



**HAL**  
open science

## Migration collective de cellules épithéliales

Erwan Grasland-Mongrain

► **To cite this version:**

Erwan Grasland-Mongrain. Migration collective de cellules épithéliales. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2009. Français. NNT : 2009PA066264 . tel-00813312

**HAL Id: tel-00813312**

**<https://theses.hal.science/tel-00813312>**

Submitted on 15 Apr 2013

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité  
Biophysique

Présentée par  
M. GRASLAND-MONGRAIN Erwan

Pour obtenir le grade de  
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

## MIGRATION COLLECTIVE DE CELLULES EPITHELIALES

Thèse soutenue le 22/09/2009

devant le jury composé de :

Mme ALBIGES-RIZO Corinne, Rapporteur  
M. ASNACIOS Atef, Rapporteur  
Mme BEN AMAR Martine, Examinatrice  
M. BERTRAND Emanuel, Examinateur  
M. SILBERZAN Pascal, Directeur de thèse



*À Yiming, pour sa patience, ses encouragements  
et son soutien inconditionnel.*



# Table des matières

Table des matières .....	5
Introduction.....	9
Propriétés des cellules épithéliales et motilité collective.....	11
1. Cellules épithéliales et épithélium.....	13
1.1. Propriétés physiques des cellules individuelles.....	13
1.1.1 Filaments intermédiaires.....	14
1.1.2 Microtubules .....	15
1.1.3 Filaments d'actine.....	19
1.2 L'adhésion cellulaire.....	20
1.2.1 Adhésions cellule-substrat.....	20
1.2.2 Adhésions cellule-cellule .....	22
1.3 Structure d'un épithélium.....	25
2. La migration cellulaire .....	27
2.1 Migration par extension d'un pseudopode.....	27
2.2 Orientation de la migration .....	30
3. Motilité d'ensemble .....	31
3.1 La transition épithéliale-mésenchymateuse .....	32
3.2 Expériences de réépithélialisation in vivo.....	34
3.2.1 Mouvements collectifs lors de la cicatrisation .....	34
3.2.1.1 Réépithélialisation par migration du front cellulaire .....	34
3.2.1.2 Réépithélialisation par rétractation d'un « cordon de bourse ».....	35
3.2.2 Motilité collective lors de la morphogénèse embryonnaire .....	37
3.2.2.1 Fermeture dorsale de l'embryon de la drosophile .....	37
3.2.2.2 Fermeture ventrale de l'embryon de C. elegans .....	39
3.3 Expériences de réépithélialisation modélisées in vitro .....	42
3.3.1 Blessures par scratch .....	43
3.3.2 Cicatrisation d'un épithélium cornéen dans une blessure modèle .....	45
3.4 Modélisation .....	46
4. Conclusion .....	51
Matériels et méthodes .....	53
1. Principe des expériences en milieu modèle.....	55
1.1 Objectifs et enjeu des blessures modèles.....	55

1.2	Principe de réalisation .....	56
1.3	Aspects expérimentaux .....	57
2.	Mise en œuvre expérimentale .....	59
2.1	Fabrication des pochoirs .....	59
2.1.1	Préparation du masque .....	60
2.1.2	Transfert sur disque de silicium .....	60
2.1.3	Moulage du PDMS.....	61
2.2	Culture des cellules sur les pochoirs .....	64
2.2.1	Entretien des cellules.....	64
2.2.2	Préparation d'un épithélium dans un pochoir.....	64
2.3	Observation de l'évolution de l'épithélium .....	66
2.3.1	Dispositif d'acquisition .....	66
2.4	Analyse des images .....	66
3.	Croissance de cellules sur microplots.....	69
3.1	Principe .....	70
3.2	Dispositif expérimental .....	71
	Résultats et discussions .....	73
1.	Comportement global de la monocouche .....	75
1.1	Description qualitative de la déformation de la bande .....	75
1.2	Vitesse moyenne de progression de la monocouche .....	77
1.2.1	Propagation .....	78
1.2.2	Régime linéaire.....	79
1.2.3	Fermeture .....	80
1.3	Influence des paramètres initiaux sur la vitesse.....	81
1.3.1	Taille des bandes.....	81
1.3.2	Espacement des bandes .....	83
1.3.3	Densité initiale .....	86
1.3.4	Géométrie de la bande .....	87
1.4	Comportement des digitations.....	91
2.	Phénomènes internes à la monocouche.....	95
2.1	Morphologie et comportement des cellules leader .....	95
2.2	Flux internes dans l'épithélium .....	99
2.3	Taille des cellules et densité de la monocouche.....	101
2.3.1	Densité moyenne de l'épithélium au cours du temps .....	101
2.3.2	Densités locales .....	102
2.3.2.1	Densité intérieure.....	103
2.3.2.1	Densité au bord de l'épithélium .....	104
2.3.2.2	Densité dans les digitations .....	105
2.4	Orientation des cellules .....	108
2.4.1	Orientation moyenne .....	108
2.4.2	Orientation hors des digitations .....	109
2.4.3	Orientation dans les digitations.....	109
2.4.4	Orientation des cellules par rapport à celle de la digitation.....	110
2.5	Prolifération cellulaire.....	112
2.5.1	Prolifération au cours du temps.....	112
2.5.2	Influence de la prolifération dans le mécanisme de cicatrisation .....	114

2.5.3	Orientation des divisions.....	115
2.6	Mesure des forces à l'aide de microplots .....	118
3.	Description schématique de la migration collective lors de la cicatrisation ..	120
3.1	Présentation et hypothèses.....	120
3.2	Evolution d'un épithélium sous forme de bande.....	121
3.2.1	Propagation .....	122
3.2.2	Régime linéaire.....	124
3.2.3	Fermeture .....	125
3.3	Limites.....	126
	Conclusion.....	127
	Remerciements .....	129
	Bibliographie.....	131
	Annexe .....	137





# Introduction

Lorsqu'une blessure détruit ou endommage un organisme, celui-ci réagit naturellement afin de se protéger d'éventuelles infections puis de réparer les tissus abîmés et enfin de restaurer la fonctionnalité de l'organe touché. Cette réparation se déroule en plusieurs étapes, variables en fonction de la nature de la blessure et de l'endroit où elle est survenue ; l'une des étapes-clé du processus de cicatrisation est la réépithélialisation de la blessure, autrement dit la restauration d'un tissu continu à la surface de la blessure. Il est donc essentiel de comprendre et ainsi pouvoir agir sur la réépithélialisation d'un point de vue clinique, afin de réduire mortalité et morbidité chez la victime.

Ce processus de réépithélialisation est particulièrement remarquable de par le fait qu'il est le résultat d'un comportement collectif de l'ensemble des composants élémentaires du tissu, les cellules épithéliales. En l'absence de toute « unité centrale » coordonnant les cellules, celles-ci s'organisent pourtant de façon remarquablement fiable pour combler la blessure à un niveau macroscopique.

Le mécanisme par lequel les cellules sont capables de détecter l'existence d'une blessure dans le tissu puis de s'organiser pour la réparer n'a pas été clairement établi. Si la cicatrisation d'une monocouche de cellules épithéliales *in vitro* a pu être étudiée en laboratoire en créant artificiellement des blessures dans un épithélium, à l'aide d'un scalpel ou par photoablation par exemple, ce mode opératoire ne permet qu'une approche descriptive du phénomène. Ainsi, il ne permet pas de déterminer si ce dernier est déclenché par la détection d'une « zone vierge » par les cellules situées au bord de la blessure, ou par la production de facteurs solubles dans le milieu par des cellules détruites ou abîmées dans le processus. On pense notamment aux facteurs de croissance, favorisant la migration.

Pour répondre à cette question et analyser la réponse des cellules épithéliales à une modification de leur environnement mécanique sans les abîmer, nous avons mis en place un dispositif à base de pochoirs microfabriqués, dans lesquels les cellules sont cultivées dans une géométrie prédéfinie. Ces pochoirs sont ensuite retirés, et la monocouche peut alors commencer à cicatriser les blessures modèles que constituent les zones initialement masquées. Ainsi, nous disposons d'un système propre, sans cellules endommagées, qui nous a permis d'étudier uniquement l'influence de l'effet de « bord libre ».

Dans la première partie de ce manuscrit, nous introduisons la problématique de la réépithélialisation du point de vue biologique, par la description des propriétés physiques des cellules épithéliales et des mécanismes régissant leur migration et leur adhésion. La seconde partie sera consacrée aux méthodes expérimentales

prises en œuvre dans le cadre de ces travaux. Enfin, dans une troisième partie, nous détaillerons les principaux résultats établis durant cette thèse concernant la compréhension du comportement collectif des cellules épithéliales, et en particulier sur les aspects physiques de la réépithélialisation.

# Partie I

## Propriétés des cellules épithéliales et motilité collective



Dans un organisme pluricellulaire, les cellules peuvent se comporter schématiquement de deux manières différentes : soit de manière indépendante les unes des autres, migrant individuellement et n'étant que peu influencées par le comportement de leurs voisines, soit, lorsqu'elles forment des tissus cohésifs, de manière fortement dépendante du comportement *collectif* de l'ensemble des cellules. Toutefois, ces deux catégories ne sont pas nécessairement différentes de par la nature intrinsèque des cellules qui les composent : une cellule d'un type donné peut avoir un comportement individuel sous certaines conditions, et prendre part à un comportement collectif une fois intégrée dans un tissu.

Alors que le comportement individuel des cellules a fait l'objet d'études poussées, permettant la compréhension de phénomènes tels que la migration ou l'adhésion cellulaire, la manière dont les propriétés individuelles des cellules se modifient ou s'adaptent dans le cas d'un comportement collectif dans un tissu reste bien moins connue.

Dans cette première partie, nous commencerons par décrire les propriétés des cellules épithéliales qui ont été étudiées par la suite dans nos expériences. Nous présenterons ensuite la mécanique de migration et d'adhésion de ces cellules, telle qu'elle est connue d'après les observations sur des cellules individuelles. Enfin, nous terminerons par une présentation des résultats connus à ce jour en matière de motilité collective.

## 1. Cellules épithéliales et épithélium

Chez la plupart des êtres vivants, l'interface entre l'organisme et l'extérieur (appareil respiratoire, appareil digestif, peau) ou entre organes au sein d'un même organisme est constituée de cellules spécifiques, les cellules épithéliales. Ces cellules forment généralement une monocouche dense à la surface de l'organe, l'*épithélium*, ayant pour fonction de protéger l'organisme de corps étrangers, de bloquer sélectivement des flux d'eau ou de nutriments, ou encore de maintenir l'intégrité d'un organe donné. À la différence des tissus conjonctifs, où des cellules sont disséminées au sein d'un réseau de polymères (la *matrice extracellulaire*) servant de support, la structure mécanique des cellules dans un épithélium est directement assurée par la cohésion entre cellules, par l'intermédiaire de jonctions adhésives entre les cellules, la matrice extracellulaire jouant alors un rôle mécanique plus limité. Afin de comprendre la structure d'un épithélium, nous commencerons par décrire les propriétés physiques d'une cellule épithéliale, puis nous nous intéresserons aux différents mécanismes d'adhésion cellulaires.

### 1.1. Propriétés physiques des cellules individuelles

Comme la plupart des cellules eucaryotes, les cellules épithéliales interagissent avec leur environnement par l'intermédiaire d'un ensemble de filaments, le *cytosquelette*, qui assure la plupart de leurs propriétés mécaniques. À la différence d'un véritable squelette de vertébré, le cytosquelette n'est pas une structure fixe,

mais dynamique : il est en constant remodelage, les filaments se dépolymérisant, se repolymérisant et se réorganisant constamment.

Ces filaments appartiennent à trois catégories : les *filaments intermédiaires*, qui structurent la cellule dans son ensemble, les *microtubules*, qui servent de support aux composants internes de la cellule et permettent les échanges à l'intérieur de la cellule, et enfin les *filaments d'actine*, qui ont pour fonction principale de permettre à la cellule de se mouvoir dans son ensemble. Nous allons maintenant brièvement décrire ces trois types de filaments, et leur rôle quant aux propriétés mécaniques des cellules.

### 1.1.1 Filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont des constituants particulièrement solides du cytosquelette, et sont ainsi particulièrement présents dans les cellules pouvant être soumises à des contraintes mécaniques fortes, dont les cellules épithéliales. Dans ces cellules, il s'agit essentiellement de filaments d'environ 10 nm de diamètre de *kératine*, une famille regroupant une vingtaine de polymères différents chez l'être humain.

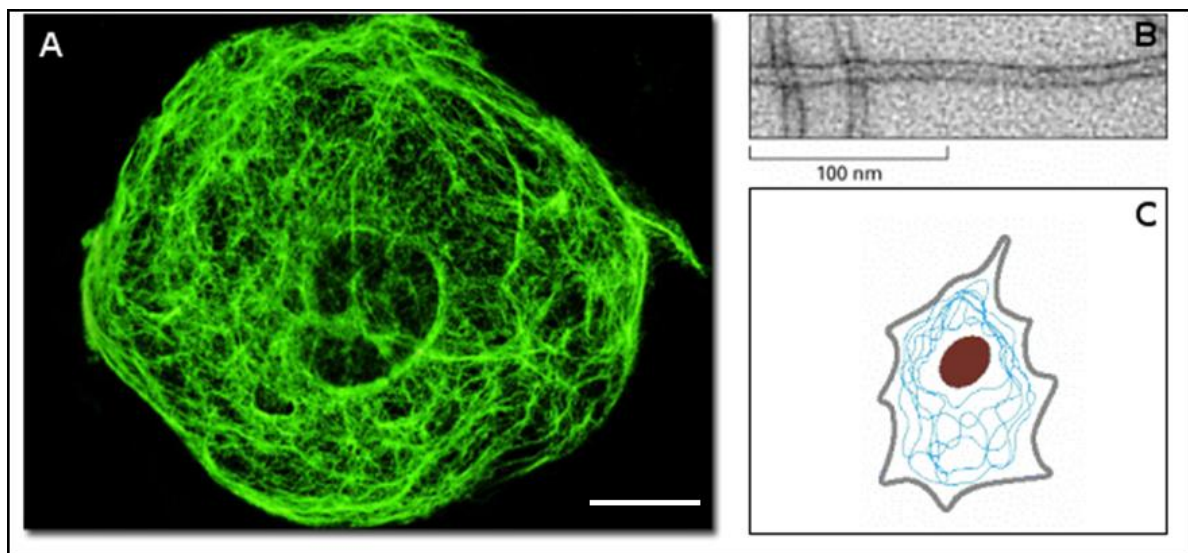


Figure 1: A) Filaments intermédiaires dans une cellule épithéliale de rein de rat kangourou (PtK2), marqués par immunofluorescence. (échelle : 5 $\mu$ m) B) Vue de filaments intermédiaires par microscopie électronique à transmission. C) Arrangement des filaments intermédiaires (en bleu) autour du noyau (en rouge) dans une cellule. [A : Nikon MicroscopyU, <http://www.microscopyu.com> ; B et C : Molecular Cell Biology 4<sup>th</sup> Edition]

Un filament de kératine est constitué par un assemblage complexe de longs monomères portant deux « têtes » différentes, l'une acide (type I), l'autre neutre ou basique (type II). Ces monomères s'assemblent sous forme de dimères, puis de tétramères. Enfin, ces tétramères forment des protofilaments, lesquels s'enroulent les uns sur les autres de manière hélicoïdale sous forme de faisceau, comme des fils formant une corde. L'ensemble forme alors un filament particulièrement robuste, au

point de pouvoir même résister au décès de la cellule dont il fait partie et former une couche dure : c'est ainsi que se forment les ongles, la corne ou les écailles.

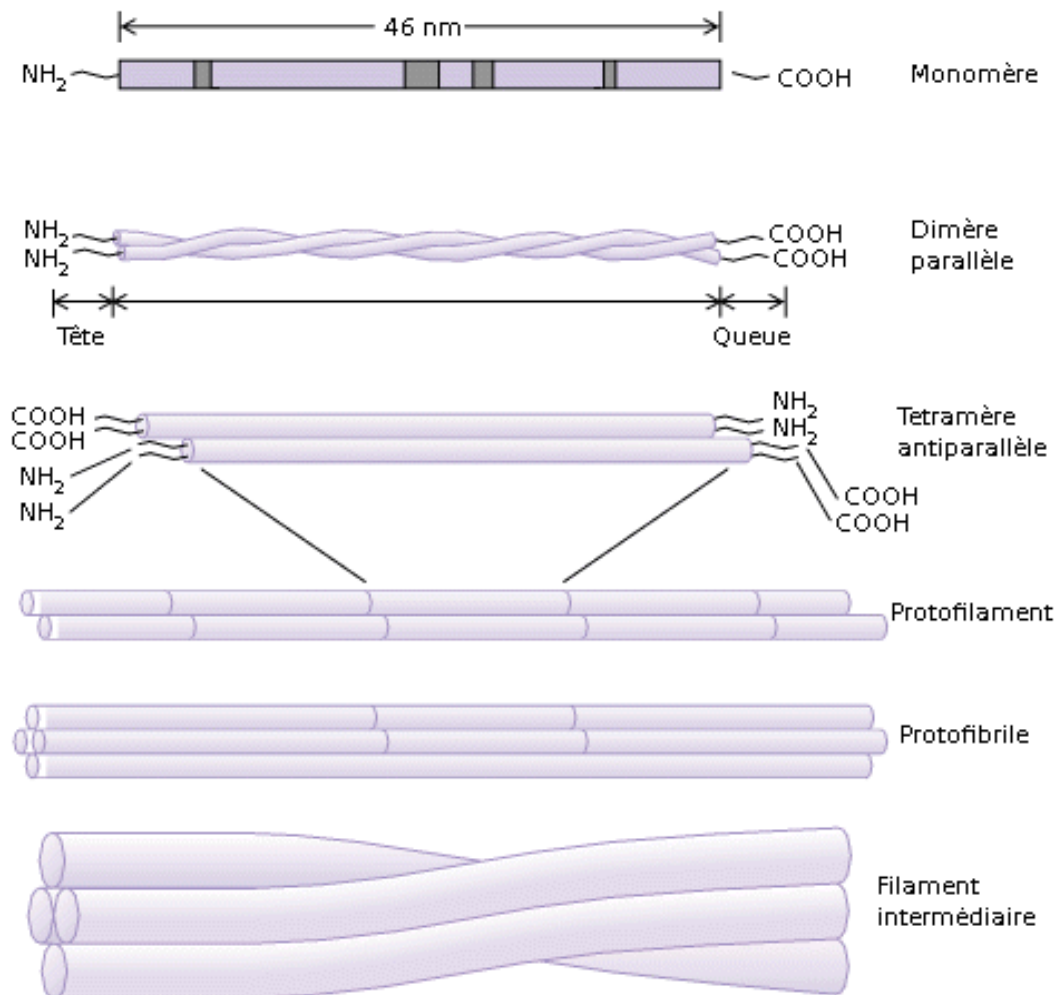


Figure 2: Structure d'un filament intermédiaire. [Molecular Cell Biology 4<sup>th</sup> edition]

### 1.1.2 Microtubules

Les microtubules, comme leur nom le suggère, sont des filaments cylindriques et creux, relativement rigides (leur longueur de persistance est de l'ordre du millimètre), ayant un diamètre d'environ 25 nm. Ils s'agencent à l'intérieur de la cellule autour d'un point précis, le *centrosome*, situé proche du noyau de la cellule. Les microtubules forment ainsi une structure étoilée autour du centrosome.

La principale fonction des microtubules est de servir de « rail » pour deux types de protéines, les *kinésines* et les *dynéines*. Ces « moteurs moléculaires » peuvent en effet se mouvoir le long des microtubules à l'aide d'une ou deux « têtes » s'accrochant et se décrochant alternativement au microtubule, afin de transporter des organelles (telles que des mitochondries ou des vésicules) d'un endroit à l'autre de la cellule.



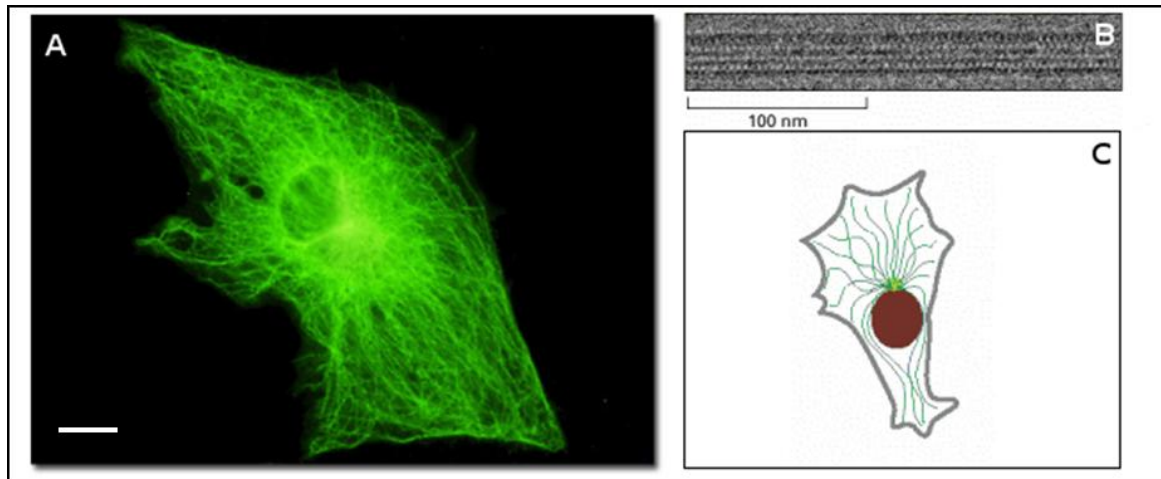


Figure 3 : A) Microtubules autour du centrosome dans une cellule épithéliale de rein de rat kangourou (PtK2), marqués par immunofluorescence. (échelle : 5 $\mu$ m) B) Aperçu d'un microtubule par microscopie électronique à transmission. C) Arrangement des microtubules (en vert foncé) autour du centrosome (vert clair, proche du noyau rouge) dans une cellule. [A : Nikon MicroscopyU, <http://www.microscopyu.com> ; B et C : Molecular Cell Biology 4<sup>th</sup> Edition]

A la différence des filaments intermédiaires, les microtubules ne sont pas eux-mêmes constitués de filaments plus petits, mais directement par l'enroulement de façon hélicoïdale de « briques » élémentaires de *tubuline*. La tubuline elle-même est un dimère, formé par l'association non covalente de deux monomères, l'alpha-tubuline et la beta-tubuline.

Comme indiqué précédemment, un microtubule n'est pas une structure fixe, il est en équilibre dynamique permanent entre polymérisation et dépolymérisation à ses extrémités, par l'intermédiaire de deux processus, le *treadmilling* (« tapis roulant ») et l'*instabilité dynamique*.

Ces deux phénomènes trouvent leur origine dans le fait que les deux extrémités d'un microtubule ne sont pas identiques : l'une (l'extrémité « moins », proche du centrosome) expose en effet les monomères d'alpha-tubuline, tandis que l'autre (l'extrémité « plus », vers la périphérie de la cellule) expose les monomères de bêta-tubuline. A chacune de ces extrémités, deux phénomènes sont en concurrence, l'hydrolyse d'une brique de tubuline à cette extrémité, et la polymérisation d'une nouvelle brique de tubuline, dont les vitesses dépendent de la concentration en tubuline « libre » dans le milieu. Or, la polymérisation est plus rapide à l'extrémité « plus » qu'à l'extrémité « moins » : pour une certaine concentration intermédiaire en tubuline, l'hydrolyse peut donc être plus rapide que la polymérisation à l'extrémité « moins », et plus lente à l'extrémité « plus », autrement dit, le microtubule s'allonge à une extrémité tout en se raccourcissant à l'autre. Extérieurement, le microtubule semble se déplacer tout en gardant une longueur constante : c'est ce phénomène que l'on appelle *treadmilling*.

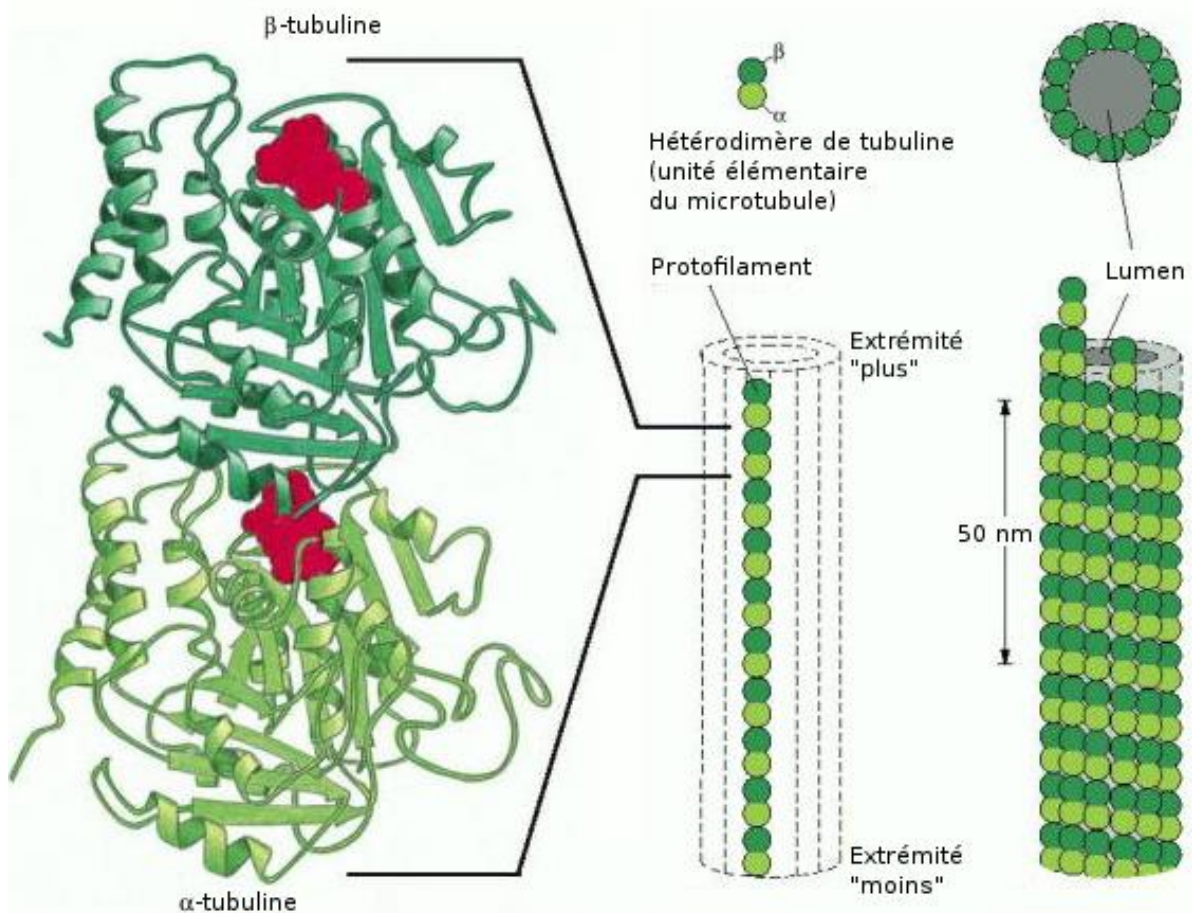


Figure 4 : Structure d'un microtubule. [Molecular Cell Biology 4<sup>th</sup> Edition]

L'*instabilité dynamique*, quant à elle, se produit lorsque l'extrémité « plus » perd tout à coup son caractère de polymérisation rapide (cet événement est appelé *catastrophe*, étymologiquement « retournement ») : dans les bonnes conditions de concentration en tubuline, cette extrémité raccourcit alors, jusqu'à ce que l'extrémité regagne le caractère perdu (*sauvetage*). Dans un microtubule, l'instabilité dynamique est prépondérante sur le *treadmilling*.

L'intérêt de ce mécanisme coûteux en énergie est de permettre une réorganisation permanente des microtubules, afin de pouvoir répondre rapidement à toute modification des conditions internes ou externes.

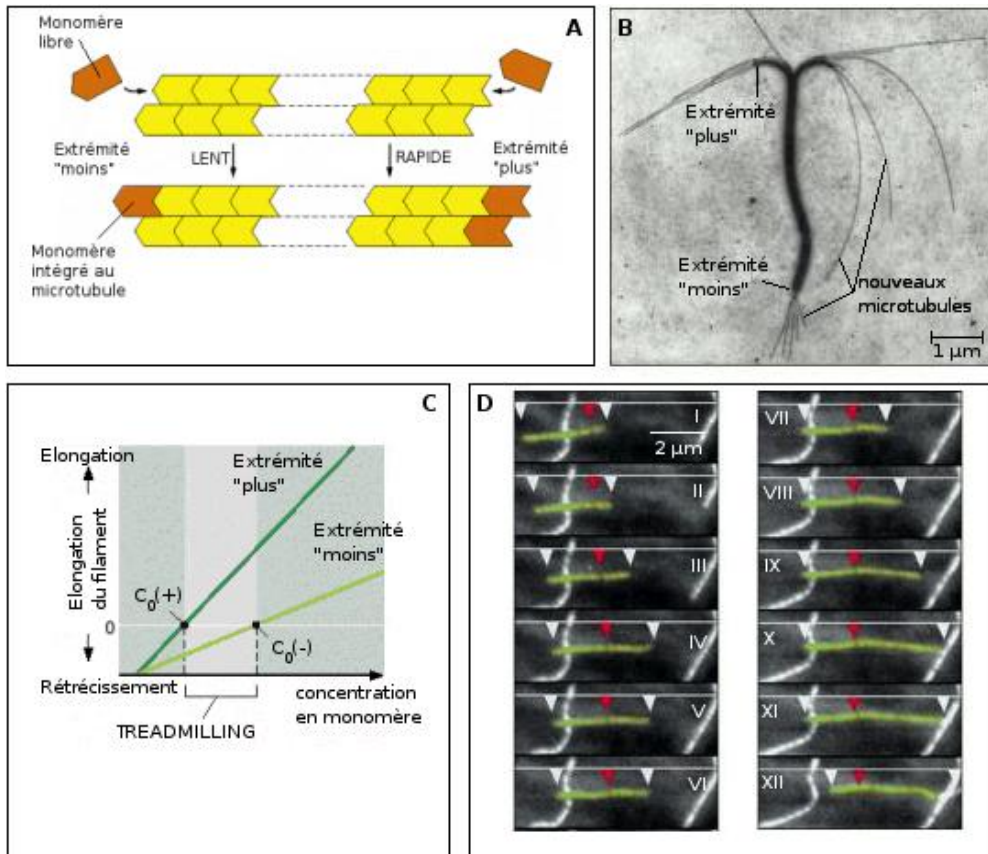


Figure 5: Le treadmilling se produit à cause de la différence de vitesse de polymérisation des monomères libres entre les extrémités « plus » (polymérisation rapide) et « moins » (polymérisation lente) des microtubules (A, B). Dans un certain intervalle de concentration en monomère, l'extrémité « plus » polymérise plus vite qu'elle ne s'hydrolyse, et inversement pour l'extrémité « moins » (C). Tout se passe comme si le microtubule se déplaçait (D I-XII), cependant, si l'on marque un monomère (flèche rouge), on constate que celui-ci reste bien immobile. [Molecular Cell Biology 4<sup>th</sup> Edition]

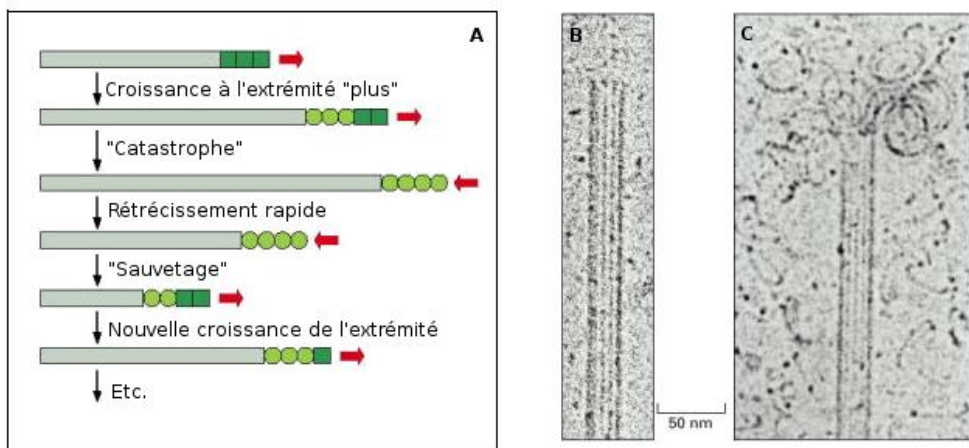


Figure 6: A) Fonctionnement schématique de l'instabilité dynamique. B) Vue d'un microtubule en croissance par microscopie électronique à transmission C) Microtubule se dépolymérise rapidement suite à une catastrophe. [Molecular Cell Biology 4<sup>th</sup> Edition]

### 1.1.3 Filaments d'actine

Les filaments d'actine constituent le troisième type de filament composant le cytosquelette, et occupent un rôle essentiel dans la migration cellulaire (voir chapitre suivant). Il s'agit d'un polymère de 5 à 10 nm de diamètre, flexible (longueur de persistance de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$ ), que l'on retrouve généralement à la périphérie de la cellule. Tout comme les microtubules, ils présentent une extrémité pointue (extrémité « moins ») et une extrémité barbée (extrémité « plus »), et sont composés par un assemblage de « briques » élémentaires d'actine.

L'actine est un monomère polaire, qui s'assemble tête-à-queue pour former un « protofilament » ; deux de ces protofilaments peuvent ensuite s'enrouler de manière hélicoïdale pour former un filament d'actine proprement dit. A leur tour, les filaments d'actine peuvent s'assembler pour former une *fibre de stress*.

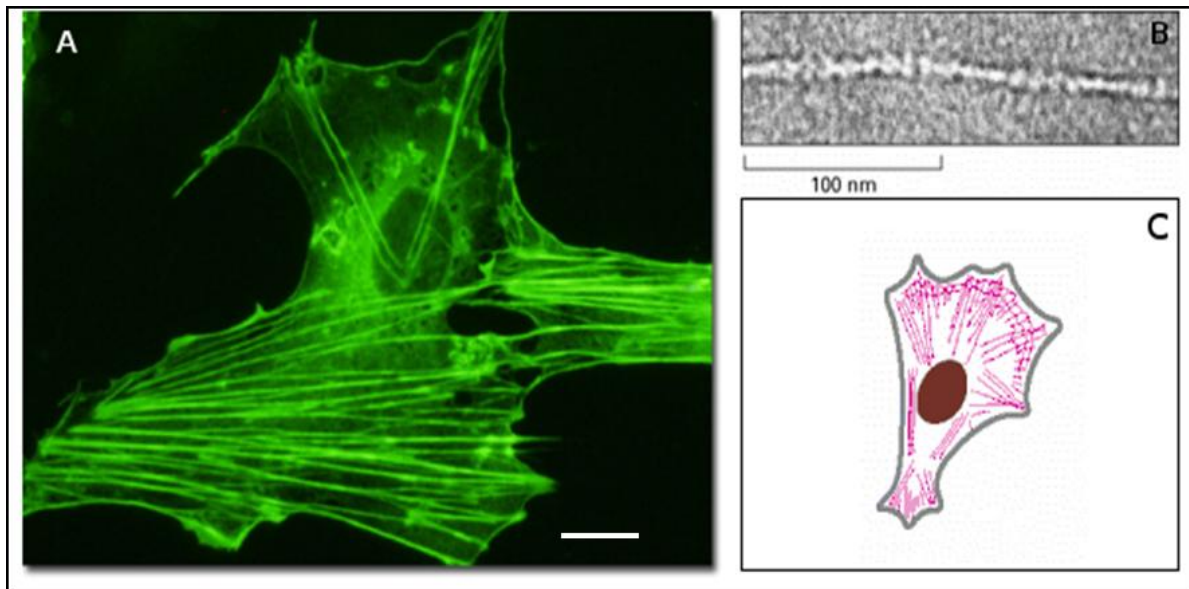


Figure 7: A) Filaments d'actine autour du centrosome dans une cellule épithéliale de rein de rat kangourou (PtK2), marqués par immunofluorescence. (échelle : 5 $\mu\text{m}$ ) B) Filament d'actine au microscope électronique à transmission. C) Arrangement des filaments d'actine (en rose) dans une cellule. [A : Nikon MicroscopyU, <http://www.microscopyu.com> ; B et C : Molecular Cell Biology 4<sup>th</sup> Edition]

De la même manière que les microtubules, les filaments d'actine sont sujets au *treadmilling* et à l'*instabilité dynamique*, cependant, dans les filaments d'actine, c'est le *treadmilling* qui est prépondérant. Ils servent par ailleurs de support à une catégorie de moteurs moléculaires proches des kinésines, les *myosines*. Ces molécules, qui peuvent également s'organiser sous forme de filaments, forment avec l'actine ce que l'on appelle l'*actomyosine*, responsable notamment de la réorganisation de l'ensemble du squelette d'actine lors de la migration cellulaire.

## 1.2 L'adhésion cellulaire

Après avoir décrit les constituants mécaniques de la cellule, nous allons nous intéresser à l'interaction entre la cellule et le milieu extérieur, et plus précisément à l'adhésion cellulaire.

Les types d'adhésions cellulaires sont nombreux ; on peut les classer en deux grandes catégories, les interactions adhésives entre la cellule et son substrat, dont les mécanismes sont nécessaires à la compréhension de la migration cellulaire, et les interactions adhésives entre cellules, qui assurent la cohésion d'un épithélium et jouent un rôle essentiel dans la spécificité de la motilité collective.

### 1.2.1 Adhésions cellule-substrat

Dans un organisme, et en particulier dans un organe recouvert par une couche de cellules épithéliales, les cellules sont entourées d'un mélange de macromolécules, la *matrice extracellulaire*. Celle-ci est constituée en particulier de protéines fibreuses (citons notamment le *collagène*, la *fibronectine* ou encore la *laminine*) qui permettent à la cellule d'adhérer et de se déplacer dans son environnement. *In vitro*, ces protéines peuvent être synthétisées par les cellules elles-mêmes ou ajoutées manuellement, afin de tapisser la surface et permettre à la cellule de migrer sur des matières non biologiques telles que le verre ou le plastique.

Il existe deux principaux types d'adhésions entre la cellule et le substrat : les *hémidesmosomes* et les *adhésions focales*.

Les hémidesmosomes (nommé ainsi en raison de leur ressemblance avec les desmosomes, cf. paragraphe 1.2.2) constituent les points d'ancrage des filaments intermédiaires avec la matrice extracellulaire. Ils sont composés d'une plaque de protéines (les *plakoglobines* et les *desmoplakines*) située à l'intérieur de la cellule, qui est elle-même accrochée à des protéines transmembranaires, les *intégrines*.

Les adhésions focales constituent, elles, le point d'ancrage des filaments d'actine avec l'extérieur ; elles occupent un rôle essentiel dans la migration cellulaire (voir partie suivante). De structure similaire aux hémidesmosomes, elles sont constituées d'un groupe de protéines (*vinculine*, *alpha-actinine*, *taline*, *filamine*...) accrochées au filament d'actine à l'intérieur de la cellule, et connectées à des intégrines transmembranaires.

Dans les deux cas, ce sont ces intégrines qui assurent l'adhésion à l'extérieur de la cellule. Les intégrines sont des hétérodimères composés par l'assemblage de deux protéines élémentaires, alpha et bêta. Ces protéines élémentaires peuvent exister sous différentes formes (18 pour la protéine alpha, 8 pour la protéine bêta), ce qui permet à la cellule de sélectionner le type de protéine de la matrice extracellulaire à laquelle elle pourra adhérer (fibronectine, laminine, etc.).

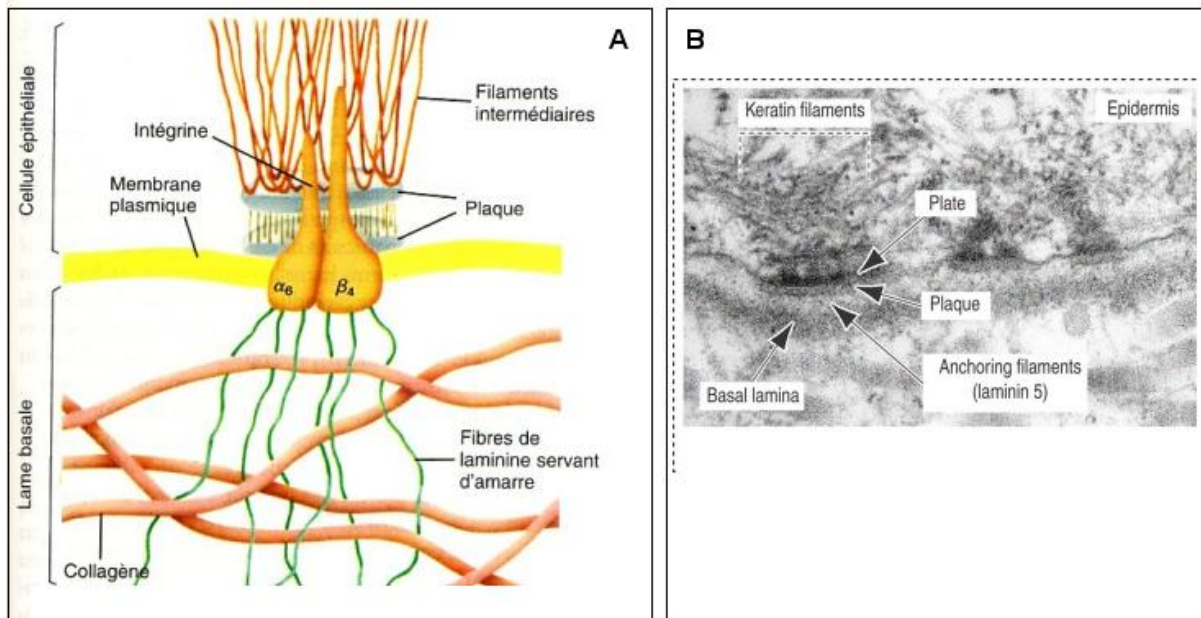


Figure 8: A) Structure d'un hémidesmosome. B) Aperçu par microscopie électronique à transmission d'un épithélium de peau de souris. HD : Hémidesmosome, LD : lame basale. [A : Biologie moléculaire de la cellule 3e édition ; B : <http://classes.kumc.edu>]

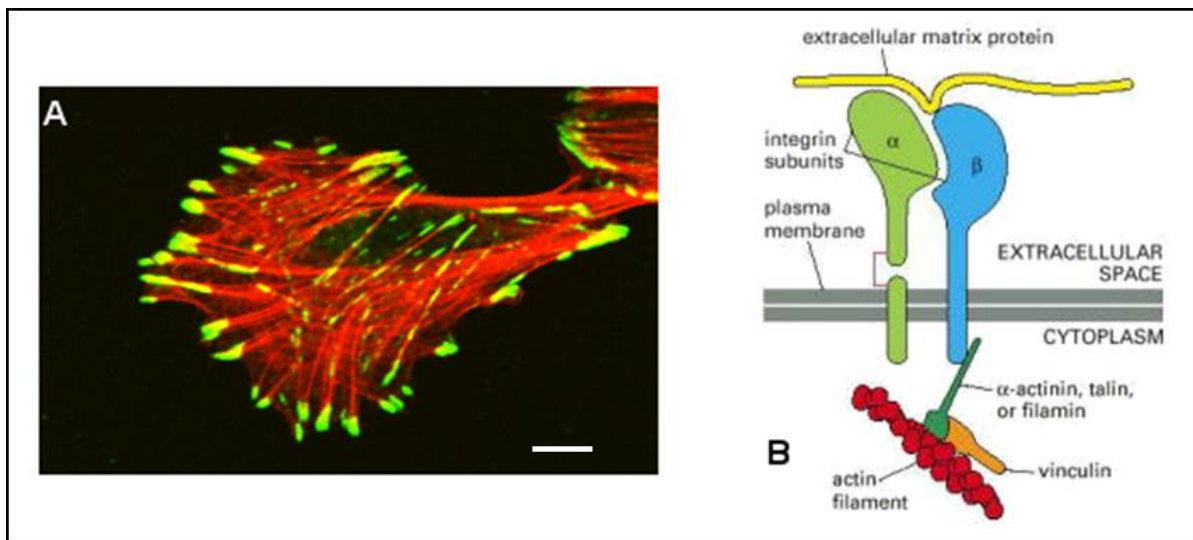


Figure 9: A) Adhésions focales (en vert) et filaments d'actine (en rouge) dans une cellule musculaire de rat (échelle : 20µm) B) Structure d'une adhésion focale [A : Dr. Kathy Griendling, Emory University School of Medicine ; B : Molecular Cell Biology 4<sup>th</sup> Edition]

L'adhésion proprement dite de l'intégrine sur le substrat fait notamment intervenir des cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ ) à l'extrémité de l'intégrine : leur concentration induit de nombreux processus biologiques permettant la formation (ou la rupture) de liaisons entre l'intégrine et des ligands, présents dans les protéines de la matrice extracellulaire. À l'échelle de la cellule, les intégrines adhèrent à la surface en petits groupes, et forment ainsi des *complexes focaux*.

D'un point de vue biochimique, le processus d'adhésion est contrôlé par une famille importante de protéines, les *Rho-GTPases*, qui regroupe en particulier *Rho*, *Rac* et *Cdc42*, dont nous discuterons plus globalement le rôle dans la partie I.2.

### 1.2.2 Adhésions cellule-cellule

Dans un épithélium, où les cellules doivent former une couche continue et imperméable, les adhésions cellule-cellule occupent un rôle essentiel. Ces adhésions, dont la nature et la fonction sont particulièrement variées, peuvent être classées en trois catégories : les *jonctions d'ancrage*, les *jonctions serrées* et les *jonctions communicantes*.

Les jonctions d'ancrage ont pour fonction d'assurer la liaison mécanique entre les cellules, autrement dit, de rapprocher et maintenir les cellules entre elles. Ces jonctions sont de deux types : les *desmosomes*, qui créent des points d'ancrage entre les cellules grâce aux filaments intermédiaires, et les *jonctions adhérentes*, qui renforcent la liaison cellule-cellule via les filaments d'actine.

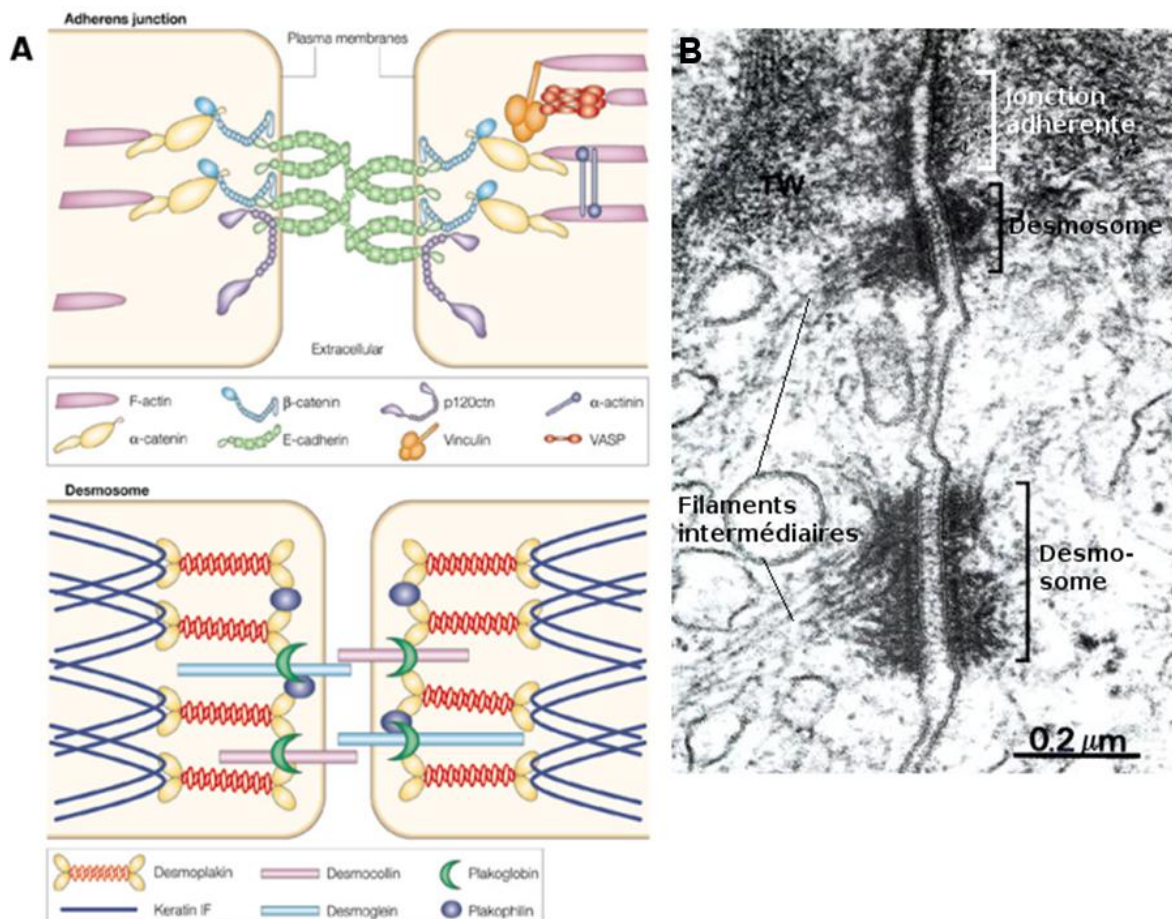


Figure 10 : A) Structure schématique d'une jonction adhérente et d'un desmosome. B) Vue au microscope électronique à transmission de l'espacement inter-cellulaire. [A : Getting under the skin of epidermal morphogenesis, Elaine Fuchs & Srikala Raghavan, Nature Reviews Genetics 3, 199-209 (March 2002) ; B : <http://classes.kumc.edu>]

Structurellement, elles sont très similaires aux jonctions cellule-substrat présentées dans le paragraphe précédent, respectivement les hémidesmosomes et les adhésions focales. Cependant, elles présentent une différence essentielle : au lieu de se faire entre une protéine de la cellule et autre protéine de la matrice extracellulaire, l'adhésion se fait entre deux protéines identiques de part et d'autre. Ainsi, à la surface des desmosomes et des jonctions adhérentes, c'est une famille de protéines spécifiques, les cadhérines, qui assurent la jonction au lieu des intégrines de l'adhésion cellule-substrat.

Les cadhérines forment une large famille de protéines intervenant dans l'adhésion cellulaire ; nous nous intéresserons particulièrement à l'E-cadhérine, qui constitue les liaisons adhérentes des cellules épithéliales. A l'échelle moléculaire, une cadhérine est un dimère formé par l'association de deux protéines élémentaires identiques, connectées entre elles par un mécanisme faisant intervenir là encore des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . C'est le même mécanisme qui assure ensuite la liaison avec les cadhérines de la cellule voisine. Ainsi, à plus grande échelle, les jonctions adhérentes et les desmosomes s'assemblent en complexes focaux, au sein desquels les cadhérines s'arrangent en alternance, telle une fermeture éclair.

Les jonctions serrées assurent quant à elles l'étanchéité sélective de l'épithélium, que celui-ci assure l'interface entre l'organisme et l'extérieur, ou entre un organe et son environnement au sein de l'organisme : ainsi, les cellules épithéliales de la paroi intestinale doivent bloquer l'essentiel de la circulation à travers les cellules, tout en laissant le passage aux nutriments. Ces jonctions n'existent que chez les vertébrés ; chez les invertébrés, ce sont les *jonctions septées*, de structure proche (mais que nous n'aborderons pas ici), qui assurent cette fonction.

Ces jonctions se situent près de la face basale des cellules épithéliales, à l'interface entre ces cellules et le tissu qu'elles recouvrent, et fonctionnent grâce à l'action de protéines transmembranaires spécifiques, les *claudines* et les *occludines*, qui scellent les membranes des cellules voisines. Le mécanisme exact d'adhésion et de filtrage de ces protéines n'est toutefois pas encore parfaitement connu.

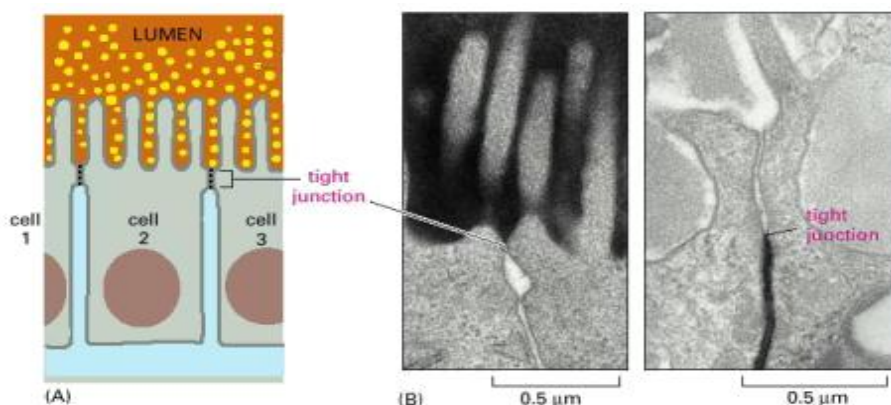


Figure 11 : Diagramme et vue au microscope électronique à transmission d'une jonction serrée. [Molecular Cell Biology 4<sup>th</sup> Edition]



Enfin, les jonctions communicantes permettent aux cellules épithéliales d'interagir entre elles, en assurant le passage de signaux électriques ou chimiques.

Une jonction communicante constitue littéralement un « tunnel » joignant les membranes des deux cellules séparées de quelques nanomètres, sous la forme d'un regroupement de tubes formés par l'assemblage de deux « demi-tubes » sur chaque cellule, les *connexones*. Ces connexones sont elles-mêmes composées de 6 protéines élémentaires assemblées latéralement et appartenant à la famille des *connexines*.

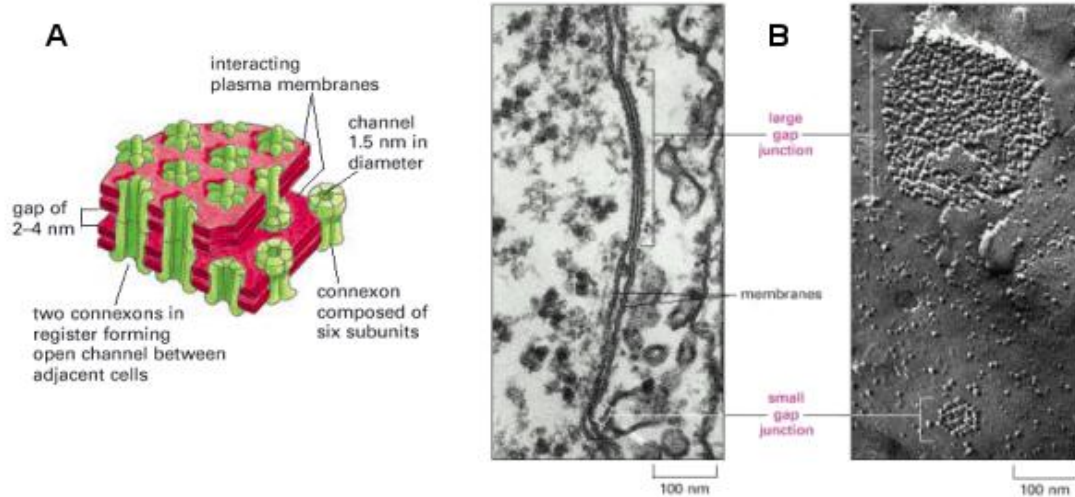


Figure 12 : A) Structure schématique d'une jonction communicante B) Vue par microscopie électronique à transmission d'une section et d'une face d'un espace intermembranaire entre deux fibroblastes montrant les jonctions communicantes. [Molecular Cell Biology 4<sup>th</sup> Edition]

Le diamètre de ces tubes est d'environ 1 nm, ce qui permet une certaine sélectivité dans les transferts de matière d'une cellule à l'autre : les plus petites molécules, telles que les ions (inorganiques), les vitamines ou les acides aminés, peuvent ainsi les traverser, mais pas les plus grosses macromolécules et protéines. Mais les jonctions communicantes peuvent également réguler leur perméabilité par des processus biochimiques : ainsi, le pH, la différence de potentiel électrique, la concentration en ions spécifiques ( $\text{Ca}^{2+}$  notamment) ou de certaines substances (par exemple la dopamine dans le cas des neurones) peuvent ouvrir ou fermer les connexones et ainsi limiter une contamination d'une cellule à l'autre ou créer une réponse sélective parmi les cellules.

L'ensemble des mécanismes d'adhésions d'une cellule épithéliale d'un vertébré est récapitulé sur la figure suivante :

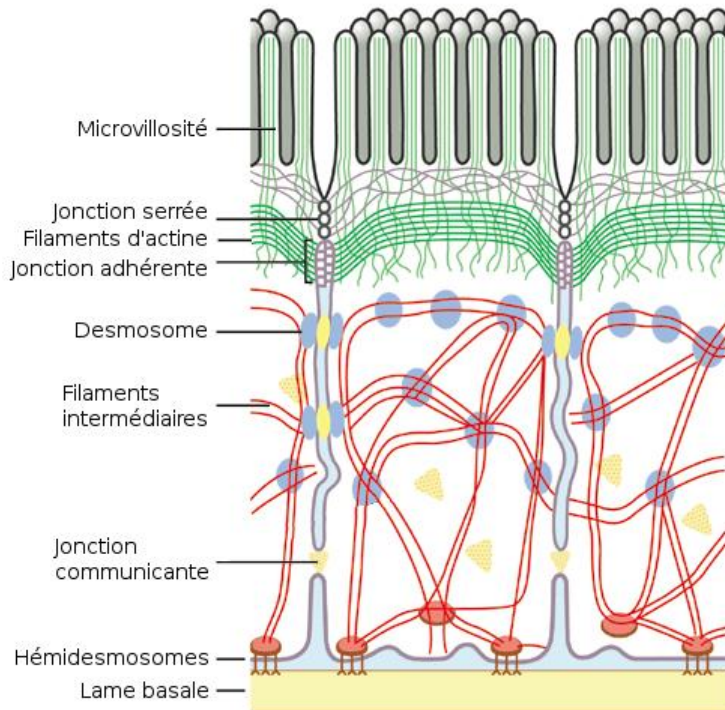


Figure 13 : Les jonctions entre une cellule épithéliale et son environnement. Les adhésions focales ne concernent que les cellules au bord de l'épithélium, elles n'apparaissent pas ici. [Inflammatory bowel disease: dysfunction of GALT and gut bacterial flora (II), P. Chandran, S. Sattaporn, A. Robins, O. Eremin, Royal College of Surgeons of Edinburgh]

### 1.3 Structure d'un épithélium

Lorsque des cellules épithéliales s'organisent en formant un épithélium, elles se lient les unes aux autres par l'intermédiaire des jonctions précédemment décrites, qui en assurent l'imperméabilité. Ces jonctions isolent donc les deux faces (de natures différentes) de l'épithélium entre elles, et il est alors possible de définir une orientation pour les cellules : d'un côté le *domaine apical* de la membrane plasmique, et de l'autre, le *domaine basolatéral* (ou simplement *basal*).

Le domaine apical concerne la partie de la cellule qui est en contact avec la « surface libre », celle dont l'épithélium a pour fonction de protéger ou de filtrer le contenu : milieu extérieur pour la peau, paroi interne de l'intestin, de l'estomac ou du poumon, etc. La paroi membranaire constitue à cet endroit la véritable interface avec l'extérieur, et porte donc une série de substances (les *glycosphingolipides*) pour s'en protéger.

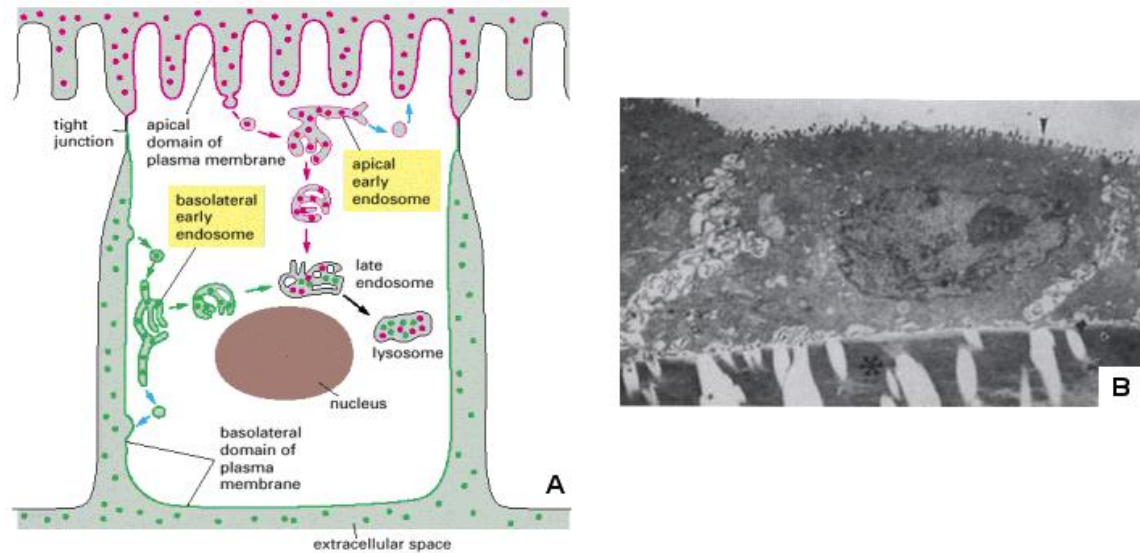


Figure 14 : A) Schéma d'une cellule épithéliale au sein d'un épithélium. B) Vue par microscopie électronique à transmission d'une cellule épithéliale biliaire de rat. [A : *Molecular Cell Biology 4<sup>th</sup> Edition* ; B : *Experimental models to study cholangiocyte biology* , Pamela S. Tietz et al., *World J Gastroenterol* **2002** 8(1) 1-4]

Lorsqu'un échange de matière est en jeu (dans l'intestin ou les poumons, notamment), cette face porte également des microvillosités ou encore des cils, afin de maximiser la surface exposée. Le transfert de matière s'effectue alors par l'intermédiaire d'*endosomes*, des petits compartiments mobiles à l'intérieur du cytoplasme. Si ceux-ci ne sont pas repérés comme contenant une substance pouvant traverser l'épithélium, ils sont simplement dégradés en *lysosomes* et éliminés.

Le domaine basolatéral concerne le reste de la membrane, qui est en contact avec les autres cellules de l'épithélium (partie latérale) ou le substrat (partie basale). Cette partie peut également former des endosomes pour délivrer une substance à la surface apicale (enzymes notamment).

On peut définir 4 familles de cellules épithéliales en fonction de leur morphologie :

- Les cellules *pavimenteuses* ou *squameuses*, étalées et aplaties, de formes irrégulières. Elles jouent souvent un rôle de filtre, et se retrouvent notamment dans la paroi pulmonaire ou dans les reins ; les cellules étudiées dans ce travail appartiennent à cette famille.
- Les cellules *cubiques*, de forme grossièrement cubique comme leur nom le suggère. Elles sont essentiellement présentes dans les glandes sudoripares.
- Les cellules *cylindriques*, plus hautes que larges, qui assurent l'absorption des nutriments dans l'intestin.
- Les cellules *transitionnelles*, qui peuvent changer de forme en fonction des besoins de l'organe, et « glisser » les unes sur les autres pour modifier le nombre de couches d'épaisseur de l'épithélium. On les retrouve notamment dans la vessie et dans l'urètre.

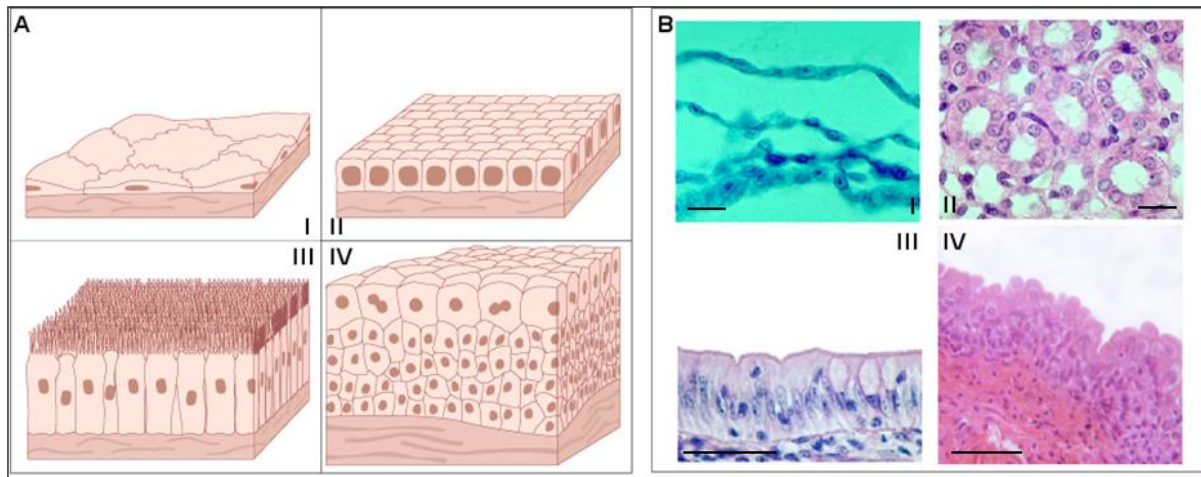


Figure 15 : Schémas et vues en coupe au microscope des principaux types de cellules épithéliales : squameuses (I), cubiques (II), cylindriques (III), transitionnelles (IV). (échelles : 50  $\mu$ m) [A I-IV : <http://www.cancerhelp.org.uk> ; B I-III : Developmental Biology Online <http://www.uoguelph.ca/zoology/devobio/dbindex.htm> ; B IV : Dorlands/Elsevier]

## 2. La migration cellulaire

Une cellule est rarement immobile dans son environnement : un organisme unicellulaire tel qu'une bactérie cherchera à se rapprocher de sources de nourriture, une cellule non spécifique d'un embryon migrera vers le site d'un futur organe, un globule blanc se déplacera vers une source d'infection, ou encore une cellule épithéliale se dirigera vers un site où se trouvent des cellules mortes à remplacer dans un épithélium endommagé.

Il existe plusieurs mécanismes radicalement différents permettant ainsi aux cellules de se mouvoir (cils, flagelles, protrusions...) ; une étude exhaustive irait bien au-delà des limites de ce travail, aussi nous contenterons-nous de décrire le mouvement d'une cellule épithéliale sur un substrat, par extension d'un *pseudopode*. Nous ne nous intéresserons *a priori* dans cette partie qu'au mouvement d'une cellule isolée, la motilité collective des cellules d'un épithélium étant étudiée dans la partie suivante.

### 2.1 Migration par extension d'un pseudopode

Le mouvement des cellules sur un substrat s'apparente au mouvement d'un alpiniste sur une paroi : celui-ci étend le bras pour trouver une prise, s'accroche à la prise, puis déplace l'ensemble de son corps en s'appuyant sur cette prise tout en lâchant les prises sur lesquelles il n'a plus d'appui. Le mouvement d'une cellule en migration peut ainsi être décomposé en trois étapes de manière similaire : premièrement, la déformation du cytosquelette et la formation d'une protrusion dans la direction de migration, deuxièmement la formation d'une adhésion entre l'extrémité de la protrusion et le substrat, et troisièmement le déplacement de l'ensemble de la cellule et le détachement des adhésions qu'elle formait avec le substrat.

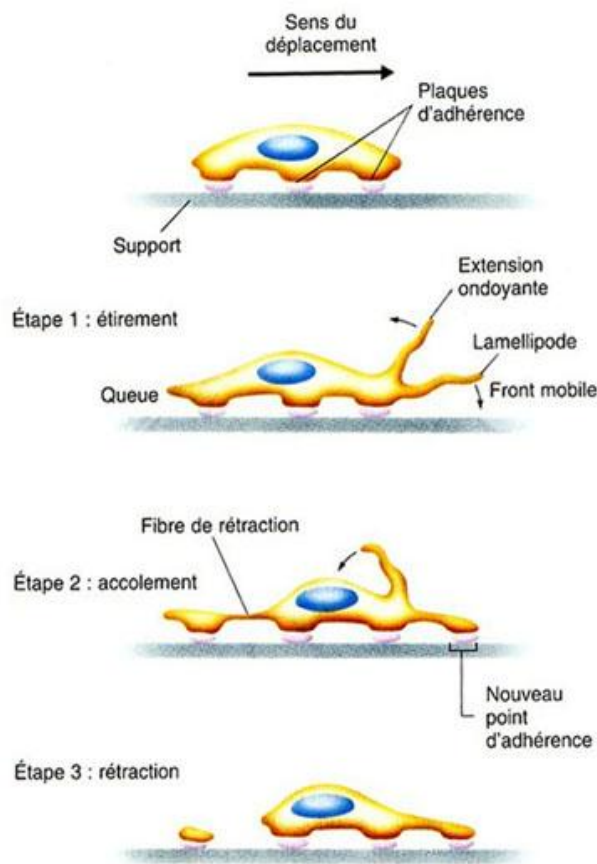


Figure 16 : Les étapes de la migration cellulaire. [Biologie moléculaire de la cellule 3e édition, 1997]

La déformation du cytosquelette à l'avant de la cellule est essentiellement due à la polymérisation de filaments d'actine (*treadmilling*), qui poussent la membrane plasmique de leur côté « plus », et donnent ainsi naissance à des protrusions. Ces protrusions peuvent prendre essentiellement deux formes : cylindriques, de faible diamètre (on parle alors de *filopodes*) ou large et aplaties (*lamellipodes*), et qui diffèrent également par l'arrangement interne des filaments d'actine : dans le cas des filopodes, ces filaments ont tous la même direction, et s'organisent sous forme de faisceaux, tandis que dans les lamellipodes, ils s'enchevêtrent et forment un véritable réseau bidimensionnel.

Ce phénomène semble largement influencé par l'action des protéines Rho, Rac et Cdc42 de la famille des Rho-GTPases. Ainsi, l'injection de Rac dans une cellule entraîne la formation d'un énorme lamellipode autour de la cellule, et la même expérience avec Cdc42 mène à l'apparition de nombreux filopodes tout au long de la périphérie de la cellule [Hall 1998]. Rho contrôle quant à elle la formation des fibres de stress [Ridley *et al.* 1992].

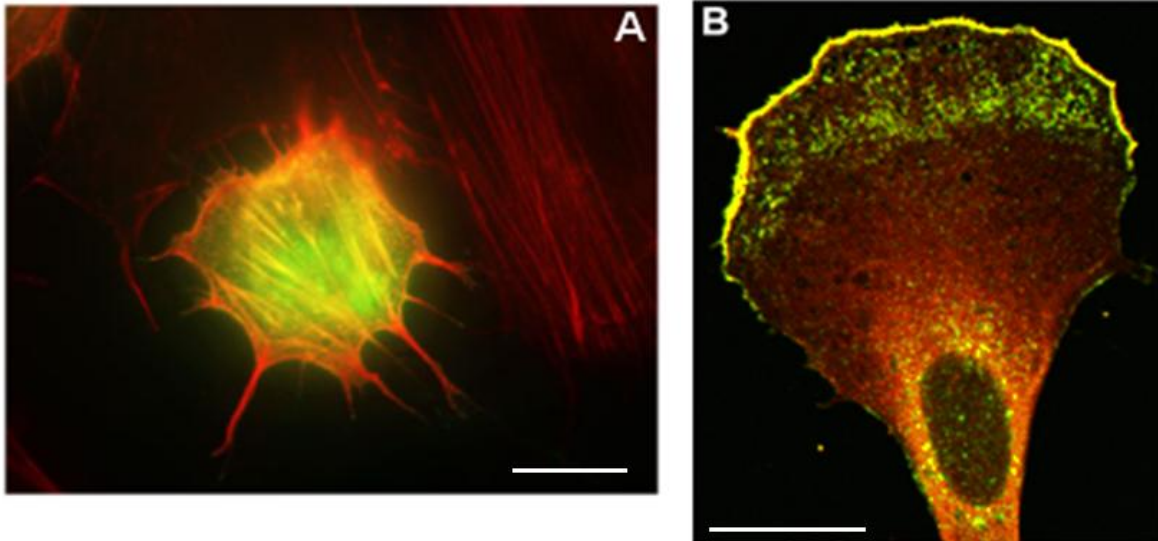


Figure : Filopodes (A) et lamellipodes (B) vus par fluorescence ; les filaments d'actine sont marqués en rouge. (échelle : 10 $\mu$ m) [A : The Philips Lab, NYU Cancer Institute ; B : Dynamin as a mover and pincher during cell migration and invasion, J Cell Sci **2006** 119: 1683-1690]

Une fois la protrusion formée, elle forme des adhésions entre son extrémité et le substrat, de manière à créer un point d'ancrage pour tirer ensuite la cellule. Ces adhésions sont du même type que les adhésions focales entre les filaments d'actine de la cellule et le substrat décrites dans la partie précédente. La nature de l'adhésion au substrat influence grandement la migration : on constate généralement que la vitesse globale de migration est d'autant plus faible que l'adhésion est forte. Les trois Rho-GTPases précédemment évoquées occupent également un rôle essentiel dans le processus d'adhésion : Rho régule la formation et la maintenance des adhésions focales, tandis que Rac et Cdc42 contrôlent les complexes focaux plus petits formés par le lamellipode ou le filopode [Nobes *et al.* 1995]. Il apparaît également que l'activité de ces trois protéines est intimement liée : Cdc42 peut activer Rac pour favoriser la formation d'un lamellipode, Rac pouvant à son tour activer Rho pour créer des adhésions focales au fur et à mesure de l'avancée du lamellipode.

Grâce à ces adhésions, la cellule peut alors se mouvoir dans son ensemble. Les filaments d'actine, fermement accrochés à l'avant de la cellule, servent alors de support à différentes familles de myosines situées à l'avant et à l'arrière de la cellule, qui peuvent déplacer les organelles et réorganiser le réseau de filaments du cytosquelette, de façon à ce que l'ensemble du corps cellulaire se soit avancé.

Le processus exact par lequel ce déplacement est effectué n'est pas très bien connu. Il semble qu'il soit déclenché lors de la rétractation (élastique et/ou sous l'action de myosines) de l'arrière de la cellule, qui propulserait alors l'ensemble du corps cellulaire vers l'avant, mais il est difficile de dire si ce phénomène est la cause ou la conséquence de ce mouvement d'ensemble. Dans tous les cas, la rétractation et le détachement de l'arrière de la cellule s'accompagnent de la rupture des jonctions qu'il faisait avec le substrat, vraisemblablement sous l'effet d'inhibiteurs spécifiques et sous l'effet des forces de contraction.

Il est important de noter qu'au cours de ce processus de migration par adhésion/dé-adhésion, la cellule exerce une certaine force sur le substrat. Cette force a pu être mesurée dans certains cas (voir partie II.4), ce qui permet d'obtenir de nombreuses informations sur le déroulement de la migration.

## 2.2 Orientation de la migration

La direction de migration d'une cellule peut être déterminée par plusieurs facteurs, chimiques ou physiques.

La diffusion d'une substance chimique dans le milieu est un premier moyen couramment observé d'orienter le mouvement des cellules dans l'organisme par *chimiotactisme*. Par exemple, un globule blanc peut détecter puis se diriger vers une infection bactérienne grâce aux protéines bactériennes diffusées dans l'organisme depuis la source de l'infection [Affolter 2005, Dormann 2003].

Les cellules disposent à leur surface de récepteurs spécifiques, permettant de détecter la concentration de différentes substances chimiques émises par l'organisme. Lorsqu'un gradient, même faible (de l'ordre de 1% entre l'avant et l'arrière de la cellule) est détecté, la cellule peut déclencher la polymérisation d'actine proche du site où la concentration est la plus élevée, et ainsi créer un pseudopode qui fera migrer la cellule dans la direction appropriée.

Le mouvement des cellules peut également être influencé par la nature du substrat : de manière similaire au chimiotactisme précédemment décrit, la matrice extracellulaire peut porter des substances chimiques non diffusées, qui déclenchent le mouvement des cellules. Comme décrit plus haut, la cellule forme et rompt successivement des adhésions lors de son mouvement. Ainsi, la vitesse de migration d'une cellule est proportionnelle à la force de ces adhésions (dans une certaine limite ; si la cellule ne peut plus rompre les adhésions, elle restera naturellement immobile), donc si le substrat n'est pas homogène, la cellule aura naturellement tendance à se déplacer dans la direction où l'adhésion est la plus forte – sur une surface couverte de fibronectine, la cellule « remontera » le gradient de concentration.

Les propriétés mécaniques du substrat peuvent également orienter le mouvement des cellules. Il a été observé que les cellules épithéliales placées sur un substrat « mou » avaient tendance à être beaucoup plus motiles et de formes irrégulières que celles sur des substrats plus rigides, ce qui laisse penser que ces cellules sont plus stables sur les substrats rigides [Pelham 1997]. Ce phénomène a été démontré et exploité en plaçant des cellules sur un substrat présentant des différences de rigidité : pour des raisons de stabilité, elles tendent effectivement à se déplacer fréquemment des zones les moins rigides aux plus rigides, et beaucoup plus rarement en sens inverse [Lo 2000].

Une fois la direction de migration « détectée » par la cellule, celle-ci se polarise en alignant son cytosquelette dans la direction du mouvement. Les signaux

permettent l'activation de la protéine Cdc42, qui déclenche à son tour le réarrangement des filaments d'actine et des microtubules dans le cytoplasme. En particulier, le centrosome (d'où partent les microtubules) se déplace autour du noyau de la cellule, jusqu'à être localisé au point le plus proche du pseudopode de la périphérie du noyau.

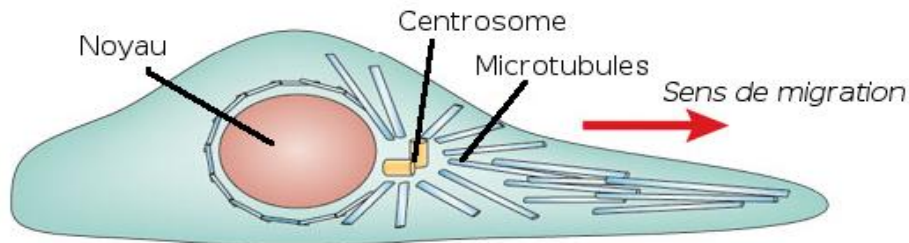


Figure 17 : Alignement du centrosome dans le sens de la migration. [The centrosome in human genetic disease, Jose L. Badano, Tanya M. Teslovich & Nicholas Katsanis, *Nature Reviews Genetics* 6 194-205 (2005)]

Lorsque le mouvement d'une cellule est entamé, il n'est pas toujours nécessaire que le signal persiste pour la guider à tout instant. A l'intérieur de la cellule, le centrosome peut se repositionner, et créer des microtubules qui s'orienteront dans la direction de la protrusion à l'avant de la cellule. Ces microtubules renforceront et amplifieront la protrusion, encourageant la motilité de la cellule dans cette direction. Le but de ce mécanisme permet à la cellule de réagir et de se mouvoir même lorsque le signal est faible ou disparaît.

### 3. Motilité d'ensemble

Le comportement des cellules au sein d'un épithélium présente de nombreuses spécificités : les cellules épithéliales sont en effet fermement maintenues entre elles par l'intermédiaire des différentes jonctions précédemment détaillées, ce qui rend ainsi leur mouvement très fortement influencé par le comportement de leurs voisines.

Nous allons détailler dans cette partie différents exemples de motilités d'un ensemble de cellules, et les principales différences qui existent avec la migration des cellules uniques. Nous aborderons d'abord la transition épithéliale-mésenchymateuse, mécanisme par lequel des cellules épithéliales peuvent se détacher et migrer individuellement, puis les mécanismes de réépithélialisation *in vivo*, en particulier la fermeture dorsale de l'embryon de drosophile et la cicatrisation de blessures sur un embryon par « cordon de bourse » (*purse string*). Nous détaillerons ensuite les expériences de réépithélialisation *in vitro* de blessures réalisées par *scratch* ou par croissance de cellules autour d'un obstacle, et qui ont servi de base à nos travaux.



### 3.1 La transition épithéliale-mésenchymateuse

L'exemple le plus direct de motilité d'un ensemble de cellules épithéliales dans un organisme consiste simplement pour ces cellules à perdre littéralement leur caractère épithélial (connectivité grâce à des jonctions serrées et adhérentes, présence d'une face basale et d'une face apicale, etc.), et à devenir des cellules *mésenchymateuses*, capables de migrer dans la matrice extracellulaire.

Le mécanisme par lequel s'effectue cette transformation est connu sous le nom de *transition épithéliale-mésenchymateuse*. Elle est présente dans un certain nombre de processus biologiques, notamment au cours du développement embryonnaire, où elle intervient dans la formation d'organes tels que le cœur, les reins ou les muscles. Cependant, elle joue également un rôle essentiel dans la diffusion de tumeurs cancéreuses dans l'organisme, ce qui rend son étude particulièrement importante d'un point de vue médical [Thiery 2002]

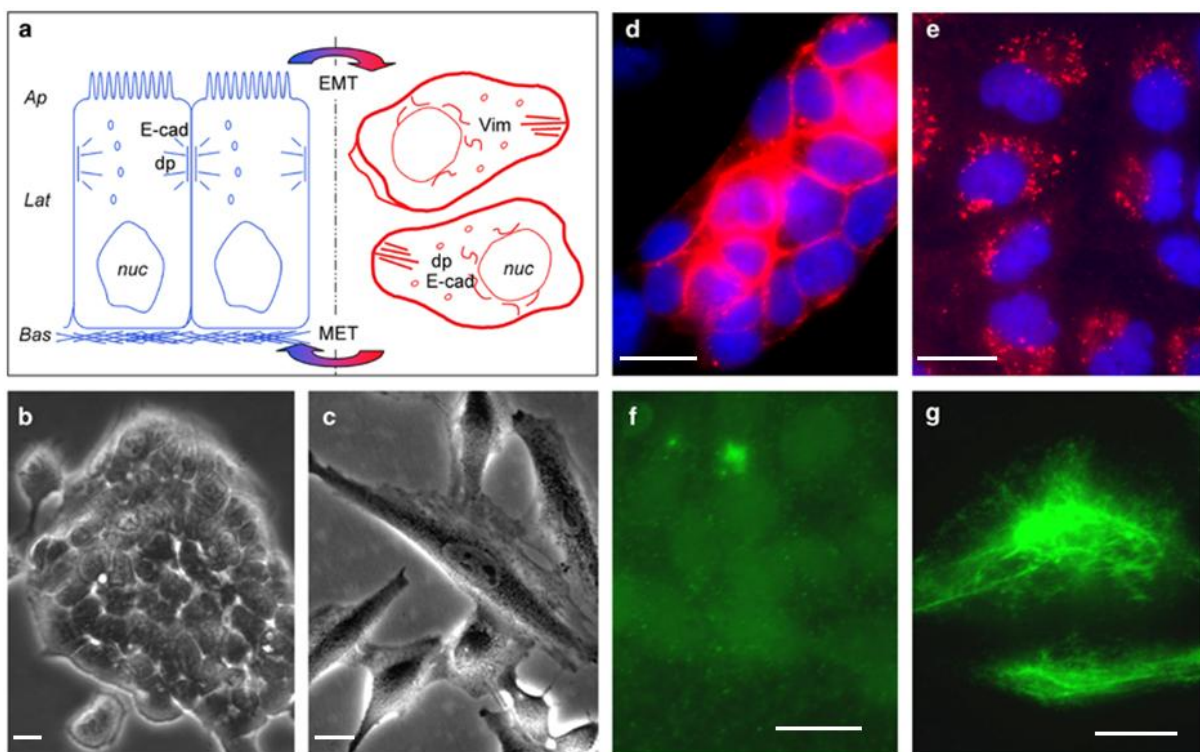


Figure 18 : Alors que les cellules épithéliales sont maintenues entre elles par des jonctions à base de cadhérine et démontrent une polarité basale/apicale, les cellules mésenchymateuses ont une morphologie totalement différente, ni adhérentes entre elles, ni polarisées (a). Cellules épithéliales (b, d, f) et mésenchymateuses (e, c, g), vues au microscope (b, c), avec marquage fluorescent des E-cadhérines (d, e) et de la vimentine, un type de filament intermédiaire (f, g). (échelle : 10µm) [a: Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways, L. Larue, A. Bellacosa, *Oncogene* **24**, 7443–7454 (2005) b-g: The Protein Kinase Akt Induces Epithelial Mesenchymal Transition and Promotes Enhanced Motility and Invasiveness of Squamous Cell Carcinoma Lines, Sylvia Julien Grille, Alfonso Bellacosa, John Upson, Andres J. Klein-Szanto, Frans van Roy, Whaseon Lee-Kwon, Mark Donowitz, Philip N. Tsichlis, and Lionel Larue, *Cancer Res.* **63** 2172-2178 (2003)]



Ce type de migration d'un ensemble de cellules ne saurait toutefois être réellement qualifié de motilité *collective* : en effet, les cellules migrent dans ce cas de manière pratiquement indépendante les unes des autres, on ne constate pas de mouvement coordonné des cellules entre elles. Si la transition épithéliale-mésenchymateuse présente un grand intérêt en soi, le mouvement individuel de chacune des cellules une fois cette transition effectuée ne présente guère de différence avec celui d'une cellule isolée.

### 3.2 *Expériences de réépithélialisation in vivo*

Lorsqu'un épithélium présente une « zone libre » en son sein, les cellules qui le constituent tendront naturellement à migrer collectivement pour occuper cet espace, et restaurer l'intégrité de l'épithélium. Ce phénomène se produit naturellement lorsqu'un épithélium subit une blessure, mais aussi lors de la morphogénèse embryonnaire de certains organismes, en présentant de nombreuses similarités [Jacinto 2001, Wood 2002]. Ainsi, alors que la cicatrisation reste un phénomène difficile à observer *in vivo*, l'étude de certaines étapes de morphogénèse embryonnaire d'organismes aisément manipulables en laboratoire permet de mettre en lumière les mécanismes à l'œuvre dans la réépithélialisation.

#### 3.2.1 *Mouvements collectifs lors de la cicatrisation*

En raison de ses implications en milieu médical, la cicatrisation d'une blessure sur un organisme a fait l'objet de nombreuses études [Clark 1996]. Cependant, l'accent a naturellement davantage été mis sur les phases les plus vitales (inflammation, coagulation des plaquettes, etc.) que sur la mécanique du mouvement collectif des cellules lors de la réépithélialisation, et le détail des mécanismes guidant ce phénomène *in vivo* reste encore relativement mal connu à ce jour. Les observations qui ont pu être réalisées permettent toutefois d'obtenir des informations sur les « grandes lignes » du processus de réépithélialisation lors d'une blessure.

Deux mécanismes généraux de fermeture, non incompatibles entre eux [Bement 1993], ont été identifiés : la cicatrisation par migration des cellules limitrophes de la blessure, et la fermeture par « cordon de bourse » (*purse string*).

##### 3.2.1.1 *Réépithélialisation par migration du front cellulaire*

Ce mécanisme de réépithélialisation, qui se rencontre majoritairement chez les organismes adultes [Clark 1996], a notamment pu être observé en effectuant des blessures (à l'aide d'un scalpel par exemple) sur un épiderme de cochon d'inde.

Un certain temps de latence de quelques heures est tout d'abord constaté, pendant lequel les cellules ne progressent pas sur la surface blessée. [Stenn 1988]. Pendant ce temps, la zone endommagée se couvre de protéines spécifiques, fibrine

et fibronectine notamment, sur laquelle les cellules s'appuient pour migrer [Clark 1982].

Les cellules situées au bord de la blessure changent alors de morphologie, adoptant une forme beaucoup plus étalée, et étendant des lamellipodes vers la surface à occuper. Ces cellules se mettent alors à migrer, formant un front d'à peine une à deux cellules d'épaisseur se dirigeant vers le trou. La progression s'effectue par un processus de « roulement » : les cellules les plus proches du bord deviennent des cellules basales, et servent de support sur lequel les cellules suivantes migreront [Krawczyk 1971], jusqu'à ce que la totalité de l'épithélium soit restauré.

La division cellulaire ne semble pas avoir d'influence sur la vitesse de cicatrisation : même en présence d'un inhibiteur de mitose, l'épithélium progresse sur la blessure [Krawczyk 1971]. Toutefois, à plus long terme, la prolifération est nécessaire pour reconstituer l'épithélium au fur et à mesure de son avancée.

Dans l'ensemble, toutefois, la mécanique de la cicatrisation reste mal comprise : quel est le « moteur » de la migration collective, les cellules situées au bord tirent-elles le reste de l'épithélium, ou l'épithélium pousse-t-il ces cellules vers la blessure (ou les deux en même temps) ? Qu'est-ce qui déclenche la transformation des cellules épithéliales du bord en cellules migrantes ?

### 3.2.1.2 Réépithélialisation par rétractation d'un « cordon de bourse »

Ce mécanisme de réépithélialisation a été tout d'abord identifié lors de blessures sur des embryons de poulet [Martin 1992, Heath 1996, Danjo 1998] et des ovocytes d'amphibiens [Brock 1996, Bement 1999], et est généralement prépondérant dans les épithéliums embryonnaires, ou les blessures de petite taille, de l'ordre de quelques cellules à quelques dizaines de cellules - bien que l'on ne sache pas comment les cellules sont capables de « détecter » la taille de la blessure [Bement 1993].

Les expériences menées consistent à effectuer une blessure mécanique sur l'embryon ou l'ovocyte, en retirant un fragment de tissu épithélial ou en le perçant à l'aide d'une pipette en verre. On observe alors une cicatrisation de manière homogène par l'ensemble des cellules bordant la blessure, jusqu'à fermeture complète de la blessure. De manière notable, la cicatrisation est « parfaite », autrement dit, l'embryon ne porte pas de cicatrice permanente à l'issue de ce processus.

Contrairement à ce qui est décrit dans la partie précédente sur la migration d'une cellule unique, les cellules limitrophes ne présentent pas de pseudopode (lamellipode ou filopode), pas plus que les cellules situées plus à l'arrière : la motilité collective diffère donc sensiblement de la migration d'une cellule unique dans ce cas, et ce mécanisme de cicatrisation ne peut s'expliquer simplement par transposition du comportement d'une cellule unique. Par ailleurs, l'expérience inverse, consistant à déposer un petit tissu cellulaire d'embryon au lieu de trouser un épithélium, donne un

résultat surprenant : au lieu d'occuper l'espace vacant, le tissu s'est au contraire rétracté sur lui-même [Bement 1999].

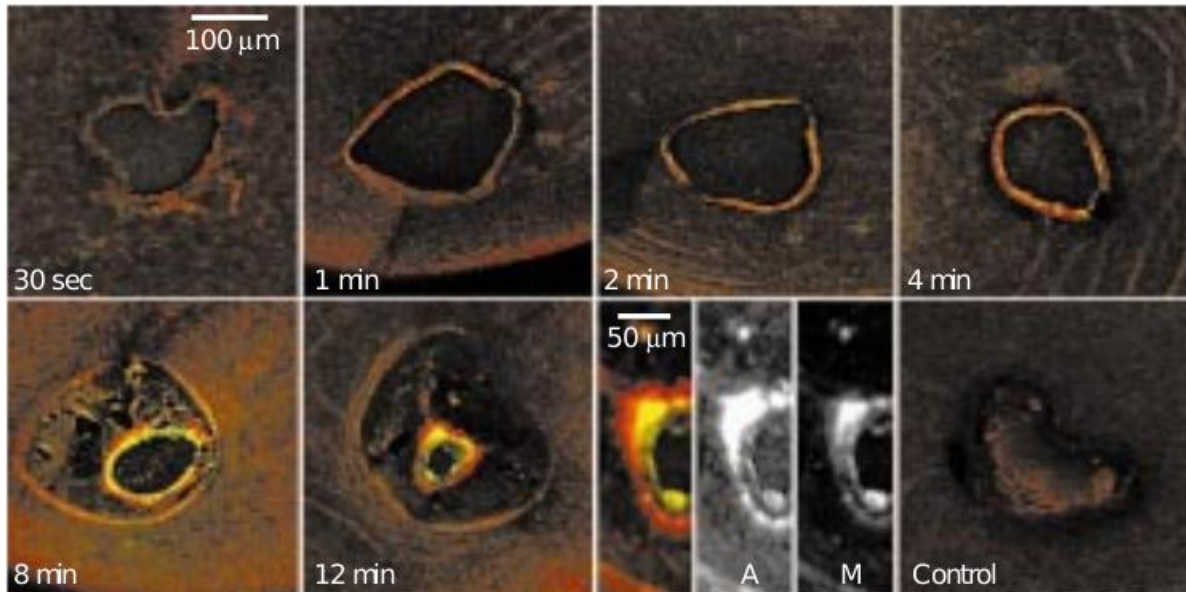


Figure 20 : Cicatrisation d'une blessure d'un épithélium sur un ovocyte de *Xenopus*. [Wound-induced assembly and closure of an actomyosin purse string in *Xenopus* oocytes, William M. Bement, Craig A. Mandato, Mary N. Kirsch, *Current Biology*, Volume 9, Issue 11 579-587 (1999)]

Ces éléments ont été expliqués par l'existence d'une tension mécanique sur la périphérie de la blessure, exercée par des filaments d'actine et de myosine au sein des cellules liées les unes aux autres pour former un anneau pluricellulaire autour de la blessure. Cet anneau se contracte au cours du temps, tirant littéralement les cellules de la périphérie vers l'intérieur, de manière analogue à un cordon fermant une bourse.

L'assemblage de ce « câble » formé par la succession de jonctions cellule-cellule de la périphérie s'effectue de manière particulièrement rapide : quelques secondes à peine après l'apparition de la blessure, les cellules limitrophes déclenchent l'assemblage de filaments d'actine, de myosine et de microtubules (ainsi que la réorganisation des filaments existants). La protéine Rho (de la famille des Rho-GTPases) a été identifiée comme composante essentielle de ce processus ; à l'inverse, Rac ne semble avoir aucune influence, son inhibition ne conduisant à aucun changement dans la fermeture de la blessure.

La cicatrisation se termine lorsque les cellules arrivent au contact (on parle d'« inhibition de contact »), et celles-ci déclenchent alors la formation de jonctions cellule-cellule. Cependant, le processus par lequel les cellules détectent puis modifient leur comportement dans ces conditions reste largement inconnu.

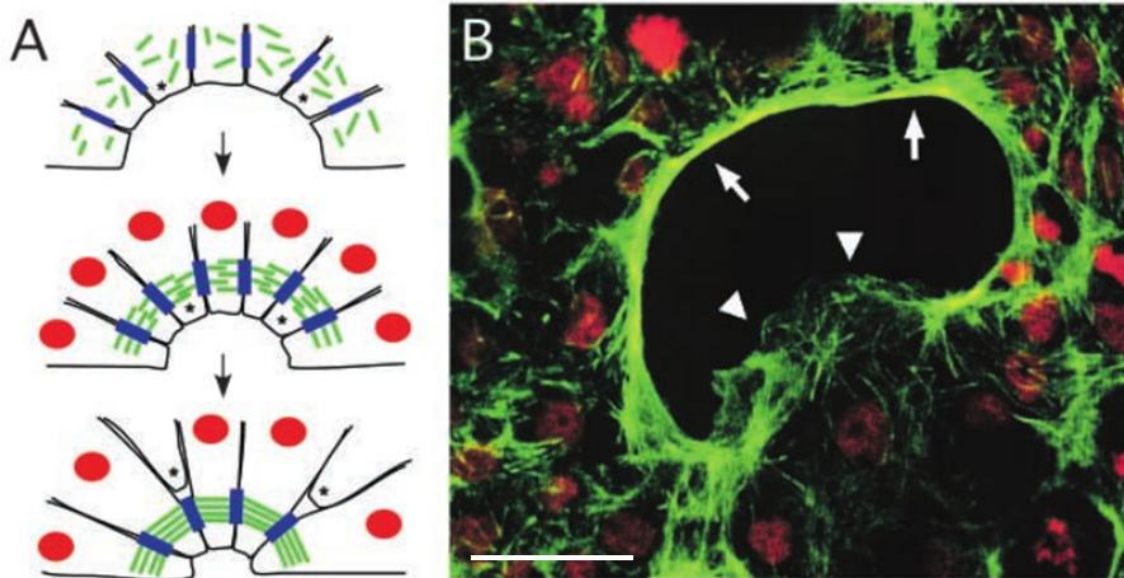


Figure 21 : (A) Schéma du mécanisme de fermeture par « cordon de bourse ». Les filaments d'actine (en vert) s'assemblent pour former un câble intercellulaire robuste, dont la contraction tire les cellules vers le centre de la blessure. Lors de cette cicatrisation, certaines cellules (marquées par une astérisque) peuvent quitter le bord de la blessure. (B) Image par fluorescence (actine marquée en vert, noyau marqué en rouge) d'une blessure dans un épithélium de cellules intestinales *Caco<sup>2BBE</sup>* cicatrisant simultanément par un mécanisme de « cordon de bourse » (flèches) et par l'intermédiaire d'un lamellipode migrant (triangles). (échelle: 50µm) [A: Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis, Paul Martin and Susan M. Parkhurst, *Development* **131** 3021-3034 (2004) ; B: Mechanisms of epithelial fusion and repair, Antonio Jacinto, Alfonso Martinez-Arias, Paul Martin, *Nature Cell Biology* **3** E117-E123 (2001)]

### 3.2.2 Motilité collective lors de la morphogénèse embryonnaire

Lors de l'embryogénèse, l'épiderme de l'embryon subit de nombreuses transformations, au fur et à mesure de l'apparition des organes. Au cours de ces transformations, les cellules épithéliales migrent collectivement et de manière coordonnée, d'une manière rappelant beaucoup la réépithélialisation faisant suite à une blessure.

Nous allons décrire deux exemples de tels mouvements collectifs, chez la drosophile, et chez le ver *Caenorhabditis elegans*, dont l'étude a permis d'explorer plus précisément les processus biologiques mis en jeu lors de la réépithélialisation.

#### 3.2.2.1 Fermeture dorsale de l'embryon de la drosophile

Au cours de l'embryogénèse de la drosophile, la surface de l'embryon se couvre d'une couche de cellules qui formeront l'épiderme de l'organisme. Ce recouvrement n'est pas complet : un trou dans l'épithélium subsiste pendant une longue période, couvert par une couche de cellules extra-embryonnaires, l'*amnioserosa*, avant d'être finalement entièrement recouvert par l'épiderme au cours d'un processus connu sous

le nom de *fermeture dorsale* [Jacinto 2002]. L'épiderme résultant ne présente alors aucune trace de cicatrisation.

Le processus se déroule schématiquement en 4 étapes : l'initialisation, le recouvrement de l'amnioserosa, la « fermeture éclair », et la terminaison.

La fermeture commence lorsque la *bande germinale*, un repli interne des couches cellulaires supérieures de l'embryon (et couvert par l'amnioserosa) finit de se rétracter. Les forces internes mises en jeu lors de cette rétractation sont probablement le déclencheur du processus ; l'épithélium commence alors à s'étendre en direction du trou, tandis que les cellules de l'amnioserosa se contractent en réponse. Toutefois, aucun recouvrement de l'amnioserosa n'est observé à ce stade.

Peu après, les cellules épithéliales face au « bord libre » déclenchent la polymérisation de filaments d'actine et de myosine, et forment un épais câble tout autour du trou [Young 1993]. Ce câble d'actine, en se contractant, tire l'épithélium, au point de le conduire à recouvrir l'amnioserosa, de manière très similaire à la fermeture par « cordon de bourse » décrite précédemment. Parallèlement, ces cellules commencent à étendre des pseudopodes en direction de la surface occupée par l'amnioserosa.

Lorsque les bords opposés sont suffisamment proches, les filopodes étendus par les cellules situées à l'avant et à l'arrière du trou peuvent atteindre les cellules opposées. La fermeture, au lieu de se faire de manière homogène comme précédemment, prend l'apparence d'une « fermeture-éclair », en rapprochant les cellules progressivement selon un axe avant-arrière.

Enfin, lorsque les deux « fermetures éclair » se rejoignent au centre, la migration s'arrête afin de ne pas conduire à une superposition des cellules épithéliales.

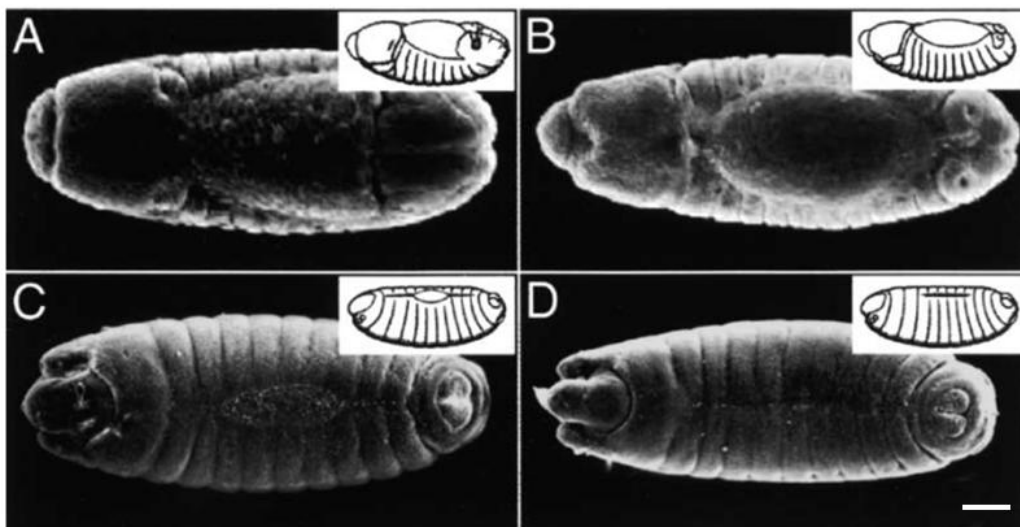


Figure 22 : Fermeture dorsale de l'embryon de drosophile : initialisation de la fermeture (A), recouvrement de l'amnioserosa (B), « fermeture éclair » (B) et terminaison (D). (échelle : 50µm) [Dynamic Analysis of Dorsal Closure in Drosophila: From Genetics to Cell Biology Antonio Jacinto, Sarah Woolner, Paul Martin Developmental Cell, 3 9-19 (2002)]

L'utilisation d'embryon mutants, dans lesquels l'expression de certains gènes est supprimée ou modifiée, a permis de mettre en évidence le rôle important joué par les Rho-GTPases Rho, Rac et Cdc42. Ainsi, Rac semble être le déclencheur de la fermeture, tandis que Rho contrôle la production et la contraction des câbles d'actomyosine, et Cdc42 l'extension des filopodes servant à la « fermeture éclair ».

En bloquant Rho chez les cellules, et donc la formation du câble d'actine, qui participe clairement à la fermeture en « cordon de bourse » comme le montre le changement de forme des cellules du bord soumises à la contraction du câble, il apparaît que l'épithélium est tout de même capable de recouvrir le trou. Par ailleurs, en effectuant la même opération sélectivement sur certaines cellules du bord de l'épithélium, celles-ci se mettent à migrer de manière moins contraintes, plus rapidement que leurs voisines. Le câble d'actine a donc pour fonction non seulement de diriger les cellules vers l'intérieur du trou, mais aussi de coordonner le mouvement des cellules, afin qu'elles progressent à la même vitesse, vraisemblablement pour assurer la « fermeture éclair » correctement.

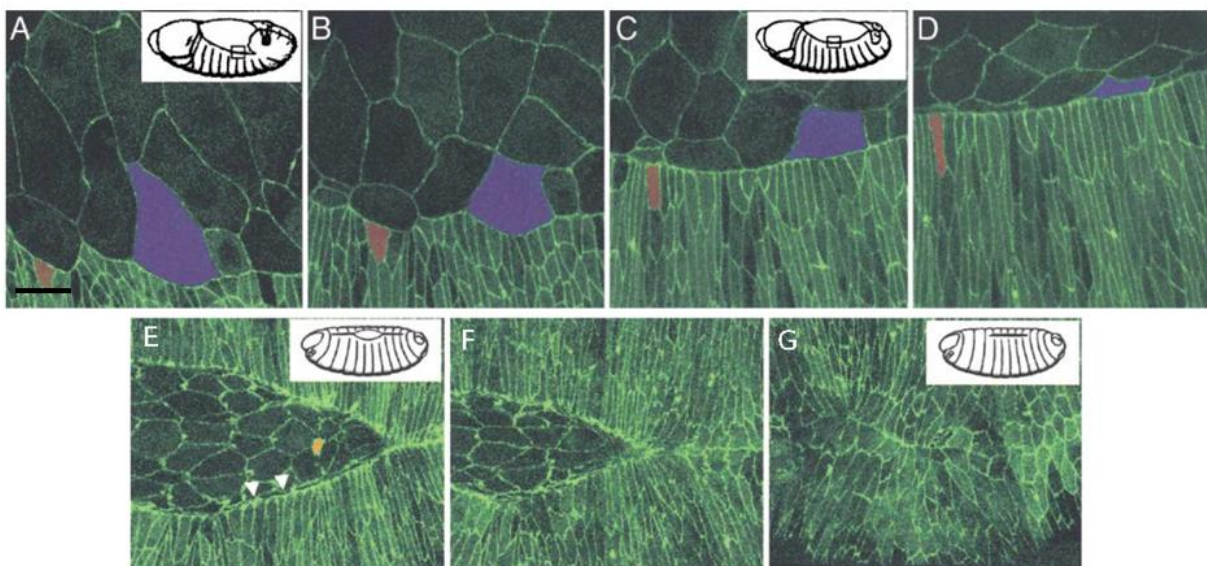


Figure 23: Comportement des cellules lors de la fermeture dorsale. A, B : Lors de l'étape d'initialisation, les cellules épithéliales (petites cellules situées sur la partie inférieure) migrent tandis que l'amnioserosa se contracte (grandes cellules situées sur la partie supérieure). C, D : Le recouvrement par « cordon de bourse » tire les cellules épithéliales vers le centre, leur donnant une forme allongée (orange). Celles-ci se mettent alors à recouvrir les cellules de l'amnioserosa (violet). E, F : La fermeture se termine par un mécanisme de « fermeture éclair », les cellules de chaque bord s'accrochant à celles situées sur le bord opposé par l'intermédiaire de câble d'actine. G : L'épithélium finit par recouvrir la totalité de l'amnioserosa. (échelle : 10µm) [Dynamic Analysis of Dorsal Closure in *Drosophila*: From Genetics to Cell Biology Antonio Jacinto, Sarah Woolner, Paul Martin *Developmental Cell*, 3 9-19 (2002)]

### 3.2.2.2 Fermeture ventrale de l'embryon de *C. elegans*

L'embryon du ver *C. elegans* subit également lors de son développement un processus de fermeture épithéliale, ventrale dans ce cas : un groupe de cellules de l'hypoderme du ver forme un épithélium sur la face dorsale de l'animal, qui se met à



recouvrir petit à petit l'embryon, jusqu'à fermer le trou qui apparaît sur la face opposée [Williams-Masson 1997, Williams-Masson 1998]. Ce phénomène présente de nombreuses similarités avec la fermeture dorsale de la drosophile, tout en présentant certaines spécificités.

La fermeture s'effectue schématiquement en 2 étapes : la migration globale de l'épithélium, et la fermeture par « cordon de bourse ».

Lors de la première étape, ce sont les cellules situées au bord de l'épithélium elles-mêmes qui constituent le moteur de la fermeture : ces cellules migrent vers l'intérieur du trou, et semblent tirer le reste de l'épithélium derrière elles. Cependant, la migration n'est pas homogène ; plusieurs cellules situées sur la partie antérieure de l'hypoderme semblent en effet beaucoup plus actives que les autres cellules de la périphérie, en étendant des filopodes vers les cellules situées de l'autre côté du trou, puis migrent parallèlement vers la ligne médiane ventrale. Ce processus n'est pas sans rappeler la « fermeture éclair » de la fermeture dorsale de la drosophile ; toutefois, ici, ce phénomène initialise, et non termine, la fermeture.

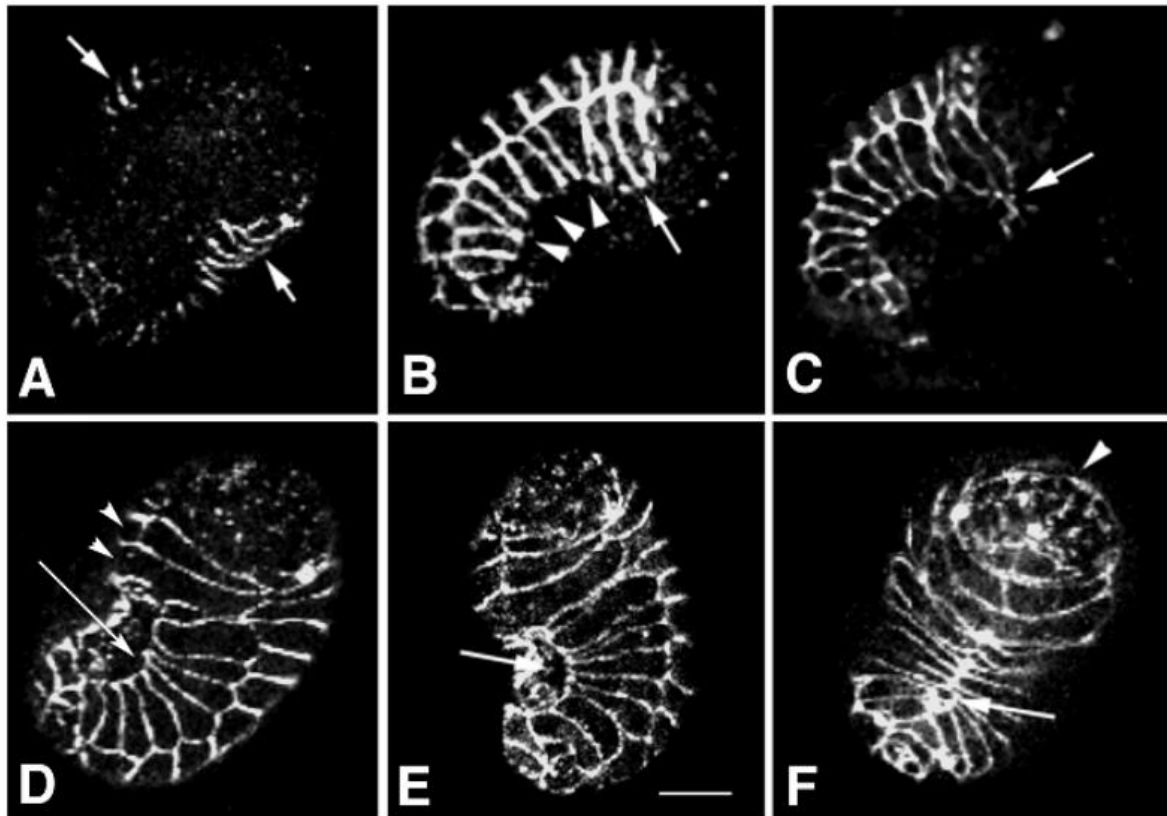


Figure 24 : Fermeture ventrale de l'embryon de *C. Elegans*. A : Vue de la partie ventrale de l'embryon lorsque l'épithélium commence à s'étendre. B : Vue de la partie latérale de l'embryon peu avant la jonction des deux bords. C : Fusion de l'épithélium à l'avant de l'embryon. D, E : Fermeture finale par « cordon de bourse ». F : Fin de la fermeture. (échelle : 10 $\mu$ m) [An actin-mediated two-step mechanism is required for ventral enclosure of the *C. elegans* hypodermi , Ellen M. Williams-Masson, Amy N. Malik, Jeff Hardin, *Development* **124**, 2889-2901 (1997) ]

Lorsque ces cellules ont effectué leur jonction, les autres cellules de la périphérie, qui n'ont pas étendu de filopodes, achèvent la fermeture par l'intermédiaire d'un « cordon de bourse » semblable à celui de l'embryon de drosophile : ces cellules génèrent un câble d'actine, qui, en se contractant, les tire vers l'intérieur du trou.

L'ordre dans lequel s'effectuent ces deux phases (inverse de la drosophile) est essentiel : en effet, la migration initiale a pour but d'assurer que l'épithélium se sera étendu au-delà de l'équateur. Dans le cas contraire, les cellules forment une boule sur la face dorsale de l'embryon, confirmant ainsi le rôle joué par la contraction du câble d'actine. L'étude de la première phase de la fermeture apporte un certain éclairage sur la manière dont les cellules créent leurs jonctions une fois au contact. Lorsque deux cellules se retrouvent suffisamment proches, les filopodes qu'elles ont étendus s'intercalent les uns dans les autres, et s'attachent à la cellule opposée. Au fur et à mesure de la dépolymérisation de l'actine contenue dans les filopodes et du rapprochement des cellules, ces adhésions évoluent pour se transformer au final en jonction adhérentes.

### A Two-Step Model for Ventral Enclosure

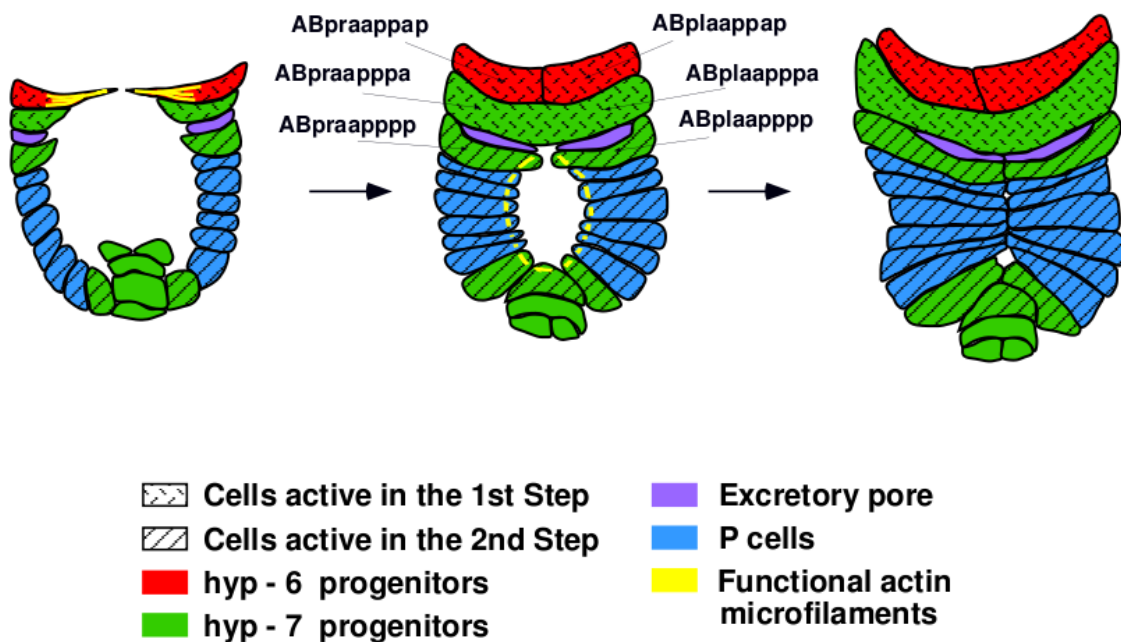


Figure 25: La fermeture ventrale s'effectue en deux étapes. Les deux parties de l'épithélium à l'avant du trou commencent par fusionner selon un mécanisme de type « fermeture éclair », puis la zone centrale est refermée par un mécanisme « cordon de bourse ». [An actin-mediated two-step mechanism is required for ventral enclosure of the *C. elegans* hypodermis, Ellen M. Williams-Masson, Amy N. Malik, Jeff Hardin, *Development* **124**, 2889-2901 (1997) ]

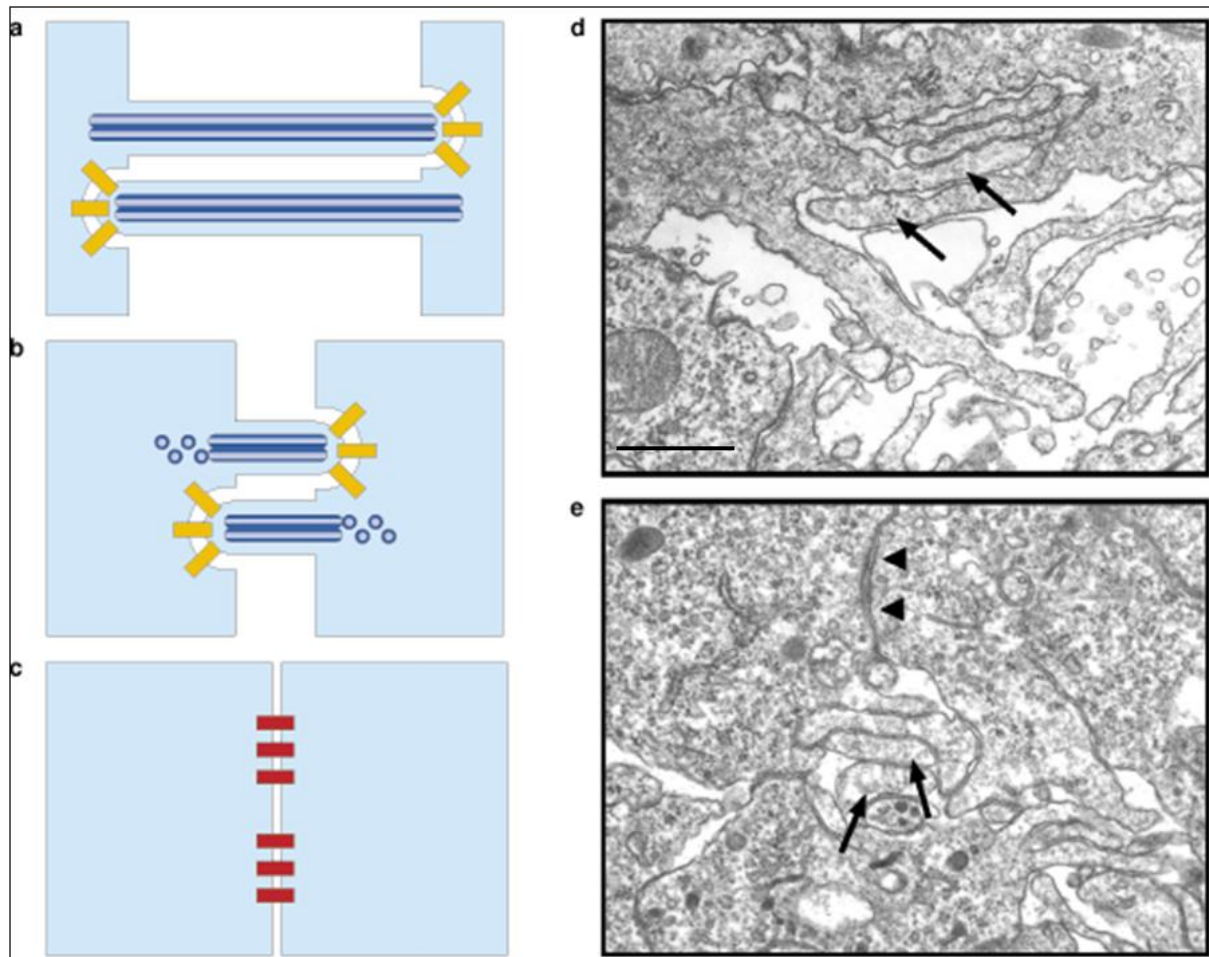


Figure 26: Lorsque les filopodes atteignent la cellule opposée, ils établissent des adhésions faibles avec celle-ci (a, d). Au fur et à mesure de la dépolymérisation de l'actine composant le filopode, les cellules se rapprochent l'une de l'autre (b, flèches e), pour finir par former de véritables jonctions adhérentes (c, triangles e). (échelle : 500nm) [Mechanisms of epithelial fusion and repair, Antonio Jacinto, Alfonso Martinez-Arias, Paul Martin, Nature Cell Biology 3, E117-E123 (2001)]

### 3.3 Expériences de réépithélialisation modélisées *in vitro*

Si les expériences de cicatrisation *in vivo* mettent en jeu de nombreux phénomènes biologiques parfois difficiles à isoler, il est beaucoup plus simple de considérer l'évolution d'une monocouche cultivée *in vitro* pour étudier les processus à l'œuvre lors de la réépithélialisation. Ces expériences diffèrent sensiblement des observations *in-vivo* sur un certain nombre de points : elles peuvent s'effectuer sur un épithélium composé de cellules d'un seul type, (MDCK, IAR2, cellules cornéennes...), et n'évoluent pas sur des tissus pouvant eux-mêmes intervenir dans la cicatrisation, mais directement sur une surface non biologique. Ces expériences permettent d'observer spécifiquement la réépithélialisation au cours du temps dans un épithélium modèle, en s'affranchissant des autres processus biologiques (saignements, mouvements dans les couches inférieures de l'épiderme, etc.).

### 3.3.1 Blessures par scratch

La méthode la plus aisée pour observer la réépithélialisation d'une monocouche épithéliale consiste à déchirer légèrement l'épithélium à l'aide d'un scalpel ou d'une pointe de pipette, puis à observer sous microscope le comportement des cellules au cours du temps en effectuant des acquisitions à intervalles réguliers. L'aspect de la blessure (« propreté » du bord, dommages effectués sur les cellules, etc.) dépend de paramètres tels que la taille et la forme de l'outil utilisé, ou encore de la vitesse à laquelle la blessure a été effectuée [Thielecke 2006].

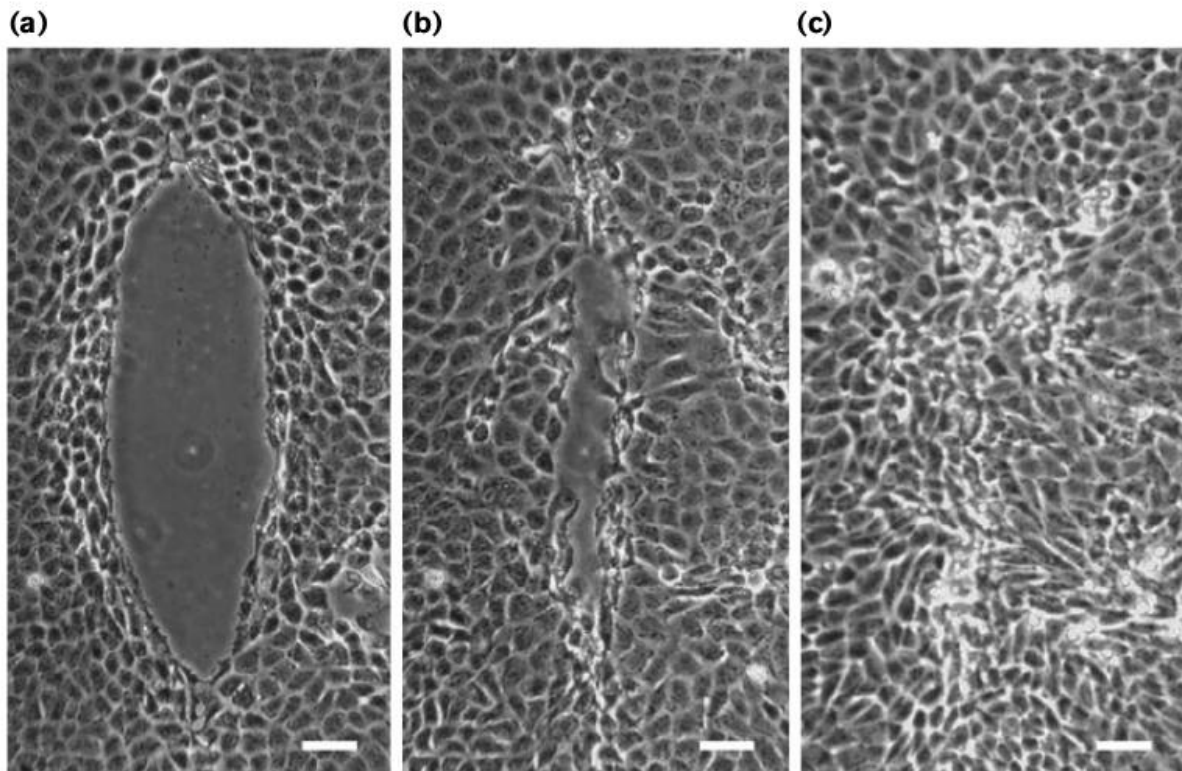


Figure 27: Cicatrisation d'une blessure mécanique effectuée sur un épithélium de cellules MDCK à  $t=0$  (a),  $t=6h$  (b) et  $t=18h$  (c) (échelle :  $50\mu m$ ) [Signaling pathways and cell mechanics involved in wound closure by epithelial cell sheets , Gabriel Fenteany, Paul A. Janmey, Thomas P. Stossel, *Current Biology* **10** 831–838 (2000)]

Si l'on se réfère à ce qui se passe *in vivo*, la cicatrisation *in vitro* s'effectue distinctement selon un mécanisme de migration des cellules plutôt que par « cordon de bourse » (possiblement à cause de la taille des blessures) : des cellules au bord de l'épithélium étendent de manière évidente des lamellipodes en direction de la blessure, et migrent de manière non totalement uniforme. Toutefois, ici, la progression se fait bel et bien par migration de l'ensemble de l'épithélium ; on n'observe pas ici de « roulement » par lequel les cellules se superposent les unes aux autres.

Lors de la blessure, le bord de l'épithélium apparaît irrégulier (de nombreuses cellules ayant été abîmées lors du retrait mécanique), voire légèrement détaché. L'épithélium commence par se rétracter [Thielecke 2006], probablement pour

réorganiser les cellules du bord qui perdent subitement le contact avec leurs voisines. Puis, il commence à recouvrir la blessure, guidé par les cellules étendant des lamellipodes. De manière notable, toutes les cellules du bord n'étendent toutefois pas de lamellipode ; lorsque cela se produit, ces cellules créent une protrusion, semblant tirer le reste de l'épithélium derrière elles. Par ailleurs, comme lors de la cicatrisation *in vivo*, la prolifération cellulaire ne semble pas jouer un rôle majeur dans l'avancée de l'épithélium [Sponsel 1994].

Du point de vue des Rho-GTPases responsables de la migration, l'apparition des lamellipodes a été attribuée à l'action de Rac, tandis que l'inhibition de Rho ou de Cdc42 ne semble pas gêner la cicatrisation [Fenteany 2000]. Cependant, l'inhibition sélective de Rac dans la première rangée de cellules de l'épithélium ne bloque pas la cicatrisation ; l'inhibition doit être étendue aux trois premières rangées pour y parvenir. Ce phénomène montre que les cellules étendant leur lamellipode de manière visible au bord de l'épithélium ne sont pas les seules à jouer un rôle dans l'avancée de ce dernier : les cellules de la seconde et de la troisième rangée étendent également des lamellipodes, qui s'insèrent entre les cellules du bord et la surface, et jouent ainsi un rôle actif dans la migration de l'épithélium [Farooqui 2004].

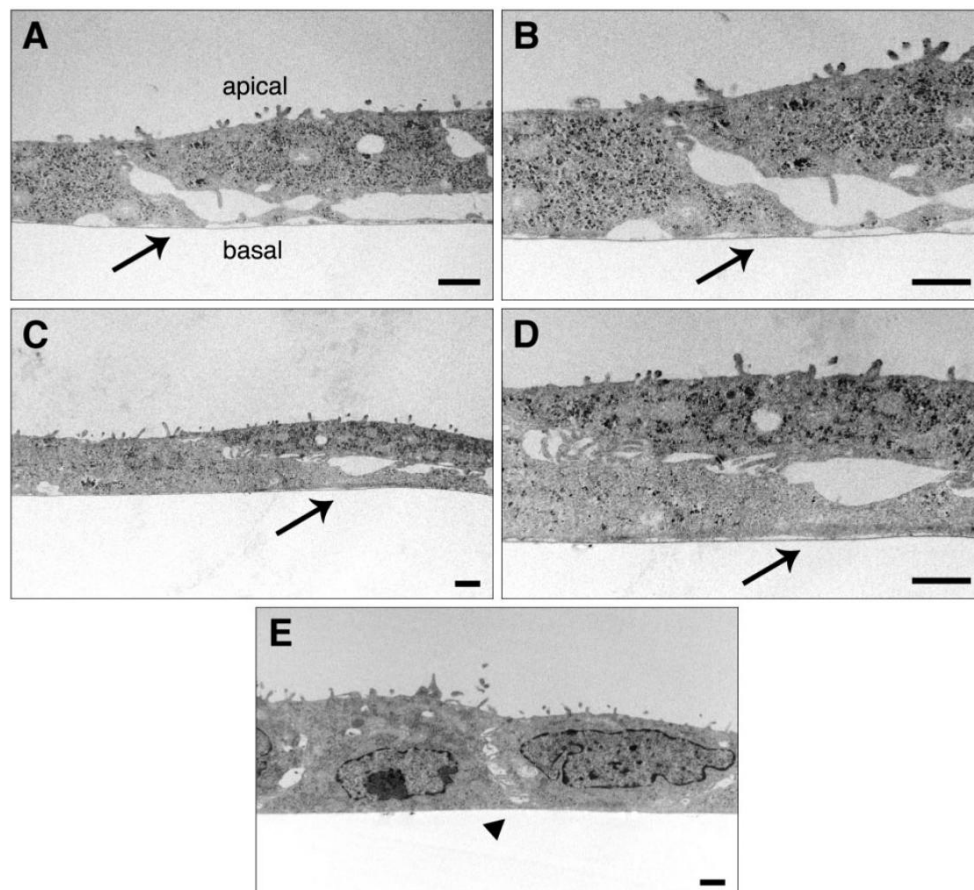


Figure 28 : Vue au microscope de coupes latérales de cellules MDCK lors de la réépipithélialisation d'une blessure. A-D : Les cellules situées « proche » du bord (5 à 7 cellules de distance) étendent un lamellipode s'insérant en-dessous de la cellule devant elles (les images B et D sont des agrandissements des images A et C). E : A 100 cellules de distance, les cellules du reste de la monocouche montrent une forme plus classique, presque cuboïdale. (échelle : 1µm) [Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell- sheet movement , Rizwan Farooqui, Gabriel Fenteany, *Journal of Cell Science* **118** 51-63 (2005)]

Toutefois, le signal déclencheur de cette activité (et donc de la migration de l'épithélium) n'a pas été clairement identifié. Trois hypothèses ont été évoquées. Tout d'abord, il est possible que les cellules endommagées lors de la blessure diffusent dans le milieu des substances activant les cellules intactes, tels que les facteurs de croissance (*Growth Factor*), connus pour accélérer la cicatrisation des cellules MDCK [Sponsel 1994]. Une autre possibilité serait que les cellules intactes verraient les propriétés de leur membrane changer brusquement au cours de la blessure, les rendant davantage perméables à des éléments présents dans le milieu, tels que certains ions ( $\text{Ca}^{2+}$  notamment) [Klepeis 2001]. Enfin, le signal déclencheur peut tout simplement être l'existence du « bord libre » : en faisant disparaître une contrainte sur les bords des cellules autour de la blessure, les forces s'exerçant sur les cellules changent radicalement, ce qui pourrait déclencher l'extension des lamellipodes.

### 3.3.2 Cicatrisation d'un épithélium cornéen dans une blessure modèle

Cette dernière hypothèse de mouvement collectif déclenché par la simple existence d'un « bord libre » semble avoir été montrée dans le cas de cellules épithéliales cornéennes [Block 2004].

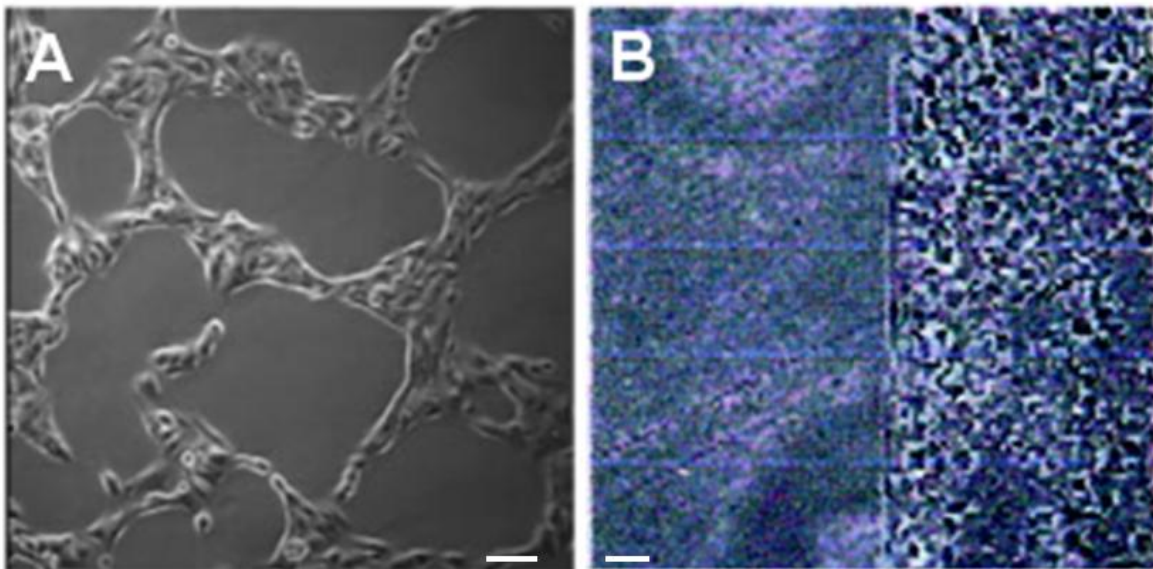


Figure 29 : Epithélium de cellules épithéliales cornéennes (A) après le retrait de gouttelettes d'agarose ou (B) de bandes d'agarose. (échelle :  $20\mu\text{m}$ ) [Wounding Induces Motility in Sheets of Corneal Epithelial Cells through Loss of Spatial Constraints, Ethan R. Block, Abigail R. Matela, Nirmala SundarRaj, Erik R. Iszkula, Jes K. Klarlund , *The Journal of Biological Chemistry* **279** 24307–24312 (2004)]

Ces cellules ont été cultivées sur des boîtes de culture sur laquelle étaient déposés des gouttes d'agarose, empêchant ainsi les cellules de croître sur certaines zones. Les gouttes d'agarose sont ensuite retirés, créant ainsi des trous dans l'épithélium (en quelque sorte des « blessures », même si aucun retrait mécanique de l'épithélium n'a été réalisé) sans que les cellules ne soient abîmés, et l'évolution de la monocouche observée.

Les cellules montrent alors un comportement proche de celui observé lors d'une blessure mécanique : au bout de 30 minutes après le retrait de l'agarose environ, certaines cellules étendent des lamellipodes en direction de la blessure, et l'épithélium recouvre la blessure en une durée comparable à celle d'un épithélium blessé mécaniquement. Block *et al.* ont ainsi montré que, si la cicatrisation de ces cellules était induite par un facteur de croissance, l'Epidermal Growth Factor (EGF), déclenchant la transformation de cellules épithéliales en cellules migrantes, ce n'est pas le fait d'abîmer ou de tuer des cellules qui était à l'origine du processus, mais la libération des récepteurs de ce facteur de croissance situées sur les cellules du bord de la blessure, qui étaient auparavant bloqués par les cellules voisines [Block 2008]

Cependant, l'origine mécanique de la migration n'a été démontrée que dans très peu de cas hors de ces cellules cornéennes et de certaines cellules endothéliales [Van Horssen 2006]. C'est à partir de ces observations que nous avons entamé nos travaux, en étendant l'étude à d'autres cellules épithéliales et en modifiant le protocole de fabrication des blessures modèles pour pouvoir obtenir des blessures de forme bien déterminée.

### 3.4 Modélisation

Outre les observations expérimentales présentées jusqu'ici, plusieurs études ont tenté de réaliser un modèle théorique de la migration collective de cellules sur une surface à partir de lois physiques. Nous allons présenter ici les principaux cadres autour desquels ces modèles ont été bâtis ainsi que les lois d'évolutions qui en ont été déduites.

La première approche consiste à considérer la migration cellulaire comme un ensemble de particules en mouvement et d'utiliser des lois de diffusion adaptées pour rendre compte de leur évolution. Cette approche semble particulièrement populaire, et a été reprise dans de nombreux articles [Sherratt 1990, Sheardown 1995, Wearing 2000, Sherratt 2002, Maini 2004]. Le modèle le plus simple néglige les aspects biochimiques de la migration en supposant que les concentrations chimiques restent constantes et traduit la conservation du nombre de cellules : la variation du nombre de cellules en un point donné de la surface est égal au nombre de cellules ayant migré vers ce point plus le nombre de nouvelles cellules issues de la division. Cette relation est modélisée par une équation du type :

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D \times \nabla^2 n + s \times n \times \left(1 - \left(\frac{n}{n_0}\right)\right)$$

Où  $n$  est le nombre de cellules sur la surface considérée (soit la densité cellulaire),  $n_0$  sa valeur initiale,  $D$  un coefficient de diffusion et  $s$  un coefficient dépendant de la vitesse de prolifération. Le premier terme rend compte de la migration cellulaire, le second terme de la prolifération cellulaire, avec l'hypothèse importante que  $n=n_0$  signifie un épithélium au repos, sans migration interne et à confluence (les cellules excédentaires issues de divisions sont expulsées de l'épithélium).

Outre les limitations précédemment mentionnées, les simulations résultant de ce modèle ne rendent pas compte d'un phénomène observé expérimentalement : la cicatrisation commence par une période de latence, pendant laquelle les cellules migrent peu. De nombreuses améliorations ont été apportées à ce modèle pour tenir compte des facteurs initialement négligés. Ainsi, l'influence d'un signal biochimique sur la prolifération a par exemple été décrite en transformant l'équation précédente en :

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D \times \nabla^2 n + s(c) \times n \times \left(2 - \left(\frac{n}{n_0}\right) - k \times n\right)$$

La forme reste similaire à l'équation précédente, mais le coefficient de prolifération  $s$  est maintenant dépendant de la concentration locale en substance contrôlant la mitose, et un troisième terme rendant compte des cellules expulsées de la monocouche est ajouté ( $k$  est choisi tel que  $s(c_0) = k$ ). La concentration de la substance chimique est déterminée par l'équation suivante :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_c \times \nabla^2 c + f(n) - \lambda \times c$$

Où  $D_c$  est une constante de diffusion pour les substances chimiques produites par les cellules,  $f(n)$  une fonction déterminant la sécrétion de la substance par les cellules et  $\lambda$  un coefficient contrôlant sa dégradation naturelle. Au final, la résolution numérique de ces équations dans le cas d'une blessure circulaire montre la progression du bord indiquée sur la figure 30, dont l'allure est similaire aux données expérimentales et du même ordre de grandeur.

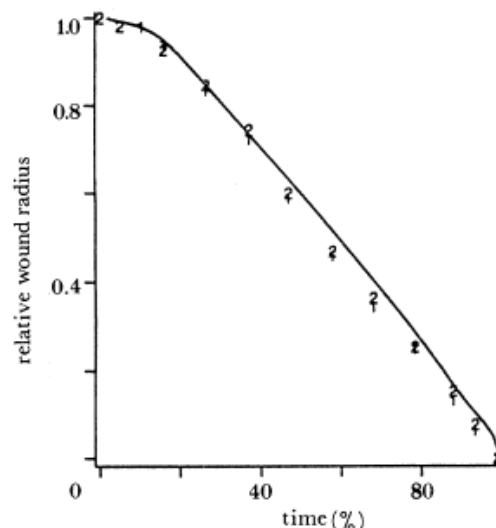


Figure 30 : Décroissance au cours du temps du rayon d'une blessure circulaire au sein d'un épithélium selon un modèle d'évolution de la densité cellulaire en présence d'un activateur de la prolifération cellulaire. [Models of epidermal wound healing Sherratt J. A., Murray J. D. Proc Biol Sci. **241** pp. 29-36 (1990)]

Le rôle des signaux chimiques est souvent traité comme un élément central à la modélisation du comportement des cellules. Plusieurs modèles ont donc été proposés pour rendre spécifiquement compte de la diffusion des substances



influençant la migration, tels que les facteurs de croissance ; citons un modèle discret établissant le déplacement par « marche aléatoire » des molécules entre la cellule émettrice et la cellule réceptrice (qui peuvent être confondues) [Shvartsman 2004] ou un modèle continu de diffusion chimique entre cellules voisines [Owen 1999].

Une autre modélisation de la migration consiste à adopter une approche statistique en considérant que le mouvement collectif résulte d'un ensemble de mouvements individuels des cellules [Callagham 2006, Khain 2007 Bindschadler 2007].

Dans le modèle de Kain *et al.* [2007], la modélisation suppose que les cellules sont incompressibles et disposées sur une grille, dont chacune des cases peut avoir deux « états » : occupée par une cellule ou vide. Lors d'une itération, chaque cellule peut migrer vers l'une des cases voisines choisie aléatoirement à condition que cette dernière soit vide (la case d'origine devient vide et la case de destination occupée), ou s'y dupliquer (les deux cases restent ou deviennent occupées). La probabilité de prolifération est nommée  $\alpha$ , tandis que la probabilité de migration (en cas de non prolifération) est définie par  $(1-\alpha)*(1-q)^n$  où  $q$  est un paramètre de migration et  $n$  le nombre de voisins (entre 1 et 4) de la cellule. Ce profil permet de rendre compte de l'adhésion cellulaire à travers le fait qu'une cellule présentant de nombreuses voisines migrera plus difficilement.

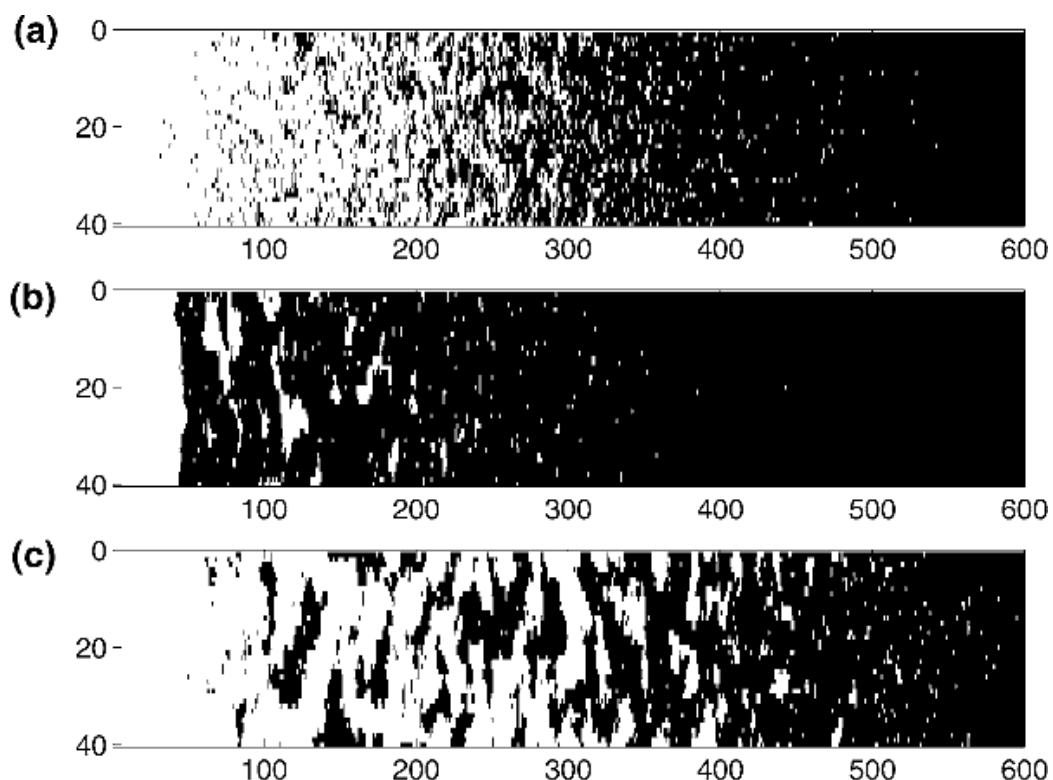


Figure 31 : Modélisation de l'évolution des cellules (points blancs) sur la surface vierge (points noirs), de gauche à droite, avec différents paramètres de départ. (a) Phase stable (adhésion « faible » et division « faible »,  $q = 0,7$  et  $\alpha = 3.10^{-4}$ ) (b) Phase instable (adhésion « forte » et division « faible »,  $q = 0,9$  et  $\alpha = 3.10^{-4}$ ), (c) Phase instable (adhésion « forte » et division « forte »,  $q = 0,9$  et  $\alpha = 7.10^{-4}$ ) [The role of cell-cell adhesion in wound healing Khain E., Sander L. M., Schneider-Mizell C. M. J. Stat. Phys. 128 pp. 209–218 (2007)].

Ce modèle est formellement équivalent au modèle statistique classique d'un champ de dipôles pouvant adopter deux états, « haut » (case occupée par une cellule) et « bas » (case vide), dans lequel le paramètre de migration  $q$  serait défini comme :  $q = \exp(-J/k_B \cdot T)$  (où  $J$  est la constante de couplage magnétique,  $k_B$  la constante de Boltzmann et  $T$  la température). Il permet notamment de rendre compte de l'influence de l'adhésion entre cellules (dont l'intensité peut être modulée par des concentrations chimiques locales) sur l'évolution de la monocouche. En effet, en fonction de la valeur de ce paramètre, deux comportements sont possibles. L'un est dit « stable », lorsque  $q$  est inférieur à une valeur critique  $q_c$  de l'ordre de 0,82 (autrement dit lorsque l'adhésion entre les cellules est faible). La distribution des cellules est alors relativement homogène, et l'évolution du « bord » suit une loi se rapprochant de  $\alpha^{1/2}$  au fur et à mesure que  $q$  se rapproche de 0. L'autre dit « instable », lorsque  $q$  est supérieur à  $q_c$ , et correspond à une situation dans laquelle des amas distincts peuvent se former.

Sur un principe similaire, Bindschadler *et al.* [2007] proposent un modèle continu, dans lequel les cellules se déplacent sur une surface bidimensionnelle avec une certaine durée de persistance  $\tau$ . Une cellule peut alors changer de direction lors de chaque itération  $\Delta t$  avec une probabilité de  $1 - \exp(-\Delta t/\tau)$ , à moins que cela ne la conduise à approcher une autre cellule en-deçà d'une distance limite nommée « distance incompressible ». La prolifération cellulaire est considérée dans ce modèle en permettant aux cellules de se diviser lorsque la densité cellulaire est suffisamment faible localement, autrement dit quand la cellule est suffisamment distante de ses plus proches voisins.

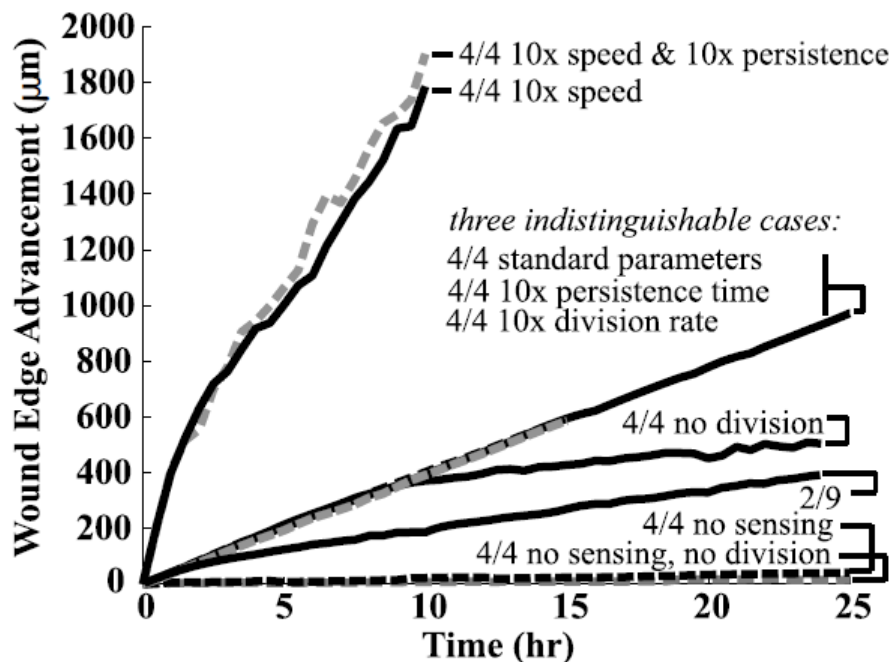


Figure 32 : Progression du bord d'un épithélium par modélisation du mouvement individuel des cellules [Sheet migration by wounded monolayers as an emergent property of single-cell dynamics Bindschadler M, McGrath J. L., *Journal of Cell Science* 120 pp. 876–884 (2007)]

Globalement, ces approches rendent compte de l'évolution du bord de l'épithélium au cours du temps avec une bonne adéquation avec les données expérimentales, et permettent d'obtenir un aperçu raisonnable de l'arrangement interne des cellules dans l'épithélium en tenant compte du fait que les cellules ne sont pas des objets ponctuels. Cependant, elles ne prennent pas en compte la diffusion éventuelle de substances chimiques favorisant la migration, et ne décrivent pas les détails spatiaux observés (forme du bord, champ de vitesse, champ de forces, etc.).

Une troisième approche repose sur une analyse des forces s'exerçant au niveau des cellules individuelles à travers l'adhésion cellule-substrat et l'adhésion cellule-cellule pour en déduire le mouvement collectif [Wolgemuth 2009]. Ce modèle propose de déterminer les vitesses et les orientations des cellules à l'aide de deux équations.

La première équation est déduite du fait que l'inertie du mouvement des cellules est négligeable et donc qu'à tout moment, la somme des forces exercées sur une cellule est nulle. Cinq forces sont alors considérées : la force de traction exercée par la cellule sur le substrat, la force de traction ou de poussée exercée sur les cellules situées à l'avant ou à l'arrière, la force « visqueuse » d'entraînement des cellules voisines, la force modélisant la rupture des adhésions à l'arrière de la cellule et enfin les forces de pression maintenant la densité cellulaire pour que l'épithélium reste cohésif. La seconde équation est inspirée de la physique des cristaux liquides, et gouverne la réorientation des cellules en fonction du temps.

Ce modèle permet de rendre compte tout particulièrement des corrélations temporelles et spatiales observées expérimentalement entre les vitesses des cellules, en se basant sur des paramètres pouvant pour la plupart être obtenus directement à partir de données expérimentales.

Enfin, une dernière approche plus macroscopique, faisant suite à des résultats expérimentaux obtenus dans notre équipe, a été proposée par Mark *et al.* [2009]. Elle consiste à identifier formellement l'épithélium à un liquide présentant une certaine tension de surface, autrement dit, dans un cas bidimensionnel, à donner une tension de surface au « contour » de l'épithélium. Cette tension superficielle, la migration aléatoire des cellules individuelles ainsi que les divisions cellulaires permettent d'établir des lois d'évolution du bord de l'épithélium, qui présente alors des irrégularités instables qui évoluent en digitations. Ces digitations peuvent à leur tour se déformer et donner naissance à de nouvelles digitations « comblant » les espaces entre digitations initiales (voir fig. 33), donnant lieu à un comportement global cyclique.

Ce modèle se distingue particulièrement par le fait qu'il rend compte de l'apparition des digitations lors de la cicatrisation, et modélise l'avancée de la bande sans donner un rôle prépondérant aux divisions cellulaires se produisant dans l'épithélium dans la progression de ce dernier, ce qui correspond à ce que nous observons expérimentalement. Néanmoins, ce modèle ne tient pas compte des facteurs chimiques et ne renseigne que l'allure du bord de l'épithélium, ne donnant pas d'informations sur le comportement des cellules à l'intérieur.

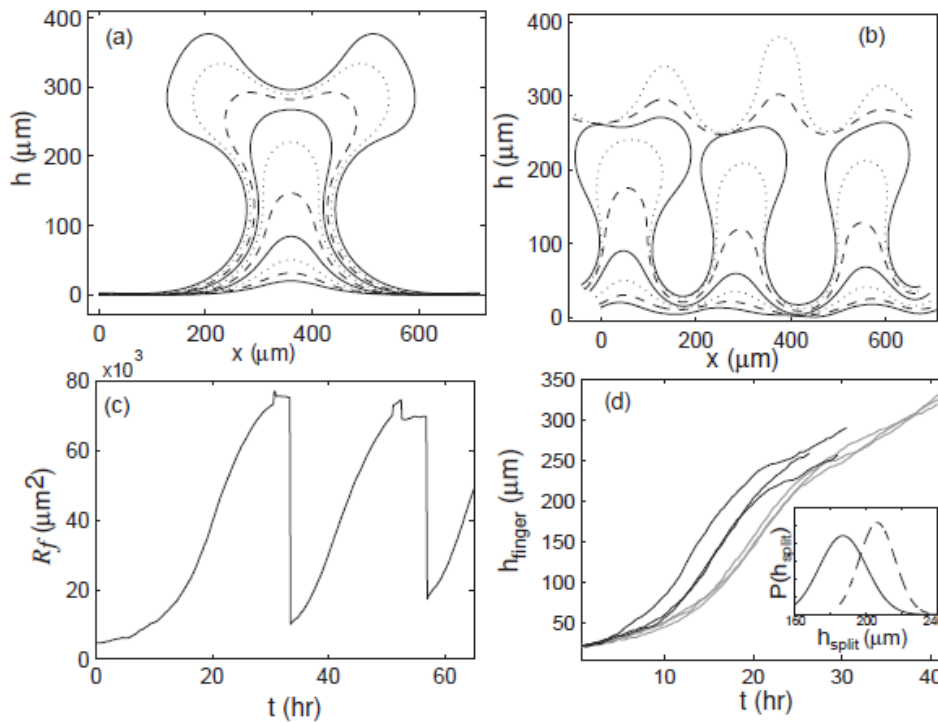


Figure 33 : (a, b) Évolution du bord d'un épithélium par modélisation d'une tension superficielle avec différents paramètres de base (c) Évolution du paramètre de rugosité (défini comme  $\langle (h - \langle h \rangle)^2 \rangle$  où  $h$  est la hauteur locale de la digitation) (d) Hauteur maximale des digitations au cours du temps [Mark 2009].

Pour conclure, de nombreux modèles théoriques ont été décrits pour simuler les comportements collectifs des cellules épithéliales lors de la cicatrisation. Ces modèles permettent chacun de retrouver certaines grandeurs ou observations expérimentales, mais présentent des lacunes propres ou ne tiennent pas toujours compte de phénomènes importants tels que la diffusion de facteur de croissance dans le milieu. Ces approches sont en effet conçues dans le but d'expliquer un phénomène ponctuel, et ne proposent pas de « vision d'ensemble » permettant de rendre compte de tous les paramètres expérimentaux. Le développement d'un modèle « unifié » passe donc par une meilleure compréhension de la migration collective d'un point de vue expérimental, et en particulier par l'identification des facteurs gouvernant réellement ce processus et ceux ne jouant qu'un rôle mineur.

#### 4. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons décrit les principaux constituants mécaniques de la cellule, et leur rôle dans le fonctionnement, l'adhésion ou la migration cellulaire. Cependant, les connaissances actuelles portent essentiellement sur la migration d'une cellule individuelle, hors d'un tissu cellulaire. Le comportement, et notamment la motilité collective, d'un groupe de cellules regroupées dans un épithélium présente de nombreuses spécificités et ne saurait se comparer à une somme de cellules migrantes individuelles : les jonctions cellulaires obligent ainsi les

cellules épithéliales à maintenir l'intégrité de l'épithélium lors de leur mouvement. Plusieurs mécanismes de migration collective ont été identifiés lors de différents processus biologiques : citons la transition épithéliale-mésenchymateuse, la cicatrisation par migration des cellules épithéliales limitrophes, ou encore la fermeture par « cordon de bourse ». Cependant, la nature des signaux déclencheurs et coordinateurs reste largement inconnue ; des expériences récentes ont toutefois montré que dans certains cas, la présence d'un bord libre suffisait à lui seul à déclencher la migration.

## Partie II

### Matériels et méthodes



Cette partie a pour but de détailler les méthodes expérimentales mises en œuvre dans nos expériences. Nous décrivons donc tout d'abord le principe de réalisation de blessures modèles non destructrices de cellules à l'aide de pochoirs en PMDS. Nous aborderons ensuite les aspects pratiques de la fabrication de ces pochoirs, ainsi que la préparation et l'exploitation des expériences de cicatrisation de cellules épithéliales proprement dites. Enfin, nous terminerons par une présentation du dispositif à base de microplots développé précédemment en collaboration avec l'équipe de B. Ladoux (MSC Paris 7), qui a été adapté pour nous permettre d'estimer les forces en présence dans l'épithélium.

## 1. *Principe des expériences en milieu modèle*

### 1.1 *Objectifs et enjeu des blessures modèles*

Classiquement, les expériences de cicatrisation d'un épithélium font appel à diverses techniques pour retirer un fragment de l'épithélium : le *scratch wounding* mécanique à l'aide d'un scalpel ou d'un cône de pipette, la photoablation [Tamada 2007], ou encore la destruction sélective de cellules grâce à un champ électrique [Keese 2004]. Ces méthodes ont toutefois pour défaut d'endommager le bord de l'épithélium : d'une part, en abîmant voire détruisant de nombreuses cellules situées autour de la blessure ainsi créée, et d'autre part, en traumatisant les cellules subsistant en périphérie de la blessure à travers la rupture brutale des jonctions adhérentes qu'elles formaient avec les cellules arrachées.

Ces perturbations modifient l'environnement cellulaire de trois manières différentes (voir partie I.3.3.1) : en libérant dans le milieu de culture les substances contenues dans les cytoplasmes des cellules abîmées, en modifiant la perméabilité des membranes plasmiques des cellules situées au bord de la blessure, et en réorganisant l'environnement mécanique de ces cellules (en faisant apparaître un « bord libre » non soumis à des contraintes). Il est alors difficile de déterminer le rôle de chacun de ces facteurs dans le déclenchement et le déroulement de la migration cellulaire conduisant à la cicatrisation de l'épithélium.

Notre approche a eu pour but de limiter au maximum l'influence des deux premiers pour évaluer le seul effet de « bord libre » sur la cicatrisation, afin d'étudier précisément si la seule absence de contraintes mécaniques au bord de l'épithélium était suffisante pour déclencher un processus de cicatrisation, ou si au contraire cela ne jouait qu'un rôle marginal. Pour cela, nous avons développé un dispositif à base de pochoirs dans lequel nous pouvons faire apparaître une blessure modèle dans un épithélium, ne présentant pas de dégradation des cellules dans sa périphérie. Le terme de blessure s'entend alors dans ce contexte comme un espace vierge de cellules au sein d'un épithélium homogène que celui-ci pourra progressivement coloniser, et non comme une lésion à réparer au sein de l'épithélium.



## 1.2 Principe de réalisation

La technique de réalisation de ces blessures modèles selon un procédé de masquage s'inspire d'expériences de croissance de cellules en présence d'obstacles [Tourovskaja 2003, Ostuni 2000, Folch 2000], telle que l'étude d'un épithélium cornéen présenté dans la partie I.3.3.2. Toutefois, à la différence de ces expériences, basées sur l'introduction de blocs d'agarose dans le milieu de culture, nous avons choisi de réaliser des pochoirs individuels en PDMS (polydiméthylsiloxane), un élastomère couramment utilisé en microfabrication, notamment dans la réalisation de canaux microfluidiques [McDonald 1999].

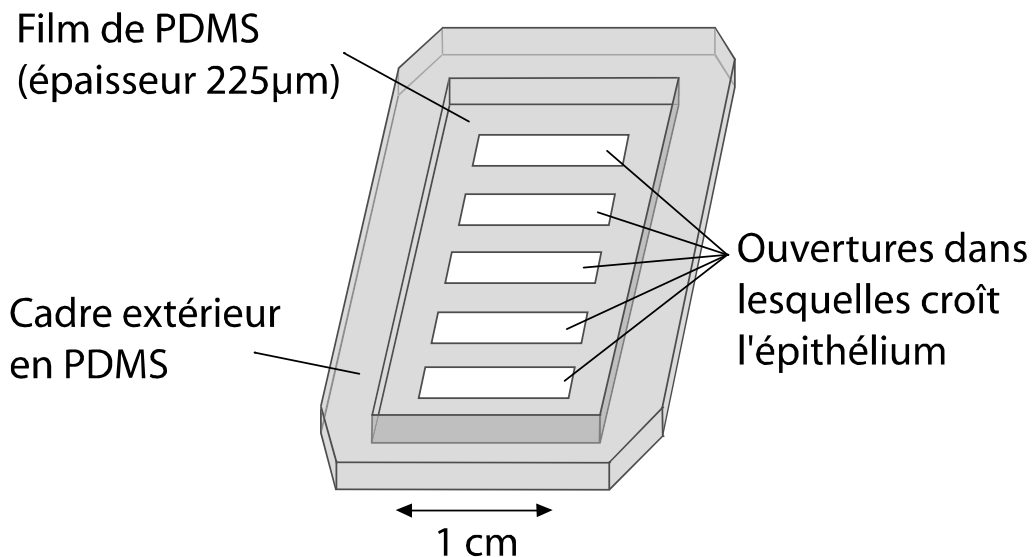


Figure 34: Schéma des pochoirs utilisés pour réaliser des bandes d'épithélium.

Schématiquement, un pochoir est constitué d'un film de PDMS présentant une série d'ouvertures de géométries et de dimensions soigneusement contrôlées – essentiellement sous forme de bandes lors de nos expériences. Posé au fond d'une boîte de pétri contenant des cellules épithéliales en suspension dans du milieu de culture, il empêche les cellules de se déposer sur les zones couvertes par le PDMS, celles-ci formant alors une couche de cellules localisée dans les ouvertures du film, épousant parfaitement leur géométrie

Il suffit alors de retirer ce pochoir ainsi que les cellules restant en suspension pour obtenir un épithélium de géométrie contrôlée avec une grande précision (pouvant même être inférieure à la taille d'une cellule), présentant des zones vierges équivalentes à des blessures normales, à l'exception du fait que les cellules les bordant restent intactes.

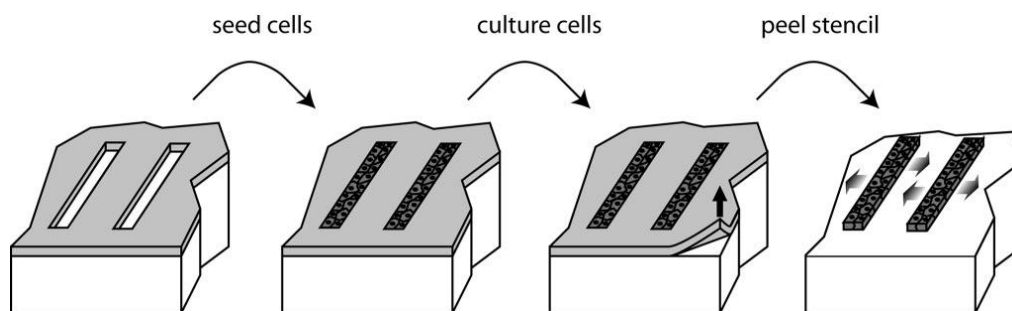


Figure 35 : Réalisation d'un épithélium de forme contrôlée grâce à un pochoir en PDMS.

Plusieurs raisons nous ont conduits à nous appuyer sur cette technique. Tout d'abord, l'utilisation de PDMS nous permet de réaliser un masque présentant une forme géométrique contrôlée avec une grande précision, avec des motifs d'une définition de l'ordre de la dizaine de microns. Nous avons pu ainsi réaliser des épithéliums sous forme de bandes soigneusement définies, puis évaluer l'impact de légers changements de géométrie sur le processus de cicatrisation (voir partie III.1.3) ; à l'avenir, cette même technique pourrait être utilisée pour réaliser des formes complexes (épithéliums circulaires, etc.)<sup>1</sup>.

Par ailleurs, d'un point de vue technique, le PDMS est un matériau solide et aisément manipulable, à la fois non toxique pour les cellules, et à la surface duquel les cellules adhèrent très mal. Cela empêche les cellules de croître sur l'épaisseur du pochoir (ce qui aurait conduit à un arrachage de cellules lors du retrait du pochoir), ainsi que l'apparition d'adhésions entre les cellules situées au bord du pochoir et le PDMS (dont la rupture soudaine modifierait les propriétés de ces cellules telles que leur perméabilité, phénomène que l'on souhaite éviter comme mentionné plus haut).

Enfin, l'ensemble du processus de fabrication est peu coûteux (à la fois en matériaux et en équipement) et peut être aisément réitéré à partir d'un moule de base avec une bonne reproductibilité, ce qui permet la réalisation de nombreuses expériences dans des conditions identiques. De plus, un seul pochoir peut présenter de nombreuses bandes, permettant d'effectuer une série d'expériences simultanément et donc d'obtenir une bonne statistique sur les mesures.

### 1.3 Aspects expérimentaux

Nous présenterons ici les principales observations expérimentales à l'issue de la réalisation de blessures modèles selon le procédé décrit ci-dessus ; les aspects techniques de la fabrication des pochoirs et de la préparation des expériences sont détaillés dans les parties suivantes.

<sup>1</sup> Certaines géométries ne sont toutefois pas réalisables directement par cette technique, par exemple une blessure circulaire au milieu d'un épithélium, car cela nécessiterait un film non connexe.

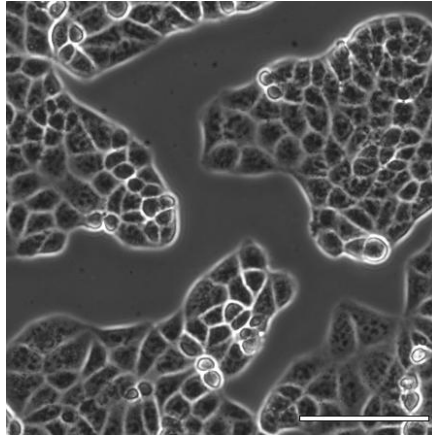


Figure 36 : Vue au microscope par contraste de phase de cellules MDCK en cours de formation d'un épithélium continu (échelle 200 $\mu$ m).

Les cellules épithéliales que nous avons utilisées pour réaliser les épithéliums sont de type MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), usuellement sauvages (*wild type*), ou modifiées de manière à exprimer des protéines marquées (type E-cadherin GFP) lors des expériences en fluorescence [Bellusci 1994]. Ces cellules immortalisées de forme pavimenteuse, archétype des cellules épithéliales, s'organisent spontanément en monocouche pour former un épithélium aisément discernable au microscope (fig. 36).

La géométrie « de référence » des pochoirs, sur laquelle nous nous sommes appuyés dans la plupart de nos expériences, est constituée d'une série d'ouvertures de forme rectangulaire, d'1 mm de large sur 5 mm de long, espacées d'1 mm l'une de l'autre. Après avoir cultivé nos cellules dans ce pochoir, celles-ci forment alors des bandes épousant parfaitement la forme de ces ouvertures : nous observons effectivement un épithélium, de densité constante (compris entre 4 et 6.10<sup>5</sup> cellules/cm<sup>2</sup> selon les conditions de réalisation de la bande), présentant une limite homogène et bien définie, au-delà de laquelle les cellules n'ont pas progressé (figure 37). Lors de l'utilisation de bandes non lisses (voir partie III.1.3.4), nous avons constaté que le front de cellules pouvait reproduire des motifs d'une taille caractéristique de l'ordre de la dizaine de microns, autrement dit de la taille d'une seule cellule.

L'impact du retrait du pochoir sur les cellules a été évalué à l'aide de Bleu de Trypan, un marqueur de cellules mortes. Moins de 5% des cellules situées au bord des blessures et aucune à l'intérieur de l'épithélium ont été marquées, ce qui montre que nous sommes effectivement dans une situation peu intrusive pour les cellules. L'évolution de l'épithélium pourra donc s'effectuer sous le seul effet de « bord libre » comme nous le souhaitons.

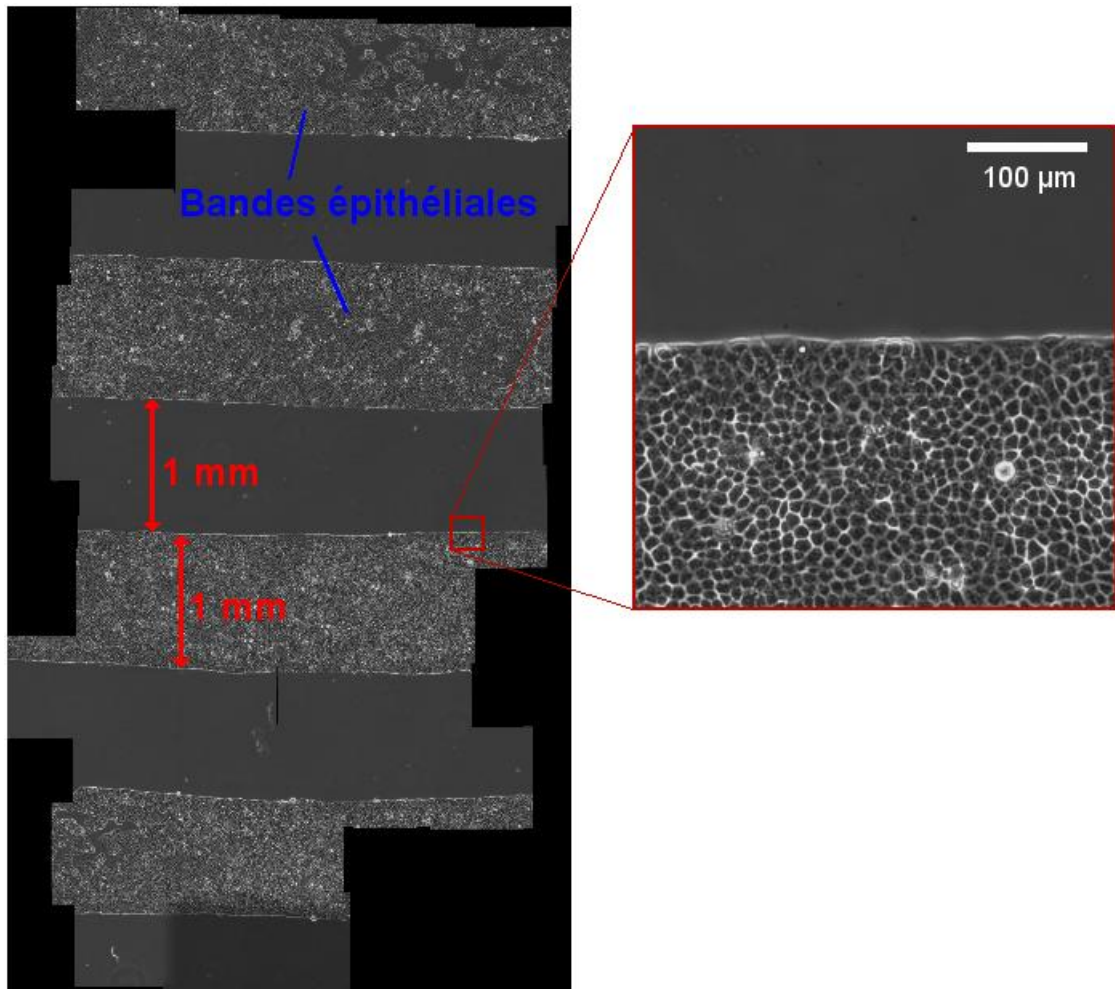


Figure 37 : Géométrie typique utilisée dans nos expériences de cicatrisation.

## 2. Mise en œuvre expérimentale

Nous allons décrire dans cette partie l'ensemble du processus de préparation et d'analyse des expériences de cicatrisation sur lequel nous nous sommes basés. Celui-ci peut être séparé en deux étapes principales : d'une part, la fabrication des pochoirs en salle blanche, qui fournit assez de pochoirs pour plusieurs expériences identiques, et d'autre part, la préparation proprement dite des blessures modèles et l'analyse du déroulement de la cicatrisation lors de chaque expérience.

### 2.1 Fabrication des pochoirs

La fabrication des pochoirs s'effectue en trois phases. Tout d'abord, nous réalisons un masque reproduisant la géométrie désirée pour le pochoir. Ce masque est ensuite utilisé pour recréer cette géométrie en résine photosensible sur une plaque de silicium. Enfin, du PDMS est moulé sur cette plaque pour former un film présentant les ouvertures souhaitées, lequel est ensuite collé à un cadre pour en assurer la solidité.

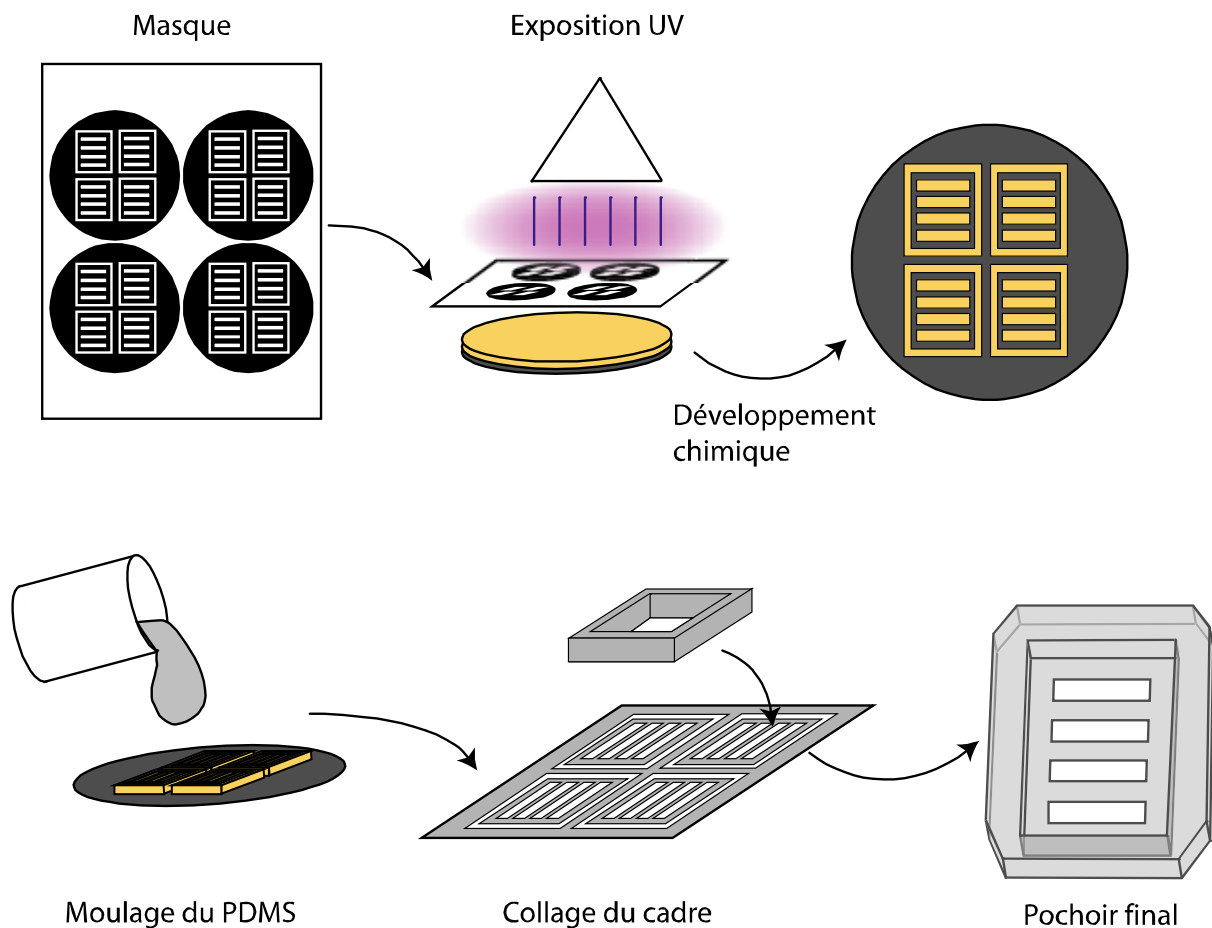


Figure 38: Schéma général de fabrication des pochoirs en trois phases : réalisation d'un masque, reproduction de la géométrie sur résine photosensible, moulage du film de PDMS sur les motifs en résine.

### 2.1.1 Préparation du masque

Le masque est tout d'abord dessiné par ordinateur, à l'aide du logiciel L-Edit v9.10, en reproduisant à l'échelle la géométrie souhaitée. Ce motif est ensuite imprimé sur un film plastique à l'aide d'une imprimante haute précision permettant la restitution de motifs dont la définition peut aller jusqu'à quelques microns par la société suisse Selba. Alternativement, pour une meilleure qualité de masque, l'impression peut également être faite sur une plaque de verre dont l'une des faces est chromée et recouverte d'une couche de résine positive.

### 2.1.2 Transfert sur disque de silicium

Par l'intermédiaire de ce masque, nous réalisons par photolithographie classique une plaquette de silicium recouverte d'une couche de résine d'épaisseur contrôlée

présentant la géométrie recherchée. Cette étape, ainsi que le moulage du PDMS, ont lieu dans la salle blanche de l'équipe à l'Institut Curie.

Le choix de l'épaisseur de la résine déposée, qui sera également celle du film de PDMS dans le pochoir, répond à deux contraintes. D'un côté, l'épaisseur de PDMS conditionne la solidité du pochoir lors du décollement, et donc une plus grande épaisseur permet la réalisation de motifs mieux définis, par exemple des bandes plus larges. De l'autre côté, augmenter l'épaisseur présente deux inconvénients. Tout d'abord, si les bandes de PDMS sont trop épaisses, il est possible que le milieu ne diffuse pas correctement dans les plus petits motifs : les cellules pourraient se retrouver au fond d'une « cuvette » bien plus profonde que large, dans laquelle le milieu se renouvelle difficilement, ce qui gêne alors la survie et la croissance cellulaire. Ce n'est généralement pas problématique dans nos expériences étant donnée la largeur de nos bandes (plusieurs centaines de micromètres à un millimètre), mais peut avoir une influence lorsque des bandes présentant des petits détails sont utilisées. Mais surtout, une épaisseur importante augmente les inhomogénéités de la surface de la résine : or, il est essentiel que celle-ci soit la plus uniforme possible, afin que, lors de l'ajout de PDMS (voir partie 2.1.3), le contact avec le film plastique ne présente pas de défaut, ce qui risquerait de permettre au PDMS de s'infiltrer et donc de former un mince film obstruant les trous destinés à accueillir les cellules.

Tenant compte de ces limitations, nous avons choisi après plusieurs essais une épaisseur de 225  $\mu\text{m}$  pour l'essentiel de nos expériences.

### 2.1.3 Moulage du PDMS

Cette étape est la plus critique en termes de risques d'apparition de défauts (moulage incomplet, infiltration de PDMS...) ou de rupture, même si le « doigté » permet, avec le temps, de réaliser proprement les pochoirs pratiquement sans perte et avec une bonne reproductivité.

Deux protocoles différents ont été utilisés pour mouler et décoller le PDMS de la plaquette de silicium couverte de résine.

La première technique, la plus directe, consiste à « écraser » le PDMS, de façon à l'expulser de la surface de la résine. Pour cela, nous coulons tout d'abord quelques grammes de PDMS sur le moule en résine, que nous recouvrons ensuite d'une feuille de plastique (type polyéthylène téréphtalate – PET) en pressant légèrement de sorte que l'épaisseur du PDMS recouvrant la résine soit la plus faible possible. L'ensemble est ensuite inséré en « sandwich » entre deux fines couches de film de PDMS déjà réticulé (pour limiter les risques de casse de la plaquette de silicium), puis compressé entre deux plaques de métal à l'aide de 4 vis de serrage, et laissé à réticuler à 65°C pendant 48h.

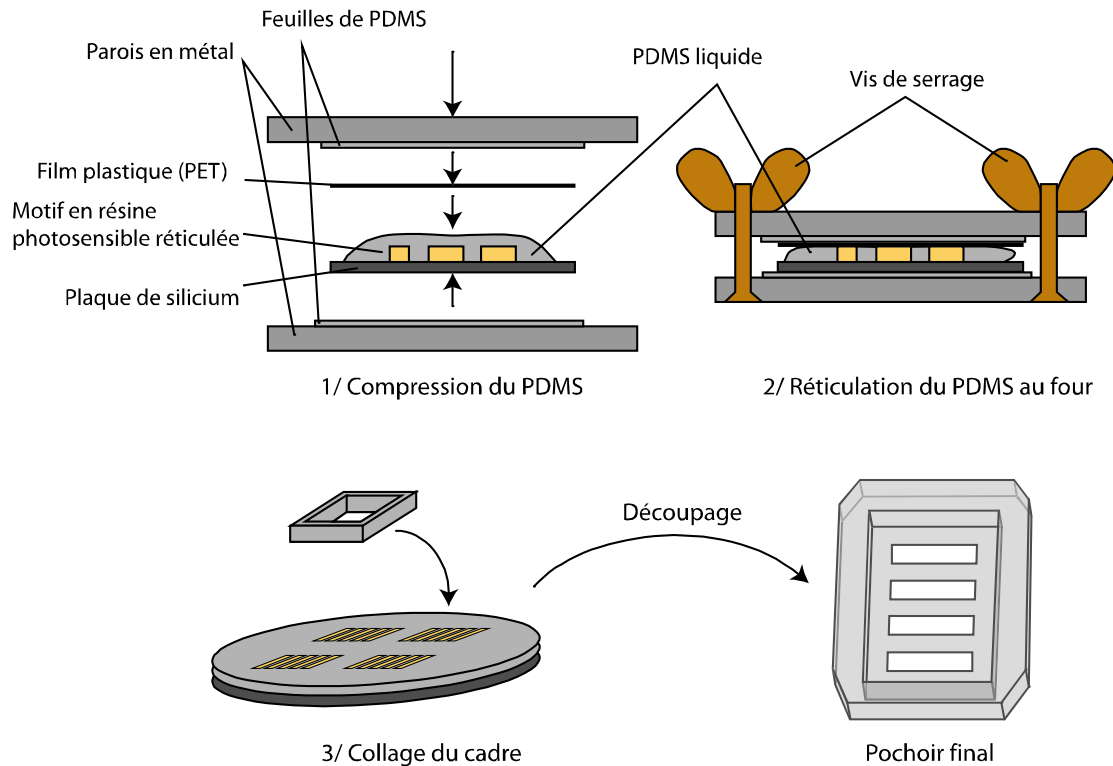


Figure 39: Schéma du premier protocole de réalisation du film de PDMS par compression de PDMS sur la plaque en silicium présentant les motifs en résine photosensible.

A l'issue de cette cuisson, les vis, les plaques de métal et le film plastique sont retirés. Le PDMS a normalement été expulsé hors des zones où la résine était présente, et forme ainsi un négatif du motif en résine. Des petits cadres en PDMS sont collés au pochoir (à l'aide d'un peu de PDMS non réticulé laissé dans le four pendant 24h supplémentaires) afin de permettre de retirer le pochoir et de le séparer en compartiments sans le déchirer.

Cette première technique présente deux inconvénients. D'abord, les moules en résine se brisent facilement à cause de la pression, ce qui oblige à renouveler régulièrement la longue étape de microlithographie. Mais surtout, il n'est pas rare que le PDMS ne soit pas entièrement expulsé des zones où se trouve la résine malgré la pression, laissant ainsi un mince film là où devraient se trouver les trous du pochoir entre les bandes, ce qui le rend totalement inutilisable. Nous avons donc par la suite adopté une autre technique de fabrication, par infiltration du PDMS sous le moule.

Ce procédé consiste à créer un contre-moule puis un moule en PDMS (et non en résine). Le contre-moule est fabriqué en coulant environ 5mm de PDMS sur la plaquette de silicium portant la résine, et en découpant le bloc de PDMS après réticulation pendant 24h dans le four. Ce bloc est ensuite traité au fluorosilane pour rendre sa surface non adhésive. Le moule en PDMS est fabriqué de la même manière, en coulant le PDMS sur le contre-moule et non sur la plaquette de silicium, en le perçant toutefois de chaque côté des bandes avant de le silaniser pour permettre l'injection du PDMS.

Le pochoir lui-même est réalisé en posant ce moule sur un film plastique en PET propre, et en laissant du PDMS non réticulé pénétrer par capillarité pendant 3 à 4h dans les trous du moule. L'ensemble est mis au four pendant 48h, puis le film de plastique est retiré et un cadre collé au pochoir comme précédemment.

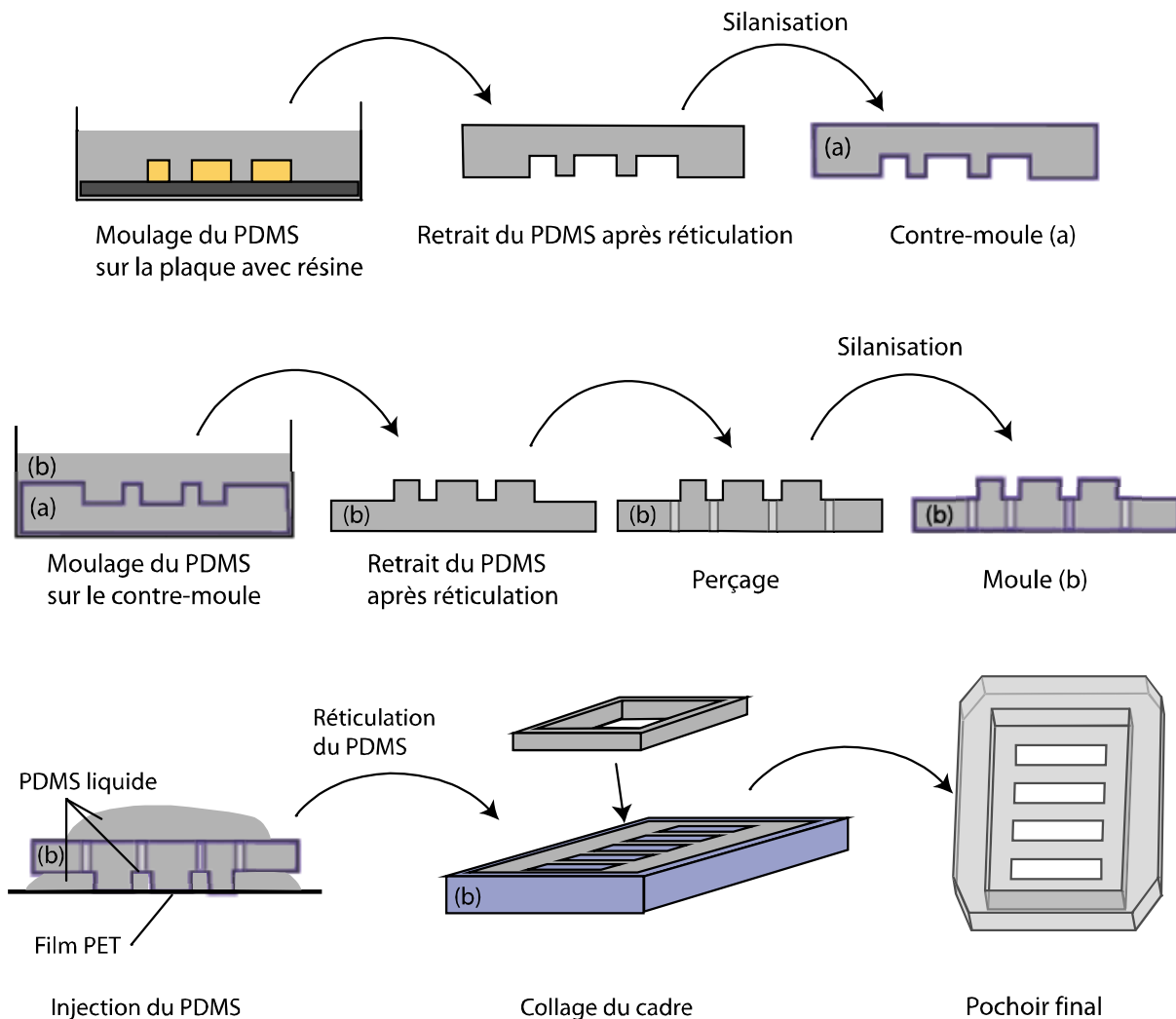


Figure 40: Schéma du second protocole de réalisation du film de PDMS par réalisation de moules

Cette seconde technique, qui nécessite de préparer deux moules intermédiaires en PDMS silanisé, permet de gagner du temps lorsque de nombreux pochoirs identiques sont réalisés, les pochoirs étant beaucoup plus rarement « bouchés » et les moules en PDMS ne se cassant pas. Toutefois, ceux-ci doivent être renouvelés (à partir du contre-moule en PDMS) au bout de 5 à 10 moulages, la silanisation ayant tendance à s'estomper, ce qui gêne le décollage du pochoir.

Dans les deux cas, nous obtenons au final un film de PDMS d'environ  $200\mu\text{m}$  d'épaisseur, percé d'ouvertures reproduisant parfaitement les motifs en relief de la plaque de silicium. Des cadres de quelques millimètres d'épaisseur présentant une ouverture rectangulaire de 5mm sur 1cm sont ensuite collés à l'aide de PDMS sur ce film, afin de former les pochoirs individuels proprement dits. Ces cadres ont deux fonctions principales : d'une part faciliter la manipulation des pochoirs en limitant le



risque de déchirement, d'autre part créer une petite cavité dans laquelle nous pourrions déposer le milieu contenant les cellules épithéliales.

## 2.2 Culture des cellules sur les pochoirs

Nous allons présenter ici les protocoles que nous avons employés pour préparer les blessures modèles. La culture et l'entretien des cellules, qui ne présentent pas de différences majeures avec les techniques couramment utilisées en biologie cellulaire seront abordés rapidement, avant de détailler plus spécifiquement les aspects plus spécifiques à nos expériences de préparation des épithéliums dans les pochoirs.

### 2.2.1 Entretien des cellules

Ces cellules sont usuellement conservées dans un flacon de milieu de culture<sup>1</sup> à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> et saturé en humidité, et sont passées 2 à 3 fois par semaine lorsqu'elles atteignent la confluence dans leur boîte de culture. Le milieu est alors jeté, et les cellules sont détachées à l'aide de trypsine ; environ 1/40<sup>e</sup> des cellules sont alors redispersées dans un nouveau flacon contenant du milieu neuf jusqu'au passage suivant.

Au bout d'environ 40 passages, de nouvelles cellules sont décongelées pour éviter les trop grands biais de sélection.

### 2.2.2 Préparation d'un épithélium dans un pochoir

Pour réaliser un épithélium présentant des « blessures » de la géométrie choisie, nous cultivons des cellules dans une boîte de pétri en polystyrène portant un pochoir au fond, qui empêchera l'épithélium de croître dans les zones recouvertes par le PDMS.

La principale difficulté rencontrée lors de la préparation consiste à maintenir une certaine adhésion entre le pochoir en PDMS et la boîte de pétri. En effet, le PDMS étant moins dense que l'eau, le pochoir ne peut être placé dans une boîte contenant déjà du milieu de culture, sous peine de le voir se détacher et remonter à la surface. S'il est possible de résoudre ce problème dans la majorité des cas en déposant le pochoir sur la boîte de pétri sèche et en rajoutant le milieu par la suite, il arrive alors fréquemment que des bulles d'air se forment dans les « trous » du pochoir, voire couvrent tout l'espace inter-bande sur lequel les cellules sont censées se déposer. Il faut alors « retirer » délicatement les bulles à l'aide d'une pince à bout fin, sans toucher le fond de la boîte de pétri pour ne pas l'abîmer (ce qui aurait une influence certaine sur la cicatrisation). Ces problèmes d'adhésion empêchent d'utiliser ces

---

<sup>1</sup> *Dulbecco's modified Eagle's medium* (Gibco) avec 10% de *Fetal Bovine Serum* (Sigma), 2mM de L-glutamine (Gibco) et 1% de solution d'antibiotique – pénicilline à 10000 unités/mL et streptomycine à 10mg/mL (Gibco).

pochoirs sur des substrats hydratés (tels qu'un gel de polyacrylamide), le pochoir se décollant lors de l'ajout de milieu.

Les cellules sont prélevées dans une boîte de culture à confluence, en les traitant à la trypsine comme lors d'un passage normal, puis en les redispersant dans 2mL de milieu de culture. Une goutte de cette solution est déposée dans la cavité formée par le cadre du pochoir posé sur la boîte de pétri, puis laissée à l'incubateur afin que les cellules se déposent et commencent à adhérer au fond de la boîte de pétri. Au bout de 30 à 40 minutes, la boîte est sortie de l'incubateur et le milieu est retiré et remplacé deux fois par environ 5mL de milieu neuf (désormais non limité à la seule cavité du pochoir), afin d'éliminer les cellules toujours en suspension. Afin de ne pas introduire d'inhomogénéités dans la monocouche, le milieu est ajouté à l'extérieur du pochoir, afin que les flux ne détachent pas les cellules adhérant au fond.

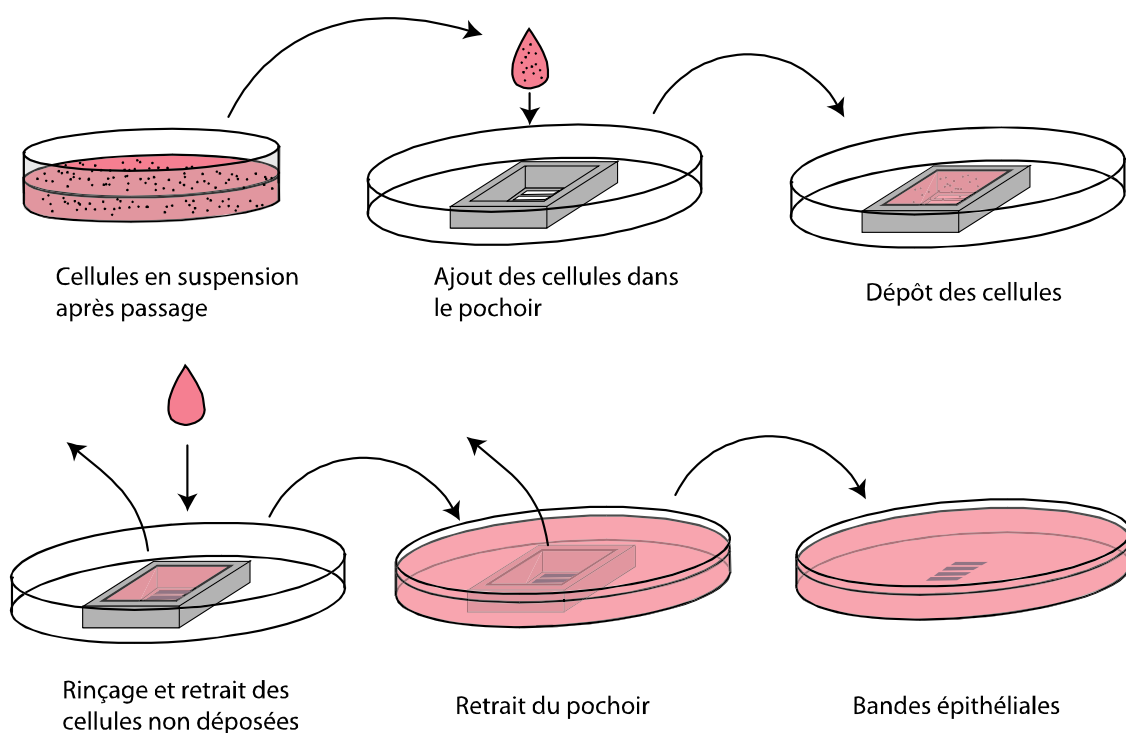


Figure 41: Réalisation des bandes épithéliales par dépôt de cellules sur un pochoir

Ce protocole en deux étapes est utilisé au lieu d'ajouter en une seule fois la quantité finale de cellules souhaitée dans le pochoir afin d'améliorer le contrôle de l'homogénéité de la monocouche et la reproductibilité des expériences. Ainsi, remplir directement la boîte contenant le pochoir avec les cellules et 5mL de milieu conduit à une trop grande dilution des cellules, ce qui oblige à attendre la confluence plusieurs jours, et surtout, crée des inhomogénéités dans la bande. Il est possible de modifier la densité moyenne de la bande en jouant sur la concentration initiale et la durée de sédimentation des cellules dans l'incubateur, la dilution tendant à créer des bandes initiales moins denses et une durée de sédimentation plus longue des cellules, des bandes plus denses. Cependant, nous ne sommes pas parvenus à réaliser de manière satisfaisante des bandes de densité inférieure à  $4.10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>, l'épithélium gardant des trous plutôt que de descendre en-dessous de cette densité moyenne ; de la même manière, nous n'avons pas pu dépasser  $6.10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>,

l'épithélium commençant à « expulser » des cellules au-dessus de la monocouche au-delà de cette densité.

La boîte est laissée dans l'incubateur pendant 12 à 24h, en vérifiant régulièrement si les cellules sont à confluence dans cet intervalle. À l'issue de cette période, les pochoirs en PDMS sont retirés le plus délicatement possible, et le milieu rincé deux fois pour retirer les cellules en suspension (celles s'étant initialement déposées sans réellement adhérer sur le PDMS, notamment).

## 2.3 *Observation de l'évolution de l'épithélium*

### 2.3.1 *Dispositif d'acquisition*

Les boîtes de pétri dans lesquelles se trouvent les épithéliums à observer sont placées sur un microscope inversé Olympus dans une enceinte thermostatée à 37°C et régulée en CO<sub>2</sub> et en humidité (5% CO<sub>2</sub>, 95% humidité relative). Afin de permettre l'observation de plusieurs positions (voire de plusieurs puits), et de corriger les déviations de focalisation le microscope est équipé d'une platine motorisée dans les trois dimensions. Les images des cellules dans le microscope sont enregistrées numériquement au moyen d'une caméra Retiga 4000R (QImaging) reliée à un ordinateur. Le contrôle de cette caméra ainsi que de la platine motorisée sont assurés à l'aide du logiciel Metamorph 7.1.7.0 (Molecular Devices).

Nous avons généralement utilisé un objectif présentant un grossissement de 20X, offrant un bon compromis entre définition et taille du champ d'observation. Les observations globales de la monocouche ont été réalisées avec un objectif 10X (ce qui rend difficile le discernement des cellules individuelles, mais permet un plus large champ, et donc un nombre d'images moindre à traiter ensuite), tandis que d'autres observations plus fines de la forme et de la structure des cellules ont été effectuées avec un objectif 40X.

Les acquisitions sont effectuées à intervalles réguliers, 30 minutes généralement, 15 minutes pour les observations plus fines. Chaque acquisition s'effectue sur l'ensemble des positions enregistrées, choisies de telle sorte que les champs se recouvrent légèrement afin de pouvoir reconstruire les images complètes par la suite.

## 2.4 *Analyse des images*

Le traitement des images est effectué à l'aide du logiciel libre ImageJ v.1.40 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), qui permet le développement de nombreux *plug-ins* dont plusieurs ont été d'une grande aide dans ces travaux.

La pile d'images (de l'ordre de 10 Go pour une expérience comportant 50 positions acquises pendant 48 heures) est prétraité afin de créer des fichiers uniques contenant l'ensemble du film retraçant chacun l'évolution temporelle d'un fragment

de l'épithélium. Ces fichiers sont ensuite éventuellement rassemblés en fonction de la position qu'ils décrivent afin de recréer l'image complète de l'épithélium (et son évolution) à l'aide du *plug-in MosaicJ*.

La progression de l'épithélium est évaluée indirectement en mesurant tout d'abord sur les images la surface vide, sans cellules : cette zone est aisément détectable automatiquement car homogène et de grande taille. Cette valeur est ensuite soustraite à la taille totale de l'image pour obtenir la surface occupée par les cellules. La progression « moyenne » est alors définie comme l'évolution de cette surface divisée par la largeur (fixe) de la partie de la bande observée. Cette méthode est utilisée plutôt qu'une mesure directe du bord de l'épithélium en raison de la relative facilité à automatiser le processus grâce à l'homogénéité de la teinte de la zone centrale.

Les flux internes dans l'épithélium sont analysés à l'aide d'une technique issue de la physique des fluides nommée *particle image velocimetry* (PIV). Elle consiste à utiliser l'image d'un épithélium, sur laquelle on définit une « grille » de pas de l'ordre de (ou légèrement inférieur) la taille d'une cellule. Un programme analyse la corrélation entre cette image et l'image suivante dans le temps, et permet d'identifier, pour chaque unité élémentaire, la position correspondant à la zone présentant la plus forte corrélation sur l'image suivante. Il est alors possible de définir un vecteur déplacement entre la position initiale et cette nouvelle position, et donc de cartographier la réorganisation interne dans l'épithélium. L'image présentée ici a été obtenue avec l'aide précieuse de Laurence Petitjean, en thèse sur le sujet dans l'équipe.

Les mesures concernant les cellules individuelles, telles que leur taille ou leur orientation, sont effectuées en dessinant manuellement le contour des cellules, puis en effectuant une correction automatique (par exemple pour « refermer » les contours mal achevés). Malgré nos efforts, nous ne sommes pas parvenus à automatiser entièrement ce processus de détection des bords des cellules, à cause des différences de contraste au sein de l'image et de la difficulté à discerner certains bords de cellules (alors que manuellement, il est possible de vérifier sur l'image suivante du stack si l'on observe bien deux cellules distinctes ou une cellule présentant un fort contraste interne) ; nos tentatives de marquer en fluorescence les cadhérines des cellules afin d'obtenir directement les contours des cellules n'ont pas non plus donné de résultats satisfaisants.

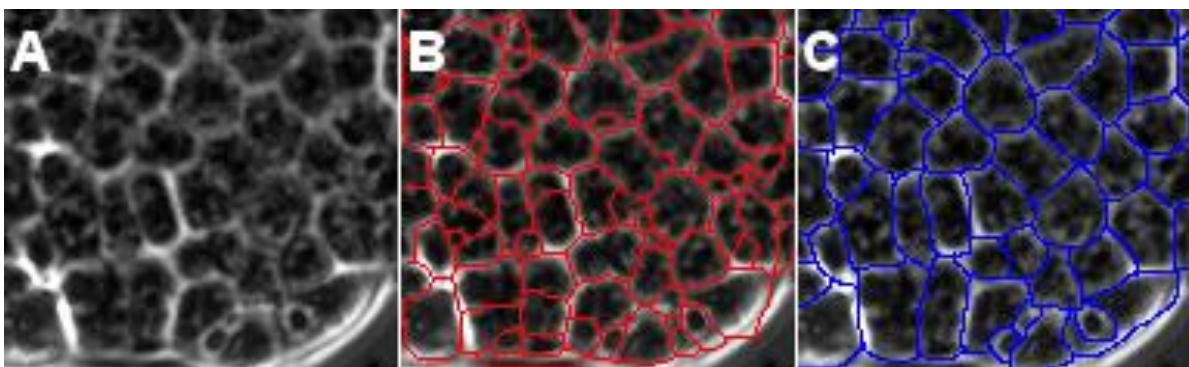


Figure 42: Détection des bords des cellules sur une image d'épithélium (A) : la détection automatique (B) présente des différences notables avec les bords réels des cellules (C).

L'automatisation de ce processus de détection est toutefois toujours à l'étude par Maxime Deforet, doctorant dans l'équipe. Une méthode basée sur les algorithmes de « ligne de partage des eaux » (*watershed*) dans laquelle les « altitudes » sont représentées par les niveaux de gris présente des résultats beaucoup plus fiables que celles qui avaient été envisagées jusque-là.

Les contours des cellules sont analysés à l'aide des outils intégrés d'ImageJ, qui renvoient les paramètres tels que la surface, la position ou l'orientation de chaque cellule. Si la définition des autres paramètres est intuitive, la méthode de calcul de l'orientation mérite d'être définie un peu plus précisément. Pour chaque particule détectée, ImageJ en détecte le contour, et le décompose en une série de composants harmoniques, selon un algorithme décrit par Cramer [1945] – de manière globalement similaire à un signal décomposé en série de Fourier. La première harmonique est ainsi un cercle de surface égale à la particule, et la seconde une ellipse, qualifiée de « best-fit ellipse ». L'angle entre le grand axe de cette ellipse et un axe horizontal de l'image (choisi parallèle aux bandes dans nos expériences) est alors défini comme l'orientation de la cellule – une cellule étirée dans le sens de la bande aura une orientation proche de  $0^\circ$ , une cellule étirée dans une direction perpendiculaire à la bande (ou parallèle à une digitation) aura une orientation proche de  $90^\circ$ .

La trajectoire des cellules remarquables est mesurée en marquant manuellement le centre de ces cellules d'une couleur donnée, puis en utilisant les plug-ins de *particle tracking* d'ImageJ pour déterminer les paramètres (position, vitesse, direction, etc.) de la « trajectoire » de ces points colorés. Là encore, une intervention manuelle a été préférée en raison de la difficulté des méthodes automatiques à détecter correctement les contours (et donc la position) de la cellule visée.

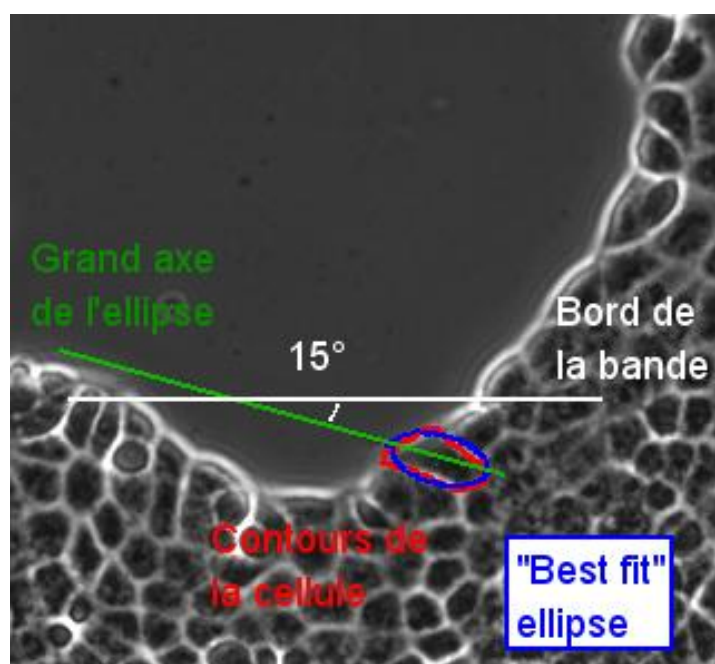


Figure 43 : Définition de l'orientation des cellules.

Enfin, les divisions cellulaires ont été traitées manuellement, en traçant sur chaque image un trait d'une couleur donnée reliant le centre de chacune des cellules-filles. L'analyse est alors effectuée sur cette image traitée afin d'extraire le nombre, la répartition ou encore l'orientation des divisions. L'orientation des divisions a été définie comme l'angle entre la droite reliant les noyaux des cellules-filles et une droite reliant un point à mi-chemin entre les centres des deux cellules-filles au centre de la cellule leader à l'extrémité de la digitation (fig. 44). Lorsque nous avons représenté ces orientations sur un graphe (fig. 88), nous avons toutefois décalé les angles de  $90^\circ$  afin que la comparaison soit facile avec les autres graphes (en donnant à une division parallèle à la bande à la base d'une digitation parfaitement verticale un angle de  $90^\circ$  et non  $0^\circ$ ).

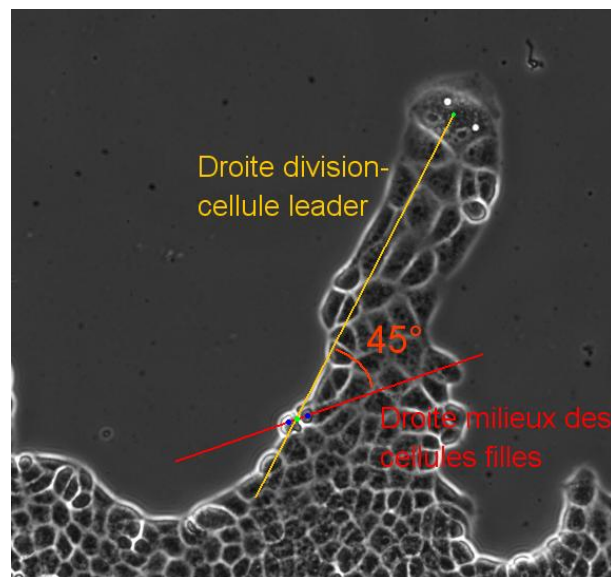


Figure 44 : Définition de l'orientation d'une division cellulaire.

Nous avons choisi cette méthode de mesure plutôt que celle décrite pour mesurer l'orientation des cellules dans la bande en raison du comportement assez particulier des divisions dans les cellules : nous tenons alors réellement compte de la variation d'orientation qui pourrait être due à la cellule leader. Si les angles donnés par les deux méthodes sont pratiquement identiques dans le cas d'une division proche de la base ou au milieu de la digitation, il peut exister un écart de plus de  $20^\circ$  entre les deux méthodes pour une cellule sur le bord et à l'avant de la digitation.

### 3. Croissance de cellules sur microplots

Nous avons tenté au cours de nos travaux de cartographier les forces exercées par les cellules de l'épithélium sur le substrat – et indirectement les forces intercellulaires – à l'aide de microplots en PDMS selon la technique développée en collaboration avec le groupe de Benoît Ladoux à l'université de Paris 7 [Du Roure 2005]. L'adaptation de cette technique à nos expériences a présenté plusieurs obstacles expérimentaux que nous allons décrire plus loin.

### 3.1 Principe

Comme nous l'avons vu dans la partie 1.2, la migration des cellules épithéliales s'effectue en interagissant avec la surface, par l'intermédiaire de pseudopodes notamment. En se contractant, ces pseudopodes « tirent » la cellule, et lui permettent de se déplacer petit à petit.

En plaçant les cellules sur un tapis de microplots de quelques micromètres de diamètre, celles-ci exerceront donc une force sur les microplots, qui les fléchira légèrement dans la direction opposée à la direction de migration de la cellule. [Tan 2003, Du Roure 2005]

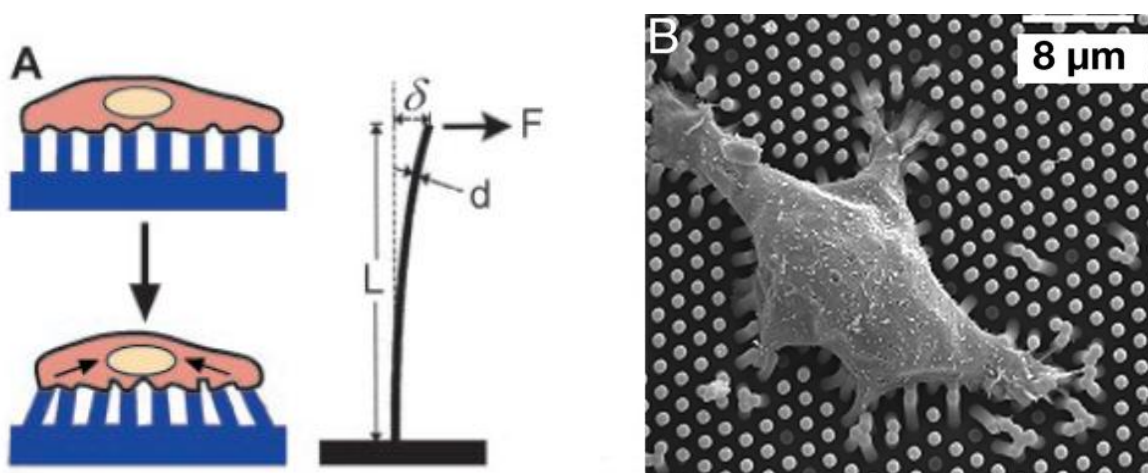


Figure 45 : (A) Flexion de plots sous l'effet des forces exercées par une cellule sur le substrat [Tan 2003]. (B) Image microscope d'une cellule sur un tapis de microplots [Du Roure 2005].

Or, le déplacement de l'extrémité d'un microplot peut être rapporté à la force exercée par la cellule sur celui-ci, selon la formule :

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

où F est la force exercée sur le plot, E le module d'Young du PDMS (2MPa, Saez 2006), r le rayon du plot, L la longueur du microplot et  $\Delta x$  le déplacement de l'extrémité du plot.

En cartographiant la position des plots au cours du temps, il est donc possible de mesurer les forces exercées par les cellules à chaque endroit de la surface, et, indirectement, d'estimer à partir de l'écart entre les forces exercées par une cellule et celles exercées par ses voisines, les forces exercées par cette cellule sur ces voisines.

### 3.2 Dispositif expérimental

La fabrication des microplots est basée sur le moulage de PDMS sur un disque de silicium gravé [Saez 2006, Du Roure 2005] ; nous ne redétaillerons ici que les aspects spécifiques aux expériences que nous avons menées.

Après plusieurs essais, la géométrie qui nous a paru la plus adaptée consistait en des microplots de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre, séparés de 2  $\mu\text{m}$  centre à centre et de 2,8  $\mu\text{m}$  de haut. Ce choix résulte d'un équilibre entre la sensibilité des microplots (dépendant de leur longueur et de leur diamètre) et la fraction de la surface accessible aux cellules (diamètre plus grand et distance centre à centre plus faible).

La principale difficulté rencontrée a consisté à faire adhérer le pochoir aux microplots. Dans nos expériences précédentes, les pochoirs étaient simplement déposés sur la surface sèche de la boîte de culture, ce qui suffisait à les faire adhérer. Or, ici, le tapis de microplots doit être maintenu humide, sous peine de voir les microplots adhérer latéralement entre eux, ce qui empêche le pochoir d'adhérer convenablement, et le fait remonter à la surface lorsque du milieu est ajouté. Malgré plusieurs essais de techniques pour maintenir le pochoir fermement accolé au tapis de microplots couvert de milieu de culture, nous ne sommes pas parvenus à aboutir à un protocole permettant de garantir que le pochoir ne se décollera pas ou que des cellules ne s'infiltreront pas en-dessous des bandes de PDMS. Néanmoins, en séchant soigneusement certaines zones du tapis, et en évitant tout mouvement intempestif du pochoir une fois celui-ci déposé sur les microplots, nous avons réussi à préparer plusieurs supports satisfaisants pour nos expériences.

L'ajout des cellules s'effectue d'une manière similaire à celle utilisée précédemment. L'observation à travers les microplots étant difficile avec le microscope inversé utilisé dans les autres expériences, nous avons utilisé ici un microscope droit, dépourvu d'enceinte régulée en  $\text{CO}_2$  ; les puits de culture étaient alors tamponnés avec de l'HEPES et couverts d'une fine couche d'huile pour limiter les échanges gazeux avec l'extérieur.

Pour éviter les risques de décollement du pochoir lorsqu'il est entièrement immergé, nous n'avons ajouté de milieu qu'à l'intérieur de la cavité formée par le pochoir – ce qui implique un renouvellement régulier de ce milieu, celui-ci étant en quantité insuffisante pour permettre aux cellules de subsister convenablement pendant plus de quelques heures.

La croissance des cellules et la formation d'un épithélium à la surface des microplots est comparable qualitativement à ce qui est observé dans les expériences ordinaires, avec toutefois un délai nettement plus long (de l'ordre de 36h voire 48h, contre 12 à 24h). Cette différence peut être attribuée à plusieurs phénomènes : d'une part, une quantité de cellules effectivement déposée plus faible (les cellules adhèrent plus difficilement aux microplots, elles se détachent plus facilement lors du premier « rinçage »), d'autre part une croissance plus difficile à cause de la quantité limitée de milieu, et enfin une progression plus lente sur les microplots à cause de l'adhésion plus difficile.



Lorsque les cellules forment des bandes proches de la confluence, le pochoir est retiré comme précédemment, et l'évolution des cellules est observée au microscope comme précédemment. En l'absence de moteur contrôlable par l'ordinateur sur l'axe Z, nous nous sommes limités à un seul champ en profondeur, dont le focus est effectué sur l'extrémité des microplots. Les cellules épithéliales à la surface et le réseau de microplots diffractant la lumière ont toutefois gêné la netteté de l'image.

Les images des microplots ont été traitées automatiquement afin d'extraire les déformations des plots et donc les forces exercées par les cellules sur le substrat.

## Partie III

### Résultats et discussions



Grâce aux pochoirs décrits dans la partie précédente, nous avons pu étudier la cicatrisation d'une monocouche ne présentant pas un bord endommagé, et ainsi quantifier la contribution de l'effet « bord libre » dans la migration collective. Il est à noter que, dans ces conditions, le terme de « blessure » peut être trompeur : dans l'ensemble de nos expériences, ce terme désigne la zone vierge initialement couverte par le PDMS, et non une zone où l'épithélium a été mécaniquement retiré ou arraché.

Dans ce chapitre, nous allons décrire les principaux résultats concernant la réépithélialisation obtenus grâce à l'utilisation de ces pochoirs. Dans un premier temps, nous nous intéresserons au comportement d'ensemble de la monocouche en réponse au retrait du PDMS, au déclenchement et au déroulement du processus de migration collective des cellules en son sein, et aux propriétés de la monocouche. Nous nous intéresserons ensuite plus précisément aux hétérogénéités qui apparaissent dans la monocouche, et en particulier aux digitations apparaissant sur le bord de l'épithélium, et aux cellules remarquables situées à l'extrémité de ces protrusions, les « cellules leader ».

### *1. Comportement global de la monocouche*

Dans cette partie, nous étudierons les propriétés de l'épithélium dans son ensemble, comme objet défini par opposition à l'espace « vierge » l'entourant, autrement dit, sans considérer le détail du comportement des cellules le constituant (ce qui fera l'objet de la partie suivante) ; la démarche est similaire à une étude d'un liquide s'étalant sur une surface pour lequel on ne s'intéresserait ni aux flux internes, ni aux trajectoires des molécules le constituant. Les résultats détaillés dans cette partie III.1 reprennent et approfondissent ceux présentés dans notre premier article sur le sujet [Poujade 2007].

#### *1.1 Description qualitative de la déformation de la bande*

Grâce à la méthode décrite dans la partie II, nous avons réalisé des pochoirs dans lesquels des cellules épithéliales MDCK ont été cultivées pour former un épithélium. Une fois le pochoir en PDMS retiré, l'épithélium se présente sous la forme d'une monocouche dans laquelle les cellules sont à confluence, à une densité variant entre 4 et  $6 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> selon la concentration initiale des cellules déposées dans le pochoir et la durée pendant laquelle les cellules ont eu le temps de se déposer sur la surface avant que le milieu ne soit changé.

Dans cette géométrie, la cicatrisation complète de la blessure, autrement dit, l'occupation de l'espace situé entre les bandes par l'épithélium, s'effectue pendant une durée de l'ordre de 48h pour une distance de 1 mm. Nous allons détailler le déroulement.

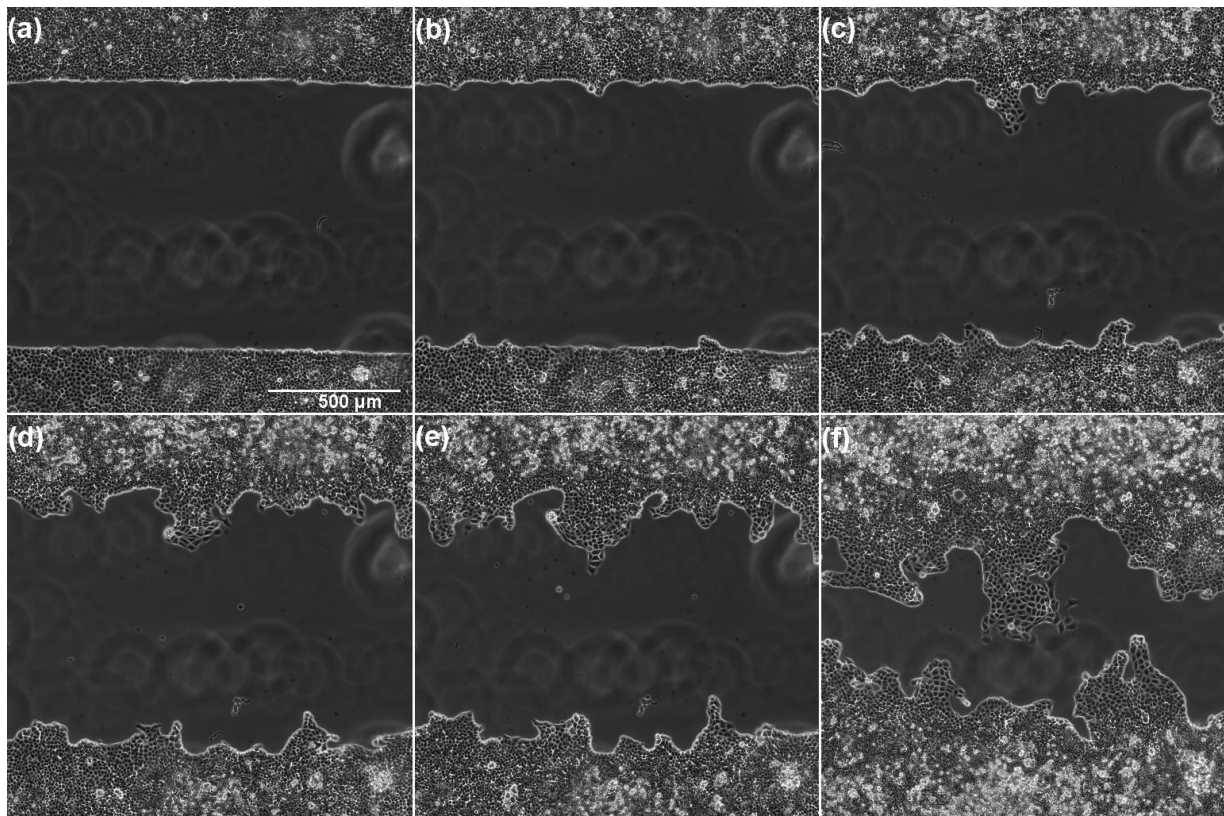


Figure 46: Cicatrisation d'une bande entre deux épithéliums. Immédiatement après le retrait du pochoir en PDMS, l'épithélium se présente sous la forme de deux bandes au bord lisse se faisant face (a,  $t=0$ ). Ces bords se déforment alors petit à petit (b,  $t=6h$ ), et l'on observe l'apparition des premières cellules leader et de protrusions au bout de quelques heures (c,  $t=12h$ ). Ces protrusions s'allongent ensuite, prenant la forme de véritables « doigts » (d,  $t=16h$  ; e,  $t=24h$ ). Au bout de 48h (f), les digitations sont sur le point de se rencontrer (ou l'ont déjà fait), amorçant alors la fermeture complète de la blessure.

Pendant les premières heures suivant le retrait du pochoir, on n'observe tout d'abord pas d'invasion de la surface libre par l'épithélium, celui-ci restant essentiellement confiné à sa géométrie initiale. Les cellules à l'intérieur des bandes ne sont toutefois pas immobiles, et de nombreuses réorganisations internes se produisent dans la monocouche. Par ailleurs, certaines cellules se divisant, on assiste à une légère densification de l'épithélium.

A l'issue de cette courte période (3h maximum), le bord de l'épithélium commence à se déformer, et à faire apparaître des protrusions s'étendant sur la surface vierge. Ces protrusions présentent généralement à leur extrémité une cellule remarquable, beaucoup plus large et étalée que les autres, ayant clairement perdu son caractère épithélial, et étendant un lamellipode dans la direction du bord libre : ce sont ces cellules que nous appellerons par la suite « cellules leader ». Pendant 24 à 48h, les protrusions portant une cellule leader croissent ainsi rapidement en digitations plus ou moins larges, qui s'étendent rapidement en direction de la bande opposée en occupant l'espace intermédiaire ; l'épithélium s'étend également hors de ces digitations, mais à une vitesse bien plus lente.

Enfin, lorsque les digitations atteignent la bande opposée, l'épithélium comble les trous restants, éventuellement par l'intermédiaires de petites digitations elles aussi guidées par des cellules leader (qui peuvent être des cellules leader ayant

initialement guidé une digitation d'une bande à l'autre). L'épithélium résultant couvre alors l'ensemble de la surface, tout en présentant de fortes inhomogénéités de densité, les zones initialement vierges étant peu denses, tandis que les zones initialement occupées par l'épithélium sont si denses que des cellules en sont expulsées.

D'un point de vue global, il est important de noter que l'épithélium reste toujours cohésif<sup>1</sup>, et qu'il constitue toujours une monocouche : à l'exception des zones centrales de l'épithélium, où les cellules excédentaires issues des divisions sont expulsées au-dessus de la monocouche (voir partie III.2.3.2.1), les cellules ne se superposent pas.

Après cette description générale, nous allons nous intéresser plus en détail à la vitesse de progression de l'épithélium sur la surface.

## 1.2 Vitesse moyenne de progression de la monocouche

La vitesse de progression de la bande a été évaluée en mesurant la surface occupée par l'épithélium au cours du temps, divisée par la largeur de la fenêtre dans laquelle la bande était observée (fig. 47).

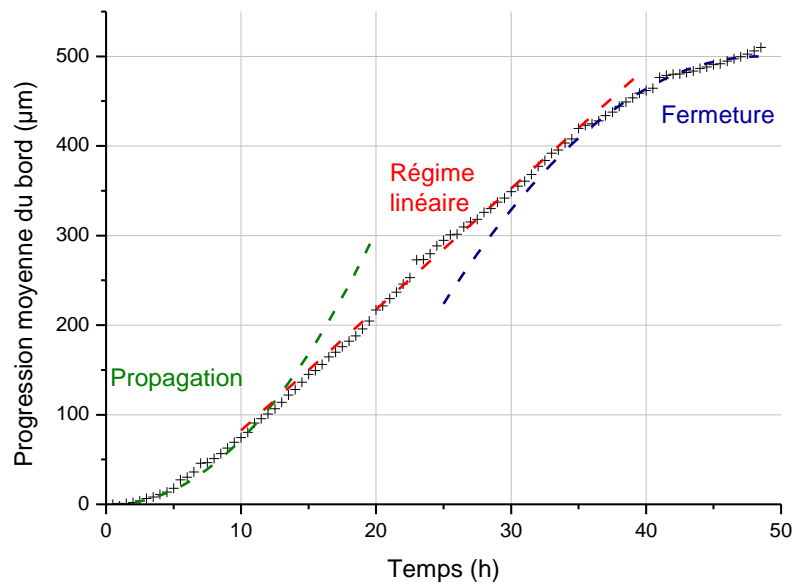


Figure 47 : Progression du front moyen de l'épithélium lors de la cicatrisation d'une bande de 1 mm de large. Trois phases distinctes peuvent être identifiées : la propagation, modélisée par une évolution parabolique (en vert), le régime linéaire, modélisé par une droite (en rouge) et la fermeture, également parabolique (en bleu). Note : au bout de 48h, la plupart des bandes n'ont pas encore entamé la phase de fermeture, à la différence de la bande choisie ici et montrant clairement les trois phases.

<sup>1</sup> Nous avons observé, à de rares occasions, des cellules leader se détachant du reste de l'épithélium et migrer seules. Cet événement reste toutefois exceptionnel (moins d'1% des leaders se détachent de cette façon).

Si cette approche ne rend pas compte de la forte irrégularité spatiale de l'avancée de l'épithélium, elle permet d'établir une loi générale d'évolution et d'évaluer simplement l'effet de nombreux paramètres sur la cicatrisation. Les résultats présentés ici concernent des bandes rectangulaires de cellules épithéliales de type MDCK sauvage, de 1 mm de large et de 5 mm de long, séparées par des espaces de 1mm, et de densité initiale de  $5,2$  à  $5,5 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>.

Trois phases ont été identifiées : la propagation, le régime linéaire, et enfin la fermeture. Nous allons maintenant détailler ces trois phases.

### 1.2.1 Propagation

Cette phase, comprise approximativement entre 0 et 20h après le retrait du pochoir, correspond à une avancée non linéaire de la position moyenne de la bande. En effet, immédiatement après le retrait du pochoir, et la bande progresse en accélérant, avec une vitesse moyenne passant de 0 à  $8,5 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$  au cours du temps. Par analogie avec les expériences de cicatrisation de blessures réalisées par *scratch wounding* dans un épithélium de cellules MDCK à confluence de Rosen *et al.* [1980], qui avaient conclu empiriquement à une loi parabolique pour l'avancée de la bande, nous avons tenté de la modéliser par une loi en puissance  $h = a \cdot t^n$  ; les résultats sont présentés sur la figure 48.

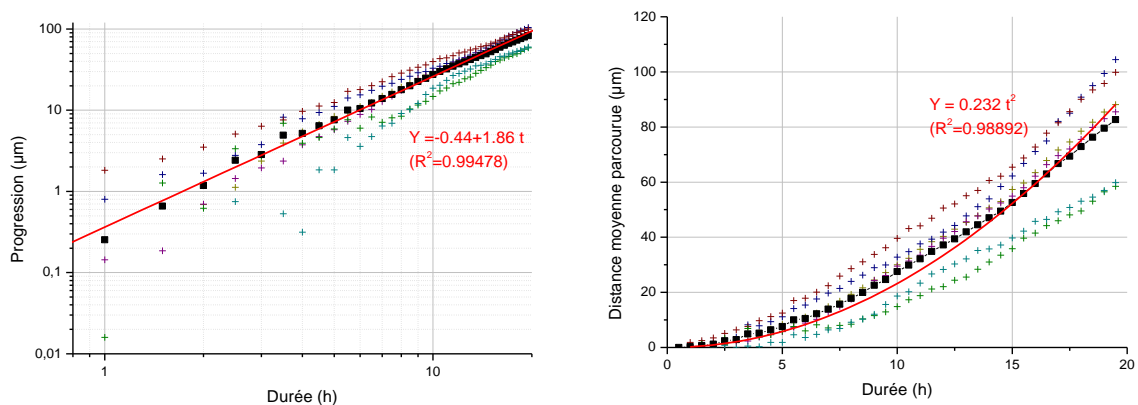


Figure 48: Progression moyenne de différentes bandes (croix colorées ; moyenne en carrés noirs) lors de la période initiale non linéaire (20h), en échelle logarithmique et linéaire. Les régressions sur la moyenne sont indiquées en rouge.

En échelle logarithmique, les points forment une droite avec un bon coefficient de corrélation, ce qui valide la loi  $a \cdot t^n$  envisagée. La pente de cette droite nous permet d'obtenir une estimation du coefficient  $n$  à  $1,86 \pm 0,4$ , soit une progression pratiquement parabolique. Nous avons donc modélisé directement la progression de la bande durant cette phase par une loi de type  $h = a \cdot t^2$ , qui nous a permis d'estimer le coefficient  $a$  à  $0,232 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-2}$ .

Nous retrouvons ici un coefficient identique à celui déterminé par Rosen *et al.*, qui s'élève à  $0,23 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-2}$ . Cependant, nous observons deux différences notables avec leurs résultats.

Tout d'abord, dans nos expériences, cette phase d'accélération cesse au bout de 20h, la vitesse s'établissant alors autour de  $8,5 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$  (voir partie suivante) tandis que Rosen *et al.* voient la vitesse continuer à augmenter au-delà de cette limite pendant au moins 100h, atteignant plus de  $30 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ . Par ailleurs, nous observons une vitesse initialement nulle lors du retrait du pochoir, alors que Rosen *et al.* indiquent une vitesse initiale de  $2,8 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ . Cette différence pourrait être liée à la densité moins élevée de nos expériences (entre  $5,2$  et  $5,5 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> contre  $6,6 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> pour Rosen *et al.*), même si l'influence de la densité initiale sur la cicatrisation semble limitée (voir partie III.1.3.3).

Qualitativement, c'est au cours de cette étape que nous assistons à l'apparition de la majorité des digitations précédemment décrites : si l'apparition de nouvelles cellules leader et de protrusions ne cesse pas complètement à l'issue de cette période, elle devient tout du moins nettement plus rare (voir partie III.2.1).

### 1.2.2 Régime linéaire

La phase précédente laisse place au bout de 20h environ à une progression linéaire du bord moyen de l'épithélium (figure 49).

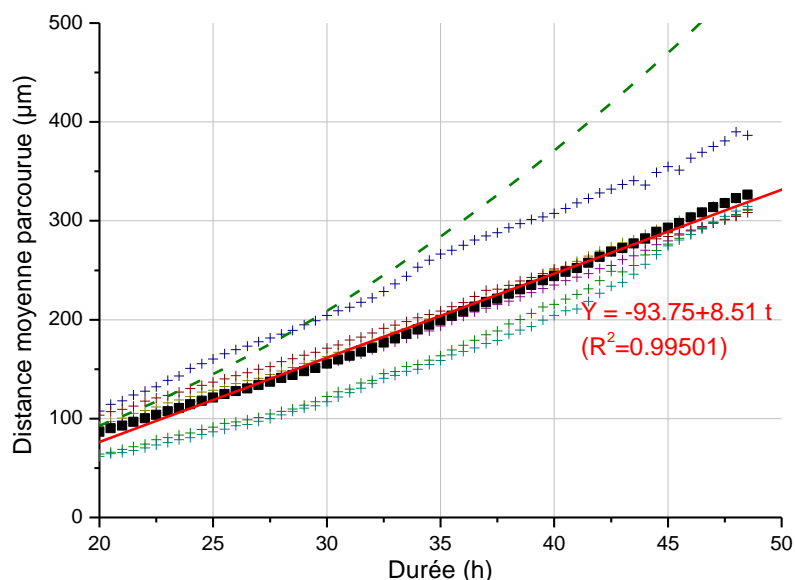


Figure 49 : Progression moyenne de cinq bandes (croix colorées ; moyenne en carrés noirs) lors de la période linéaire (20h-48h). La régression linéaire sur la moyenne est indiquée sur le trait rouge continu, tandis que la prolongation de la régression parabolique menée sur les 20 premières heures est indiquée sur le trait discontinu vert pour comparaison.



La vitesse de progression est évaluée à ce stade à  $8,5 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$  en moyenne. Toutefois, des disparités apparaissent dans la vitesse mesurée d'une expérience à l'autre sur des géométries et des paramètres initiaux pourtant identiques, parfois même d'une partie de la bande à l'autre, celle-ci pouvant s'établir entre  $7$  et  $10 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ . L'origine de ces différences semble liée à la durée de l'étape précédente, dans laquelle la progression était quasi-parabolique : plus cette étape dure, plus la vitesse « acquise » lorsque le régime devient linéaire est grande. Du point de vue du comportement de la bande, cela revient à dire que plus la durée pendant laquelle de nouvelles protrusions et cellules leader apparaissent était grande, plus l'épithélium s'étendra rapidement ensuite : davantage encore que la progression « globale » de l'épithélium hors de ces digitations, c'est donc vraisemblablement les cellules leader qui constituent le moteur de cette avancée.

Durant cette phase, l'apparition de nouvelles cellules leaders se fait plus rare, tandis que les protrusions existantes s'étendent et s'élargissent, jusqu'à rejoindre celles du bord opposé.

### 1.2.3 Fermeture

Lorsque les digitations opposées se rejoignent, la progression linéaire ne peut évidemment se poursuivre. Cette transition se produit généralement hors des limites de nos observations ( $48\text{h}^1$ ), autrement dit, après au moins  $30\text{h}$  de régime linéaire. Cependant, comme indiqué précédemment, la vitesse durant le régime linéaire est variable, en nous concentrant sur les bandes présentant la progression la plus rapide, nous avons pu assister à quelques événements de fermeture. La figure 50 présente cette progression sur l'une de ces bandes.

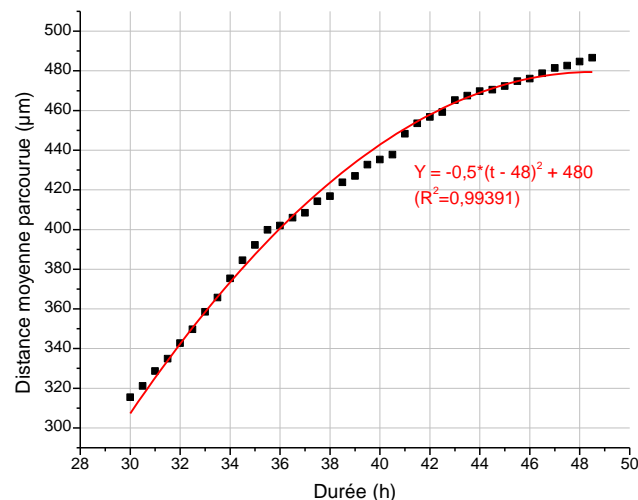


Figure 50 : Progression moyenne sur une bande « rapide » (dont l'extrémité a atteint la bande opposée à  $t=36\text{h}$  et ayant recouvert entièrement l'épithélium à  $t= 48\text{h}$ ) entre  $30\text{h}$  et  $48,5\text{h}$ .

<sup>1</sup> Au-delà de  $48\text{h}$ , le milieu de culture commence à s'épuiser, et les cellules sont donc soumises à des conditions de survie différentes, ce qui gêne leur division et leur migration. Nous n'avons donc réalisé que peu d'expériences au-delà de cette limite.

L'évolution quantitative de cette progression est difficile à établir avec précision sur un échantillon limité d'événements, mais semble bien décrite par une loi empirique de type  $1-(t-t_f)^2$  (avec  $t_f$  l'instant où l'épithélium a entièrement recouvert la bande), non linéaire et montrant un ralentissement croissant de la progression après le régime linéaire.

Qualitativement, une fois que les digitations ont commencé à fusionner, la vitesse de progression (qui garde un sens, étant donné qu'il s'agit de la surface occupée par l'épithélium divisée par sa largeur) diminue progressivement, tandis que les trous ainsi formés dans l'épithélium se referment. Il paraît raisonnable de penser que le mécanisme de cicatrisation change et soit alors proche de celui en « cordon de bourse » décrit dans la partie I.3.2.1.2.

### 1.3 Influence des paramètres initiaux sur la vitesse

Les mesures que nous avons effectuées précédemment concernent une bande dans une géométrie et des conditions initiales données. Nous avons cherché à identifier les différents paramètres influençant la progression de la bande et à estimer leur rôle dans l'étalement de l'épithélium. Cette étude a été rendue possible en grande partie grâce aux possibilités offertes par le système de pochoirs en PDMS que nous avons utilisé.

#### 1.3.1 Taille des bandes

En modifiant la largeur des ouvertures dans les pochoirs en PDMS, nous pouvons tester une variété de combinaisons de largeurs pour les bandes initiales d'épithélium. Cependant, la relative fragilité de la résine photosensible utilisée pour créer les pochoirs (typiquement de 200 $\mu\text{m}$  d'épaisseur) limite la largeur des futures bandes d'épithélium autour de 100 $\mu\text{m}$ .

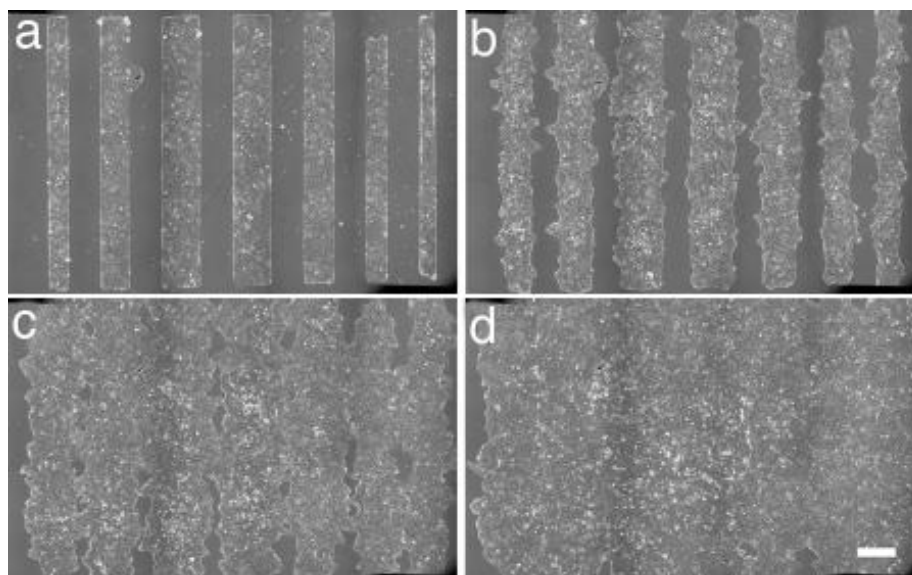


Figure 51 : Évolution de bandes de différentes longueurs variant entre 100 et 400 $\mu\text{m}$  à  $t=1\text{h}30$  (a),  $t=13\text{h}$  (b),  $t=25\text{h}$  (c) et  $t=37\text{h}$  (d) (échelle : 400 $\mu\text{m}$ ).

Les expériences réalisées sur une série de bandes de largeurs égales à 100  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$  et 400  $\mu\text{m}$  ne montrent pas de différence qualitative de comportement avec les bandes de 1 mm : nous observons une avancée similaire de l'épithélium par l'intermédiaire de digitations, tandis que la vitesse présente une évolution au cours du temps identique à celle décrite dans la partie précédente, parabolique puis linéaire.

L'étude de la vitesse de cicatrisation pendant la phase initiale parabolique, indiquée sur la figure 51, donne des résultats compatibles avec ce qui a été mesuré pour les bandes les plus larges pour les bandes de taille supérieure ou égale à 150  $\mu\text{m}$ .

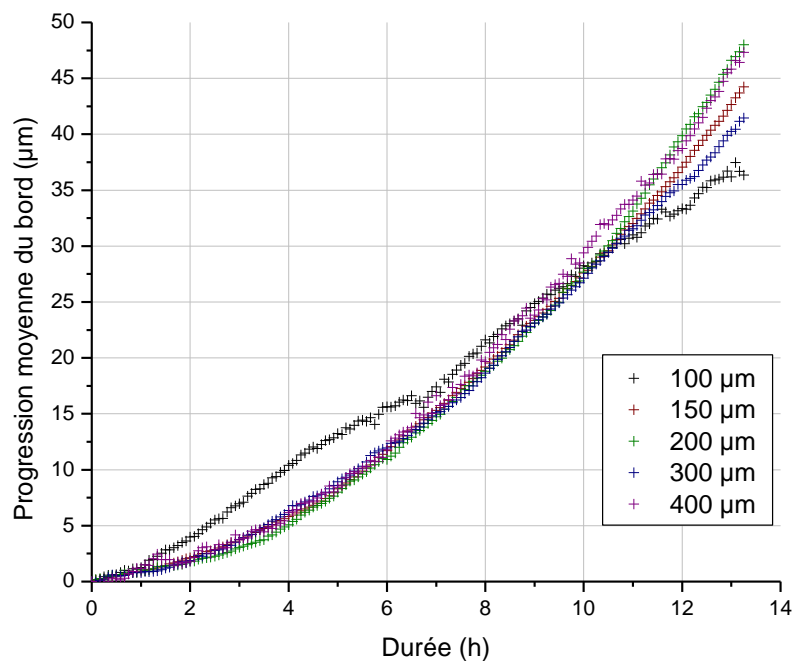


Figure 52 : Progression moyenne de bandes de différentes longueurs au cours de la période initiale. Les bandes de 100 $\mu\text{m}$  démontrent un comportement sensiblement différent des bandes plus larges, tandis que les autres bandes gardent un comportement identique aux bandes larges d'1mm

Cette similarité de comportement va dans le sens d'une confirmation du fait que la cicatrisation est principalement un phénomène dynamique, et non une simple conséquence de l'étalement naturel des cellules ou de la division cellulaire dans l'épithélium : si cette dernière hypothèse était vraie, les bandes fines, contenant moins de cellules que les bandes plus larges, s'étaleraient naturellement moins loin (en valeur absolue) et moins vite que les autres, à cause du nombre plus réduit de cellules pouvant participer à l'étalement, et du nombre plus faible de nouvelles cellules dans l'épithélium issues de divisions cellulaires (à ratio nombre de divisions/nombre de cellules constant). L'absence de différence indique alors plutôt que la réépithélialisation se produit par l'intermédiaire d'un processus actif, vraisemblablement déclenché par un changement de comportement des cellules

situées à une courte distance du bord de l'épithélium. Dans cette optique, les digitations observées pourraient alors être une conséquence de ce processus, et non de simples écarts statistiques dans la progression moyenne de l'épithélium.

En revanche, à la limite inférieure des bandes que nous avons pu réaliser (100  $\mu\text{m}$ ), on observe une différence notable de comportement : d'une part, la phase initiale présentant une croissance parabolique est pratiquement absente, le régime linéaire s'établissant au bout de 3 à 4h seulement, et d'autre part, la vitesse de progression moyenne dans le régime linéaire est elle-même bien plus faible que pour des bandes plus larges, s'établissant à 5  $\mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$  (figure 52).

Plusieurs phénomènes peuvent être à l'origine cette différence de comportement. D'abord, la proximité des bords de part et d'autre de la bande empêche l'évolution indépendante des digitations de chaque côté. Comme nous le verrons dans la partie III.2.2, celles-ci sont impliquées dans de vastes mouvements d'ensemble des cellules à l'intérieur de l'épithélium : la présence à proximité de digitations s'étendant dans des directions opposées perturbe les flux internes de l'épithélium, et gêne le mouvement de nouvelles cellules vers les digitations. Ensuite, la division cellulaire dans des bandes fines n'est vraisemblablement pas suffisante pour « renforcer » l'épithélium au fur et à mesure de son avancée quand l'étalement des cellules est maximal (voir parties III.2.3 et III.2.5)

C'est probablement aussi pour ces raisons que l'on n'observe pas de digitations lors de la formation d'un épithélium à partir de petits groupes de cellules, par exemple lorsque l'on redisperse des cellules dans du milieu de culture. Dans ces conditions, l'épithélium croît lentement en s'étendant progressivement grâce aux divisions des cellules.

### 1.3.2 *Espacement des bandes*

De la même façon que la largeur des bandes, nous pouvons varier l'espacement entre les bandes, jusqu'à une distance d'environ 100 $\mu\text{m}$ . En-deçà de cette longueur, c'est cette fois le risque de rupture du PDMS lors du décollement du pochoir de son moule qui rend difficile l'utilisation d'espacement fins.

Là encore, nous n'observons pas de différence significative de comportement pour des largeurs comprises entre 100 et 1000  $\mu\text{m}$ , excepté bien sûr un allongement de la durée de la phase « linéaire » pour les espaces les plus grands, la diminution de la vitesse n'intervenant que lorsque la bande opposée est atteinte.

Toutefois, lorsque la bande est située au bord de l'échantillon, autrement dit qu'il n'y a pas de bande en face, plusieurs différences apparaissent clairement (fig. 53). Tout d'abord, la partie parabolique initiale est beaucoup plus courte (5h maximum), voire inexistante : la progression moyenne de l'épithélium est ainsi pratiquement linéaire depuis le début, et présente une remarquable régularité au cours du temps. Par ailleurs, cette progression s'effectue à une vitesse nettement plus lente que d'ordinaire, en moyenne de 5  $\mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ , mais pouvant descendre jusqu'à 2  $\mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ . Cette différence est d'autant plus évidente qu'elle est visible sur des bandes

présentant un bord « libre » et un bord avec vis-à-vis. Cependant, la cicatrisation semble suivre qualitativement le même type de processus, en s'effectuant par l'intermédiaire de digitations s'étendant vers la surface libre et guidée par des « cellules leader » (celles-ci semblant toutefois moins étalées que d'ordinaire, bien qu'aussi nombreuses).

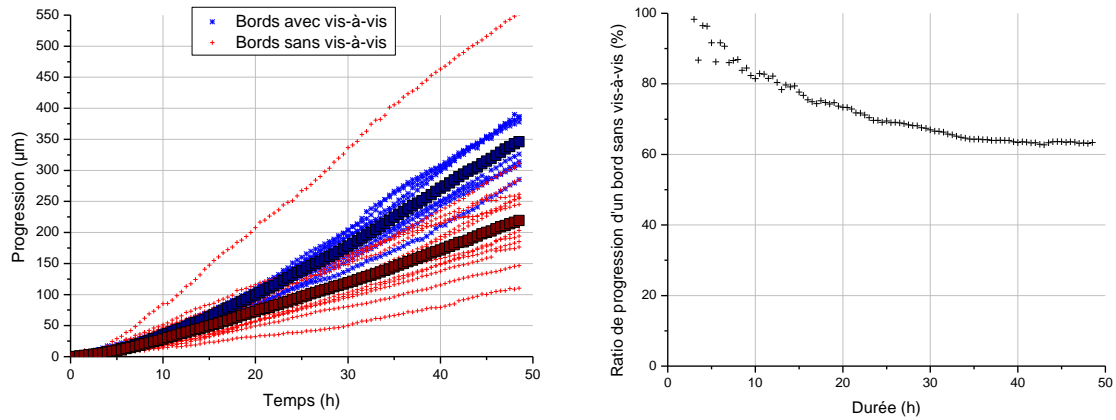


Figure 53 : Progression moyenne du bord d'une série de bandes présentant une autre bande sans vis-à-vis (en rouge, moyenne globale indiquée par les carrés) ou avec vis-à-vis (en bleu, moyenne globale indiquée par les carrés). À une exception près, les secondes présentent une vitesse nettement inférieure (de l'ordre de 65%) aux premières.

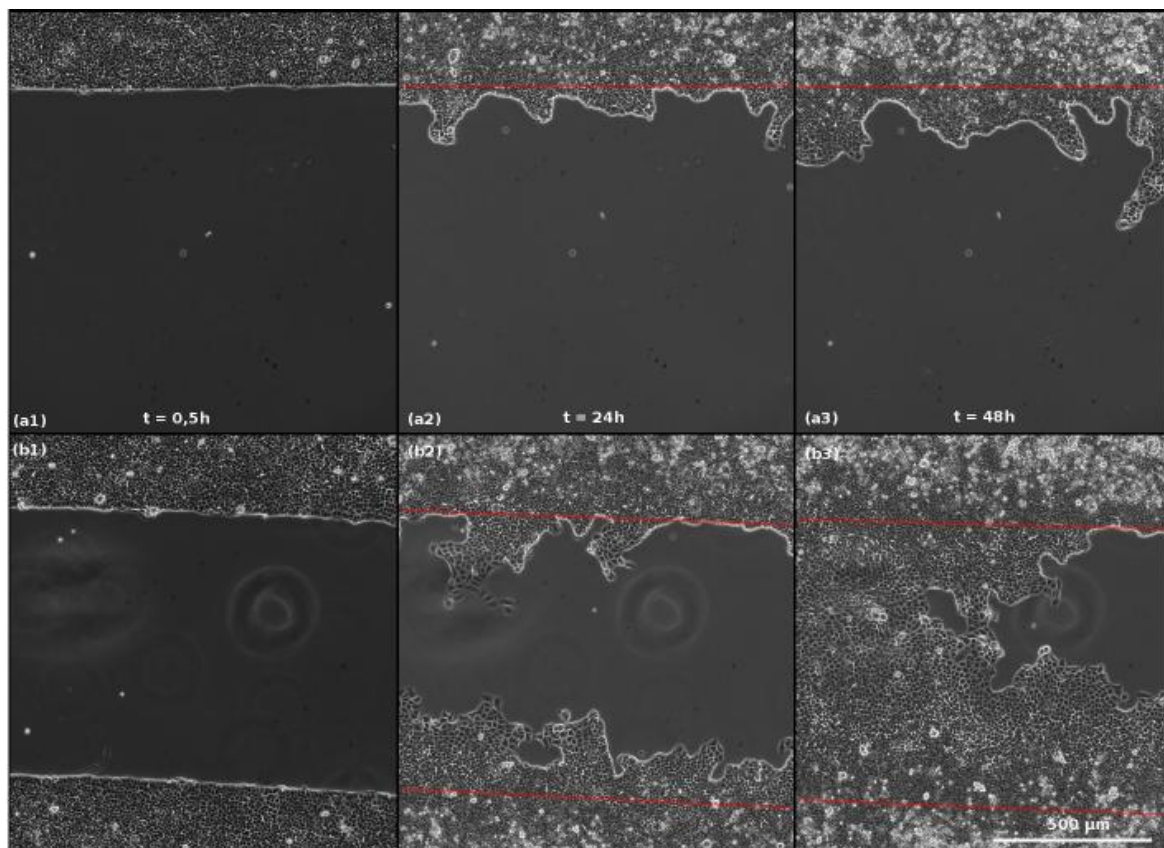


Figure 54 : Evolution comparée d'une bande ayant un côté sans vis-à-vis (a1-a3) et un côté avec vis-à-vis (b1-b3). Les lignes rouges indiquent les positions initiales des bords.

Ce phénomène est observé pour des bandes lisses aussi bien que des bandes dentelées (voire partie III.1.3.4). Toutefois, les bords sans vis-à-vis, mais en face desquels se sont déposées quelques cellules au cours du retrait du pochoir (qui forment au fur et à mesure de l'expérience un petit amas qui grossit au cours du temps) présentent un comportement semblable aux bords avec vis-à-vis, bien que le nombre de cellules en face soit de l'ordre de quelques dizaines à peine, bien moins que dans une bande complète. Par ailleurs, l'une de nos expériences de « bord libre » (sur une dizaine mesurées) s'est singularisée, et présente une vitesse normale, voire même légèrement supérieure à la moyenne des bords avec vis-à-vis (mais sans excéder les progressions les plus rapides constatées). Si nous n'avons pas observé d'« amas cellulaire » susceptible d'induire ce comportement, il est toutefois possible qu'il ait tout de même été présent, au-delà de 1 mm (limite de notre champ d'observation).

Nous tirons plusieurs informations de ce résultat. Tout d'abord, il semble que les cellules de l'épithélium soient capables de détecter la présence d'un bord opposé, ou du moins, de cellules à une distance importante. L'hypothèse la plus raisonnable serait que les cellules situées au contact d'un bord de l'épithélium puissent diffuser dans le milieu une substance chimique (de type facteur de croissance) capable de modifier le comportement des autres cellules au contact d'un bord à proximité. Cependant, cette hypothèse suppose que la détection s'opère à une distance élevée (1 mm au moins) : dans ce cas, la question se pose de savoir pourquoi les cellules (identiques) situées sur le même bord ne détecteraient pas cette substance. De même, si l'on suppose que la détection fait intervenir une élévation au cours du temps de la concentration détectée, pourquoi les substances émises par l'autre bord de la même bande ne conduiraient pas au même résultat ? Enfin, si c'était le gradient de concentration qui était détecté, pourquoi les émissions de cet autre bord ne brouillent pas toute répartition spatiale ordonnée de la substance ?

En tenant compte de ces remarques, l'explication la plus plausible de ce phénomène serait qu'il y ait bien diffusion d'une substance chimique dans le milieu (produite par les cellules de bord ou simplement par l'ensemble des cellules) favorisant la migration des cellules, mais que les flux internes (plus faibles en périphérie de la boîte de pétri alors que les bandes sans vis-à-vis sont situées sur les bords du pochoir) ainsi que la plus forte densité de cellules « au milieu » de la boîte de pétri (où le pochoir est déposé) conduisent à une plus forte concentration en substance active dans les zones centrales du pochoir, où se trouvent les bandes en vis-à-vis et une concentration moindre en périphérie, où se trouvent les bandes sans vis-à-vis. Néanmoins, cette explication reste peu satisfaisante ; nous n'avons pas pu à ce stade déterminer clairement l'origine de ce phénomène, qui devrait donc faire l'objet d'une étude plus détaillée.

Quoi qu'il en soit, cette différence met en évidence le fait que la cicatrisation est, au moins en partie, influencée par l'environnement, et ne constitue donc pas un phénomène exclusivement intrinsèque de l'épithélium. Nous rejoignons ici les conclusions de la partie précédente sur la largeur des bandes : la cicatrisation n'est pas un simple phénomène d'extension de l'épithélium sous l'effet de l'étalement et des divisions des cellules le constituant.

### 1.3.3 Densité initiale

Rosen *et al.* [1980] observaient une certaine durée de latence avant que la cicatrisation ne commence d'autant plus élevée que la densité initiale était faible ; ce délai était interprété comme la durée pendant laquelle la bande se densifiait, jusqu'à atteindre une « densité minimale limite » ( $2 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) permettant la cicatrisation. Bien que notre protocole ne nous permette pas de réaliser des bandes réellement confluentes (autrement dit sans « trous ») de densité aussi basse, nous avons cherché à déterminer si la densité initiale modifiait le déroulement de la cicatrisation, par exemple si une bande plus dense conduisait à une cicatrisation plus rapide.

Il est aisé de modifier la densité initiale des cellules dans l'épithélium en augmentant la quantité de cellules déposées sur le pochoir, en les laissant se déposer plus longtemps ou encore en laissant l'épithélium croître plus longtemps dans le pochoir. Il est même possible d'introduire des inhomogénéités de densité dans un même pochoir, en rinçant brusquement les cellules environ 30 minutes après les avoir introduites, ce qui a pour effet de décoller de nombreuses cellules au centre du pochoir, mais très peu sur les bandes les plus proches du bord ou sur les extrémités des bords.

Grace à ces méthodes, nous pouvons estimer l'influence de la densité initiale en cellules sur le déplacement du front, toutes choses égales par ailleurs. Nous avons ainsi mesuré la vitesse moyenne de progression pour des densités initiales d'un épithélium à confluence allant de  $4$  à  $6 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>. En-deçà de  $4 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>, les bandes présentent des zones libres, ce qui perturbe la progression de la bande dans une direction perpendiculaire, tandis qu'au-delà de  $6 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>, l'épithélium commence à « expulser » des cellules au-dessus de la monocouche trop dense pour les contenir.

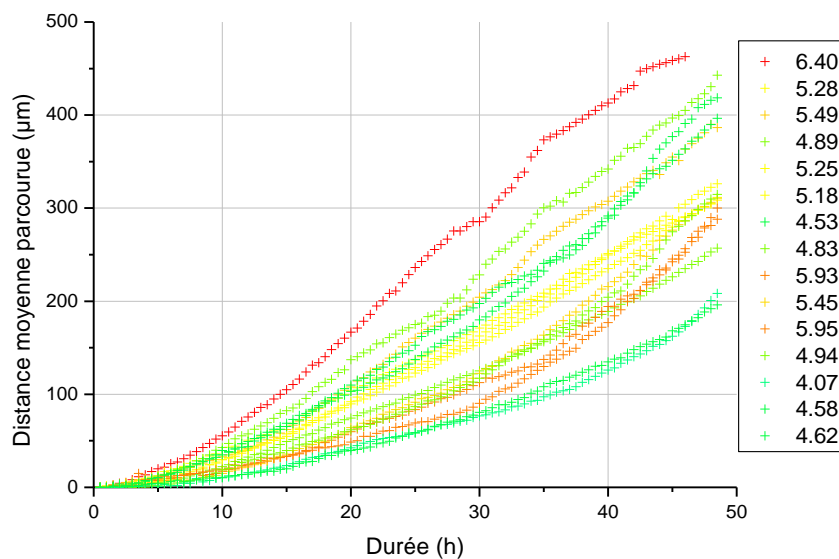


Figure 55 : (A) Progression moyenne d'une série de bandes de densité initiale variable (entre  $4 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>, en vert, et  $6,4 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>, en rouge)

La figure 55 montre l'évolution d'une série de bandes présentant des densités initiales différentes, ainsi que la vitesse moyenne dans la phase linéaire en fonction de la densité. Nous pouvons tout d'abord remarquer que, si la bande dont la progression est la plus rapide est la plus dense et la moins rapide parmi les moins denses, il semble difficile d'en déduire une loi générale, des bandes peu denses progressant rapidement tandis que d'autres plus denses ont une vitesse bien inférieures à la moyenne.

Nous pouvons évaluer plus en détail le lien entre vitesse moyenne de progression et densité initiale en reportant les valeurs correspondante pour une série de bandes (fig. 56A). Le graphe ainsi obtenu présente un « nuage de points » ne montrant pas de corrélation nette entre vitesse et densité initiale. De plus, la progression moyenne sur les bandes de moins de  $5 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> est identique à celle sur les bandes de plus de  $5 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> (fig. 56B), ce qui nous permet d'affirmer que, sur la plage de 4 à  $6 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>, la densité initiale n'a pas d'impact sur la cicatrisation.

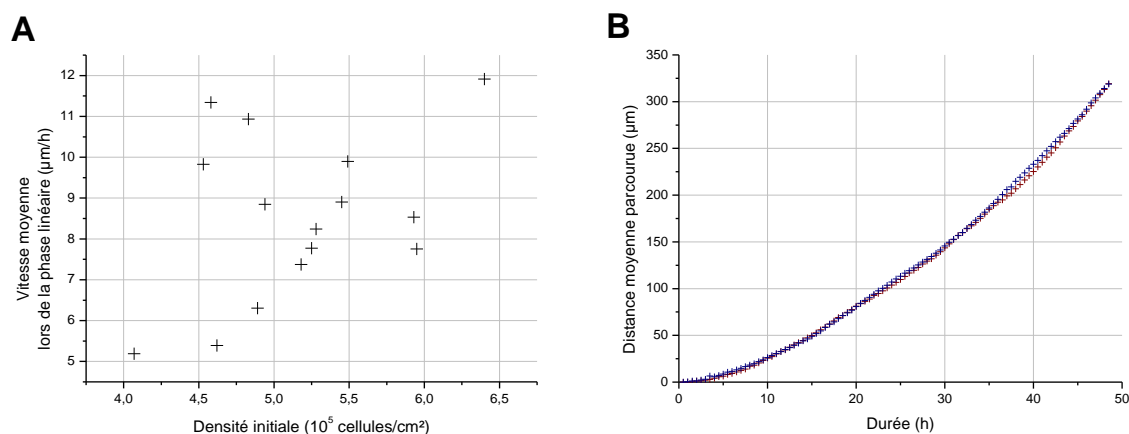


Figure 56 : A : Corrélation entre la vitesse moyenne lors de la phase linéaire et la densité initiale. B : Moyenne des progressions sur les 7 bandes de densités initiales comprises entre 4 et  $5 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> (en rouge) et celle sur les 7 bandes de densités initiales comprises entre 5 et  $6 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> (en bleu).

### 1.3.4 Géométrie de la bande

Les résultats présentés jusqu'à présent semblent indiquer que c'est l'existence d'une interface entre les cellules de la bande et la surface vierge qui déclenche la cicatrisation selon un mécanisme actif. Nous nous sommes donc posé la question de savoir si l'accroissement de la longueur de la frontière de la bande a une influence sur la cicatrisation au niveau global, et si l'apparition de digitations était favorisée par une plus grande exposition à l'espace hors de l'épithélium au niveau local, autrement dit par la courbure du bord de l'épithélium, hypothèse évoquée dans le modèle de Mark *et al.* [2009].



Pour cela, nous avons réalisé des pochoirs en PDMS en variant la géométrie des bandes : au lieu de rectangles aux bords lisses, nous avons réalisé des bandes présentant des motifs périodiques sur les masques d'origine, reproduits sur la figure 57. Par ailleurs, afin de conduire simultanément une expérience témoin, nous avons créé une série de bandes présentant une moitié lisse et une moitié dentelée, afin de comparer la différence de rugosité toutes choses égales par ailleurs.

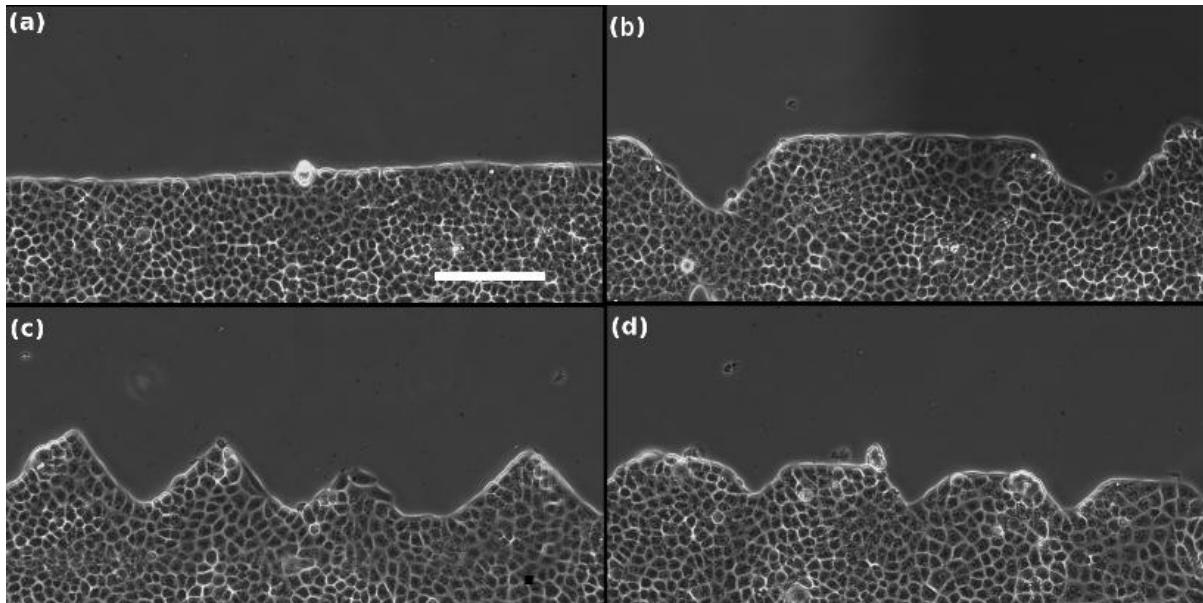


Figure 57 : Différentes géométries de bords utilisées pour modifier la rugosité du bord de la bande : (a) bande lisse ; (b) ouvertures triangulaires de  $100\ \mu\text{m}$  de profondeur sur  $200\ \mu\text{m}$  de large, espacées de  $500\ \mu\text{m}$  ; (c) pics triangulaires de  $100\ \mu\text{m}$  de haut sur  $200\ \mu\text{m}$  de large, espacés de  $200\ \mu\text{m}$  ; (d) ouvertures triangulaires de  $50\ \mu\text{m}$  de profondeur sur  $100\ \mu\text{m}$  de large, espacées de  $200\ \mu\text{m}$  (échelle :  $200\ \mu\text{m}$ ).

Les différentes géométries utilisées pour modifier la forme du bord des bandes ne modifient pas sensiblement le comportement des bandes : nous observons toujours une cicatrisation en plusieurs phases, parabolique, puis linéaire. Cependant, au bout de quelques heures, au moment où les digitations commencent à se former, les moitiés de bandes dentelées semblent présenter une progression plus rapide de l'épithélium sur la surface vierge (fig. 58).

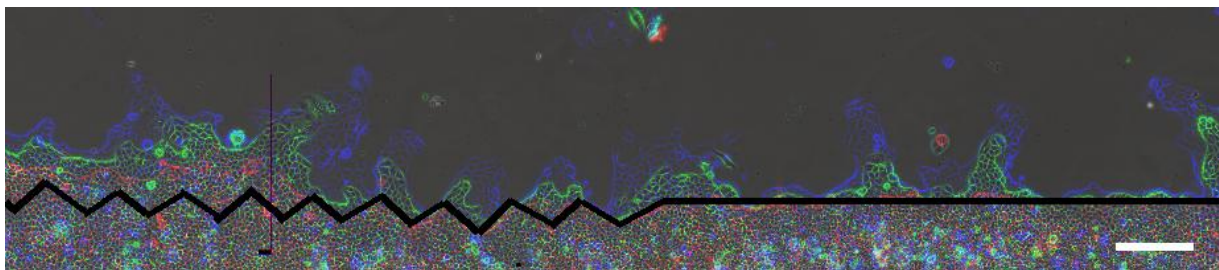


Figure 58 : Evolution du bord d'une bande présentant une moitié lisse (à droite) et une moitié dentelée (pics de  $200\ \mu\text{m}$  de large sur  $100\ \mu\text{m}$  de haut, à gauche) : en noir, le bord initial au moment du retrait du pochoir, en rouge la bande après un délai de 10h, en vert après un délai de 20h et en bleu après un délai de 30h. La moitié dentelée présente une progression nettement plus rapide.

Nous avons étudié quantitativement ce phénomène en comparant la progression moyenne d'une série de 8 bandes présentant une moitié lisse et une moitié dentelée sur chacune de ces deux moitiés (fig. 59). L'augmentation de la vitesse de cicatrisation est nette : les moitiés dentelées couvrent en moyenne une surface couverte 30% supérieure à celle des moitiés lisses à largeur de bande égale.

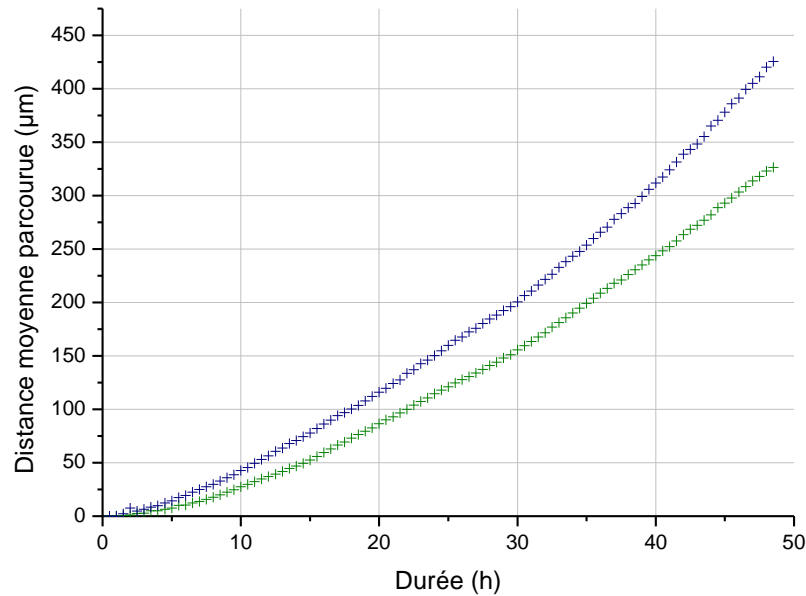


Figure 59: Progression moyenne sur une série de 8 bandes présentant une moitié dentelée (en bleu) et l'autre moitié lisse (en vert), montrant l'augmentation de la vitesse de cicatrisation dans le premier cas.

L'explication la plus plausible de ce phénomène est que l'accroissement de la vitesse de cicatrisation soit dû à une augmentation du nombre de cellules leaders, ce que nous avons confirmé par la suite (voir partie III.2.1). Deux phénomènes peuvent potentiellement expliquer cet effet : l'augmentation de la longueur du bord et la plus grande courbure locale de l'épithélium.

Afin d'évaluer le rôle de la variation de longueur du bord, nous avons calculé le ratio de la surface occupée par la bande dans sa moitié « à motif » sur celle occupée par sa moitié lisse au cours du temps en fonction du type de motif, (fig. 60).

Nous retrouvons bien sûr ici que la cicatrisation est plus rapide pour les parties dentelées que pour les parties lisses : le ratio de progression des premières par rapport aux secondes est en permanence, et de manière stable, supérieur à 1. Cependant, des différences apparaissent d'un motif à l'autre : les moitiés présentant le motif (b) ont une progression supérieure de 20 à 30% à celle des moitiés lisses des bandes, celles avec le motif (c) de 40 à 50% et celle avec le motif (d) de 60 à 80%.

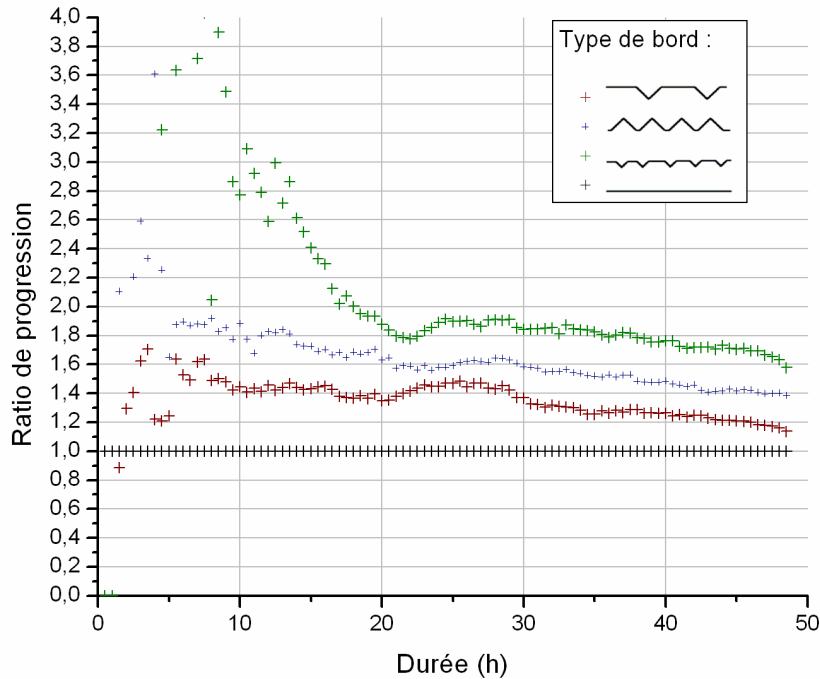


Figure 60 : Ratio des avancées des moitiés dentelées de la bande sur celles des moitiés lisses sur 8 bandes différentes (moyennes sur 2 bandes présentant des motifs « b », 5 des motifs « c » et 1 des motifs « d »). La progression des bords dentelés est constamment supérieure de 20 à 80% à la progression des bords lisse, particulièrement dans le cas des motifs augmentant sensiblement la longueur du bord (motifs « c » et « d »). N.B. : La période initiale est très bruitée à cause de la faible avancée de la bande lisse, et n'est donc pas significative.

La longueur réelle du bord pour chaque motif présenté sur la figure 57 peut être calculée géométriquement. Pour le motif (b), sur une largeur de bande de  $500 \mu\text{m}$  (correspondant à la distance entre deux motifs), la longueur du bord est de  $300 + 2 \cdot \sqrt{2} \cdot 100 = 580 \mu\text{m}$ , soit une augmentation de 16% par rapport à un bord lisse (fig. 61). Pour le motif (c), sur une largeur de bande de  $200 \mu\text{m}$ , la longueur du bord est de  $2 \cdot \sqrt{2} \cdot 100 = 280 \mu\text{m}$ , soit une augmentation de 40% par rapport à un bord lisse. Enfin, pour le motif (d), sur une largeur de bande de  $200 \mu\text{m}$ , la longueur est de  $100 + 2 \cdot \sqrt{2} \cdot 50 = 240 \mu\text{m}$ , soit une augmentation de 20% par rapport à un bord lisse.

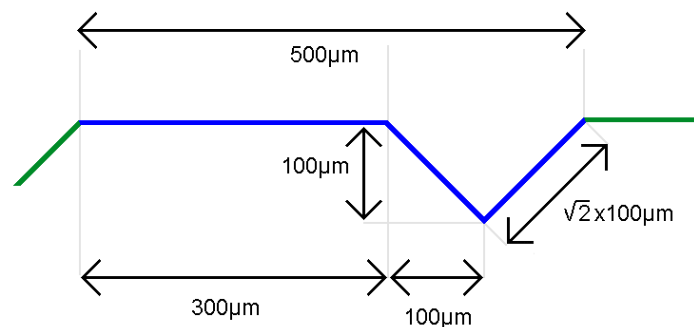


Figure 61 : Longueur du bord pour un bord présentant des motifs de type « b » : sur une largeur de  $500 \mu\text{m}$ , la longueur du bord (en bleu) s'élève à  $300 \mu\text{m}$  (partie lisse) +  $2 \cdot \sqrt{2} \cdot 100 \mu\text{m}$  (parois du motif).

À l'exception du motif (d) (qui peut être une erreur statistique, la figure 60 étant basée sur une seule bande de ce motif), l'augmentation de la longueur du bord par rapport à une bande lisse semble donc du même ordre de grandeur que l'augmentation de la vitesse de progression de l'épithélium indiquée sur la figure 60. Cela montre que la vitesse de cicatrisation de la blessure est influencée par la longueur du bord de la blessure, ce qui indique que ce sont les cellules situées au bord de la blessure qui dirigent le processus de cicatrisation, vraisemblablement par l'intermédiaire des cellules leader. Autrement dit, la cicatrisation n'est pas la conséquence d'une « poussée » du reste de la bande épithéliale sous l'effet de la prolifération cellulaire.

En revanche, l'apparition des cellules leader au niveau local ne semble pas déterminée par l'exposition des cellules à l'extérieur de l'épithélium. Qualitativement, les digitations, et en particulier les cellules leader qui en forment les extrémités, se forment aussi bien à partir de la « pointe » des dents, où la surface exposée vers la zone vierge est la plus grande, que sur les parois latérales (lisses) des motifs ou même dans la partie creuse située entre deux motifs (où la surface exposée à la zone vierge est minimale), et dans des proportions similaires. Cela signifie que, si la présence d'un bord libre est nécessaire pour voir apparaître une cellule leader, la courbure du bord ne semble pas avoir une influence déterminante sur la probabilité de cet événement (du moins sur la gamme de courbures étudiées), ce qui irait à l'encontre des hypothèses de Mark *et al.* [2009].

#### 1.4 Comportement des digitations

Nos mesures ont été faites jusqu'à présent sur la progression *moyenne* de la bande. Il est toutefois évident lorsque l'on observe la cicatrisation que l'avancée ne se fait pas uniformément, et que certaines parties de la bande (les digitations mentionnées plus haut) progressent plus vite que d'autres. La mesure de la longueur du bord au cours du temps (fig. 62) fait apparaître là encore 3 phases, s'identifiant approximativement aux phases décrites pour la progression moyenne de la bande.

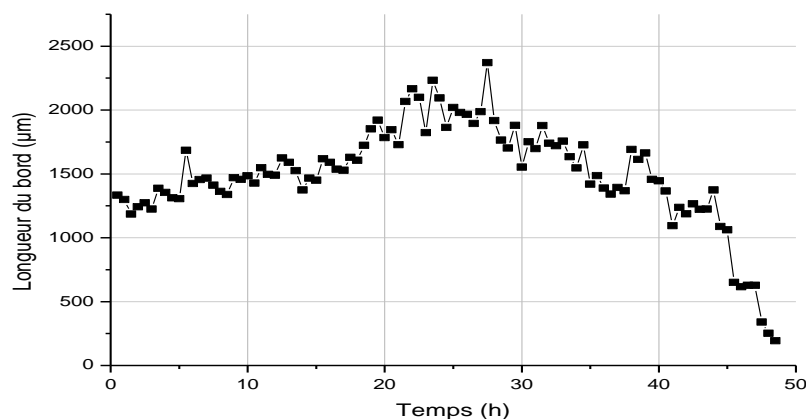


Figure 62 : Longueur du bord d'une bande lisse sur une fenêtre de largeur initiale de 1250 µm de large et parvenant à la fermeture en 48h. Trois phases peuvent être observées, s'identifiant approximativement à celles définies dans la partie III.1.2 : augmentation régulière du bord pendant environ 20h, stagnation pendant environ 20h, puis chute jusqu'à la fermeture complète.

La première phase, durant environ 20h, correspond à une augmentation régulière de la longueur du bord, jusqu'à un maximum de 150% de la longueur initiale. Qualitativement, elle correspond à l'apparition et à l'extension des digitations de l'épithélium, jusqu'au moment où les digitations se touchent latéralement, et peut être identifiée à la phase de propagation décrite dans la partie III.1.2.1. La seconde phase, qui s'étend ici jusqu'à 40h environ (mais généralement davantage, de l'ordre de 50 à 60h) montre une certaine stabilité dans la longueur du bord, et correspond à l'avancée du front constitué par les digitations une fois qu'elles se sont touchées latéralement, jusqu'au moment où elles atteignent le bord opposé. Elle peut être identifiée au régime linéaire de la partie III.1.2.2. Enfin, la troisième phase, une chute brutale de la longueur du bord pendant une dizaine d'heures, correspond à la jonction entre les deux bords jusqu'à la fermeture totale, et peut être identifiée à la phase de fermeture de la partie III.1.2.3.

L'augmentation de la longueur du bord au cours des 20 premières heures illustre quantitativement l'apparition des digitations dans la progression de la bande. Cependant, le rôle de ces digitations n'est pas évident au premier abord. On pouvait raisonnablement supposer qu'elles constituaient des déformations « aléatoires » du bord de l'épithélium orientées en direction de la « zone vierge » à cause de l'augmentation de la densité au sein de l'épithélium, et de résultantes non nulles des forces intercellulaires proche des bords. Les conclusions des sous-parties du chapitre III.1.3 laissent cependant penser au contraire que la cicatrisation n'est pas un phénomène « passif », principalement guidé par des contraintes mécaniques au sein de l'épithélium. L'apparition de « cellules leader » remarquables et différentes des autres cellules épithéliales aux extrémités des digitations nous mènent à envisager que ces digitations pourraient constituer le « moteur » de la cicatrisation.

Nous avons considéré l'évolution au cours du temps d'un groupe de digitations en mesurant la position de leur extrémité dans les directions parallèle et perpendiculaire à la bande au fur et à mesure de leur croissance ; les résultats sont présentés sur les figures suivantes :

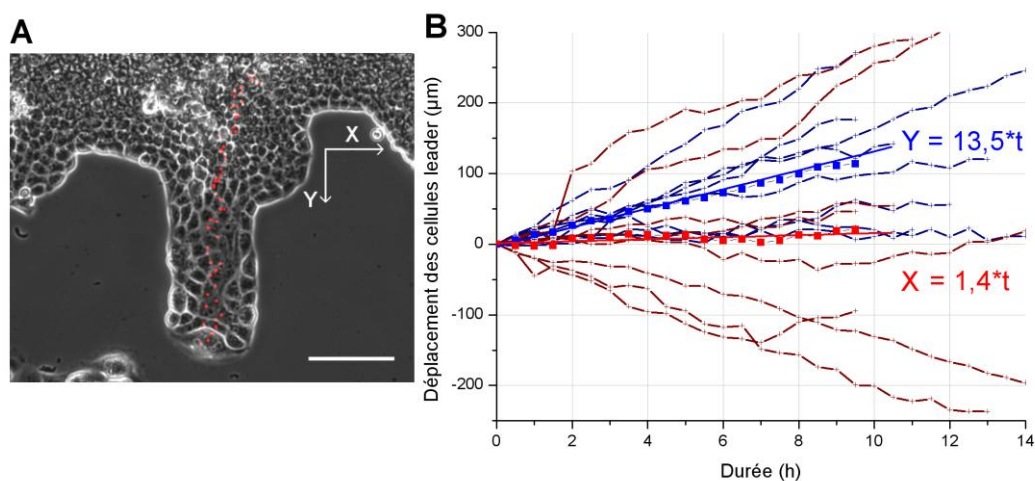


Figure 63 : Mouvement d'une cellule leader à l'extrémité d'une digitation au cours du temps. Les points rouges correspondent aux positions relevées toutes les 30 minutes (échelle 100  $\mu\text{m}$ ).

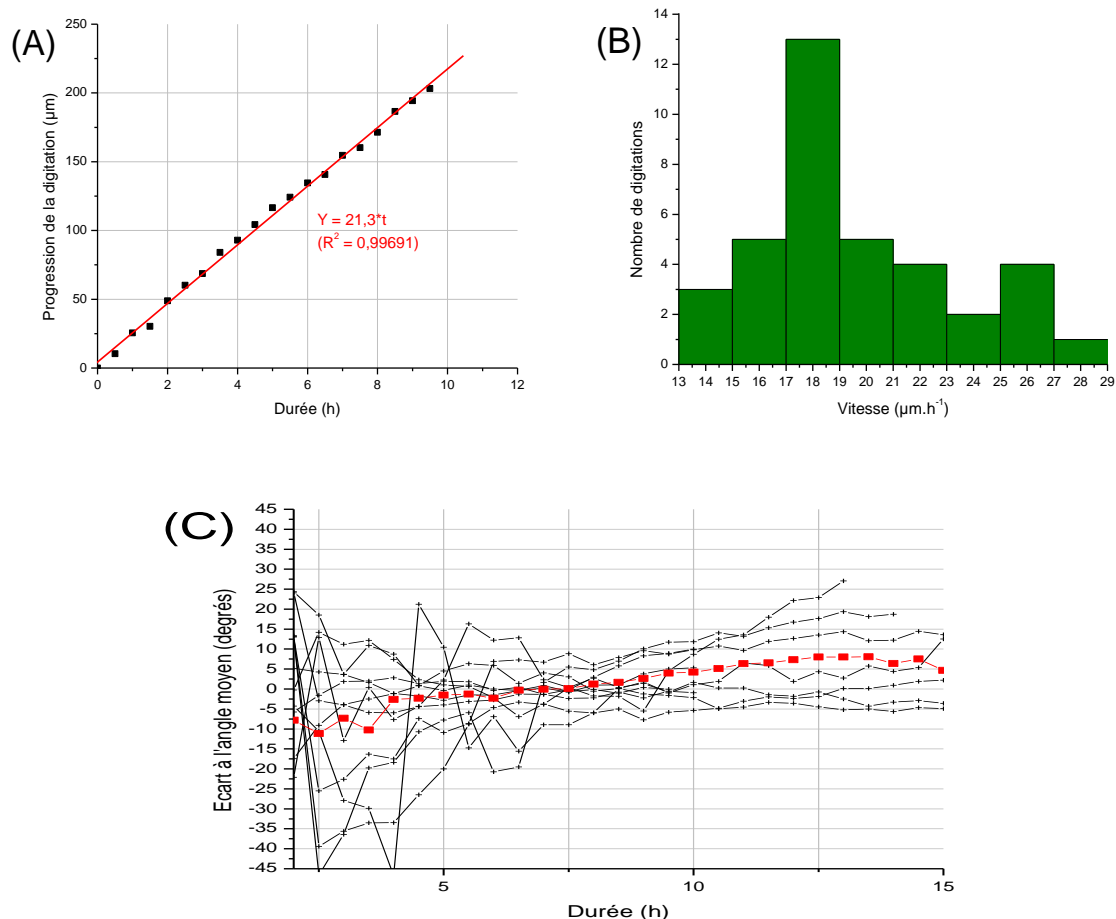


Figure 64 :

(A) Distance moyenne parcourue par les digitations en fonction du temps (définie comme la racine de la somme des carrés des distances parcourues horizontalement et verticalement). La vitesse de progression d'une digitation reste constante au cours du temps et s'établit en moyenne sur les 11 digitations considérées à  $21,3 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ , variant selon les digitations entre  $14$  et  $28 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ .

(B) Répartition des vitesses moyennes de progression sur 37 digitations (la figure (A) ayant établi que ces vitesses restaient constantes au cours du temps). Les digitations présentent de manière prépondérante une vitesse de l'ordre de  $18 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$  (vitesse moyenne des digitations considérées :  $19,5 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

(C) Écart entre la direction de progression (définie comme l'angle entre la position et la verticale) et la direction moyenne de progression. Au-delà des 5 premières heures, les digitations progressent dans une direction comprise dans une fourchette de  $\pm 15^\circ$  autour de leur direction moyenne, autrement dit dans une direction pratiquement constante au cours du temps.

Plusieurs informations intéressantes peuvent être tirées de ces mesures. Tout d'abord, dans la direction parallèle à la bande, le déplacement moyen sur l'ensemble des digitations est nul – sans grande surprise, étant donné que les deux sens sont équivalents étant donnée la géométrie adoptée. Cependant, en observant de plus près le mouvement dans chaque digitation, il apparaît clairement que celles-ci adoptent une vitesse horizontale pratiquement constante – même si la moyenne algébrique de ces vitesses est nulle. Or, un véritable mouvement aléatoire n'aurait pas fait apparaître une vitesse constante dans une digitation donnée, voire aurait occasionnellement montré des changements de sens de déplacement. La trajectoire

d'une digitation ne saurait donc être interprétée comme le résultat d'un mouvement aléatoire.

L'évolution verticale (dans le sens perpendiculaire à la bande) des digitations va également dans ce sens. Alors que l'on s'attendrait dans le cas d'un mouvement aléatoire (éventuellement autour d'une vitesse moyenne non nulle causée par l'avancée naturelle de l'épithélium sous l'effet de la densité croissante ou même d'un processus actif d'étalement) à observer une vitesse fortement bruitée, elle apparaît relativement constante au cours du temps. Plus directement encore, on remarque que les digitations sont quasi permanentes : une fois apparues, elles poursuivent leur avancée sans jamais être « rattrapées » par le reste de l'épithélium – sauf naturellement dans les rares cas où elles fusionnent avec une autre digitation, ou en fin de cicatrisation, lorsque le bord opposé est atteint.

Enfin, la vitesse moyenne de progression des digitations dans la direction orthogonale à la bande, de l'ordre de 13  $\mu\text{m}/\text{h}$  (fig. 63), est largement supérieure à la vitesse moyenne de l'épithélium mesurée dans la partie III.1.2 (8  $\mu\text{m}/\text{h}$ ). Cela nous mène à confirmer l'hypothèse que les digitations, loin d'être de simples déviations aléatoires, participent activement à la cicatrisation, en permettant à l'épithélium de progresser bien au-delà des limites qu'il atteindrait s'il ne faisait que s'étaler.

Cependant, le rôle que jouent ces digitations dans l'avancée de l'épithélium au cours du temps reste incertain à ce stade, et une question fondamentale se pose notamment : ces digitations « tirent-elles » le reste de l'épithélium derrière elles (par quel mécanisme ?), agissant ainsi comme de véritables moteurs, ou sont-elles « poussées » par le reste de l'épithélium, constituant simplement un front local de progression sur lequel se concentrent des forces cellulaires exercées collectivement par les cellules de l'intérieur de l'épithélium ? La compréhension de la mécanique à l'œuvre dans ces digitations passe ainsi par une étude de l'intérieur de l'épithélium, et en particulier du comportement et des propriétés des cellules individuelles qui le composent.

## 2. Phénomènes internes à la monocouche

Après avoir décrit le comportement global de la monocouche, nous allons maintenant nous intéresser aux hétérogénéités qui apparaissent à l'intérieur de l'épithélium, et au comportement individuel des cellules qui le composent, afin de comprendre la physique à l'œuvre dans l'épithélium.

Dans un premier temps, nous décrirons les propriétés des cellules particulières que sont les « cellules leader », ainsi que leur comportement au sein de la monocouche. Nous nous intéresserons ensuite aux différences de densité et d'orientation de l'ensemble des cellules en fonction de leur localisation dans la monocouche, puis à l'évolution de ces cellules au cours du temps, à travers leurs divisions et leurs vitesses individuelles au sein de l'épithélium. Enfin, nous étudierons les forces exercées par les cellules sur le substrat mesurées grâce à des micro capteurs de force, et les informations que nous pouvons en déduire sur les forces cellulaires dans l'épithélium.

### 2.1 Morphologie et comportement des cellules leader

Au cours de la réépithélialisation observée dans nos expériences, certaines cellules épithéliales situées au bord de la bande, les « cellules leader » (fig. 65), adoptent un phénotype très différent des autres, et jouent un rôle essentiel dans le processus de cicatrisation. De telles cellules leader ont été clairement identifiées dans des expériences de scratch-wound sur des cellules IAR2 de rein de rat [Omelchenko 2003]. En outre, on observe de cellules d'allure similaire sur limges d'articles décrivant la cicatrisation d'épithéliums MDCK [Farooqui 2005] ou de cornée [Grasso 2007]. Dans l'ensemble de ces observations cependant, on ne peut conclure quant à l'origine de ces leaders (conséquence de blessures infligées aux cellules du bord ou phénomène se produisant spontanément).

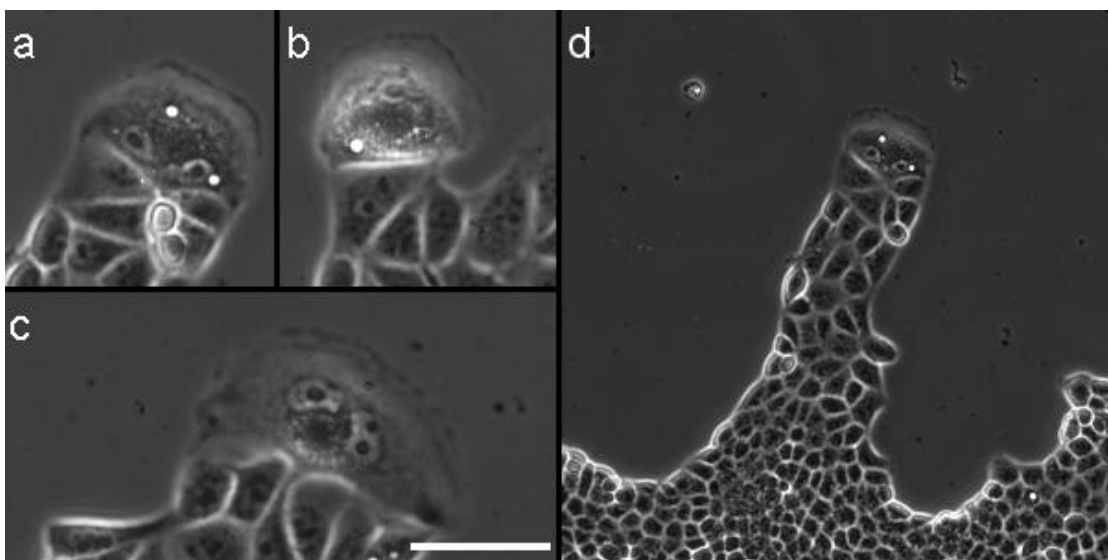


Figure 65 : Images de quelques cellules leaders (a, b, c) et d'une digitation surmontée d'une cellule leader (d) (Échelle : 50 $\mu$ m)



Ces cellules font leur apparition au bout d'une à deux heures après le retrait du pochoir. La majorité des cellules leader observées au cours de la cicatrisation apparaissent à ce moment-là, pendant une durée de l'ordre de quelques heures ; cependant, le phénomène n'est nullement limité à cette période, et l'on voit apparaître de nouvelles cellules leader tout au long du processus. En revanche, les cellules devenues leader le restent en permanence : nous n'avons pas observé de transformation inverse (cellule leader vers cellule épithéliale ordinaire).

Elles présentent de nombreuses caractéristiques qui les distinguent dans l'épithélium. Tout d'abord, leur taille est généralement 3 à 4 fois plus grande que celle d'une cellule ordinaire, de l'ordre de 50  $\mu\text{m}$  de large, et pouvant parfois atteindre 100  $\mu\text{m}$ , contre de l'ordre de 15 à 20  $\mu\text{m}$  pour les autres cellules dans une monocouche à confluence. Ensuite, à la différence des autres cellules situées au bord de l'épithélium, ces cellules présentent un lamellipode sur toute leur longueur exposée à la « surface libre », particulièrement actif. Une cellule leader semble ainsi particulièrement apte à se déplacer dans la zone intermédiaire, alors que les autres cellules situées au bord de l'épithélium paraissent davantage « poussées » vers l'extérieur que se déplaçant réellement dans cette direction.

D'autre part, nous observons que ces cellules possèdent fréquemment (plus de 50 % du temps) deux noyaux, comme si ces cellules avaient entamé une division sans la terminer. La division elle-même reste un événement particulièrement rare : si des divisions de cellules leaders ont parfois été observées, cela concerne moins de 1 % des cellules leaders sur des expériences de 48h (alors que ces cellules se divisent normalement au bout de 16h).

Lorsque les digitations sont assez nettement discernables, les cellules leaders se retrouvent aux extrémités de ces digitations ; dans certains cas, les digitations semblent même menées par plusieurs cellules leader côte à côte. Certaines irrégularités au bord de l'épithélium présentent un aspect proche des digitations précédemment décrites, mais n'incluent pas de cellule leader clairement identifiable à leur extrémité, celle-ci étant composée d'une ou plusieurs cellules épithéliales d'apparences et de tailles ordinaires, étendant parfois un petit lamellipode. Ces irrégularités ne présentant par ailleurs que peu de différences avec l'intérieur de l'épithélium en termes de densité ou de vitesse de progression (à la différence des digitations, voir parties III.1.4 ou III.2.3.2.2), nous ne les avons pas considérées comme des digitations à proprement parler : ce que nous désignons sous le terme de digitation dans ce travail ne concerne que les déformations présentant une cellule leader à leur extrémité.

Plusieurs informations sur ces cellules leader peuvent être obtenues par marquage immunofluorescent (fig. 66). Si la cellule leader a clairement perdu son caractère épithélial et est devenue très motile, elle reste néanmoins fermement accrochée aux autres cellules de l'épithélium à travers des jonctions cellule-cellule ; le marquage des cadhérines ne montre pas de différence à ce niveau avec les autres cellules. Il arrive que la cellule leader se détache et se mette à migrer individuellement, avant de se reconnecter éventuellement à l'épithélium, mais cela reste un événement rare (moins de 1 % des cellules leaders se détachent ainsi). Enfin, le marquage des adhésions focales montre que celles-ci sont particulièrement

nombreuses et développées dans le lamellipode de la cellule leader, confirmant que celle-ci adopte un comportement de cellule migrante.

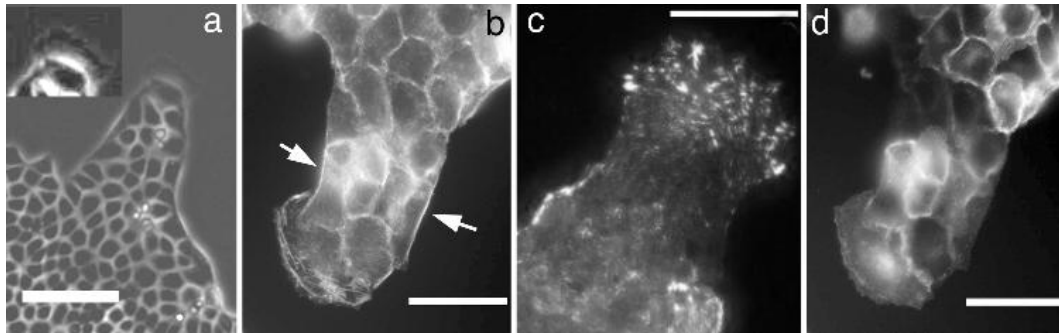


Figure 66 : (a) Image en contraste de phase d'une digitation portant une cellule leader présentant un lamellipode (échelle : 100µm). (b) Image par fluorescence du squelette d'actine, particulièrement visible aux bords de la digitation (flèches) (échelle : 50µm). (c) Image par fluorescence des adhésions focales (marquage de la vinculine par immunofluorescence), particulièrement développées sous la cellule leader (échelle : 50µm). (d) Image par fluorescence (marquage des E-cadhérines par immunofluorescence) des adhésions cellulaires entre les cellules de la digitation, en particulier entre la cellule leader et ses voisines (échelle : 50µm).

Les cellules épithéliales adoptant un comportement de cellules leader sont initialement indiscernables des autres, et peuvent parfois être originaires d'une division cellulaire à l'issue desquelles l'autre cellule-fille reste « ordinaire ». Comme indiqué précédemment, l'apparition des cellules leader se fait exclusivement au bord de l'épithélium, mais ces cellules peuvent tout à fait provenir de l'intérieur de la monocouche, s'étant par la suite retrouvées en bord de bande au cours des réorganisations internes de la monocouche avant de prendre leur caractère de leader.

La répartition des cellules leader tout au long de la bande est fortement irrégulière, mais ne semble pas totalement aléatoire (fig. 67).

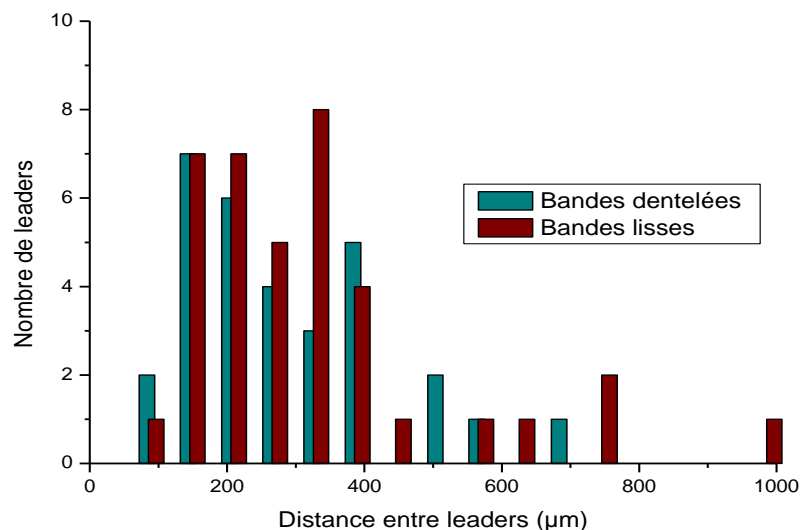


Figure 67 : Distribution des écarts entre cellules leaders pour des bandes lisses (38 distances entre deux cellules leaders, en rouge) et dentelées (31 distances entre deux cellules leaders, en bleu) au bout de 24h.

Au bout de 20h, on dénombre en moyenne une cellule leader tous les 300  $\mu\text{m}$ , mais il est possible de trouver deux cellules leader situées à moins de 100  $\mu\text{m}$  l'une de l'autre, ou de ne voir aucune cellule leader sur une distance pouvant atteindre 800  $\mu\text{m}$ . Toutefois, la majorité des cellules leader apparaissent à environ 300  $\mu\text{m}$  de leurs voisines. L'écart entre les cellules leader dans des bandes dentelées espacées de 200  $\mu\text{m}$  ne présente pas de différence significative avec les bandes lisses.

L'apparition des cellules leader n'est pas uniforme au cours du temps (fig. 68), et se concentre dans les 20 premières heures après le retrait du pochoir : sur des films de 48h, 70% des cellules leaders observées sont apparues dans ces 20 premières heures, correspondant à 41% de la durée totale des films. Néanmoins, l'apparition de cellules leader ne s'arrête jamais totalement ; même lorsque les digitations commencent à atteindre le bord opposé, il est possible de voir de nouvelles cellules leader apparaître sur un côté de digitation.

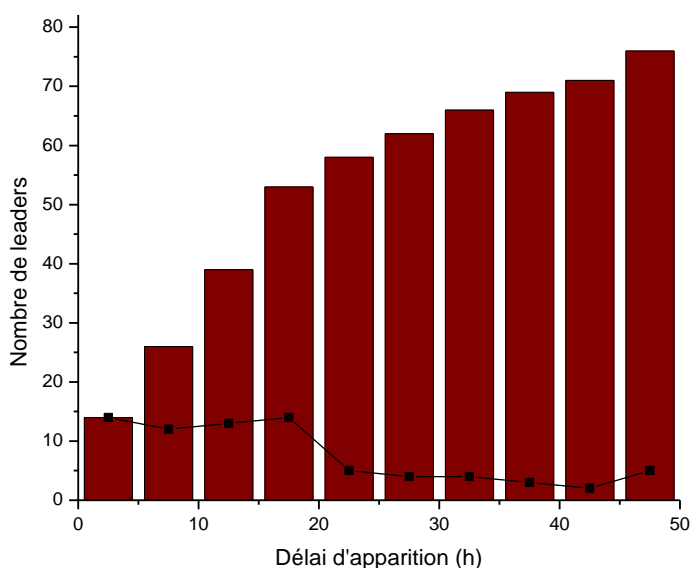


Figure 68 : Nombre total de cellules leaders (barres rouges) et nombre de nouvelles cellules leaders (carrés noirs) en fonction du temps sur des bords d'épithélium de longueur cumulée de 17mm.

Cette « limite » de 20h semble correspondre à la fin de la phase de progression parabolique décrite dans la partie III.1.2. L'apparition de cellules leader entraînant la formation de digitations dont la progression est rapide, la vitesse de progression varie linéairement avec le nombre de leader présents sur la bande. Or, pendant ces 20 premières heures, le nombre de cellules leader croît linéairement (au rythme d'environ 0,15 leader par heure et par mm de bord), entraînant donc une progression parabolique telle que celle que nous avons observée dans la partie III.1.2.1. Au-delà de ces 20h, de nouvelles cellules leader apparaissent, mais moins rapidement (environ 0,04 leader par heure et par mm de bord). En outre, ce ralentissement s'accompagne de la fusion latérale des digitations les plus proches (formant une nouvelle digitation présentant deux cellules leader à son extrémité, mais se comportant à tous points de vue comme une digitation ordinaire) ; le nombre de

digitations reste alors globalement stable, ce qui conduit à une progression linéaire de la bande.

Enfin, lorsqu'une cellule leader rencontre l'épithélium sur sa face présentant un lamellipode, généralement lorsqu'une digitation atteint la bande opposée, elle migre rapidement vers le bord le plus proche afin d'exposer à nouveau son lamellipode vers la « surface libre » et de continuer à couvrir l'espace encore vierge. Si cela est impossible – lorsque l'épithélium se referme totalement notamment – elle retrouve alors à ce moment-là une taille proche de celle d'une cellule épithéliale ordinaire, sans toutefois retrouver vraiment son caractère épithélial et devenir indiscernable des autres : sa forme devient sphérique, semblable à celle d'une cellule sur le point de se diviser, mais restant « bloquée » à ce stade de la division (fig. 69).

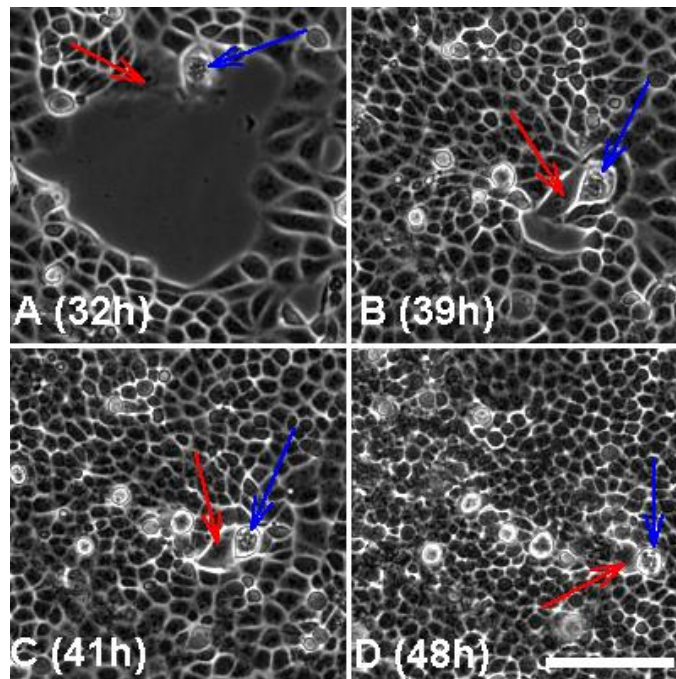


Figure 69: Comportement de deux cellules leaders (flèches rouge et bleue) lors de la fermeture locale de la blessure. Celles-ci adoptent une forme sphérique rappelant des cellules sur le point de se diviser, sans toutefois qu'une division ne soit observée sur une durée atteignant 9h (échelle : 100 $\mu$ m).

Cette donnée, ainsi que le fait que ces cellules soient souvent polynucléées, semble indiquer que les cellules leader pourraient être la conséquence d'une division cellulaire non aboutie. Toutefois, le processus de division supposé ne s'achève pas lorsque la cellule leader se retrouve en milieu d'épithélium ; de plus, l'introduction d'un inhibiteur de la division cellulaire, la mitomycine C, dans le milieu n'empêche pas la formation de cellules leader ou de digitation (voir partie III.2.5).

## 2.2 Flux internes dans l'épithélium

L'analyse par PIV (*particle image velocimetry*) d'images du bord d'une bande présentant des digitations permet de cartographier les déplacements internes se produisant dans l'épithélium et d'en obtenir une représentation visuelle claire, présentée sur la figure 70.

Ce champ de vitesse présente plusieurs caractéristiques notables, nous apportant des informations essentielles sur la dynamique de la cicatrisation. Tout d'abord, nous pouvons remarquer qu'il est très hétérogène dans l'espace : loin de suivre un mouvement synchronisé et ordonné dans la direction de l'espace entre les bandes, les cellules adoptent des vitesses ayant des directions et des valeurs très variées – certaines cellules allant même jusqu'à se déplacer vers l'intérieur de la bande. Mais pour autant, le mouvement des cellules n'est pas aléatoire : de larges zones démontrant un mouvement d'ensemble, coordonné de cellules voisines sont mises en évidence, particulièrement à proximité des digitations.

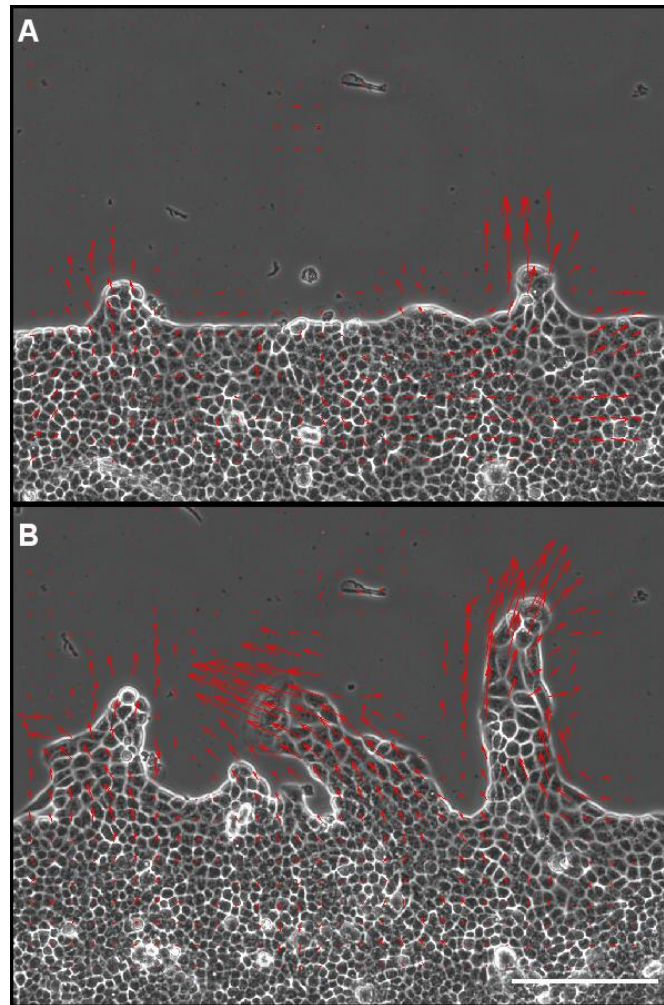


Figure 70: Flux à l'intérieur de l'épithélium à  $t=4h$  (A) et  $t=16h$  (B) après le retrait du pochoir (échelle :  $200\mu m$ ). La migration des cellules frontalières s'accompagne d'un mouvement coordonné en profondeur dans l'épithélium lors de l'apparition des digitations, puis dans les digitations elles-mêmes.

Ces mouvements s'étendent à une profondeur non négligeable importante dans la bande, de l'ordre de 100 ou 200  $\mu m$ , indiquant que l'apparition et l'extension des digitations résultent d'une dynamique d'ensemble de l'épithélium et rejoignant ainsi les conclusions de la partie III.1.4 : elles ne constituent pas une déformation aléatoire du bord de la bande, mais un mouvement coordonné des cellules à l'intérieur de l'épithélium.

Une observation plus précise des vecteurs vitesses dans la digitation permet de remarquer un phénomène intéressant : les vitesses aux extrémités des digitations sont plus importantes qu'au niveau où la digitation rejoint le reste de la bande (et qu'à l'intérieur de la bande), et semblent, cette fois, largement orientées dans la direction de l'axe formé par la digitation. Cette variation, rendue possible physiquement par la déformabilité des cellules, est un élément allant dans le sens d'une dynamique de progression de la digitation due à une traction de l'avant de la cellule – que l'on peut fortement soupçonner d'être due à l'action de la cellule leader.

Les champs de vitesses observés ne sont toutefois pas directement ceux des cellules, mais ceux de portions arbitraires de l'image de l'épithélium – même s'il semble raisonnable de croire qu'ils sont proches, étant donné la taille choisie proche de celle des cellules pour ces portions d'image – autrement dit, la PIV ne permet pas de discriminer entre les déplacements et les déformations des cellules. Si les cellules situées à l'avant de la digitation sont effectivement plus rapides que celles situées à l'arrière, cela devrait se traduire physiquement par, d'une part, une augmentation de la taille des cellules à l'extrémité des digitations, d'autre part, un biais de l'orientation des cellules de la digitation dans la direction de l'extrémité de la digitation. L'étude de ces caractéristiques des cellules fait donc l'objet des parties suivantes.

### 2.3 Taille des cellules et densité de la monocouche

Nous allons nous intéresser dans cette partie à la densité des cellules dans l'épithélium (ou, ce qui revient au même, à la taille des cellules de l'épithélium), à son évolution au cours du temps et à ses variations spatiales.

#### 2.3.1 Densité moyenne de l'épithélium au cours du temps

Dans un premier temps, elle a été évaluée directement, en comptant le nombre de cellules dans la bande à chaque acquisition, et en divisant par la surface couverte à ce moment-là par l'épithélium. Le résultat ne correspond donc pas à la variation locale de la densité en un point précis de l'épithélium, mais à la densité moyenne de l'épithélium sur la surface croissante qu'il recouvre. La courbe obtenue est présentée sur la figure 71.

Cette courbe présente un aspect similaire aux expériences de Rosen *et al.* : la densité augmente régulièrement depuis sa valeur initiale ( $4,6 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>) jusqu'à  $5,2 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> au bout de 6 à 8h, puis se stabilise [Rosen 1980]. Cette évolution résulte des influences opposées de deux phénomènes : l'augmentation de la surface occupée par l'épithélium, qui diminue la densité, et la division cellulaire, qui augmente cette densité. Nous verrons dans la partie III.2.5.1 que le nombre de divisions au cours du temps est constant, autrement dit, que le nombre de cellules augmente linéairement ; la surface occupée par l'épithélium progresse quant à elle de façon parabolique (voir partie 1.2.1) pendant les 10 premières heures, puis linéairement. La densité étant le rapport du nombre de cellules sur la surface, il est donc clair qu'elle commence par augmenter (lorsque la bande progresse peu), puis voit cette augmentation ralentir et enfin se stabilise (lorsque la vitesse de progression

de la surface est suffisante pour « absorber » l'excès de cellules provenant de la division), voire diminue dans certains cas. Nous reviendrons sur cet aspect dans la partie III.2.5.1.

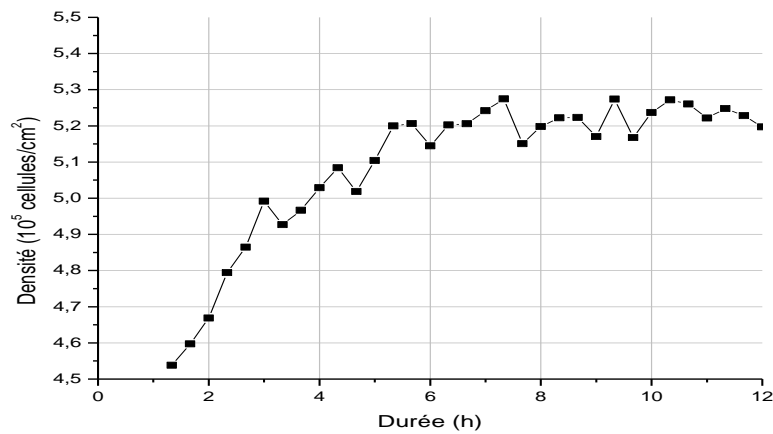


Figure 71 : Densité moyenne au cours du temps sur une bande épithéliale de 200µm de large.

### 2.3.2 Densités locales

Il est clair d'après les observations précédentes que les cellules situées dans les digitations ont un comportement différent du reste de l'épithélium. Afin d'évaluer proprement ces différences, nous avons donc réparti les cellules de l'épithélium en trois régions : dans une digitation, dans l'épithélium « proche du bord » hors d'une digitation, et « au milieu » de l'épithélium.

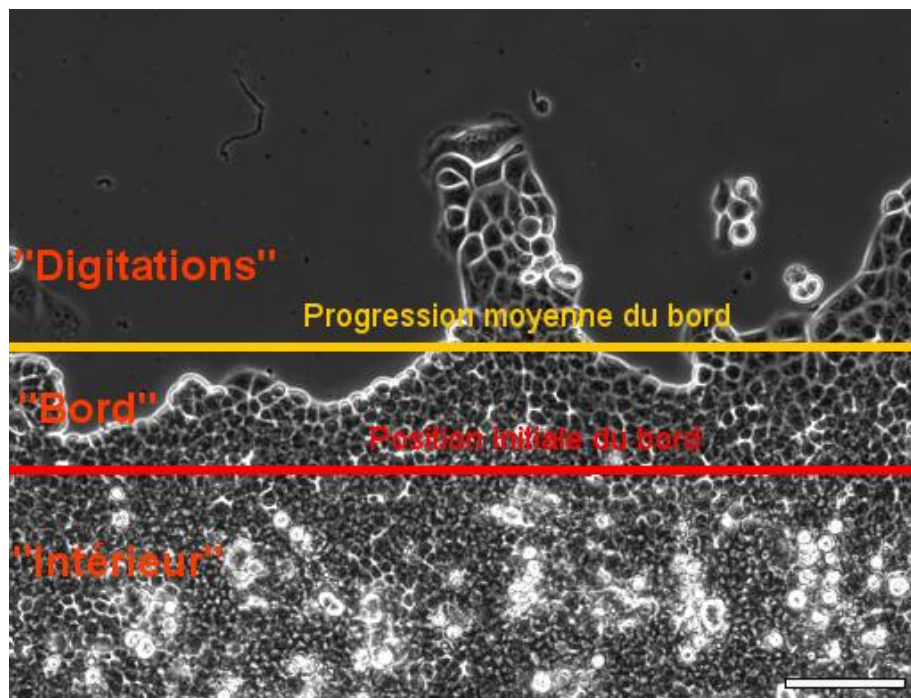


Figure 72 : Définition des zones d'intérêt dans l'épithélium. En jaune : progression moyenne de l'épithélium ; en rouge : bord initial de la bande (échelle : 100µm, délai après retrait du pochoir : 24h).

Ces trois régions ont été définies de la manière suivante sur plusieurs images montrant l'évolution d'une bande ordinaire au bout de 24h. Les cellules « dans une digitation » sont les cellules situées au-delà de la limite qu'aurait atteinte l'épithélium s'il progressait à une vitesse constante égale à la vitesse moyenne de progression. Les cellules « proches du bord, mais hors d'une digitation » correspondent aux cellules situées dans une zone comprise entre la limite initiale du bord de la bande au moment du retrait du pochoir, et la limite qu'aurait l'épithélium s'il avait progressé uniformément à sa vitesse moyenne. Enfin, les cellules « au milieu » de l'épithélium correspondent aux cellules situées dans la zone déjà occupée par l'épithélium au début de l'expérience.

### 2.3.2.1 Densité intérieure

Dans la zone « au milieu » de l'épithélium, nous observons deux comportements distincts. D'une part, jusqu'à une distance de 200 $\mu\text{m}$  par rapport à la limite initiale de la bande, la densité cellulaire est homogène, égale à la densité initiale, autour de  $5 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> (fig. 73). Cette densité reste globalement stable au cours de l'expérience, à deux exceptions près. Immédiatement après le retrait du pochoir en PDMS, la densité augmente légèrement pendant 5 à 10 heures, l'épithélium ne progressant pratiquement pas pendant cette période (qui correspond au début de la phase « parabolique » de la partie III.1.2) pendant que les divisions augmentent le nombre de cellules sur cette surface. Ensuite, lorsque les deux bords opposés se rejoignent et que la cicatrisation est proche de s'achever, l'épithélium semble ne pas pouvoir « évacuer » les cellules excédentaires issues de la division cellulaire, ce qui conduit à une nette augmentation de la densité, voire à l'expulsion de cellules au-dessus de la monocouche sous forme de petits agrégats.

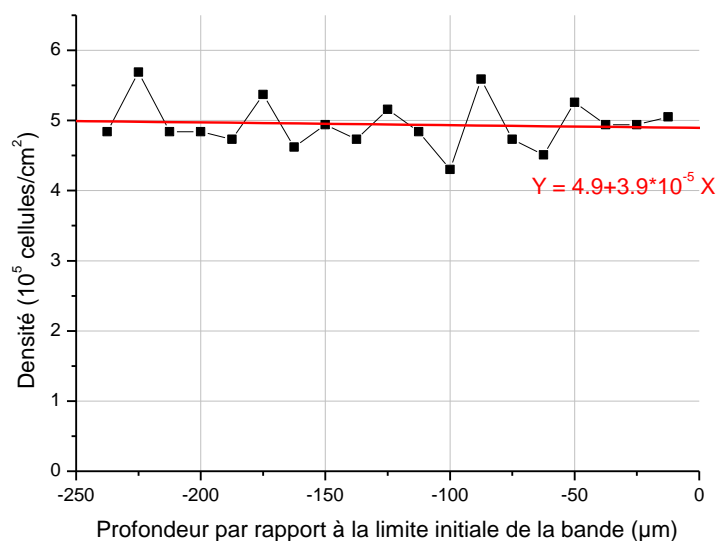


Figure 73 : Profil de densité moyen d'un épithélium (880 cellules) en fonction de la profondeur dans la zone initialement couverte par les bandes au bout de 24h. N.B. : la profondeur correspond ici à la distance par rapport à la position initiale du bord d'une bande, à 150 $\mu\text{m}$  de profondeur du bord de la bande hors des digitations.



D'autre part, au-delà de 200  $\mu\text{m}$  de profondeur, l'épithélium se densifie rapidement sous l'effet de la prolifération cellulaire jusqu'à plus de  $6.10^5$  cellules/ $\text{cm}^2$ , puis « évacue » les cellules excédentaires au-dessus de la monocouche (fig. 74), comme cela est observé pour un épithélium complet, sans « bord libre »<sup>1</sup>. Les cellules deviennent alors difficilement discernables, et la densité ne peut alors plus être mesurée correctement – sans tenir compte des cellules expulsées, on peut raisonnablement supposer qu'elle reste égale à la densité maximale de l'épithélium, soit  $6.10^5$  cellules/ $\text{cm}^2$ . L'existence de cette zone nous conduit à conclure que la propagation des contraintes mécaniques entre les cellules ne s'effectue que sur une profondeur limitée.

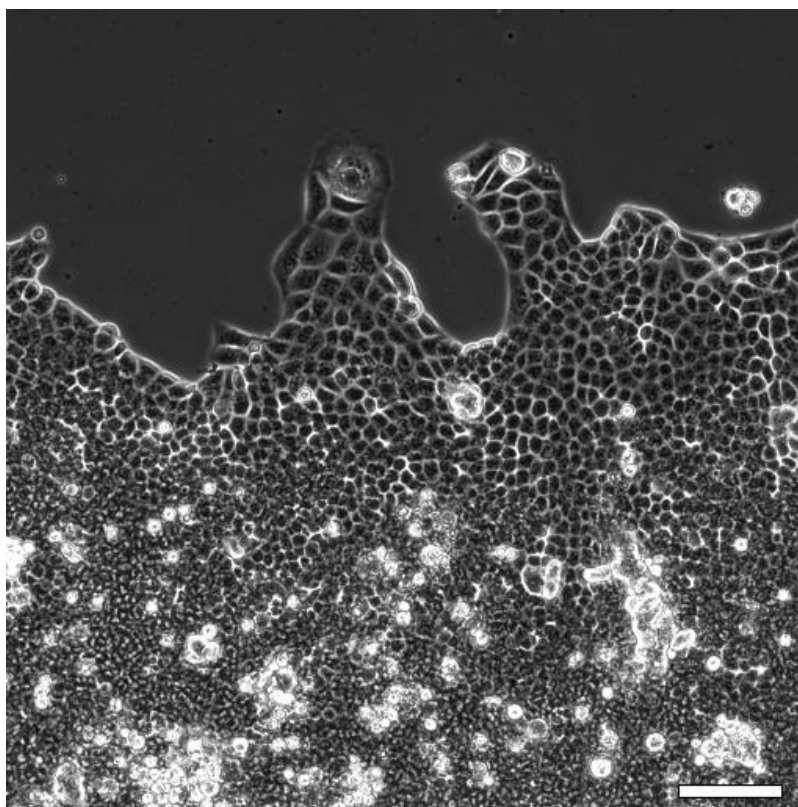


Figure 74 : Lorsque l'épithélium devient trop dense au centre de la bande, les cellules provenant de divisions sont expulsées hors de la monocouche (points blancs), tandis que les cellules deviennent difficilement discernables (échelle 100 $\mu\text{m}$  ; délai après retrait du pochoir : 20h).

### 2.3.2.1 Densité au bord de l'épithélium

Dans la zone « proche du bord et hors des digitations » (fig. 75), en revanche, nous observons une diminution progressive de la densité moyenne depuis l'intérieur (où elle est égale, par continuité avec ce qui est décrit dans la partie précédente, à  $5.10^5$  cellules/ $\text{cm}^2$ ) au fur et à mesure que l'on se rapproche du bord de la bande, où elle s'établit autour de  $4.10^5$  cellules/ $\text{cm}^2$ .

<sup>1</sup> Notons que cette zone peut être absente dans le cas de bandes suffisamment fines, comme cela est visible sur la figure 51.

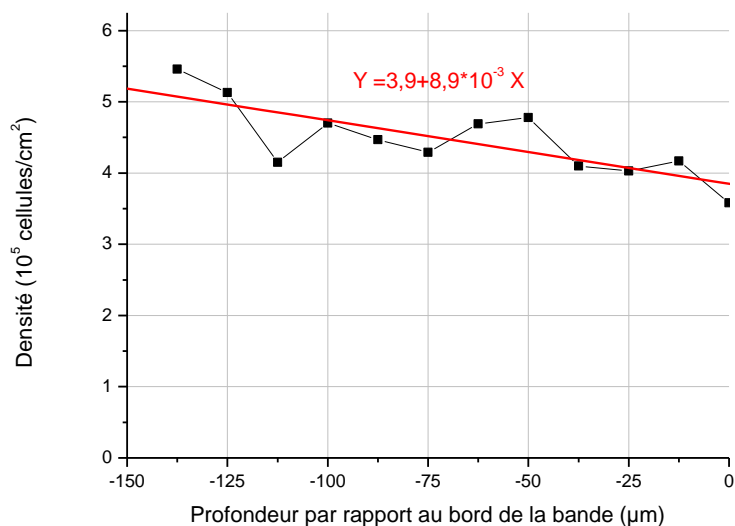


Figure 75 : Profil de densité moyen d'un épithélium (670 cellules) en fonction de la profondeur dans la zone initialement couverte par les bandes au bout de 24h. N.B. : la profondeur correspond ici à la distance par rapport au bord d'une bande hors des digitations, située à 150µm du bord initial de la bande (pris comme référence dans la figure 73).

La raison de la non homogénéité de la densité s'explique aisément par le fait que les cellules sont des objets déformables : celles-ci vont, avant de propager une contrainte, se déformer, jusqu'à ce qu'il soit plus « rentable » d'un point de vue thermodynamique, de tirer ou de pousser les cellules autour d'elles plutôt que de se déformer davantage. L'existence d'un gradient de densité s'explique ainsi par la présence d'une contrainte d'un côté ou de l'autre de la zone observée :

- soit les cellules de l'intérieur repoussent le reste de l'épithélium vers l'extérieur à cause des divisions cellulaires,
- soit les cellules situées sur le bord progressent vers la surface vierge et entraînent le reste de l'épithélium derrière elles.

Il est difficile de déterminer avec certitude sur la base de ces seules données laquelle de ces deux possibilités est la principale cause de cette variation. Néanmoins, nous pouvons remarquer que la densité de l'épithélium dans cette région ne s'établit qu'entre 5 et 5,5.10<sup>5</sup> cellules/cm<sup>2</sup> et ne présente pas ou peu de cellules expulsées de la monocouche : or, un épithélium peut se densifier par lui-même au minimum à 6.10<sup>5</sup> cellules/cm<sup>2</sup> puis expulser des cellules sous l'effet de la prolifération cellulaire. Le fait que la densité soit en-deçà de cette limite pour les cellules de cette région va ainsi plutôt dans le sens d'un épithélium tiré par les cellules du bord.

### 2.3.2.2 Densité dans les digitations

Les différences les plus intéressantes sont observées pour les cellules « dans les digitations ». Dans cette région, l'épithélium présente une densité beaucoup plus basse, s'établissant en moyenne entre 1,9 et 3,4.10<sup>5</sup> cellules/cm<sup>2</sup> selon les

digitations observées, soit la moitié de la densité initiale de la bande ; en d'autres termes, les cellules occupent en moyenne une surface double.

L'intérieur des digitations présente également des variations notables. Nous avons tracé sur la figure 76 le profil de densité d'une série de digitations de tailles comprises 100 et 300  $\mu\text{m}$ , et des portions d'épithélium situées derrière elles. Une autre manière de voir les choses consiste à observer la taille des cellules (définie comme la racine carrée de la surface des cellules) qui varie comme l'inverse de la racine carrée de la densité (fig. 77).

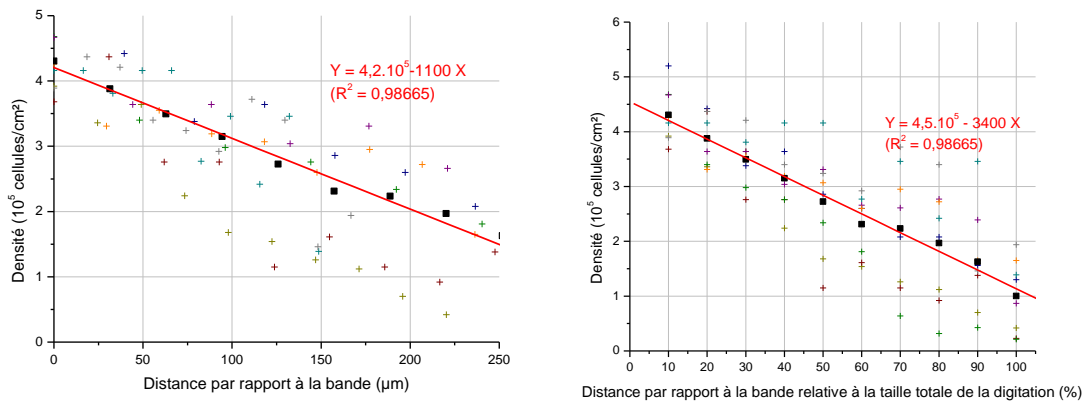


Figure 76 : Densité dans une série de 8 digitations (5 mesurées au bout de 20h et 3 au bout de 40h, correspondant à un total de 2140 cellules) en fonction de la distance par rapport à la base de la digitation, en valeur absolue et rapportée à la taille totale de chaque digitation. Les moyennes sont indiquées en carrés noirs.

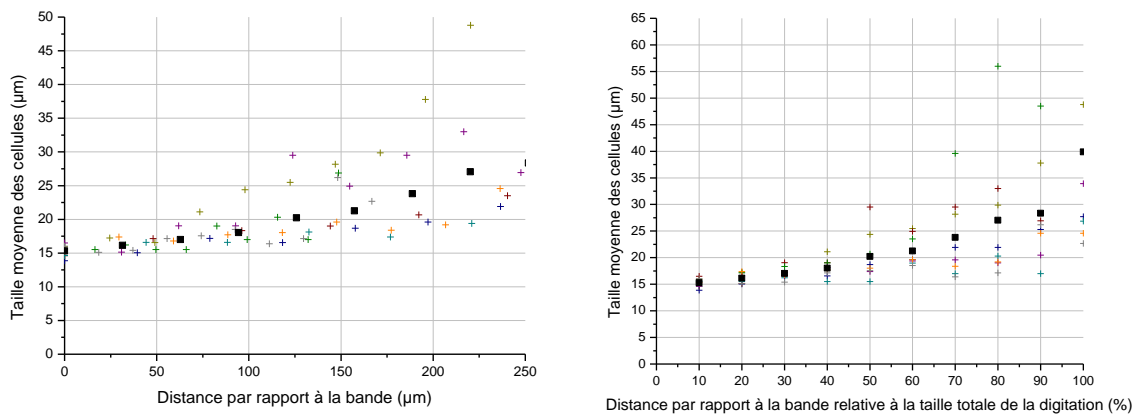


Figure 77 : Taille moyenne des cellules dans les digitations en fonction de la distance par rapport à la base de la digitation, en valeur absolue et rapportée à la taille de chaque digitation étudiée. La moyenne est indiquée en carrés noirs.

Une nette diminution de la densité cellulaire est observée au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la bande en direction de l'extrémité du doigt, passant de près de  $6 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> à la position qui correspondait initialement à l'origine de la bande jusqu'à devenir très faible à l'extrémité, où la bande n'est constituée que d'une seule

large cellule leader. Cette diminution s'effectue linéairement avec la distance ; de manière intéressante, nous pouvons noter que la pente ( $12 \cdot 10^{-3} \text{ cellules.cm}^{-2}.\mu\text{m}^{-1}$ ) est proche de celle que nous avons relevée pour le bord des bandes hors des digitations ( $8 \cdot 10^{-3} \text{ cellules.cm}^{-2}.\mu\text{m}^{-1}$ ). Il est donc vraisemblable que la diminution observée hors des digitations soit liée à celle observée dans les digitations, autrement dit, que les digitations, en instaurant une décroissance linéaire de la densité derrière elles, entraînent un rééquilibrage latéral de la densité. La diminution de la densité proche de l'extrémité démontre un étalement des cellules, non seulement des cellules leaders, mais également des cellules épithéliales « ordinaires » à proximité, allant jusqu'à doubler, voire tripler leur taille.

Ces résultats vont dans le sens d'une dynamique de traction par l'extrémité de la digitation (donc de la cellule leader), par opposition à une avancée sous l'effet d'une poussée issue de l'intérieur de l'épithélium. En effet, une densité en-deçà de  $2 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> n'est jamais observée « naturellement » dans un épithélium confluent (même non soumis à des contraintes spatiales telles que le PDMS des pochoirs) : il est clair que les cellules ont une taille supérieure à celle qui leur assure une stabilité optimale dans des conditions « normales ». La raison de cet étalement ne peut être due qu'à une traction exercée par les cellules voisines, et le gradient de densité pointe nettement en direction de la cellule leader.

Le fait que les cellules soient déformées sous l'effet de forces extérieures a été confirmé lors d'une expérience menée au laboratoire par M. Reffay : lorsqu'une digitation est scindée proche de son extrémité, les cellules situées proche de la base se rétractent légèrement, montrant ainsi qu'elles n'occupaient une surface plus élevée qu'à l'habitude que sous l'effet d'une contrainte provenant de l'extrémité de la digitation.

La figure 78 montre une image colorisée selon la taille des cellules mettant en évidence les disparités locales de densité dans la bande évoquées dans cette partie :

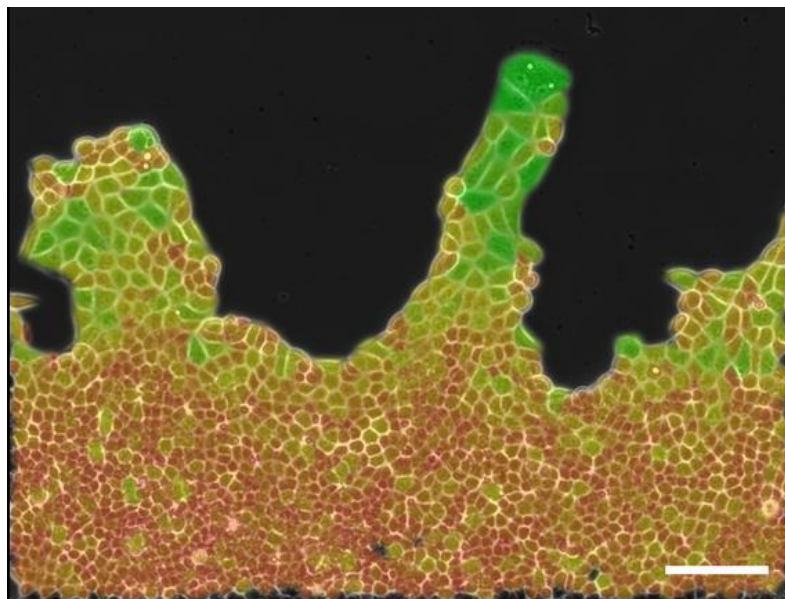


Figure 78 : Image d'une bande dont les cellules sont colorisées en fonction de leur taille (du rouge vif pour les plus petites au vert pour les plus grandes), permettant d'évaluer les différences de densité au sein de l'épithélium (échelle : 100µm).

## 2.4 Orientation des cellules

La partie précédente a mis en évidence l'existence d'un comportement particulier des cellules dans les digitations, que nous avons attribuée à une traction exercée par les cellules leaders situées à leurs extrémités. Si cela est bien le cas, nous nous attendons à observer des cellules déformées dans la direction de la digitation, autrement dit, perpendiculairement à la bande.

### 2.4.1 Orientation moyenne

Nous avons tout d'abord mesuré les orientations des cellules dans une bande après 20h d'évolution, celles-ci étant définies comme les angles entre la ligne formée par le bord initial de la bande (horizontale sur nos images) et le grand axe de l'ellipse épousant le mieux les contours de chacune des cellules (voir partie II.2.4). L'orientation moyenne des cellules a ainsi été établie à  $86^\circ$ , autrement dit verticalement sur nos images, confirmant le fait intuitif au vu de la géométrie de nos expériences qu'il n'y a pas d'orientation privilégiée dans la direction de la bande.

Cependant, cela ne nous permet pas de déterminer si les orientations perpendiculaires à la bande sont favorisées : nous avons donc représenté graphiquement la répartition des orientations (fig. 79) :

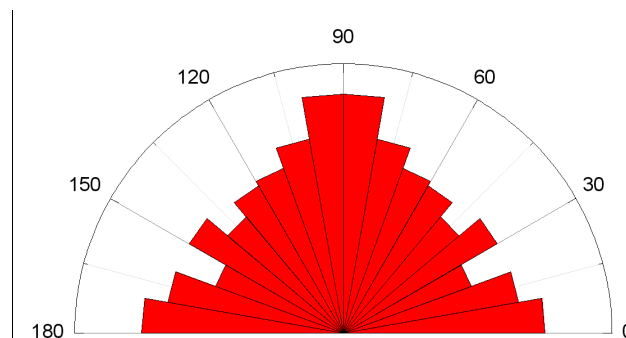


Figure 79 : Répartition des orientations (angle entre l'axe des cellules et le bord initial de la bande) dans un épithélium de 970 cellules 20h après le retrait des pochoirs. La distribution a été symétrisée autour de l'angle  $90^\circ$  en raison de l'équivalence des orientations correspondantes.

Cette distribution ne met pas en évidence l'existence d'un angle privilégié net dans la direction orthogonale à la bande ( $90^\circ$ ), comme nous l'envisageons. Cependant, la distribution ne paraît pas entièrement homogène : nous observons notamment que les orientations proches de  $0^\circ$  (ou  $180^\circ$ ) et proches de  $90^\circ$  sont légèrement surreprésentées.

Afin d'interpréter plus précisément ces résultats, nous avons étudié la répartition des cellules dans les 3 zones définies dans la partie III.2.3.2, « à l'intérieur » de la bande, « au bord » de la bande, et dans les digitations.

### 2.4.2 Orientation hors des digitations

La figure 80 présente la répartition des orientations dans la bande épithéliale hors des digitations, réparties en deux groupes, « à l'intérieur » de la bande (en-deçà du bord initial de la bande) et « au bord » de la bande (entre le bord initial et l'avancée moyenne de l'épithélium).

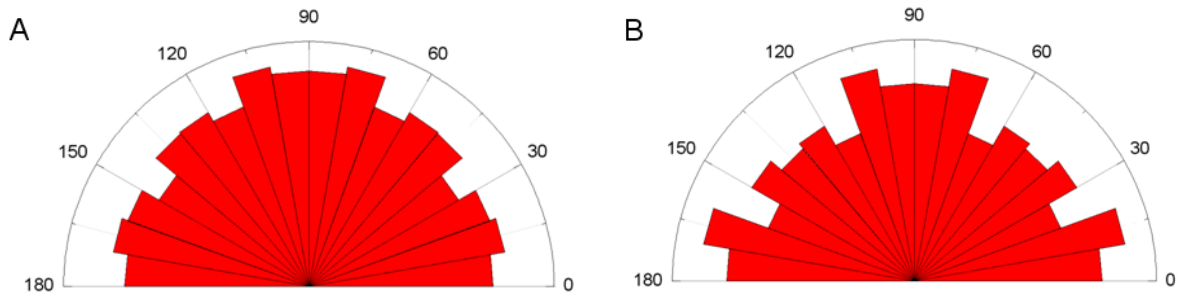


Figure 80 : A : Répartition des orientations des cellules en profondeur dans un épithélium (statistique sur 1451 cellules). B : Répartition des orientations des cellules au bord de l'épithélium, hors des digitations (statistique sur 827 cellules).

Dans cette région, l'orientation des cellules est clairement aléatoire, le léger excès, d'environ 5%, observé autour de 90° n'étant pas significatif. D'un point de vue stabilité, les cellules au sein de l'épithélium vont avoir naturellement tendance à adopter une forme circulaire minimisant la « tension superficielle » sur leur membrane, rendant toute orientation détectée le résultat de variations légères de forme autour de cette configuration stable. En tout état de cause, cette répartition montre que, si des forces contribuent à orienter les cellules plus proches du bord de l'épithélium, cet effet a une portée limitée.

### 2.4.3 Orientation dans les digitations

La répartition des orientations des cellules dans les digitations est indiquée sur la figure 81 :

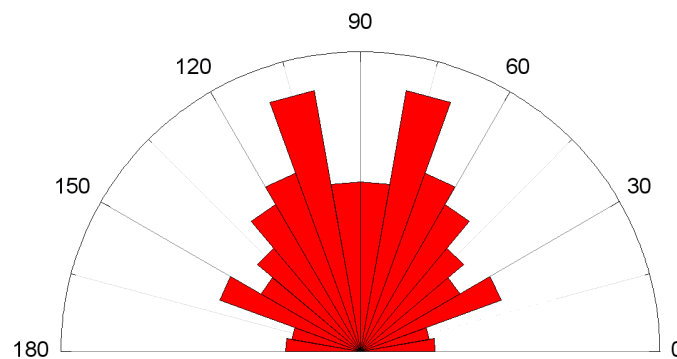


Figure 81 : Répartition des orientations des cellules dans 6 digitations (totalisant 270 cellules) relevées entre 20 et 40h après le retrait du pochoir.

Nous observons une orientation privilégiée autour de  $90^\circ$ , autrement dit dans la direction des digitations<sup>1</sup>, avec une très faible proportion autour de  $0^\circ$ , dans la direction parallèle au bord de la bande. Cela rejoint notre hypothèse de cellules tirées par la cellule leader dans les digitations : comme nous l'évoquions précédemment, une situation dans laquelle les cellules sont organisées selon une orientation privilégiée ne correspond pas à un optimum de stabilité, la déformation de la membrane nécessitant une force extérieure. Inversement, lorsqu'une force est appliquée sur une cellule dans l'épithélium, il est plus « économe » énergétiquement de déformer localement les cellules plutôt que de réorganiser l'épithélium, de la même manière que ce que nous avons observé pour la surface des cellules.

L'orientation privilégiée autour de  $90^\circ$  peut s'expliquer *a priori* par deux phénomènes : par l'existence d'une force « tirant » les cellules selon la direction d'angle  $90^\circ$  avec le bord initial, ou par l'existence d'une force « écrasant » les cellules selon la direction d'angle  $0^\circ$  avec le bord initial. La seconde possibilité semble peu probable : latéralement, les digitations sont exposées à la surface libre, sur laquelle les cellules pourraient progresser pour relaxer les contraintes. Étant donné le profil de densité observé dans la partie III.2.3.2.2, l'hypothèse d'une force dirigée vers l'extrémité de la digitation paraît nettement plus plausible.

Cependant, si l'orientation orthogonale à la bande est privilégiée, les autres orientations restent fréquentes, et nous sommes loin d'assister à un étirement de toutes les cellules vers la cellule leader : la déformation dans cette direction doit donc vraisemblablement être compensée par un autre phénomène. Nous avons ainsi supposé que la prolifération cellulaire pourrait jouer ce rôle ; cela sera abordé dans la partie III.2.5.

#### 2.4.4 Orientation des cellules par rapport à celle de la digitation

Jusqu'à présent, nous nous sommes essentiellement intéressés à l'orientation des cellules en considérant que les digitations étaient perpendiculaires à la bande – ce qui est vrai en moyenne, mais des écarts importants sont parfois observés (voir fig. 63). Nous avons donc ici considéré l'orientation des cellules par rapport à celle de la digitation dans laquelle elles se trouvent.

Nous avons tout d'abord considéré les digitations dont l'orientation est effectivement orthogonale au bord de la bande (fig. 82). L'angle moyen des cellules avec le bord s'établit à  $89,8^\circ$ , remarquablement proche de l'orientation moyenne des « ombres » des digitations considérées, de  $89,3^\circ$ . Nous pouvons donc légitimement considérer que les cellules s'orientent dans la direction de la digitation, autrement dit, dans la direction de la cellule leader.

---

<sup>1</sup> La raison pour laquelle le « pic » est en fait situé autour de  $80^\circ$  peut s'expliquer par le fait que les digitations ne sont pas toujours parfaitement perpendiculaires

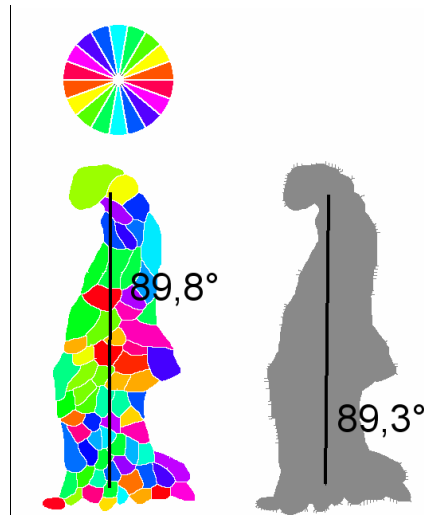


Figure 82 : Orientation moyenne des cellules dans une digitation (à gauche) et orientation de la digitation entière (à droite). En moyenne, les cellules s'orientent orthogonalement à la bande, dans la direction de la digitation.

Cependant, les mesures effectuées sur des digitations non orthogonales montrent des résultats légèrement différents (fig. 83). Si nous observons effectivement que l'orientation moyenne des cellules est déviée dans la direction globale de la digitation, ces deux directions ne sont pas confondues, la première se situant dans une région intermédiaire entre la seconde et la direction perpendiculaire à la bande. Ce résultat indique que, si les cellules sont orientées dans la direction de la cellule leader, vraisemblablement sous l'effet d'une traction de cette dernière, cette orientation ne résulte pas uniquement de ce phénomène, autrement dit, que les cellules non leader détectent dans une certaine mesure la direction perpendiculaire à la bande.

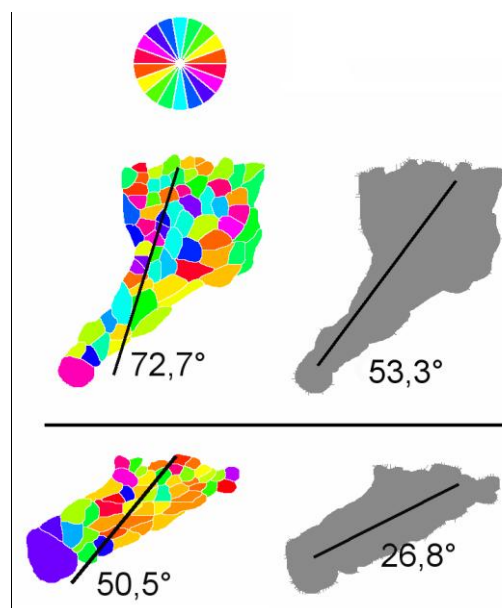


Figure 83 : Orientation moyenne des cellules de deux digitations non orthogonales à la bande (à gauche) et orientation des digitations entières (à droite). Les cellules s'orientent toujours dans la direction de la digitation, mais avec un léger décalage vers 90°.



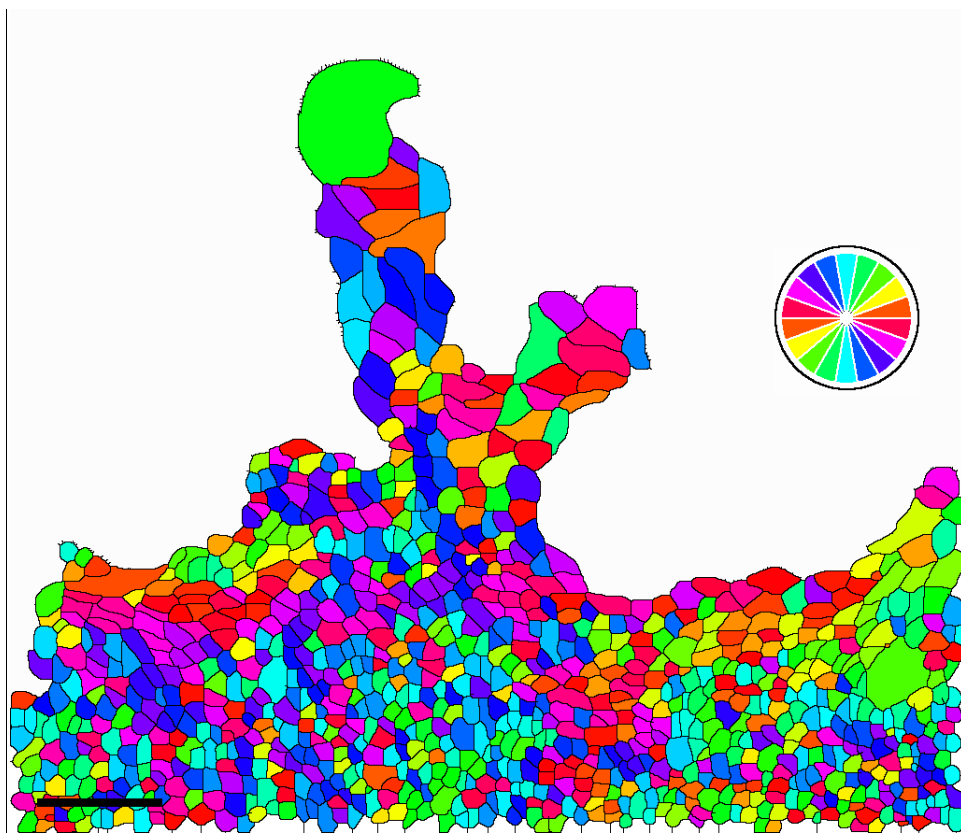


Figure 84 : Image d'une bande artificiellement coloriée des cellules en fonction de leur orientation (légende sur le disque colorée) (échelle : 100 $\mu$ m). Nous pouvons remarquer plusieurs ensembles de cellules de couleurs proches adoptant une orientation similaire en direction des digitations : à gauche en rouge/violet, dans la digitation centrale en bleu et à droite en jaune/vert.

## 2.5 Prolifération cellulaire

La cicatrisation de l'épithélium s'effectue *a priori* sous l'influence de deux processus physique : la migration cellulaire, qui conduit les cellules à se déplacer activement vers la surface vierge, et la division cellulaire, qui augmente la densité de la bande et conduit à « pousser » les cellules vers la surface vierge. Nous avons vu dans les parties précédentes le rôle important du premier ; cependant, le rôle de la division cellulaire mérite d'être exploré plus en détail.

Nous présenterons dans cette partie nos résultats concernant l'influence de la prolifération cellulaire dans la progression globale de l'épithélium, ainsi que les spécificités que présentent les divisions lors de la cicatrisation.

### 2.5.1 Prolifération au cours du temps

Nous avons vu dans la partie III.2.1 que les premières heures suivant le retrait du pochoir s'accompagnaient de l'apparition d'un nombre important de digitations, permettant à la bande de progresser de plus en plus rapidement. L'épithélium restant

cohésif, sa croissance se fait simultanément en augmentant la taille de certaines cellules et en augmentant le nombre de cellules. Le premier aspect ayant essentiellement été décrit dans la partie III.2.3, nous nous intéresserons ici à l'évolution de la prolifération cellulaire au cours du temps.

Les modèles théoriques de réépithélialisation après blessure de la littérature [Sherratt 1990, Sherratt 2002] mentionnent souvent une forte augmentation de la division cellulaire à proximité du bord de cette blessure lorsque les cellules commencent à migrer collectivement. Afin d'établir si nous retrouvons ce phénomène dans nos expériences, nous avons mesuré le nombre de divisions observées pendant les 15 premières heures<sup>1</sup> sur une profondeur de 200µm dans une bande (fig. 85).

Nous n'observons pas ici de variation notable du rythme de division au cours du temps. Celui-ci s'établit à une division par cellule en 24h, ce qui est même inférieur au cycle normal de division des cellules que nous avons utilisées (16h) : ainsi, la division cellulaire ne semble pas jouer ici le rôle moteur de la réépithélialisation qui lui était souvent attribué jusqu'ici. Nous pouvons par ailleurs remarquer que ce rythme de division, conduisant à une augmentation linéaire du nombre de cellules dans la bande, ne peut expliquer directement l'allure parabolique de la progression du bord décrite dans la partie III.1.2.1 : en réalité, le bord de la bande se densifie progressivement jusqu'à atteindre une valeur limite de 5 à 6.10<sup>5</sup> cellules/cm<sup>2</sup>. au bout d'environ 10h puis se stabilise, les nouvelles cellules alimentant la progression linéaire de l'épithélium qui a lieu par la suite (cf. figure 71).

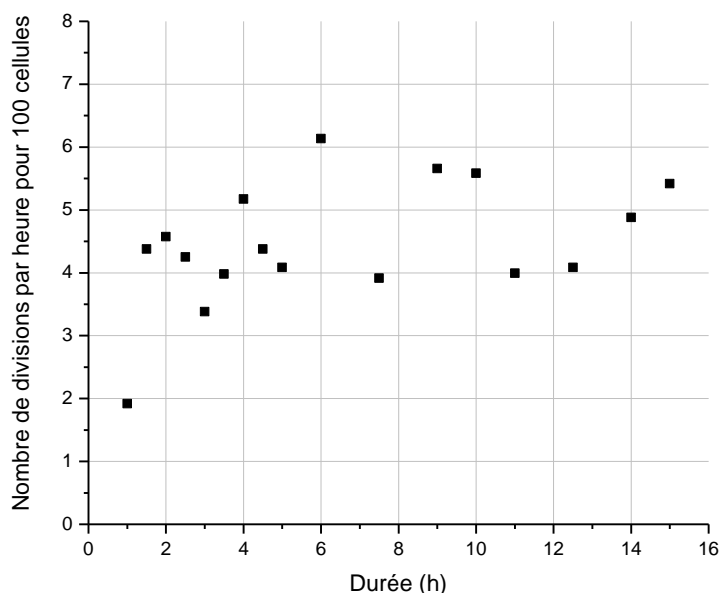


Figure 85 : Nombre de divisions par heure pour 100 cellules observées sur une profondeur de 200 µm au cours du temps sur 2400 cellules. La prolifération cellulaire paraît stable au cours du temps, se situant à 4,2% des cellules par heure.

<sup>1</sup> Au-delà, les cellules expulsées au-dessus de l'épithélium rendent le décompte précis des divisions difficile

Nous pouvons vérifier cette dernière remarque par un calcul simple. Sur une bande de 5mm de long et sur une profondeur de 200  $\mu\text{m}$  de densité de l'ordre de  $6 \cdot 10^5$  cellules/ $\text{cm}^2$ , les divisions entraînent une augmentation 4,2% de la surface initiale par heure, soit 8,4  $\mu\text{m}/\text{h}$ , autrement dit la valeur moyenne trouvée dans la partie III.1.2.2 (8,5  $\mu\text{m}/\text{h}$ ). Autrement dit, au cours de cette phase linéaire, la prolifération cellulaire dans les 200  $\mu\text{m}$  au-delà du bord initial fournit le nombre nécessaire de cellules au maintien d'une densité quasi constante dans cette région – d'où notamment la valeur constante de la densité moyenne dans une bande de 200  $\mu\text{m}$  au cours du temps de la partie III.2.3.1 ou celle stable à  $5 \cdot 10^5$  cellules/ $\text{cm}^2$  sur une distance de 200  $\mu\text{m}$  au-delà du bord initial après 24h de la partie III.2.3.2.1, alors qu'au-delà de ces 200  $\mu\text{m}$ , la densité devient rapidement très élevée et difficile à déterminer à cause des cellules expulsées de la monocouche.

### 2.5.2 Influence de la prolifération dans le mécanisme de cicatrisation

Nous avons vu précédemment que l'apparition du bord libre ne suffit pas à déclencher par lui-même une accélération de la prolifération cellulaire. La question se pose donc de savoir si, au-delà de leur rôle essentiel dans le renforcement de l'épithélium au fur et à mesure de la cicatrisation, les divisions cellulaires constituent effectivement un déclencheur de la réépithélialisation en augmentant la densité de l'épithélium.

Nous avons étudié pour cela la cicatrisation d'un épithélium en présence de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de mitomycine C, un inhibiteur de la division cellulaire. Cette molécule agit sur la division en se liant à l'ADN au moment de l'interphase, empêchant ainsi sa duplication et bloquant l'ensemble du processus. Les cellules ainsi bloquées ne sont toutefois pas viables et finissent par mourir ; nous n'avons ainsi pas pu observer l'évolution de la bande au-delà d'une dizaine d'heures. Toutefois, cet intervalle de temps est suffisant pour constater un comportement similaire de la bande, avec l'apparition de digitations, et une vitesse moyenne de progression sensiblement égale (figure 86).

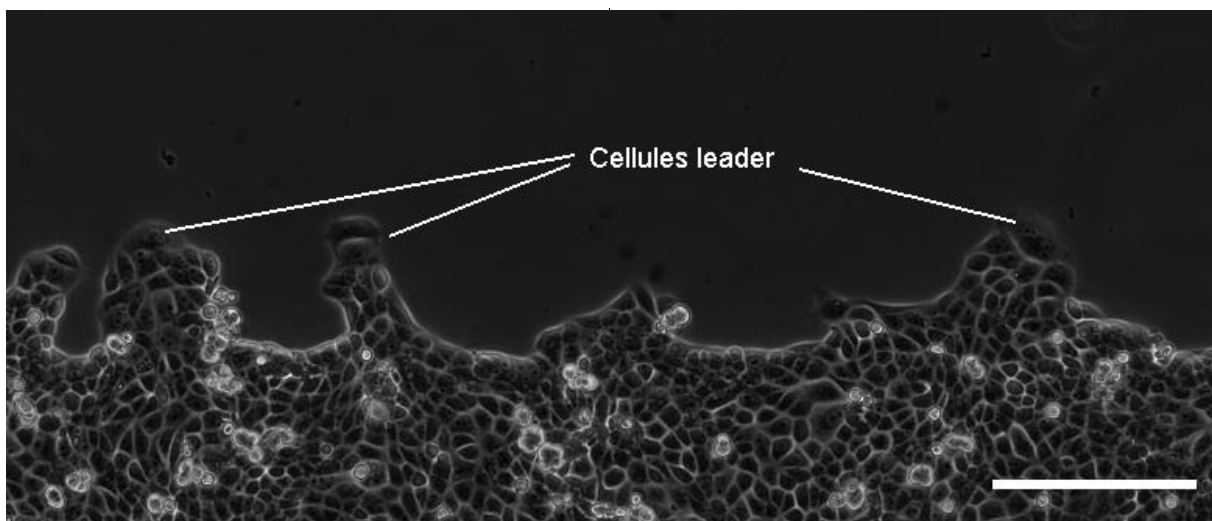


Figure 86 : Image du bord d'un épithélium en présence d'un inhibiteur de la division cellulaire au bout de 12h (échelle : 100 $\mu\text{m}$ ). Même lorsque la division cellulaire est inhibée, des cellules leaders et des digitations apparaissent au bord de l'épithélium.

Il est intéressant de noter que même lorsque la division cellulaire est inhibée, l'apparition de cellules leaders n'est pas empêchée. Nous évoquons dans la partie III.2.1 l'hypothèse que les cellules leader résultent de la division inachevée d'une cellule ordinaire, ce que semble infirmer cette expérience. Notons toutefois que nous n'observons pas ici de cellules leader polynucléées alors que cela est courant dans nos autres expériences.

Cette expérience apporte une preuve supplémentaire que l'apparition des digitations, et plus généralement le processus complet de cicatrisation, se déclenche de par la simple existence d'un bord, et non sous l'effet de l'augmentation de densité dans la bande. À plus long terme, il est probable que la progression de la bande soit ralentie voire stoppée par le manque de divisions, les cellules ne pouvant s'étaler indéfiniment, mais le comportement similaire au début du processus montre que l'apport de nouvelles cellules à travers les divisions ne joue qu'un rôle de support, maintenant la densité dans la bande au fur et à mesure de sa progression. Le fait que la division cellulaire ne joue qu'un rôle passif dans la cicatrisation (alimentant seulement l'épithélium au fur et à mesure de sa progression) est par ailleurs compatible avec les résultats que nous avons obtenus dans la partie III.1.3.3 établissant que la densité initiale n'avait pas d'influence sur la cicatrisation : si les divisions déclenchaient ou favorisaient la cicatrisation, l'augmentation de la densité initiale entraînerait un nombre plus élevé de divisions cellulaires par unité de surface et donc une accélération ou au moins une modification du comportement de l'épithélium lors de la cicatrisation.

### *2.5.3 Orientation des divisions*

Nous avons observé dans la partie III.2.4 que la progression des digitations s'accompagnait d'une orientation des cellules dans la direction orthogonale à la bande. Cependant, l'effet n'est pas de 100% et de nombreuses cellules s'orientent aléatoirement, contrairement à ce que l'on attendrait si les digitations étaient bien tirées par la cellule leader. Nous avons donc cherché à déterminer si les divisions cellulaires n'intervenaient pas également : en effet, les cellules soumises à une contrainte selon un axe donné ont tendance à se diviser dans la direction de cet axe [Théry 2007], donnant alors naissance dans l'espace initialement occupé par la cellule-mère à deux cellules-filles ayant donc des orientations beaucoup plus aléatoires. Si cette observation est confirmée dans nos expériences, cela pourrait expliquer pourquoi la répartition des orientations des cellules reste peu inhomogène.

Les divisions ont tout d'abord été repérées visuellement en traçant en rouge sur nos images les segments liant les deux cellules-filles à l'issue d'une division, d'une part dans les digitations, d'autre part dans le reste de l'épithélium ; un exemple de telles images est indiqué sur la figure 87 :

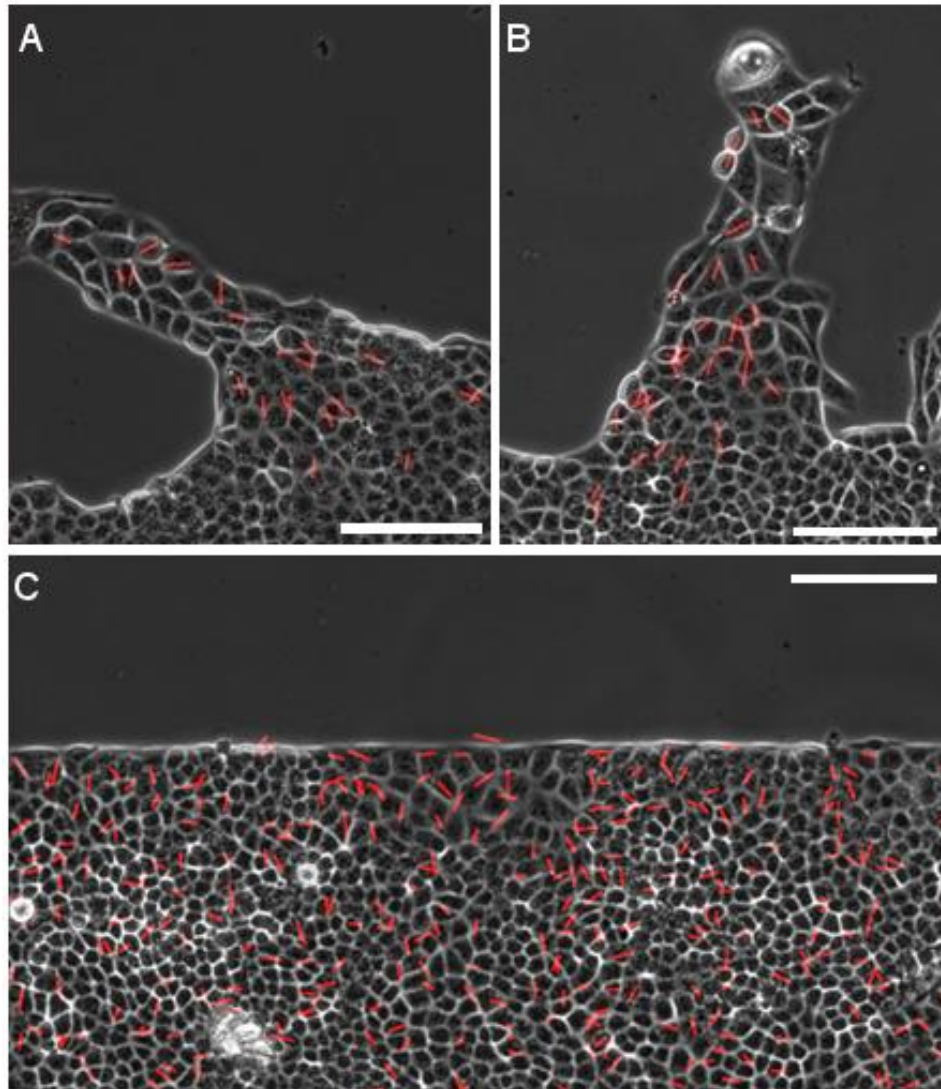


Figure 87: Orientation des divisions dans une digitation (A, B) et à l'intérieur de l'épithélium (C). Les traits rouges relient les centres des cellules-filles (échelle : 100 $\mu$ m).

Il nous a semblé clair d'après ces images qu'à l'intérieur de chaque digitation, les divisions avaient tendance à s'effectuer dans la direction globale de cette digitation, de façon beaucoup plus évidente que ce que nous observons pour l'orientation des cellules. Nous avons donc étudié de manière similaire à ce que nous avons réalisé dans cette partie la répartition des orientations des divisions. Comme indiqué dans la partie II.2.4, chacune de ces orientations a été définie comme l'angle entre la droite reliant les noyaux des cellules-filles et une droite reliant la cellule-mère et la cellule leader. Cette définition nous a paru plus adaptée qu'un simple angle par rapport au bord initial de la bande (comme nous l'avons fait pour les orientations de cellules) en raison des conclusions obtenues précédemment : si les cellules sont effectivement tirées par la cellule leader, l'orientation préférentielle devrait être observée vers la cellule leader et non simplement perpendiculairement à la bande ou dans la direction de la digitation. Pour permettre une comparaison plus facile avec les autres graphes, cet angle a été décalé de 90°, de sorte qu'une division donnant naissance à deux cellules-filles alignées avec la cellule leader ait une orientation de 90° (fig. 44).

La répartition a été évaluée dans les digitations et dans le reste de l'épithélium pour établir si les divisions adoptaient un comportement spécifique dans les premières ; les résultats sont présentés sur la figure 88 :

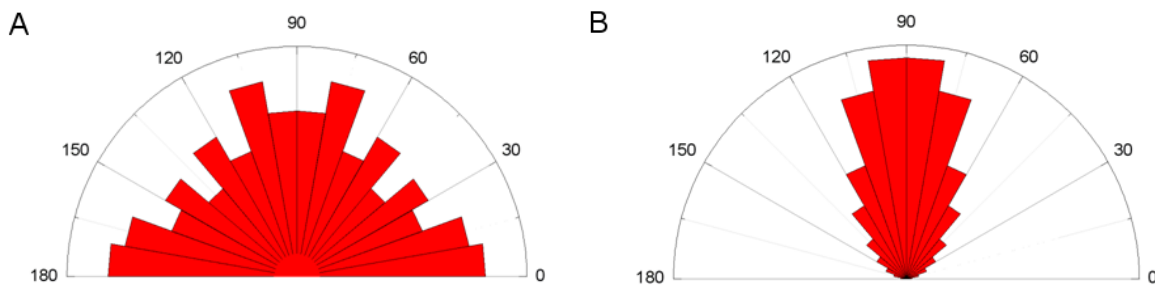


Figure 88 : Répartition des orientations des divisions (A) dans la bande hors digitations ( $90^\circ$  correspondant à une division perpendiculaire au bord initial de la bande) et (B) dans les digitations ( $90^\circ$  correspondant à une division orientée dans la direction de la cellule leader).

Les observations qualitatives sur l'orientation des divisions se trouvent confirmées de manière évidente par ces mesures : sur l'ensemble des digitations observées, les divisions se font en quasi-totalité dans la direction de la cellule leader (80% des divisions sont alignées à moins de  $20^\circ$  avec la cellule leader), alors que dans le reste de l'épithélium, les divisions s'orientent aléatoirement ; des résultats similaires, quoique moins prononcés, sont observés si l'on se contente de prendre l'angle entre la division et l'orientation globale de la digitation.

Ce résultat confirme l'hypothèse émise au début de ce chapitre : nous observons un fort effet d'orientation des divisions se produisant dans les digitations dans la direction de la cellule leader, ce que nous interprétons comme une preuve qu'il existe une force intercellulaire dans les digitations dirigée vers leur extrémité. En effet, la disposition des cellules-filles est déterminée par les positions des centrosomes de la cellule-mère au moment de la division, qui sont à l'origine des fuseaux de mitotiques selon lesquels les chromosomes migreront lors de l'anaphase [Théry 2007], Or, ces positions des centrosomes sont déterminées en grande partie par l'orientation des microtubules qui y sont liés : lorsque la cellule est soumise à une contrainte dans une certaine direction, les microtubules (comme les filaments d'actine) s'orienteront majoritairement dans cette direction, et conduiront ainsi à répartir les centrosomes selon cette même direction.

Cet effet d'orientation des divisions permet par ailleurs d'expliquer le fait que l'on n'observe qu'un faible effet d'orientation des cellules dans la direction de la digitation : chaque couple de cellules-filles occupe l'espace initialement occupé par une seule cellule, or, en étant majoritairement alignées avec la cellule leader, leur dimension dans la direction de la cellule leader est divisée par deux, d'où une probabilité plus forte que les grands axes de leurs « best-fit ellipses » ne soient pas orientés dans cette direction. Si l'on ajoute à ce phénomène la réorganisation locale des cellules qui suit une division, cela aboutit à diminuer lors de chaque division le nombre de cellules orientées vers la cellule leader (fig. 89).

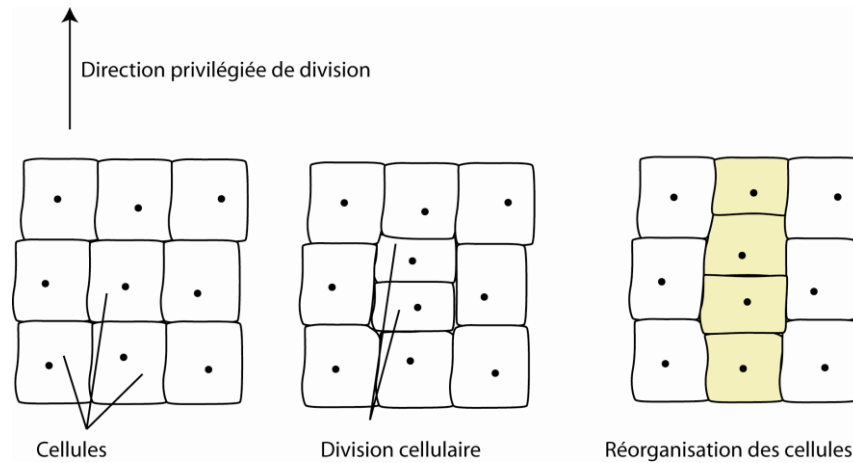


Figure 89 : Des divisions cellulaires selon une direction privilégiée tendent à favoriser les orientations de cellules orthogonales à cette direction, ce qui limite l'orientation « naturelle » des cellules dans la direction de la digitation.

## 2.6 Mesure des forces à l'aide de microplots

Nous présentons dans cette partie les résultats que nous avons tirés des mesures de forces par l'intermédiaire de microplots selon le procédé décrit dans la partie II.3. À cause des difficultés expérimentales évoquées, les données obtenues sont peu nombreuses et difficiles à interpréter ; néanmoins, nous tenons à évoquer les informations que nous avons pu tirer de quelques expériences sur lesquelles des mesures concernant les forces dans les digitations ont pu être effectuées avec un minimum de fiabilité.

La figure 90 présente une cartographie des forces exercées sur des microplots situés en-dessous d'une digitation de 6 cellules présentant deux cellules leaders :

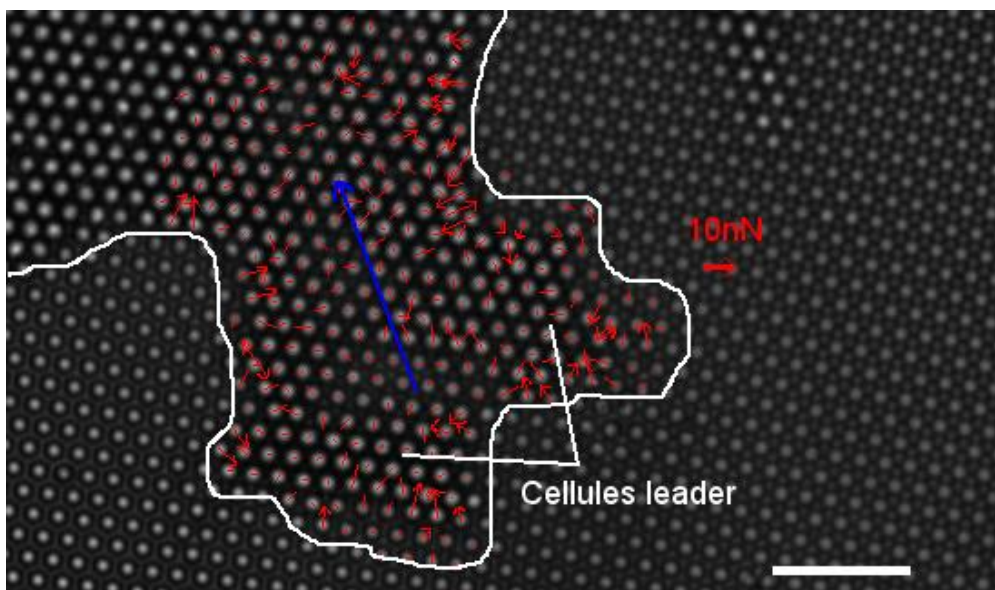


Figure 90 : Cartographie des forces s'exerçant sur le substrat par les cellules dans une digitation. Les traits rouges indiquent l'intensité et la direction de la force exercée localement, la ligne blanche les bords de l'épithélium et la flèche bleue la force résultante (échelle : 10 $\mu$ m).

Tout d'abord, il apparaît nettement que les forces exercées sur les bords de l'épithélium sont plus importantes en intensité qu'à l'intérieur. Elles s'élèvent ainsi généralement entre 5 et 10 nN par microplots sur les premières rangées de microplots contre rarement au-delà de 5 nN à l'intérieur de la digitation, tandis que leur direction est orientée vers l'intérieur de la digitation, perpendiculairement au bord. Nous retrouvons ici un comportement similaire aux expériences de Saez [2006] sur des îlots de 10 à 20 cellules, où était observée une chute rapide sur quelques microns de la force exercée sur le substrat. Nous pouvons remarquer que ces forces plus importantes sont détectées au niveau des cellules leader, mais également sur les bords de la digitation, du moins pour ces doigts peu développés. Cela signifierait donc que plusieurs cellules du bord de la digitation (et non les seules cellules leader) participent au mouvement d'ensemble.

À l'échelle de cette digitation modeste de 6 cellules, la force résultante (somme de l'ensemble des forces exercées sur les digitations) s'élève à 120nN, soit 20nN en moyenne par cellule, selon une direction faisant un angle de  $110^\circ$  avec l'horizontale, autrement dit, proche de la direction dans laquelle progresse la digitation (aux alentours de  $135^\circ$ ). Cette force résultante significative est dirigée vers l'intérieur de l'épithélium : elle apporte ainsi une preuve que la dynamique de progression de l'épithélium lors de la cicatrisation s'effectue sous l'effet d'une migration active des cellules situées dans la digitation.

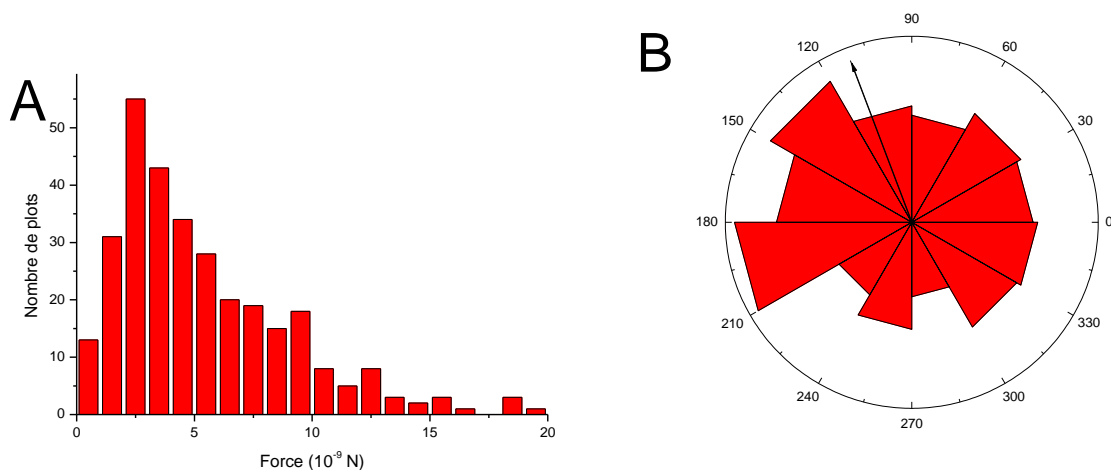


Figure 91 : (A) Distribution des forces exercées sur les microplots. (B) Distribution des directions des forces exercées sur les microplots (la flèche indique la direction de la force résultante)

Ces premières expériences, bien que difficilement exploitables quantitativement à ce stade, ont néanmoins permis de montrer que la mesure de force à l'aide de microplots était possible dans le cas d'une réépithélialisation après retrait d'un pochoir. Le protocole expérimental devrait être amélioré afin de cartographier plus précisément les forces, et notamment de déterminer si nous observons une décroissance de la force lorsque l'on se dirige de l'extrémité de la digitation vers l'intérieur, signe que les forces exercées par les cellules les unes sur les autres diminuent lorsque l'on s'éloigne de la cellule leader.



### 3. Description schématique de la migration collective lors de la cicatrisation

À l'aide des observations expérimentales décrites dans ce travail, nous proposons une description schématique rendant compte de la cicatrisation de bandes d'épithélium. Nous commencerons par décrire les hypothèses sur lesquelles nous nous sommes appuyés ainsi que leur justification expérimentale, puis nous montrerons comment ce mécanisme permet ensuite par des arguments géométriques simples de retrouver les principaux résultats et lois d'évolution décrites dans ce chapitre.

#### 3.1 Présentation et hypothèses

Pour représenter les cellules migrant sur une surface, nous avons choisi d'utiliser une grille, formant des cases qui peuvent être occupées ou non par des cellules. Le pas de cette grille, autrement dit la longueur d'une case, est choisi égal à la taille caractéristique moyenne d'une cellule dans un épithélium à confluence, soit  $12\mu\text{m}$  environ (chaque case représentant alors environ  $150\mu\text{m}^2$ ). L'apparence initiale d'une bande au moment du retrait d'un épithélium est donc telle que montrée sur la fig. 92 :

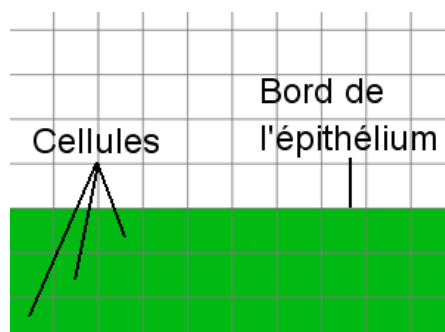


Figure 92 : Situation initiale de la bande.

Au cours du temps, les cellules peuvent se mouvoir sur cette grille, selon des règles qui seront décrites plus loin. Les divisions cellulaires ne jouant pas un rôle actif dans la cicatrisation (elles fournissent essentiellement les cellules nécessaires au maintien de la densité cellulaire au fur et à mesure de l'étalement de la bande), nous n'en avons pas tenu compte pour décrire la progression du bord de l'épithélium. La durée de « mise à jour » de la grille, autrement dit l'intervalle entre deux étapes d'évolution, est fixé tel qu'une cellule prenne une étape pour se déplacer d'une case à une autre, soit la vitesse de déplacement d'une cellule divisée par l'espace entre deux cases. Comme nous supposerons plus loin que les cellules ne migrent que dans une direction, nous avons utilisé comme vitesse de migration la vitesse orthogonale de progression des digitations évaluée au paragraphe III.1.4, soit  $13\mu\text{m/h}$ , ce qui nous donne un intervalle d'une heure.

L'évolution de la grille au cours du temps est déterminée par les règles suivantes :

1. Une cellule ne peut se déplacer que vers une case vide. Cette règle illustre le fait que l'épithélium reste une monocouche (les cellules ne se superposent pas), et que les cellules ne peuvent pas se « compresser » davantage (étant donné que la taille d'une case est celle d'une cellule à confluence). Ce fait est issu des observations au cours de nos expériences, tel que mentionné au paragraphe III.1.1.

2. Une cellule ne peut se déplacer que dans une direction unique, perpendiculaire à la bande initiale. Cette règle illustre le fait que les cellules ont un mouvement dont la direction moyenne est orientée perpendiculairement à la bande. Si expérimentalement les cellules migrent dans toutes les directions, on observe toutefois que la direction perpendiculaire aux bandes est privilégiée, comme cela est indiqué au paragraphe III.1.4 et en conclusion de la partie III.1. Nous avons donc supposé que les mouvements latéraux s'annulaient en moyenne, et que seul le mouvement dans la direction perpendiculaire contribuait significativement à l'évolution d'ensemble.

3. D'après les résultats présentés aux parties III.2.3 et III.2.6, il semble exister un effet de traction exercé par les cellules les plus avancées sur celles situées derrière elles. Pour rendre compte de cet effet, lorsqu'une cellule se déplace, elle entraîne les cellules situées derrière elle (à condition que les cases situées devant ces cellules soient libres).

4. Nous avons observé dans la partie III.2.3 que les cellules se déformaient dans les digitations, et s'étalaient pour occuper une surface double de celle qu'elles occupaient initialement dans la bande. La partie III.2.4 ayant mis en évidence une orientation privilégiée des cellules dans la direction de la digitation, autrement dit dans la direction de migration de la cellule, nous avons illustré le fait que les cellules ne sont pas rigides, mais se déforment avant de tirer les autres cellules de la manière suivante : lorsqu'une cellule se déplace, si elle n'occupe qu'une seule case, elle s'étale et occupe lors de l'étape suivante à la fois sa case d'origine et sa case de destination. Si la cellule était déjà étalée, elle se déplace « normalement » en se retirant de sa case arrière (tirant la ou les cellules derrière elle), et en occupant la case devant elle.

5. Seules certaines cellules (clairement identifiées) sont capables de se mouvoir sans être « tirées » par d'autres. Ces cellules correspondent naturellement aux cellules leader décrites dans la partie III.2.1, les autres cellules ne migrant que dans le cadre des protrusions, même lorsqu'elles sont situées en bord de bande. Ces cellules leaders migreront d'une case à chaque étape.

### *3.2 Evolution d'un épithélium sous forme de bande*

En se basant sur les hypothèses précédemment décrites, nous pouvons représenter l'évolution d'un épithélium sous forme de bandes au cours des principales étapes étudiées de la cicatrisation, la propagation, le régime linéaire et la fermeture.

### 3.2.1 Propagation

Nous allons présenter dans cette partie les premières étapes de la cicatrisation selon ce modèle, jusqu'au moment où les digitations se rejoignent latéralement. Une représentation schématique est présentée sur la fig. 93 :

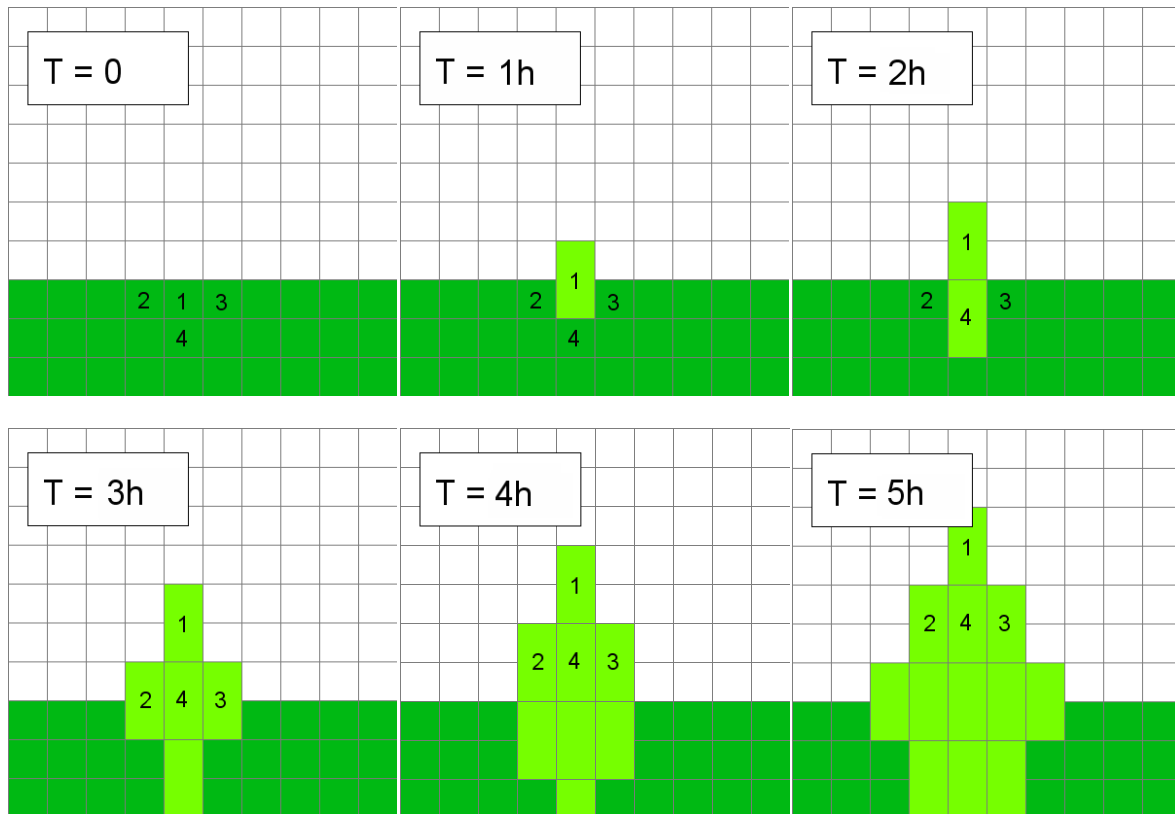


Figure 93 : Description schématique de l'avancée de la bande par étalement des cellules.

Nous observons au bout de quelques heures la formation d'une digitation de forme triangulaire, présentant à son extrémité une cellule leader, de densité inférieure de 50% au reste de l'épithélium. Cette diminution de densité s'étend à l'intérieur de la bande sur une profondeur égale à la taille de la digitation.

Cet effet d'étalement est retrouvé dans une certaine mesure dans la partie III.2.3, dans laquelle nous indiquons que la taille moyenne des cellules s'élevait nettement dans les digitations et atteignait le double de la taille moyenne des cellules à confluence. Toutefois, contrairement au modèle, on observait une décroissance de cette taille au fur et à mesure que l'on se rapprochait de la base de la protrusion, et une densité homogène dans la bande. Nous attribuons cette différence notable à l'absence de prise en compte de la prolifération dans ce modèle. Celle-ci conduit en effet à densifier la monocouche dans la bande, et, par réorganisation interne des cellules, à lisser les variations de densité. Cependant, on observe tout de même qu'au-delà d'une profondeur dans la bande de l'ordre de la taille de la protrusion hors de la bande, on commence à observer l'apparition de cellules au-dessus de la monocouche, celles-ci ne pouvant être « absorbées » par de l'espace libéré dans la monocouche comme celles situées plus proches du bord de la bande, ce qui

confirme que l'extension des protrusions s'accompagne bien d'une diminution de la densité sur une profondeur sensiblement égale.

L'avancée moyenne de l'épithélium selon ce modèle peut être aisément calculée. La surface totale occupée par la bande est égale à la surface S occupée initialement par la bande, plus la surface S' recouverte par les « triangles » des digitations.

Lorsque l'on passe de l'étape N-1 à l'étape N, le nombre de cases occupées par une digitation augmente de N-1 si N est pair, ou de N si N est impair. Cette digitation occupe donc un nombre total de cases égal à  $2 \times \left(\frac{N}{2}\right)^2 = \frac{N^2}{2}$  si N est pair, ou  $\frac{1}{2}(N-1)^2 + N = \frac{1}{2}(N^2 - 1)$ . Avec une bonne approximation ( $N^2$  devient très rapidement grand devant 1 lorsque N augmente), nous pouvons donc dire que la digitation occupe  $\frac{N^2}{2}$  cases quel que soit N.

Sur une bande de largeur X où les digitations sont séparées d'une distance  $D_l$ , nous avons  $X/D_l$  digitations occupant chacune  $\frac{N^2}{2}$  cases, la surface S' est donc égale à :

$$S' = \frac{X}{D_l} \times S_c \times \frac{N^2}{2} = \frac{1}{2} \times \frac{X}{D_l} \times S_c \times \left(\frac{t}{T}\right)^2$$

où t est le temps, T la durée d'une étape (1h) et  $S_c$  la surface d'une case ( $150 \mu\text{m}^2$ )

L'avancée moyenne de la bande est donnée par cette surface S' divisée par la largeur de la bande X. La distance  $D_l$  entre deux digitations est estimée d'après III.1.3.4 à  $300 \mu\text{m}$ . L'avancée moyenne est donc :

$$L = \frac{1}{2} \times \frac{S_c}{D_l} \times \left(\frac{t}{T}\right)^2$$

Soit numériquement :

$$L = 0,25 \times t^2$$

avec L en  $\mu\text{m}$  et t en heures.

Nous observons ici non seulement que la loi en  $t^2$  déterminée dans la partie III.1.2.1 est vérifiée, mais également que le préfacteur de 0,25 est proche de la valeur expérimentale de 0,23.

Cependant, ces observations ne sont valides que pour un temps donné : que se passe-t-il lorsque les digitations ne peuvent plus croître latéralement ?

### 3.2.2 Régime linéaire

Dans cette partie, nous allons présenter les résultats de notre modèle à partir du moment où les digitations se touchent latéralement jusqu'au moment où elles atteignent la bande opposée.

Le moment auquel la transition entre le régime précédent et celui-ci peut être calculé à partir de grandeurs évaluées précédemment. Dans ce modèle, les digitations ont une hauteur égale au nombre d'étapes écoulées (la cellule leader se déplaçant d'une case par étape), d'où :

$$h = L_c \times N$$

où h est la hauteur de la digitation,  $L_c$  la longueur d'une case et N le nombre d'étapes écoulées.

Les digitations se heurtent latéralement lorsque leur taille latérale devient égale à la distance moyenne entre deux cellules leader  $D_l$ . Le nombre d'étapes nécessaire est donc égal à  $D_l/L_c = 25h$ . Cette durée correspond expérimentalement au moment où l'on observe effectivement les digitations commencer à se heurter, et est légèrement supérieure aux 20h qui correspondent à la limite moyenne que nous avons fixée pour la transition entre la propagation et le régime linéaire dans la partie III.1.2.2. Néanmoins, nous estimons ces valeurs suffisamment proches pour valider la cohérence du modèle avec les données expérimentales.

Durant cette période, la surface occupée par la bande est égale à la surface S occupée initialement par la bande, plus la surface  $S_1$  correspondant à la partie recouverte par l'épithélium sur toute la largeur, plus la surface  $S_2$  correspondant à la partie recouverte par les digitations triangulaires.

Sur une fenêtre de taille  $D_l$ , à partir du moment où les digitations se joignent latéralement (soit  $N=25$ ), la zone correspondant à la surface  $S_1$  progresse d'une case par étape, autrement dit,  $S_1$  progresse de  $\frac{X}{L_c} \times S_c$   $\mu\text{m}$  par étape sur un épithélium de largeur X. La surface  $S_1$  est donc au final égale à :

$$S_1 = \frac{X}{L_c} \times S_c \times (N - 25) = X \times L_c \times \left(\frac{t}{T} - 25\right)$$

La zone correspondant à la surface  $S_2$  est quant à elle constante, et égale à la surface des digitations triangulaires calculée dans la partie précédente pour  $N=25$ . On obtient donc :

$$S_2 = \frac{X}{D_l} \times \frac{1}{2} \times S_c \times 25^2$$

La progression moyenne du bord sur la bande L est égale à  $S_1+S_2$  divisé par la largeur X de la bande, d'où :

$$L = L_c \times \left( \frac{t}{T} - 25 \right) + \frac{1}{2} \times 25^2 \times \frac{S_c}{D_l}$$

Numériquement, cela donne :

$$L = 12 \times t - 144 \text{ pour } t > 25h.$$

avec L en  $\mu\text{m}$  et t en heures.

On retrouve une loi linéaire telle que décrite dans la partie III.1.2.2. Le coefficient de  $12 \mu\text{m/h}$  est du même ordre de grandeur que la vitesse mesurée expérimentalement de  $8,5 \mu\text{m/h}$ .

### 3.2.3 Fermeture

La fermeture intervient lorsque les extrémités des digitations commencent à se rejoindre d'une bande à l'autre. Cela se produit au plus tôt lorsque les digitations ont parcouru  $500\mu\text{m}$ . La hauteur des digitations étant égale à  $N \cdot L_c$ , ce moment se situe à  $t = 42h$ . Cependant, les digitations ne sont pas nécessairement exactement face à face : les digitations se rejoindront donc en pratique plus tard. Nous pouvons estimer ce moment en calculant le temps nécessaire à l'extrémité d'une digitation pour rejoindre le « bord moyen » de la bande opposée.

D'après les données expérimentales de la partie III.1.2.2, ce bord progresse, dans la partie linéaire, selon une loi de type  $L = 8,5 \cdot t - 94$  (avec L en heures et t en  $\mu\text{m}$ ). Les bords se rencontrent lorsque la somme du bord moyen et de la hauteur d'une digitation est égale à l'écart entre les bandes, soit  $1000 \mu\text{m}$ . La durée correspondante est alors  $t = 53,6h$ , ce qui est compatible avec nos observations.

Lorsqu'une colonne de cellules atteint le bord opposé, elle ne s'étend plus verticalement. La surface occupée par la digitation est donc égale à la surface qu'elle occuperait si elle pouvait progresser « naturellement », moins la surface située au-delà de la limite du bord opposé, que nous supposons pour simplifier constante. En reprenant les définitions du paragraphe précédent, cette surface est donc égale à  $S + S_1 + S_2 - S_3$ , où  $S_3$  est la surface située au-delà de la limite du bord opposé.

La surface  $S_3$  progresse comme celle d'une nouvelle digitation ; nous pouvons donc reprendre le raisonnement effectué dans la partie III.3.2.1 pour arriver à :

$$S_3 = \frac{1}{2} \times \frac{X}{D_l} \times S_c \times \left( \frac{t - 53,6}{T} \right)^2 \text{ pour } t > 53,6$$

Soit une progression moyenne du bord par rapport à sa position initiale de :

$$L = \frac{S_1 + S_2 - S_3}{X} = L_c \times \left( \frac{t}{T} - 25 \right) + \frac{1}{2} \times 25^2 \times \frac{S_c}{D_l} - \frac{1}{2} \times \frac{S_c}{D_l} \times \left( \frac{t - 53,6}{T} \right)^2 \text{ pour } t > 53,6$$

Ou numériquement :

$$L = 12 \times t - 144 - 0,25 \times (t - 53,6)^2 = -0,25 \times (t - 50,8)^2 + 870$$

Nous retrouvons ici une loi en  $-(t - t_0)^2$  similaire à ce qui avait été observé expérimentalement dans la partie III.1.2.3, bien que le préfacteur ne soit cependant pas identique (0,25 au lieu de 0,5). Ce résultat apparaît particulièrement remarquable (et peut-être même fortuit) puisqu'il a été montré que ces trous se refermaient par un mécanisme de « cordon de bourse », qui n'a absolument pas été considéré ici.

### 3.3 Limites

Le « toy model » que nous venons de présenter permet de rendre compte sommairement du comportement global d'une bande épithéliale lors de la cicatrisation. À partir d'observations expérimentales, nous avons pu retrouver avec une bonne précision les lois d'évolutions déterminées empiriquement. Cependant, plusieurs points importants n'ont pas été pris en compte ici, et pourraient améliorer la précision de cette représentation. Tout d'abord, nous avons utilisé ici une valeur moyenne pour la distance entre cellules leader : l'irrégularité de cette distance dans nos observations pourrait modifier sensiblement les valeurs numériques trouvées pour la phase linéaire et de fermeture. Par ailleurs, nous avons supposé que toutes les cellules leader apparaissaient immédiatement après le retrait du stencil, alors que ce phénomène s'étend tout au long de la cicatrisation (même s'il est majoritairement concentré dans les 20 premières heures). Enfin, les cellules sont considérées ici comme des objets rigides et non déformables (en-dehors de l'étalement sur deux cases), alors que leur compressibilité et leur mobilité interne à l'épithélium peut avoir une influence sur l'avancée de la bande.

Parmi les limites évidentes de cette description, nous pouvons citer le fait qu'elle ne rend pas compte des grandeurs internes de l'épithélium (densité, prolifération, orientation des cellules...) ainsi que de la forme précise des digitations. Néanmoins, elle pourrait constituer une base simple pour modéliser simplement l'ensemble du processus de cicatrisation.

# Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'étudier les mouvements collectifs des cellules épithéliales lors de la cicatrisation selon une approche différente de ce qui avait été réalisé auparavant. Cette approche se base sur une méthode de réalisation des blessures à l'aide de pochoirs en PDMS, permettant de créer des épithéliums présentant directement la forme choisie au lieu de détruire plus ou moins sélectivement des cellules. Cette méthode nous a permis d'évaluer le comportement des cellules soumises uniquement à un effet de « bord libre » : le seul moyen pour l'épithélium de « détecter » l'existence de la blessure est en effet l'exposition des cellules situées sur ses bords à une surface vierge.

Nos observations ont permis de montrer que la cicatrisation constituait un phénomène de migration collective et coordonnée des cellules, allant bien au-delà d'un simple étalement de l'épithélium. La cicatrisation s'effectue en effet par l'intermédiaire de digitations présentant à leur extrémité une cellule initialement indiscernable adoptant soudainement un phénotype remarquable, s'étendant sur une surface beaucoup plus grande que les autres et très motile. L'ensemble du processus se découpe en 3 phases : une phase d'apparition des digitations, où la progression du bord de l'épithélium est parabolique, une phase d'extension des digitations, où la progression du bord est linéaire, et enfin une phase de fermeture, également parabolique, où les digitations rejoignent le bord opposé de la blessure.

Les expériences que nous avons menées montrent que les cellules leaders occupent un rôle privilégié dans la migration collective : plusieurs indices vont dans le sens d'une migration sous l'effet d'une traction de l'ensemble de l'épithélium exercée par ces dernières. Cependant, cette explication est insuffisante pour rendre compte de l'intégralité du mécanisme de cicatrisation : un indice clair en ce sens est que la cellule leader devrait exercer une force de plus en plus élevée sur l'épithélium, alors même que sa vitesse reste constante au fur et à mesure de leur progression. Il est donc probable que les autres cellules, notamment dans les digitations, participent activement à la migration collective menée par les cellules leaders, au lieu de n'en subir que passivement les effets.

Plusieurs aspects importants doivent donc être examinés plus en détails. Tout d'abord, l'étude des mouvements individuels des cellules et des flux internes dans l'épithélium, en particulier grâce à la PIV, mérite d'être poursuivie au-delà de l'analyse préliminaire que nous avons menée. Cette analyse apporterait notamment des informations précieuses sur l'organisation des cellules à l'intérieur de l'épithélium en vue de préparer la migration collective alors que le bord de l'épithélium ne présente pas encore de déformation nette.



Un autre domaine d'étude important concerne l'identification des forces qui s'exercent au sein de l'épithélium, aussi bien exercées sur le substrat qu'entre les cellules, en particulier dans les digitations, qui jouent un rôle central dans la cicatrisation. Deux pistes sont à privilégier : d'une part, l'utilisation de microplots pour cartographier les forces cellules-substrat, d'autre part, l'analyse biochimique de protéines telles que l'actine ou la myosine par marquage fluorescent pour mettre en évidence la localisation et l'intensité des forces adhésives. Une telle étude serait par ailleurs précieuse pour étudier plus en détail les spécificités de la phase de fermeture, qui pourrait présenter un mécanisme de fermeture de type « cordon de bourse ».

Enfin, les résultats surprenants concernant la différence de comportement entre une bande seule et une bande faisant face à une autre bande montrent que la diffusion de signaux chimiques joue un rôle essentiel à la migration collective. L'identification de la nature de ces signaux, des conditions dans lesquelles ils sont émis ainsi que de leur mécanisme de propagation représente un aspect essentiel de la compréhension des mouvements collectifs des cellules.

# Remerciements

Cette thèse a sans doute constitué l'épreuve la plus difficile à laquelle j'ai pu être confronté jusqu'à présent. C'est donc avec une immense fierté que je regarde aujourd'hui l'aboutissement de ces travaux, et que je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé, accompagné et soutenu tout au long de ces années.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, **Pascal Silberzan**, naturellement pour les discussions que nous avons pu avoir, pour ses conseils et pour son aide sur le plan scientifique. Mais, au-delà de l'aspect purement scientifique, j'aimerais tout particulièrement rendre hommage à ses qualités humaines, sa disponibilité constante et son soutien sans faille ; je pense que peu de doctorants auront eu la chance d'avoir un directeur de thèse aussi ouvert et impliqué dans la réussite de ses étudiants que Pascal.

J'adresse également toute ma gratitude à **Mathieu Poujade**, qui m'a littéralement accueilli et formé dès mon arrivée en thèse, m'enseignant aussi bien les techniques expérimentales que les notions théoriques de biophysique sans lesquelles cette thèse n'aurait jamais « décollé », et avec qui pendant plus de la moitié de ces années j'ai ensuite partagé conseils, idées et bien sûr bureau.

De nombreux résultats n'auraient pu voir le jour sans la précieuse coopération de **Laurence Petitjean** et de **Myriam Reffay**, que je tiens donc à remercier tout particulièrement pour leur aide. Je souhaite également les remercier, ainsi que les autres membres de l'équipe de recherche, **Axel Buguin**, **Jonathan Saragosti** et **Maxime Deforet**, pour leur intérêt dans mes travaux, leurs conseils (d'ordre scientifiques ou non) ainsi que leur bonne humeur au cours de ces années à l'Institut Curie.

Les expériences sur microplots n'auraient pu être envisagées sans l'aide essentielle de **Benoît Ladoux**, **Léa Trichet** et **Marion Ghibaudo**, du laboratoire Matière et Systèmes Complexes à Paris 7, qui m'ont accueilli dans leur laboratoire et que je tiens à remercier pour le temps, la formation et le matériel expérimental qu'ils m'ont fournis pour mener à bien ces expériences.

J'adresse mes plus vifs remerciements à **Atef Asnacios** et **Corinne Albigès-Rizo** pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'à **Martine Ben Amar** et **Emanuel Bertrand**, qui feront partie du jury à leurs côtés. J'espère que leur plaisir à lire ce manuscrit sera à la hauteur du temps qui lui a été consacré...

Je ne peux pas oublier ici toutes les personnes qui m'ont encouragé et soutenu lors des périodes les plus difficiles. Il me sera difficile d'être exhaustif ici, mais j'aimerais adresser des remerciements tout particuliers à **Robert Pelletier**, **Emanuel Bertrand** (encore lui !) et **Darren Link** pour m'avoir aidé et assisté dans mes questionnements d'ordre professionnel, ainsi qu'à **Cédric « Crocell » Faure**, **Marc Bailly-Bechet**, **Nicolas Bourgeois**, **Claire Lacour**, **Claire Giroud**, **Sophie Picot**, **Émeric « Mouton » Tourniaire** et **Bruno « Boka » Kauffmann** pour de nombreuses raisons allant de l'hébergement d'urgence après des soirées un peu trop tardives au laboratoire au soutien moral entre thésards...

Enfin, « *last but not least* » comme on dit, **Loïc**, **Johanne**, **Pol** et **Yiming** connaissent l'immensité de ce que je leur dois...

# Bibliographie

AFFOLTER M., WEIJER C. J. *Signaling to cytoskeletal dynamics during chemotaxis*, Dev. Cell **9**, pp. 19–34 (2005)

BACH T. L., BARSIGIAN C., CHALUPOWICZ D. G., BUSLER D., YAEN C. H., GRANT D. S., MARTINEZ J. V. *E-cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation in fibrin and collagen gel*. Exp Cell Res. **238** pp. 324–334 (1998)

BELLUSCI S., MOENS G., THIERY J., JOUANNEAU J. *A scatter factor-like factor is produced by a metastatic variant of a rat bladder carcinoma cell line* J. Cell Sci. **107** pp. 1277–1287 (1994)

BEMENT W. M., FORSCHER P., MOOSEKER M. S. *A novel cytoskeletal structure involved in purse string wound closure and cell polarity maintenance* J. Cell Biol. **121** pp. 565–578 (1993)

BENINGO K. A., WANG Y.-L. *Flexible substrata for the detection of cellular traction forces* Trends in Cell Biology **12** pp. 79–84 (2002)

BINDSCHADLER M., MCGRATH J. L. *Sheet migration by wounded monolayers as an emergent property of single-cell dynamics* Journal of Cell Science **120** pp. 876–884 (2007)

BLOCK E. R., KLARLUND J. K. *Wounding Sheets of Epithelial Cells Activates the Epidermal Growth Factor Receptor through Distinct Short- and Long-Range Mechanisms* Mol Biol Cell. **19** pp. 4909–4917 (2008)

BLOCK E. R., MATELA A. R., SUNDAR-RAJ N., ISZKULA E. R., KLARLUND J. K. *Wounding induces motility in sheets of corneal epithelial cells through loss of spatial constraints - Role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor signaling* Journal of Biological Chemistry **279** pp. 24307–24312 (2004)

CALLAGHAN T., KHAIN E., SANDER L., ZIFF R. *A Stochastic Model for Wound Healing* J. Stat. Phys **122** pp. 909–924 (2006)

CLARK R. A. F. *The molecular and cellular biology of wound repair, Second Edition* Plenum Press (1996)

CLARK R. A. F., LANIGAN J. M., DELLA PELLE P., MANSEAU E., DVORAK H. F., COLVIN R. B. *Fibronectin and Fibrin Provide a Provisional Matrix for Epidermal Cell Migration During Wound Reepithelialization* Journal of Investigative Dermatology **79**, pp. 264–269 (1982)

- CRAMER H. *Mathematical Methods of Statistics*, Princeton Univ. Press
- DANJO Y., GIPSON I. K. *Actin 'purse string' filaments are anchored by E-cadherin-mediated adherens junctions at the leading edge of the epithelial wound, providing coordinated cell movement* J. Cell Sci. **111** pp. 3323–3332 (1998).
- DORMANN D., WEIJER C. J. *Chemotactic cell movement during development* Curr Opin. Genet. Dev. **13** pp. 358–364 (2003)
- DU ROURE O., SAEZ A., BUGUIN A., AUSTIN R. H., CHAVRIER P., SILBERZAN P., LADOUX B. *Force mapping in epithelial cell migration* Proc. Nat. Acad. Sci. USA **102** pp. 2390–2395 (2005)
- FAROOQUI R., FENTEANY G. *Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell- sheet movement* Journal of cell science **118** pp. 51–63 (2005)
- FENTEANY G., JANMEY P. A., STOSSEL T. P. *Signaling pathways and cell mechanics involved in wound closure by epithelial cell sheets* Current Biology **10** pp. 831–838 (2000)
- FOLCH A., JO B. H., HURTADO O., BEEBE D. J., TONER M. *Microfabricated elastomeric stencils for micropatterning cell cultures* Journal of Biomedical Materials Research **52** p. 346 (2000)
- FRIEDL P., NOBLE P. B., WALTON P. A., LAIRD D. E., CHAUVIN P. J., TABAH R. J., BLACK M., ZANKER K. S. *Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro* Cancer Res. **55** pp. 4557–4560 (1995)
- GRASSO S., HERNÁNDEZ J. A., CHIFFLET S. *Roles of wound geometry, wound size, and extracellular matrix in the healing response of bovine corneal endothelial cells in culture* Am. J. Physiol. Cell Physiol **293** pp. C1327–C1337 (2007)
- HALL A. *Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton* Science **279** pp. 509–514 (1998)
- HEATH J. P. *Epithelial cell migration in the intestine* Cell Biol. Int. **20** pp. 139–146 (1996)
- JACINTO A., *Dynamic analysis of dorsal closure in Drosophila: From genetics to cell biology* Dev. Cell **3** p. 9 (2002)
- JACINTO A., MARTINEZ-ARIAS A., MARTIN P. *Mechanisms of epithelial fusion and repair* Nat. Cell Biol. **3** p. E117 (2001)
- KEESE C.R., WEGENER J., WALKER S. R., GIAEVER I. *Electrical wound-healing assay for cells in vitro* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **101** pp. 1554–1559 (2004)
- KHAIN E., SANDER L. M., SCHNEIDER-MIZELL C. M. *The role of cell-cell adhesion in wound healing* J. Stat. Phys. **128** pp. 209–218 (2007)

KLEPEIS V. E., CORNELL-BELL A., TRINKAUS-RANDALL V. *Growth factors but not gap junctions play a role in injury-induced Ca<sup>2+</sup> waves in epithelial cells* J Cell Sci **114** pp. 4185–4195 (2001)

KRAWCZYK W. S. *A pattern of epidermal cell migration during wound healing*, J. Cell Biol. **49** pp. 247–263 (1971)

LO C.-M., WANG H.-B., DEMBO M., WANG Y.-L. *Cell movement is guided by the rigidity of the substrate* Biophys. J. **79** pp. 144–152 (2000)

MAINI P. K., MCELWAIN S., LEAVESLEY D. *Travelling waves in a wound healing assay* Applied Maths Letters **17** pp. 575–580. (2004)

MARK S., SHLOMOVITZ R., POUJADE M., GRASLAND-MONGRAIN E., SILBERZAN P., GOV N. S. *Physical model of the dynamic instability in an expanding cell culture (submitted)* (2009)

MARTIN P., LEWIS J. *Actin cables and epidermal movement in embryonic wound healing* Nature **360** pp. 179–183 (1992)

MCDONALD J. C., DUFFY D. C., ANDERSON J. R., CHIU D. T., WU H., SCHUELLER O. J., WHITESIDES G. M. *Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)* Electrophoresis **21** pp. 27-40 (2000)

MORALI O. G., DELMAS V., MOORE R., JEANNEY C., THIERY J.-P., LARUE L. *IGF-II induces rapid  $\beta$ -catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition* Oncogene **20** pp. 4942–4950 (2001).

MORALI O. G., JOUNEAU A., MCLAUGHLIN K. J., THIERY J.-P., LARUE, L. *IGF-II promotes mesoderm formation* Dev. Biol. **227** pp. 133–145 (2000).

NALDINI L. WEIDNER K. M., VIGNA E., GAUDINO G., BARDELLI A., PONZETTO C., NARSIMHAN R. P., HARTMANN G., ZARNEGAR R., MICHALOPOULOS G. K. *Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor* EMBO J. **10** pp. 2867–2878 (1991).

NOBES C.D., HALL A. *Rho, Rac and Cdc42 regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia* Cell **81** pp. 53–62 (1995).

O'BRIEN L. E., ZEGERS M. M., MOSTOV K. E. *Opinion: building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models*. Nat Rev Mol Cell Biol. **3** pp. 531–537 (2002)

OMELCHENKO T., VASILIEV J. M., GELAND I. M., FEDER H. H., BONDER E. M. *Rho-dependent formation of epithelial "leader" cells during wound healing* Proc. Nat. Acad. Sci. USA **100** pp. 10788–10793 (2003)

OSTUNI E., KANE R., CHEN C. S. INGBER D. E., WHITESIDES G. M. *Patterning mammalian cells using elastomeric membranes* Langmuir **16** p. 7811 (2000)

OWEN M. R., SHERRATT J. A., MYERS S. R. *How far can a juxtacrine signal travel?* Proc Biol Sci. **266** pp. 579–585 (1999)

PELHAM R. J. JR., WANG Y.-L. *Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility* Proc. Natl. Acad. Sci. **94** pp. 13661–13665 (1997)

POUJADE M., GRASLAND-MONGRAIN E., HERTZOG A., JOUANNEAU J., CHAVRIER P., LADOUX B., BUGUIN A., SILBERZAN P. *Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound* Proc. Natl. Acad. Sci. **104** pp. 15988–15993 (2007)

RAICH W. B., AGBUNAG C., HARDIN J. *Rapid epithelial-sheet sealing in the *Caenorhabditis elegans* embryo requires cadherin-dependent filopodial priming* Curr. Biol. **9** pp. 1139–1146 (1999)

RIDLEY A. J. *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and stress fibers in response to growth factors* Cell **70** pp. 389–399. (1992).

ROSEN P., MISFELDT D. S. *Cell density determines epithelial migration in culture* Proc. Nat. Acad. Sci. USA **77** pp. 4760-4763 (1980)

SAEZ A. *Étude mécanique des processus d'adhésion et de migration des cellules épithéliales à l'aide de substrats microfabriqués* Thèse de doctorat de l'Université Paris 7 (2006)

SAFRANA S. A., GOV N., NICOLASC A., SCHWARZD U.S., TLUSTYA T., NICOLAS A., GEIGER B., SAFRAN S.A. *Physics of cell elasticity, shape and adhesion* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101** p. 12520 (2004)

SARRET Y., WOODLEY D. T., GRIGSBY K., WYNN K., O'KEEFE E. J. *Human Keratinocyte Locomotion: The Effect of Selected Cytokines* Journal of Investigative Dermatology **98** pp. 12–16 (1992)

SHVARTSMAN S. Y., WILEY H. S., LAUFFENBURGER D. A. *Epidermal growth factor receptor signaling in tissues* IEEE Cont Sys Mag **24** pp. 53–61 (2004).

SHEARDOWN H., CHENG Y.-L. *Mechanisms of corneal epithelial wound healing* Chemical Engineering Science **51** pp. 4517–4529 (1995)

SHERRATT J. A., MURRAY J. D. *Models of epidermal wound healing* Proc Biol Sci. **241** pp. 29–36 (1990)

SHERRATT J. A., DALLON J. C. *Theoretical models of wound healing: past successes and future challenges* Comptes rendus. Biologies **325** pp. 557–564 (2002)

SPONSEL H. T., BRECKON R., HAMMOND W., ANDERSON R. J. *Mechanisms of recovery from mechanical injury of renal tubular epithelial cells* Am. J. Physiol. **267** pp. F257–F264. (1994)

STENN K. S., DEPALMA L. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair 1<sup>st</sup> ed.: Reepithelialization* Plenum Press (1988)

TAMADA M., PEREZ T., NELSON W. J., SHEETZ M. P. *Recruitment and activation of the myosin contractile ring at the tight junction during epithelial wound closure* *J. Cell Biol.* **176** pp. 27-33 (2007)

TAN JL, TIEN J, PIRONE DM, GRAY DS, BHADRIRAJU K, CHEN CS, *Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **100** pp. 1484–1489 (2003)

THÉRY M., JIMÉNEZ-DALMARONI A., RACINE V., BORNENS M., JÜLICHER F *Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation* *Nature* **447** pp. 493–496 (2007)

THIELECKE H., IMPIDJATI, FUHR G. R. *Biopsy on living cells by ultra slow instrument movement* *Journal of Physics – Condensed Matter* **18** p. S627 (2006)

THIERY J.-P., *Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression* *Nature Reviews Cancer* **2** pp. 442-454 (June 2002)

TOUROVSKAIA A., BARBER T., WICKES B. T., HIRDES D., GRIN B., CASTNER D. G., HEALY K. E., FOLCH A. *Micropatterns of chemisorbed cell adhesion-repellent films using oxygen plasma etching and elastomeric masks* *Langmuir* **19** pp. 4754 (2003)

VAN HORSSSEN R., GALJART N., RENS J. A. P., EGGERMONT A. M. M., TEN HAGEN T. L. M. *Differential effects of matrix and growth factors on endothelial and fibroblast motility: application of a modified cell migration assay* *J. Cell. Biochem.* **99** pp. 1536–1552 (2006)

WEARING H. J., SHERRATT J. A. *Keratinocyte growth factor signalling: a mathematical model of dermal-epidermal interaction in epidermal wound healing* *Mathematical Biosciences* **165** pp. 41–62 (2000)

WEIDNER K. M. HARTMANN G., NALDINI L., COMOGLIO P. M., SACHS M., FONATSCH C., RIEDER H., BIRCHMEIER W. *Molecular characteristics of HGF-SF and its role in cell motility and invasion* *Experientia Supplementum* **65** pp. 311–328 (1993).

WILLIAMS-MASSON E. M., HEID P. J., LAVIN C. A., HARDIN J. *The cellular mechanism of epithelial rearrangement during morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* dorsal hypodermis* *Developmental Biology* **204** pp. 263–276 (1998)

WILLIAMS-MASSON E. M., MALIK, A. N., HARDIN, J *An actin-mediated two-step mechanism is required for ventral enclosure of the *C-elegans* hypodermis* *Development* **124** pp. 2889–2901 (1997)

WOLGEMUTH C. W. *Collective migration of epithelial monolayers* <http://www.ccam.uchc.edu/wolgemuth/PDF/CollectiveMigration.pdf> (submitted) (2009)

YOUNG P. E., RICHMAN A. M., KETCHUM A. S., KIEHART D. P., *Morphogenesis in *Drosophila* requires nonmuscle myosin heavy chain function* *Genes&Development* **7** p. 29 (1993)





# Annexe

Nous reproduisons ici les macros ImageJ ayant servi à réaliser les figures 78 et 84 dans lesquelles les cellules sont coloriées en fonction de la densité ou de l'orientation des cellules. Ces macros sont à appliquer sur une image en noir et blanc de l'épithélium dans lequel seuls les contours des cellules sont indiqués.

```
#Couleur_densité
```

```
run("RGB Color");
```

```
max = 0;
```

```
min = 100;
```

```
for (row=0; row<nResults ;row++){
```

```
    A = getResult("Area", row);
```

```
    if (A > max) {max = A;};
```

```
    if (A < min) {min = A;};
```

```
};
```

```
ecart = max-min;
```

```
for (row=0; row<nResults;row++){
```

```
    x = getResult("X", row);
```

```
    y = getResult("Y", row);
```

```
    A = getResult("Area", row);
```

```
    white = floor((A-min)/(ecart)*511);
```

```
    if (white < 256) {
```

```
        setForegroundColor(255, white, 0);
```

```
    }
```

```
    else {
```

```
        setForegroundColor(511-white, 255, 0);
```

```
    }
```

```
    floodFill(x, y);
```

```
};
```

```
#Couleur_orientation
```

```
modifiers=0;
```

```
while (modifiers != 16) {
```

```

    getCursorLoc(cx, cy, cz, modifiers);
    wait(10);
}

setForegroundColor(255, 255, 255);
setLineWidth(2);
drawOval(cx-70, cy-70, 140, 140);

for (i=0;i<18;i++){
    drawLine(cx, cy,cx+70*cos(i*3.14/9), cy+70*sin(i*3.14/9));
}

run("Analyze Particles...", "size=10-15000 circularity=0.00-1.00 show=Nothing
display exclude");
run("RGB Color");

for (row=0; row<nResults;row++){
    x = getResult("X", row);
    y = getResult("Y", row);
    A = abs(getResult("Angle", row));
    if (A < 30) {
        setForegroundColor(255, A*255/30, 0);}
    else {
        if (A < 60) {
            setForegroundColor(255-(A-30)*255/30, 255, 0);}
        else {
            if (A < 90) {
                setForegroundColor(0, 255, (A-60)*255/30);}
            else {
                if (A < 120) {
                    setForegroundColor(0, 255-(A-90)*255/30, 255);}
                else {
                    if (A < 150) {
                        setForegroundColor((A-120)*255/30, 0, 255);}
                    else {
                        setForegroundColor(255, 0, 255-(A-150)*255/30);}
                    }}}
    floodFill(x, y);
};

```