionnées aléatoirement dans la séquence d'étude des configurations. Une moyenne des 440 images (44 images  $\times$  10 cellules) donne l'image résultat utilisée pour les mesures.

### Mesure du rayon de courbure

Pour vérifier l'hypothèse du rayon de courbure constant, celui-ci sera mesuré de manière locale avec un programme développé sur Matlab (Roth, 2009). Afin de minimiser le bruit, les 440 images sont moyennées. Une moyenne des quatre interfaces est réalisée en effectuant des rotations de l'image.

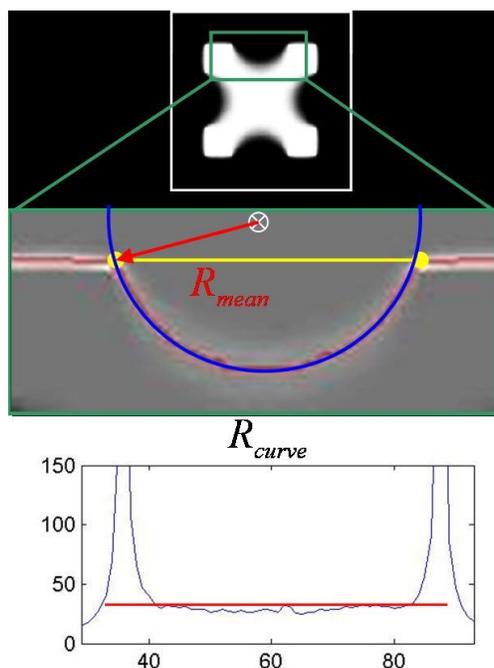


FIGURE 5.2: Mesure du rayon de courbure sur une image représentative d'un cas simulé. L'image résultat représentant la moyenne des 440 images issues des simulations après rotation et moyenne pour obtenir une image symétrique (en haut) est traitée afin de mesurer localement la courbure (zoom au milieu). Le rayon de courbure local (en bas) est directement mesuré tout le long de la cellule.

Nous vérifions d'après la Figure 5.2 que le rayon de courbure local est constant sur toute la longueur de l'interface non adhésive en accord avec notre hypothèse. Un cercle (en bleu) de rayon égal au rayon de courbure moyen se superpose parfaitement à l'interface. Pour chaque cas de simulation, un rayon moyen  $R_{mes}$  est ainsi mesuré.

### 5.3. Loi de Laplace et diagramme de phase

---

#### Mesure de l'aire

Pour calculer le rayon de courbure de l'équation (5.3), la mesure de l'aire des cellules suffit. Les autres paramètres étant connus et définis dans la simulation, le calcul est directement intégré dans le programme Matlab de mesure locale de la courbure. Un seuillage est effectué sur l'image moyennée pour supprimer les zones faiblement occupées. Le seuil a été fixé à 50% de l'intensité totale, ce qui correspond à l'aire moyenne. Un rayon de courbure  $R_{cal}$  est associé à chaque cas simulé. Ainsi, un couple de paramètre  $(M, S)$  contient deux rayons de courbure  $R_{mes}$  et  $R_{cal}$  qui seront comparés.

### 5.3 Loi de Laplace et diagramme de phase

Dans cette partie, en se basant sur les mesures définies dans la partie précédente, nous vérifions dans un premier temps que le CPM obéit à la loi de Laplace. Nous construisons ensuite un diagramme de phase des cellules adhérentes sur la forme carrée 4 plots distants de 10  $\mu\text{m}$ .

#### 5.3.1 La simulation comparée au modèle

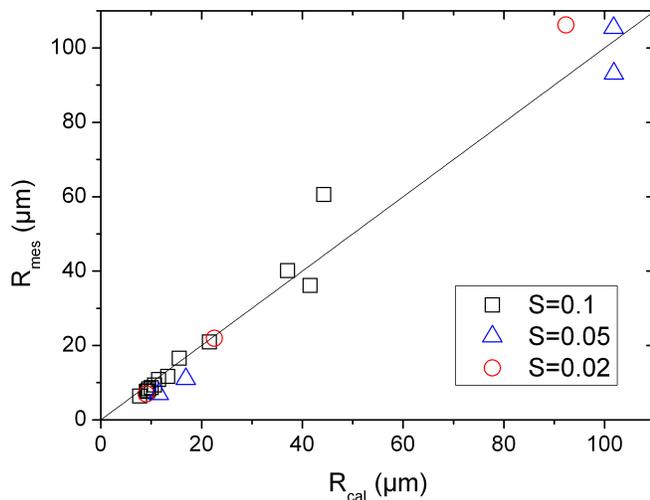


FIGURE 5.3: Graphique représentant le rayon de courbure mesuré de différents cas de simulations en fonction du rayon de courbure calculé à partir de l'équation (5.3).

Afin de vérifier si les simulations sont cohérentes avec la loi de Laplace décrite par le modèle, une comparaison entre les rayons de courbures mesurés sur les images issues de simulations et

ceux calculés à partir de l'équation de Laplace : équation (5.4), est reportée dans la Figure 5.3. Les rayons de courbures mesurés sont tracés en fonction des rayons de courbures calculés.

La corrélation entre les rayons de courbure est satisfaisante et démontre la validité de la loi de Laplace dans ce système.

### 5.3.2 La construction du diagramme de phase

La diagramme de phase a été construit en réalisant des simulations en faisant varier les paramètres :  $T$ ,  $\gamma_{cm}$  et  $\lambda_A$  de manière systématique. Les résultats ont ensuite été regroupés en fonction des valeurs des paramètres  $M$  et  $S$  correspondantes.

Le diagramme obtenu est représenté sur la Figure 5.4. Les images incluses dans le diagramme permettent de visualiser directement les effets des variations des paramètres. Chaque image correspond à un résultat typique obtenu pour le couple  $(M, S)$  considéré.

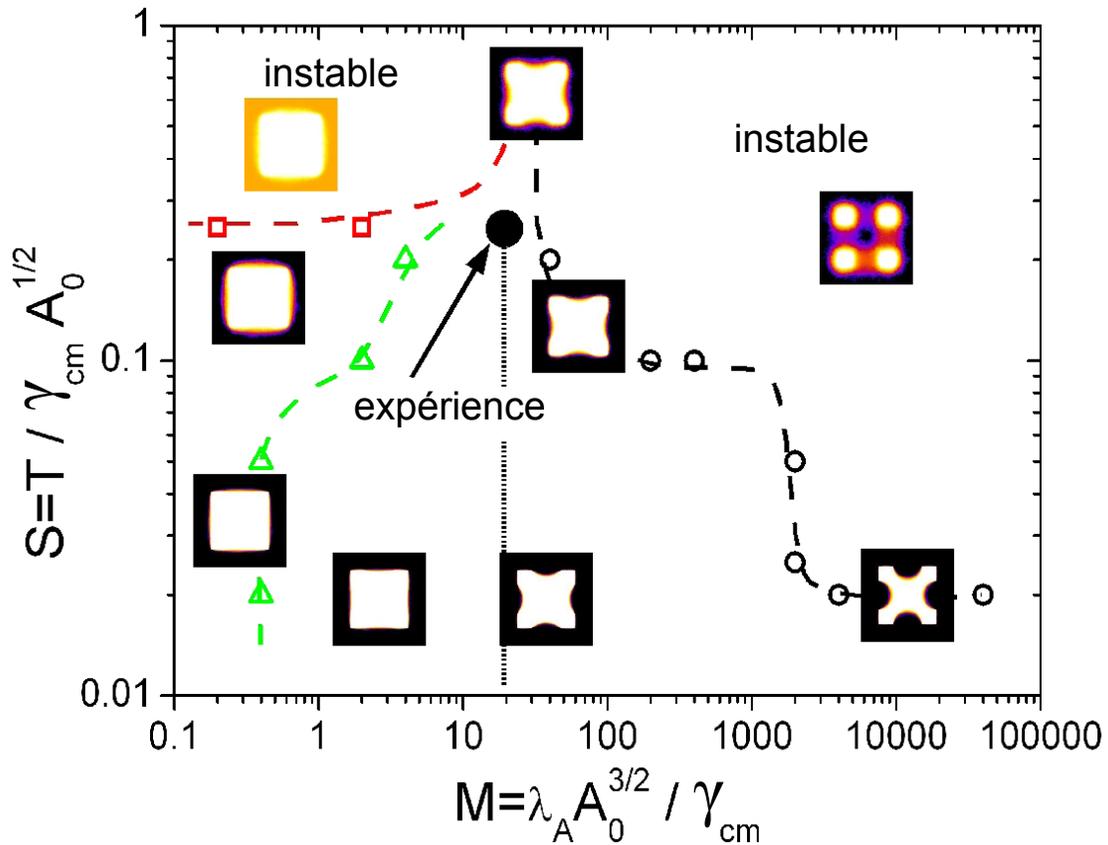


FIGURE 5.4: Diagramme des courbures en fonction des paramètres  $M$  et  $S$ . La frontière en vert délimite la transition entre les cellules contractées et gonflées. Celle en rouge délimite les cas non physiques de dépassement d'image et les cas valides. La frontière noire concerne les autres cas non physiques de fragmentation de cellules. Les axes sont tracés de manière logarithmique.

### 5.3. Loi de Laplace et diagramme de phase

Deux comportements non physiques sont observés. Premièrement, pour des valeurs très faibles de  $M$ , correspondant à une faible élasticité du gel contre une forte contractilité des fibres, les fluctuations d'aire vont dépasser les limites de l'image. La ligne en pointillé rouge délimite dans le diagramme les zones où nous avons observé ce comportement.

Deuxièmement, pour une très faible contractilité de fibre et une forte élasticité du gel, les configurations de cellules fragmentées sont favorables énergétiquement. La frontière entre ces cas et le domaine valide est représentée par la ligne en pointillés noirs. De manière générale, un paramètre  $S$  plus faible pour une même valeur de  $M$  va stabiliser la morphologie et présenter des interfaces cellule/milieu très bien définies.

Nous avons également trouvé une transition entre des cellules convexes et concaves correspondant respectivement à des cellules contractées ou bien gonflées (ligne verte).

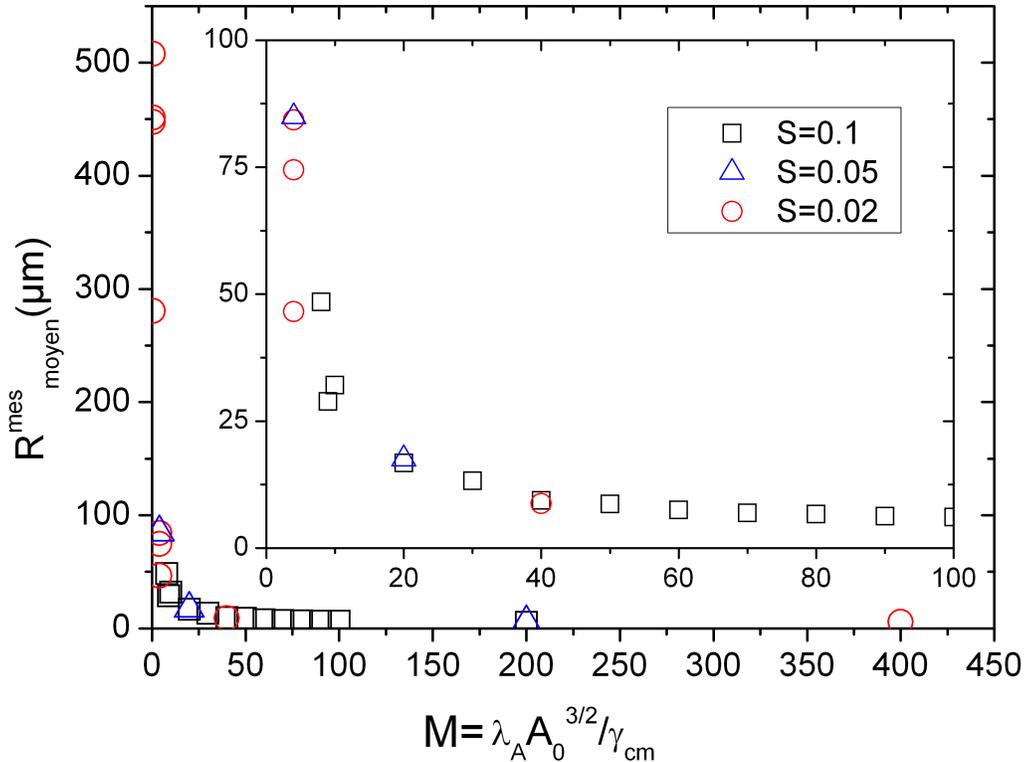


FIGURE 5.5: Graphique représentant le rayon de courbure mesuré de plusieurs cas de simulations en fonction de différentes compétitions  $M$ . Trois niveaux de fluctuations ont été tracés,  $S = 0, 02, S = 0, 05$  et  $S = 0, 1$ . Un agrandissement sur  $R, M \in [0, 100]$  est placé en insert.

Nous avons représenté sur la Figure 5.5 le rayon de courbure mesuré en fonction du paramètre  $M$ . Les points correspondants à des simulations réalisées à différentes valeurs de  $S$  mais à des

valeurs de  $M$  identiques se superposent. Le rayon de courbure ne change pas en fonction des fluctuations thermiques. Cela n'est pas surprenant puisque d'après l'équation (5.4) qui se réécrit en fonction de  $M$ , il ne dépend pas de la température :

$$R = \frac{A_0^{3/2}}{2M(A - A_0)} \quad (5.7)$$

Avec des conditions géométriques, nous montrons que :

$$A = (2a + b)^2 - 4R^2 \arcsin\left(\frac{b}{2R}\right) + 2Rb\sqrt{1 - \left(\frac{b}{2R}\right)^2} \quad (5.8)$$

Ces deux équations relient la géométrie du réseau aux paramètres  $M$  et  $A_0$ , eux-mêmes reliés à la biologie du système.

D'après les mesures des rayons de courbures données dans la Figure 5.5, lorsque  $M$  est supérieur à 100, le rayon de courbure reste à sa valeur minimum :  $b/2 = 5 \mu\text{m}$ . Augmenter la valeur de  $M$  au delà va induire une interface dont le rayon de courbure ne sera plus constant. L'hypothèse du rayon de courbure constant n'est plus valide, la loi de Laplace ne s'applique plus. Physiquement, cela signifie que le système a atteint son aire cible. Biologiquement, cela signifie que le système n'est pas capable de développer une contractilité suffisante pour s'écarter de son aire cible.

### 5.3.3 La correspondance avec l'expérience

Les échantillons utilisés dans le chapitre précédent nous ont permis de placer un point expérimental sur le diagramme. Pour cela, nous avons sélectionné toutes les formes correspondant au carré  $4A$ . Après avoir effectué un seuillage pour transformer les images en niveau de gris en images binaires, nous les avons moyennées de la même manière que les images simulées (Figure 5.6). Cela permet d'obtenir le rayon de courbure moyen d'une population de cellules avec précision :  $R = 15,6 \mu\text{m}$ . Nous en avons déduit la valeur correspondante du paramètre  $M$  d'après la Figure 5.5 :  $M = 20$ . Il reste à déterminer la valeur du paramètre  $S$  qui va représenter dans ce cas la dispersion des morphologies.

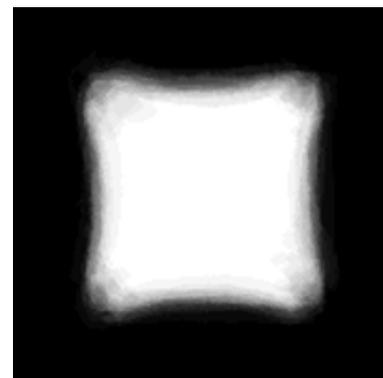


FIGURE 5.6: Image moyennée à partir de 55 cellules adhérentes en configuration  $4A$ .

### 5.3. Loi de Laplace et diagramme de phase

Pour cela, nous effectuons une coupe en partant du centre de la cellule vers l'extérieur au niveau du milieu de l'interface. Nous obtenons ainsi une mesure du taux d'occupation sur cette ligne. Les mêmes coupes sont effectuées sur les images de chaque simulation correspondant à  $M = 20$  et à différentes valeurs de  $S$ . La Figure 5.7 représente ces coupes et nous permet de déterminer quelle valeur de  $S$  correspond le mieux au cas expérimental :  $S = 0,25$ .

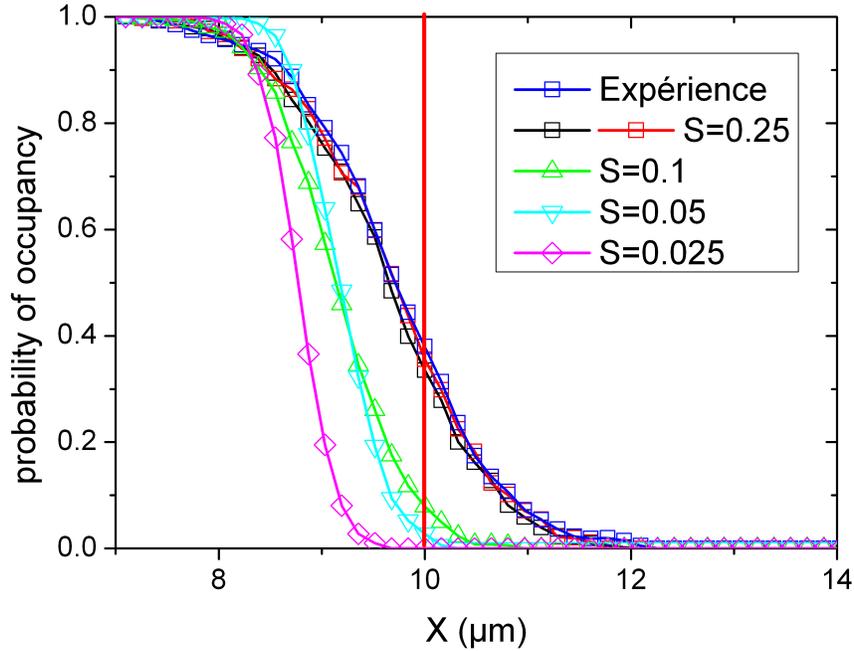


FIGURE 5.7: Graphique représentant la probabilité d'occupation au centre de l'interface entre deux plots adhésifs. Le centre de la cellule correspond à  $X = 0$ , le trait rouge représente la fin des plots adhésifs  $X = b/2 + a = 10 \mu\text{m}$ . Plusieurs valeurs de  $S$  sont représentées ainsi que le cas expérimental.

Nous avons également, d'après cette figure, la confirmation que la configuration d'une cellule dépend des valeurs des paramètres  $M$  et  $S$  et non des valeurs de  $T$ ,  $\gamma_{cm}$  et  $\lambda_A$ . En effet, pour deux jeux de valeurs des paramètres énergétiques différents mais correspondant à des mêmes valeurs de  $M$  et de  $S$ , les taux d'occupation se superposent.

En conclusion de cette section, nous avons pu grâce au CPM, en analysant la courbure des interfaces, déduire pour une population de cellules biologiques, la valeur des paramètres  $M$  et  $S$ . Le paramètre  $M$  comme nous l'avons vu est relié à la compétition entre la contractilité des fibres de stress et l'élasticité du gel d'actine à l'intérieur du cytosol. Le paramètre  $S$  quant à lui n'est

défini que pour une population de cellules et représente la dispersion de cette population. Nous allons voir maintenant dans une expérience préliminaire réalisée comment appliquer cette méthode pour étudier l'évolution de ces paramètres en altérant les processus de l'adhérence.

## 5.4 Expérience préliminaire

Une des limites des réseaux utilisés jusqu'à maintenant était la faible taille obtenue des cellules. Pour une résolution optique donnée, cela limite la mesure des rayons de courbures. Nous avons donc utilisé de nouveaux motifs qui permettent d'augmenter de manière significative la surface des cellules ( $\times 4$ ), tout en conservant un excellent contrôle des morphologies et une adhérence sur un support discret. Les images obtenues sur ce type de motif sont représentées sur la Figure 5.8. Sur ces images prises pour différentes cellules après un même temps d'adhérence, nous pouvons nous faire une idée de la dynamique de l'adhérence. La grande majorité des cellules occupe les 4 plots discrets (image de droite).

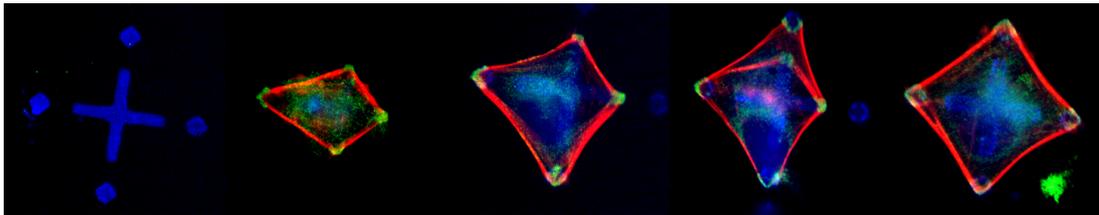


FIGURE 5.8: Images expérimentales de cellules adhérentes sur un motif en croix comportant un plot adhésif carré de largeur  $5 \mu\text{m}$  à chaque extrémité. La distance entre les plots carrés est de  $23 \mu\text{m}$ . L'actine est marquée en rouge, la vinculine en vert et les protéines adhésives en bleu.

Ces expériences ont permis d'augmenter la longueur des fibres de stress, jusqu'ici de l'ordre de  $10 \mu\text{m}$ , jusqu'à plus de  $25 \mu\text{m}$ . Cela augmente de manière significative la résolution de la mesure du rayon de courbure. Après un temps d'adhérence de 4h, nous avons ajouté de la blebbistatine ( $20 \mu\text{M}/\text{ml}$  pendant 20 min), un inhibiteur des myosines II, pour perturber l'équilibre des cellules. La blebbistatine diminue la mobilité des moteurs moléculaires et augmente le temps pendant lequel la myosine II est décrochée des filaments (Kovacs *et al.*, 2004) (voir chapitre 1). Dans notre cas, ces perturbations mécaniques doivent modifier la valeur du paramètre  $M$ , c'est à dire la courbure des fibres de stress. Les résultats préliminaires sont présentés dans cette partie et représentent des perspectives intéressantes pour étudier les mécanismes contractiles dans les fibres de stress, le gel d'actine et leur lien.

## 5.4. Expérience préliminaire

Nous avons analysé l'évolution des morphologies sur trois supports différents. La distance entre les plots adhésifs est de 20, 23 et 27  $\mu\text{m}$  pour les motifs nommés respectivement Croix1, Croix2 et Croix3. Après fixation et l'immunofluorescence de l'actine, des mesures du rayon de courbure des fibres de stress ont été effectuées sur chaque cellule. L'évolution du rayon de courbure en fonction de l'écartement des plots est représentée sur la Figure 5.9

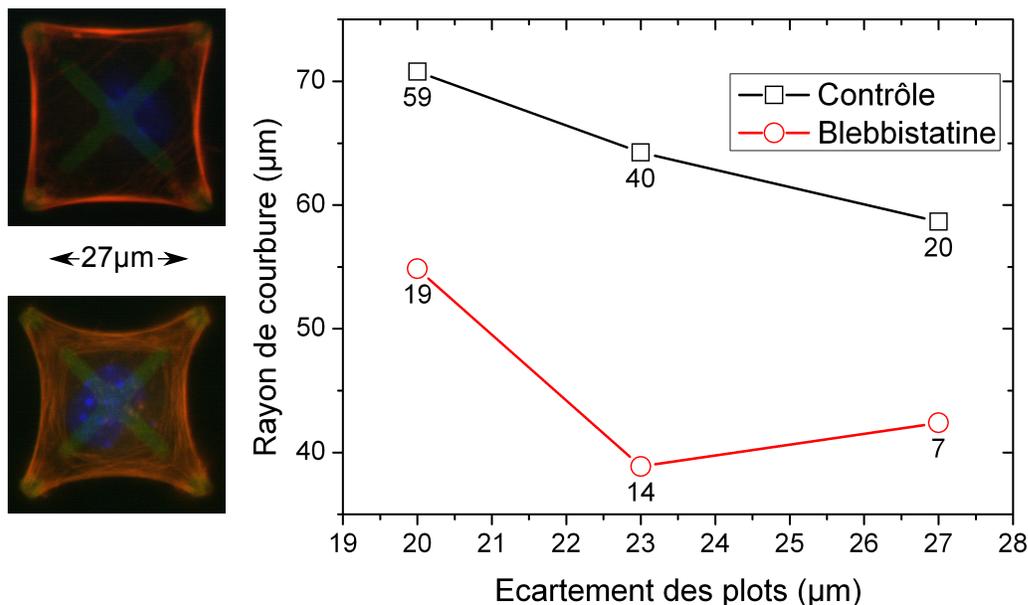


FIGURE 5.9: Evolution du rayon de courbure en fonction de l'écartement des plots. Le nombre de cellules par cas est indiqué en dessous des points. Les images à gauche, représentent une cellule contrôle (haut) et une après le traitement blebbistatine (bas).

La diminution des rayons des courbures montre une évolution du paramètre  $M$ . Cette expérience doit être reproduite pour obtenir plus de statistiques. Il faut également construire les diagrammes de phase pour chaque écartement des plots à l'aide du CPM. Cela nous permettra de quantifier l'évolution des paramètres  $M$  et  $S$ .

Des mesures mécaniques ont montré que la blebbistatine rend le cytosquelette plus élastique et moins rigide (Balland *et al.*, 2005). Cet effet correspond à une augmentation de  $M$ , traduisant la diminution de la contractilité des fibres (faible  $\gamma_{cm}$ ) et l'augmentation de l'élasticité du gel d'actine (fort  $\lambda_A$ ). Mais ce résultat doit être pris avec précaution.

## 5.5 Conclusion

Dans le chapitre 4, le CPM nous a permis d'identifier les états d'équilibre métastables d'une population de cellules adhérentes sur un support micro-structuré. Dans ce chapitre, nous avons utilisé le CPM pour étudier un seul état métastable : la forme carrée 4A. Cela nous a permis de vérifier que les formes obtenues en minimisant l'énergie de la cellule vérifiait la loi de Laplace. Le modèle définit deux paramètres :  $M$  et  $S$ , reliés à la biophysique de la cellule. Ces paramètres nous permettent d'ajuster finement des formes obtenues par simulations numériques aux résultats expérimentaux.

Pour cela, nous avons construit un diagramme de phase des morphologies adhésives sur le support. Nous avons également développé une méthode pour placer les points expérimentaux dans ce diagramme. Nous obtenons ainsi les valeurs des paramètres  $M$  et  $S$  pour des cellules biologiques.

Nous avons également décrit une expérience préliminaire qui nous permet de suivre l'évolution des paramètres définis par le CPM lorsque certains processus impliqués dans l'adhérences sont perturbés.

# Chapitre 6

## *La dynamique de l'adhérence*

"LA MÉCANIQUE A DEUX BRANCHES, LA STATIQUE ET LA DYNAMIQUE."

Jean le Rond d'Alembert (1717 - 1783)

Mathématicien, philosophe et encyclopédiste français



## Chapitre 6

# Aspects dynamiques de l'adhérence

Nous nous sommes focalisés dans les chapitres précédents sur des populations de cellules fixées. L'influence du temps d'adhérence a été pris en compte uniquement de manière statistique en étudiant des populations de cellules pour des temps d'adhérence différents. Or d'après notre chapitre introductif, nous savons que l'adhérence est un phénomène très dynamique. Étudier cette dynamique sur une grande population de cellules nécessite d'utiliser des lignées cellulaires dont le cytosquelette est marqué par des protéines fluorescentes (GFP). Il faut également analyser un très grand nombre de cellules, ce qui pose des problèmes techniques : des acquisitions d'images fluorescentes à haute résolution, en parallèle, requièrent une très grande stabilité thermique du système optique. Bien que nous ayons développé un tel système, nous n'avons pas eu le temps de l'utiliser sur des lignées fluorescentes.

Cependant, nous allons tout de même nous intéresser à l'aspect dynamique en analysant des images en contraste de phase dont l'analyse ne peut être automatisée. Les aspects statistiques ne seront donc pas aussi importants que dans les chapitres précédents.

En étudiant la dynamique de l'adhérence de cellules sur un support discret, nous avons identifié un processus cellulaire très important pour l'adhérence : les protrusions membranaires de type filopode. Dans le chapitre 3, nous avons suggéré que la distance entre les plots adhésifs était le processus principal limitant l'adhésion cellulaire sur les réseaux. Cela nous a permis d'identifier une transition entre des formes désordonnées et ordonnées pour des séparations de plots voisines de  $10 \mu\text{m}$ . Dans ce chapitre, nous démontrons expérimentalement que cette distance est liée aux filopodes.

Dans le chapitre 4, à l'aide du modèle de Potts, nous avons montré que les formes organisées

des cellules adhérentes correspondaient à des minima locaux d'une énergie, c'est à dire à des états d'équilibre métastables. Nous allons dans ce chapitre utiliser le CPM pour estimer le coût énergétique du passage d'un minimum local à un autre en utilisant les filopodes. Nous montrerons ainsi que les processus d'exploration ne peuvent pas être intégrés au modèle tel qu'il est.

---

## Sommaire

---

6.1	Dynamique sur un plot adhésif . . . . .	<b>155</b>
6.1.1	Le rôle des filopodes . . . . .	155
6.1.2	Un unique outil pour adhérer . . . . .	156
6.1.3	Le filopode limite-t-il l'adhérence? . . . . .	158
6.2	Le CPM et les transitions forme-forme . . . . .	<b>159</b>
6.2.1	Les fluctuations thermiques . . . . .	159
6.2.2	Les phénomènes rares . . . . .	162
6.3	Conclusion . . . . .	<b>164</b>

---



### 6.1 Dynamique sur un plot adhésif

Nous avons réalisé des expériences en vidéo-microscopie en contraste de phase pour étudier la dynamique de l'adhérence.

#### 6.1.1 Le rôle des filopodes

A partir des images de vidéo-microscopie, nous pouvons reconstituer la séquence des processus biologiques permettant l'adhésion et l'étalement de la cellule. Nos données sont donc des films dont une séquence caractéristique est représentée sur la Figure 6.1.

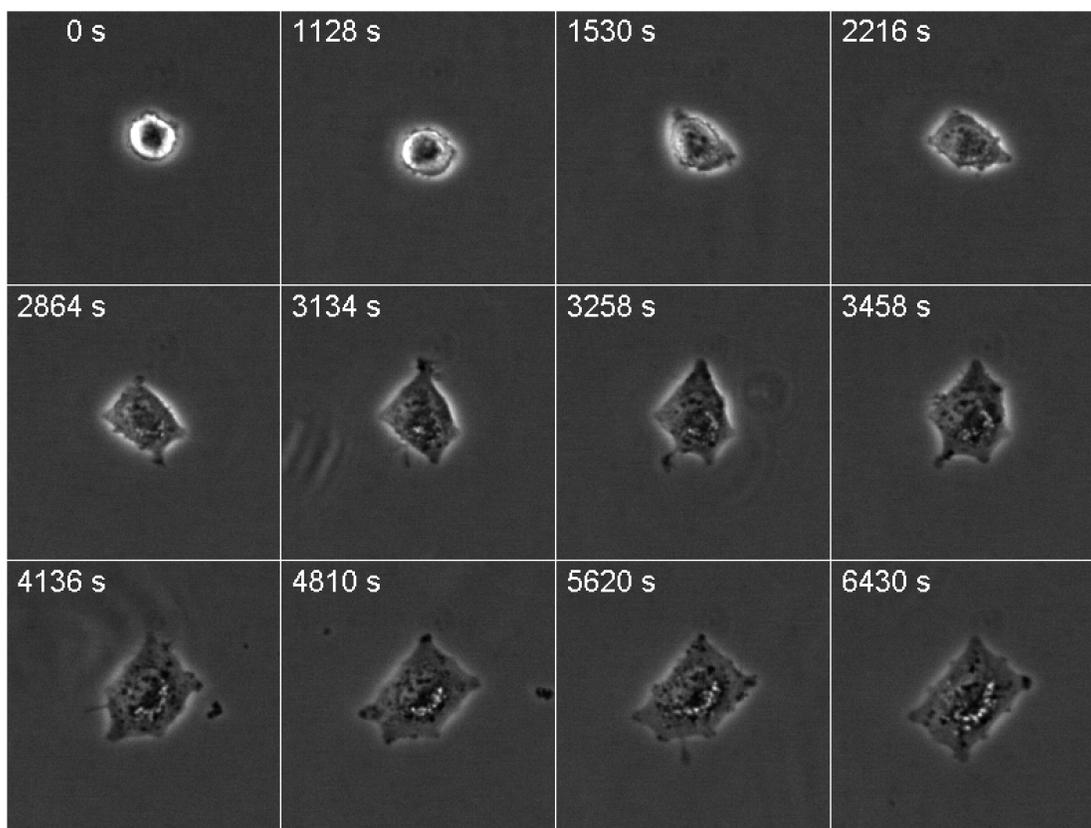


FIGURE 6.1: Images d'une cellule en adhérence sur un réseau R10 à différents moments durant l'adhésion. Seuls les filopodes trouvent les nouveaux plots suggérant une meilleure efficacité par rapport aux lamellipodes pour explorer l'environnement sur des supports micro-structurés.

Chaque image de cette séquence correspond à l'acquisition par la cellule d'un nouveau plot adhésif. Nous constatons que les protrusions membranaires impliquées sont des filopodes (voir en particulier  $t = 3\ 258, 4\ 136, 5\ 620$ s). Le modèle classique de l'adhérence suggère que la création d'adhérence focale lors de la migration cellulaire sur des supports homogènes utilise des filopodes

pour explorer l'environnement mais limite la formation des adhérences focales au niveau du front cellulaire, c'est à dire au bord des lamellipodes (Rottner *et al.*, 1999). Nos observations montrent qu'il est possible d'établir un point d'ancrage à partir d'un filopode.

### 6.1.2 Un unique outil pour adhérer

A partir de données obtenues avant le début de cette thèse, nous avons montré que le filopode peut se transformer en lamellipode (Guillou *et al.*, 2008). Cette transformation implique l'engagement des intégrines, l'activation de Rac et la création de sites adhésifs par les filopodes comme le montre la Figure 6.2. Des travaux ont également suggéré que des adhérences focales pouvaient être créées par des filopodes grâce à la présence d'intégrines à leur extrémité (Partridge & Marcantonio, 2006), ajoutant au filopode une nouvelle fonction dans le modèle classique de l'adhérence.

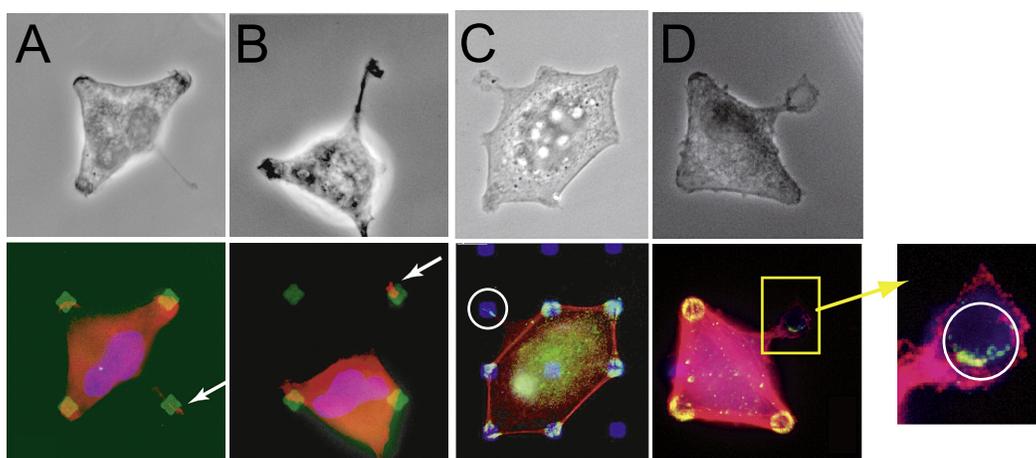


FIGURE 6.2: **A,B,C & D** : Images en contraste de phase (haut) et en fluorescence (bas) de cellules en adhésion sur des réseaux de plots (*R16*). **A,B** : Le noyau a été marqué en bleu, les fragments Fn710 en vert et la protéine Rac1 en rouge. Cette dernière est visible sur le plot trouvé par un filopode, et va déclencher la signalisation pour former un lamellipode. **C,D** : Les fragments Fn710 sont marqués en bleu. La vinculine (vert) est visible au niveau des plots nouvellement acquis par les filopodes (ronds blancs). Cela confirme la possibilité pour les filopodes de créer directement des adhérences focales. Le zoom (carré jaune) montre également que l'actine (rouge) est présente au niveau du plot, suggérant que l'extension membranaire observée en contraste de phase est un procédé actif et n'est pas dû à une soudaine augmentation de pression dans cette zone ou un phénomène de gonflement spontané.

Ces observations ont été facilitées par l'utilisation des réseaux de plots qui permettent une bonne discrimination des événements et exacerbent les comportements. La Figure 6.3 montre que la transformation filopode-lamellipode est possible sur un support homogène. Le gonflement d'un filopode en lamellipode est initié dans ce cas à partir de la base du filopode car c'est là que les intégrines sont engagées.

## 6.1. Dynamique sur un plot adhésif

---

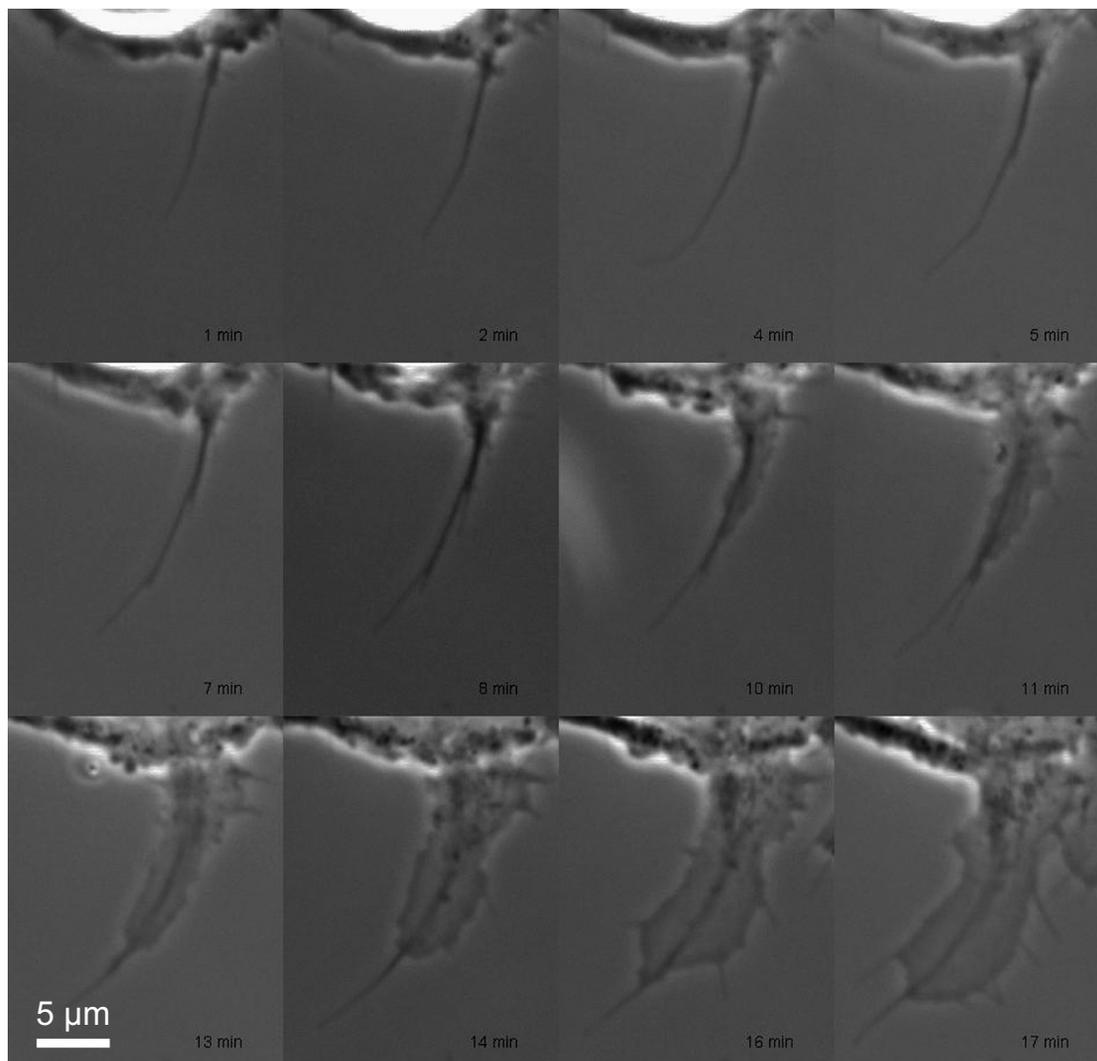


FIGURE 6.3: Images en contraste de phase d'une cellule en adhérence sur un substrat recouvert de manière homogène avec des fragments Fn710. Sa position stable et sa taille constante dans le temps suggèrent qu'un complexe focal a été initié à sa pointe à  $t = 5\text{min}$ . Il apparaît rapidement après l'accroche du filopode à la surface l'émission d'un lamellipode partant du bord cellulaire et venant recouvrir le filopode.

Cette transition pose certaines questions :

- Comment le matériel est-il transporté à l'extrémité du filopode pour le gonflement ?
- Comment les ré-arrangements structuraux de filaments parallèles en filaments branchés par Arp2/3 sont possibles ?

Nous allons voir dans la prochaine partie pourquoi le filopode limite l'adhésion de cellules sur des supports adhésifs discrets.

### 6.1.3 Le filopode limite-t-il l'adhérence ?

Les expériences que nous avons réalisées dans cette partie consistaient à étudier les cellules adhérentes sur des supports carrés de 4 et 9 plots distants de  $10 \mu\text{m}$ . Des images des protrusions étaient enregistrées à des intervalles de temps de 2 à 3 s. Nous avons ensuite mesuré les caractéristiques des protrusions membranaires.

L'image en contraste de phase étant impossible à traiter de manière automatique ou semi-automatique. Un écran tactile est utilisé pour détourer manuellement le bord cellulaire et les protrusions membranaires observables sur chaque image. Le logiciel ImageJ est utilisé pour traiter les contours ainsi obtenus. Nous nous intéressons à la distance maximum que les protrusions membranaires explorent. Pour cela, la distance entre l'extrémité de la protrusion et le bord cellulaire est mesurée.

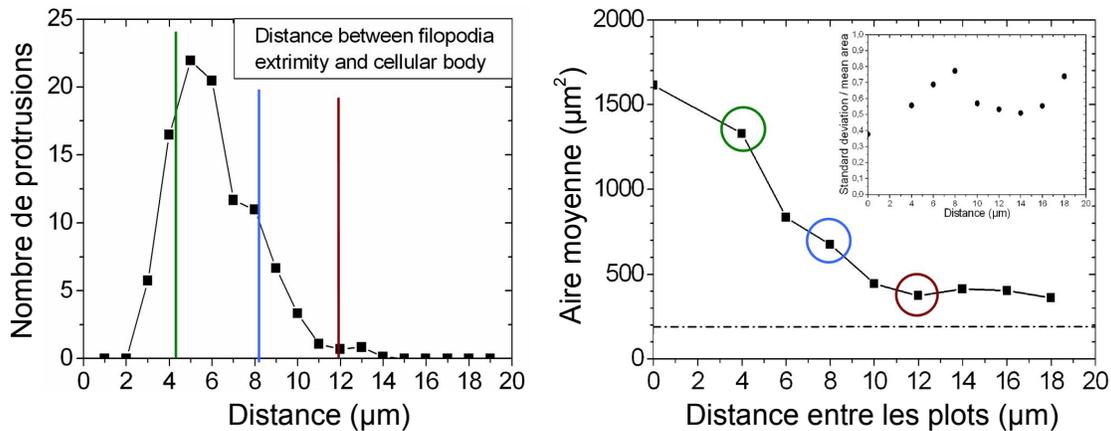


FIGURE 6.4: La distribution des formes géométriques ou désordonnées évolue avec la distance entre les plots. La distance inter-plots est de 4, 8 et 12  $\mu\text{m}$  respectivement pour le vert, bleu et rouge. **A** : Seules les distances explorées supérieures au trait coloré sont efficaces sur le réseau du fait de l'écartement des plots. **B** : Evolution de l'aire moyenne de la population de cellules fixées sur un réseau de plots. La diminution de l'efficacité des filopodes à créer de nouveaux sites adhésifs réduit l'aire d'adhésion.

Nous avons mesuré 20 séquences de cellules différentes et 200 filopodes ont ainsi été caractérisés. La Figure 6.4 **A** présente la distribution de la portée d'exploration des filopodes. Centrée sur 6  $\mu\text{m}$  elle démontre que peu de filopodes atteignent des distances supérieures à 10  $\mu\text{m}$ . La Figure 6.4 **B** rappelle l'évolution de l'aire moyenne des populations de cellules en fonction de la distance entre les plots.

La diminution des aires moyennes mesurées en fonction de la distance de séparation est associée à la diminution de la quantité de filopodes efficaces, c'est à dire ceux dont la distance d'exploration

## 6.2. Le CPM et les transitions forme-forme

---

est supérieure ou égale à la distance de séparation (traits colorés associés aux cercles). Au delà d'une longueur comprise entre 10 et 12  $\mu\text{m}$ , un très faible nombre de filopodes est observé. L'adhésion sur des réseaux dont les plots sont séparés par cette distance sera fortement perturbée.

Pour quantifier l'effet sur la dynamique, il faut également considérer la dépendance angulaire de la direction des filopodes ainsi que leur fréquence d'émission. Comme nous n'avons pas effectué de mesures dans ce sens, nous ne pouvons donc pas proposer un modèle complet de la dynamique. Néanmoins, nous pouvons associer la transition désordre/ordre abordée dans le chapitre 3, à la taille limite des filopodes. Cette taille est probablement contrôlée par des protéines de régulation qui déterminent le nombre de filaments intégrés dans un filopode et les liens mécaniques entre eux. Nous retiendrons que les filopodes sont les processus qui permettent la transition entre les formes géométriques déterminant la dynamique de l'adhérence.

## 6.2 Le CPM et les transitions forme-forme

Nous avons vu dans les chapitres précédents que le CPM reproduit les morphologies de cellules expérimentales. Dans la section précédente, nous avons mis en évidence l'importance des filopodes dans la dynamique de l'adhérence. Les filopodes sont des processus hors-équilibre, basés sur la polymérisation de l'actine.

Nous allons comparer dans une première partie les fluctuations dans le CPM et les fluctuations de membranes de cellules biologiques. Nous verrons que les fluctuations biologiques associées aux filopodes sont des événements très rares.

### 6.2.1 Les fluctuations thermiques

Pour caractériser les fluctuations thermiques de l'interface dans le cadre du CPM, nous enregistrons les différentes formes obtenues à chaque MCS. Nous les associons pour former une séquence. Les fluctuations d'interface sont ensuite visualisées en regroupant des coupes effectuées à chaque MCS aux centres des interfaces. Cela construit une image représentée sur la Figure 6.5 pour deux températures de fluctuations :  $T_{CPM} = 250$  et  $T_{CPM} = 1\ 500$ .

Nous observons qu'une température élevée a pour effet d'élargir l'exploration de la membrane tandis qu'une température plus faible tend à stabiliser l'interface vers une position précise. Afin de quantifier cette variation, nous mesurons la position de l'interface à chaque MCS et construisons les distributions des positions dont un exemple est reporté dans la Figure 6.6 **A**. Une loi

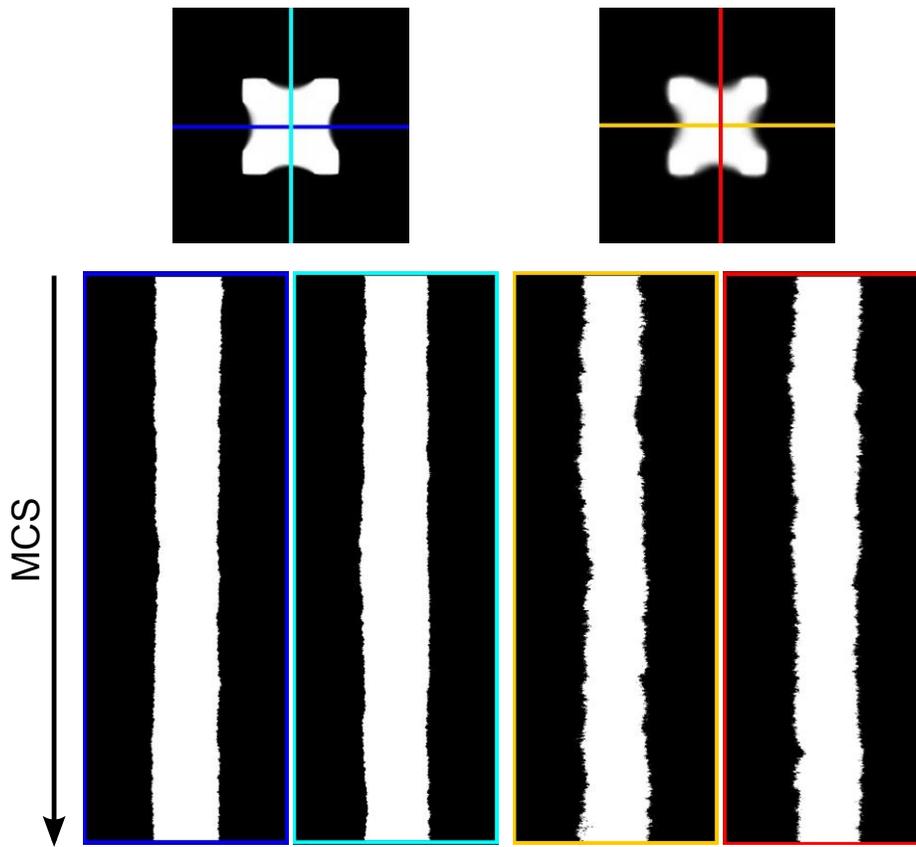


FIGURE 6.5: **Haut** : Images de cellules modèles pour  $T_{CPM} = 250$  (A) et  $1500$  (B) en adhérence sur 4 plots distants de  $10 \mu\text{m}$  issues d'une moyenne de plusieurs configurations énergétiques. **Bas** : Coupes effectuées au centre des cellules pour l'observation de la position de l'interface à chaque MCS. Le code couleur des coupes correspond à celui des contours des séquences.

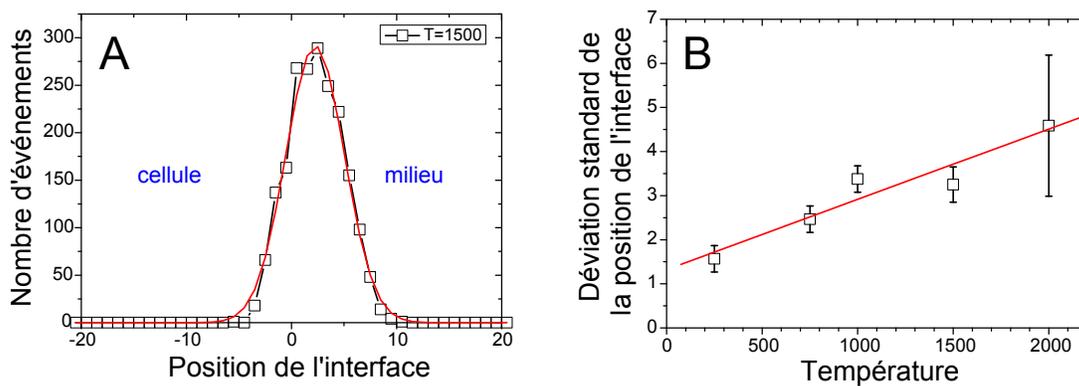


FIGURE 6.6: **A** : Distribution moyennée de la position du centre des 4 interfaces cellule/milieu (coupes orange et rouge sur la Figure 6.5 B). Un ajustement à partir d'une loi gaussienne standard a été ajouté en rouge. **B** : Evolution de la déviation standard de la position de l'interface en fonction de la température  $T_{CPM}$ .

## 6.2. Le CPM et les transitions forme-forme

gaussienne s'ajuste à cette distribution comme cela est attendu. La largeur de cette distribution est proportionnelle à la température (Figure 6.6 **B**). Cela n'a rien de surprenant puisque nous utilisons une probabilité de Boltzmann pour traiter les cas où les changements testés augmentent l'énergie de la cellule.

Nous avons réalisé la même opération à partir des images en contraste de phase obtenues par vidéo-microscopie sur des cellules adhérentes. Ici, une séquence temporelle d'images d'une cellule carrée sur un support de plots distants de  $10\ \mu\text{m}$  adhérente est moyennée. Les images construites à partir des coupes réalisées, soit au centre de la cellule, soit au milieu des zones adhésives, correspondent au temps réel. Les résultats sont représentées sur la Figure 6.7.

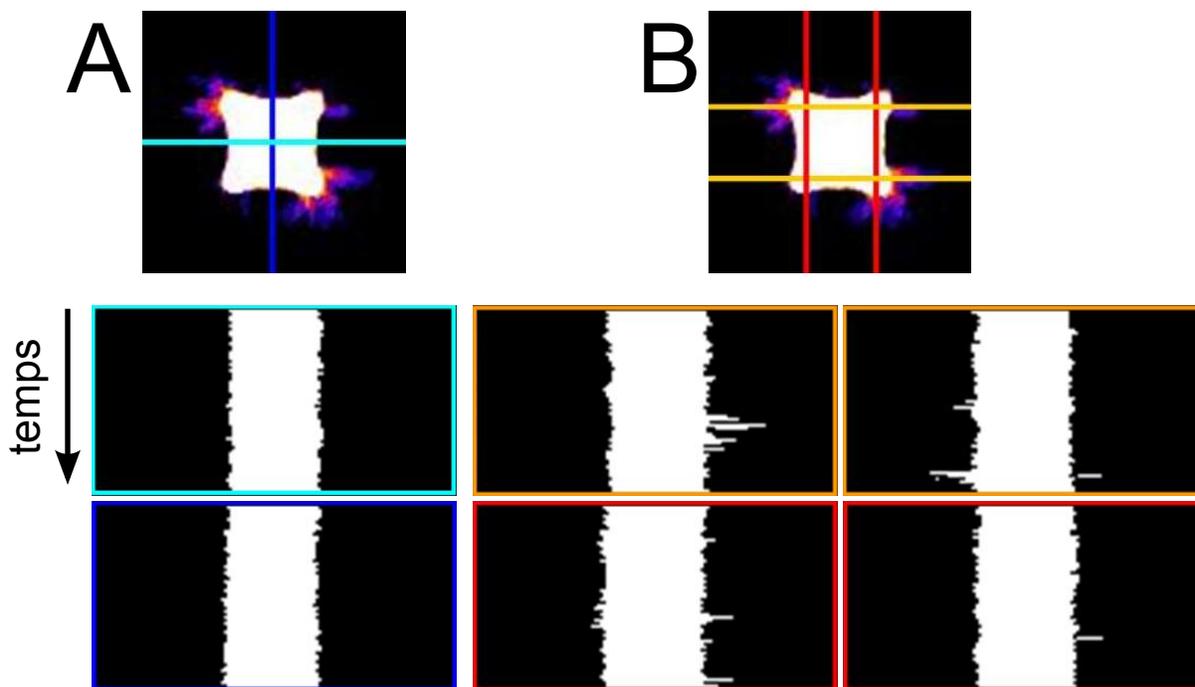


FIGURE 6.7: **Haut** : Image moyennée d'une cellule biologique adhérente à différents temps. **Bas** : Les coupes sur cette image sont respectivement au centre des interfaces (**A**) et au niveau des plots adhésifs (**B**). Le code couleur des coupes correspond à celui des contours des séquences.

La Figure 6.8 représente les distributions des positions des interfaces au centre (**A**) et au niveau de plots adhésifs (**B**). Au centre, bien que la résolution de l'image ne permette pas un ajustement, les distributions de la position semblent similaires au cas du CPM, une gaussienne. Nous pourrions associer la largeur des distributions expérimentales à une température, de manière similaire à ce qui est réalisé pour le CPM (Figure 6.6 **B**). Mais ces deux distributions ne sont comparables que qualitativement.

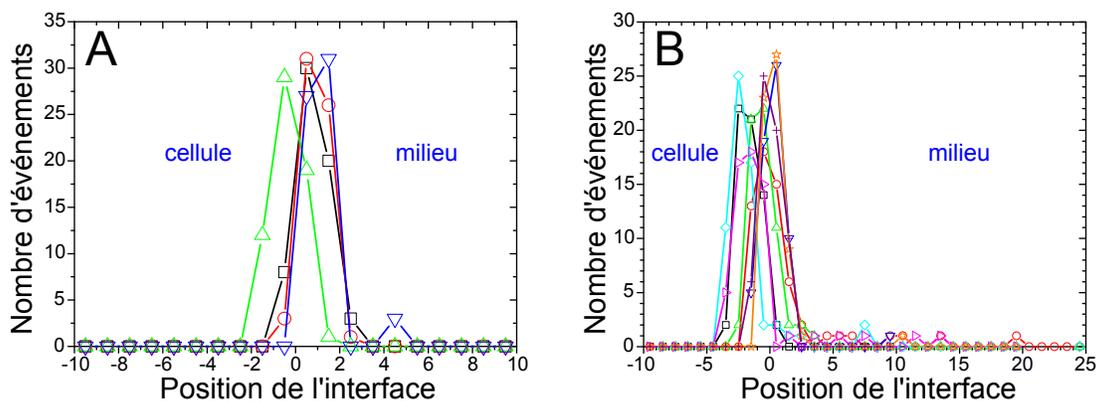


FIGURE 6.8: **A** : Distributions des positions du centre des 4 interfaces cellule/milieu (coupes bleu foncé et bleu clair sur la Figure 6.7 **A**). **B** : Distributions des positions de l'interface au niveau des plots adhésifs (coupe rouge et orange sur la même figure).

En revanche, la distribution obtenue pour les coupes (**B**) montre qu'il existe des événements rares au niveau des points d'ancrage. Ces événements correspondent aux filopodes qui explorent l'environnement. Comme ces distributions ne s'apparentent pas à des gaussiennes, nous ne pouvons pas tenter de leur associer une température. Les événements rares dominent.

### 6.2.2 Les phénomènes rares

Le CPM ne contient aucun terme permettant de modéliser des événements rares puisque ce sont des fluctuations thermiques qui explorent l'environnement énergétique. Le CPM ne peut donc pas dans sa forme actuelle reproduire les transitions d'une forme à l'autre comme nous l'observons. Nous allons néanmoins utiliser le CPM pour estimer le coût énergétique d'une telle fluctuation. Pour cela, une séquence d'images représentée sur la Figure 6.9 (**Haut**) a été dessinée manuellement pour reproduire l'évolution morphologique d'une cellule biologique lors de son étalement. Cette séquence n'est en aucun cas un résultat issu de simulation puisque les filopodes présents sur la série d'images qui permettent l'invasion des nouveaux plots adhésifs ont été ajoutés. Malgré tout, en utilisant les valeurs des paramètres énergétiques utilisées pour trouver les états d'équilibre du chapitre 3, nous pouvons calculer en utilisant l'hamiltonien de Potts les énergies de chacune des configurations de la cellule (Figure 6.9 **Bas**).

Les quatre formes géométriques correspondant aux états métastables : 3A, 4A, 5A et 6A correspondent à des minima locaux d'énergie. La transition d'un minimum à l'autre est réalisée en passant par un col dans le paysage d'énergie. Ces cols représentent les points de passage les plus bas

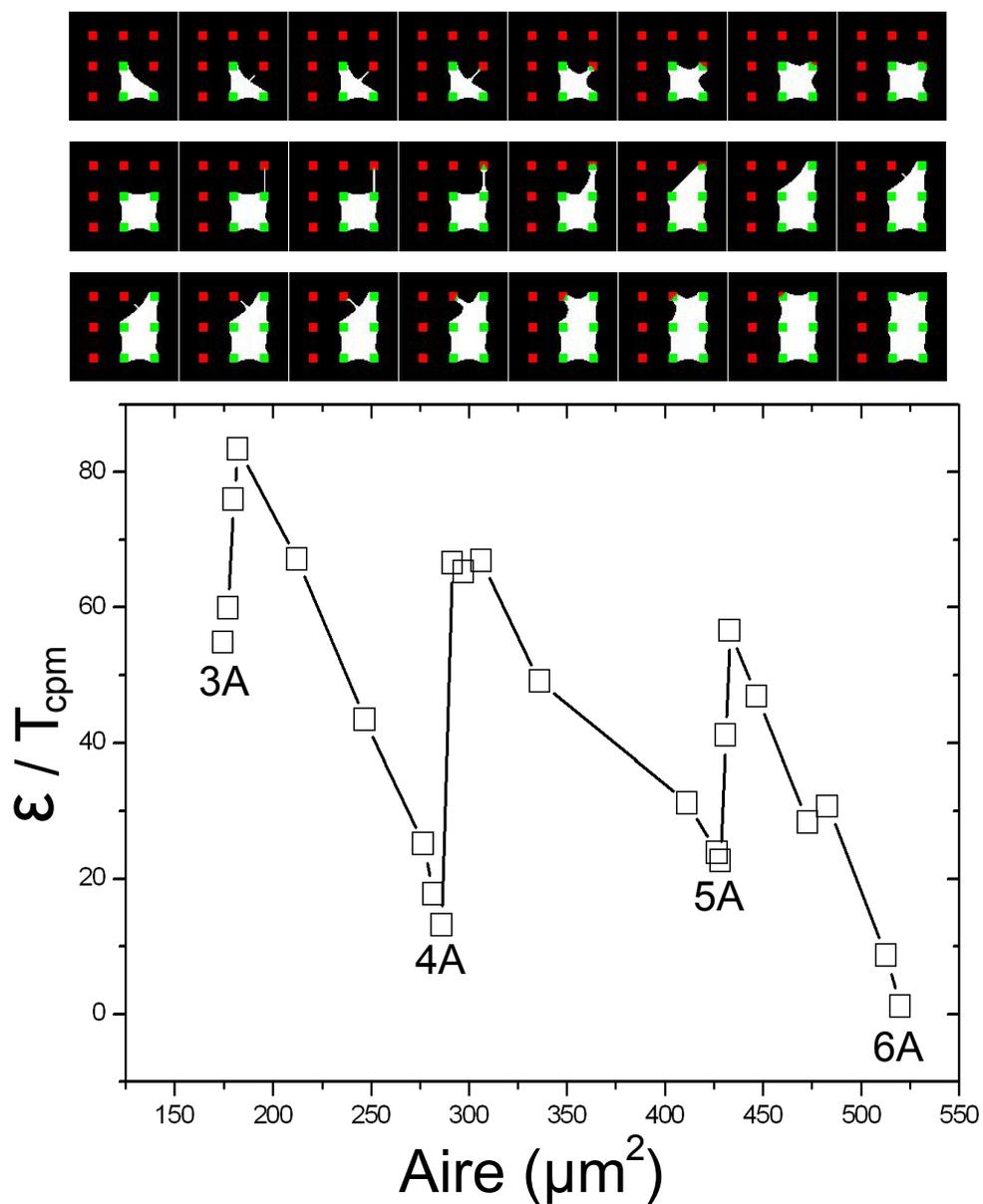


FIGURE 6.9: **Haut** : Séquence d'images représentant des transitions d'une forme à l'autre, imaginée à partir de formes stables obtenues par simulation. **Bas** : Énergies quantifiées par la température de fluctuations utilisée en fonction de l'aire correspondant à la séquence.

dans le paysage d'énergie et leur franchissement correspond au processus limitant l'adhésion. Nous remarquons de manière qualitative que deux cas se présentent pour l'acquisition d'un nouveau plot : le premier correspond aux transitions  $3A \rightarrow 4A$  et  $5A \rightarrow 6A$  où la distance du plot est à  $\sqrt{2}b/2$  et le second pour la transition  $4A \rightarrow 5A$ , cette fois-ci pour une distance de filopode de  $b$ . Cela donne une explication des lignes marquant les transitions entre formes. La dépense

énergétique est respectivement de 30 et 50 fois la température de fluctuations (Figure 6.9).

Une piste pour intégrer les événements rares dans le CPM consisterait à modifier la probabilité avec laquelle des changements non favorables énergétiquement sont acceptés dans l'algorithme. Une loi probabiliste différente, telle qu'une loi de Levy, serait une bonne candidate pour la réalisation de ces phénomènes rares et hors équilibre.

### 6.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié la dynamique de l'adhérence. Nous avons identifié le filopode comme le processus clef de l'adhésion lorsque le support adhésif est discret. Des analyses statistiques nous ont permis d'associer la distance entre les plots limitant l'adhésion à la longueur des filopodes. Le ralentissement de l'adhérence évoqué tout au long de ce manuscrit est donc la conséquence de la diminution de l'efficacité des filopodes lorsque les cellules adhèrent sur des supports de plots adhésifs discrets.

Nous avons utilisé le CPM pour estimer le coût énergétique des filopodes. Ce dernier est tel qu'il représente un événement statistiquement rare. Cela justifie le fait que les transitions d'une forme à l'autre se réalisent sur des échelles de temps beaucoup plus longues que la réorganisation du cytosquelette permettant de minimiser l'énergie de la cellule. Cela ouvre des perspectives dans le développement d'un modèle thermodynamique de l'adhérence cellulaire.

# Chapitre 7

## *Conclusions et perspectives*

”CE QUI EST INCOMPRÉHENSIBLE, C’EST QUE LE MONDE SOIT  
COMPRÉHENSIBLE.”

Albert Einstein (1879 - 1955)

Physicien américain d’origine allemande, Prix Nobel de physique(1921)



## Chapitre 7

# Conclusions et perspectives



---

## Sommaire

---

7.1	Conclusions . . . . .	<b>170</b>
7.2	Perspectives : Organisations dynamiques du cytosquelette d'actine . . . . .	<b>172</b>
7.2.1	Une transition filopode - fibres de stress . . . . .	172
7.2.2	La réorganisation interne des fibres de stress . . . . .	173
7.2.3	La construction du paysage énergétique . . . . .	174

---

## 7.1 Conclusions

L'adhérence cellulaire est un phénomène fondamental pour les cellules biologiques, mais représente un défi dans sa compréhension. Nous avons vu dans le chapitre 1 que la construction du cytosquelette en fibres de stress, en gel et en protrusions membranaires et celle des sites adhésifs sont une succession permanente d'assemblages et de désassemblages influencés par des jeux de signalisations croisées. Notre approche du problème a été influencée par diverses considérations présentées dans le chapitre introductif et dont nous nous servons ici pour résumer les résultats importants obtenus pendant cette thèse.

Étudier l'influence de la densité de protéines adhésives a été motivée par les travaux de G. Bell (Bell *et al.*, 1984) et a été notre premier objectif dans la thèse. Nous avons donc développé une technique de micro-fabrication présentée dans le chapitre 2, pour réaliser des supports à contraste adhésif. Notre méthode permet d'obtenir des motifs ayant une bonne résolution, où différentes molécules peuvent être immobilisées. Leur densité est contrôlée et la couche anti-adhésive est également très stable. Cela a permis de mettre en évidence un ralentissement du processus d'adhérence cellulaire dû à l'écartement des plots adhésifs.

Nous avons dans le chapitre 3 développé une méthode d'analyse statistique pour étudier les paramètres morphologiques des cellules adhérentes. Nous avons relié un écartement de plots caractéristique, limitant l'adhésion, à une transition entre deux régimes : désordonné et ordonné. Dans le premier, les morphologies cellulaires sont proches des cas de cellules adhérentes sur des substrats homogènes. Dans le régime ordonné, les cellules adhérentes sur des plots distants de plus de  $10\ \mu\text{m}$  montrent une reproductibilité spectaculaire dans l'organisation de leur cytosquelette. Les processus impliqués dans l'adhésion comme les voies de signalisation ne sont pas altérés fondamentalement puisque cette auto-organisation remarquable comprend des fibres de stress contractiles et des adhérences focales.

Des formes sont utilisées préférentiellement par les cellules biologiques sur les réseaux du régime ordonné et conservent la géométrie rectangulaire du motif. Cela suggère que les systèmes vivants obéissent à des lois physiques, les morphologies des cellules étant similaires à des gouttes d'eau en adhésion sur un support structuré. Nous avons vérifié cette hypothèse dans les chapitres 4 et 5 en utilisant un modèle énergétique à l'équilibre : le modèle de Potts Cellulaire. Nous avons dans le chapitre 4 reproduit de manière qualitative les morphologies d'une population de cellules en adhérence en régime ordonné. Ces formes géométriques sont donc des minima locaux d'énergie et constituent une représentation du paysage énergétique induit par le support adhésif. Nous

## 7.1. Conclusions

---

reproduisons ainsi la relaxation du cytosquelette d'actine dans une organisation correspondant à un état métastable en attendant de créer un nouveau site adhésif.

En ne considérant qu'une forme géométrique élémentaire, nous avons, dans le chapitre 5, étudié l'effet de paramètres adimensionnels sur le rayon de courbures des interfaces. Ces paramètres sont reliés à des considérations physiques. L'élasticité du gel d'actine, qui exerce des forces de pression (Boukellal *et al.*, 2004), est en compétition avec la contractilité des fibres de stress. Un rapprochement avec la compétition tension/compression de la tenségrité cellulaire développée par D. Ingber (Ingber, 1993) peut être avancé. Nous montrons également qu'un diagramme de phase correspondant à une géométrie adhésive peut être relié à des résultats expérimentaux. Il permet aussi de relier les évolutions des paramètres du modèle aux évolutions des processus biologiques. Ces dernières sont provoquées par des régulations biochimiques ou des perturbations extérieures comme l'utilisation de drogue modifiant les propriétés mécaniques des cellules (Balland *et al.*, 2005).

Nous avons montré dans le chapitre 6 que c'est en fait l'efficacité de l'exploration de l'environnement des filopodes qui est fortement diminuée lorsque les zones adhésives sont distantes de plus de 10  $\mu\text{m}$ . L'acquisition d'un nouveau plot adhésif devient un phénomène rare vis à vis de la relaxation du cytosquelette sur des supports micro-structurés. Nous obtenons donc une séparation temporelle des processus hors-équilibre par rapport aux processus à l'équilibre. Bien que le modèle de Potts Cellulaire ne reproduise en aucun cas la dynamique de l'adhérence, il est possible d'estimer grossièrement le coût énergétique des barrières énergétiques que la cellule franchit lors de l'étalement.

## 7.2 Perspectives : Organisations dynamiques du cytosquelette d'actine

Nous pensons que l'utilisation de cellules dont l'actine a été marquée par la GFP, pour observer dynamiquement l'organisation du cytosquelette, serait un outil nécessaire et très utile pour observer la relaxation du cytosquelette durant l'étalement. Deux phénomènes de ré-organisation du cytosquelette présentés dans la suite ont retenu notre attention, le premier concerne la transformation d'un filopode en fibres de stress, le second le réassemblage de fibres entre elles. Enfin, nous verrons que plusieurs résultats abordés dans ce manuscrit peuvent être mis en commun pour élaborer succinctement le paysage énergétique d'un réseau de plots.

### 7.2.1 Une transition filopode - fibres de stress

Nous avons observé un phénomène très intéressant durant l'acquisition d'un plot adhésif par un filopode : deux faisceaux d'actine se formeraient à partir du filopode qui entourent le lamellipode en croissance. La cellule se développe rapidement lorsqu'un nouveau site adhésif est trouvé pour augmenter son aire. Nous pensons que le filopode ayant trouvé le plot et initiant la formation d'un lamellipode entre sa pointe et le corps cellulaire, est soit dépolymérisé, soit séparé en deux faisceaux distincts.

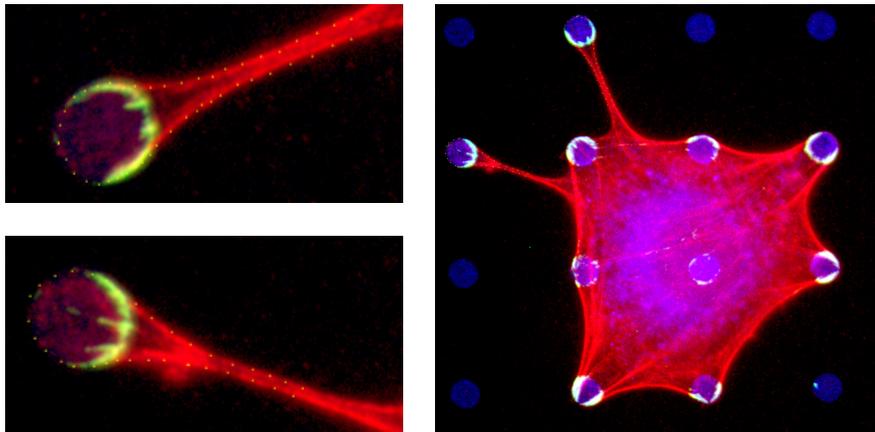


FIGURE 7.1: Images en fluorescence d'une cellule en adhérence sur un réseau de plots (R14) dont les fragments Fn710 sont marqués en bleu, l'actine en rouge et la vinculine en vert. Les zooms des deux plots nouvellement acquis par la cellule grâce à des filopodes montrent des faisceaux de filaments d'actine de part et d'autre du réseau d'actine s'organisant entre les plots et le corps cellulaire.

Ceux-ci viennent se recombinaient avec les fibres de stress existantes (Figure 7.1). Nous n'avons

## 7.2. Perspectives : Organisations dynamiques du cytosquelette d'actine

malheureusement pas eu le temps d'effectuer d'expériences supplémentaires pour obtenir des résultats dynamiques concernant ce processus. Mais ce phénomène, observé grâce à la séparation des zones adhésives, ouvre la voie à de nouveaux modèles incluant le filopode dans les recombinaisons de fibres de stress comme nous l'avons évoqué dans le chapitre introductif.

### 7.2.2 La réorganisation interne des fibres de stress

Plus généralement, des réorganisations de fibres de stress ont été observées à l'intérieur de cellules comme le montre la Figure 7.2. Une recombinaison de deux fibres de stress formant un unique côté d'une forme en une seule fibre a été régulièrement observée (**B**). Celle-ci pourrait être reliée à une certaine minimisation d'énergie, conséquence d'un nouvel équilibre entre les forces exercées par la cellule sur le substrat qui supprimerait la tension au niveau du plot intermédiaire. La diminution de tension entraînerait le désassemblage des adhérences focales, visible sur les formes n'utilisant plus que les plots des coins pour adhérer.

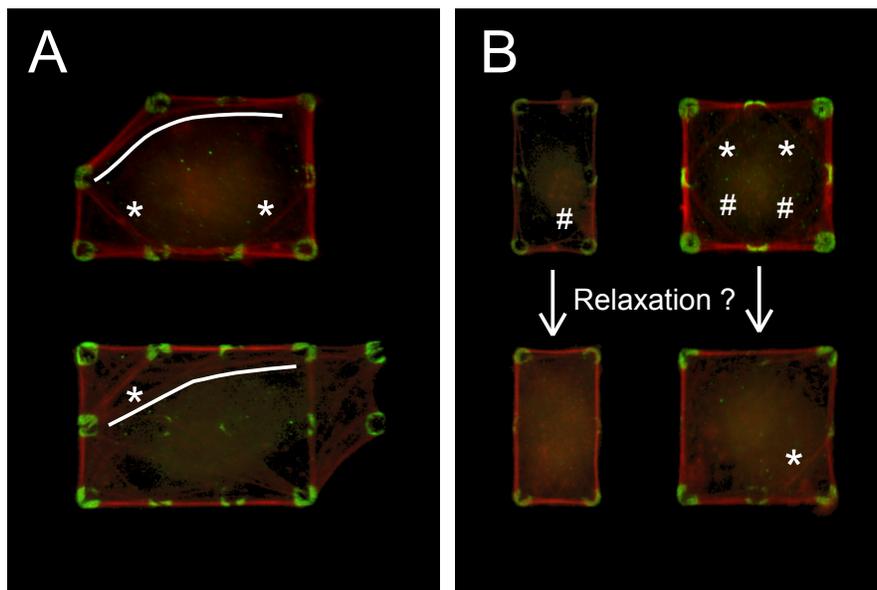


FIGURE 7.2: Images en fluorescence de cellules en adhérence sur un réseau de plots (**A** : R8, **B** : R12) dont l'actine est marquée en rouge et la vinculine en vert.

La géométrie des organisations des fibres devient très simplifiée sur les réseaux. La géométrie du support imposant une distribution spatiale discrète d'adhérences focales, les anciennes fibres de stress (symbole #) paraissent se déplacer vers les coins pour renforcer les fibres en périphérie. Des considérations mécaniques entre le couplage du gel d'actine avec les fibres de stress pourraient

expliquer l'effet de dérive des fibres de stress vers les zones périphériques de la cellule (lignes blanches et #). Les fibres de stress pourraient être déplacées par le gel d'actine qui serait plus actif dans certaines conditions.

L'utilisation de produits biologiques perturbant les régulations et les activités des moteurs moléculaires permettrait de confirmer cette piste ou du moins ajouterait des éléments de réponse dans la compréhension de la dynamique du cytosquelette.

### 7.2.3 La construction du paysage énergétique

Le paysage énergétique offert par un réseau de plots peut être élaboré à partir des différents résultats obtenus pendant la thèse (Figure 7.3). Il est composé des diagrammes C/A des réseaux réalisés dans le chapitre 3 qui donnent des informations sur la position et l'occupation des états métastables. Le fond d'une vallée correspondant à une forme précise est représentée par des diagrammes de phase similaire à celui présenté dans le chapitre 6. En changeant les paramètres du modèle, nous modifions le paysage énergétique de la forme (flèches rouges). Chaque morphologie (tendue, courbée, gonflée) pour une même forme correspond à un minimum d'énergie dépendant de la compétition entre la contractilité des fibres de stress et l'élasticité du gel d'actine. Les filopodes, qui s'avèrent être le paramètre limitant et permettant de passer d'une forme à une autre, sont de véritables barrières énergétiques pour la cellule, qui utilise des processus hors équilibre pour les franchir. Les hauteurs des cols permettant le passage d'une forme à l'autre correspondent à ce coût (flèches noires). Cette approche permettrait de poser les bases d'une approche thermodynamique de l'adhérence.

## 7.2. Perspectives : Organisations dynamiques du cytosquelette d'actine

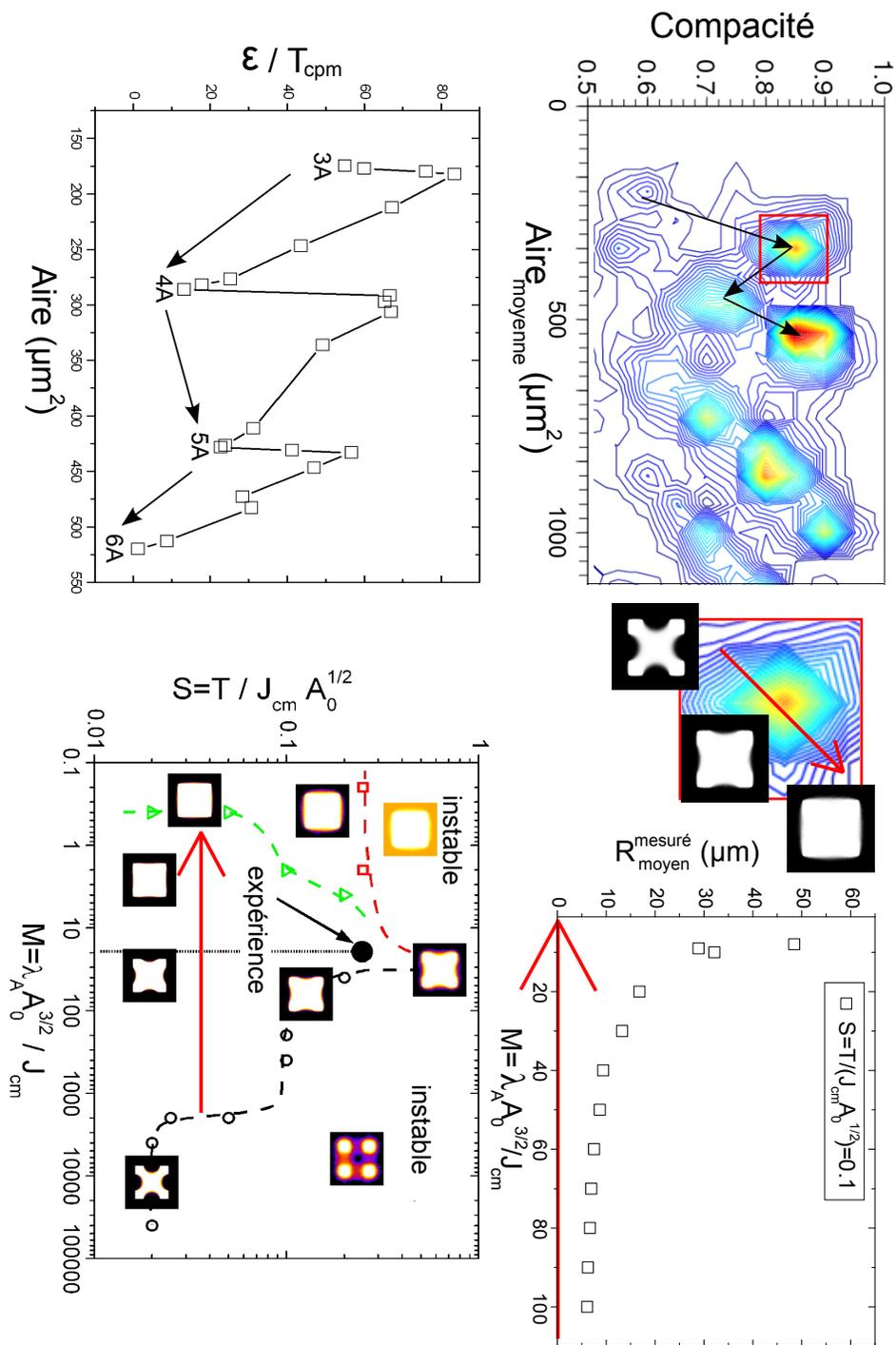


FIGURE 7.3: Schéma des éléments constituant la formation du paysage énergétique d'un réseau de plots. Les transitions entre les formes, rendues possibles par les filopodes, ont un coût énergétique pouvant être estimé. Un zoom sur la forme 4A dans le diagramme C/A permet d'observer la dépendance du rayon de courbure (reliée à la compacité et à l'aire de la cellule) en fonction de paramètres du modèle.



# Bibliographie

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., & WATSON, J.D. 1999. Molecular biology of the cell - 3rd edition. Garland.
- ARNOLD, M., CAVALCANTI-ADAM, E.A., GLASS, R., BLÜMMEL, J., ECK, W., KANTLEHNER, M., KESSLER, H., & SPATZ, J. 2004. Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*, **5**(3), 383–388.
- BALABAN, N.Q., SCHWARZ, U.S., RIVELINE, D., GOICHBURG, P., TZUR, G., SABANAY, I., MAHALU, D., SAFRAN, S., BERSHADSKY, A., ADDADI, L., & GEIGER, B. 2001. Force and focal adhesion assembly : a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature Cell Biology*, **3**(5), 466–472.
- BALLAND, M., RICHERT, A., & GALLET, F. 2005. The dissipative contribution of myosin II in the cytoskeleton dynamics of myoblasts. *European Biophysics Journal*, **34**(3), 255–261.
- BAUER, A.L., JACKSON, T.L., & JIANG, Y. 2007. A cell-based model exhibiting branching and anastomosis during tumor-induced angiogenesis. *Biophysical Journal*, **92**, 3105–3121.
- BELL, G.I., DEMBO, M., & BONGRAND, P. 1984. Cell Adhesion : competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophysical Journal*, **45**, 1051–1064.
- BERNHEIM-GROSWASSER, A., WIESNER, S., GOLSTEYN, R.M., CARLIER, M.-F., & SYKES, C. 2002. The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature*, **417**, 308–311.
- BERSHADSKY, A.D., BALABAN, N.Q., & GEIGER, B. 2003. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **19**, 677–695.
- BERSHADSKY, A.D., BALLESTREM, C., CARRAMUSA, L., ZILBERMAN, Y., GILQUIN, B., KHOCHBIN, S., ALEXANDROVA, A.Y., VERKHOVSKY, A.B., SHEMESH, T., & KOZLOV, M.M. 2006. Assembly and mechanosensory function of focal adhesions : experiments and models. *European journal of cell biology*, **85**(3-4), 165–173.
- BESSER, A., & SCHWARZ, U.S. 2007. Coupling biochemistry and mechanics in cell adhesion : a model for inhomogeneous stress fiber contraction. *New Journal of Physics*, **9**(425).
- BISCHOF, I.K., KLEIN, F., LEHNERT, D., BASTMEYER, M., & SCHWARZ, U.S. 2008. Filamentous network mechanics and active contractility determine cell and tissue shape. *Biophysical Journal*, **95**, 3488–3496.
- BLAWAS, A.S., & REICHERT, W.M. 1998. Protein patterning. *Biomaterials*, **19**, 595–609.
- BOUKELLAL, H., CAMPÁS, O., JOANNY, J.-F., PROST, J., & SYKES, C. 2004. Soft Listeria : Actin-based propulsion of liquid drops. *Physical Review E*, **69**(6), 061906.

- BROCK, A., CHANG, E., HO, C.C., LEDUC, P., JIANG, X., WHITESIDES, G.M., & INGBER, D.E. 2003. Geometric determinants of directional cell motility revealed using microcontact printing. *Langmuir*, **19**, 1611–1617.
- BURRIDGE, K. 1981. Are stress fibres contractile? *Nature*, **294**(5843), 691–692.
- BURRIDGE, K., & CHRZANOWSKA-WODNICKA, M. 1996. Focal adhesions, contractility and signaling. *Annual review of cell and developmental biology*, **12**(1), 463–519.
- CHANG, K.-C., TEES, D.J.F., & HAMMER, D.A. 2000. The state diagram for cell adhesion under flow : Leukocyte rolling and firm adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**(21), 11262–11267.
- CHEN, C.S., MRKSICH, M., HUANG, S., WHITESIDES, G.M., & INGBER, D.E. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science*, **276**(5317), 1425–1428.
- COJOC, D., DIFATO, F., FERRARI, E., SHAHAPURE, R.B., LAISHRAM, J., RIGHI, M., DI FABRIZIO, E.M., & TORRE, V. 2007. Properties of the force exerted by filopodia and lamellipodia and the involvement of cytoskeletal components. *Public Library of Science ONE*, **2**(10), e1072.
- CRAMER, L.P., SIEBERT, M., & MITCHISON, T.J. 1997. Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts : implications for the generation of motile force. *Journal of Cell Biology*, **136**(6), 1287–1305.
- DANUSER, G. 2009. Testing the lamella hypothesis : the next steps on the agenda. *Journal of Cell Science*, **122**(12), 1959–1962.
- DE ANDA, F.C., POLLAROLO, G., DA SILVA, J.S., CAMOLETTO, P.G., FEIGUIN, F., & DOTTI, C.G. 2005. Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature*, **436**(7051), 704–708.
- DEMALI, K.A., & BURRIDGE, K. 2003. Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *Journal of Cell Science*, **116**(12), 2389–2397.
- DEMALI, K.A., BARLOW, C.A., & BURRIDGE, K. 2002. Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin : coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *The Journal of Cell Biology*, **159**(5), 881–891.
- DISCHER, D.E., JANMEY, P., & WANG, Y. 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, **310**(5751), 1139–1143.
- DISCHER, D.E., MOONEY, D.J., & ZANDSTRA, P.W. 2009. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*, **324**(5935), 1673–1677.
- DÖBEREINER, H.-G., DUBIN-THALER, B., GIANNONE, G., XENIAS, H.S., & SHEETZ, M.P. 2004. Dynamic phase transition in cell spreading. *Physical Review Letters*, **93**(10), 108105.
- DU ROURE, O., SAEZ, A., BUGUIN, A., AUSTIN, R.H., CHAVRIER, P., SIBERZAN, P., & LADOUX, B. 2005. Force mapping in epithelial cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **102**(7), 2390–2395.
- DUBIN-THALER, B., GIANONNE, G., DÖBEREINER, H.-G., & SHEETZ, M.P. 2004. Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. *Biophysical Journal*, **86**, 1794–1806.
- ETIENNE-MANNEVILLE, S. 2004. Cdc42 - the centre of polarity. *Journal of cell science*, **117**(8), 1291–1300.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- FABRY, B., MAKSYM, G.N., BUTLER, J.P., GLOGAUER, M., NAVAJAS, D., & FREDBERG, J.J. 2001. Scaling the microrheology of living cells. *Physical Review Letters*, **87**(14), 148102.
- FAIX, J., BREITSPRECHER, D., STRADAL, T.E.B., & ROTTNER, K. 2009. Filopodia : Complex models for simple rods. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **41**(8-9), 1656–1664.
- FALCONNET, D., GRANDIN, H.M., TEXTOR, M., & CSUCS, G. 2006. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials*, **27**(16), 3044–63.
- FINK, J., THÉRY, M., AZIOUNE, A., DUPONT, R., CHATELAIN, F., BORNENS, M., & PIEL, M. 2006. Comparative study and improvement of current cell micro-patterning techniques. *Lab on a Chip*, **7**, 672–680.
- GEIGER, B., & BERSHADSKY, A.D. 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Current opinion in cell biology*, **13**(5), 584–592.
- GIANCOTTI, F.G., & RUOSLAHTI, E. 1999. Integrin signaling. *Science*, **285**(5430), 1028–1033.
- GLAZIER, J.A., & GRANER, F. 1993. Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells. *Physical Review E*, **47**(3), 2128.
- GLAZIER, J.A., ANDERSON, M.P., & GRETT, G.S. 1990. Coarsening in the two-dimensional soap froth and the large-Q Potts model : A detailed comparison. *Philosophical Magazine Part B*, **62**(6), 615.
- GRANER, F., & GLAZIER, J.A. 1992. Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended Potts model. *Physical Review Letters*, **69**(13), 2013.
- GRANER, F., & SAWADA, Y. 1993. Can surface adhesion drive cell-rearrangement? *Journal of Theoretical Biology*, **164**, 455–506.
- GUILLOU, H., DEPRAZ-DEPLAND, A., PLANUS, E., VIANAY, B., CHAUSSY, J., GRICHINE, A., ALBIGÈS-RIZO, C., & BLOCK, M.R. 2008. Lamellipodia nucleation by filopodia depends on integrin occupancy and downstream Rac1 signaling. *Experimental Cell Research*, **314**(3), 478–488.
- GUPTON, S.L., & GERTLER, F.B. 2007. Filopodia : the fingers that do the walking. *Science STKE*, **2007**(400).
- HALL, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**(5350), 509–514.
- HAMMER, D.A., & APTE, S.M. 1992. Simulation of cell rolling and adhesion on surfaces in shear flow : general results and analysis of selectin-mediated. *Biophysical Journal*, **63**, 35–57.
- HEATH, J.P., & HOLIFIELD, B.F. 1991. Cell locomotion : new research tests old ideas on membrane and cytoskeletal flow. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **18**(4), 245–257.
- HERBERT, C.B., MCLERNON, T.L., HYPOLITE, C.L., ADAMS, D.N., PIKUS, L., & HUANG, C.C. 1997. Micropatterning gradients and controlling surface densities of photoactivable biomolecules on self-assembled monolayers of oligo(ethylene glycol) alkanethiolates. *Chemistry & Biology*, **4**, 731–737.
- HUGHES, P.E., & PFAFF, M. 1998. Integrin affinity modulation. *Trends in Cell Biology*, **8**(9), 359–364.
- INGBER, D.E. 1993. Cellular tensegrity : defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, **104**(3), 613–627.

- INGBER, D.E. 2003. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *Journal of Cell Science*, **116**(7), 1157–1173.
- INGBER, D.E. 2006. Cellular mechanotransduction : putting all the pieces together again. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, **20**(7), 811–827.
- ISRAELACHVILI, J.N. 1991. Intermolecular and surface forces : 2nd Revised edition. Academic Press Inc.
- KÄFER, J. 2008. From cells to tissues : physical modelling of the collective behaviour of embryonic cells. Université Joseph Fourier - Grenoble 1.
- KÄFER, J., HAYASHI, T., MARÉE, A.F.M., CARTHEW, R.W., & GRANER, F. 2007. Cell adhesion and cortex contractility determine cell patterning in the Drosophilaretina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **104**(47), 18549–18554.
- KANDERE-GRZYBOWSKA, K., CAMPBELL, C.J., MAHMUD, G., KOMAROVA, Y., SOH, S., & GRZYBOWSKI, B.A. 2007. Cell motility on micropatterned treadmills and tracks. *Soft Matter*, **3**(6), 672–679.
- KAVERINA, I., KRYLYSHKINA, O., & SMALL, J.V. 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *The Journal of Cell Biology*, **146**(5), 1033–1044.
- KOVACS, M., TOTH, J., HETENYI, C., MALNASI-CSIZMADIA, A., & SELLERS, J.R. 2004. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *The journal of biological chemistry*, **279**(34), 35557–35563.
- KULKARNI, S.A., MIRJI, S.A., MANDALE, A.B., GUPTA, R.P., & KUNJUKRISHNA, P.V. 2005. Growth kinetics and thermodynamic stability of octdecyltrichlorosilane self-assembled monolayer on Si (100) substrate. *Materials letters*, **59**, 3890–3895.
- KUO, S.C., HAMMER, D.A., & LAUFFENBURGER, D.A. 1997. Simulation of detachment of specifically bound particles from surfaces by shear flow. *Biophysical Journal*, **73**, 517–531.
- LAN, Y., & PAPOIAN, G.A. 2008. The stochastic dynamics of filopodia growth. *Biophysical Journal*, **94**, 3839–3852.
- LAURENT, V.M., HÉNON, S., PLANUS, E., FODIL, R., BALLAND, M., ISABEY, D., & GALLET, F. 2002a. Assessment of mechanical properties of adherent living cells by bead micromanipulation : comparison of magnetic twisting cytometry vs optical tweezers. *Journal of Biomechanical Engineering*, **124**(4), 408–421.
- LAURENT, V.M., NADAS, P. CA FODIL, R., PLANUS, E., ASNACIOS, A., WENDLING, S., & ISABEY, D. 2002b. Tensegrity behaviour of cortical and cytosolic cytoskeletal components in twisted living adherent cells. *Acta Biotheoretica*, **50**, 331–356.
- LEHNERT, D., WEHRLE-HALLER, B., DAVID, C., WEILAND, U., BALLESTREM, C., IMHOF, B.A., & BASTMEYER, M. 2004. Cell behaviour on micropatterned substrata : limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *Journal of Cell Science*, **117**(1), 41–52.
- LI, F., REDICK, S.D., ERICKSON, H.P., & MOY, V.T. 2003. Force measurements of the  $\alpha_5\beta_1$  integrin - fibronectin interaction. *Biophysical Journal*, **84**(2), 1252–1262.
- LIU, V.A., JASTROMB, W.E., & BHATIA, S.N. 2002. Engineering protein and cell adhesivity using PEO-terminated triblock polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, **60**(1), 126–134.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- LUDERS, J., & STEARNS, T. 2007. Microtubule-organizing centres : a re-evaluation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**(2), 161–167.
- LUO, Y., XU, X., LELE, T., KUMAR, S., & INGBER, D.E. 2008. A multimodular tensegrity model of an actin stress fiber. *Journal of Biomechanics*, **41**(11), 2379–2387.
- MAHMUD, G., CAMPBELL, C.J., BISHOP, K.J.M., KOMAROVA, Y.A., CHAGA, O., SOH, S., HUDA, S., KANDERE-GRZYBOWSKA, K., & GRZYBOWSKI, B.A. 2009. Directing cell motions on micropatterned ratchets. *Nature Physics*.
- MARCY, Y., PROST, J., CARLIER, M-F., & SYKES, C. 2004. Forces generated during actin-based propulsion : A direct measurement by micromanipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**(16), 5992–5997.
- MARÉE, A.F.M., GRIENEISEN, V.A., & HOGEWEG, P. 2007. The Cellular Potts Model and biophysical properties of cells, tissues and morphogenesis. *Pages 107–136 of* : ANDERSON, A.R.A., CHAPLAIN, M.A.J., & REJNIAK, K.A. (eds), *Single cell based models in biology and medicine*.
- MARMOTTANT, P., MGHARBEL, A., KÄFER, J., AUDREN, B., RIEU, J.P., VIAL, J.C., VAN DER SANDEN, B., MARÉE, A., GRANER, F., & DELANOË-AYARI, H. 2009. Effective viscosity of cell aggregates : the role of fluctuations and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. In Press.
- MCBEATH, R., PIRONE, D.M., NELSON, C.M., BHADRIRAJU, K., & CHEN, C.S. 2004. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Developmental Cell*, **6**, 483–495.
- MCPHERSON, T., KIDANE, A., SZLEIFER, I., & PARK, K. 1998. Prevention of protein adsorption by tethered poly(ethylene oxide) layers : experiments and single-chain mean-field analysis. *Langmuir*, **14**, 176–186.
- MITCHISON, T.J., & CRAMER, L.P. 1996. Actin-Based Cell Motility and Cell Locomotion. *Cell*, **84**(3), 371–379.
- NELSON, C.M., JEAN, R.P., TAN, J.L., LIU, W.F., SNIADOCKI, N.J., SPECTO, A.A., & CHEN, C.S. 2005. Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **102**(33), 11594–11599.
- NOBES, C.D., & HALL, A. 1995. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multi-molecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, **81**(1), 53–62.
- NOGALES, E. 1999. A structural view of microtubule dynamics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **56**(1), 133–142.
- NOIREAUX, V., GOLSTEYN, R.M., FRIEDERICH, E., PROST, J., ANTHONY, C., LOUWARD, D., & SYKES, C. 2000. Growing an actin gel on spherical surfaces. *Biophysical Journal*, **78**, 1643–1654.
- OLIVER, T., JACOBSON, K., & DEMBO, M. 1995. Traction forces in locomoting cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **31**(3), 225–240.
- PALUCH, E., SYKES, C., PROST, J., & BORNENS, M. 2006. Dynamic modes of the cortical actomyosin gel during cell locomotion and division. *Trends in Cell Biology*, **16**(1), 5–10.
- PANTALONI, D., LE CLAINCHE, C., & M-F.CARLIER. 2001. Mechanism of actin-based motility. *Science*, **292**(5521), 1502–1506.

- PARKER, K.K., BROCK, A.L., C.B., MANNIX, R.J., WANG, N., OSTUNI, E., GEISSE, N.A., ADAMS, J.C., WHITESIDES, G.M., & INGBER, D.E. 2002. Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, **16**(10), 1195–1204.
- PARTRIDGE, M.A., & MARCANTONIO, E.E. 2006. Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. *Molecular Biology of the Cell*, **17**(10), 4237–4248.
- PELLEGRIN, S., & MELLOR, H. 2007. Actin stress fibres. *Journal of Cell Science*, **120**(20), 3491–3499.
- PETERSON, L.J., RAJFUR, Z., MADDOX, A.S., FREEL, C.D., CHEN, Y., EDLUND, M., OTEY, C., & BURRIDGE, K. 2004. Simultaneous stretching and contraction of stress fibers in vivo. *Molecular Biology of the Cell*, E03–09–0696.
- PLASTINO, J., & SYKES, C. 2005. The actin slingshot. *Current Opinion in Cell Biology*, **17**(1), 62–66.
- PLASTINO, J., LELIDIS, I., PROST, J., & SYKES, C. 2004. The effect of diffusion, depolymerization and nucleation promoting factors on actin gel growth. *European Biophysical Journal*, **33**, 310–320.
- PLAYFORD, M.P., & SCHALLER, M.D. 2004. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene*, **23**, 7928–7946.
- PONTI, A., MATOV, A., ADAMS, M., GUPTON, S., WATERMAN-STORER, C.M., & DANUSER, G. 2005. Periodic patterns of actin turnover in lamellipodia and lamellae of migrating epithelial cells analyzed by quantitative fluorescent speckle microscopy. *Biophysical Journal*, **89**, 3456–3469.
- RAUCHER, A., & SHEETZ, P. 2000. Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *The Journal of Cell Biology*, **184**(1), –.
- RAYMENT, I., HOLDEN, H.M., WITTAKER, M., YOHAN, C.B., LORENZ, M., HOLMES, K.C., & MILLIGAN, R.A. 1993. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*, **261**, 58–65.
- RIDLEY, A.J. 2001. Rho family proteins : coordinating cell responses. *Trends in Cell Biology*, **11**, 471–477.
- RIDLEY, A.J., SCHWARTZ, M.A., BURRIDGE, K., FIRTEL, R.A., GINSBERG, M.H., BORISY, G., PARSONS, J.T., & HORWITZ, A.R. 2003. Cell migration : integrating signals from front to back. *Science*, **302**(5651), 1704–1709.
- RIVELINE, D., ZAMIR, E., BALABAN, N.Q., SCHWARZ, U.S., ISHIZAKI, T., NARUMIYA, S., KAM, Z., GEIGER, B., & 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. *The Journal of Cell Biology*, **153**(6), 1175–1186.
- ROHATGI, R., MA, L., MIKI, H., LOPEZ, M., KIRCHHAUSEN, T., TAKENAWA, T., & KIRSCHNER, M.W. 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex Links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, **97**(2), 221–231.
- ROTH, S. 2009. Réseaux de neurones modèles : contrôle de la différenciation axonal par micro-patterns. Université Joseph Fourier - Grenoble 1.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- ROTTNER, K., HALL, A., & SMALL, J.V. 1999. Interplay between rac and rho in the control of substrate contact dynamics. *Current Biology*, **9**(12), 640–648, S1.
- RUIZ, S.A., & CHEN, C.S. 2008. Emergence of patterned stem cell differentiation within multicellular structures. *Stem Cells*.
- SAGIV, J. 1980. Organized monolayers by adsorption. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, **102**(1), 92–98.
- SINGHVI, R., KUMAR, A., LOPEZ, G.P., STEPHANOPOULOS, G.N., WANG, D.I, WHITESIDES, G.M., & INGBER, D.E. 1994. Engineering cell shape and function. *Science*, **264**(5159), 696–698.
- SMALL, J.V., STRADAL, T., VIGNAL, E., & ROTTNER, K. 2002. The lamellipodium : where motility begins. *Trends in Cell Biology*, **12**(3), 112–120.
- SORRIBAS, H., PADESTE, C., & TIEFENAUER, L. 2002. Photolithographic generation of protein micropatterns for neuron culture applications. *Biomaterials*, **23**(3), 893–900.
- SUN, Z., MARTINEZ-LEMUS, L.A., TRACHE, A., TRZECIAKOWSKI, J.P., DAVIS, G.E., POHL, U., & MEININGER, G.A. 2005. Mechanical properties of the interaction between fibronectin and  $\alpha_5\beta_1$  integrins on vascular smooth muscle cells studied using atomic force microscopy. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*.
- SVITKINA, T.M., BULANOVA, E.A., CHAGA, O.Y., VIGNJEVIC, D.M., KOJIMA, S., VASILIEV, J.M., & BORISY, G.G. 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *The Journal of Cell Biology*, **160**(3), 409–421. PMID : 12566431.
- THÉRY, M., PEPIN, A., DRESSAIRE, E., CHEN, Y., & BORNENS, M. 2006. Cell distribution of stress fibers in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **63**(6), 341–355.
- THÉRY, M., JIMENEZ-DALMARONI, A., RACINE, V., BORNENS, M., & JÜLICHER, F. 2007. Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature*, **447**(7143), 493–496.
- TORNEY, D.C., DEMBO, M., & BELL, G.I. 1986. Thermodynamics of cell adhesion II : freely mobile repellers. *Biophysical Journal*, **49**, 501–507.
- VAN DER VAART, B., AKHMANOVA, A., & STRAUBE, A. 2009. Regulation of microtubule dynamic instability. *Biochemical society transactions*, **037**(5), 1007–1013.
- WANG, N., NARUSE, K., STAMENOVIĆ, D., FREDBERG, J.J., MIJAILOVICH, S.M., TOLIĆ-NØRRELYKKE, I.M., POLTE, T., MANNIX, R., & INGBER, D.E. 2001. Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(14), 7765–7770.
- WANG, N., OSTUNI, E., WHITESIDES, G.M., & INGBER, D.E. 2002. Micropatterning tractional forces in living cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **52**(2), 97–106.
- WASSERMAN, S.R., Y.-T.TAO, & WHITESIDES, G.M. 1989. Structure and reactivity of alkylsiloxane monolayers formed by reaction of alkyltrichlorosilanes on silicon substrates. *Langmuir*, **5**, 1074–1087.
- WOZNIAK, M.A., & CHEN, C.S. 2009. Mechanotransduction in development : a growing role for contractility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **10**, 34–43.
- ZAMIR, E., & GEIGER, B. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science*, **114**(20), 3583–3590.

- ZÖLLNER, D., & STREITENBERGER, P. 2008. Normal grain growth : Monte Carlo Potts Model simulation and Mean-Field theory. *Pages 3-18 of* : SHAKER VERLAG (ed), *Micro-Macro-interaction*.

# Annexe A

## Matériel et méthodes, les autres outils

### A.1 Biologie cellulaire

Les cellules utilisées sont des fibroblastes NIH 3T3 cultivées dans le Laboratoire d'Etudes de la Différenciation et de l'Adhérence Cellulaires à l'Institut Albert Bonniot de Grenoble. Ces cellules sont contractiles. Elles ont la particularité de développer des fibres de stress afin d'exercer des forces sur le substrat. Celles-ci sont responsables entre autre du maintien de la forme cellulaire.

#### A.1.1 Culture des cellules

Les cellules sont tout d'abord placées dans une boîte de Petri dans un incubateur régulé à 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C jusqu'à confluence\*. Du milieu nutritif composé d' $\alpha$ -MEM (Gibco-InVitrogen, Oxon, UK) avec 10% de sérum foetal de chèvre, de pénicilline et de streptomycine est ajouté dans la boîte de Pétri. Une fois à confluence, 5 ml de trypsine est ajoutée au milieu nutritif. En quelques minutes, les cellules vont se détacher du fond de la boîte de Petri. Le milieu avec les cellules est placé en centrifugeuse durant cinq minutes à 3 000 tours par minute. Les cellules, plus lourdes que le milieu vont se retrouver au fond du tube. Un nouveau milieu remplace l'ancien mélangé à la trypsine, la concentration de cellules est donc contrôlée à cette étape en fonction du volume du nouveau milieu ajouté. Seule une partie des cellules est remise en culture afin d'avoir une faible concentration de cellules pour la boîte de Petri. Cette étape permet d'initialiser le développement cellulaire. Les cellules en incubation sont utilisées quelque 24 heures après pour les expériences. D'ici là, la confluence ne sera pas atteinte, ce qui laisse les processus d'adhérence et de migration mais aussi de division actifs.

---

\*. La confluence signifie que la boîte de culture est totalement occupée par les cellules après plusieurs divisions cellulaires

### A.1.2 Conditions expérimentales

Avant l'expérience, les cellules sont sorties de l'incubateur et retraitées à la trypsine puis centrifugées, comme décrit précédemment. Les cellules sont ensuite ensemencées sur une lamelle de verre comportant les réseaux microstructurés. L'échantillon est replacé dans l'incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> durant le temps d'adhérence choisi. Pour les expériences sur les cellules fixées, des visualisations ponctuelles sont effectuées afin de vérifier l'état d'activité des cellules, et le cas échéant, rallonger le temps d'adhérence si nécessaire. En effet, la dépendance en temps d'adhérence a été évoquée précédemment comme déterminant les formes préférentielles observées. Bien que les protocoles biologiques soient identiques et bien que les cellules proviennent toutes à l'origine de la même lignée, deux expériences identiques menées à quelques jours d'intervalle vont donner des résultats proches mais pas exactement similaires. L'avantage de notre méthode de microfabrication, qui permet d'obtenir rapidement des réseaux identiques avec le même masque, nous permet d'utiliser plusieurs lamelles de verre pour une même expérience, améliorant les statistiques de formes.

### A.1.3 Immunofluorescence

Après le temps d'adhérence souhaité, les cellules sont fixées dans du PBS avec 3% de paraformaldehyde et 2% de sucrose et perméabilisées avec 0.2% de Triton X-100 dans du PBS. Les sites non spécifiques sont bloqués avec du PBS et 10% de sérum de chèvre pendant 45 minutes à 37°C. La visualisation de l'actine est obtenue grâce à du Tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC)-phalloïdin (Sigma-Aldrich). Un clone anti-vinculine (clone VIN-11-5, Sigma, France) est également ajouté lorsque la visualisation des adhérences focales est souhaitée. Le plus souvent, les fragments de fibronectine Fn710 utilisés sont eux aussi équipés de fluorophores permettant de visualiser les zones adhésives. La lamelle de verre est ensuite collée à l'aide de mowiol sur une lame de verre et déposée dans un endroit sec à température ambiante pour laisser sécher le mowiol. Les cellules se retrouvent confinées dans le mowiol entre la lamelle et la lame de verre.

### A.1.4 Vidéo-microscopie

La vidéo-microscopie est une étude temporelle. On observe en direct l'adhérence de cellule en effectuant une acquisition périodique d'images à des endroits prédéterminés. Les cellules utilisées n'étant pas transfectées<sup>†</sup>, l'acquisition se fait en contraste de phase. Les zones relativement plates apparaissent lumineuses tandis que les zones à fort contraste sont obscures. Pour ce type d'expérience, la lamelle de verre est placée dans un incubateur régulé à 37°C. De l'hepes est ajouté au milieu nutritif afin de simuler un pourcentage de CO<sub>2</sub>. Des pousses seringues reliés à la chambre d'incubation permettent l'ajout de milieu nutritif durant l'expérience.

---

<sup>†</sup>. Aucune protéine n'a été modifiée pour fluorescer.

## A.2 Protocoles de microfabrication

### A.2.1 La silanisation

Avant de commencer la réaction de silanisation, un traitement de la surface des lamelles de verre est effectué pour optimiser la réaction avec le silicium oxydé des silanes. Celles-ci sont nettoyées de tout élément organique grâce à un plasma d'oxygène de forte puissance (600 watts pendant 10 minutes). La surface nettoyée ne présente donc que du silicium oxydé. Elles sont laissées à l'air libre une demi-heure afin de laisser l'eau présente dans l'air se déposer en une couche mince sur la lamelle, créant des groupes OH liés aux atomes de silicium du verre. Les lamelles de verre sont placées dans une boîte de Pétri pour la réaction de silanisation avec l'ODTS.

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'utilisation de silane nécessite une attention particulière à l'humidité ambiante puisque des micelles peuvent rapidement se créer. L'eau va permettre aux silanes de s'assembler et va supprimer son efficacité durant la réaction avec la lamelle de verre. Nous effectuons cette réaction en salle blanche, où la température et l'humidité sont contrôlées. Nous pouvons placer entre 8 et 15 lamelles de verre (Menzel - Gläser) suivant leur taille : 22 mm de diamètre pour les expériences avec fixation, 30 mm pour celles résolues en temps. Nous utilisons de l'hexane  $CH_3 - (CH_2)_4 - CH_3$  fourni par Fluka (ref : 52766) comme solvant. Les volumes des produits pour une boîte de Pétri sont : 20  $\mu$ l d'ODTS pour 10 ml d'hexane.

Après une heure de réaction, les lamelles sont retirées de la boîte de Petri. Une succession de nettoyages sous ultrasons est effectuée pour supprimer toute nouvelle réaction du silane, évitant la formation de micelles ou la destruction de la couche. Les lamelles sont placées dans un bécher d'hexane, puis d'acétone et enfin d'alcool. Chaque bécher est placé 3 minutes dans le bain à ultrasons. Les lamelles sont ensuite séchées une à une sous azote. La verrerie et les seringues sont nettoyées à l'hexane, puis à l'acétone et enfin à l'alcool. Elles sont ensuite laissées en salle blanche jusqu'à une prochaine utilisation. Le silane et l'hexane sont enfin placés dans un dessiccateur en salle blanche pour limiter le contact avec l'eau.

### A.2.2 La lithographie

Après la silanisation des surfaces, une couche homogène de résine de 0,5  $\mu$ m d'épaisseur est réalisée à l'aide d'une tournette puis recuite pour la stabiliser. Nous utilisons un aligneur (Karl Suss - MJB3) pour effectuer l'insolation aux UV puis un révélateur standard de microélectronique (Rohm et Haas Electronic Materials - Micro Dev). La stabilité de la résine restante et des couches de silanes permet le stockage des échantillons en l'état pendant plusieurs mois. Les étapes d'adsorption sont effectuées le jour de l'expérience, pour profiter au maximum de la durabilité des couches de protéines et de molécules anti-adhésives.

### A.2.3 L'immobilisation des protéines

Les lamelles sont placées dans des plaques 6 puits où une solution contenant du PBS (Phosphate Buffered Saline) et des protéines adhésives est ajoutée. La concentration de protéines adhésives est de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Un des principaux avantages de cette technique réside dans la possibilité d'utiliser d'autres protéines adhésives, puisque l'interaction est non spécifique. Après une heure de réaction à 37 ° C, un nettoyage au PBS des lamelles est effectué à l'aide de bain à ultrasons pour supprimer les protéines non adsorbées sur la surface.

### A.2.4 La passivation

La résine restante est supprimée grâce à un nettoyage des lamelles dans un bécher d'alcool placé dans le bain à ultrasons. La liaison entre les fragments de fibronectine et le silane est assez forte, puisque cette étape dans l'alcool n'altère pas les liaisons entre les protéines et le silane pour un nettoyage de quelques secondes. La surface silanisée recouverte par la résine devient accessible. Les lamelles sont à nouveau placées dans des plaques 6 puits, et du pluronic (F127 de chez Sigma-Aldrich) est ajouté avec une concentration de 4% dans du PBS. Après deux heures de réaction à 37°C, les lamelles sont rincées au PBS et prêtes à être utiliser pour les expériences.

# Annexe B

## Calculs

### B.1 Chapitre 5 - Loi de Laplace

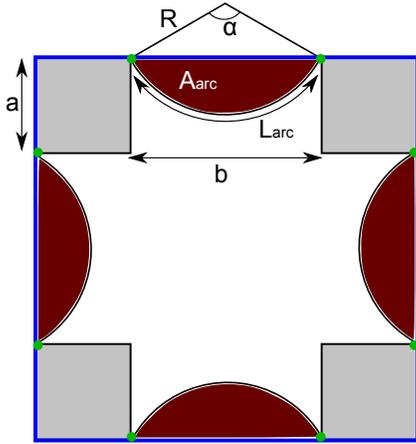


FIGURE B.1: Schéma de la géométrie d'une cellule en forme carrée utilisant 4 plots adhésifs. La courbure entre 2 plots distants de  $d$  est un arc de cercle de rayon  $R$ , de longueur  $L_{arc}$ .

Rappelons qu'en utilisant le fait qu'il n'y a pas de changement dans l'aire adhésive  $A_A$  pour une forme utilisant un nombre de plot constant, et que nous nous plaçons à l'équilibre, nous avons d'après notre modèle :

$$-\frac{2\lambda_A(A - A_0)}{\gamma_{cm}} = \frac{dL}{dA} \quad (\text{B.1})$$

La géométrie de la forme étudiée permet facilement de trouver la dérivée du périmètre en fonction de celle de l'aire. Posons les caractéristiques morphologiques de la cellule en fonction des dimensions du support dont les plots de largeur  $a$  sont espacés de la distance  $d$  :

$$\begin{aligned} A &= A_{carré} - 4 \times A_{plot} - 4 \times A_{arc} \\ L &= 8 \times a + 4 \times L_{arc} \end{aligned} \quad (\text{B.2})$$

$A_{carré}$  représente l'aire du carré théorique de largeur  $2a + d$  dessiné en bleu sur la Figure B.1. Les autres dimensions nécessaires aux calculs sont reportées sur la figure. Nous prendrons comme hypothèse que le début de l'arc commence toujours vers les coins intérieurs des plots du côté du milieu (marqué par des ronds vert sur la figure). Ainsi, calculer la variation d'aire  $dA$  et

la variation de périmètre  $dL$  de la cellule revient à calculer les variations d'aire et de périmètre des surfaces comprises entre la cellule et le carré théorique soit :

$$\frac{dA}{dL} = \frac{dA_{arc}}{dL_{arc}} \quad (\text{B.3})$$

En effet, comme la distance  $d$  ne varie pas, la cellule ne peut que changer son rayon de courbure pour trouver l'aire et le périmètre correspondants au minimum local d'énergie. On va donc calculer  $dL_{arc}$  et  $dA_{arc}$ , le rapport des deux étant égal à  $dL$  sur  $dA$ . Le périmètre  $L_{arc}$  est égal à la somme longueur de la fibre  $L$  et distance entre les plots  $d$ . La longueur de l'arc vaut  $L = \alpha \times R$ . La géométrie nous permet d'exprimer l'angle  $\alpha$  en fonction des longueurs caractéristiques  $R$  et  $d$  :

$$\begin{aligned} \alpha &= 2 \arcsin\left(\frac{d}{2R}\right) \\ L_{arc} &= L + d \\ &= \alpha R + d \\ &= 2 \arcsin\left(\frac{d}{2R}\right) R + d \end{aligned} \quad (\text{B.4})$$

Nous pouvons donc calculer la dérivée du périmètre en fonction du rayon de courbure et simplifier en utilisant le facteur  $g$  tel que :

$$g = \frac{d}{2R} \quad (\text{B.5})$$

$$\frac{dL_{arc}}{dR} = 2 \arcsin(g) - \frac{2g}{\sqrt{1-g^2}} \quad (\text{B.6})$$

Pour déterminer l'aire  $A_{arc}$ , il faut utiliser le fait qu'elle est la différence entre l'aire du disque  $A_d$  d'angle  $\alpha$  et de rayon  $R$  et l'aire du triangle  $A_t$  de hauteur  $R \cos(\alpha/2)$  et de largeur  $d$ . En utilisant à nouveau le terme  $g$  décrit en B.5 ainsi qu'en exprimant l'angle  $\alpha$  comme défini en B.4 nous obtenons :

$$\begin{aligned} A_{arc} &= A_d - A_t \\ &= \frac{\alpha R^2}{2} + \frac{Rd}{2} \cos\left(\frac{\alpha}{2}\right) \\ &= R^2 \arcsin\left(\frac{d}{2R}\right) - \frac{Rd}{2} \cos\left(\arcsin\left(\frac{d}{2R}\right)\right) \\ &= R^2 \arcsin(g) - \frac{Rd}{2} \sqrt{1-g^2} \end{aligned} \quad (\text{B.7})$$

Nous avons utilisé la relation trigonométrique  $\cos(\arcsin(x)) = \sqrt{1-x^2}$  dans le développement précédent afin de simplifier le calcul de dérivée. Pour plus de lisibilité, nous allons dériver en

## B.1. Chapitre 5 - Loi de Laplace

---

fonction de  $R$  chacune des aires  $A_d$  et  $A_t$  successivement :

$$\begin{aligned}\frac{dA_d}{dR} &= 2R \arcsin(g) - \frac{d}{2\sqrt{1-g^2}} \\ \frac{dA_t}{dR} &= \frac{d}{2\sqrt{1-g^2}}\end{aligned}$$

Nous pouvons donc revenir à  $dA_{arc}$  :

$$\begin{aligned}\frac{dA_{arc}}{dR} &= \frac{dA_d}{dR} - \frac{dA_t}{dR} \\ &= 2R \arcsin(g) - \frac{d}{\sqrt{1-g^2}}\end{aligned}\tag{B.8}$$

En intégrant la variation de périmètre de l'arc B.6 et celle de son aire B.8 dans l'égalité B.3, nous obtenons :

$$\frac{dA}{dL} = -\frac{dA_{arc}}{dL_{arc}} = -R\tag{B.9}$$

Ce résultat, intégré dans l'égalité obtenue à partir du modèle B.1 permet de retrouver la loi de Laplace :

$$-\frac{2\lambda_A(A - A_0)}{\gamma_{cm}} = \frac{\Pi}{\gamma_{cm}} = -\frac{1}{R}\tag{B.10}$$

## Résumé

L'adhérence cellulaire est un processus vital impliqué dans de nombreux phénomènes biologiques fondamentaux comme la différenciation, la réparation tissulaire ou encore le développement cellulaire. Cette thèse porte sur une étude alliant expériences et modélisation de cellules uniques en adhérence sur des supports micro-structurés. Les résultats montrent que la contrainte géométrique imposée par les supports à contraste adhésif limite l'adhérence. Au-delà de cette limitation, une organisation reproductible du cytosquelette d'actine est observée cela suggère l'existence de lois physiques simples régissant ce processus. Nous avons développé une méthode de classification des formes géométriques élémentaires observées expérimentalement nous permettant d'obtenir des statistiques robustes. En nous basant sur le modèle de Potts Cellulaire, nous avons pu reproduire les résultats expérimentaux. Ce modèle énergétique démontre que les formes élémentaires sont des états métastables utilisés par les cellules au cours de l'adhérence. Les paramètres du modèle sont reliés aux paramètres biologiques pertinents. Nous présentons des résultats qui relient la courbure des interfaces aux paramètres biologiques. Nous montrons que la mesure expérimentale de cette courbure est une représentation de la compétition entre la contractilité des fibres de stress et l'élasticité du gel d'actine. Une correspondance entre les propriétés physiques issues du modèle et les processus biochimiques régulant et organisant l'adhérence cellulaire est ainsi possible.

Mots clés : adhérence cellulaire, cytosquelette d'actine, support micro-structuré, modèle de Potts Cellulaire, états métastables, auto-organisation.

## Abstract - Single cells spreading onto micropatterned substrates

The cell adhesion is a critical process involved in many fundamental biological phenomena as differentiation, tissue repair or cell development. This thesis focuses on a study combining experiments and modelization of single cells spreading on micro-fabricated substrates. Experimental results show that the geometrical constraint imposed by the adhesiveness contrast limits the adhesion. Beyond this limitation, a reproducible organization of the actin cytoskeleton of cells spreading on micro-structured materials suggests that simple physical laws govern the process. We have developed a classification method of basic geometrical shapes observed experimentally to obtain robust statistics. Based on the Cellular Potts model, we reproduced experimental results. This energetical model shows that the basic shapes are metastable states used by cells during spreading. The model parameters are linked to relevant biological parameters. We present results that connect the curvature of interfaces to biological parameters. We show that the experimental measurement of this curvature represents the competition between the contractility of stress fibers and the elasticity of the actin gel. A correspondence between the physical properties in the model and the biochemical processes that regulate and organize the cellular adhesion is possible.

Key words : cellular adhesion, actin cytoskeleton, micro-fabricated substrate, Cellular Potts model, metastable states, auto-organization.