Croissance et densification d'un épithélium en géométrie confinée

Maxime Déforet

▶ **To cite this version:**

Maxime Déforet. Croissance et densification d'un épithélium en géométrie confinée. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66490 . tel-00828161

HAL Id: tel-00828161

https://theses.hal.science/tel-00828161

Submitted on 30 May 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.

THÈSE DE DOCTORAT DE
l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Physique

École doctorale de Physique de la Région Parisienne

Présentée par

Maxime DEFORET

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Croissance et densification d'un épithélium en géométrie confinée

soutenue le 28 Septembre 2012

devant le jury composé de :

M. Damien Baigl	Président
M. Marc Block	Rapporteur
M. Sylvain Gabriele	
Mme. Sylvie Hénon	
M. Pascal Silberzan	Directeur de thèse
M. Olivier Théodoly	Rapporteur

Table des matières

Résumé 7
Abstract 8
Introduction 9

1 Etat des connaissances **13**
1.1 De la cellule au tissu épithélial 13
1.1.1 La cellule épithéliale 13
1.1.1.1 Le cytosquelette 13
1.1.1.2 Adhésions cellule-substrat 18
1.1.1.3 Migration cellulaire 22
1.1.2 L'épithélium 25
1.1.2.1 Adhésions cellule-cellule 26
1.1.2.2 Mécanotransduction 28
1.1.2.3 Migration collective 30
1.1.2.4 Contractilité collective 34
1.2 Inhibition par contact 39
1.2.1 Inhibition de la migration par contact 39
1.2.1.1 Polarisation de la migration 39
1.2.1.2 Mécanismes moléculaires 40
1.2.2 Inhibition de la prolifération par contact 42
1.2.2.1 Mécanismes cellulaires 44
1.2.2.2 Contrôles mécaniques de la prolifération 45
1.3 Aspects mécaniques de la pluricellularité 46
1.3.1 Aspects statiques 46

1.3.2 Aspects dynamiques 47

2 Matériel et Méthodes **49**

2.1 Traitement de surface 49
2.1.1 Cahier des charges 49
2.1.2 Revue des techniques existantes 50
2.1.2.1 Le substrat 50
2.1.2.2 Les traitements adhésifs et anti-adhésifs 51
2.1.2.3 Le dépôt localisé du traitement anti-adhésif 52
2.1.3 Choix de la technique 55
2.1.4 Protocole 57
2.1.4.1 Traitement de surface 57
2.1.4.2 Gravure 59
2.2 Culture cellulaire 63
2.3 Microscopies et ablation 65
2.3.1 Microscopie à contraste de phase 65
2.3.2 Microscopie de fluorescence 65
2.3.2.1 Microscopie de fluorescence classique 65
2.3.2.2 Microscopie confocale 68
2.3.2.3 Microscopie confocale à disque rotatif 68
2.3.3 Photo-ablation biphotonique 70
2.3.4 Caractéristiques des microscopes utilisés 70
2.4 Analyse d'image 73
2.4.1 Segmentation entropique 73
2.4.1.1 Seuillage classique 73
2.4.1.2 Calcul d'entropie 75
2.4.2 Outils morphomathématiques 78
2.4.2.1 L'érosion 79
2.4.2.2 La dilatation 80
2.4.2.3 L'ouverture 80
2.4.2.4 La fermeture 81
2.4.2.5 La transformée de distance 81
2.4.2.6 Les outils morphomathématiques pour les images en niveaux de gris 81
2.4.2.7 La dilatation géodésique et la reconstruction morphologique 81

2.4.2.8 Extrema locaux 83
2.4.2.9 La ligne de partage des eaux (Watershed) 85
2.4.2.10 Exemple 1 : Evaluation de la densité de cellules à partir d'une image en contraste de phase 86
2.4.2.11 Exemple 2 : Evaluation de la densité de cellules à partir d'une image de fluorescence 87
2.4.2.12 Exemple 3 : Calcul d'une distance 88
2.4.2.13 Exemple 4 : Mesure d'aire sans cellule 92
2.4.3 Mesure du champ de vitesse par PIV 94
2.4.3.1 Principe de la PIV 94
2.4.3.2 Méthode utilisée 95
2.4.4 Analyse statistique des données 97

3 Résultats et discussions **99**
3.1 Motifs adhésifs circulaires 99
3.1.1 Description du bourrelet 101
3.1.2 Analyse de la prolifération cellulaire 106
3.1.2.1 Densification de l'îlot 106
3.1.2.2 Les divisions cellulaires 108
3.1.2.3 Influence de la taille du motif circulaire 110
3.1.3 Dynamique de la formation du bourrelet de cellules 111
3.1.4 Champ de vitesse au cours de la compaction 115
3.1.4.1 Norme de la vitesse au cours du temps 115
3.1.4.2 Composantes radiale et orthoradiale 116
3.1.4.3 Influence de la taille des motifs circulaires sur la vitesse radiale 120
3.1.4.4 Influence de la taille des motifs circulaires sur la vitesse orthoradiale 124
3.1.5 Un câble d'acto-myosine au bord du motif adhésif 124
3.1.6 Conclusion 127
3.2 Motifs anti-adhésifs circulaires 128
3.2.1 Influence de la taille du motif 128
3.2.2 Étude des conditions de fermeture 132
3.2.2.1 Temps total de la fermeture 132
3.2.2.2 Approche énergétique 135
3.2.3 Étude de la dynamique de la fermeture 136

3.2.3.1 Évolution du rayon . . . 136
3.2.3.2 La phase finale de la fermeture . . . 138
3.2.3.3 Dépendance avec la densité - Bourrelet . . . 141
3.2.4 Rôle des adhésions focales . . . 141
3.2.5 Perturbations de la structure . . . 145
3.2.5.1 Ablation d'une portion de câble . . . 145
3.2.5.2 Ablation de cellules . . . 145
3.2.5.3 Inhibition . . . 148
3.2.6 Conclusion . . . 148
3.3 Pacman . . . 150
3.3.1 Recouvrement de la pointe . . . 151
3.3.2 Recouvrement maximal en fonction de l'angle . . . 152
3.3.3 Forme du profil . . . 154
3.3.4 Perturbations du câble ou de l'épithélium . . . 158
3.3.4.1 Ablation d'une portion de câble . . . 158
3.3.4.2 Ablation de cellules . . . 160
3.3.5 Inhibition . . . 162
3.3.6 Conclusion . . . 163

A Annexes **169**
A.1 Microscopie à contraste de phase . . . 169
A.2 Vidéos . . . 176
A.3 Automated velocity mapping of migrating cell populations . . . 177
A.4 Structural and mechanical heterogeneity of the erythrocyte membrane reveals hallmarks of membrane stability . . . 179
A.5 A Facile and Versatile Approach to Design Self-Assembled Monolayers on Glass using Thiol-ene Chemistry . . . 181

Bibliographie **183**

Résumé

Croissance et densification d'un épithélium en géométrie confinée

Un épithélium est un tissu formé de cellules étroitement juxtaposées dont la fonction est d'isoler des organes entre eux ou vis-à-vis du milieu extérieur. Nous étudions la croissance d'un épithélium en géométrie confinée. En utilisant des techniques de microfabrication, nous avons développé un protocole de traitement de surface permettant de confiner un tissu dans une zone adhésive pendant plusieurs semaines. La résolution spatiale de cette technique est micrométrique, et nous autorise la conception de motifs adhésifs de diverses géométries. Dans notre étude, leurs tailles sont telles que les cellules s'y comportent collectivement.
Nous analysons la croissance d'un épithélium de cellules Madine Derby Canine (MDCK) dans des domaines adhésifs circulaires. La migration et la densification du tissu sont étudiées par PIV (Particle image velocimetry) et d'autres techniques d'analyse d'image. Nous caractérisons les champs de vitesse et observons des oscillations de grande amplitude de la vitesse dont la période correspond à l'hypothèse d'une onde de contraintes se propageant dans l'épithélium. Nous caractérisons également l'apparition d'un bourrelet tridimensionnel de cellules à la périphérie de l'épithélium, rappelant les premières étapes de la tubulogénèse. Dans deux autres expériences, en utilisant une géométrie inverse, nous étudions le recouvrement d'un épithélium sur une région anti-adhésive. Nous montrons que ce recouvrement nécessite un câble d'actomyosine supracellulaire, et que la tension de ce câble s'opposant à une tension de surface définit une taille critique au-delà duquel le motif anti-adhésif ne peut pas être recouvert par l'épithélium.

Mots-clés : traitement de surface, épithélium, confinement, migration, PIV, tension de ligne, cable d'actine

Abstract

Growth and densification of an epithelium in confined geometry

Epithelium consists of closely packed cells that make up the inside or outside lining of body's surfaces. We study the growth of an epithelium in a confined geometry. Using microfabrication techniques, we developed a surface treatment protocol allowing tissue confinement inside an adhesive area over a few weeks. The technique achieves a micrometer resolution and any geometry of the adhesive area is feasible. In our study, the size is such that cells behave collectively. We analyse the growth of epithelium with Madine Derby Canine (MDCK) cells in circular adhesive regions. Migration and densification of the tissue are studied with PIV (Particle Image Velocimetry) and others image analysis techniques.
We characterize velocity field and observe large amplitude oscillations of the velocity, whose period match the hypothesis of stress wave propagating through the epithelium. We also characterize the appearance of a tridimensionnal rim of cells at the periphery of the epithelium, similar to the first step of tubulogenesis. In two other experiments, using opposite geometry, we study how the epithelium can cover an anti-adhesive region. We show the covering requires a supracellular actomyosine cable, and the cable tension balanced by a surface tension defines a critical size beyond which the anti-adhesive region cannot be covered by the epithelium.

Mots-clés : surface treatment, epithelium, confinement, migration, PIV, line tension, actin cable.

Introduction

A l'échelle de la cellule isolée, les aspects mécaniques ont été systématiquement étudiés et ont permis des avancées majeures dans notre compréhension des relations entre phénotype, génotype et mécanique (Boal, 2011). Pratiquement, un des moyens d'étude a consisté à immobiliser les cellules sur des motifs adhésifs identiques de manière à réaliser de très nombreuses expériences en paralèlle, et ainsi analyser un très grand volume d'information et en réaliser un analyse statistique robuste (on parle de l'analyse d'une «cellule moyenne»). Cette technique permet d'analyser par exemple l'influence des conditions d'adhésion sur la forme et la fonctionnalité des cellules (Théry, 2010).

La culture de tissus permet de voir émerger de nombreuses propriétés spécifiques à la pluricellularité, telles que l'inhibition par contact (Abercrombie, 1970), la séparation de tissus de types cellulaires différents (Steinberg, 1962), le mouvement collectif (Vicsek et Zafiris, 2010). L'étude de systèmes pluricellulaires n'est donc pas simplement qu'une extension de l'étude de la cellule individuelle, mais ouvre sur un ensemble de problématiques dans lesquelles les interactions cellule-cellule sont primordiales.

Les études *in vitro* des propriétés physiques dues à la pluricellularité portent souvent sur des épitheliums non limités. Dans le travail présenté ici, nous proposons d'utiliser la culture sur motifs adhésifs à l'échelle pluricellulaire. Les avantages sont multiples : liberté du choix de la forme et de la taille du motif adhésif, conditions d'adhésions bien connues, possibilité réaliser de nombreuses expériences en parallèle et ainsi de pouvoir faire une analyse statistique, etc.

Le premier chapitre est consacré à la présentation générale de la biologie de la cellule et de l'épithélium, ainsi que les différents propriétés physico-biologique d'un système pluricellulaire, dont en premier lieu l'inhibition par contact.

Le second chapitre présente les techniques et méthodes utilisées pour ce travail : le traitement de surface permettant de définir des zones adhésives et anti-adhésives sur le substrat, la culture cellulaire et les outils biochimiques, les diverses méthodes d'acquisition des images par microscopie optique ainsi que la photoablation biphotonique, et enfin les différents outils d'analyse d'images permettant d'extraire diverses grandeurs physiques à partir d'images de microscopie optique d'épithéliums.

Enfin le troisième et dernier chapitre expose et discute les résultats obtenus à partir de trois expériences différentes. Dans une première partie, nous choisissons

de cultiver l'épithélium sur un motif adhésif circulaire, et d'étudier la migration et la prolifération des cellules dans une situation de confinement.

La deuxième partie est consacrée à la situation inverse : les cellules sont cultivées autour de motifs anti-adhésifs circulaires. La principale question est ici de savoir dans quelle condition et de quelle façon un épithélium recouvre un substrat anti-adhésif.

La troisième et dernière partie porte sur la croissance d'un épithélium sur un motif circulaire, dont un secteur angulaire est anti-adhésif. Cette expérience permet d'étudier les propriétés de contractilité des cellules à la périphérie de la région adhésive.

Notes

Le lecteur trouvera, en annexe, à la fin du manuscrit, les références ainsi que les résumés des articles relatifs à ce travail, en cours de soumission.

Il trouvera également les liens de six vidéos hébergées sur la plateforme YouTube, illustrant diverses expériences citées dans ce manuscrit.

1

Etat des connaissances

Ce chapitre constitue une présentation rapide des connaissances sur la structure d'un épithélium, ses aspects mécaniques et ses propriétés de régulation. Un épithélium (ou tissu épithélial) est l'un des quatre grands types de tissus chez l'animal, avec les tissus conjonctif, musculaire et nerveux. Il recouvre les surfaces et cavités de l'organisme, et permet notamment la protection des organes, le transport à travers les cellules, la filtration. Il forme une monocouche de cellules cohésives, maintenues entre elles par un ensemble de jonctions et reposant sur le tissu conjonctif sous-jacent via la lame basale. Après un rappel sur l'organisation cellulaire et le cytosquelette, nous évoquerons les modes d'adhésion et de migration à l'échelle d'une cellule unique. Ensuite, nous élargirons cette description à l'échelle d'un épithélium. Enfin, nous verrons comment s'effectue la régulation d'un épithélium d'un point de vue mécanique.

1.1 De la cellule au tissu épithélial

Nous décrivons dans cette partie la structure et certaines fonctions d'une cellule animale, puis nous étendons cette description aux épithéliums.

1.1.1 La cellule épithéliale

1.1.1.1 Le cytosquelette

Comme toute cellule eucaryote animale, la cellule épithéliale tient de nombreuses propriétés mécaniques (forme, rigidité, etc) de son cytosquelette. Cet ensemble de polymères de protéines en constant renouvellement s'organise en réseaux de trois types (Alberts *et al.*, 2007).

Actine : Les filaments d'actine sont constitués de monomères d'actine globulaire (ou actine-G). Ces monomères polymérisent en filaments polaires d'actine (ou actine-F). Ces filaments ont une structure en hélice de pas 37 nm et de diamètre 8 nm. Ils sont flexibles (longueur de persistance de l'ordre de 10 µm (Ott *et al.*, 1993)). La polymérisation se déroule de la façon suivante, que ce soit *in vivo* ou *in vitro* (Welch et Mullins, 2002) :

Nucléation : trois monomères d'actine-G s'assemblent pour former un trimère stable, nucléateur pour les étapes suivantes de la polymérisation. La constante cinétique d'un tel assemblage est très faible. La polymérisation à partir d'une protéine de nucléation est bien plus courante (la formine ou complexe Arp2/3 notamment).

Croissance : chaque monomère est polarisé, ce qui induit une polarisation des filaments eux-mêmes. La polymérisation au bout (+), dit barbé, est rapide. La polymérisation au bout (−), dit pointu, est lente. L'hydrolyse de l'ATP en ADP a lieu juste après la liaison d'un monomère au filament déjà formé.

Dépolymérisation : la dépolymérisation est plus rapide au bout pointu qu'au bout barbé.

Un filament peut connaître différentes dynamiques en fonction de la concentration en monomères d'actine aux deux extrémités, et de l'intervention d'autres protéines :

Croissance : lorsque la polymérisation au bout (+) est plus rapide que la dépolymérisation au bout (−), le filament s'allonge.

Décroissance : lorsque la dépolymérisation au bout (−) est plus rapide que la polymérisation au bout (+), le filament se raccourcit. Cela peut être dû à l'intervention d'une protéine de coiffe, qui se lie au bout (+) et empêche le polymérisation.

État stationnaire : lorsque polymérisation au bout (+) et dépolymérisation au bout (−) s'effectuent à même vitesse, le filament garde une taille constante. C'est le phénomène de *treadmilling*, ou tapis roulant, où le filament semble avancer alors que chaque monomère est immobile. Il joue un rôle majeur dans la migration.

Le complexe Arp2/3 et la formine sont deux nucléateurs de la polymérisation, mais participent également à la structure du réseau d'actine :

– Le complexe Arp2/3 vient se fixer sur le côté d'un filament déjà existant (filament mère) pour donner naissance à un filament secondaire. Le filament secondaire forme un angle de 70° en moyenne avec le filament mère. La répétition de ces embranchements donne naissance à une structure branchée, en réseau (Welch et Mullins, 2002).

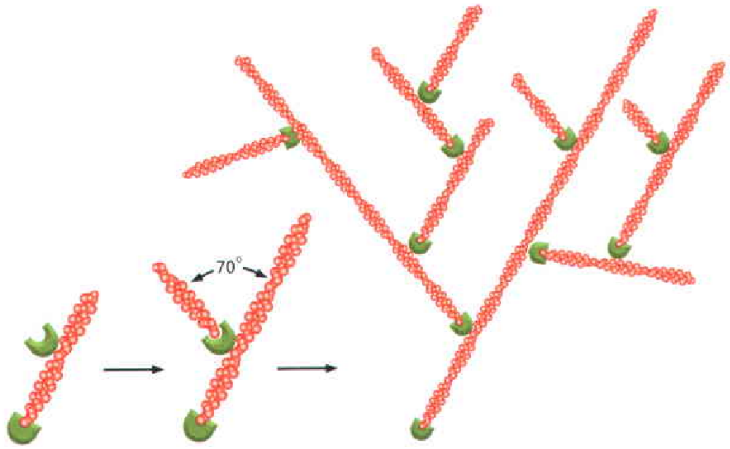

Figure 1.1 – Formation d'un réseau d'actine par embranchements successifs grâce au complexe Arp2/3 (Alberts *et al.*, 2007).

– La formine vient se lier au bout (+) du filament d'actine, de manière processive : au fur et à mesure de l'ajout de monomères d'actine, la formine se déplace pour toujours protéger le bout (+) des protéines de coiffe qui viendraient arrêter le processus de polymérisation. La structure linéaire des filaments est favorisée (Zigmond, 2004), indispensable à la formation des fibres de stress.

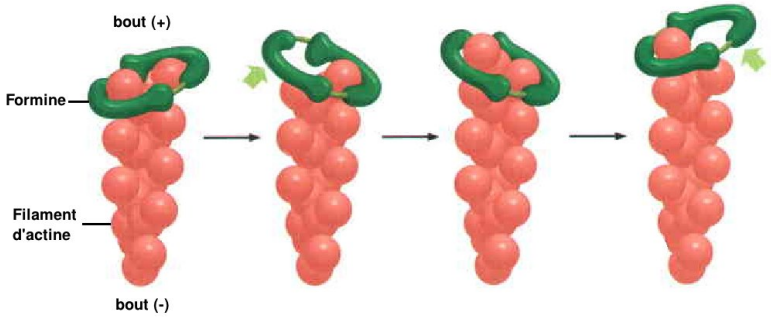

Figure 1.2 – Polymérisation d'un filament d'actine, dont le bout (+) est lié à une formine. La formine reste liée au filament au fur et à mesure qu'il croît (Alberts *et al.*, 2007).

Les filaments d'actine peuvent être maintenus entre eux par des protéines de pontage qui, en fonction de leur longeur et flexibilité, confèrent à la structure

obtenue des propriétés spécifiques. Les protéines de pontage courtes, telles que l'α-actinine ou la fimbrine, fixent étroitement les filaments induisant un arrangement parallèle, en faisceau. Les protéines de pontage longues, telles que la filamine, la spectrine et la dystrophine, assurent un arrangement lâche, en réseau. Le réseau cortical qui assure à la membrane plasmique un soutien mécanique en est un exemple.

Les filaments d'actine servent également de support à des moteurs moléculaires, les myosines, capables de «marcher» le long du filament dans la direction du bout (+) en hydrolysant de l'ATP. La myosine I, par exemple, transporte des organites le long des filaments au sein de la cellule. La myosine II permet la contractilité des faisceaux d'actine : en se liant à deux filaments d'actine de polarités opposées, elle peut ainsi les faire glisser le long l'un de l'autre. Les faisceaux contractiles jouent un rôle important dans la contraction musculaire ainsi que dans la migration cellulaire (le rôle de la contractilité est détaillé dans le paragraphe 1.1.2.4).

Microtubules : Les microtubules sont des filaments cylindriques et creux de 25 nm de diamètre, et très rigides (longueur de persistance de l'ordre du millimètre). Ils sont constitués de 13 protofilaments. Chaque protofilament est un polymère dont la brique de base est un dimère de α-tubuline et β-tubuline. Tout comme les filaments d'actine, les microtubules sont polarisés. La plupart du temps, le bout (−) est ancré au centrosome, via la γ-tubuline appartenant au complexe γ-TuRC, analogue du complexe Arp2/3 pour l'actine. Le bout (+) est le lieu de la polymérisation. Ce bout est stable tant que la β-tubuline exposée est associée à une Guanosine-TriPhosphate (GTP). L'hydrolyse de cette GTP en GDP (Guanosine-DiPhosphate) déstabilise la structure et la dépolymérisation du filament est très rapide (on parle de «catastrophe»). Si une β-tubuline du bout (+) en dépolymérisation retrouve une GDP, la structure se restabilise, et la polymérisation peut reprendre (on parle de «sauvetage»).

Les microtubules sont un acteur majeur du transport intra-cellulaire, grâce à deux types de moteurs moléculaires, les dynéines et les kinésines, capables de se mouvoir le long des microtubules, respectivement en direction du bout (−) et du bout (+). Ces moteurs sont liés à leur queue à des vésicules lipidiques contenant les molécules à convoyer. Les microtubules jouent aussi un rôle important lors de la division cellulaire : les microtubules se lient aux chromosomes et les disposent au niveau de la plaque équatoriale puis les tirent vers les centromères uniquement par polymérisation/dépolymérisation (sans le jeu de moteurs moléculaires).

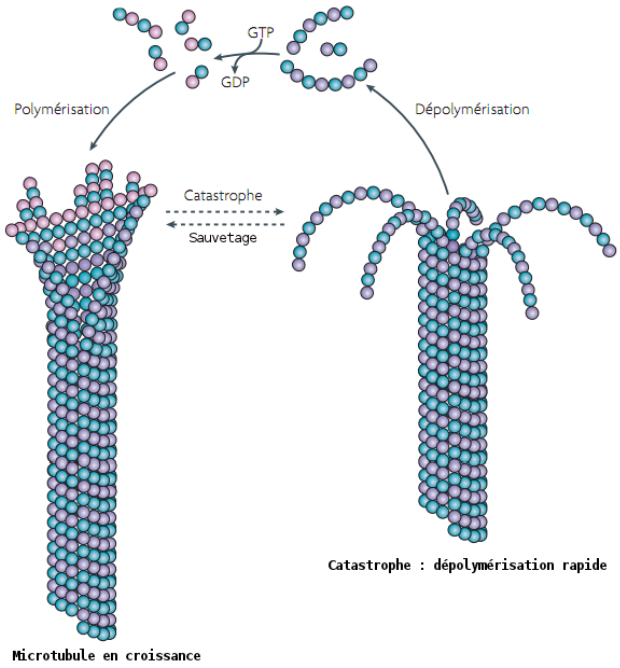

Figure 1.3 – Polymérisation et dépolymérisation des microtubules (Akhmanova et Steinmetz, 2008).

Filaments intermédiaires : Les filaments intermédiaires sont les plus stables et les plus robustes constituants du cytosquelette (Herrmann *et al.*, 2007). Contrairement aux filaments d'actine et aux microtubules, le motif de base des filaments intermédiaires n'est pas une protéine globulaire mais une protéine fibreuse (encadré 1.1). Celle-ci s'associe d'abord en dimères, puis en tétramères (deux dimères anti-parallèles) non polarisés. Enfin, plusieurs tétramères (jusqu'à huit tétramères) s'enroulent les uns sur les autres pour former un filament d'environ 10 nm de diamètre. Cette structure en forme de corde donne au filament intermédiaire une faible longueur de persistance (environ 1 µm) mais une très grande solidité. Dans la cellule, les filaments intermédiaires concourent à la résistance mécanique de la cellule en constituant une «charpente». Ils participent également à la lamina nucléaire, un réseau de filaments sous la membrane nucléaire interne. Il existe une grande variété de filaments intermédiaires, formés à partir de protéines différentes. Ils peuvent être constitués de lamines dans le noyau des cellules eucaryotes, de vimentine dans les cellules musculaires et nerveuses, ou de neurofilaments dans les neurones. Du fait de leur solidité, les filaments intermédiaires sont très présents dans les cellules soumises à de fortes contraintes mécaniques, comme les cellules épithéliales. Dans celles-ci, les filaments intermédiaires sont principalement

constitués de cytokératine. Ils consolident l'épithélium et renforcent son intégrité en s'ancrant à la matrice extra-cellulaire au niveau des hémidesmosomes et aux jonctions cellule-cellule au niveau des desmosomes. Les cytokératines présentent elles-mêmes une grande variabilité. Par exemple, 9 types différents de cytokératines sont présents dans les cellules de l'épithélium luminal des glandes sudoripares (Langbein *et al.*, 2005).

Les trois types de filaments que nous avons décrits forment le cytosquelette et confèrent à la cellule l'essentiel de ses propriétés mécaniques. L'interaction mécanique entre la cellule et son environnement est médiée par les adhésions.

1.1.1.2 Adhésions cellule-substrat

La cellule épithéliale ne repose pas directement sur le tissu sous-jacent, mais sur la lame basale. Cette fine couche d'une centaine de nanomètres d'épaisseur est un réseau dense de macromolécules, dont la laminine et le collagène constituent la majeure partie, secrétées par les cellules épithéliales. Celles-ci adhèrent à cette matrice via des protéines transmembranaires au niveau des adhésions focales et des hémidesmosomes.

Intégrines : Les intégrines sont des protéines transmembranaires permettant l'ancrage des cellules à la matrice extra-cellulaire. Une des extrémités est liée à un filament du cytosquelette, et l'autre extrémité se lie sur un élément de la lame basale. Par changement de conformation, les intégrines peuvent s'attacher ou se détacher de leurs ligands. Ces protéines traversant la membrane, elles permettent la transmission de signaux mécaniques. Cela leur confère une versatilité indispensable à la migration ou la division par exemple.

Il existe une grande variété d'intégrines (24 sont connues), capables de se greffer aux différents constituants de lame basale et de se lier aux différents filaments du cytosquelette.

Adhésions focales : Plusieurs types d'intégrines sont capables de s'ancrer à la laminine de la lame basale et de se lier aux filaments d'actine du cytosquelette, via de nombreuses protéines, dont la taline, la paxiline, la α-actine et la vinculine (figure 1.4). Le recrutement d'intégrines et de filaments d'actine dans les adhésions focales est régulé par la GTPase Rho (Encadré 1.2).

Encadré 1.1 – Protéines globulaires et protéines fibreuses

La structure des protéines dans l'espace est la conséquence du repliement de la chaîne polypeptidique sous l'effet d'interactions, telles que les interactions électrostatiques, les forces de Van der Waals, les ponts disulfures (liaisons covalentes entre deux cystéines). On peut classer la forme des protéines en trois catégories :

Les protéines globulaires ont une forme compacte. La plupart des groupes apolaires (hydrophobes) sont orientés vers l'intérieur, alors que les groupes polaires (hydrophiles) sont orientés vers l'extérieur. Les protéines globulaires sont donc généralement hydrophiles, donc solubles dans l'eau. Ce sont les protéines les plus courantes

Les protéines fibreuses ont une forme de bâtonnets. Dans cette conformation, les groupes apolaires ne sont pas enfouis au cœur de la protéine, mais au contraire tournés vers l'extérieur. Les protéines fibreuses sont donc généralement non solubles dans l'eau. Très stables mécaniquement, elles ont principalement un rôle structural dans la cellule. Par exemple les cytokératines, constituant majoritaire des filaments intermédiaires dans la cellule épithéliale, sont des protéines fibreuses. Citons également le collagène, élément essentiel de la lame basale.

Les protéines membranaires sont localisées au niveau de la membrane de la cellule. Elles possèdent à la fois des parties apolaires insérées dans la bicouche lipidique de la membrane, et des parties polaires en contact avec l'intérieur et/ou l'extérieur de la cellule.

Une protéine peut passer d'une forme globulaire à une forme fibreuse. La fibronectine, fabriquée par la cellule, est transportée sous forme globulaire (donc soluble) dans le cytoplasme. Puis au contact des intégrines liées à la membrane cellulaire, sa conformation est modifiée : la fibronectine devient fibreuse, et participe à l'organisation de la matrice extra-cellulaire (Schwarzbauer et Sechler, 1999).

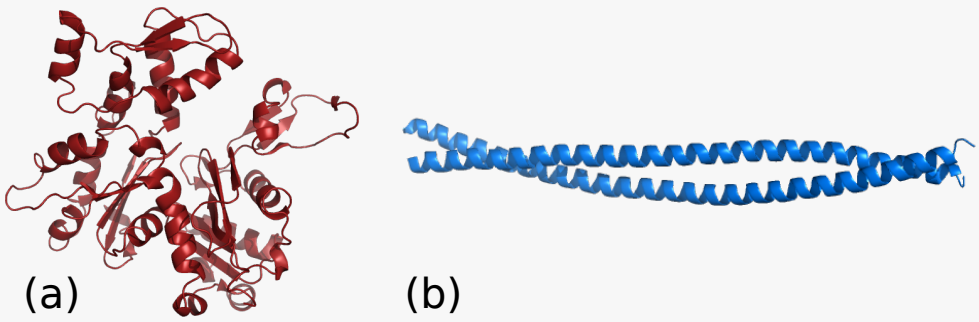

Figure – Structure d'une molécule d'actine (a) et d'un assemblage de kératine 4 et 15 (b).(RCSB Protein Data Bank)

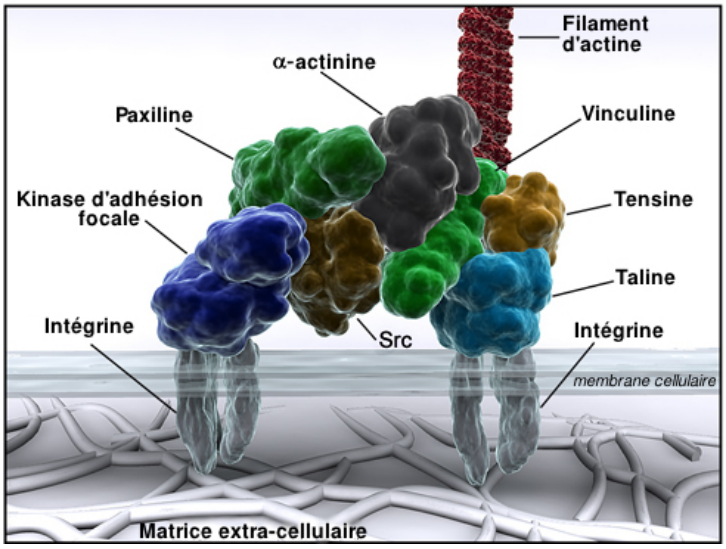

Figure 1.4 – Structure d'une adhésion focale. (Cell migration Lab, University of Reading, Angleterre)

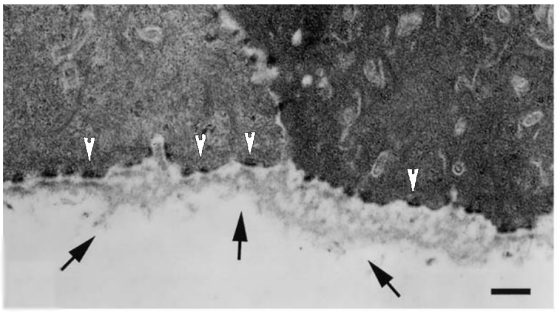

Figure 1.5 – Image de microscopie électronique montrant un épithélium. Les flèches blanches montrent les hémidesmosomes. Les flèches noires montrent la lame basale. Barre = 1 µm. (Taneri *et al.*, 2004)

Hémidesmosomes : Spécifiques aux cellules épithéliales, les hémidesmosomes font intervenir l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ qui se lie aux filaments de kératine (filaments intermédiaires) de la cellule et à la laminine de la lame basale.

Nous avons vu comment la cellule adhère à son environnement et interagit avec lui. Les adhésions sont extrêmement dynamiques, elles se font et se défont au gré, par exemple, des mouvements de la cellule sur le substrat.

Encadré 1.2 – Les Rho GTPases

Les Rho GTPases constituent l'une des cinq sous-familles de GTPases : Ras, Rab, Sar1/Arf, Ran et Rho.
Les GTPases sont des co-enzymes liant les coenzymes GTP ou GDP et possédant une activité GTPasique. Elles fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires entre un signal activateur et un effecteur. Elles peuvent donc réguler dans le temps et dans l'espace des fonctions cellulaires spécifiques. Les GTPases Rho sont notamment impliquées dans la migration cellulaire, la division cellulaire, ainsi que dans la polarisation.
Les GTPases existent sous deux formes : une forme inactive, liée au GDP, incapable d'interagir avec ses effecteurs, et une forme active, liée au GTP, capable d'interagir avec ses effecteurs. L'activation de la GTPase, c'est-à-dire le passage de la forme inactive à la forme active, est initiée par la dissociation du GDP lié à cette GTPase. Puis lorsque la GTPase se lie avec un GTP, très abondant dans le cytoplasme, elle change de conformation, permettant l'interaction avec les effecteurs. L'inactivation (passage de la forme active à la forme inactive) passe par l'hydrolyse du GTP par la GTPase elle-même. Ces deux processus (activation et inactivation) sont très lents s'ils ne sont pas accélérés par l'intervention des GEFs et GAPs :

- Les facteurs d'échange de nucléotide guanylique (ou Guanine Nucleotide Exchange Factors, GEFs) accélèrent la dissociation du GDP lié à la GTPase inactive, stabilisent la GTPase sans nucléotide, permettant ainsi la liaison avec un GTP. Ensuite la GEF se dissocie de la GTPase.
- Les protéines d'activation des GTPases (ou GTPase Activating Proteins, GAPs) augmentent l'activité d'hydrolyse du GTP lié aux GTPases, permettant un retour rapide à la forme inactive.

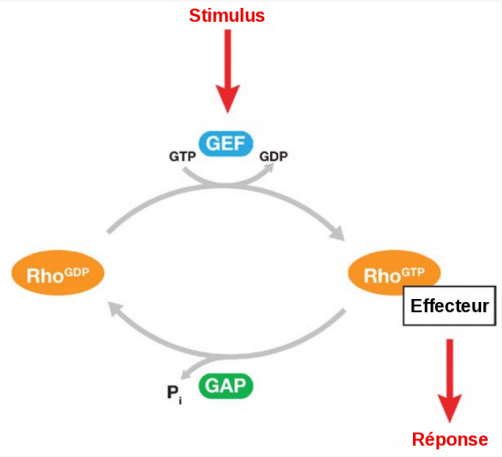

Figure – Le cycle des Rho-GTPases entre une forme inactive (liée à la GDP) et une forme active (liée à la GTP) (Jaffe et Hall, 2005).

1.1.1.3 Migration cellulaire

Omniprésente lors de l'embryogénèse (gastrulation, formation de la crête neurale), la migration cellulaire est également indispensable à la survie de l'individu adulte. L'angiogénèse, la réponse immunitaire ou la cicatrisation dépendent directement de la migration cellulaire. Et sa dérégulation est liée à des maladies telles que le cancer, l'athérosclérose ou les maladies immunitaires [1].

Migration par extension de protrusion : La migration d'une cellule isolée sur un substrat est classiquement décrite par quatre étapes (Lauffenburger et Horwitz, 1996) (figure 1.7) :

Déformation à l'avant : A l'avant de la cellule, les filaments d'actine polymérisent du côté (+) et déforment la membrane cellulaire. La protrusion engendrée est un *filopode* quand les filaments d'actine croissent en faisceau parallèle, et que la déformation de la membrane est fine et cylindrique. Les filopodes permettent à la cellule de sonder son environnement (Mattila et Lappalainen, 2008). La protrusion est un *lamellipode* quand les filaments d'actine croissent en réseau et que la déformation de la membrane est large et plate.

Adhésion de la protrusion : Des contacts focaux se forment sous la protrusion. La plupart de ces contacts sont instables et se désassemblent rapidement (Millon-Frémillon *et al.*, 2008). Mais certains contacts maturent en adhésions focales et ancrent les filaments d'actine au substrat.

Traction : Les myosines II liées à ces filaments d'actine se contractent et provoquent le déplacement du corps cellulaire vers l'avant.

Rétraction à l'arrière : A l'arrière de la cellule, les fibres de stress se contractent également et induisent la rétraction du corps cellulaire ainsi que le détachement des adhésions.

Polarisation de la migration : Les arguments développés ci-dessus permettent de décrire le mouvement cellulaire mais pas la migration dirigée. Il faut pour cela introduire la notion de polarité, son acquisition et son maintien durant le mouvement.

1. Respectivement : la migration des cellules tumorales pendant le processus métastatique permet leur dissémination dans l'organisme ; la migration des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins vers un dépôt riche en cholestérol à la surface des vaisseaux accroît la taille de ces dépôts et augmente le risque d'obstruction de l'écoulement sanguin ; la migration des leucocytes dans les tissus est indispensable au déroulement des défenses immunitaires.

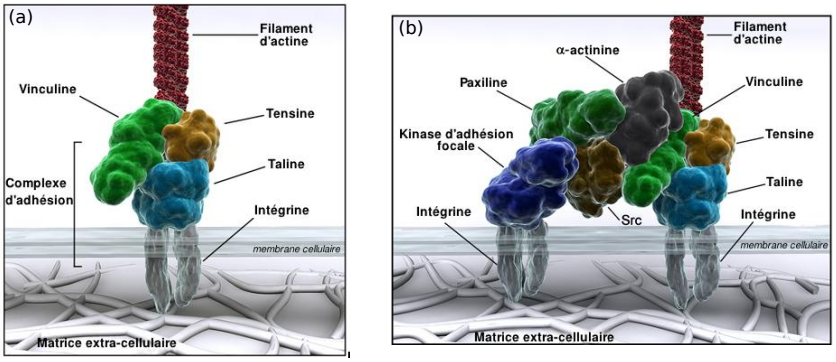

Figure 1.6 – Maturation d'un contact focal (a) en adhésion focale (b). (Cell migration Lab, University of Reading, Angleterre)

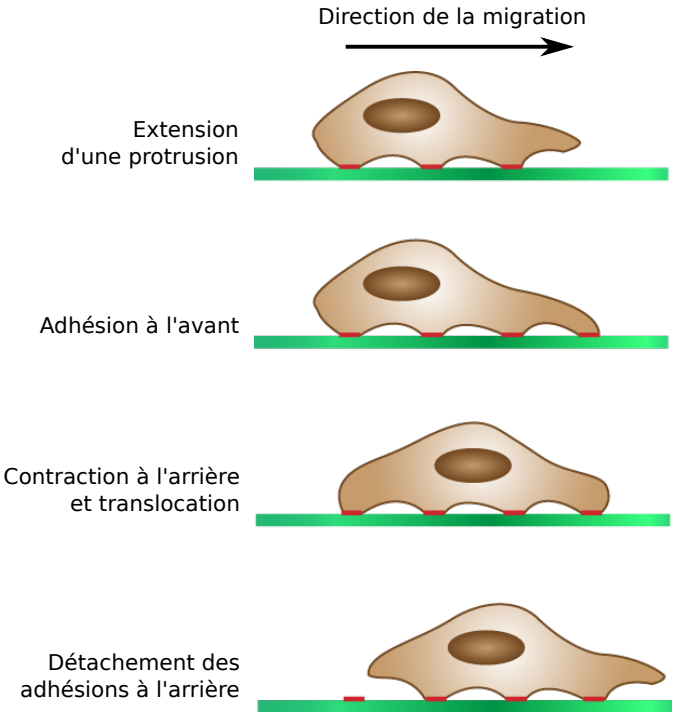

Figure 1.7 – Les étapes de la migration cellulaire.(Wikimedia Commons)

La polarité cellulaire est la distribution asymétrique des structures et des fonctions cellulaires. Elle est impliquée non seulement dans la migration cellulaire (définissant la direction de migration), mais également dans l'organisation apico-basale des cellules épithéliales et dans la division cellulaire (définissant l'axe de division).

Dans le cas de la polarisation de la migration, la cellule peut se polariser spontanément (Altschuler *et al.*, 2008) et en réaction les faibles différences de concentration en molécules de signalisation peuvent être amplifiées, jusqu'à stabiliser cette polarisation. Cependant, la cellule se polarise généralement en réaction à un signal extérieur. Celui-ci peut être chimique (chimioattractif ou chimiorépuslif), mais la topologie de la matrice extra-cellulaire peut également jouer un rôle important (Petrie *et al.*, 2009).

Les mécanismes de transduction qui peuvent expliquer la polarisation sous l'effet d'un gradient chimiotactique sont complexes et font intervenir de nombreux éléments cellulaires. Sans entrer dans les détails qui nous emmèneraient hors du cadre de ce travail, citons à nouveau le rôle central des GTPases Rho (RhoA, Rac1 et Cdc42). Ces trois Rho-GTPases régulent differents aspects de la dynamique du cytosquelette (Heasman et Ridley, 2008). Cdc42 est impliqué dans la polymérisation de l'actine dans les filopodes, Rac1 est un promoteur de la formation des lamellipodes en régulant la polymérisation de l'actine (Jaffe et Hall, 2005). Et RhoA favorise la formation des fibres de stress.

Dans une cellule polarisée, Rac1 et Cdc42 sont présents à l'avant et activent la formation de protrusions, tandis que RhoA est présent à l'arrière et contrôle la contraction cellulaire. Une inhibition mutuelle entre Rac1 et RhoA a été établie (Rottner *et al.*, 1999). De plus, il a été récemment montré que RhoA est également présent à l'avant au début de la formation des protrusions en tant qu'initiateur de la polymérisation de l'actine (Machacek *et al.*, 2009).

Les GTPases Rho sont également impliquées dans la polarisation de l'adhésion sur le substrat lors de la migration cellulaire. Lors de la formation d'une protrusion, les complexes focaux se créent d'abord sous l'influence de Rac1 (Nobes *et al.*, 1995). Ce sont des petites structures d'adhésion qui se désassemblent rapidement ou bien se développent en adhésions focales (Webb *et al.*, 2002), plus stables, sous le contrôle de RhoA via ROCK (Rho-kinase) (Amano *et al.*, 2010), qui à son tour stimule la contractilité.

Si l'acquisition de la polarisation est sous le contrôle de Rac1, son orientation et son maintien au cours du mouvement sont associés à Cdc42 (Etienne-Manneville,

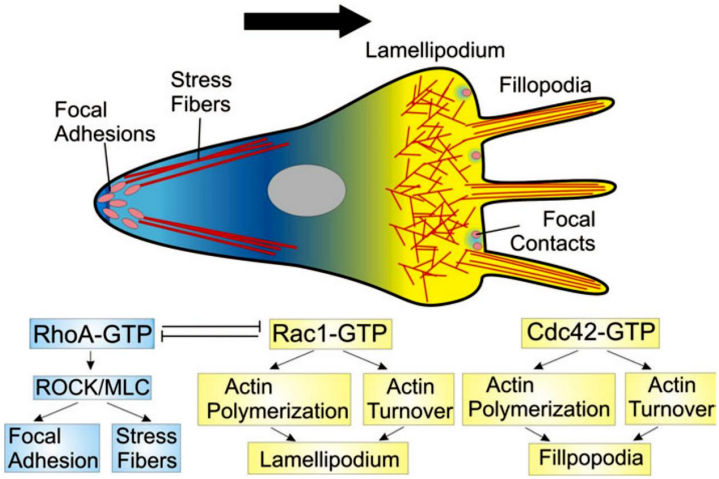

Figure 1.8 – Le rôle des Rho GTPases dans le contrôle de la migration (Mayor et Carmona-Fontaine, 2010).

2004). Cdc42 participe non seulement à la polarisation de la migration, mais à la polarisation de la cellule dans son ensemble. Cdc42 contrôle la direction de la polarisation au cours de la division cellulaire, ainsi que la polarité apico-basale des cellules épithéliales.

1.1.2 L'épithélium

Un épithélium est un tissu de cellules étroitement juxtaposées, sans présence de matrice extracellulaire entre les cellules. Il forme une monocouche cellulaire autour du corps (la peau) ou des organes internes et de leurs cavités. Il est une barrière entre un tissu sur lequel il repose et une cavité remplie d'un fluide (reins, vessie, etc) ou d'air (appareil respiratoire, peau). Ses fonctions sont multiples : protection mécanique contre les agressions, transport d'ions, de protéines, et d'autres molécules de part et d'autre de l'épithélium, sécrétion de substances (épithéliums glandulaires), etc.

L'épithélium repose sur un tissu d'un côté, ce qui définit son pôle basal, mais pas de l'autre côté, ce qui définit le pôle apical. Le pôle basal adhère à la lame basale, le pôle apical est en contact direct avec un fluide ou bien avec l'air. Cela définit la polarité apico-basale de l'épithélium.

Nous décrivons ici les adhésions cellule-cellule au sein d'un épithélium, puis comment ces adhésions régulent les interactions mécaniques intercellulaires. Pour cela, nous nous intéressons aux processus collectifs qui se présentent à l'échelle d'un épithelium : la migration collective et la contractilité collective.

1.1.2.1 Adhésions cellule-cellule

La propriété majeure d'un épithélium est que les cellules qui le constituent adhèrent entre elles pour former une monocouche cohésive. Il convient donc maintenant de décrire les différents types d'adhésions cellule-cellule.

Jonctions serrées : La frontière perméable que l'épithélium forme entre le tissu et le fluide ne peut être fonctionnelle que si tous les échanges sont contrôlés par les cellules elles-mêmes. Pour éviter que des matières extracellulaires présentes dans le fluide ne passent dans le tissu, ou bien que l'eau présente dans le tissu ne se vide dans les cavités, la cohésion entre les cellules doit donc être parfaite. C'est le rôle des jonctions serrées. Elles sont assurées par trois protéines transmembranaires, la claudine, l'occludine et la tricelluline, dont les domaines extracellulaires interagissent avec ceux des cellules voisines. Elles forment un réseau de fibrilles qui ceinture le domaine apical des cellules. Les jonctions serrées sont liées aux filaments d'actine.

Jonctions gap : Les jonctions gap permettent de coupler deux cellules voisines chimiquement et électriquement en laissant passer des ions ou des petites protéines du cytoplasme de l'une ou cytoplasme de l'autre. Ce couplage permet la coordination à l'échelle multicellulaire de l'activité des cellules individuelles. Elles sont formées de quelques dizaines à quelques milliers de canaux. Chaque canal est formé de deux connexons alignés, chacun provenant d'une cellule. Chaque connexon est un hexamère : 6 connexines transmembranaires assemblées en tube. La perméabilité des jonctions gap peut être régulée par la cellule.

Jonctions d'ancrage : Les adhésions mécaniques cellule-cellule sont assurées d'une part par les jonctions adhérentes liées au cytosquelette d'actine (via α-caténine, β-caténine, α-actinine et vinculine), et d'autre part par les desmosomes liées aux filaments intermédiaires[2] (via plakoglobine, plakophiline et desmoplakine). Ces deux types de jonctions forment les jonctions d'ancrage. Ce sont les E-cadhérines qui assurent la jonction cellule-cellule dans les deux cas, en formant une liaison homophile en présence d'ions Ca^{2+}.

2. On peut établir une analogie entre les adhésions cellule-substrat et les jonctions cellule-cellule : les filaments intermédiaires sont liés à la fois à la lame basale via les hémidesmosomes et aux cellules voisines via les desmosomes. Et le cytosquelette d'actine est lié à la lame basale via des adhésions focales et aux cellules voisines via les jonctions adhérentes.

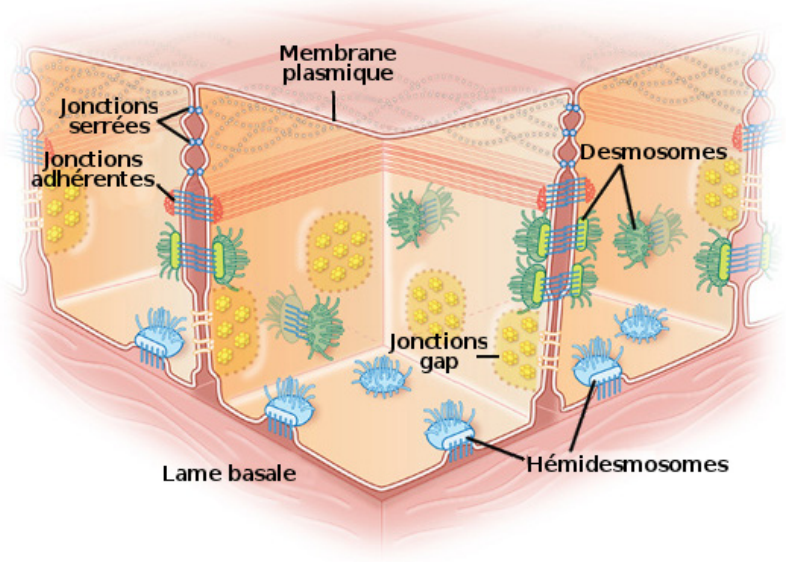

Figure 1.9 – Vue schématique de la structure épithéliale et des différentes jonctions cellule-cellule et cellule-substrat (d'après Scitable, Nature Education).

Les jonctions adhérentes forment une ceinture continue autour de la cellule assurant une occlusion complète de l'espace intercellulaire. Un faisceau d'actomyosine court le long de cette ceinture et forme un anneau contractile dans la partie apicale de la cellule (voir figure 1.9). La contraction de cet anneau est à l'origine de mouvements morphogénétiques. Les jonctions adhérentes sont très dynamiques. Elles sont sans cesse assemblées et désassemblées, permettant de relâcher les contraintes qui peuvent être imposées au cytosquelette lors de changements dans l'organisation du tissu. Cela permet de conserver la cohésion de l'épithélium, même lors de divisions, apoptoses, délaminations ou intercalations d'une cellule dans le tissu (Baum et Georgiou, 2011).

Les desmosomes sont des jonctions ponctuelles et très solides mécaniquement et stables temporellement : ils restent ancrés à la membrane (Windoffer *et al.*, 2002), mais peuvent se déplacer le long de celle-ci au gré des réarrangements cellulaires (Roberts *et al.*, 2011), conférant sa résistance mécanique à l'épithélium, tandis que les jonctions adhérentes permettent la coordination du cytosquelette d'actine d'une cellule avec ceux des cellules voisines et donc par exemple la coordination de la motilité.

Les cellules au sein d'un épithélium échangent des signaux chimiques via les jonctions gap. La communication intercellulaire peut également être de nature mécanique. La transmission des forces d'une cellule à une autre a lieu au niveau

des jonctions d'ancrage, qui sont les acteurs principaux de la mécanotransduction.

1.1.2.2 Mécanotransduction

Le développement d'un organisme multicellulaire nécessite la régulation de nombreuses fonctions cellulaires : prolifération, migration, déformation, différentiation, etc. Cette régulation est notamment d'origine biochimique, impliquant en particulier les facteurs de croissance de transformation TGF (Transformation growth factors) secrétés par certaines cellules pour induire la différenciation, la prolifération ou la mort cellulaire (Massagué, 2000).

Mais la régulation est également d'origine mécanique. La matrice extracellulaire et les cellules voisines imposent à chaque cellule sa forme et sa position au sein d'un tissu. La géométrie de l'environnement de la cellule ainsi que les forces exercées sur elle sont des signaux qu'elle reçoit et interprète en adaptant son comportement. La mécanotransduction est la conversion d'un signal mécanique externe en réponse biochimique intracellulaire.

Une cellule est liée aux cellules voisines et au substrat par diverses adhésions, et c'est principalement par l'intermédiaire de ces adhésions qu'elle ressent l'environnement mécanique.

Au niveau des interactions cellule-substrat, les intégrines sont le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette. Elles transmettent les forces de part et d'autre des adhésions, que ces forces soient générées par la cellule (contraction des filaments d'actomyosine) ou par l'environnement. Plus que des simples transmetteurs de forces, elles sont des senseurs des forces exercées sur elles en changeant de conformation en fonction de la force appliquée (Jin *et al.*, 2004). L'activité des intégrines est liée à leur conformation (Askari *et al.*, 2009). Plus précisément, en se liant avec une taline, une intégrine change de conformation et devient active : elle est capable de se lier à la matrice extracellulaire et de créer un contact focal. Une contraction du cytosquelette d'actine ou un mouvement de la matrice extracellulaire induisent une tension mécanique sur l'intégrine qui stabilise sa conformation active (Kong *et al.*, 2009), et donc consolide l'adhésion focale (Riveline *et al.*, 2001). Un grand nombre de protéines peuvent se lier à la partie intracellulaire des intégrines, ouvrant la voie à une cascade biochimique (Legate et Fässler, 2009) impliquant en particulier les Rho GTPases (voir encadré 1.2), et par ce biais sur les différents aspects biomécaniques de la cellule, tels que la migration, mais aussi la prolifération et la survie.

Un exemple spectaculaire de réponse cellulaire à l'environnement mécanique

extérieur est la différenciation des cellules souches sur des substrats de rigidités variables (Engler *et al.*, 2006). Ces auteurs observent en effet que la rigidité du substrat oriente la différenciation des cellules souches. Une cellule souche sur un substrat «mou» acquiert des caractères de neurone, alors que sur un substrat rigide elle acquiert des caractères de cellule osseuse. Notons enfin que si une cellule perd le contact avec la matrice extracellulaire, elle déclenche sa propre mort cellulaire (Stupack et Cheresh, 2002).

De manière similaire, les jonctions adhérentes, reliant les cytosquelettes d'actine de deux cellules voisines, sont au centre des interactions mécaniques cellule-cellule, jouant le rôle de senseurs des contraintes mécaniques internes ou externes. Par exemple, les jonctions adhérentes se renforcent lorsque la contractilité acto-myosine est augmentée (Liu *et al.*, 2010, Ladoux *et al.*, 2010) ou lorsqu'une force extérieure est appliquée à la cellule (le Duc *et al.*, 2010). Ce mécanisme permet d'empêcher la rupture des liaisons cellule-cellule. L'α-caténine pourrait jouer un rôle dans ce mécanisme : la force appliquée pourrait induire un changement de conformation de cette protéine, exposant à la vinculine un site de liaison supplémentaire. Cette vinculine est un point d'attache supplémentaire entre le réseau d'actine et la jonction adhérente, renforçant ainsi l'adhésion (Yonemura *et al.*, 2010). L'engagement des E-cadhérines dans les jonctions adhérentes a également un effet sur les Rho GTPases.

Nous avons vu que l'application d'une force sur une cellule peut déclencher une cascade de processus biochimiques, activant ou inhibant une fonction cellulaire, souvent par l'intermédiaire des Rho GTPases. Au sein d'un épithélium, toutes les cellules sont en contact serré. Une cellule en migration applique donc des forces sur les cellules voisines, ce qui déclenche des processus biochimiques qui peuvent activer ou inhibier à leurs tours des fonctions cellulaires telles que la migration, l'adhésion, la contraction,etc. D'un point de vue mécanique, on peut considérer un épithélium comme un système complexe d'éléments (les cellules) interagissant mécaniquement entre eux, ce qui modifie leurs propriétés (leur taille, leur forme et leur vitesse notamment). Bien entendu, cette régulation d'origine mécanique complète les processus purement biochimiques.

D'un tel système complexe peuvent émerger des processus collectifs (Vicsek et Zafiris, 2010, Grant *et al.*, 2006, Reffay *et al.*, 2011) : nous développons maintenant deux exemples mettant en jeu des cellules adhérant entre elles, la migration collective et la contractilité collective.

1.1.2.3 Migration collective

Dans un organisme multicellulaire, les cellules migrent fréquemment en groupe, en conservant un contact entre elles. La migration collective est un processus fondamental dans le développement embryonnaire (formation de la crête neurale, vascularisation, etc) ou à l'âge adulte (cicatrisation).

La migration collective apporte un certain nombre d'avantages par rapport à ce que serait la migration individuelle d'un groupe de cellules :

- la conservation de l'intégrité du tissu durant la migration,
- la coopération des cellules à la formation d'un tissu à la forme bien déterminée,
- la fiabilité du processus par la redondance des acteurs de la migration.

L'étude de la migration collective nécessite donc de regarder le tissu comme un ensemble et non pas comme la juxtaposition de cellules individuelles.

Les types de migrations collectives *in vivo* ou *in vitro* sont variés (Friedl et Gilmour, 2009) (et décrits dans la figure 1.10). Nous ne nous intéresserons ici qu'à la migration d'un épithélium (à deux dimensions) (1.10a).

La migration collective d'un épithélium est courante durant le développement embryonnaire (Köppen *et al.*, 2006), comme par exemple dans le cas de la fermeture dorsale pour l'embryon de drosophile (voir encadré 1.3, page 32), ou chez l'adulte le renouvellement de l'épithélium intestinal (Sancho *et al.*, 2003). L'une des fonctions de l'épithélium est de constituer une barrière protectrice du tissu sous-jacent. Un épithélium en migration doit conserver cette fonction et ne peut donc pas perdre son intégrité. Le contact cellule-cellule doit être continûment assuré. En cas de blessure, un processus de migration collective est enclenché pour cicatriser la plaie et rétablir l'intégrité de l'épithélium.

Cicatrisation : Lorsqu'une partie de l'épithélium perd sa cohésion, ou plus drastiquement lorsqu'une partie de l'épithélium est absente, commence un processus de cicatrisation dans le but de restaurer l'intégrité de l'épithélium. La cicatrisation de blessure présente des similarités avec des mouvements morphogénétiques pendant le développement de l'embryon de certains organismes (Martin et Parkhurst, 2004). Dans le cas de blessures de petite taille (quelques tailles cellulaires), la réépithélialisation met en œuvre un mécanisme de fermeture par «cordon de bourse» (*purse-string*) : un câble d'acto-myosine supracellulaire formé par de nombreux filaments d'actine en faisceaux parcourt le bord de la blessure. Les propriétés contractiles de ce câble assurent la fermeture (Martin, 1997). Pour de plus grandes

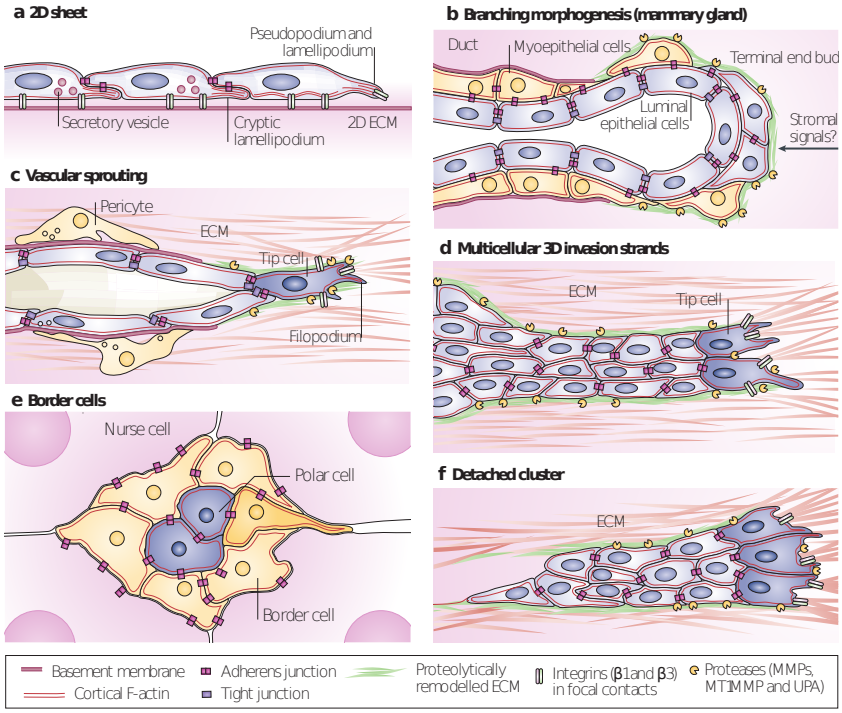

Figure 1.10 – (a) Monocouche cohésive migrant sur une matrice extra-cellulaire bidimensionnelle. (b) Formation d'une glande mammaire par embranchement. (c) Formation d'un vaisseau sanguin. La cellule en tête dirige la migration par extension de filopodes. (d) Invasion d'une digitation de cellules cancéreuses à partir d'une tumeur. (e) Migration d'un groupe de cellules entre les cellules de l'œuf de drosophile. (f) Migration d'un groupe de cellules cancéreuses détachées de la tumeur (d'après Friedl et Gilmour (2009))

.

Encadré 1.3 – La fermeture dorsale de l'embryon de drosophile

Jusqu'au milieu de l'embryogénèse, l'embryon de drosophile est recouvert d'un épiderme sur presque toute sa surface, à l'exception de la face dorsale. Cette région est transitoirement recouverte par des cellules extra-embryonnaire, l'amnioséreuse, dont le devenir est de dégénérer en fin d'embryogénèse, après avoir été entièrement recouverte par l'épiderme au cours de la **fermeture dorsale**. Le processus peut être décrit en quatre étapes successives (Jacinto *et al.*, 2002) :

L'initiation : les cellules de l'amnioséreuse se contractent et provoquent le déplacement des cellules de la partie antérieure de l'épiderme vers la partie dorsale.

Le recouvrement de l'amnioséreuse : de l'actine s'accumule au bord de l'épiderme, et polymérise jusqu'à former un câble d'actine supra-cellulaire tout autour de l'amnioséreuse. Les contractions de l'amnioséreuse associées à la tension exercée par le câble conduisent à la fermeture de l'épiderme.

La fermeture «éclair» : aux extrémités antérieure et postérieure du trou, les deux bords sont assez proches pour que les filopodes étendus par les cellules d'un bord puissent atteindre les cellules du bord opposé. La fermeture ne se déroule plus de façon homogène, mais prend la forme d'une fermeture-éclair (*zipping*).

La terminaison : la migration cesse lorsque les deux flancs latéraux de l'épiderme se rejoignent et forment une suture parfaite.

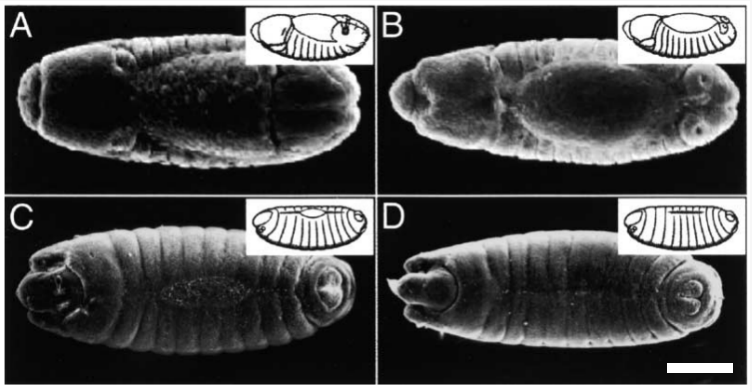

Figure – Les quatres étapes de la fermeture dorsale de l'embryon de drosophile (Jacinto *et al.*, 2002). Barre = 100 µm.

blessures, en plus du câble d'actine qui parcourt le bord du tissu, des protrusions (décrites au paragraphe 1.1.1.3) participent également à l'invasion de la zone libre par l'épithélium.

L'étude de la cicatrisation *in vitro* sur un substrat bidimensionnel est un test classique de migration : soit une partie de l'épithélium est retirée à l'aide d'un outil de type scalpel ou pipette, soit un pochoir est disposé sur le substrat empêchant l'épithélium de pousser dans certaines zones. Le fait de retirer le pochoir laisse une zone libre devant le bord de l'épithélium, et suffit à initier la migration (Poujade *et al.*, 2007).

Une des caractéristiques des mouvements collectifs de la cicatrisation est que l'invasion de la blessure par la zone libre n'est pas réduite à la migration des seules cellules du bord, mais implique en réalité des mouvements à l'échelle plus globale, jusqu'à plusieurs dizaines de cellules en amont du bord de tissu. Les mouvements collectifs résultent des mécanismes de migration à l'échelle cellulaire, coordonnés à l'échelle intercellulaire.

Coordination : La coordination au sein d'un tissu épithélial s'établit à deux niveaux :

- l'adhésion cellule-cellule couple mécaniquement deux cellules voisines, leur conférant un comportement migratoire très proche, et ce d'autant plus que l'adhésion est forte.
- la communication cellule-cellule par signaux chimiques joue également un rôle fondamental. Les molécules de signalisation peuvent transiter d'une cellule à l'autre par les jonctions gap. L'interaction entre protéines membranaires au niveau du contact permet également la transmission d'un signal.

Ces deux aspects peuvent par ailleurs se coupler : la force appliquée sur une cellule par sa voisine peut initier une cascade biochimique dans le cytoplasme, qui peut à son tour contrôler les forces exercées par cette cellule.

Le couplage entre les aspects mécanique et biochimique peut ainsi conduire le tissu à générer des forces sur le substrat bien plus importantes que la force que peut générer une cellule unique (Du Roure *et al.*, 2005, Mertz *et al.*, 2012).

La coordination de la migration cellulaire peut aussi participer à la morphogénèse. S'ils sont concertés, des petits mouvement à courte portée, comme des changements de forme cellulaire ou des réarrangements locaux de la position des cellules avec leurs voisines, peuvent aboutir à des modifications importantes de la forme ou de la taille d'un tissu (Keller, 2006).

Transition Epithelium-mesenchyme et cancer : La migration collective n'est possible que quand les cellules sont liées les unes aux autres. Si ce caractère cohésif est perdu, alors la migration des cellules devient individuelle.

Par exemple, lors de la transition épithélium-mesenchyme, une modification des propriétés d'adhésion cellule-cellule cause la perte de la cohésion de l'épithélium : les cellules ne sont plus étroitement liées, mais au contraire elles sont dispersées dans la matrice extracellulaire et migrent de façon individuelle. C'est le cas des cellules qui quittent la crête neurale et envahissent divers organes de l'embryon (Theveneau et Mayor, 2012).

Inversement, des cellules individuelles peuvent, par changement de leurs propriétés d'adhésion, se lier les unes aux autres jusqu'à former un épithélium et amorcer alors une migration collective. De telles transitions ont lieu lors du développement embryonnaire, comme lors du développement des tubules rénaux (Liu, 2004).

Elles sont aussi importantes à l'âge adulte, dans le cancer par exemple. Dans les carcinomes (les cancers épithéliaux) la transition épithélium-mésenchyme a un rôle important dans le processus métastatique (Thiery *et al.*, 2002). Elle est impliquée dans le détachement d'une cellule cancéreuse de la tumeur et de son invasion dans le tissu sain environnant.

Récemment, l'idée que le passage de l'épithelium au mésenchyme est continu et non discret a commencé à s'imposer. Il semble établi sur plusieurs exemples que les cellules épithéliales peuvent passer par une succession d'états intermédiaires les conduisant au phénotype mésenchymateux (Revenu et Gilmour, 2009).

1.1.2.4 Contractilité collective

Le cytosquelette est doté de propriétés contractiles. Dans l'épithélium, les cytosquelettes des cellules sont reliés les uns aux autres par l'intermédiaire des jonctions d'ancrage. Ainsi, la contraction d'une cellule provoque une tension sur les cellules voisines, qui en réaction peuvent elles-mêmes adapter l'état de contraction de leur cytosquelette. La contraction coordonnée des cytosquelettes de plusieurs cellules peut induire des mouvements à l'échelle de plusieurs cellules.

A l'échelle cellulaire, la contractilité des fibres d'acto-myosine intervient en de multiples circonstances. Par exemple, la translocation de la cellule après la création d'une protrusion et son adhésion au substrat est en partie due à la contraction du cytosquelette d'actine à l'arrière de la cellule (voir paragraphe 1.1.1.3). La contraction du cytosquelette est également indispensable à la division cellulaire,

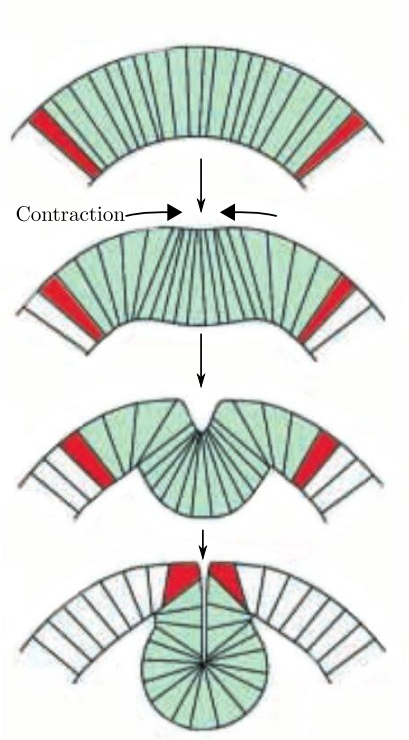

Figure 1.11 – Coupes transversales d'illustration de l'invagination du mésoderme chez l'embryon de drosophile due à la constriction apicale. (Oda et Tsukita, 2001)

lors de la scission de la cellule mère en deux cellules filles (figure 1.15a,b). Lors d'une blessure cellulaire, c'est-à-dire quand la membrane plasmique présente un trou, la réparation est réalisée à l'aide de la contraction du cortex acto-myosine qui sous-tend la membrane cellulaire (figure 1.15c,d).

A l'échelle multicellulaire, la contraction coordonnée des cytosquelettes d'un ensemble de cellules peut provoquer des mouvements morphogénétiques de grande ampleur. Par exemple, la contraction de l'anneau d'actomyosine situé au niveau apical de la cellule épithéliale tend à la déformer : la surface apicale est diminuée, alors que la surface basale est inchangée. Lorsque cette constriction est coordonnée à l'échelle de plusieurs cellules, elle peut induire une invagination. Ainsi l'invagination du mésoderme lors du développement de l'embryon de drosophile est liée à la constriction apicale des cellules de la partie ventrale de l'embryon (Oda et Tsukita, 2001).

A l'échelle multicellulaire, la contractilité intervient également dans les muscles grâce aux sarcomères, mais aussi dans l'organisation multicellulaire de la migration (lors du développement embryonnaire ou de la cicatrisation) grâce au câble d'actomyosine. Nous évoquons maintenant ces deux structures.

Contraction musculaire : L'élément contractile de base de la cellule musculaire squelettique est le sarcomère. La répétition des sarcomères placés bout à bout, séparés par les disques Z [3], forme une myofibrille. Une cellule musculaire contient plusieurs de ces myofibrilles (figure 1.12a). Sa longueur peut être celle du muscle lui-même (soit jusqu'à plusieurs centimètres).

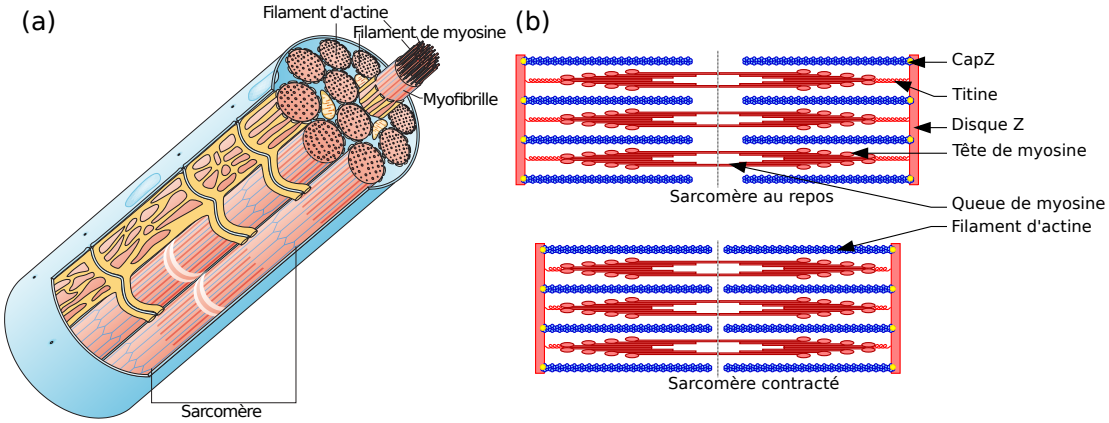

Figure 1.12 – (a) Structure d'un myocyte strié (Davies et Nowak, 2006). (b) Structure d'un sarcomère (Wikimedia Commons).

Un sarcomère est constitué d'un assemblage de filaments d'actine et de myosine. Les filaments d'actine sont liés aux extrémités du sarcomère (disque Z) via l'α-actinine. Les filaments de myosine, association de nombreuses molécules de myosine, alternent régulièrement avec les filaments d'actine. La queue de chaque myosine est enchâssée dans le filament de myosine, tandis que la tête, responsable de l'activité ATPase, interagit avec le filament d'actine. Le filament de myosine est relié aux disques Z par la titine, dont les propriétés élastiques permettent au filament de myosine de rester au centre du sarcomère.

Lorsque les myosines sont activées, elles se déplacent le long du filament d'actine, dans la direction du bout (+), soit dans la direction du disque Z. Du fait de sa configuration symétrique, l'activité synchrone des myosines induit une contraction du sarcomère (figure 1.12b). La contraction collective de tous les sarcomères d'une cellule musculaire, et de toutes les cellules musculaires d'un muscle, aboutit à une contraction totale du muscle de l'ordre de 20% de sa longueur.

Câble d'actine : L'actine peut s'organiser en fibres de stress : ce sont des faisceaux d'approximativement 10 à 30 filaments d'actine tenus ensemble par des

3. Le disque Z est le lieu d'ancrage des filaments d'actine.

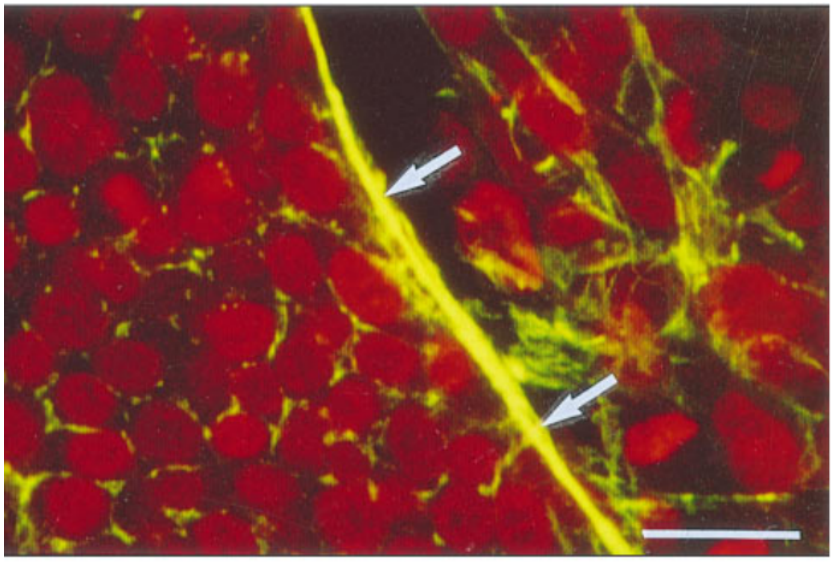

Figure 1.13 – Section confocale à travers la lame basale d'un épiderme d'embryon de drosophile en cours de cicatrisation. L'actine est marquée en jaune, les noyaux en rouge. Le câble d'actine est désigné par les flèches. Barre = 20 µm. (Martin, 1997)

protéines de liaison telles que l'α-actinine. Ils confèrent à la cellule ses propriétés mécaniques. Mais les filaments peuvent s'associer de manière à former une structure pluricellulaire.

Lors de la fermeture dorsale de l'embryon de drosophile, se forme un câble d'actine supracellulaire similaire au sarcomère, bien que moins organisé, qui parcourt les cellules du bord de l'épithélium. La contraction de ce câble de par l'activité de la myosine II qui lui est associée (Franke *et al.*, 2005), combinée à la contraction de l'amnioséreuse (Solon *et al.*, 2009), contribue à la fermeture de l'épithélium à la façon d'un cordon de bourse (Martin, 1997). Un câble similaire est présent dans d'autres situations, par exemple lors du développement d'autres espèces (Costa *et al.*, 1998, Quinlan *et al.*, 2004), lors de la cicatrisation (Martin, 1997) (figure 1.13) ou bien *in vitro* (Martin, 1997, Poujade *et al.*, 2007, Anon *et al.*, 2012).

La structure supracellulaire du câble est assurée par le fait que le câble traverse plusieurs cellules sans discontinuité. A la frontière entre deux cellules, les jonctions adhérentes, donc les E-cadhérines, assurent la continuité du câble (Danjo et Gipson (1998) et figure 1.14). Ces jonctions adhérentes sont en constant renouvellement, de façon à permettre les réarrangements cellulaires au fur et à mesure de la fermeture. En effet, comme la circonférence de la «blessure» diminue, certaines cellules sont expulsées du bord de l'épithélium.

Le câble est un assemblage de filaments d'actine et de myosine II. Aucune

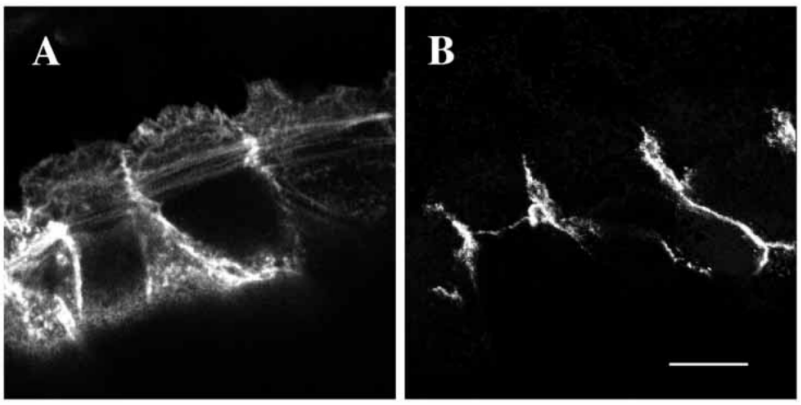

Figure 1.14 – Image d'immunfluorescence d'un bord d'épithélium issu de la cornée d'une souris. A : Les filaments d'actine sont marquée. B : L'E-Cadhérine est marquée. (Danjo et Gipson, 1998)

protéine de pontage (telle que l'α-actinine) n'est nécessaire à l'émergence d'une telle structure *in vitro* (Thoresen *et al.*, 2011). Cependant, l'α-actinine est tout de même présente *in vivo*, de part et d'autre des jonctions adhérentes (Rodriguez-Diaz *et al.*, 2008).

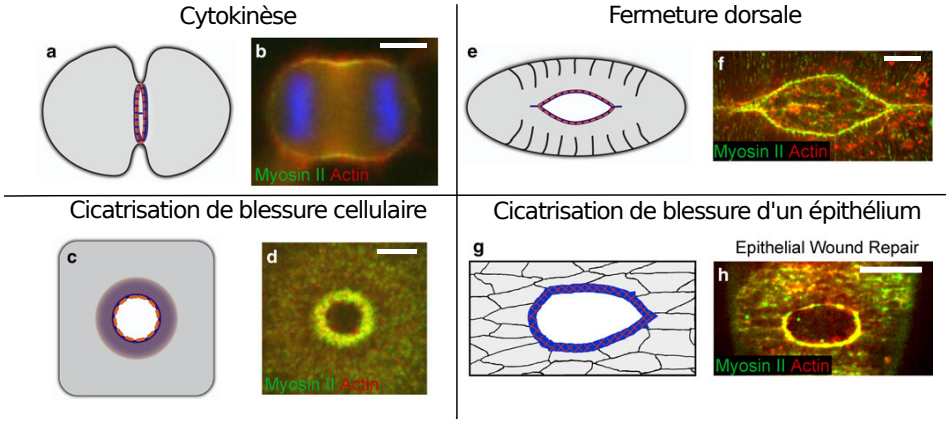

Figure 1.15 – Différents processus biologiques où la contraction d'une structure d'acto-myosine intervient. Contraction à l'échelle de la cellule : (a,b) la cytokinèse. (c,d) la blessure cellulaire. Contraction à l'échelle multicellulaire : (e,f) la fermeture dorsale. (g,h) la blessure d'un épithélium. (b) est une cellule HeLa, (d,f,h) embryon de Drosophile. (Abreu-Blanco *et al.*, 2012). Barres : (b) 5 µm, (d) 10 µm, (f) 50 µm, (h) 20 µm.

Dans un épithélium, toutes les cellules sont au contact les unes des autres. Le comportement de chacune de ces cellules influence directement (mécaniquement ou chimiquement) les cellules voisines. Nous avons décrit comment les cellules coopèrent pour réguler leur comportement individuel dans le cadre de la migration collective et de la contractilité collective. Nous avons vu que ces processus collectifs permettent des mouvements morphogénétiques à grande échelle (migration d'un

ensemble de cellules, invagination, fermeture dorsale, cicatrisation, etc). Dans la prochaine partie nous étudions dans quelle mesure le contact cellule-cellule peut inhiber la migration et la prolifération d'un épithélium.

1.2 Inhibition par contact

1.2.1 Inhibition de la migration par contact

L'inhibition de migration par contact (IMC) est le fait qu'une cellule change de direction dans son mouvement après avoir touché une autre cellule (Abercrombie et Heaysman, 1953, Abercrombie *et al.*, 1979). Les étapes de ce processus sont les suivantes :

- contact entre deux cellules,
- inhibition des protrusions des cellules dans la zone du contact,
- apparition d'une nouvelle protrusion hors de la zone de contact,
- migration dans la direction de la nouvelle protrusion.

Cette description est établie dans le cas de deux cellules isolées qui viennent au contact l'une de l'autre, mais n'est plus tout à fait valable dans le cas d'un épithélium, au sein duquel le contact entre les cellules est permanent. En effet, si les cellules épithéliales cessaient de migrer lorsqu'elles sont en contact, alors aucun mouvement morphogénétique ne serait possible lors du développement embryonnaire ou de la cicatrisation. *In vitro*, les cellules épithéliales ralentissent nettement lorsqu'elles sont à confluence (c'est-à-dire qu'elles forment une monocouche cohésive) par rapport à l'état pré-confluent (Petitjean *et al.*, 2010). Mais elles continuent malgré tout de se déplacer. Le contact cellule-cellule n'inhibe pas totalement leur caractère migratoire. Elles sont encore pourvues de lamellipodes, dits cryptiques, mais ceux-ci sont petits et transitoires (Farooqui et Fenteany, 2005).

1.2.1.1 Polarisation de la migration

Lorsque le tissu de cellules présente un bord libre, par exemple dans le cas d'une blessure, la situation est différente. Si les cellules au sein du tissu sont toujours en contact avec d'autres cellules, les cellules du bord connaissent une dissymétrie, puisqu'elles présentent un bord libre qui n'est en contact avec aucune cellule. Leur migration n'est donc pas inhibée de ce côté-ci. Un lamellipode peut se former, et la migration peut commencer dans la direction du bord libre. Cette situation a été étudiée au sein de l'équipe en utilisant des «blessures modèles», permettant

de créer un tel bord libre sans perturber l'environnement biochimique des cellules, comme c'est le cas dans les blessures de type «scratch» (Poujade *et al.*, 2007) (figure 1.16).

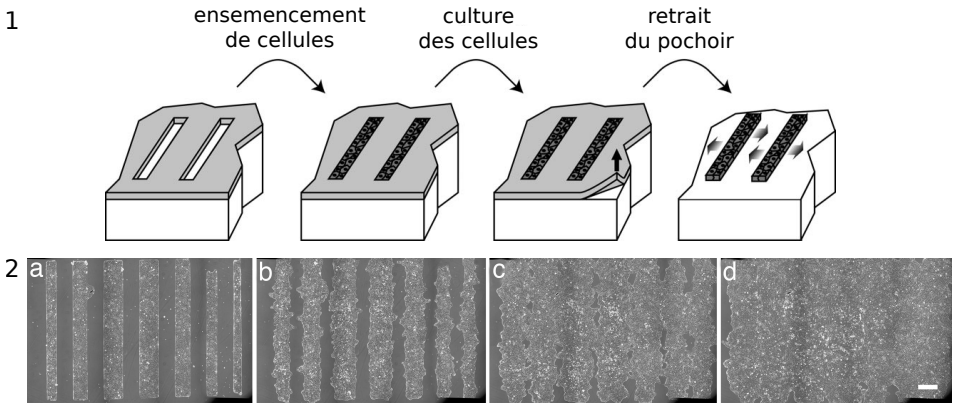

Figure 1.16 – (1) Expérience de blessure modèle. Les cellules (de type MDCK, épithéliales) sont ensemencées puis cultivées dans un micro-pochoir. Le retrait de ce micro-pochoir crée un bord libre. (2) Micrographes montrant la progression des bandes de cellules. (a) 90 min, (b) 13h, (c) 25h, (d) 37h après le retrait du pochoir. Barre d'échelle = 400µm. (Poujade *et al.*, 2007)

L'inhibition de la migration par contact permet également de répondre efficacement à un gradient chimiotactique (Theveneau et Mayor, 2010). Dans le cas de la migration des cellules de la crête neurale (une population de cellules transitoires et multipotentes embryonnaires), les cellules répondent à un gradient de Sdf-1 (Stromal cell-dependent factor-1). Le Sdf-1 n'est pas capable d'initier la formation de protrusion ou ni même d'en guider l'orientation, mais stabilise les protrusions existantes. L'inhibition de la migration par contact permet alors d'expliquer comment des cellules individuelles répondent peu au gradient chimiotactique, alors qu'un groupe de cellules cohésives y répond d'une façon bien plus efficace (figure 1.17).

Si cet effet est clairement expliqué dans le cas de la migration de la crête neurale (Carmona-Fontaine *et al.*, 2008), il est encore discuté dans le cas épithélial.

1.2.1.2 Mécanismes moléculaires

Les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'inhibition de la migration par contact sont encore peu connus. On peut toutefois séparer ces mécanismes en deux parties : la détection du contact cellule-cellule, et la réponse de la cellule. La réponse de la cellule est la polarisation de la migration (inhibition des protrusions du côté du contact, création de protrusions de l'autre côté), contrôlée par les GTPases Rho (voir paragraphe 1.1.1.3).

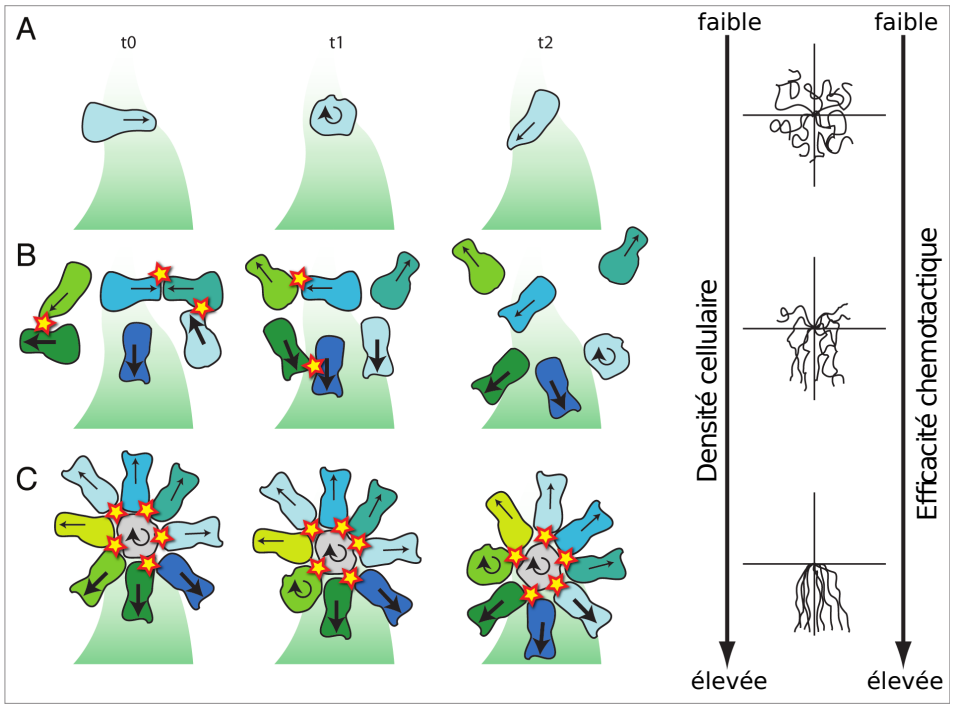

Figure 1.17 – Comportements de migration dans un gradient chimiotactique (Theveneau et Mayor, 2010). Des cellules individuelles issues de la crête neurale sont capables de générer des protrusions dans des directions aléatoires, sans stimulus extérieur.
(a) Dans le cas de cellules individuelles soumises à un gradient de Sdf-1, la direction des protrusions est également aléatoire. Le seul effet du Sdf-1 est la stabilisation des protrusions dans la direction du gradient. Cependant, vu le comportement erratique des cellules individuelles, cette stabilisation est rare et brève.
(b) Lorsque une population de cellules individuelles est soumise au même gradient, les contacts cellule-cellule inhibent les protrusions au niveau du contact, et induisent la formation de nouvelles protrusions dans la direction opposée. Les protrusions dans la direction d'une région sans cellule ont une durée de vie plus longue que celles dirigées vers une région avec des cellules. Ces protrusions stables peuvent être biaisées par le gradient chimiotactique de Sdf-1.
(c) Dans le cas d'un groupe de cellules adhérentes, l'inhibition de la migration par contact limite les mouvements des cellules vers l'intérieur du groupe. Par contre, le mouvement des cellules du bord vers l'extérieur n'est pas inhibé car aucun contact cellule-cellule ne vient l'entraver. Ces protrusions sont donc très stables, et cette stabilité est biaisée par le gradient chimiotactique.

Le contact cellule-cellule doit faire intervenir un couple récepteur-ligand à la surface des cellules, capable de traduire le signal du contact en une réponse biochimique. Les E-cadhérines, responsables de l'adhésion cellule-cellule, jouent ce rôle (Bracke *et al.*, 1997, Ayollo *et al.*, 2009). Dans ce cas, le ligand et le récepteur sont les deux E-cadhérines engagées dans une jonction adhérente, chacune provenant d'une cellule différente. L'engagement de l'E-cadhérine dans une jonction adhérente active Rac1 et Cdc42 et inhibe RhoA dans la zone du contact (Erez *et al.*, 2005).

Il existe d'autres couples ligand-récepteur, comme les couples Ephrine/Eph (Klein, 2008) et les nectines (Takai *et al.*, 2008).

La grande variété de molécules à la surface des cellules susceptibles de détecter la contact cellule-cellule et d'initier une réponse au niveau des mécanismes de polarisation permet d'interpréter les deux types d'inhibition de la migration par contact :

- l'IMC homotypique : l'inhibition de la migration lors d'un contact entre cellules de même type,
- l'IMC hétérotypique : l'inhibition de la migration lors d'un contact entre cellules de types différents. Ce caractère est perdu chez les cellules cancéreuses, qui peuvent envahir un tissu voisin sans être inhibées (Abercrombie et Ambrose, 1962).

1.2.2 Inhibition de la prolifération par contact

Reprise de l'expression «inhibition de la migration par contact», l'«inhibition de la prolifération par contact» désigne le fait que des cellules en culture cessent de se diviser une fois qu'elles ont rempli tout l'espace disponible (figure 1.18).

En réalité, même lorsqu'elles sont en contact, les cellules continuent de se diviser pendant un certain temps, mais en réduisant leur taille. Les cellules filles sont plus petites que la cellule initiale. Ce processus aboutit à une densification du tissu. Cependant, en deçà d'une certaine taille, une cellule n'est plus capable de se diviser. L'inhibition de la prolifération n'intervient pas au contact entre deux cellules, mais est en fait dépendante de la densité cellulaire (Stoker et Rubin, 1967). La mesure de cette dépendance a été effectuée (Puliafito *et al.*, 2012) et met en avant un seuil en deçà duquel le taux de division devient très grand (figure 1.19).

Ce mécanisme de régulation permet au tissu d'atteindre une densité station-

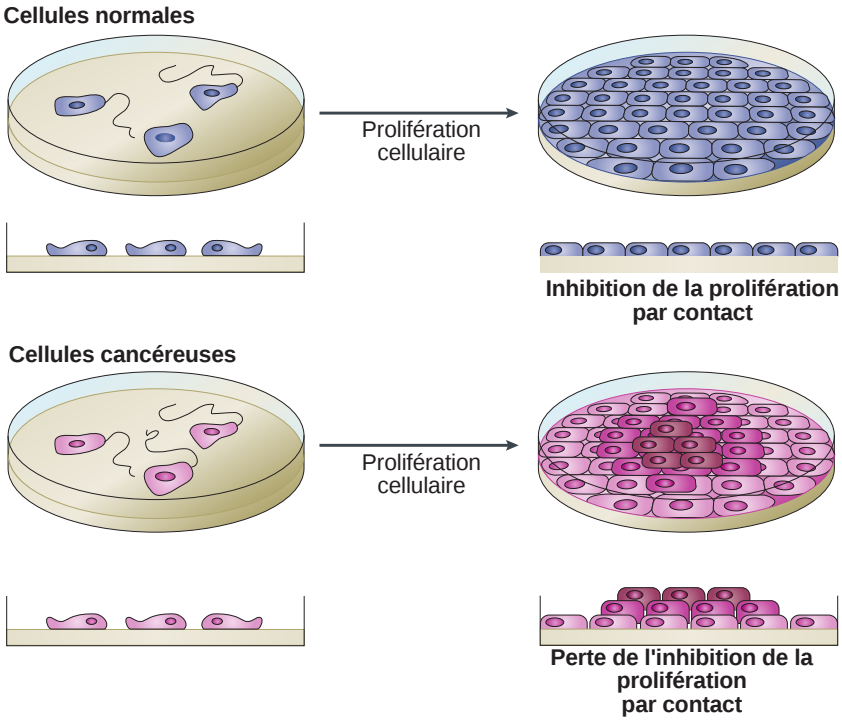

Figure 1.18 – Inhibition de la prolifération par contact dans le cas de cellules normales et perte de l'inhibition de la prolifération par contact dans le cas des cellules cancéreuses (Takai *et al.*, 2008).

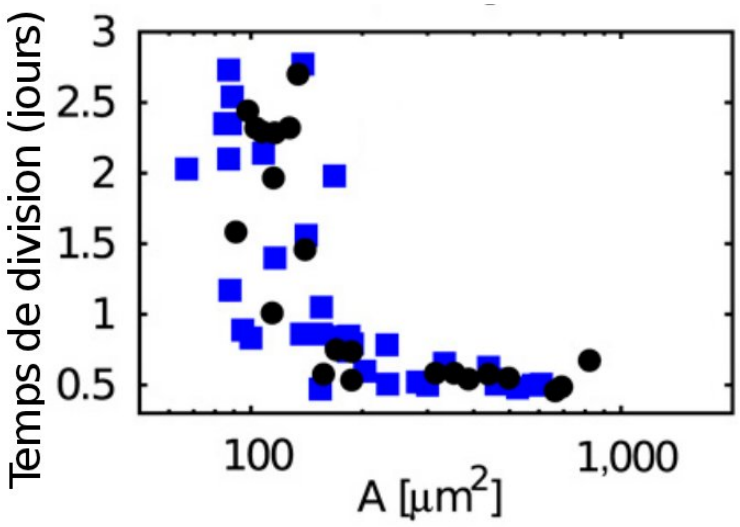

Figure 1.19 – Temps de division en fonction de la taille des cellules, pour des cellules MDCK. Les deux ensembles de points représentent deux expériences différentes (Puliafito *et al.*, 2012).

naire à partir d'une situation de faible densité (Eisenhoffer *et al.*, 2012). Si le tissu est artificiellement sur-densifié, des cellules sont expulsées du tissu, soit par extrusion, soit par apoptose (figure 1.20).

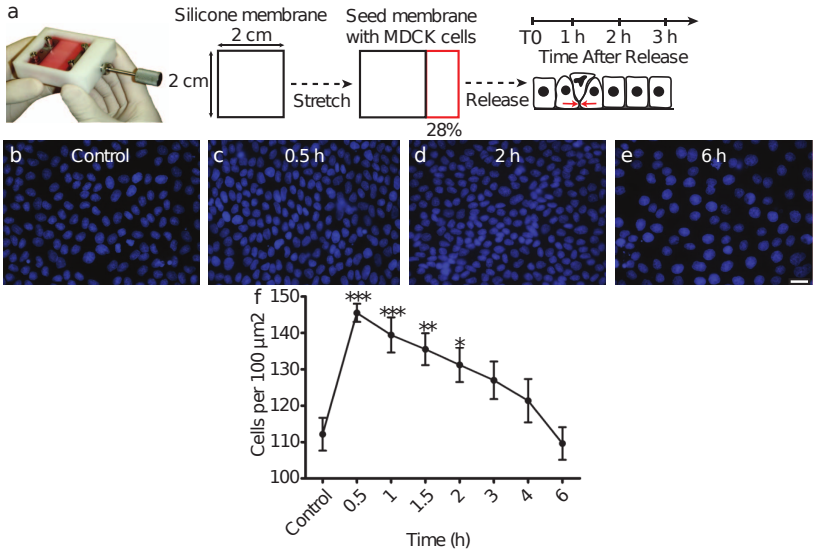

Figure 1.20 – (a) Principe de l'expérience : les cellules sont déposées sur le substrat initialement étiré, puis le substrat est ramené à sa configuration d'équilibre, augmentant la densité des cellules (b) Cellules MDCK sur le substrat étiré. (c,d,e) Cellules sur le substrat 0.5h, 2h, et 6h après le retour du substrat à sa position d'équilibre. (f) Evolution de la densité au cours du temps. (Eisenhoffer *et al.*, 2012).

1.2.2.1 Mécanismes cellulaires

L'une des fonctions d'un épithélium est d'établir une barrière protectrice (autour d'un organe, par exemple). Pour cela, il est nécessaire que le nombre de cellules dans l'épithélium soit stable. La mort cellulaire et la prolifération cellulaire doivent se compenser. La mort cellulaire (l'*apoptose*) est un processus d'auto-destruction programmée de la cellule, répondant à un signal. Au cours du processus d'apoptose des signaux peuvent être émis à une cellule voisine afin d'initier une division chez celle-ci (Fan et Bergmann, 2008). Cependant, pour le processus inverse, on ne connaît pas de signal émis lors de la division d'une cellule qui puisse initier la mort d'une cellule voisine. Malgré cela, le tissu parvient à maintenir un nombre de cellules constant.

Les cellules sont donc capables de «sentir» la densité du tissu. De nombreux mécanismes ont été proposés (Nelson et Daniel, 2002), impliquant l'ensemble des jonctions cellule-cellule. Citons le rôle central des E-cadhérines, dont l'engagement dans une jonction adhérente induit une inhibition de la division, par un mécanisme

dépendant de la β-caténine, et bloquant les récepteurs de facteurs de croissance.

1.2.2.2 Contrôles mécaniques de la prolifération

La prolifération cellulaire peut mettre en compression le tissu, qui peut se déstabiliser par flambage (Nelson *et al.*, 2011) et déformer le substrat sur lequel il repose.

Mais les contraintes mécaniques du substrat peuvent également influencer la prolifération cellulaire. Ainsi, un tissu endothélial [4] sur un substrat confiné exerce des contraintes de traction sur les bords de ce substrat. Et c'est dans ces zones de fortes contraintes mécaniques que la prolifération cellulaire est la plus importante (Nelson *et al.*, 2005) (figure 1.21).

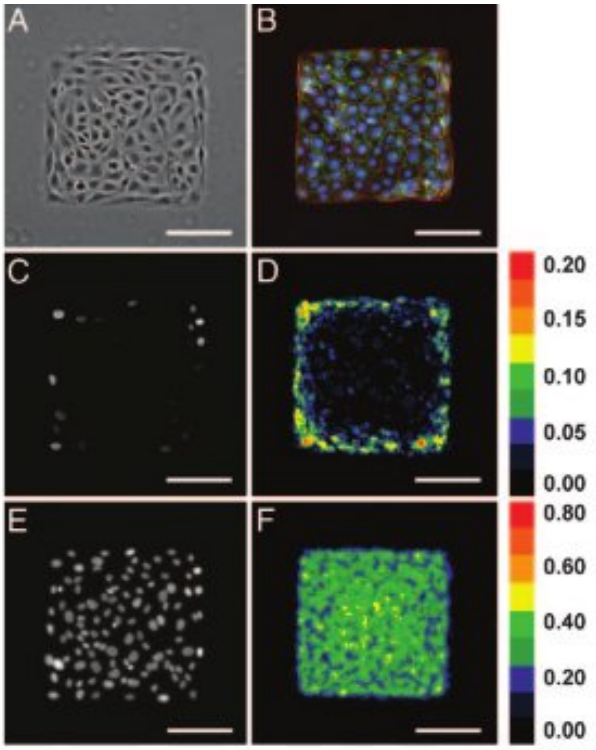

Figure 1.21 – (a) Image en contraste de phase des cellules sur un îlot adhésif carré de 250 µm de côté. (b) Image de fluorescence (actine en rouge, VE-cadhérine en vert, les noyaux en bleu). (c) Image de fluorescence de la prolifération (avec le marqueur BrdUrd). (d) Superposition colorimétrique pour plusieurs ilôts de la prolifération (un pixel à une valeur de 0.20 signifie que 20% des cellules ont proliféré à cet endroit). (e) Image en fluorescence des noyaux sur un îlot. (f) Superposition colorimétrique des noyaux pour plusieurs ilôts montrant la distribution uniforme des cellules dans la monocouche. Barre = 100 µm. (Nelson *et al.*, 2005)

La dépendance entre les contraintes mécaniques subies par une cellule et le

4. L'endothélium est l'épithélium qui recouvre l'intérieur des vaisseaux sanguins

taux de division ou le taux d'apoptose permet de modéliser la régulation de la taille des cellules. Considérons un tissu de densité uniforme. Si un ensemble de cellules entame une croissance rapide dans ce tissu, et si le taux de division des cellules environnantes est conservé, alors les cellules à la croissance rapide, devenues plus nombreuses et plus «serrées», sont en compression. Si le taux de division dépend négativement du taux de compression, le taux de division des cellules à croissance rapide est alors plus faible que celui des cellules environnantes, la densité s'uniformise à nouveau. Ce mécanisme de régulation permet théoriquement d'expliquer la régulation de la densité cellulaire à l'échelle d'un tissu (Shraiman, 2005), même quand la prolifération cellulaire est contrôlée par un gradient morphogénétique (Hufnagel *et al.*, 2007).

1.3 Aspects mécaniques de la pluricellularité

La mécanique cellulaire a été très étudiée à l'échelle individuelle. En revanche, les connaissances à l'échelle pluricellulaire sont plus restreintes, et proviennent souvent d'études *in vivo* sur des animaux modèles (drosophile, poisson zèbre, etc).

L'émergence de processus collectif au sein d'un tissu de cellules nécessite la coordination de diverses propriétés à l'échelle pluricellulaire, telles que la taille ou la forme des cellules, leur vitesse de migration, etc. Don Ingber a été parmi les premiers à formaliser une description mécanique pluricellulaire des tissus et des épithéliums. Expérimentalement, la force appliquée par une cellule sur une cellule voisine n'est pas directement accessible. En revanche, la force appliquée par les cellules sur le substrat peut être mesurée par des micro-senseurs. Il en existe de deux types : le tapis de micro-piliers élastiques (Du Roure *et al.*, 2005), et le substrat élastique contenant des micro-billes («traction force microscopy», TFM, Dembo et Wang (1999)). Dans les deux cas, les forces appliquées par les cellules déforment localement le substrat. Ces déformations sont mesurées par microscopie optique puis converties en champ de forces.

1.3.1 Aspects statiques

En utilisant des micro-piliers élastiques, Saez *et al.* (2010) montrent notamment que la force exercée par des cellules épithéliales à la périphérie d'un îlot sont dirigées vers l'intérieur de l'îlot, et que plus le substrat est rigide, plus les forces exercées sur le substrat sont importantes.

Avec des mesures de TFM, Mertz *et al.* (2012) montrent en outre que la force totale exercée par les cellules sur le substrat dépend linéairement de la taille de l'îlot de cellules, ce qui permet ainsi de définir une tension de surface. Cette tension de surface peut être modélisée en considérant l'îlot comme un gel actif au sein duquel la pression est modifiée par la contractilité du réseau d'actomyosine.

Une autre façon d'évaluer les forces mises en jeu et sonder les propriétés mécaniques dans un tissu est de réaliser des ablations laser (Hutson *et al.*, 2003). L'étude des mouvements provoqués par la suppression de la tension dans une partie du tissu permet de renseigner sur l'état mécanique de la structure pluricellulaire (Bosveld *et al.*, 2012).

1.3.2 Aspects dynamiques

Les dynamiques de la migration et de la densification sont très liées. Les lamellipodes dits «cryptiques» (Farooqui et Fenteany, 2005) permettent aux cellules à l'intérieur de l'îlot de se déplacer activement et ainsi contribuer autant au mouvement des cellules que les cellules de la périphérie. Chaque cellule se déplace au sein d'une population dont les individus sont liés mécaniquement entre eux. Cette combinaison de la migration et de l'adhésion fait émerger des propriétés collectives (Vicsek et Zafiris, 2010). On peut montrer par exemple que le degré de coordination du mouvement est directement dépendant de l'adhésion cellule-cellule et de la vitesse de migration (Kabla, 2011), et montre même un optimum de coopération pour certaines valeurs de ces grandeurs.

La migration d'une cellule individuelle au sein d'un tissu cohésif est donc fortement dépendante de la position, de l'orientation, et de la vitesse de migration des cellules voisines. Pour se frayer une chemin au milieu de ces voisines, (Tambe *et al.*, 2011) montre que les cellules migrent le long de la direction du moindre contrainte de cisaillement avec leurs voisines. Ces contraintes sont de plus en plus fortes à mesure que le tissu se densifie. La façon dont la migration évolue avec la densité de cellules rappelle selon Angelini *et al.* (2011) la dynamique de la transition vitreuse. En situation confinée, la densification fait apparaître une transition d'encombrement («jamming») au-delà de laquelle le mouvement des cellules ne s'apparente plus à une marche aléatoire avec persistance, mais à un piégeage de la position de chaque cellule par ses voisines (Henkes *et al.*, 2011). Lorsque le confinement est supprimé, comme par exemple lors des expériences de blessures («scratch wounding assay»), le mouvement des cellules reprend dans la direction

du bord libre. Ce mouvement peut être compris comme un mouvement collectif dû aux interactions cellule-cellule (Bindschadler et McGrath, 2007) : chaque cellule voit son mouvement réorienté après un contact avec une cellule voisine.

2 Matériel et Méthodes

2.1 Traitement de surface

Le développement des techniques de microfabrication permettant de faire croître *in vitro* une ou plusieurs cellules sur un motif adhésif très bien défini sur un substrat a permis d'étudier en détail l'adhésion, la prolifération, la migration, la différenciation cellulaire ainsi que les mécanismes moléculaires associés (Falconnet *et al.*, 2006). La nature de la surface sur laquelle adhèrent les cellules, ainsi que sa forme et sa taille, ont un impact important sur les fonctions cellulaires (Poudel *et al.*, 2012).

Les contraintes imposées par le confinement d'un tissu pluricellulaire sur une région adhésive nous ont conduits à développer une technologie spécifique.

2.1.1 Cahier des charges

Pour contraindre une ou plusieurs cellules à n'adhérer que dans une région précise, la stratégie est toujours la même : il s'agit de recouvrir la surface de molécules adhésives là où les cellules devront adhérer, et de molécules anti-adhésives là où elles ne devront pas adhérer. La nature du substrat, le type de molécules adhésives et non-adhésives, la façon d'en recouvrir la surface et la manière de définir spatialement les régions adhésives et non-adhésives sont des choix qui déterminent les propriétés du traitement de surface.

Dans le cadre de notre étude, nous désirons étudier les caractéristiques de la croissance et de la prolifération *in vitro* d'un épithélium spatialement confiné. Il s'agit de laisser croître les cellules pendant plusieurs jours, sans jamais que le traitement anti-adhésif ne se dégrade et que les cellules ne s'échappent de la région

adhésive. Nous souhaitons également examiner les rôles de la taille et de la forme de la région adhésive, et suivre localement le comportement des cellules à la frontière des régions adhésives et anti-adhésives.

Si nous faisons l'inventaire des contraintes relatives à notre étude, nous arrivons à la liste suivante :

- Le substrat doit être compatible avec les observations en microscopie optique.
- Le traitement anti-adhésif doit être robuste et ne pas être dégradé au fil du temps. Il doit rester efficace plus d'une semaine.
- La résolution de la définition des zones adhésives et anti-adhésives doit atteindre 1 µm.
- Toute forme de région adhésive doit pouvoir être envisageable.

2.1.2 Revue des techniques existantes

Reprenons chacun des points du cahier des charges, et voyons laquelle des techniques généralement utilisées est la plus adaptée.

2.1.2.1 Le substrat

La culture cellulaire est généralement réalisée sur un substrat en plastique, souvent du polystyrène [1], qui constitue le fond des boîtes de Petri et autres boîtes de culture [2] . Pour obtenir des qualités optiques supérieures, le verre est une solution habituelle. Concernant les différentes techniques d'immobilisation de molécules adhésives ou anti-adhésives sur un substrat, plusieurs solutions existent : le verre et le polystyrène, mais également l'or. Dans ce cas, une très fine couche d'or de quelques dizaines de nanomètres est déposée sur une lamelle de verre et permet l'adsorption de molécules de types -thiols dont l'autre extrémité est fonctionnalisée

1. Le polystyrène qui constitue le fond des boîtes de culture est modifié en surface avec des procédés propriétaires.

2. Cependant, il faut noter que dans le cas spécifique des cellules épithéliales, un substrat différent est parfois utilisé. Il s'agit d'une membrane perméable dont les pores ont des tailles de 0.2 µm à 5 µm. Ce substrat permet au pôle basal d'être en contact avec le milieu de culture, contrairement à la culture sur lamelle de verre ou substrat en plastique. La perméabilité aux nutriments permet la polarisation apico-basale (Chlapowski et Haynes, 1979, Zegers *et al.*, 2003). Mais ces membranes perméables ne sont pas optiquement transparentes et l'observation des cellules n'est pas aussi simple qu'à travers une lamelle de verre. Pour cette raison, lorsque la polarisation apico-basale n'est pas requise pour l'étude de l'épithélium, l'utilisation de substrats transparents est privilégiée. Ainsi, toutes les expériences de migration collective des épithéliums sont menées sur des substrats en verre ou en plastique.

pour favoriser ou empêcher l'adhésion cellulaire (Mrksich *et al.*, 1996). Cependant, le critère de la qualité optique indique de décliner le choix de l'or, en raison de sa transparence réduite, surtout dans le cas de microscopie de fluorescence. Le polystyrène est également un mauvais choix principalement en raison de son auto-fluorescence. Finalement, parmi les substrats habituels, seul le verre permet des observations en microscopie de qualité satisfaisante. De plus, le verre autorise l'utilisation de solvants organiques pour le traitement de surface, et la chimie de surface du verre est très bien connue (Jupille, 2001).

2.1.2.2 Les traitements adhésifs et anti-adhésifs

Le choix des traitements de surface adhésifs et non-adhésifs est imposé par la volonté de contraindre spatialement les cellules sur une durée de l'ordre d'une semaine ou même davantage si possible. Généralement, des protéines de la matrice extracellulaire sont déposées sur le substrat pour le rendre adhésif vis-à-vis des cellules. Fibronectine, laminine ou collagène sont les plus couramment utilisées. La simple différence entre des régions fonctionnalisées avec ces protéines adhésives et le substrat nu autour suffit à contrôler l'adhésion des cellules à temps court. Après quelques heures cependant, les cellules finissent toujours par fabriquer leur propre matrice extracellulaire et envahir les régions voisines. Il est donc nécessaire de rendre ces régions anti-adhésives pour y empêcher l'adsorption de protéines.

Pour cela une méthode consiste à accrocher à la surface des polymères anti-adhésifs hydrophiles (Ostuni *et al.*, 2001) empêchant l'adsorption des protéines par répulsion stérique (Jeon *et al.*, 1991, Chen *et al.*, 2010). Pour lier ces polymères au substrat, deux méthodes sont possibles : la physisorption et la chimisorption. Dans le premier cas, le polymère n'est pas irréversiblement attaché à la surface. Dans ce cadre, on utilise souvent la poly-l-lysine-g-polyethylèneglycol (PLL-g-PEG). La partie polyéthylèneglycol (PEG) est hydrophile et empêche l'adsorption des protéines, et la partie poly-l-lysine s'adsorbe facilement sur le verre par interaction électrostatique. Cependant, la PLL-g-PEG s'avère n'être efficace contre l'adsorption des protéines que quelques jours (Nelson *et al.*, 2003) (les PLL-g-PEG se détachant du substrat pour des raisons thermodynamiques (Lussi *et al.*, 2006)). L'autre méthode consiste à utiliser un greffage covalent pour immobiliser les chaînes de polymères hydrophiles sur la surface. Un tapis dense et stable de chaînes hydrophiles est ainsi obtenu, formant une brosse hydrophile anti-adhésive (Dalsin et Messersmith, 2005). Cependant le greffage covalent impose une chimie plus complexe. Parmi les polymères utilisés dans ce cadre, citons le poly(vinylalcool)

(Peterbauer *et al.*, 2006), le poly-acrylamide (Tourovskaia *et al.*, 2006, Tang *et al.*, 2012), le PEG-methyl-methacrylate (Ma *et al.*, 2004). Ces méthodes ont des résultats équivalents en terme de durabilité du traitement anti-adhésifs : les propriétés anti-adhésives sont conservées pendant plus d'une semaine.

Citons également le greffage covalent de PEG-thiols sur une surface de verre traitée avec un silane-alcène, tel qu'il a été développé au laboratoire par l'équipe de Vincent Semetey. Cette approche a été validée par des tests d'adhésions de cellules que nous avons réalisés. L'article (Oberleitner *et al.*, 2012) décrivant ce travail est disponible en annexe A.5.

2.1.2.3 Le dépôt localisé du traitement anti-adhésif

Le greffage covalent de molécules anti-adhésives sur le verre dans les protocoles cités ci-dessus implique l'utilisation de solvants organiques. Il n'est donc pas envisageable de créer en premier les zones adhésives en déposant les protéines, car celles-ci seraient dégradées par les solvants organiques.

Les deux traitements, anti-adhésifs et adhésifs, sont donc réalisés en deux étapes successives : certaines régions de la lame de verre sont recouvertes par le traitement anti-adhésif, puis le traitement adhésif est appliqué sur les régions non recouvertes par le premier traitement. Deux méthodes sont possibles pour exécuter la première étape consistant à créer des zones non-adhésives sur le substrat (voir figure 2.1) :

Méthode directe : le traitement anti-adhésif est localement greffé sur le substrat, par exemple à l'aide d'un micro-tampon ou à travers un pochoir, fabriqués par photolithographie (voir encadré 2.1).

Méthode indirecte : le traitement anti-adhésif est greffé sur toute la lamelle de verre, puis il est localement retiré suivant un motif prédéfini, par exemple en utilisant un traitement oxydant (plasma ou oxydant chimique).

La méthode directe est la méthode la plus utilisée : l'impression par micro-contact (micro-contact printing) consiste à imprégner un tampon dans une solution chimique, puis à appliquer le tampon sur le substrat. L'espèce chimique est transférée seulement là où le tampon est en contact avec le substrat (Kaufmann et Ravoo, 2010). Les techniques de photolithographie et l'utilisation de PDMS pour le tampon permettent de fabriquer facilement des tampons de forme et de taille désirée. La résolution accessible par cette technique est celle atteinte par la photolithographie, soit typiquement 1 µm. Cependant, dans notre cas, il s'agit de transférer via impression par micro-contact les molécules anti-adhésives. Même si

Encadré 2.1 – Photolithographie

La photolithographie consiste à transférer un motif présent sur un masque vers une couche de résine photosensible. Elle se déroule de la façon suivante : un substrat (lamelle de verre ou plaquette de silicium) est déposé sur une tournette motorisée. Une couche de résine photosensible est étalée sur le substrat, puis la force centrifuge provoque l'étalement de la résine en une couche mince (étape a). La résine est ensuite exposée à un rayonnement UV à travers le masque (étape b). Les zones transparentes du masque laissent passer les UV, les zones sombres du masque bloquent les UV. Les UV modifient la solubilité des zones exposées.
Vient finalement l'étape du développement (étape c) : le substrat est trempé dans un bain de développeur. Dans le cas d'une résine *positive*, la partie qui a été exposée aux UV a subi des modifications physico-chimiques qui l'ont rendu soluble dans le développeur. Au contraire, une résine *négative* est initialement soluble et l'exposition aux UV la rend insoluble. Finalement, on obtient après développement respectivement le motif présent sur le masque ou son négatif.

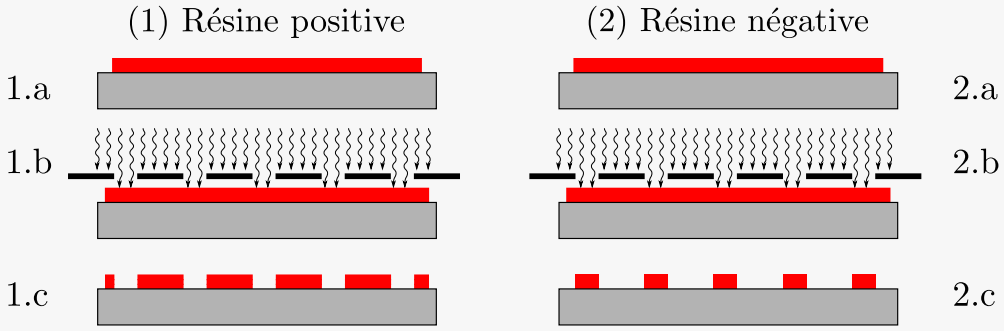

Figure – Les étapes de la photolithographie sur résine positive (1) et sur résine négative (2).

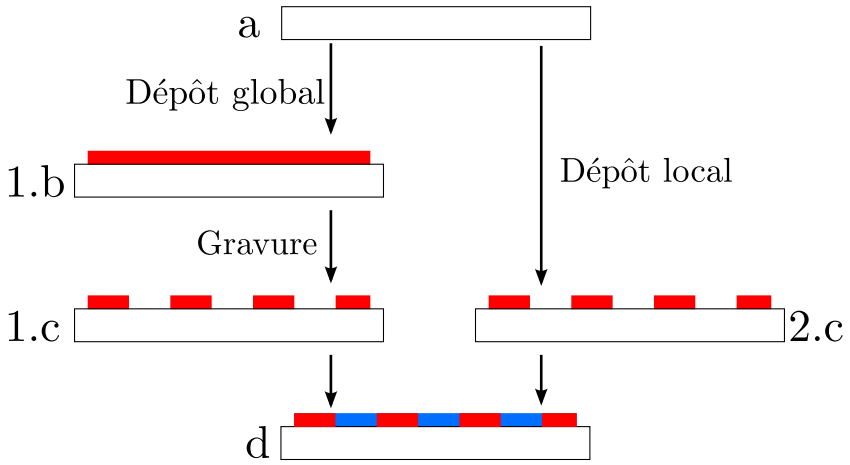

Figure 2.1 – Méthodes de texturation : voie indirecte (1) et voie directe (2). (a) Lamelle de verre nu. (1b) Le traitement anti-adhésif est déposé sur la lamelle. (1c) Une partie de ce traitement est gravé. (2c) Le traitement anti-adhésif est déposé localement. (d) Les molécules du traitement adhésif sont déposées ensuite sur les régions non recouvertes par le traitement anti-adhésif.

les zones adhésives ont une taille limitée, en général entre 5 et 500 µm, la zone non-adhésive recouvre elle tout le substrat puisqu'elle entoure les zones adhésives. Or, si la technique d'impression par micro-contact a prouvé son efficacité lorsqu'il s'agit de transférer des espèces chimiques sur des petites surfaces, le transfert de motifs de grandes tailles et/ou très éloignés les uns des autres est sujet à de nombreuses imperfections (Ruiz et Chen, 2007). Ceci s'explique par la déformabilité du tampon qui est requise pour assurer un bon contact avec le substrat. Mais la contrepartie est que le tampon peut parfois se déformer excessivement lors du transfert, en particulier si les motifs à transférer sont éloignés et que leur hauteur sur le tampon est faible (ce qui est nécessaire si une résolution spatiale élevée est requise). Dans ces conditions, les zones qui normalement ne devraient pas être en contact avec le substrat peuvent être déformées jusqu'à toucher le substrat (voir figure 2.2).

Pour répondre aux problèmes de déformation du tampon de PDMS, une autre méthode est utilisée. Une partie du substrat est protégée par un dispositif microfabriqué par photolithographie, soit sous la forme de micro-canaux, soit sous la forme d'un pochoir (Tourovskaia *et al.*, 2006, Frimat *et al.*, 2009). On dépose la solution de molécules à greffer sur le masque ou dans les micro-canaux. Le greffage n'a lieu que dans les parties découvertes du substrat, qui est finalement retiré. Cependant, ces techniques n'autorisent pas toutes les formes (voir figure 2.3). Si les formes simples (rond, rectangle, triangle...) sont simples à réaliser, les formes non

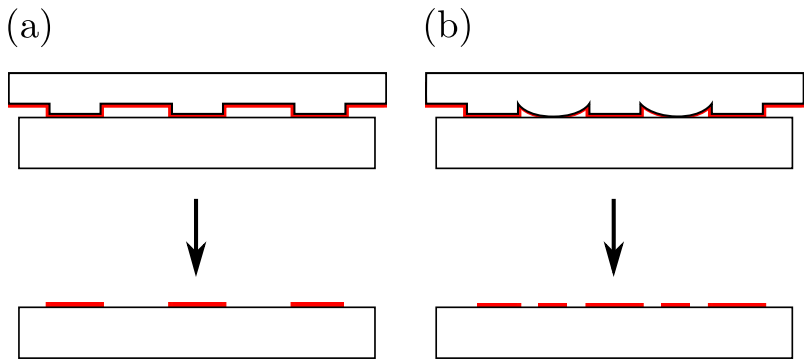

Figure 2.2 – (a) Schéma de principe de l'impression par micro-contact. (b) Lorsque le tampon subit de trop larges déformations, le motif à transférer n'est plus respecté.

connexes (par exemple des cercles concentriques) ne sont pas toujours possibles avec cette méthode.

Pour pouvoir fabriquer n'importe quelle forme de masque, une solution consiste à le fabriquer *in situ* sur le substrat à partir d'une résine photosensible (Thomas *et al.*, 1999). De cette manière, toutes les formes sont envisageables, la résolution est de l'ordre du micron, et les déformations du masque sont limitées.

Dans la méthode indirecte, le traitement anti-adhésif est appliqué d'abord sur toute la surface du substrat. Ensuite, le traitement est détruit sur une zone bien définie. Pour cela plusieurs techniques sont proposées : l'oxydation par traitement plasma à travers un pochoir de PDMS (Tourovskaia *et al.*, 2006, Frimat *et al.*, 2009) ou à travers un masque de résine photosensible réalisé *in situ* (Kuribayashi *et al.*, 2010), l'utilisation d'un oxydant fort tel que l'hypochlorite de sodium (Peterbauer *et al.*, 2006), ou le rayonnement UV que ce soit par l'utilisation d'un faisceau collimaté à travers un masque (Huang *et al.*, 2011) ou en «dessinant» la forme voulue avec un laser monté sur un microscope (Iwanaga *et al.*, 2005).

2.1.3 Choix de la technique

Considérant les diverses techniques que nous venons de présenter, nous avons choisi d'appliquer la stratégie suivante (voir figure 2.4) :

– Sur une lamelle de verre, nous déposons de façon covalente un traitement anti-adhésif (qui a démontré son efficacité pendant 60 jours (Thomas *et al.*, 1999)) constitué des couches successives suivantes : allyltrichorosilane, polyacrylamide, PEG-acrylate (Tourovskaia *et al.*, 2006). Le polyacrylamide et le PEG-acrylate forment un réseau de polymères interpénétrés dont la sta-

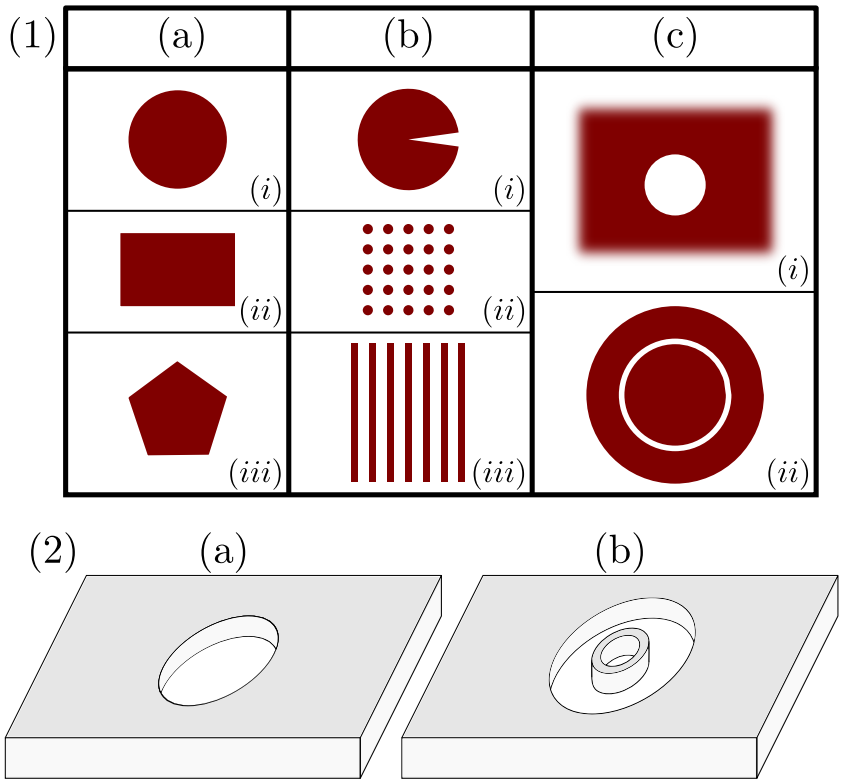

Figure 2.3 – (1) Trois types de motifs à transférer à l'aide d'un pochoir. Les formes rouges sont les motifs à tranférer sur le substrat, ce qui correspond aux parties vides du pochoir. (a) Des géométries connexes (d'un seul tenant) et convexes, simples à réaliser. (b) Des géométries topologiquement acceptables, mais difficiles à réaliser du fait des parties concaves (1b.*i*) ou de la flexibilité du pochoir et de la structure très fine des motifs (1b.*ii* et 1b.*iii*). (c) Motifs topologiquement non réalisables. (2) (a) Schéma d'un pochoir réalisable, correspondant au motif (1a.*i*). (b) Schéma du pochoir «virtuel» correspondant au motif (1c.*ii*) : la réalisation de ce type de pochoir n'est pas envisageable car il ne pourrait être manipulé et déposé sur le substrat. Il doit donc être fabriqué *in situ* sur le substrat, sous la forme d'un masque de résine photosensible.

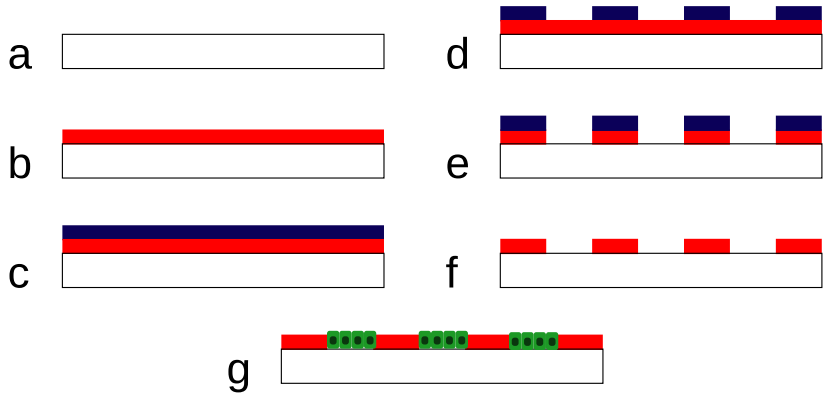

Figure 2.4 – Les étapes de la texturation. (a) Lamelle nue. (b) Lamelle traitée avec le revêtement anti-adhésif. (c) Dépôt de résine sur la lamelle traitée. (d) Photolithographie de la résine. (e) Ablation du traitement anti-adhésif à travers le masque en résine. (f) Dissolution du masque en résine. (g) Culture de cellules sur la lamelle (épaisseur du traitement anti-adhésif et taille des cellules ne sont pas à l'échelle).

bilité et les propriétés anti-adhésives permettent d'envisager un confinement efficace (Bearinger *et al.*, 1997).

- Sur cette couche anti-adhésive, nous étalons une fine couche de résine photosensible, d'épaisseur environ 1 µm, permettant de définir des motifs de n'importe quelle géométrie, avec une résolution latérale de 1 µm.
- Après photolithographie, cette résine sert de masque : le traitement plasma appliqué à la lamelle n'atteint que les zones découvertes, mais pas les zones protégées par la résine. Le traitement plasma permet de localement retirer complétement le traitement anti-adhésif et de revenir au verre nu.
- Après dissolution de la résine, on obtient des motifs de verre nu entourés de régions anti-adhésives.

2.1.4 Protocole

2.1.4.1 Traitement de surface

Les lamelles sont traitées en trois étapes successives suivant Tourovskaia *et al.* (2006) : par le silane, puis le gel d'acrylamide, et enfin le polyéthylèneglycol (PEG) (voir les étapes résumées dans la figure 2.6).

Silane : Les lamelles de verre (35 mm de diamètre ou 22x22 mm, d'épaisseurs nominales 100 µm, 140 µm, et 170 µm) sont d'abord nettoyées à l'éthanol, puis traitées par une solution «Piranha» (30% H_2O_2, 70% H_2SO_4) pendant 10 minutes. Rincées à l'eau ultra pure puis séchées, les lamelles sont ensuite mises à tremper

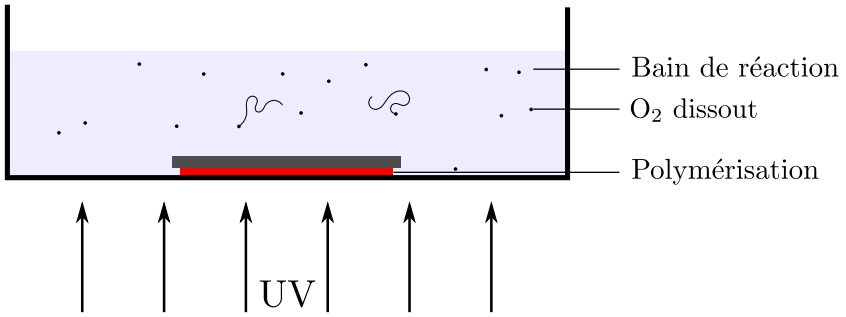

Figure 2.5 – Schéma du dispositif d'illumination : la lamelle est posée au fond de la boîte de Petri. La polymérisation n'a lieu que sur la face inférieure de la lamelle.

pendant 1 minute dans de l'allyltrichorosilane à 1.25% dans du toluène anhydre. Après rinçage avec du toluène puis de l'acétone puis de l'eau, les lamelles sont placées sur une plaque chauffante à 95°C pendant une heure. A cette étape, les lamelles sont des deux côtés très hydrophobes.

Gel d'acrylamide : Les lamelles disposent maintenant à leur surface d'une double liaison due au silane. C'est sur cette double liaison que va venir réagir l'acrylamide, formant un gel solidement accroché à la lamelle. Les lamelles sont disposées à plat au fond d'une grande boîte de Petri en verre, recouvertes par une solution préparée de la façon suivante : Dans 40mL d'acétone, 6g d'acrylamide, 0.06g de N,N'-methylene bisacrylamide, et 2.18g de benzophénone. Les lamelles sont exposées aux rayons UV (λ = 365 nm) pendant 2 minutes, à l'aide d'un transilluminateur. La réaction se fait préférentiellement sur la face inférieure de la lamelle probablement en raison de l'oxygène dissout dans la solution qui vient empoisonner la réaction sur la face supérieure (Bhanu et Kishore, 1991) (voir figure 2.5).

Un gel opaque et très fragile se forme dans l'espace entre le fond de la boîte de Petri et les lamelles. Ce gel est en grande partie retiré lors du rinçage, successivement dans l'acétone puis l'eau. Mais une partie très fine du gel reste accrochée à la lamelle de verre via la couche de silane. L'épaisseur du gel a été évaluée à 17 nm (Tourovskaia *et al.*, 2003). A cette étape, la face qui était en contact avec le fond de la boîte de Petri est très hydrophile, et la face opposée est restée très hydrophobe.

PEG : Suivant le même procédé, des molécules de polyéthylèneglycol sont accrochées au gel d'acrylamide. Les faces hydrophiles des lamelles sont placées en contact avec le fond d'une boîte de Petri en verre, dans une solution préparée

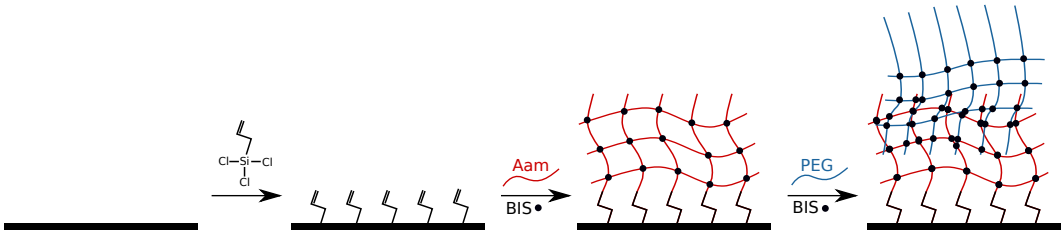

Figure 2.6 – Les étapes du traitement anti-adhésifs : silanisation d'une lamelle de verre, polymérisation de l'acrylamide, polymérisation du PEG. Aam : Acrylamide, PEG : Polyéthylène glycol, BIS : N,N'-methylene bisacrylamide. D'après Bearinger *et al.* (1997).

comme suit : dans 40mL de méthanol, 1.2g de Polyethylene glycol 1000 monomethyl ether monomethylacrylate (PEG), 1.8g de N,N'-methylene bisacrylamide, et 2.18g de benzophénone. La boîte de Petri en verre est placée 2 minutes au dessus du transilluminateur UV ($\lambda = 365$ nm). Les lamelles sont ensuite rincées au méthanol, puis à l'acétone, et enfin à l'eau et séchées.

Les lamelles ainsi traitées peuvent être conservées pendant plusieurs mois à l'air sans modification notoire des propriétés anti-adhésives.

2.1.4.2 Gravure

Pour créer les formes désirées de revêtement anti-adhésif, nous utilisons une méthode de gravure par traitement plasma à travers un masque réalisé par photolithographie sur résine fine. L'utilisation d'un masque en résine a de nombreux avantages :

- la résine est étalée directement sur toute la lamelle, et permet de graver toute la surface à la fois, à une qualité de gravure homogène.
- la lithographie permet d'obtenir une résolution très fine, de l'ordre du micron.
- les motifs n'ont pas de limite de topologie : on peut créer des formes concaves ou convexes, et même des formes non connexes, telles que des cercles concentriques.

Réalisation du masque : La première étape consiste à dessiner les motifs désirés dans un fichier à l'aide d'un logiciel de conception adapté (L-Edit (Tanner) ou LayoutEditor (Juspertor UG)), qui sont imprimés ensuite sur un masque. Ce masque peut être de deux types, selon la résolution spatiale des motifs désirée. Les masques les plus usuels sont des films de PET sur lesquels les motifs sont imprimés avec une imprimante haute résolution (Selba). La résolution maximale de cette technique est de 50800 dpi, ce qui convient à des motifs plus grands que 10

µm. Pour atteindre une résolution plus fine, il faut utiliser des masques en verre ou en quartz sur lequel une fine couche de chrome (de l'ordre de 100 nm) est gravée par lithographie à faisceau d'électrons (Compugraphics). La résolution est alors de l'ordre de 0.2 µm.

Dans le cas des masques en PET, nous les avons transférés sur des masques en chrome, afin d'utiliser un masque aux propriétés optimales : transparence au rayonnement UV bien meilleure pour le verre, et durée de vie beaucoup plus longue pour les motifs en chrome.

Photo-lithographie : Nous avons vu que pour obtenir une résolution du masque de l'ordre du micron, nous devions déposer sur la lamelle une couche très fine de résine. C'est ce qui nous conduit à choisir la résine S1813 (Microposit), dont l'épaisseur nominale après étalement est de 1.3 µm.

Étalement	30 secondes à 4000 tours/minutes
Recuit	2 minutes à 120°C sur plaque chauffante
Exposition	8 secondes à $\lambda = 365$ nm
Développement	10 secondes dans le développeur

Tableau 2.1 – Paramètres utilisés pour la photolithographie

Après le développement, la lamelle est rincée à l'eau puis séchée.

Gravure par traitement plasma : Nous utilisons le plasma pour graver le traitement anti-adhésif de la lamelle, uniquement là où il n'est pas protégé par la résine. De fait, la résine est également attaquée par le plasma, mais la différence d'épaisseur est telle (1.3 µm pour la résine contre 20 nm pour le traitement anti-adhésif) que la résine est considérée comme intacte après le traitement plasma. Nous traitons les lamelles au plasma pendant 4 séances de 5 minutes, séparées d'une pause de 2 minutes afin de les laisser refroidir. En effet, l'ensemble lamelle de verre / couche de résine constitue un système bilame donc les coefficients de dilatation différents peuvent induire une déformation lors de l'échauffement. Cela conduirait à un déplacement du pochoir en résine, et donc à une dégradation de la qualité des motifs sur la lamelle.

Dissolution du pochoir : La dernière étape est la dissolution du pochoir en résine dans de l'acétone pendant 20 secondes, suivi d'un rincage à l'eau puis d'un séchage. On retrouve ainsi une lamelle plane, avec des motifs anti-adhésifs là où il

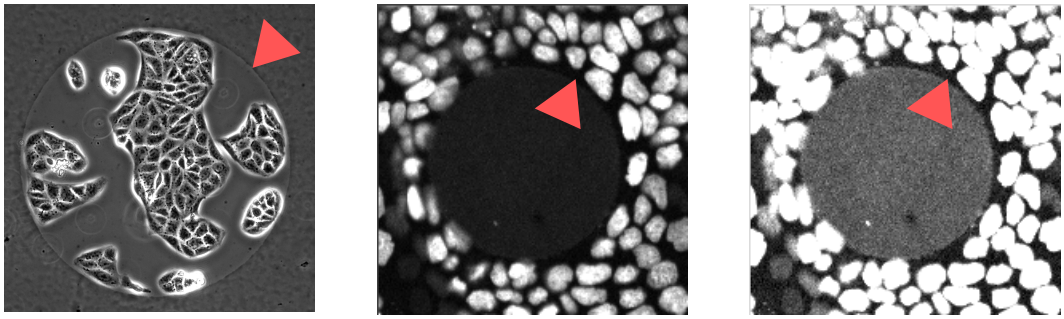

Figure 2.7 – Images de régions adhésives et non-adhésives. Les flèches rouges indiquent la limite entre la région adhésive et la région non-adhésive. (a) Rond adhésif de 400 µm de diamètre avec quelques cellules MDCK, en microscopie à contraste de phase. (b) Rond anti-adhésif de 75 µm de diamètre entourés de cellules MDCK dont le noyau est fluorescent (Histone-GFP) adhérant à la région adhésive, en microscopie confocale à disque rotatif. (c) Image identique à (b), avec le contraste ajusté pour mieux observer la région anti-adhésive.

y avait de la résine, et du verre nu là où il n'y avait pas de résine. Le traitement anti-adhésif étant très fin et transparent, il n'est pas facile de vérifier à l'oeil nu que la texturation est de qualité. Un test simple consiste à tremper la lamelle dans de l'eau, puis la ressortir et laissant l'eau couler : la texturation induisant un contraste d'hydrophilie entre les zones anti-adhésives et les zones de verre nu, l'eau mouille (et démouille) de façon différente sur ces zones. La zone anti-adhésive étant très hydrophile, l'eau s'étale très finement (sur une épaisseur micrométrique), et donc s'évapore très vite. Par contre, l'angle de contact de la goutte d'eau sur le verre nu est plus important, de l'ordre de 30°. L'épaisseur de la goutte est alors millimétrique, et l'eau persiste plus longtemps. Lorsqu'on sort la lamelle de l'eau, on voit donc des goutelettes sur les motifs de verre nu. Au microscope, la texturation est facilement observable (figure 2.7) :

- même si le traitement anti-adhésif est très fin, la différence d'indice optique avec l'eau induit un déphasage qui permet de l'observer facilement au microscope à contraste de phase.
- le traitement anti-adhésif possède des propriétés de fluorescence (dont l'origine n'est pas complètement comprise) permettant l'observation avec un microscope à fluorescence (dans les longueurs d'onde rouges, à $\lambda = 610$ nm).

Préparation de la chambre de culture : Afin de pouvoir cultiver des cellules sur une lamelle texturée dans leur milieu de culture, il est commode de fixer la lamelle sur une boîte de culture. Pour ce faire, la lamelle est collée avec du PDMS

sur le fond d'une boîte de culture percée d'un trou de 25 mm de diamètre. Après 10 minutes sur une plaque chauffante à 95°C, le PDMS est réticulé et la lamelle est solidement attachée à la boîte de culture.

2.2 Culture cellulaire

Nous utilisons comme modèle biologique la lignée MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). Ce sont des cellules épithéliales, extraites du rein d'un chien en 1958. Lorsqu'elles sont cultivées dans une boîte de culture elles forment spontanément une monocouche. Elles sont soit de type «sauvage» (wild type), soit elles sont transfectées de manière stable pour exprimer des protéines associées à un fluorophore (actine globulaire, actine filamenteuse, E-cadhérine, histone, vinculine) (les souches utilisées sont répertoriées au paragraphe 2.3.2.1 dans la partie «Microscopie»).

Les cellules sont cultivées dans une flasque de culture remplie de 7 mL de milieu de culture. Le milieu utilisé est le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) auquel nous ajoutons 10% de sérum fœtal de bœuf (Gibco), 2mM de L-glutamine (Gibco) et 1% d'une solution d'antibiotiques : Pénicilline (10 000 unités) et Streptomycine (10 mg/mL) (Gibco). Pour les cellules MDCK dont les protéines sont marquées par un fluorophore, nous ajoutons également 0.4 μg/mL de généticine (Gibco) qui est un antibiotique qui permet d'éliminer les cellules qui n'expriment pas la protéine fluorescente. La flasque est conservée dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère est saturée en humidité et régulée en CO_2 à 5%. Lorsque les cellules recouvrent entièrement le fond de la flasque, le milieu de culture est retiré et les cellules sont dissociées en utilisant une solution de trypsine-EDTA (0.3 mL pendant 10 min). Nous prélèvons ensuite environ 10% des cellules que l'on transfère dans une nouvelle flasque remplie de milieu. Cette opération, appelée «passage», est répétée tous les 2 à 3 jours jours. Après une trentaine de passages, nous cessons la culture des cellules pour éviter un biais dans la sélection et de trop nombreuses mutations. Les flasques sont jetées et de nouvelles cellules sont décongelées.

Le substrat préparé suivant le protocole décrit en 2.1.4 est fixé au fond de la boîte de culture. L'ensemencement a lieu lors du passage des cellules, lorsqu'elles sont dissociées. Pour déposer une quantité donnée de cellules, on prélève une certaine quantité de cellules en suspension dans la flasque. Souvent, comme nous cherchons à étudier l'épithélium proche de la confluence, une densité élevée de cellules est requise initialement, il est alors nécessaire de centrifuger les cellules (2 minutes à 1000 tours/minutes) pour les concentrer.

Une fois que les cellules ont adhéré sur les régions adhésives, le milieu de culture

est aspiré, les cellules sont rincées avec du PBS, et du milieu frais est ajouté (3mL par boîte de culture). Pratiquement, la densité surfacique de cellules doit quand même être mesurée au début de chaque expérience : en effet les cellules ne se déposent pas de façon homogène sur le substrat, elles n'y adhèrent pas toutes, et celles qui adhérent trop peu sont arrachées lors du rinçage.

Inhibitions : Au cours de ce travail, nous avons réalisé des inhibitions de certains acteurs composants cellulaires en utilisant des drogues spécifiques :

- l'inhibition de la polymérisation de l'actine avec la latrunculine, à 1 μM.
- l'inhibition de ROCK (effecteur de Rho) avec Y27632, à 30 μM.
- l'inhibition de Rac avec NSC23766, à 50 μM.
- l'inhibition de la myosine II avec la blebbistatine, à 25 μM.

Lors des inhibitions, la boîte de culture est conservée dans l'enceinte régulée du microscope. L'inhibiteur est ajouté au milieu de culture et les images sont prises 10 minutes plus tard, pendant plusieurs heures.

2.3 Microscopies et ablation

Les cellules en culture sur un support transparent (plastique ou verre) sont difficilement observables en microscopie en champ clair car elles s'apparentent à des objets transparents. Pour mieux les observer, nous avons principalement utilisé la microscopie en contraste de phase et l'épifluorescence.

2.3.1 Microscopie à contraste de phase

Une stratégie pour augmenter le contraste d'objets transparents est de convertir le déphasage de la lumière transmise dûe à la présence d'objet d'indice optique différent de celui du milieu en amplitude lumineuse. C'est le principe de la microscopie à contraste de phase (Bennett *et al.*, 1951), dont le principe est détaillé en annexe A.1.

Dans ces conditions, les cellules apparaissent plus sombres que le substrat, et les zones où l'épaisseur varie rapidement apparaissent très claires à l'image (effet de «halo»). C'est le cas des bords des membranes latérales des cellules. Cet effet est utilisé en analyse d'image pour repérer le contour des cellules (voir le paragraphe «Ligne de partage des eaux» 2.4.2.10).

Cependant, il faut préciser que la position exacte du halo ne coïncide pas exactement avec le bord de la cellule. Une déconvolution du halo est possible pour extraire la forme réelle de la cellule, mais n'est pas aisée (Yin *et al.*, 2012). En première approximation, on considèrera que le bord de la cellule correspond au maximum d'intensité du halo. Le halo a une largeur typique de 5 µm (voir figure 2.8). L'erreur sur la position exacte du contour des cellules est typiquement de $\pm 1 \mu m$. Notons que pour une cellule de 50-500 μm^2, l'erreur sur la mesure de l'aire est de 100% pour les petites cellules, et de 30% pour les plus grandes.

Enfin, précisons que le halo est d'autant plus intense que la cellule diffracte fortement la lumière. Cet effet est maximal quand le bord de la cellule est vertical, et beaucoup plus faible quand la cellule est étalée sur le substrat.

2.3.2 Microscopie de fluorescence

2.3.2.1 Microscopie de fluorescence classique

Afin d'améliorer encore le contraste entre les cellules et le fond de l'image, une technique consiste à utiliser des cellules fluorescentes et à les observer en fluorescence.

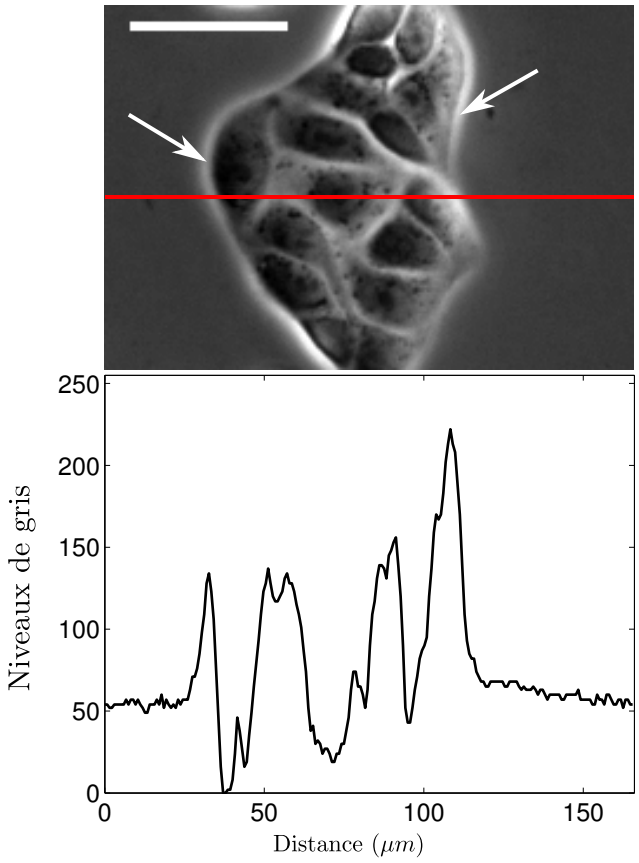

Figure 2.8 – (a) Îlot de quelques cellules MDCK sur une lame de verre, en microscopie à contraste de phase, avec un objectif 10x, barre=50 µm. Les flèches désignent le halo. (b) Profil de niveaux de gris correspondant à la ligne rouge sur l'image (a). On voit clairement que le cœur des cellules est plus foncé que le niveau de gris du substrat, et qu'un halo blanc apparaît à l'emplacement des membranes latérales des cellules.

Pour marquer la cellule en fluorescence, on utilise un fluorophore. C'est une molécule qui passe à un état excité en absorbant un photon d'une longueur d'onde donnée, et retombe dans son état fondamental en émettant une partie de l'énergie absorbée en rayonnement lumineux : un photon de longueur d'onde plus élevée. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission dépendent de chaque fluorophore et de son environnement physico-chimique.

Pour connaître la distribution d'une protéine dans la cellule à un instant donné, on réalise un marquage par immunofluorescence : la cellule est d'abord fixée : l'adjonction d'un agent de fixation permet la réticulation des protéines de la cellule, sans modification structurelle. Puis un anticorps (ou une toxine) lié à un fluorophore est introduit dans la cellule et se lie spécifiquement à une molécule-cible, telle qu'une protéine (marquage direct). Cette protéine est alors visible avec un microscope à fluorescence. Le marquage peut être également réalisé en deux étapes. Un anticorps est d'abord lié à une molécule-cible. Puis un autre anticorps associé à un fluorophore se lie spécifiquement sur le premier anticorps (marquage indirect).

Dans notre étude, nous avons utilisé la phalloïdine, qui est une toxine qui se lie aux filaments d'actine, couplée au fluorophore Alexa 488 ($\lambda_{\text{excitation}} = 495$ nm et $\lambda_{\text{émission}} = 519$ nm) ou Alexa 546 ($\lambda_{\text{excitation}} = 556$ nm et $\lambda_{\text{émission}} = 573$ nm), ainsi que l'anticorps anti-myosine de la souris puis l'anticorps anti-souris couplé au fluorophore Alexa 546.

Pour marquer une cellule vivante et l'étudier au cours du temps, l'immunofluorescence ne peut être employée, car la fixation est létale pour la cellule. La stratégie est de faire en sorte que la cellule produise elle-même le fluorophore associé à la protéine. Ceci est réalisable en transfectant les cellules de manière à ce qu'elles associent une protéine fluorescente à la protéine d'intérêt. L'exemple le plus courant de protéine fluorescente est la GFP (Green Fluorescent Protein), issue de la méduse (*Aequorea victoria*) ($\lambda_{\text{excitation}} = 488$ nm et $\lambda_{\text{émission}} = 509$ nm). mCherry est une autre protéine souvent utilisée, issue d'un corail ($\lambda_{\text{excitation}} = 587$ nm et $\lambda_{\text{émission}} = 610$ nm)

Dans notre étude, nous avons utilisé les cellules MDCK transfectées avec les plasmides suivants :

- cadhérine-GFP (marquage des contacts cellule-cellule)
- histone-mCherry (marquage des noyaux)
- actine-GFP (marquage de toute l'actine du cytoplasme)
- LifeAct-GFP (marquage de l'actine filamenteuse uniquement) (Riedl *et al.*, 2008)

– vinculine-GFP (marquage des contacts focaux)

Pour l'observation des cellules marquées, il faut utiliser un microscope de fluorescence. Le principe de la microscopie de fluorescence consiste à illuminer la cellule avec une lumière dont la longueur d'onde correspond au maximum d'absorption du fluorophore présent dans les cellules, puis à collecter la lumière émise par ce même fluorophore, à l'oculaire ou à la caméra, à la longueur d'onde d'émission du fluorophore.

2.3.2.2 Microscopie confocale

Le principal défaut de la microscopie de fluorescence tient au fait que pour imager une section d'un échantillon à une certaine hauteur, il faut illuminer cet échantillon dans toute son épaisseur. Les fluorophores situés hors du plan focal en question reçoivent de la lumière, et donc réémettent de la lumière qui est captée par l'objectif et participe à l'image finale : les fluorophores apparaissent flous à l'image. Pour s'abstraire de l'image des fluorophores hors du plan, la microscopie confocale restreint le volume d'illumination et le volume de détection (volume confocal) : deux diaphragmes (pinholes) conjugués au plan focal de l'objectif sont disposés sur le trajet optique. L'un est placé entre la source lumineuse et l'objet, l'autre est entre l'objectif et le capteur (Minsky, 1988, Pawley, 2006) (voir figure 2.9). Cette technique permet d'obtenir des images très contrastées et avec peu de bruit. La faible quantité de lumière provenant du volume confocal réduit impose d'utiliser une source lumineuse puissante, tel un laser, et d'amplifier le signal émis à l'aide d'un photomultiplicateur.

Pour construire une image complète d'une section de l'échantillon, celui-ci est balayé par le point focus. Pour en obtenir une image tridimensionnelle, il est deplacé verticalement au cours de l'acquisition. La reconstruction 3D est réalisée par ordinateur.

2.3.2.3 Microscopie confocale à disque rotatif

La microscopie confocale à disque rotatif («spinning-disk») reprend les mêmes principes que la microscopie confocale, mais diffère quant à la façon de parcourir l'échantillon. En microscopie confocale classique, un système de miroirs mobiles déplace le volume focal sur tout l'échantillon. Mais même réalisée à très haute vitesse, l'acquisition d'une image entière demande typiquement une seconde, rendant impossible l'acquisition à une vitesse plus rapide que une image par seconde. De

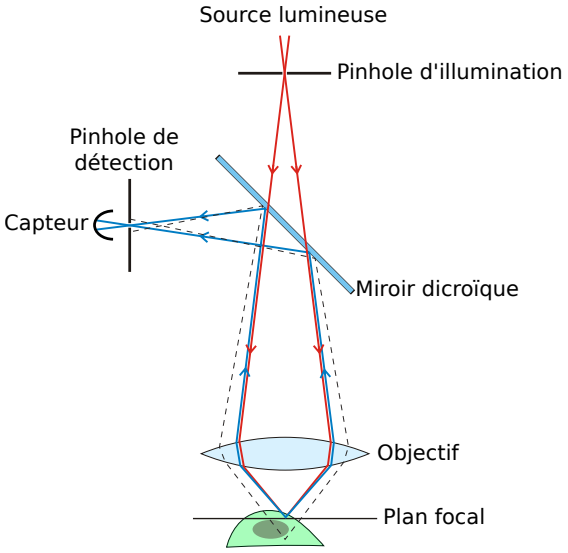

Figure 2.9 – Schéma de principe d'un microscope confocal. Le trajet optique rouge représente l'excitation lumineuse du volume confocal. Le trajet optique bleu représente l'émission à partir du volume confocal. Le trajet optique en pointillé noir représente un rayon lumineux émis d'un point hors du volume confocal et qui par conséquent est bloqué par le diaphragme d'émission.

plus, à chaque acquisition, l'échantillon est longuement illuminé par une lumière laser dont la puissance élevée peut être toxique (Freeman *et al.*, 1970, Logg *et al.*, 2009).

Le principe de la microscopie confocale à disque rotatif est de placer non pas un seul pinhole mais quelques milliers sur un disque rotatif («disque de Nipkov»). Chaque révolution du disque permet à la lumière d'illuminer tout l'échantillon. La lumière émise par fluorescence passe par le même disque avant d'atteindre une caméra (figure 2.10). En faisant tourner le disque à très haute fréquence, on peut atteindre un taux d'acquisition très élevé (jusqu'à 1000 images par seconde).

En résumé, nous utilisons le microscope confocal classique pour imager des cellules fixées : les images ont une très bonne résolution spatiale mais demandent environ une seconde d'acquisition. Nous utilisons le microscope confocal à disque tournant pour imager des cellules vivantes : les images ont une résolution spatiale moindre, mais ne demandent que quelques centaines de millisecondes d'acquisition. Il est donc possible de répéter ces acquisitions régulièrement pour suivre des cellules au cours du temps.

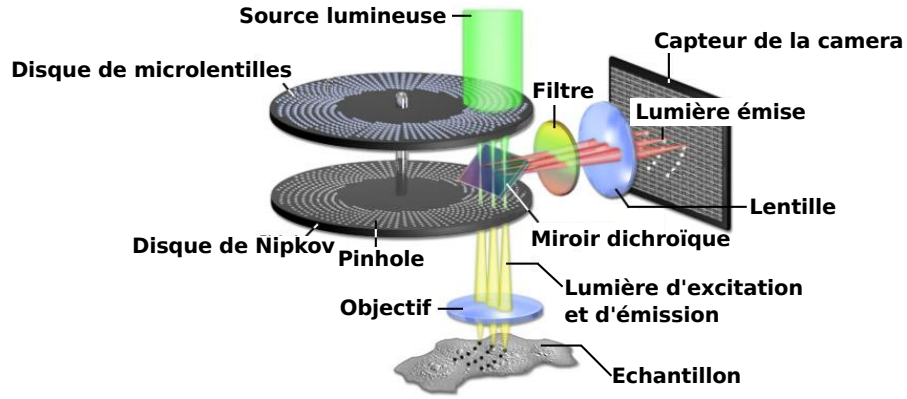

Figure 2.10 – Schéma de principe d'un microscope confocal à disque rotatif. Le disque de microlentilles permet de concentrer la lumière de la source sur les pinholes. (Zeiss Microscopy Online Campus)

2.3.3 Photo-ablation biphotonique

L'ablation laser permet de perturber localement l'équilibre mécanique de la cellule et permet d'étudier les forces impliquées dans la contractilité intracellulaire ou le rôle des différentes forces dans le développement de tissus (Colombelli et Solon, 2012). Les ablations sont réalisées avec un laser pulsé femtoseconde (longueur d'onde $\lambda = 800\text{n}m$, puissance P=0.4W) en mode biphoton, monté sur un microscope confocal, permettant une résolution spatiale de l'ordre du micron. L'ablation se déroule à la vitesse de 2.6 ms/μm^2. La puissance et la longueur d'onde du laser, ainsi que le temps d'ablation sont réglés de manière à ne réaliser que des ablations plasma, sans cavitation de bulle de vapeur d'eau due à l'échauffement. L'ablation d'une portion du câble d'actine n'affecte pas la survie de la cellule. La zone soumise à l'ablation est définie manuellement comme un polygone grâce au logiciel d'interface du microscope.

2.3.4 Caractéristiques des microscopes utilisés

Les microscopes utilisés au cours ce travail disposent tous d'une régulation de température, fixée à 37°C, et de CO_2, fixé à 5%, et disposent d'une platine x,y et d'un contrôle de la position verticale z motorisés, interfacés par un ordinateur grâce au logiciel Metamorph. Une liste de positions x,y,z peut être définie et mémorisée. L'interfaçage permet également de réaliser des observations sur la durée : une image est prise à chaque position de la liste mémorisée tous les intervalles de temps dt. L'intervalle de temps dt est défini entre 5 et 60 minutes, pour une durée totale

d'observation entre 1 et 4 jours.

Les microscopes Nikon Eclipse Ti (Spinning-Disk) et Zeiss LSM NLO 710 (Confocal/Ablation biphotonique) sont hébergés par la plateforme d'imagerie de l'Institut Curie.

Les caractérisques des microscopes utilisés sont présentées dans le tableau suivant :

Modèle	Olympus IX71		Nikon Eclipse Ti				Zeiss LSM NLO 710		
Type	Contraste de phase		Spinning Disk				Confocal		
Sources lumineuses	Lampe halogène		Laser : 405nm, 491nm, 561nm				Diode laser : 405nm laser argon : 457nm, 488nm, 514nm laser DPSS : 561nm laser HeNe : 633nm		
Capteur Taille du capteur	QImaging Retiga-4000R 15.1 × 15.1 mm		Caméra CoolSNAP HQ2 8.98 × 6.71 mm				Photo-multiplicateur -		
Objectifs	10x	20x	20x	40x	60x	100x	25x	40x	63x
Type	air	air	huile	huile	huile	huile	huile	huile	huile
Ouverture numérique	0.3	0.45	0.75	1.3	1.3	1.4	0.8	1.3	1.4
Taille du pixel (en microns)	0.742	0.371	0.644	0.322	0.216	0.130	0.66 †	0.42 †	0.26 †
Temps d'acquisition d'une image	100 ms		50-300 ms ‡				0.5-3 s ‡		
Utilisation §	{x,y,t}		{x,y,z,t}				{x,y,z} sur cellules fixées {x,y,t} après une ablation		
Paramètres d'acquisition	Δt = 5 - 30 min		Δt = 15 - 60 min, Δz = 0.2 - 5 µm				Δz = 0.1 - 0.5 µm, Δt = 0.5 - 2 s		

Tableau 2.2 – Caractéristiques des microscopes

†. Pour une taille d'image de 512 × 512 pixels

‡. Donné à titre indicatif. Le temps d'acquisition doit être ajusté en fonction de la puissance de la source lumineuse et de la sensibilité des fluorophores

§. Mode d'acquisition
- x,y : acquisition des images en plusieurs positions de l'échantillon.
- z : acquisition des images sur plusieurs coupes transvervales de l'échantillon.
- t : acquisition temporelle.

2.4 Analyse d'image

Les images des cellules capturées par les caméras des microscopes, qu'elles soient obtenues par fluorescence ou par contraste de phase, contiennent une quantité importante d'information : position et taille des cellules, niveau d'expression d'une protéine donnée, localisation de telle structure intracellulaire, etc. Même lorsque la qualité des images permet à un opérateur d'identifier les cellules, d'évaluer leur taille et leur forme, et de délimiter le contour du tissu de cellules, ces opérations sont trop longues et laborieuses pour être traitées manuellement, surtout quand il est nécessaire de suivre l'évolution des cellules au cours du temps. Une expérience typique consiste en une pile d'images, prises toutes les 15 min, pendant 48h. Cela correspond à 192 images. Si une centaine de cellules sont présentes à l'image, la simple détection manuelle des cellules représente près de 200 000 clics de souris, soit plus de 2 jours entiers de travail.

Il apparaît donc nécessaire d'automatiser le traitement des images. Nous travaillons principalement avec Matlab (The Mathworks) qui est un logiciel de calcul numérique.

Les images acquises par les caméras sont codées la plupart du temps sur 8 bits : une image est un tableau où chaque case (pixel) a une valeur entière comprise entre 0 et 255 (noir=0, blanc=255). Ces deux valeurs extrêmes encadrent les niveaux de gris intermédiaires. Quand les images sont codées sur 16 bits, la valeurs des pixels est comprise entre 0 et 4095 (le noir à 0 ; le blanc à 4095)

Les méthodes de traitement et d'analyse d'image que nous présentons ici reposent toutes sur le fait qu'une image est une matrice dont on modifie les éléments numériques.

2.4.1 Segmentation entropique

2.4.1.1 Seuillage classique

Pour mesurer la taille d'un îlot de cellules, ou pour restreindre une analyse à la partie de l'image occupée par les cellules, il est nécessaire de segmenter l'image : définir précisement les pixels occupés par les cellules, et ceux correspondant au susbstrat. Pour ce faire, la méthode la plus simple est de seuiller l'image selon les niveaux de gris : l'image en niveau de gris est transformée en image binaire en attribuant aux pixels les plus sombres la valeur 0, et aux pixels les plus clairs la valeur 1. Le choix du seuil de niveau de gris définissant la frontière entre une

valeur claire et une valeur foncée est crucial car il définit la forme et la taille des zones claires et des zones foncées (voir figure 2.11).

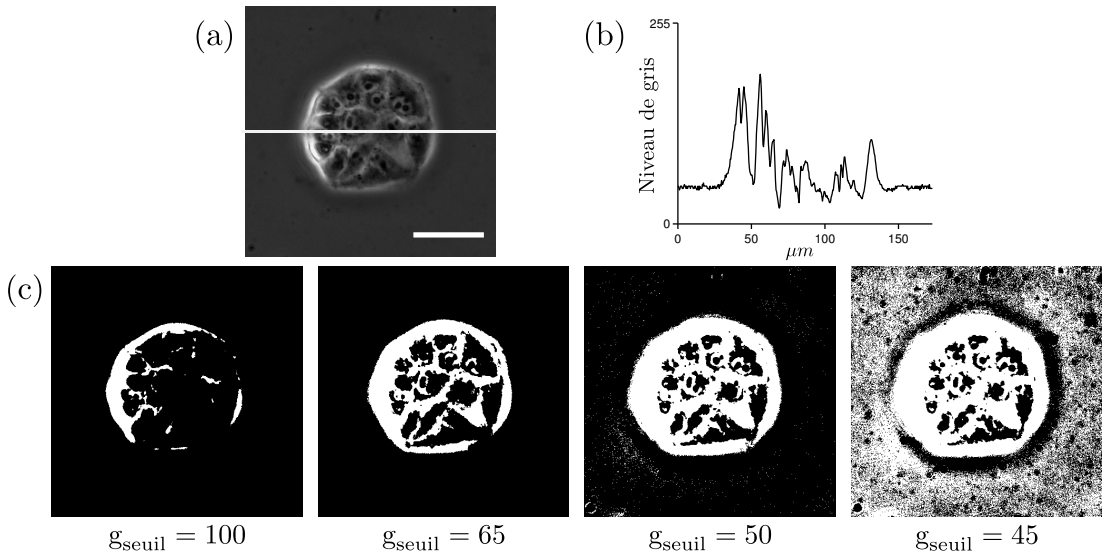

Figure 2.11 – (a) Image en contraste de phase d'un îlot de cellules MDCK. barre = $50\mu m$. (b) Niveau de gris correspondant à la ligne blanche sur l'image (a). (c) Résultat de la segmentation pour différentes valeurs du seuil.

La microscopie à fluorescence permet d'obtenir des images de cellules fluorescentes sur un fond noir, avec un fort contraste. Un seuillage simple permet d'isoler facilement la cellule à l'image. Généralement les images en fluorescence posent moins de difficultés quant à l'extraction des éléments présents à l'image.

Les images en contraste de phase ne sont pas aussi simples à seuiller. Le halo (voir le chapitre «microscopie par contraste de phase», 2.3.1) autour des cellules est plus clair que le substrat, et l'intérieur des cellules est plus foncé que le substrat. Cependant le halo n'est pas d'intensité uniforme. Une cellule qui s'étale davantage sur le susbtrat rend le halo moins intense, jusqu'à parfois disparaître. Le halo ne forme pas toujours un contour fermé autour des cellules. Il est parfois possible de segmenter le halo dans ses régions sombres en abaissant le seuil, mais cela se fait au prix d'une surestimation de la taille de l'îlot dans les régions claires (voir l'exemple figure 2.11).

De plus, le seuillage est très sensible à l'homogénéité de l'illumination. Si une zone est plus claire que le reste de l'image, elle ne sera pas seuillée de la même manière car la valeur du seuil est identique pour toute l'image.

Pour toutes ces raisons, il est nécessaire d'utiliser une méthode alternative pour seuiller les images.

2.4.1.2 Calcul d'entropie

La segmentation entropique ne définit pas un seuil absolu en niveau de gris mais utilise leur inhomogénéité locale mesurée par une «entropie» (Shannon, 1948) :

$$E = -\sum_{g=0}^{255} f_g \log_2(f_g)$$

où g est la valeur des pixels, et f_g est la fréquence de pixels de valeur g. Considérons par exemple une image uniforme, où tous les pixels ont pour valeur $g = G$. Alors la distribution des niveaux de gris est $\delta((g) - G)$ (elle vaut 1 en G, et 0 partout ailleurs). Puisque $x \log_2(x)$ s'annule en 0 et en 1, l'entropie d'une telle image est nulle.

$$E_{\text{image uniforme}} = 0$$

Considérons maintenant le cas d'une image très inhomogène, où toutes les valeurs de niveau de gris sont représentées aléatoirement. La distribution des niveaux de gris est uniforme, et vaut $f = 1/256$. L'entropie est alors égale à $\log_2(256) = 8$. On peut d'ailleurs démontrer que cette valeur est la valeur maximale de l'entropie : il n'existe pas d'image plus inhomogène que celle considérée ici.

$$E_{\text{image inhomogène}} = 8$$

Un exemple simplifiée est représenté en figure 2.12 avec une image de 9 pixels, avec 3 valeurs possibles de niveaux de gris.

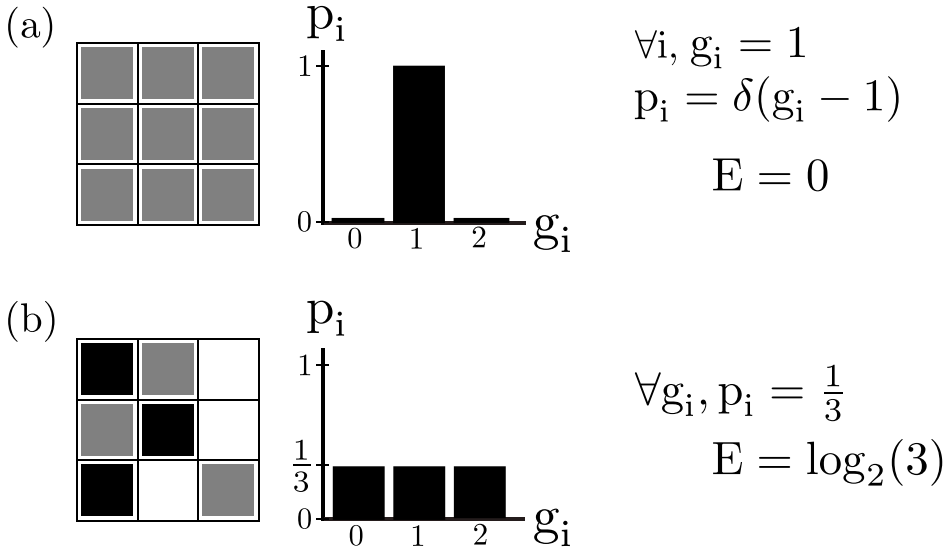

Figure 2.12 – (a) Cas d'une image uniforme. (b) Cas d'une image inhomogène.

Cette entropie s'avere être un critère tres discriminant. Calculée sur l'image évoquée précédemment (sur des sous-images de 9×9 pixels), elle permet d'extraire deux régions. Une région de faible entropie, où l'image est très uniforme (le substrat) ; un région de forte entropie, qui présente de grandes inhomogénéités de niveaux de gris (les cellules). Nous effectuons ensuite un seuillage classique sur cette carte de l'entropie, en déterminant une valeur intermédiaire entre les entropies moyennes des deux régions sus-citées. On obtient alors un masque binaire, blanc dans les zones avec cellules, noir dans les zones sans cellules. Enfin diverses opérations morphomathématiques (que nous décrivons ci-après, en 2.4.2) complètent le traitement en ajustant la forme du masque (figure 2.13).

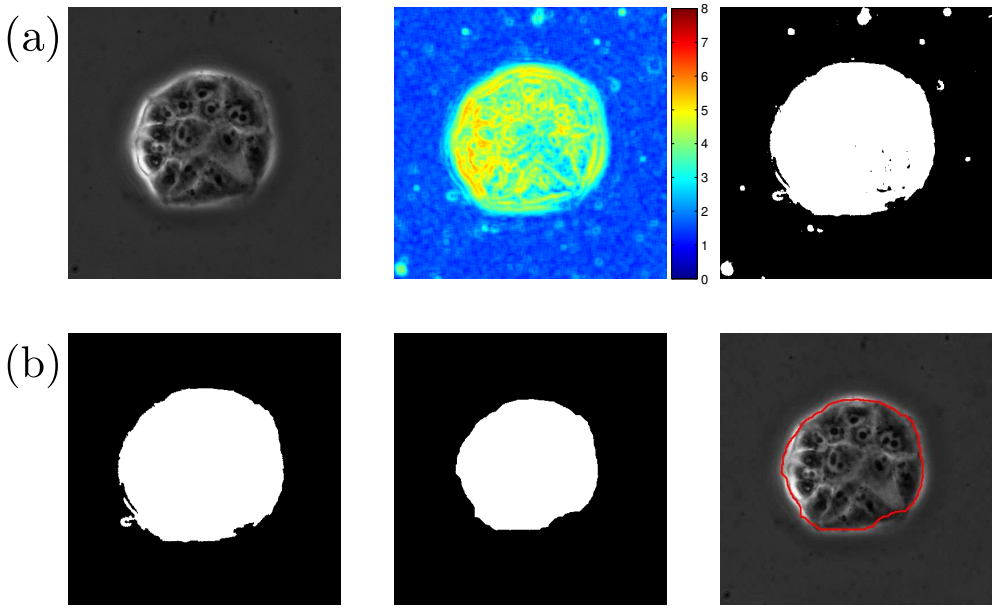

Figure 2.13 – (a) De gauche à droite : l'image initiale, la carte de l'entropie locale, le résultat du seuillage de la carte de l'entropie (pour un seuil de 2.4). (b) De gauche à droite : les opérations morphomathématiques successives : remplissage des zones plus petites que 2000 pixels^2 (275 µm^2), érosion de 20 pixels (7.4 µm), extraction du contour du masque.

Remarquons que dans la mesure où le calcul de l'entropie utilise la fréquence des niveaux de gris et non pas leur valeur, la valeur de l'entropie reste inchangée si tous les niveaux de gris de l'image sont multipliés par une constante, ou bien additionnés à une constante. Ainsi un changement global des conditions d'illumination ne modifie pas la valeur de l'entropie [1]. En revanche l'entropie dépend de la

1. Il faut tout de même prendre soin de ne jamais faire saturer la caméra lors de l'acquisition des images, car un changement d'illumination modifie alors l'information présente dans l'image en changeant le nombre de pixels saturés, et donc modifie la valeur de l'entropie. Ce point est important quand on veut réaliser une segmentation entropique avec la même valeur seuil pour une série d'images prises à des instants successifs : si les images sont saturées, alors la texure

«texture» de l'image (elle-même dépendante du type cellulaire, du grossissement, de la qualité de contraste du microscope, etc).

de l'image ne sera pas constante dans le temps, et il faudra adapter la valeur du seuil à chaque image.

2.4.2 Outils morphomathématiques

Les outils morphomathématiques ont été inventés et développés par Jean Serra et Georges Matheron dans les années 1960 dans le but initial de décrire la taille et l'arrangement des différents constituants du minerai de fer pour améliorer l'efficacité de l'extraction du fer dans les mines de Lorraine (Serra, 1965). Une algèbre spécifique a été développée et ces outils morphomathématiques ont été ensuite appliqués à divers domaines : géophysique, étude des matériaux, biologie... Nous utilisons ces outils pour la détection du contour des îlots ou du contour des cellules au sein d'un îlot, afin par exemple de mesurer des densités cellulaires ou des tailles d'îlots.

Le principe général des outils morphomathématiques est de considérer une image non pas comme un tableau de nombres, mais comme un relief topologique à trois dimensions, un «paysage», où la hauteur et la largeur de l'image sont l'étendue du paysage, et les niveau de gris des pixels donnent l'altitude de chaque point du paysage.

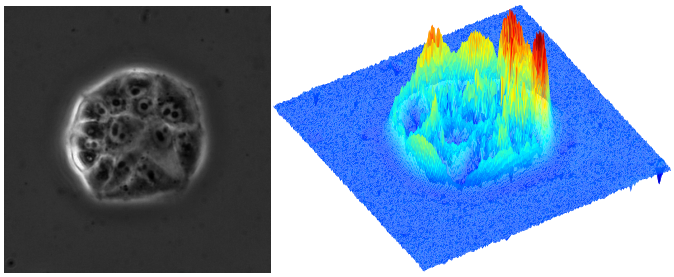

Figure 2.14 – Image en contraste de phase d'un îlot de cellule. Vue 3D de la même image.

Pour expliquer simplement comment fonctionnent ces outils morphomathématiques, il est plus facile de raisonner sur des images binaires, constituées de 0 et de 1. Le paysage n'est alors qu'une surface à deux niveaux : 0 pour le fond et 1 pour les zones élevées. Nous appelerons les zones élevées «objet». Un objet est donc un sous-ensemble de l'image qui vaut 1 partout. Cette surface est modifiée par un «élément structurant». Ici, nous considérons le cas simple où l'élément structurant est un disque de rayon R. En déplaçant ce disque sur toute l'image, et en examinant l'intersection de ce disque avec l'objet, plusieurs opérations peuvent être définies.

Figure 2.15 – Exemple d'image binaires contenant 5 objets.

2.4.2.1 L'érosion

L'érosion morphologique est une opération qui consiste à transformer l'objet A en un objet B. En chaque point de l'image, si tout le disque est entièrement inclus dans un objet A, alors ce point fait partie de B. Si une partie du disque n'est pas incluse dans l'objet A, alors ce point ne fait pas partie de l'objet B. En d'autres termes, l'érosion réduit l'objet d'une taille R (rayon du disque). Le principe de l'érosion est schématisé dans la figure 2.16.

L'érosion peut modifier la topologie de l'image : un objet A peut être érodé en deux objets B_1 et B_2 si A contenait une partie plus fine que R. De même, un objet plus petit que R disparaît.

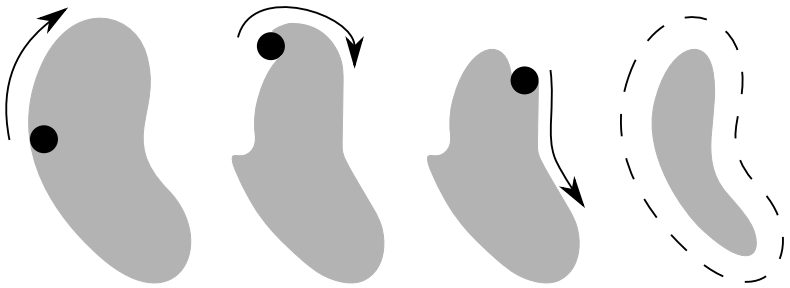

Figure 2.16 – De gauche à droite et de haut en bas : les étapes de l'érosion d'un objet (en gris) par un élément structurant circulaire (en noir). On obtient au final un objet aminci. En pointillé est représentée la forme de l'objet initial.

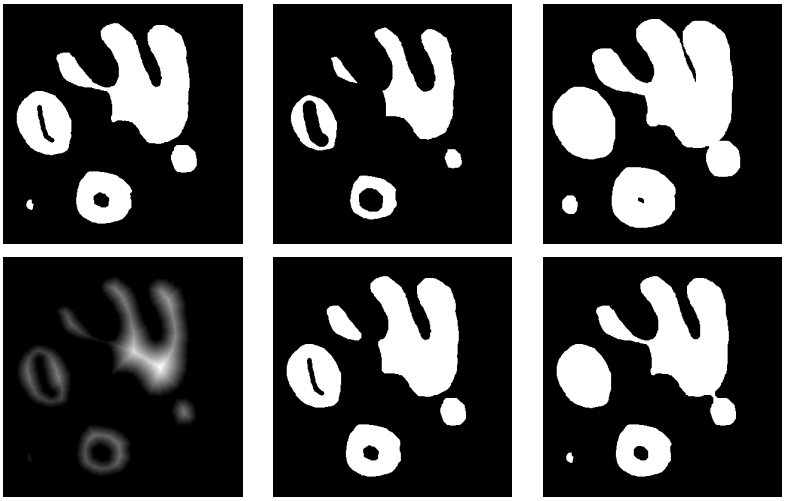

Figure 2.17 – De gauche à droite et de haut en bas : une image binaire initale, les résultats des opérations d'érosion, de dilatation, de transformée en distance, d'ouverture, de fermeture. La taille de l'image est 400×400 pixels, l'élément structurant est un disque de 8 pixels de rayon.

2.4.2.2 La dilatation

La dilatation morphologique est l'opération inverse de l'érosion. En chaque point de l'image, si l'intersection du disque avec l'objet A est non vide, alors ce point fait partie de B. Si le disque ne touche pas l'objet A, alors ce point ne fait pas partie de B. En d'autres termes, la dilatation agrandit l'objet d'une taille R.

La dilatation peut modifier la topologie de l'image : deux objets séparés A_1 et A_2 peuvent être joints par dilatation s'ils étaient séparés d'une distance inférieure à R. De même, un trou plus petit que R au sein d'un objet est rebouché.

L'érosion et la dilatation ne sont toutefois pas des opérations inverses l'une de l'autre. Les modifications entraînées par l'une de ces opérations ne sont pas annulées par l'autre opération. Cette non-réversibilité fait la richesse de ces transformations. On l'utilise par exemple pour définir les opérations d'ouverture et de fermeture.

2.4.2.3 L'ouverture

L'ouverture est une érosion suivie de dilatation. Pour les parties de faible rayon de courbure, l'ouverture n'entraîne aucune modification : la dilatation recrée la partie creusée par l'érosion. Mais les petits détails sont supprimés par l'érosion et ne sont pas recréés par la dilatation. L'ouverture a pour effet de supprimer de l'objet toutes les parties qui ne peuvent pas contenir entièrement le disque.

2.4.2.4 La fermeture

La fermeture est une dilatation suivie d'une érosion. De la même manière, les parties de faible rayon de courbure ne sont pas affectées pas la fermeture. Mais les petits espaces entre les objets sont remplis par la dilatation et ne sont pas supprimés par l'érosion. La fermeture a pour effet de combler tous les espaces entre les objets qui ne peuvent pas contenir entièrement le disque.

2.4.2.5 La transformée de distance

Les outils morphomathématiques permettent de calculer des distances. Les contours d'objets A_i construits par érosions successives d'un objet A définissent des ensembles de points situés à égale distance du contour de A. La distance entre un point du contour de A_i et le contour de A est le nombre d'érosions entre A et A_i. On peut alors fabriquer une «carte des distances» en superposant les objets érodés A_i. Cette image est la transformée en distance de l'image initiale. La distance entre un point de A et le contour de A est donnée par la valeur du pixel en ce point.

2.4.2.6 Les outils morphomathématiques pour les images en niveaux de gris

Pour des images en niveaux de gris, il faut étendre le raisonnement à trois dimensions, en considérant l'image comme la surface d'un paysage : tout ce qui est sous la surface du paysage, «la terre», définit les objets, et tout ce qui est au dessus de la surface du paysage est «l'air». On définit l'élément structurant, l'érosion, la dilatation, la fermeture et l'ouverture dans l'espace comme dans le plan. Par exemple, l'élément structurant disque est remplacé par une sphère. L'érosion est définie comme l'opération qui à partir d'un objet définit l'objet érodé, comme l'ensemble des points de l'espace où la sphère n'a pas d'intersection avec «l'air». La sphère agit comme un outil excavateur, en retirant une épaisseur (correspondant au rayon de la sphère) de «terre» aux objets. De façon similaire, la dilatation ajoute aux objets une couche de terre de l'épaisseur du rayon de la sphère. La fermeture est également définie comme une dilatation suivie d'une érosion, et l'ouverture comme une dilatation suivie d'une érosion (voir exemples en figure 2.18).

2.4.2.7 La dilatation géodésique et la reconstruction morphologique

La dilatation géodésique fait intervenir deux objets : un objet à dilater A, et un objet B qui limite la dilatation. Le résultat de la dilatation géodésique est l'inter-

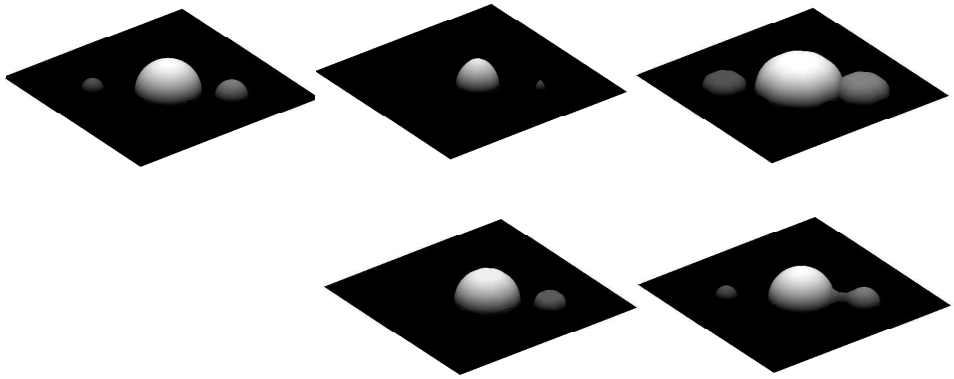

Figure 2.18 – De gauche à droite et de haut en bas : une image en niveaux de gris initale, les résultats des opérations d'érosion, de dilatation, d'ouverture, de fermeture. La taille de l'image est 400×400 pixels, l'élément structurant est un disque de 20 pixels de rayon. Les 3 objets sont des demi-sphères, de gauche à droite de rayons initiaux 20, 60, et 30 pixels.

section de B avec le dilaté de A. La reconstruction morphologique est l'itération de la dilatation géodésique jusqu'à obtenir un objet stationnaire. La reconstruction morphologique permet de reconstruire des objets modifiés par une opération précédente. Par exemple, si on veut filtrer une image binaire en retirant les petits objets isolés, on peut appliquer une érosion. Mais l'érosion modifie également les gros objets en les creusant. La reconstruction morphologique de l'érodé dans l'image initiale permet de retrouver exactement les gros objets initiaux, contrairement à l'ouverture qui ne permet que de retrouver qu'approximativement les gros objets (les petits détails des objets étant supprimés par l'ouverture) (figure 2.19).

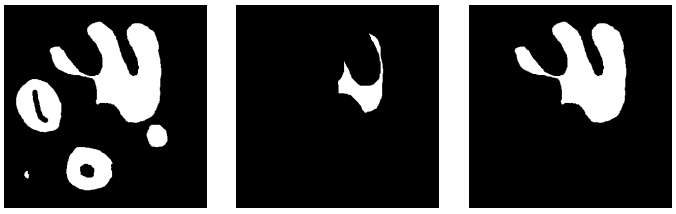

Figure 2.19 – Exemple de reconstruction morphologique d'une image binaire. De gauche à droite : l'image initiale (400 × 400 pixels), l'érodé par un disque de 20 pixels de rayon, et la reconstruction morphologique de l'érodé dans l'image initiale, permettant de retrouver le gros objet initial et d'éliminer les petits objets.

On peut définir également une reconstruction morphologique par érosions géodésiques successives d'un objet A dans un objet B.

Il existe encore bien d'autres outils morphomathématiques, utilisant chacun des éléments structurants aux formes bien définies. Des exemples sont illustrés dans la figure 2.20.

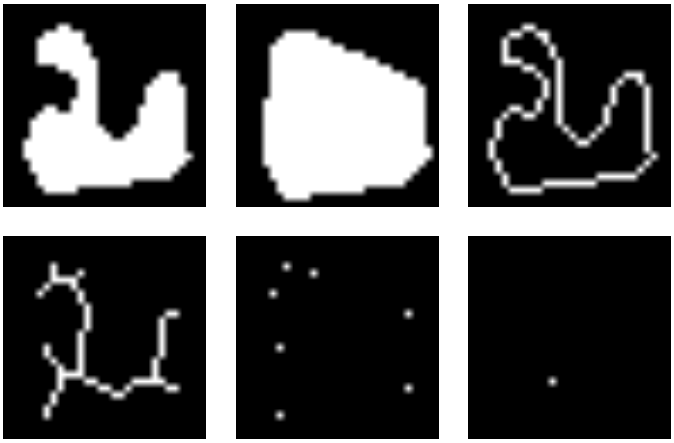

Figure 2.20 – Exemple d'opération morphomathématiques. De gauche à droite et de haut en bas : l'image de départ (30×30 pixels), son enveloppe convexe, son périmètre, son squelette, les points terminaux du squelette, la réduction de l'image de départ en un point.

2.4.2.8 Extrema locaux

Les extrema locaux d'une image correpondent souvent à des zones d'intérêt sur des images en fluorescence : noyaux, adhésions focales, etc. Localiser ces objets est la première étape de l'analyse de leur dynamique (détection de leur trajectoire ou évolution de leur densité par exemple). Cette opération peut être réalisée par les outils morphomathématiques.

Si on utilise un élément structurant plat sur une image en niveaux de gris, toute dilatation laissera inchangée les points de l'objet correspondants à des maxima locaux : elle dilatera l'objet latéralement, mais pas en hauteur. De même, une érosion ne creuse pas les minima locaux. C'est un moyen simple de détection de extrema locaux.

Pour un objet A, définissons A_- son translaté de -1 sur la verticale. Il suffit ensuite d'exécuter la reconstruction morphologique de A_- dans A, c'est-à-dire la dilatation de A_- sous la contrainte de A (voir figure 2.21). La dilatation de A_- ne déplace pas les maximums locaux, donc la reconstruction morphologique de A_- a ses maxima locaux inférieurs d'une unité par rapport à ceux de A, mais tous ses autres points sont strictement identiques à A. La détection des maxima est alors immédiate. De la même manière, la détection des minima se fait par reconstruction morphologique (cette fois par érosion) de A_+, translaté de A de $+1$ sur la verticale, dans A.

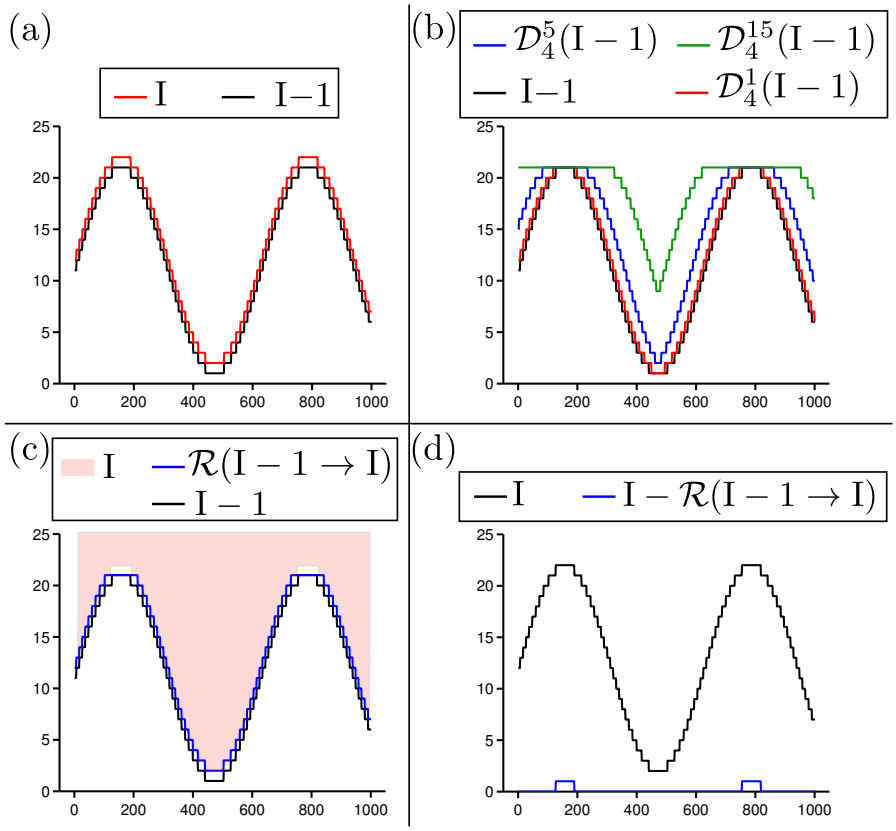

Figure 2.21 – Exemple de reconstruction morphologique pour déterminer les maxima d'une fonction d'une image I en niveaux de gris. L'image I est représentée en coupe transversale.

(a) L'image I et son translaté de -1, I−1.

(b) I−1 et trois dilatations de $I-1$ (l'élément struturant est un disque de 4 pixels de rayon. Les dilatations sont répétées une fois, cinq fois, et quinze fois). Remarquons que les maxima ne changent pas.

(c) I-1 et la reconstruction morphologique de I−1 dans I (la borne supérieure de la reconstruction, I, est représentée en rose). Remarquons que la reconstruction de I−1 dans I coïncide avec I sauf sous les maxima.

(d) I et la différence entre I et la reconstruction de I-1 dans I. Les maxima sont mis en valeur.

La dilatation avec un élément structurant de rayon r et répétée n fois est notée $\mathcal{D}_r^n$. La reconstruction morphologique de A dans B est notée $\mathcal{R}(A, B)$.

2.4.2.9 La ligne de partage des eaux (Watershed)

L'algorithme de partage des eaux permet de détecter les lignes de crête d'un relief topologique. Dans le cas d'une image de microscopie à contraste de phase, il s'agit des lignes claires du halo lumineux correspondant aux contours des cellules (voir les exemples 2.4.2.10, 2.4.2.12 et 2.4.2.13). Cet algorithme permet également de localiser les lignes d'équidistances entre des noyaux de cellules, permettant d'inférer la position des membranes cellulaires (voir l'exemple 2.4.2.11).

Imaginons qu'on inonde le paysage d'eau à partir de tous les minima locaux. Progressivement, le niveau de l'eau s'élève. Pour empêcher le mélange des eaux venant de minima différents, on crée un barrage élémentaire en chaque point de contact. L'eau continue de s'élever. A la fin ne restent que les barrages, entourés d'eau. L'ensemble des barrages décrit la ligne de partage des eaux (figure 2.22).

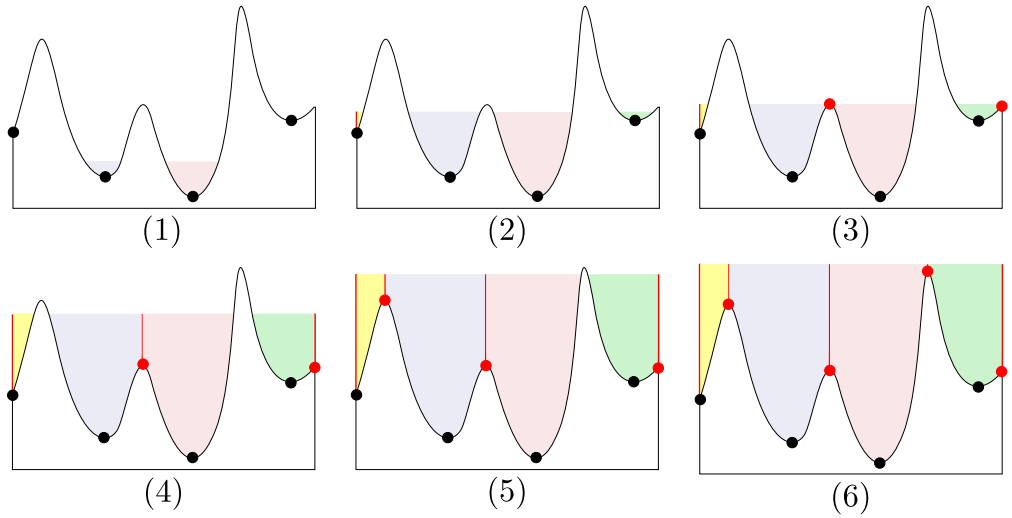

Figure 2.22 – Illustration du principe de l'algorithme de ligne de partage des eaux. Les points noirs • réprésentent les minima locaux. Chaque couleur représente un bassin différent. L'eau monte progressivement à partir des minima locaux. Les points (représentés en rouge, •) où se rejoignent deux bassins définissent la ligne de partage des eaux.

L'algorithme de ligne de partage des eaux est utilisé pour détecter les membranes des cellules, et par exemple calculer leur densité (voir 2.4.2.10). Il est également utilisé pour la mesure automatisée de la distance couverte sur les pointes de Pacman (voir 2.4.2.12) et l'aire des régions sans cellule sur les motifs anti-adhésifs circulaires (voir 2.4.2.13).

2.4.2.10 Exemple 1 : Evaluation de la densité de cellules à partir d'une image en contraste de phase

L'évaluation de la densité de cellules dans un îlot peut évidemment être effectuée à la main, en pointant chaque cellule individuelle. Mais le nombre de cellules dans un îlot (de l'ordre de 100 à 1000 cellules) rend cette tâche très longue. L'algorithme de ligne de partage des eaux permet de déterminer rapidement et efficacement la position des membranes cellulaires.

Généralement, cet algorithme appliqué à une image donne un résultat sursegmenté : il y a beaucoup trop de minima locaux, donc beaucoup trop de bassins. On peut réduire le nombre de bassins en fusionnant les minima locaux correspondant à une même cellule. Pour cela, une méthode consiste à ne considérer que les h-minima étendus (figure 2.23) : on inonde chaque minimum local d'une hauteur h d'eau (sans création de barrage aux points de contact).

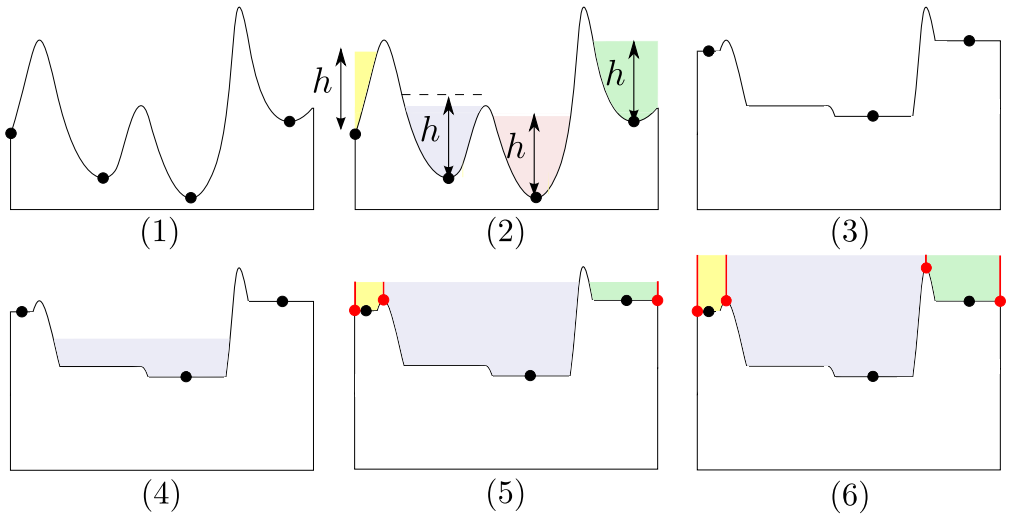

Figure 2.23 – Principe de la réduction du nombre de bassins. À partir des minima locaux initiaux (•), une hauteur h d'eau est injectée. Les bassins peu profonds (d'une profondeur inférieure à h) sont entièrement recouverts (2). Cela définit une nouvelle image (3) et donc de nouveaux minima locaux. Ensuite la procédure habituelle se poursuit (4,5,6) : inondation à partir des nouveaux minima locaux, définition des barrages, etc.

Une autre technique consiste à définir manuellement les minima locaux à considérer. Autrement dit on fixe le nombre de bassins et la position des bassins. Cela permet de guider très efficacement l'algorithme (voir les exemples suivants 2.4.2.12 et 2.4.2.13).

2.4.2.11 Exemple 2 : Evaluation de la densité de cellules à partir d'une image de fluorescence

Dans le cas d'image de microscopie de cellules dont les noyaux sont marqués, il est également possible d'utiliser l'algorithme de ligne de partage des eaux. Dans ce cas, l'algorithme est appliqué non pas à l'image initale, mais à l'image inversée : les noyaux marquées forment des bassins, et les zones entre les noyaux forment des crêtes. En supposant que les membranes des cellules coïncident avec ces crêtes, l'aire des cellules est facilement extractable.

La figure 2.24 montre une méthode efficace pour détecter les cellules à partir d'une image de noyaux de cellules fluorescents de faible contraste.

(a) l'image de départ est une image de noyaux de cellules à faible contraste. Certains noyaux apparaissent à peine, notamment dans le coin supérieur droit de l'image.

(b) un filtrage par moyennage local permet d'extraire les noyaux de l'image.

(c) cependant, sur l'image binaire qui en résulte, certains noyaux se recouvrent. On ne peut donc pas extraire immédiatement le contour des cellules.

(d) pour séparer deux noyaux qui se touchent (comme dans le coin inférieur droit, par exemple), une transformée en distance est d'abord appliquée. Quand deux noyaux se recouvrent dans l'image binaire, ils sont le plus souvent connectés par une région plus mince que les noyaux eux-même. La valeur de la transformée en distance au point de connection est donc plus faible que la valeur au centre des noyaux.

(e) une ouverture morphologique est appliquée afin de ne pas sursegmenter l'image (notamment pas la suppression des objets très petits).

(f) l'algorithme de ligne de partage des eaux est enfin utilisé pour repérer les lignes de crêtes entre les noyaux (l'algorithme est appliqué sur l'image (e) retournée, pour que les noyaux soient des bassins).

Cette méthode n'est pas parfaite. Elle est sujette à des erreurs de sursegmentation et de sous segementation. Mais comme le montre l'exemple de la figure 2.24, ces erreurs sont peu nombreuses par rapport au nombre total de cellules. Il faut également préciser que cet algorithme est capable de trouver des cellules difficilement détectables à l'œil. Enfin, la rapidité d'exécution d'une telle routine permet de suppléer le comptage manuel.

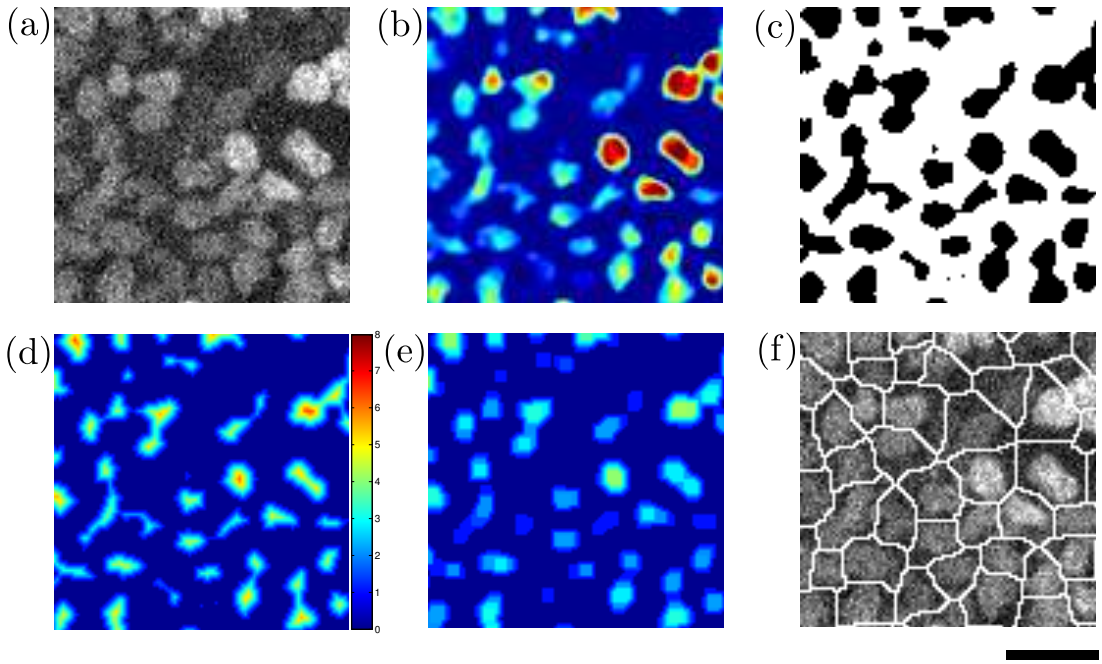

Figure 2.24 – Les étapes de la détection de cellules à partir d'une image des noyaux, à l'aide d'outils morphomathématiques. Voir le texte pour les détails des étapes. Barre = 20 µm.

2.4.2.12 Exemple 3 : Calcul d'une distance

Dans le cadre de l'expérience «Pacman» (section 3.3), l'épithélium prend une forme particulière (figure 2.25) sur laquelle il est important de mesurer la distance D entre le centre du motif et le bord du tissu au niveau de la pointe.

Pour atteindre une précision suffisante sur l'estimation de la moyenne de D en fonction des différentes conditions expérimentales, il est nécessaire de répéter l'expérience un grand nombre de fois. De plus l'analyse de l'évolution de D au cours du temps est aussi effectuée. Pour 400 vidéos expérimentales de 300 images chacunes réalisées au cours de cette étude, la distance D doit être mesurée 120000 fois. Un traitement automatisé de cette tâche est possible en utilisant les outils morphomathématiques.

Nous utilisons le halo lumineux inhérent à la microscopie par contraste de phase pour détecter le bord du tissu. Un seuillage simple ne permet pas de le détecter directement, car son intensité n'est pas uniforme. Une segmentation entropique permet de seuiller efficacement l'îlot de cellules, mais la résolution de cette méthode n'est que de l'ordre de 5 µm (la largeur du halo). En utilisant le maximum d'intensité du halo lumineux comme repère du bord de l'îlot, la résolution est de 1 µm. Les outils morphomathématiques permettent de définir une méthode robuste

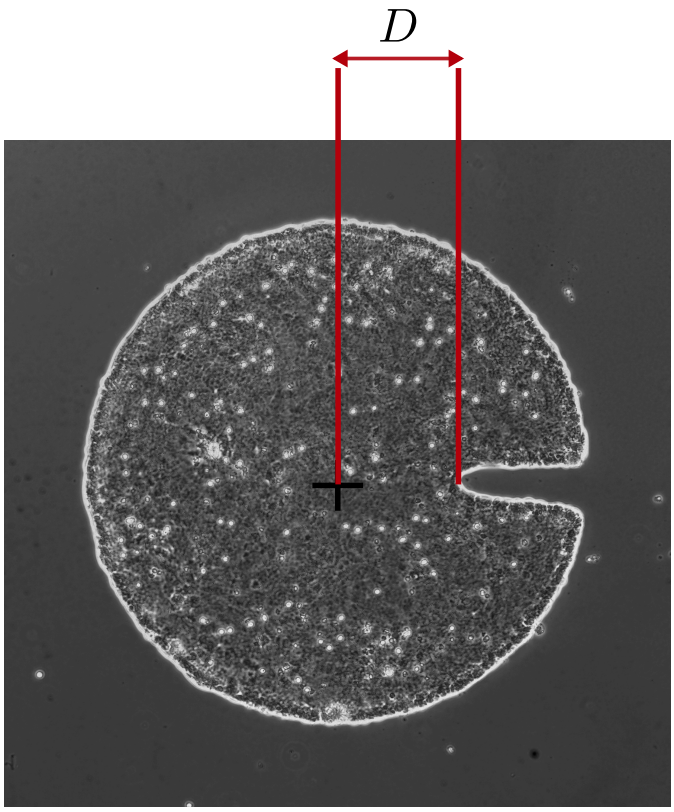

Figure 2.25 – Définition de la distance de la partie de la pointe couverte par les cellules.

pour détecter ce halo puis pour mesurer D via la transformée de distance (voir 2.4.2.5).

La figure 2.26 reprend les étapes de traitement d'image pour la mesure de cette distance. L'image de départ est un tissu à confluence dans un motif adhésif Pacman, de 1000 µm de diamètre. L'algorithme de partage des eaux appliqué à l'image brute ne permet pas de détecter le bord du tissu :

(α) : L'algorithme de partage des eaux sursegmente l'image car l'image brute contient beaucoup trop de minima locaux.

(β) : Pourtant le bord du tissu forme une «crête» bien marquée dans le relief topologique.

Il faut donc appliquer l'algorithme de ligne de partage des eaux sur une image «simplifiée», dont les minima locaux ont été imposé à dessein. Comme le bord du tissu constitue une «crête» très marquée, il suffit de définir un minimum au centre du Pacman et autre minimum à l'extérieur du Pacman :

(a) : La première étape consiste à appliquer la segmentation entropique : mesure de l'entropie locale, puis

(b) : segmentation de cette carte d'entropie pour obtenir un **masque grossier**, à plus ou moins 30 µm près (des étapes de «nettoyages» de l'image binarisée sont effectuées par ouverture et fermeture morphologiques, cachées ici (voir figure 2.13)).

(c) : L'enveloppe convexe est extraite de l'image binarisée du tissu, permettant de déterminer le **centre du motif** Pacman (repéré par la croix +). La position du centre sera utilisée plus tard (étape (i)).

(d) : Une érosion et une dilatation de l'image binarisée du tissu sont combinées et déterminent les régions où sont imposés les minima locaux.

(e) : Reconstruction d'une image contenant que deux minima locaux : un à l'intérieur du Pacman, et un à l'extérieur du Pacman.

(f) : Dans l'algorithme de ligne de partage des eaux, le nombre de minima locaux correspond au nombre de bassins. La ligne de partage des eaux séparant les deux bassins correspond alors exactement au **bord du tissu**.

(g) : Le bassin intérieur est défini blanc, le bassin extérieur est défini noir.

(h) : La **transformée en distance** donne en chaque pixel blanc du Pacman la plus courte distance à un pixel noir.

(i) : La valeur de cette image prise au centre du Pacman (défini en (c)) est la **distance D** entre le centre du Pacman et le bord du tissu sur la pointe anti-adhésive.

Cet algorithme pour mesurer D est entièrement autonome. Il ne dépend que d'un seul paramètre ajustable : la valeur du seuil entropique. Mais nous avons vu que ce paramètre ne dépend que du type cellulaire. De plus, la segmentation entropique n'est qu'un point de départ grossier dans la définition du contour, elle ne définit pas directement la valeur D. Un changement (limité) de valeur du seuil entropique modifiera le résultat de la segmentation entropique (étape b), mais ne changera pas la valeur de D. Nous pouvons donc répéter de manière automatique les mesures de D pour une série d'images accumulées au cours d'une expérience. À titre indicatif, la mesure de D pour une image prend environ 3 secondes. Une expérience de 80 heures, à raison d'une image toutes les 15 minutes, représente 320 images, soit 320 mesures à répéter. L'analyse de toute l'expérience dure donc 15 minutes. En utilisant les capacités de calcul parallèle des processeurs multi-coeurs, cette durée est réduite à quelques minutes.

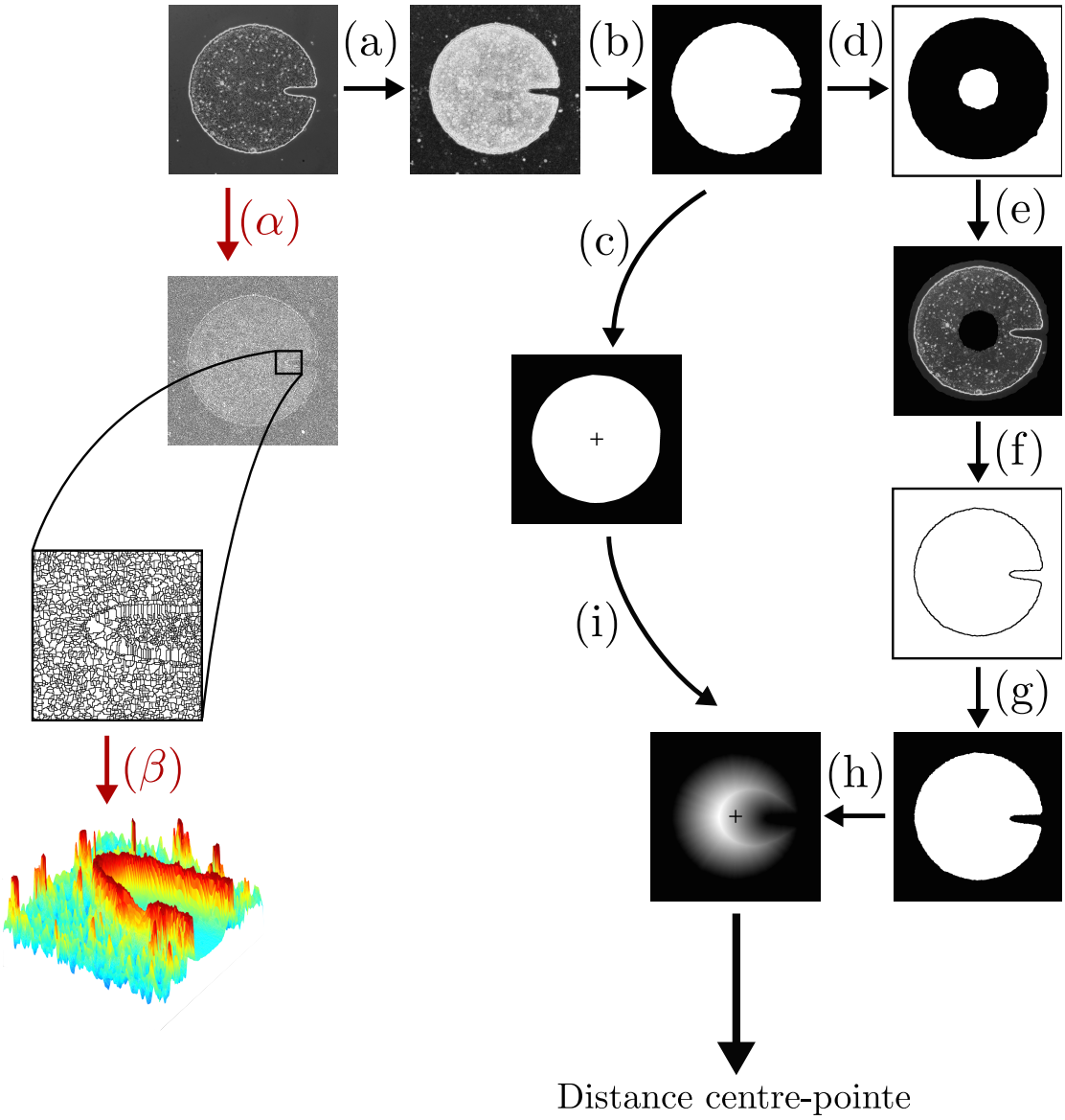

Figure 2.26 – Les étape permettant de mesurer D. Les étapes sont détaillées dans le texte.

2.4.2.13 Exemple 4 : Mesure d'aire sans cellule

Une méthode très similaire est utilisée pour évaluer l'aire des régions sans cellule sur les motifs anti-adhésifs circulaires de la partie 3.2. L'algorithme de ligne de partage des eaux localise le bord de l'épithélium en utilisant là encore le halo lumineux. La détection du halo est facilitée en fixant le nombre de bassins sur l'image. Un bassin est à l'intérieur du halo et l'autre bassin est à l'extérieur du halo. Pour cela un minimum est imposé à l'intérieur de la blessure ronde et un autre minimum est imposé autour de la blessure ronde.

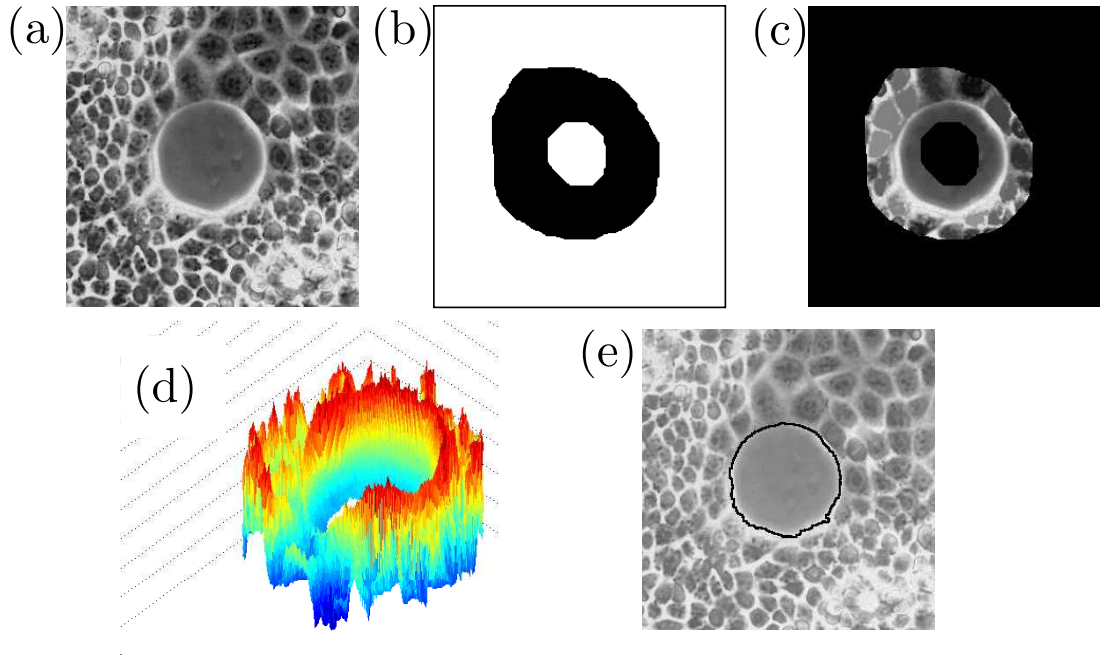

Figure 2.27 – Les étapes permettant de mesurer l'aire de la blessure. Les étapes sont les suivantes : (a) l'image de départ, (b) les régions (en blanc) de l'image où sont imposés les minima, créant deux bassins (c). (d) Vue tridimensionelle du halo lumineux à détecter. (e) résultat de l'algorithme de ligne de partage des eaux.

Dans le cas d'une série d'image prises à des instants différents, les régions des minimas (figure 2.27b) sont dessinées à la main pour la première image. Ensuite pour l'image suivante, les régions sont inférées en utilisant le résultat de la détection du bord de l'épithélium de l'image précédente.

Les outils morphomathématiques permettent de développer des techniques de traitement d'images efficaces et rapides. Ils sont indispensables à l'analyse de nos expériences, pour lesquelles nous disposons d'une très grande quantité d'images. De plus, la versatilité de ces outils est un atout majeur lorsqu'il s'agit de construire et d'adapter une technique de traitement d'image à un problème particulier. À

titre d'exemple supplémentaire, citons Picas *et al.* (2012) pour lequel nous avons construit l'outil d'analyse d'images AFM du cytosquelette de globule rouge (disponible en annexe A.4).

2.4.3 Mesure du champ de vitesse par PIV

Pour mesurer la vitesse des cellules en migration à partir d'images de microscopie, une technique consiste à détecter chacune des cellules, évaluer leur centre de masse, et mesurer le déplacement de ces centres de masse au cours du temps. Cela permet d'accéder à l'information de position et de vitesse au cours du temps de chaque cellule dans le tissu. Pratiquement, la détection des cellules est réalisée soit manuellement (un opérateur pointe chaque cellule à l'aide de la souris de l'ordinateur et un logiciel enregistre chaque position pointée), soit de façon automatisée à l'aide de l'algorithme de ligne de partage des eaux ou par tracking automatique des noyaux fluorescents (ou bien à partir d'une image des membranes fluorescentes). La première méthode est laborieuse quand il s'agit de localiser des centaines de cellules par image sur une vidéo qui en compte quelques dizaines. La seconde méthode n'est véritablement efficace que si les cellules apparaissent très contrastées à l'image. Cela est donc possible en microscopie de fluorescence, avec les membranes ou les noyaux des cellules fluorescentes. Mais en contraste de phase, le résultat de l'algorithme de ligne de partage des eaux commet fréquemment des erreurs : si une membrane est moins marquée, deux cellules peuvent être détectée comme une seule ; si un détail de la cellule est très lumineux, alors cette cellule peut être détectée comme deux cellules. Il est alors impossible de suivre une cellule au cours du temps.

Il est donc nécessaire d'opter pour une méthode de mesure de vitesse qui ne s'appuie pas sur la détection préalable des cellules. Cela est permis par la Vélocimétrie par Images de Particules (PIV : Particle Image Velocimetry) (Petitjean *et al.*, 2010). Cette technique est très utilisée dans l'équipe. Elle a été mise au point par Laurence Petitjean (Petitjean, 2011).

2.4.3.1 Principe de la PIV

Cette méthode, développée initialement pour l'étude d'écoulements hydrodynamiques (Raffel *et al.*, 1998), consiste à mesurer un champ de vitesse par le calcul de la corrélation entre deux sous-fenêtres d'images successives pour en déduire le déplacement local (voir figure 2.28). Si le recours à des traceurs transportés par le fluide est indispensable à l'application de cette technique en hydrodynamique, l'application à des images de cellules est directe (Supatto *et al.*, 2005) : sur des images à constraste de phase, de nombreux composants intracellulaires (tels que les organelles, les membranes, ou les noyaux) apportent suffisamment de détails à

l'image pour que le calcul de la corrélation soit possible.

2.4.3.2 Méthode utilisée

Nous utilisons l'algorithme de PIV inclus dans la suite MatPIV (Sveen, 2004), dans l'environnement MATLAB. Nous avons développé un ensemble de routines permettant de tirer profit de la puissance de la méthode. La suite MatPIV a été écrite pour caractériser des écoulements hydrodynamiques, et est bien adaptée à cette problématique. Notre travail a consisté à réécrire des fonctions permettant l'utilisation directe de l'algorithme dans le cadre de l'étude de la migration collective de cellules. Cela a conduit à l'écriture de deux interfaces graphiques :

Gui_PIV est une interface graphique permettant le chargement d'une liste de vidéos à traiter, le choix des paramètres de PIV (nous y reviendrons), et l'ajustement des paramètres de masquage des zones sans cellules. L'algorithme a été modifié pour permettre l'utilisation optimale des possibilités de calcul parallèle offerte par Matlab sur des processeurs multi-cœurs. Une fois le calcul exécuté, les champs de vitesses sont stockés sur le disque dur pour une analyse ultérieure.

AVeMap [2] (Deforet *et al.*, 2012) est une interface graphique similaire à Gui_PIV, mais rigoureusement adaptée aux expériences de migration massivement menées en parallèle (wound-healing assay), dont l'objectif est d'identifier des paramètres permettant une classification des phénotypes de manière automatique et parallèle. L'analyse de la migration d'une population de cellules dans ces expériences consiste généralement en deux types de mesure (Simpson *et al.*, 2008) :

- une mesure globale de la vitesse de migration comme l'évolution de l'aire couverte par les cellules au cours du temps.
- une évaluation locale des propriétés de migration des cellules. Les trajectoires des cellules sont déterminées par tracking manuel, et d'autres propriétés telles que les degrés de cohésion ou d'étalement sont estimées selon une échelle sommaire (par exemple : très cohésif / cohésif / peu cohésif).

Si les expériences de criblage génomique aux ARN interférents (siRNA) sont maintenant réalisées à haut-débit par des automates, l'analyse des tests de motilité reste partiellement manuelle et subjective et constitue donc un frein à l'identification fonctionnelle des gènes impliqués dans la migration.

La méthode AVeMap consiste à calculer les champs de vitesse par PIV, puis à fournir des paramètres quantitatifs de la migration (orientation et vitesse de la

2. **A**utomated **Ve**locity **Map**ping of migrating cell populations (Cartographie automatisée de la vitesse de migration d'une population de cellules).

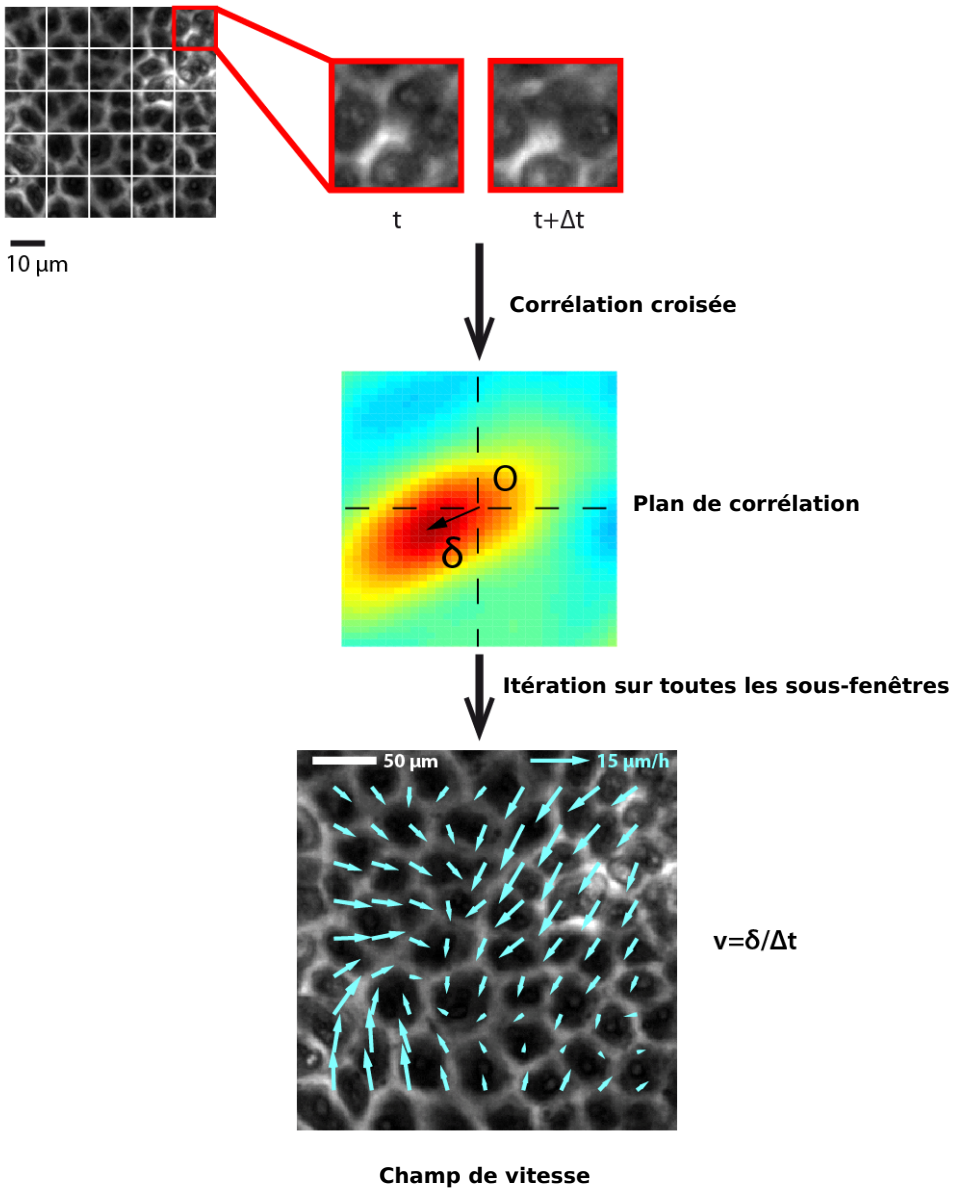

Figure 2.28 – L'image est partagée en plusieurs sous-fenêtres. La corrélation croisée de chaque sous-fenêtre extraite de l'image à l'instant t avec la même sous-fenêtre extraite de l'image à instant $t + dt$ est calculée. La position du maximum du corrélation est repérée avec une résolution inférieure au pixel, et définit le déplacement moyen entre les deux sous-fenêtres. La vitesse est calculée comme le rapport de ce déplacement sur l'intervalle de temps dt entre deux images succesives. L'opération est répétée sur toutes les sous-fenêtres de l'image, puis sur toutes les images de la vidéo jusqu'à obtenir le champ de vitesse complet $\vec{u}(x, y, t)$

migration) et de leur évolution dans l'espace et dans le temps. Cette méthode permet donc de rapidement classer de manière automatisée un nombre très important d'expériences de migration selon des critères objectifs.

On trouvera l'article présentant cette méthode en annexe A.3.

2.4.4 Analyse statistique des données

Le traitement de surface présenté en 2.1 permet de réaliser un grand nombre d'expériences en parallèle. À partir des images traitées avec les méthodes présentées ci-dessus, nous extrayons certaines grandeurs comme des distances, des temps, ou des vitesses. Nous travaillons donc à chaque fois sur les moyennes. C'est une des forces de notre approche que de pouvoir réaliser plusieurs dizaines d'expériences parfaitement identiques et donc de pouvoir définir des comportements moyens (ainsi que les fluctuations par rapport à cette moyenne). L'erreur reportée est, suivant les cas, soit la déviation standard (DS), soit l'erreur sur la moyenne (ESM), soit l'intervalle de confiance à 95% (IC95). La méthode est précisée à chaque fois.

3

Résultats et discussions

3.1 Motifs adhésifs circulaires

Depuis les expériences pionnières d'Abercrombie et Heaysman (1953), de nombreux travaux se sont penchés sur les comportements cellulaires au sein d'un épithélium en croissance. Il apparaît en particulier que les cellules épithéliales migrent en restant cohésives, cette cohésion étant en partie responsable de l'organisation spatiale des mouvements. Ainsi la longueur de corrélation des vitesses dans un épithélium de MDCK est de l'ordre de 100 µm, soit environ 10 cellules (Petitjean *et al.*, 2010). De même, la prolifération a été étudiée dans le cas d'un îlot en expansion libre (Puliafito *et al.*, 2012).

Nous proposons ici d'étudier la migration et la prolifération d'un épithélium confiné spatialement, afin de comprendre comment les cellules s'adaptent aux conditions aux limites imposées par l'environnement.

Nous avons choisi de confiner les cellules dans des motifs adhésifs de géométrie circulaire (figure 3.1) de diamètre variable (de 50 µm à 400 µm), et nous analysons la migration et la compaction cellulaire au cours du temps. La géométrie circulaire simplifie l'analyse : la symétrie par révolution permet en effet de ne considérer que la dépendance radiale des grandeurs telles que la vitesse de migration ou la densité de cellules.

L'expérience se déroule de la façon suivante : nous ensemençons les cellules sur les motifs adhésifs, et nous les laissons adhérer et proliférer pendant plusieurs jours. Nous constatons tout d'abord que la géométrie du motif adhésif est respectée : les cellules n'adhèrent jamais sur les zones anti-adhésives, même plusieurs semaines après l'ensemencement, quelle que soit la taille du motif adhésif circulaire (voir figure 3.2).

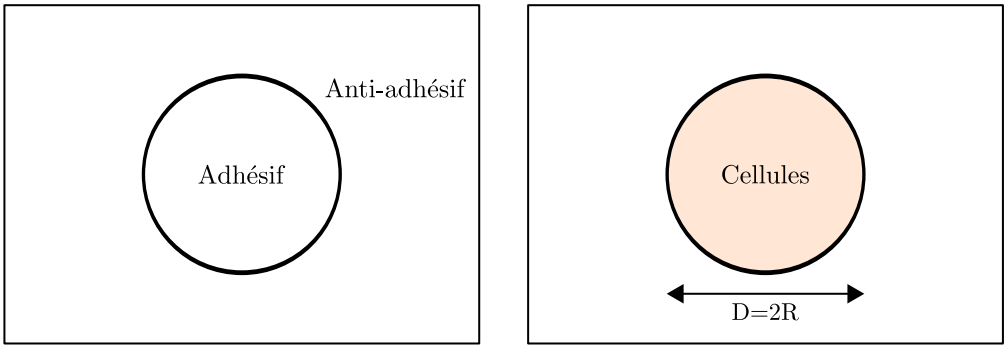

Figure 3.1 – Le motif adhésif circulaire (diamètre D) est entouré d'une région anti-adhésive. Les cellules sont ensemencées sur la région adhésive.

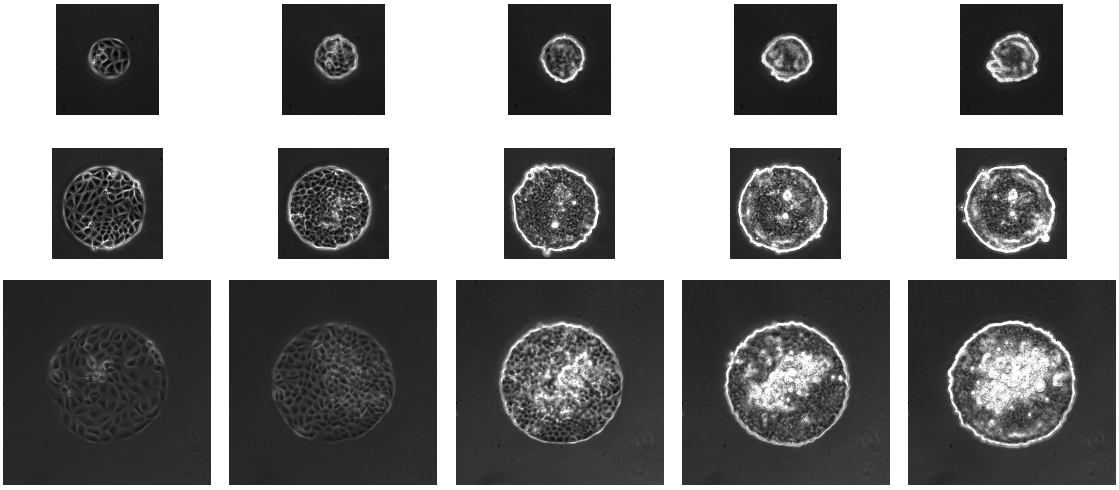

Figure 3.2 – Evolution temporelle des cellules au sein de motifs adhésifs circulaires, de diamètres (de haut en bas) de 100 µm, 200 µm, et 300 µm, aux instants (de gauche à droite) t=0h, t=15h, t=30h, t=45h, et t=60h après la confluence. Les tâches blanches visibles au centre du motif de 300 µm de diamètre à partir de 30h sont des cellules éjectées de la monocouche. Ce point est discuté au paragraphe 3.1.2.2.

Nous décrivons la croissance cellulaire sur le substrat spatialement limité en 4 étapes (une vidéo est disponible en ligne, l'adresse est précisée en annexe A.2.1) :

1. Les cellules individuelles ou des agrégats de quelques cellules (jusqu'à 10 cellules) sont déposés sur le substrat adhésif et y adhèrent (l'adhésion est complète 2 heures après l'ensemencement).
2. Pendant 10 à 20 heures, les cellules se divisent et migrent sur le substrat adhésif, formant ainsi des îlots de cellules qui finissent par remplir tout l'espace disponible. Lorsque l'îlot ainsi formé recouvre toute la partie adhésive, nous considérons que les cellules sont à «confluence» (il n'y a alors plus de trou dans la monocouche de cellules).
3. Après confluence, les cellules continuent à se déplacer et à se diviser. Cependant, la vitesse de migration et le taux de division diminuent à mesure que les cellules se densifient.
4. Environ 2 jours après la confluence se forme un «bourrelet» périphérique : les cellules au bord de la zone adhésive ne forment plus une monocouche mais un empilement tridimensionnel désordonné. Ce bourrelet est stable, composé de cellules vivantes, adhérant les unes aux autres, et perdure aussi longtemps que dure l'expérience (c'est-à-dire aussi longtemps que la subsistance de la culture cellulaire est assurée, notamment par renouvellement du milieu de culture). Il a été observé jusqu'à 3 semaines après sa formation.

3.1.1 Description du bourrelet

Comme évoqué précédemment, le bourrelet se forme au temps long à la périphérie de l'îlot au dessus d'une certaine densité de cellules. Les cellules au centre de l'îlot conservent principalement une organisation en monocouche (environ 20 µm de hauteur). La hauteur du bourrelet est de l'ordre de 30 à 50 µm et sa largeur est d'environ 40 µm. La taille d'une cellule dans le bourrelet est typiquement de 10 µm de diamètre. Un bourrelet peut donc être constitué d'un amas de plus de 5 cellules sur sa section.

La figure 3.3 montre une coupe transversale d'un îlot avec un bourrelet périphérique.

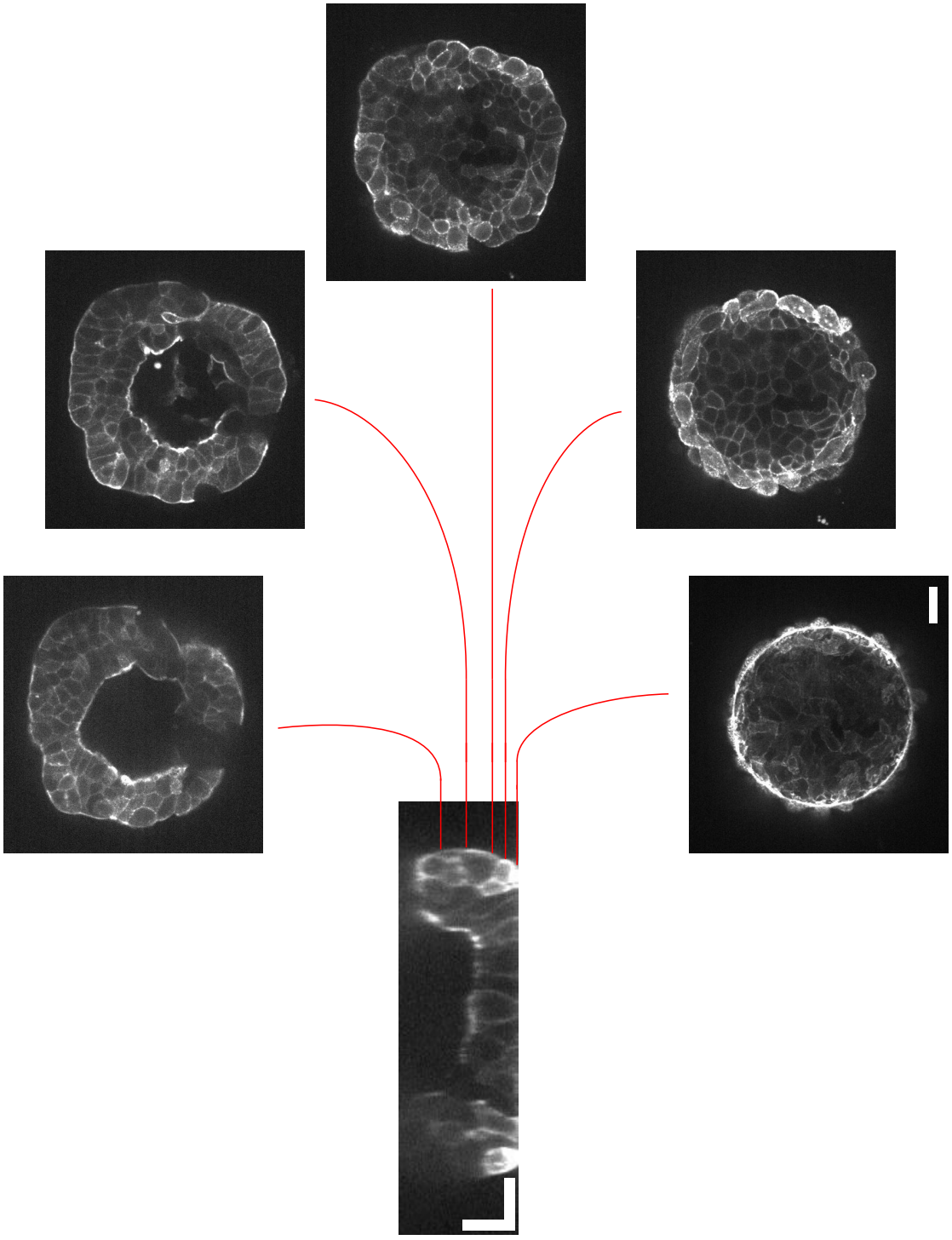

Figure 3.3 – Coupe transversale (xz) d'un îlot de 100 µm de diamètre et du bourrelet périphérique et 5 images (xy) à 5 hauteurs différentes (0 µm, 5 µm, 10 µm, 20 µm et 30 µm). Les cellules sont des cellules MDCK marquées Life-Act GFP (rendant visible l'actine filamenteuse), imagées par microscopie confocale à disque rotatif (objectif 40x). Barre = 20 µm.

La figure 3.4 représente des coupes transversales dans différentes situations :

(a) Une cellule unique étalée sur un motif adhésif de 50 µm de diamètre. La hauteur de la cellule est de 10 µm.

(b) Une monocouche sur un substrat adhésif. La hauteur moyenne est de l'ordre de 15 µm. Des cellules reposent sur la monocouche, sans y adhérer. Ces cellules ont été éjectées de la monocouche.

(c,d,e) Sur un domaine de 50 µm de diamètre, la largeur du bourrelet est telle qu'il recouvre tout le motif circulaire. Dans ces conditions, les cellules ne s'organisent pas du tout en monocouche, mais forment un assemblage désordonné de 2 ou 3 cellules d'épaisseurs.

(f,g) Deux exemples de bourrelets de hauteurs différentes (30 µm pour (f), 40 µm pour (g) sur des îlots de 250 µm de diamètre).

(h,i) Parfois, à l'intérieur du bourrelet se forme une cavité d'une taille de l'ordre de 5 µm (indiqué par la flèche rouge).

(j,k) L'intérieur de l'îlot est habituellement une monocouche. Cependant, des structures tridimensionnelles (indiquées par des flèches bleues) sont parfois visibles à l'intérieur de l'îlot (à l'écart du bourrelet). Leur taille et leur structure sont similaires à celles du bourrelet.

La formation de structures tridimensionnelles à partir de cellules MDCK en culture sur un substrat plan est surprenante, puisque ces cellules sont habituellement considérées comme des épithéliums bidimensionnels modèles. Rappelons néanmoins que la lignée MDCK est issue d'un tubule rénal (Herzlinger *et al.*, 1982). De fait, ces cellules cultivées dans un gel ont la capacité de former des structures tridimensionnelles telles que les cystes et les tubules. (McAteer *et al.*, 1986). Les cystes sont des vésicules formées d'une couche de cellules entourant un fluide («lumière»). Ils sont formés par la polarisation de cellules au sein d'un agrégat. La taille maximale des cystes (de quelques microns à quelques millimètres) dépend de la densité initiale de cellules et de la composition du milieu de culture. Les tubules se forment *in vitro* à partir de cystes après stimulation par des hormones de croissance (Bryant et Mostov, 2008).

Les cellules constituant les cystes ou les tubules sont polarisées : dans le cas d'une culture dans un gel, la face apicale est orientée vers l'intérieur de la structure, faisant face à la lumière, comme c'est également le cas dans les tubules et les kystes rénaux. La face basale est orientée vers l'extérieur, en contact avec le gel. La polarisation inverse (apical vers l'extérieur et basal vers l'intérieur) concerne les

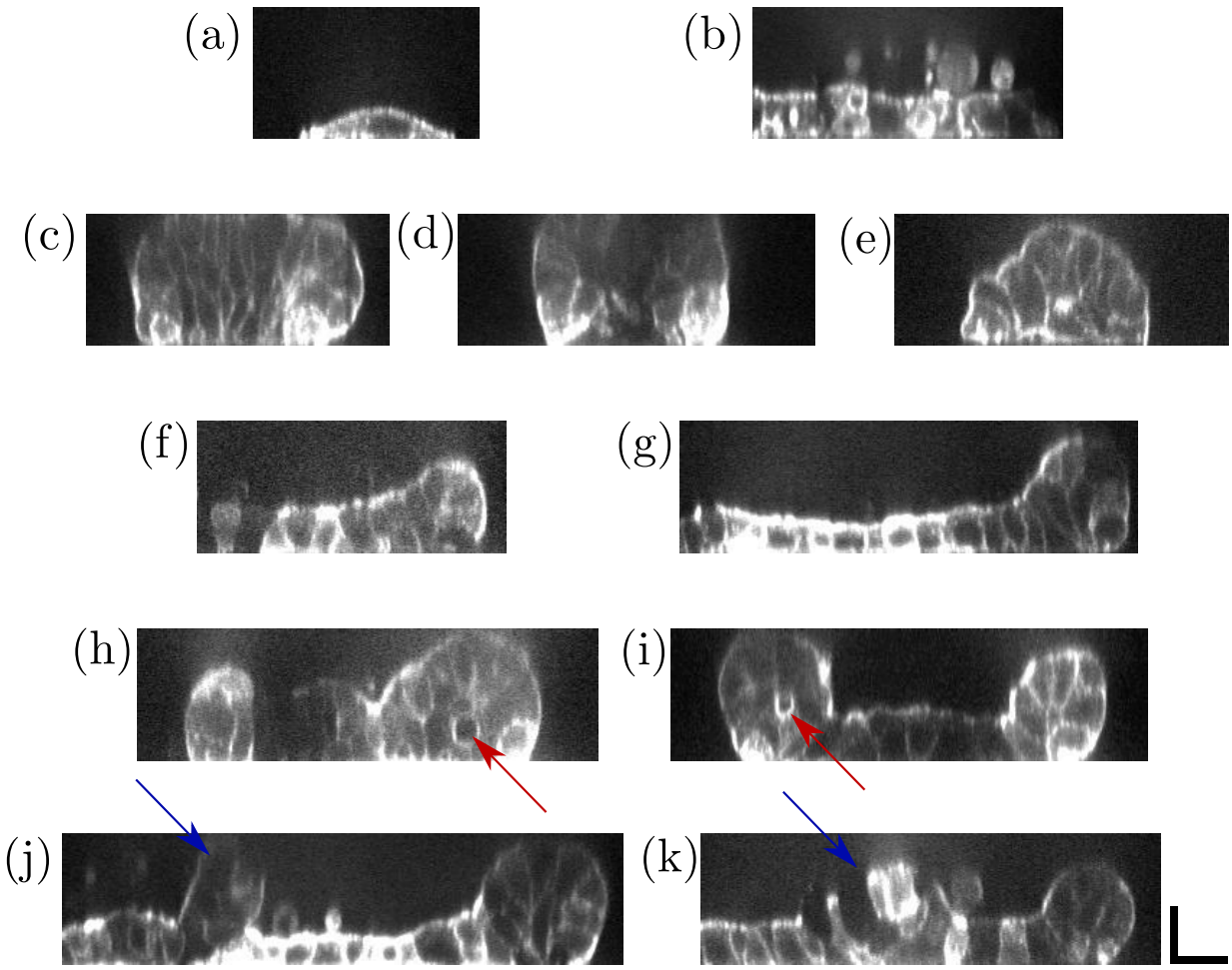

Figure 3.4 – Coupes transversales (xz) d'îlots dans différentes situations. Voir le texte pour les détails. Barres = 20 µm.

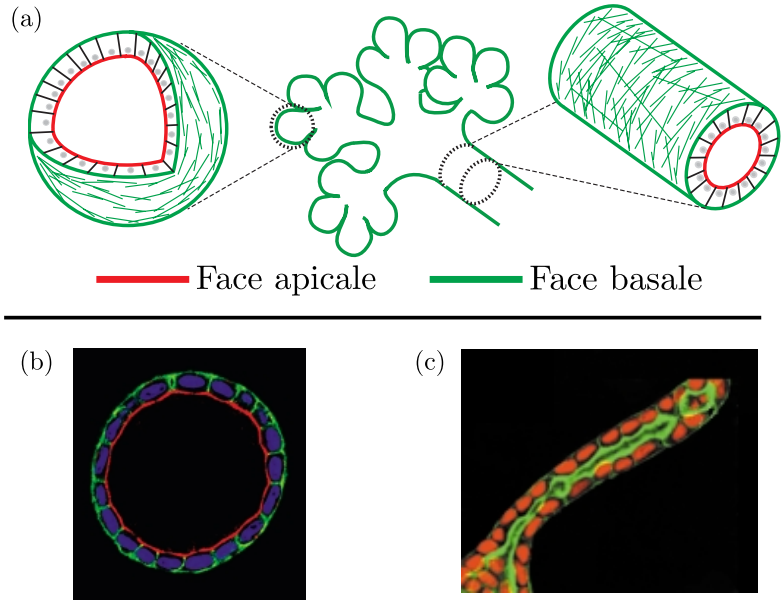

Figure 3.5 – (a) Schéma d'un tissu épithélial rénal, constitué d'un réseau de tubules, débouchant sur des cavités. (b) Cyste formée de cellules MDCK, après 12 jours de développement dans un gel. Le pôle apical est marquée avec l'actine (rouge), les faces latérales et basales avec p58 (vert) et les noyaux en bleu. (c) Tubule formé de cellules MDCK, à partir d'un cyste traité par le facteur de croissance hepatocytaire. L'actine est marquée en vert, les noyaux en rouge. (a) d'après Wang *et al.* (2011), (b,c) d'après O Brien *et al.* (2002)

cystes obtenus à partir d'agrégats de cellules en suspension dans un milieu liquide (Grant *et al.*, 2006).

Ici, les cellules MDCK prolifèrent sur une lame de verre et conservent une structure de monocouche. Mais à la périphérie se forme une structure tridimensionnelle qui n'est pas sans rappeler les premières étapes de la formation des cystes et tubules. De plus, dans certains cas, une «lumière» peut être distinguée au sein du bourrelet (figures 3.4h et i), suggérant l'acquisition d'une polarité bien définie.

Ces observations sont à rapprocher de résultats très récents montrant la formation de tubules lorsque des cellules endothéliales sont confinées sur des pistes adhésives de 10 à 50 µm. Les molécules adhésives jouent ici un rôle actif dans cette angiogénèse (Lei *et al.*, 2012).

Le confinement géométrique d'un épithélium permet donc de faire coexister une monocouche avec une structure tridimensionnelle pouvant aller jusqu'à des précurseurs de tubules, sans utilisation de facteur de croissance ni de molécules d'adhésion spécifique.

La suite de cette partie s'organise de la façon suivante. Dans un premier temps, nous décrivons la dynamique de prolifération et de compaction des cellules dans le

motif adhésif, ainsi que la formation du bourrelet périphérique. Dans un deuxième temps, nous nous pencherons sur les mouvements des cellules dans la monocouche confluente.

3.1.2 Analyse de la prolifération cellulaire

Les cellules déposées sur un motif circulaire prolifèrent d'abord librement, c'est-à-dire que les cellules ne sont pas limitées par les zones anti-adhésives. Après un certain nombre de divisions, les cellules remplissent complètement le motif circulaire (c'est la confluence). Ensuite chaque division contribue à la densification de l'îlot. Comme nous l'avons déjà évoqué, à partir d'une certaine densité se forme un bourrelet de cellules à la périphérie du motif circulaire.

3.1.2.1 Densification de l'îlot

Sont représentées en figure 3.6 le nombre total de cellules sur le motif ainsi que le nombre de cellules à l'intérieur du motif. La différence entre ces deux valeurs correspond aux cellules solidaires de la monocouche à l'extérieur du motif. Ce ne sont pas des cellules qui adhèrent à la lamelle de verre en dehors du motif, mais des cellules du bourrelet qui «débordent» du motif, et n'ont donc pas d'interaction adhésive avec le substrat (figure 3.7). L'apparition de ces cellules en «dehors» du motif correspond donc à l'apparition du bourrelet.

L'îlot remplit entièrement le motif de 50 µm de diamètre avec environ 10 cellules. La densité est alors de 5.10^5 cellules/cm^2 (taille moyenne des cellules = 200 µm^2). D'après la figure 3.6, les cellules commencent donc à «déborder» lorsqu'elles sont environ 20 sur ce même motif. La densité correspondante est de 10^6 cellules/cm^2 (taille moyenne des cellules = 100 µm^2).

A partir de l'évolution du nombre de cellules sur le motif, nous pouvons calculer le temps de doublement avant la stabilisation du nombre de cellules, soit avant t=60h (figure 3.8a). Il passe de 15h à 50h, à mesure que l'îlot se densifie. Tracé en fonction de la taille moyenne des cellules (figure 3.8b), le temps de doublement montre clairement une transition autour de 150 µm^2. Pour des tailles supérieures à 150 µm^2, le temps de doublement est stable, et vaut entre 15h et 20h. Pour des tailles inférieures à 150 µm^2, le temps de doublement est bien plus long. Cette relation de dépendance entre le temps de doublement et la taille des cellules est en accord avec Puliafito *et al.* (2012) (figure 1.19) (dans cette étude, les cellules MDCK prolifèrent sur un substrat sans limite, et l'analyse statistique est réalisée

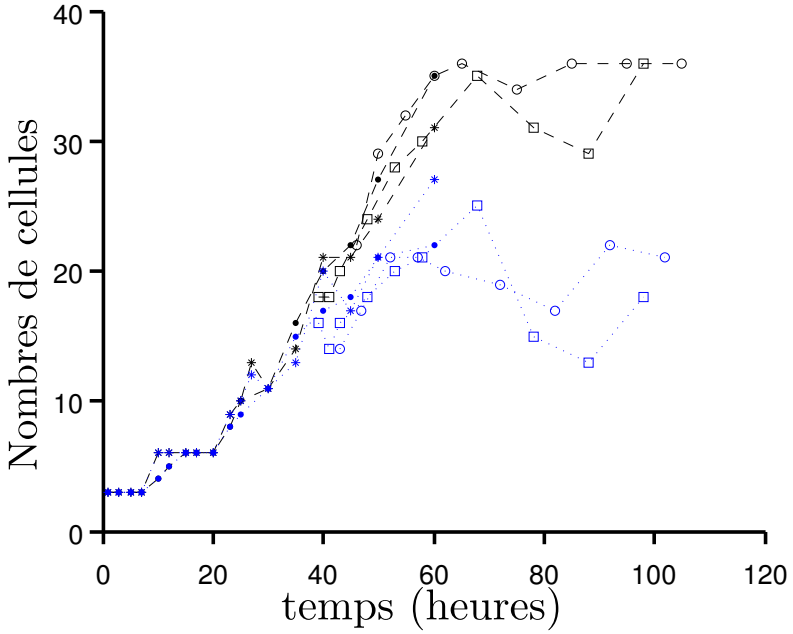

Figure 3.6 – Nombre de cellules au cours du temps sur un motif circulaire de 50 µm de diamètre. Chaque symbole représente une expérience différente. Courbes noires : nombre total de cellules comptabilisées juste au dessus de la lamelle de verre. Courbes bleues : nombre de cellules à l'intérieur du motif circulaire. Les fluctuations importantes sur le nombre de cellules après t=60h sont dues à la difficulté de repérer les cellules : les cellules sont très denses et ont perdu beaucoup de leur fluorescence depuis le début de l'expérience. Ces courbes proviennent de quatre expériences différentes. La densité est évaluée en utilisant les outils morphomathématiques décrit en 2.4.2.11.

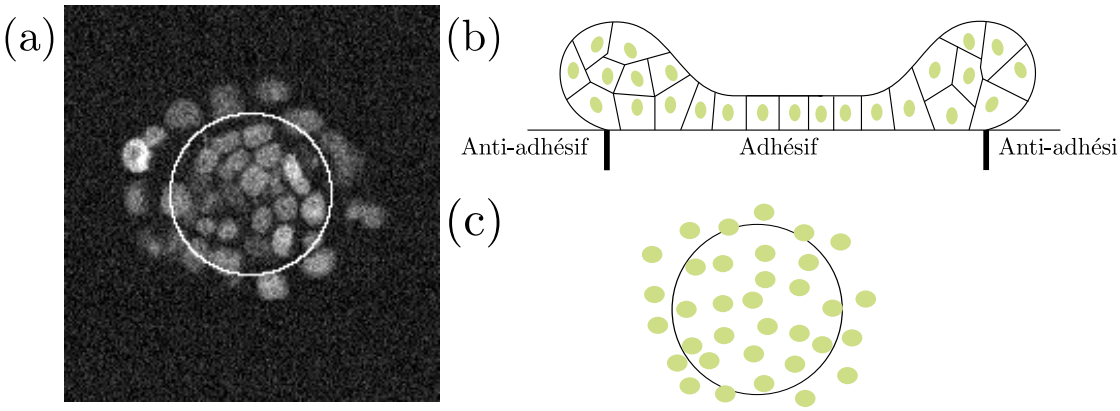

Figure 3.7 – (a) Image de microscopie confocale à disque rotatif de cellules MDCK Histone-GFP sur un motif circulaire de diamètre 50 µm. La limite du bord adhésif est représenté par la ligne blanche. (b) Réprésention schématique en vue transversale du bourrelet. Le trait vertical noir représente la frontière la région adhésive et la région anti-adhésive. (c) Représentation schématique des noyaux des cellules, vue de dessus. Les cellules du bourrelet apparaissent à l'extérieur du motif adhésif, alors qu'elles n'y adhèrent pas.

sur le centre de l'îlot qui se densifie au cours du temps).

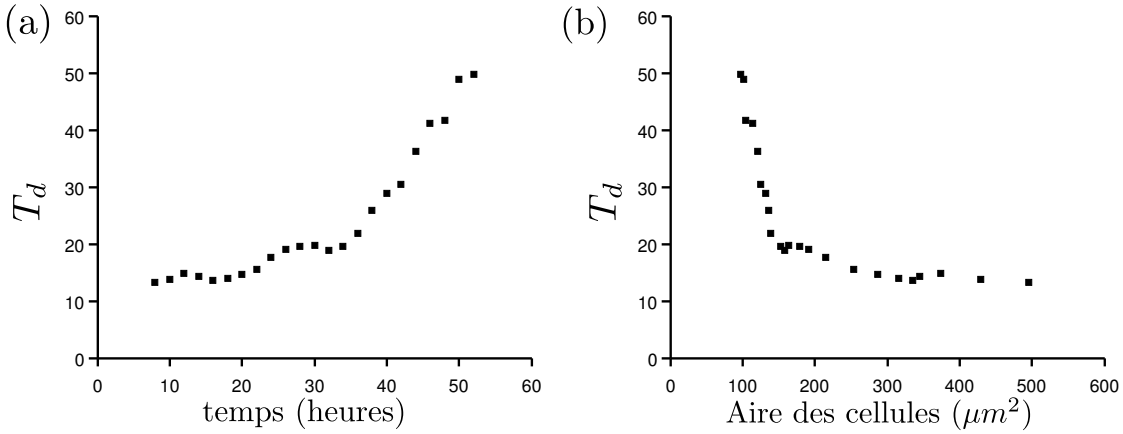

Figure 3.8 – Evolution du temps de doublement en fonction du temps (a), et de l'aire moyenne des cellules (b). Nous pouvons noter une transition dans l'évolution du temps de division à A=150 μm^2, en accord avec Puliafito *et al.* (2012).

Remarquons que le temps de doublement est le temps nécessaire pour doubler le nombre de cellules dans l'îlot. Ce n'est pas nécessairement un temps de division. En effet, les cellules peuvent être éjectées de la monocouche après division ou bien incluses dans le bourrelet. Ces divisions ne contribuent alors pas à la densification de l'îlot.

3.1.2.2 Les divisions cellulaires

Même si le taux de division décroît quand la densité augmente, les cellules continuent toujours de se diviser à un taux très faible même à très haute densité (10^6 cellules/cm^2). Soit les cellules filles contribuent à densifier encore l'îlot, soit l'une des deux cellules filles est éjectée de la monocouche. Les cellules éjectées restent sur les cellules sous-jacentes sans y adhérer complètement (un simple rinçage suffit à les chasser). Ces cellules apparaissent blanches [1] sur les images de contraste de phase (figure 3.2, au centre du motif de 300 µm, pour t=60h.).

Nous remarquons d'ailleurs sur cette même figure qu'une bande de 100 µm de large autour du motif adhésif est dépourvue de cellules «éjectées». Il est probable que le bourrelet absorbe une partie de ces divisions.

La figure 3.9 montre que dans un premier temps, les cellules s'incorporent dans la monocouche après division. Elles participent au nombre total de cellules dans l'îlot. Après un certain nombre de divisions cependant, le nombre de cellules dans

1. Les cellules hors de la monocouche sont très sphériques et diffractent beaucoup la lumière. Pour cette raison elles apparaissent blanc en microscopie à constraste de phase.

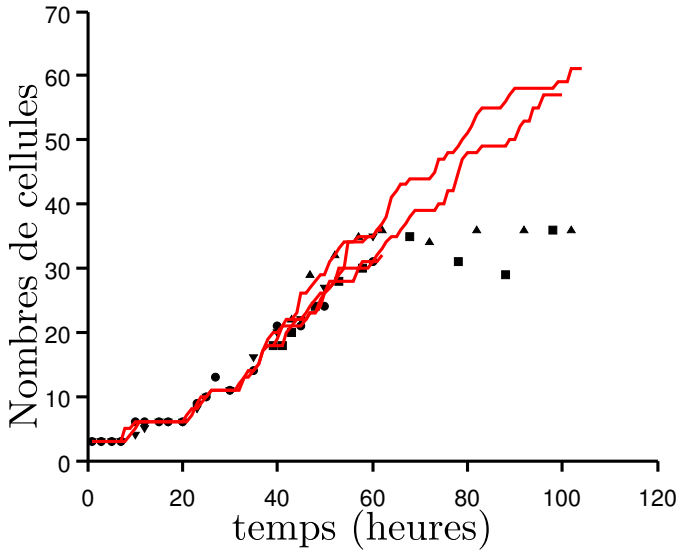

Figure 3.9 – Les points noirs représentent le nombre de cellules présentes sur le substrat (à l'intérieur et à l'extérieur du motif circulaire (diamètre 50 µm), soit les cellules de la monocouche ainsi que les cellules de la base du bourrelet, voir la figure 3.7). Les courbes rouges correspondent à l'intégration du nombre de division, soit le nombre de cellules produites par les divisions. Quatre expériences différentes sont superposées (triangles vers le haut, triangles vers le bas, ronds et carrés). La croissance du nombre de cellules s'effectue par paliers au début de l'expérience. Cet effet est dû à la synchronisation des divisions des cellules dans le temps.

la monocouche est stable alors que les divisions continuent. Les cellules sont soit éjectées de la monocouche, soit participent à la formation du bourrelet. L'instant où les cellules ne participent plus à la monocouche après division correspond à la densité de 10^6 cellules/cm^2.

Cela confirme la figure 3.8 : le temps de doublement du nombre de cellules correspond au temps de division pour t $<$ 60h. Remarquons que dans Puliafito *et al.* (2012), les cellules poussent sur la face inférieure d'une lamelle de verre : les cellules éjectées de la monocouche tombent dans le milieu de culture et ne sont pas visible à l'image. De plus, la culture est rincée régulièrement. Pour ces raisons, la distinction entre temps de doublement et temps de division n'est pas faite. Nos résultats complètent donc cette étude en montrant que les cellules continuent à se diviser même à haute densité. Mais celles-ci étant éjectées, la densité cellulaire dans la monocouche n'évolue plus.

Nous montrons ici que temps de division et temps de doublement coïncident à densité inférieure à 10^6 cellules/cm^2, mais plus à densité supérieure. En effet, les cellules continuent à se diviser dans la monocouche, mais sans que cela ne modifie la densité cellulaire.

La répartition spatiale des divisions au cours du temps sur un îlot de 50 µm de

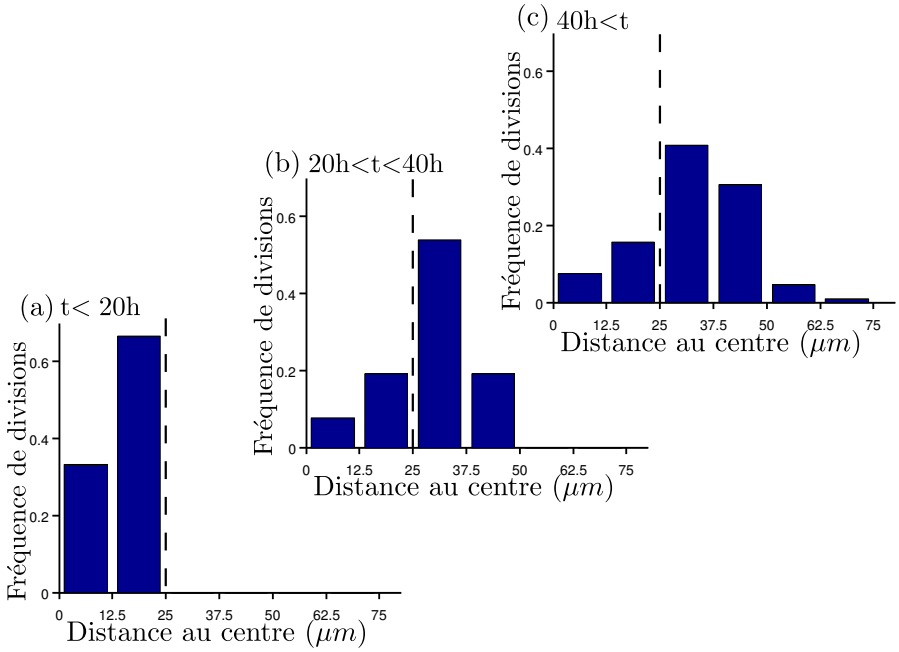

Figure 3.10 – Fréquence des divisions (nombre de divisions dans un bin / nombre total de divisions dans l'îlot) en fonction de la distance au centre, pour 3 périodes : avant 20h, soit avant la confluence, entre 20h et 40h, soit la densification, et après 40h, soit la formation du bourrelet. Diamètre du motif = 50 µm. La ligne pointillée représente la position du bord du motif, à $R = 25$ µm.

diamètre est représentée en figure 3.10. Nous pouvons remarquer que les cellules au cœur de l'îlot se divisent encore même à forte densité (t>40h). Et nous voyons également que les cellules du bourrelet se divisent également alors qu'elles n'adhèrent pas au substrat (R>25µm). Elles se divisent même davantage dans le bourrelet qu'au centre de l'îlot. Enfin, la dépendance du nombre de divisions en fonction de la distance au centre est au premier ordre linéaire jusqu'au bord du motif adhésif (R<25µm), figurant une répartition homogène des divisions dans l'îlot.

3.1.2.3 Influence de la taille du motif circulaire

La densification ne dépend pas de la taille du domaine. Les observations effectuées sur les domaines de 50 µm s'appliquent aux autres tailles (figure 3.11) : prolifération libre jusqu'à la confluence, ensuite la prolifération est ralentie jusqu'à atteindre la densité de 10^6 cellules/cm^2. A cette densité, les cellules se divisent encore mais à un très faible taux.

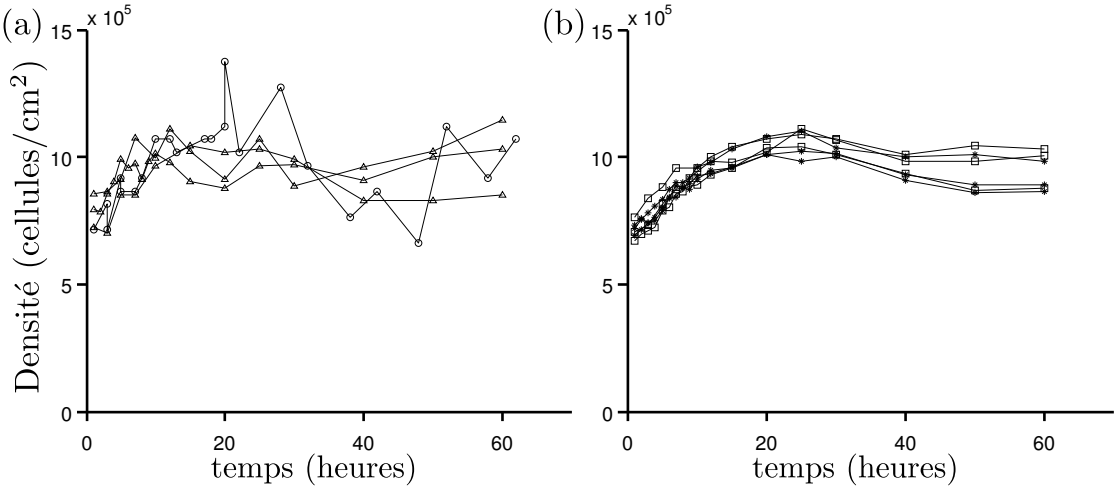

Figure 3.11 – Densité de cellules à l'intérieur de motifs circulaires de diamètre (a) 50 µm (○) et 100 µm (△), (b) 250 µm (∗) et 300 µm (□). Les courbes pour les faibles rayons sont très bruitées du fait du faible nombre de cellules (entre 20 et 40 cellules). La date t= 0 est telle que la densité initiale est de l'ordre de 6.10^5 cellules/cm^2. La baisse de la densité à partir de t=20h est due à la difficulté de détecter les cellules à haute densité. En réalité, la densité est stable à partir de t=20h.

3.1.3 Dynamique de la formation du bourrelet de cellules

Le bourrelet périphérique apparaît quand la densité atteint environ 10^6 cellules/cm^2. Il se forme en quelques dizaines d'heures.

Les figures 3.12 et 3.13 montrent le profil tridiensionnel du bourrelet au cours du temps. Les zones épaisses au centre de l'îlot sont des cellules qui ont été éjectées de la monocouche et qui stagnent sur les cellules sous-jacentes. Elles ne représentent pas un épaississement de la monocouche au centre de l'îlot. Au contraire, les cellules restent organisées en monocouche sauf à la périphérie.

À partir de l'analyse statistique des divisions cellulaires dans un îlot confiné (paragraphe 3.1.2.2), nous pouvons interpréter la formation du bourrelet comme l'agglomération de cellules surnuméraires. A densité élevée (10^6 cellules/cm^2) les cellules situées loin du bord du motif sont éjectées de la monocouche et perdent généralement le contact avec les cellules sous-jacentes. Les cellules situées près du bord ne sont pas éjectées : elles adhèrent toujours aux cellules voisines, mais certaines perdent le contact avec le substrat et se placent au dessus de la monocouche, ce qui initie la formation du bourrelet et sa croissance.

Précisons que des structures similaires au bourrelet se forment parfois au sein de la monocouche (figures 3.4j et k).

La figure 3.14 montre que la hauteur du bourrelet croît linéairement avec le temps, alors que sa largeur est stable (après la période de formation). Donc la sec-

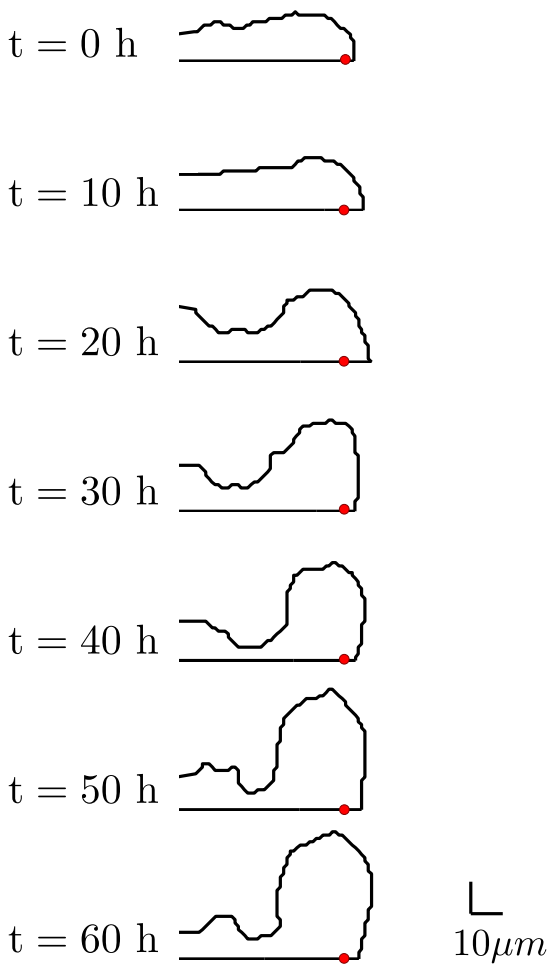

Figure 3.12 – Evolution du profil tridimensionnel du bourrelet au cours du temps, sur un motif de 100 µm de diamètre. Le profil est obtenu par projection circulaire d'une pile d'images échantillonnant l'épaisseur du bourrelet ($\Delta z = 5\mu m$ entre chaque image). Les images sont acquises par microscopie confocale à disque rotatif (20x). Les cellules utilisées sont marquées Histone-mCherry. Le point rouge (•) représente la limite de la région adhésive. Notons que les cellules n'adhèrent pas à la zone non-adhésive, sous le bourrelet. Le contour du bourrelet rejoint toujours le point rouge (voir les coupes transversales de la figure 3.4).

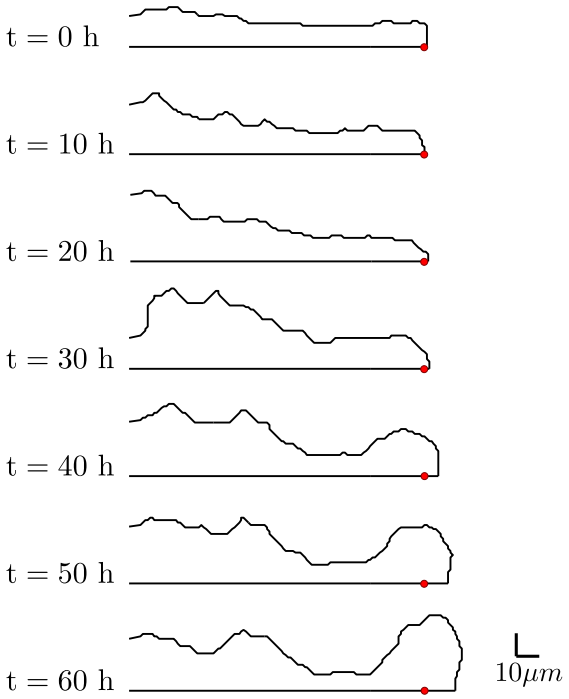

Figure 3.13 – Evolution du profil tridimensionnel du bourrelet au cours du temps, sur un motif de 250 µm de diamètre.

tion du bourrelet (hauteur × largeur) croît également linéairement avec le temps. Le bourrelet croît par l'apport de nouvelles cellules, créées par des divisions au sein même du bourrelet.

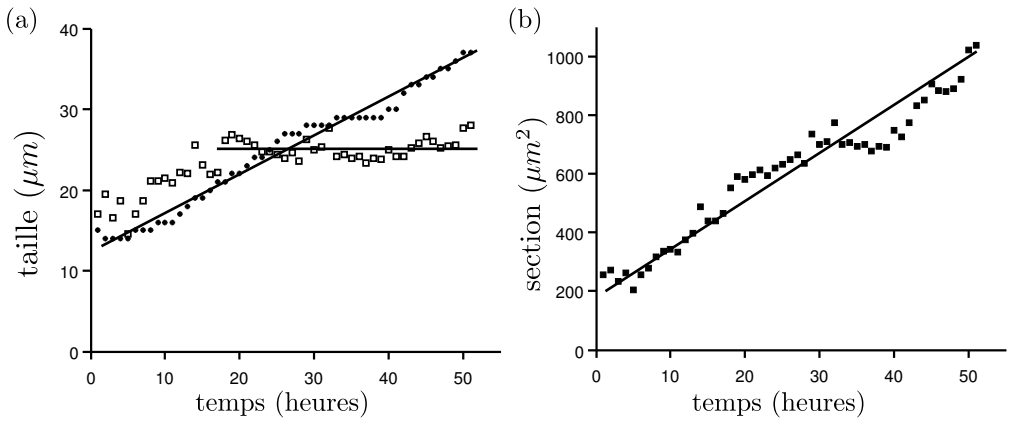

Figure 3.14 – (a) Hauteur (rond) et largeur (carré) du bourrelet présenté figure 3.12 (rayon 50 µm). (b) Section du bourrelet (hauteur × largeur).

La vitesse de croissance du bourrelet est de 14 µm²/h sur sa section, soit un taux de croissance volumique de 4400 µm³/h sur toute la périphérie (R=50 µm). La figure 3.15 représente une estimation du nombre de cellules obtenues par division dans le bourrelet. Le taux de croissance cellulaire est de 0.5 cellules/h (ajustement

linéaire pour t>25h). En deux heures, le bourrelet augmente de 8800 μm^3 et d'une cellule. Nous pouvons donc considérer les cellules du bourrelet comme des sphères de rayon 13 µm, ce qui correspond en ordre de grandeur à la taille observée dans les expériences (figure 3.4).

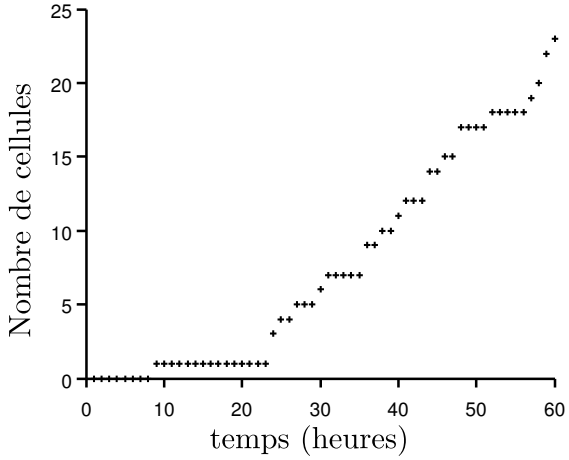

Figure 3.15 – Nombre de cellules nées de divisions dans le bourrelet, calculé comme l'intégrale du nombre de division dans le plan z=25 µm.

3.1.4 Champ de vitesse au cours de la compaction

Les déplacements au sein de la monocouche lors d'expériences de confinement des cellules dans un motif adhésif circulaire sont analysés par PIV. Elles suggèrent que le confinement suffit à induire un mouvement coordonné des cellules.

3.1.4.1 Norme de la vitesse au cours du temps

A mesure que les cellules prolifèrent, la motilité cellulaire[2] diminue. A la confluence, elle est d'environ 10 µm/h. La densité est alors entre 3.10^5 et 6.10^5 cellules/cm^2. Environ 30 à 40 heures plus tard, la vitesse se stabilise à environ 2 µm/h (figure 3.16). Pendant ce temps les cellules ont proliféré, la densité est environ de 10^6 cellules/cm^2. Une fois cette densité atteinte, les cellules se déplacent très peu. Les mouvements des cellules sont très locaux et ne traduisent pas une véritable migration active. Il s'agit majoritairement de fluctuations de faible amplitude autour d'une position d'équilibre et de réarrangements dans l'organisation des cellules, par exemple après une division.

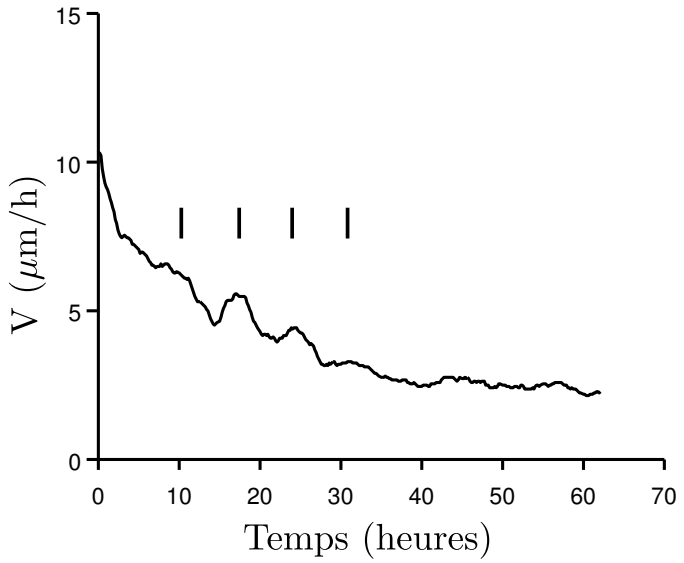

Figure 3.16 – Norme du champ de vitesse, moyenné sur tout le tissu. Motif : disque de diamètre 200 µm. Les traits noirs marquent les oscillations dans le champ de vitesse (voir paragraphe 3.1.4.3).

2. La vitesse de migration que nous mesurons est le module moyen du champ de vitesse mesurée par PIV.

3.1.4.2 Composantes radiale et orthoradiale

Nous avons vu que la vitesse moyenne des cellules diminue au cours du temps, mais cette mesure ne capture pas la diversité des mouvements cellulaires. La géométrie circulaire du confinement incite à décomposer le vecteur vitesse en une composante radiale et une composante orthoradiale.

$$\vec{\mathrm{U}} = \mathrm{U}_r \vec{e_R} + \mathrm{U}_\theta \vec{e_\theta}$$

où $\vec{e_R}$ et $\vec{e_\theta}$ sont les vecteurs unitaires dans la base polaire (figure 3.17).

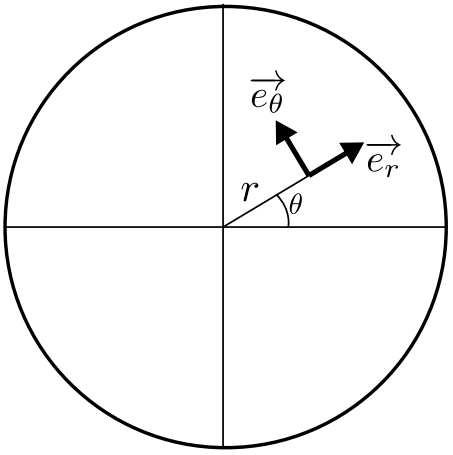

Figure 3.17 – Définition des vecteurs de la base polaire.

On peut mettre en valeur des mouvements collectifs de cellules dans la direction radiale (c'est-à-dire des cellules qui s'éloignent ou s'approchent du bord du motif adhésif) ou dans la direction orthoradiale (des cellules qui migrent parallèlement au bord).

Ainsi, la figure 3.18 montre l'évolution de la vitesse radiale U_R et de la vitesse orthoradiale U_θ au cours du temps.

Les larges variations d'amplitude de la vitesse radiale moyenne et de la vitesse orthoradiale moyenne quelques heures après la confluence sont le résultat de mouvements coordonnés à l'échelle de la zone adhésive tout entière. Par exemple, l'amplitude du champ de vitesse radial moyenné entre t=7h et t=9h est représentée en figure 3.19, et permet de mettre en évidence des régions de migration rapide (jusqu'à 7 µm/h) et des régions quasiment immobiles.

Une bonne façon de visualiser la diversité des mouvements des cellules dans l'espace et dans le temps est de représenter la vitesse radiale et la vitesse orthoradiale

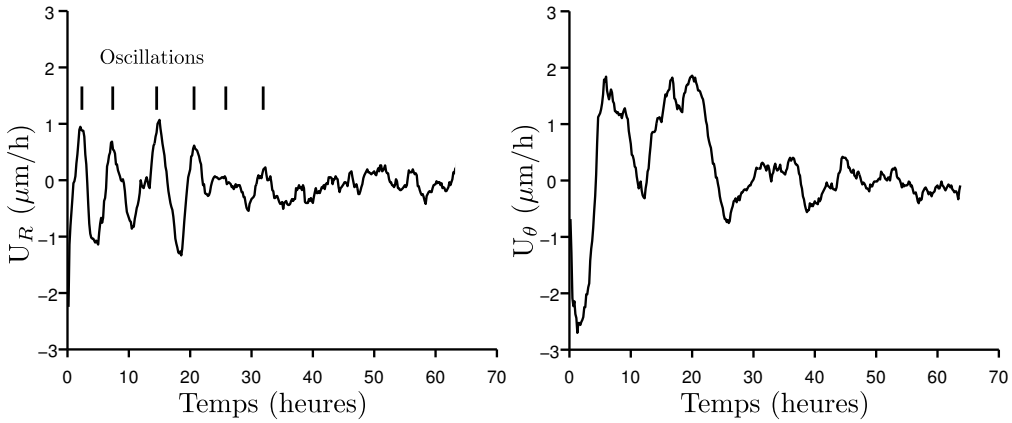

Figure 3.18 – Vitesse radiale (à gauche) et vitesse orthoradiale (à droite), moyennées sur tout le motif adhésif. Motif : disque de diamètre 200 µm. L'évolution de U_R montre pendant les 40 premières heures des oscillations, de période 7 heures environ (voir l'analyse de ces oscillations au paragraphe 3.1.4.3).

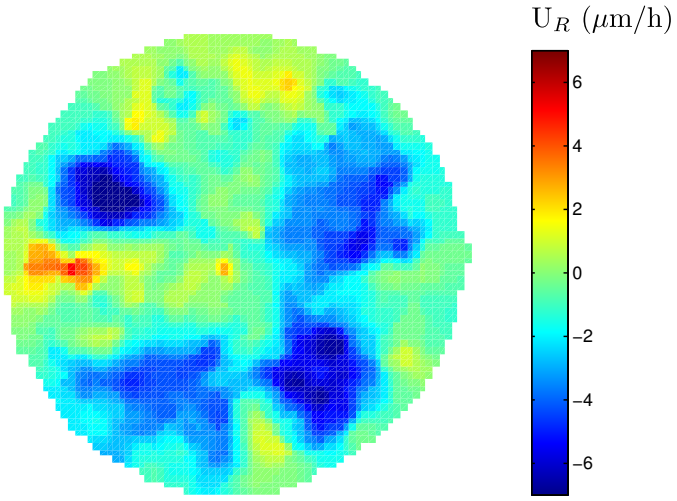

Figure 3.19 – Vitesse radiale moyennée sur une période de 2h (soit sur 13 images) entre t=7h et t=9h.

dans un diagramme spatio-temporel. On écrit les vitesses :

$$\mathrm{U}_r = \mathrm{U}_r(r,\theta,t)$$
$$\mathrm{U}_\theta = \mathrm{U}_\theta(r,\theta,t)$$

On peut calculer les valeurs moyennes de ces composantes, en moyennant soit sur r, soit sur θ :

$$\langle \mathrm{U}_r \rangle_r(\theta,t) = \frac{2}{R^2}\int_0^R \mathrm{U}_r(r,\theta,t)\, r\mathrm{d}r$$
$$\langle \mathrm{U}_\theta \rangle_r(\theta,t) = \frac{2}{R^2}\int_0^R \mathrm{U}_\theta(r,\theta,t)\, r\mathrm{d}r$$
$$\langle \mathrm{U}_r \rangle_\theta(r,t) = \frac{1}{2\pi}\int_0^{2\pi} \mathrm{U}_r(r,\theta,t)\, \mathrm{d}\theta$$
$$\langle \mathrm{U}_\theta \rangle_\theta(r,t) = \frac{1}{2\pi}\int_0^{2\pi} \mathrm{U}_\theta(r,\theta,t)\, \mathrm{d}\theta$$

Représentons ces quatre grandeurs dans le cas d'un motif de diamètre 200 µm :

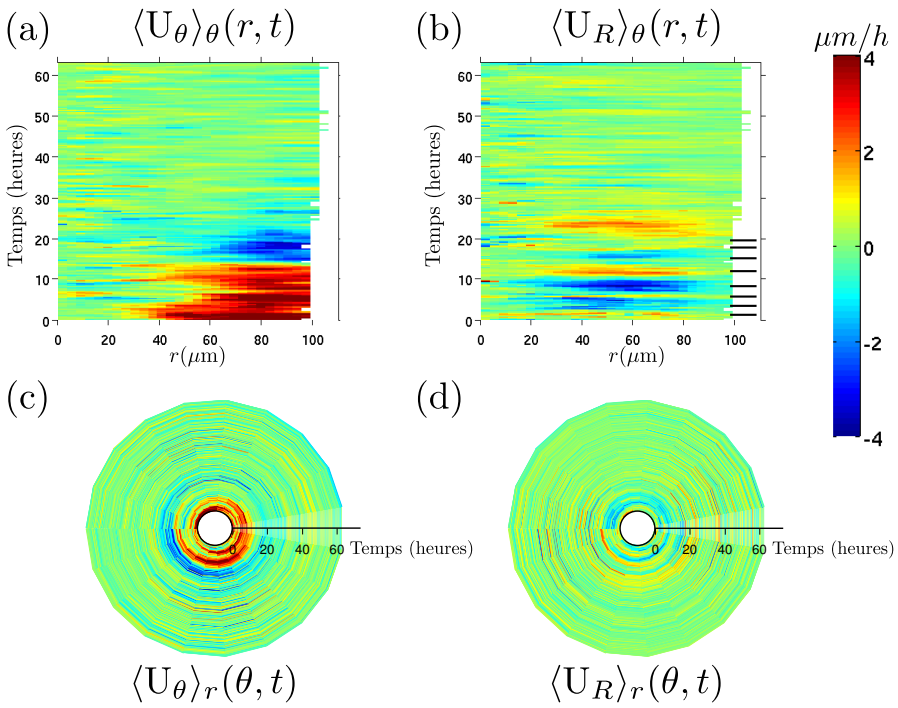

Figure 3.20 – Représentations spatio-temporelles du champ de vitesses.(a) et (b) : l'axe vertical représente le temps, l'axe horizontal représente la distance au centre du motif. (c) et (d) : pour ces diagrammes, le temps s'écoule de l'intérieur vers l'extérieur. Les traits noirs horizontaux de la figure (b) indiquent les oscillations de la vitesse radiale.

Ces quatre diagrammes méritent une description plus détaillée. Tout d'abord,

notons que les deux composantes de vitesse U_R et U_θ fluctuent beaucoup jusqu'à environ t=25h et atteignent régulièrement des valeurs élevées (de l'ordre de 4 µm/h). Puis partout les deux composantes deviennent très faibles.

(a) la vitesse orthoradiale positive puis négative montre que les cellules tournent globalement dans un sens puis dans l'autre. Cette vitesse est beaucoup plus élevée au bord de la zone adhésive qu'au centre. Nous analyserons la dépendance de $\langle U_\theta \rangle_\theta$ avec r dans le paragraphe suivant (3.1.4.3).

(b) une vitesse radiale négative signifie que les cellules migrent vers le centre du motif. Une vitesse radiale positive, au contraire, correspond aux situations où les cellules migrent vers le bord du motif. La succession des bandes horizontales rouges et bleues (signalées par des traits noirs horizontaux) indique donc une succession de mouvements des cellules vers l'intérieur et vers l'extérieur du motif.

(c) La vitesse orthoradiale est d'abord positive pour tous les angles, puis négative pour tous les angles. Cela signifie que les mouvements de rotation impliquent l'ensemble des cellules (paragraphe 3.1.4.4)

(d) On observe là encore une succession de mouvements vers l'extérieur et vers l'intérieur, mais l'amplitude de la vitesse radiale moyennée sur R est beaucoup plus faible que la même quantité moyennée sur les angles. La moyenne de la vitesse radiale sur tout le rayon ne donne que des vitesses faibles. Cela est dû au fait qu'à $r = 0$ et $r = R$ la vitesse radiale est nulle et fait diminuer la valeur de la moyenne.

Dans la suite, pour l'analyse des champs de vitesse, nous séparons les expériences en deux phases. Une première phase entre la confluence et le début de la formation du bourrelet (t<T) où les mouvements de cellules sont de grande amplitude, puis une seconde phase (t>T) où les mouvements sont beaucoup plus restreints (figure 3.16 et 3.18). Nous définissons le temps T comme le temps à partir duquel la norme de la vitesse se stabilise à environ 3 µm/h.

Le chute de la vitesse des cellules à mesure que la densité augmente est une conséquence de l'inhibition de la migration par contact. Cependant, avant que les cellules atteignent une densité telle que les mouvements soient pratiquement stoppés, leurs mouvements au sein de l'îlot sont affectés par la taille du motif adhésif. Ainsi, alors que la longueur de corrélation[3] des vitesses est de l'ordre

3. La longueur de corrélation des vitesses est qualitativement estimée comme la taille des hétérogénéités dynamiques (Angelini *et al.*, 2011) : nous identifions les vecteurs les 20% plus rapides, et nous calculons la taille des sous-régions connexes contenant ces vecteurs.

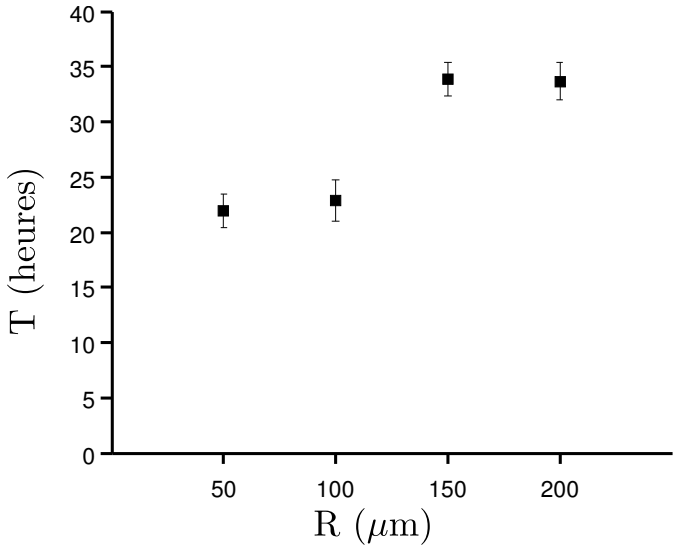

Figure 3.21 – Temps de changement de phase T, séparant la phase aux mouvements rapides (t<T) et la phase aux mouvements plus lents (t>T). Ce temps correspond au début de la formation du bourrelet. Il est mesuré à partir de la confluence.

de 100 µm (environ 10 cellules) dans le cas d'un épithélium en migration libre (Petitjean *et al.*, 2010), la longueur de corrélation est ici plus faible (de l'ordre de 50 µm). Les conditions aux limites stringentes imposent que les mouvements des cellules se fassent à une échelle plus locale.

La confinement a donc un effet direct sur les mouvements au sein de l'îlot. Regardons maintenant ces effets sur les deux modes du mouvement : les mouvements radiaux et orthoradiaux.

3.1.4.3 Influence de la taille des motifs circulaires sur la vitesse radiale

Les résultats présentés ci-dessus étaient obtenus pour une taille de motif adhésif circulaire de 200 µm de diamètre. Nous avons vu que la migration cellulaire dans une situation confinée implique des mouvements de l'ensemble des cellules. Nous répétons maintenant la même expérience avec des motifs circulaires de différentes tailles.

Dans les figures 3.22 et 3.23 sont présentés les profils de la valeur absolue de la vitesse radiale, moyennée dans le temps durant respectivement la première phase et la seconde phase, en fonction de la taille des motifs, $\langle U_r \rangle_{\theta,t}(r)$. Nous voyons que la forme du profil de vitesse radiale ne dépend pas de la taille du motif : la vitesse radiale est toujours maximale environ à la moitié du rayon du motif, et minimale à r=0 et r=R. Nous remarquons également que l'amplitude de la vitesse radiale dépend directement de la taille du motif : plus le motif est grand, plus

les cellules atteignent des vitesses radiales importantes. Enfin, les vitesses radiales sont naturellement plus faibles dans la seconde phase que dans la première phase.

t<T :

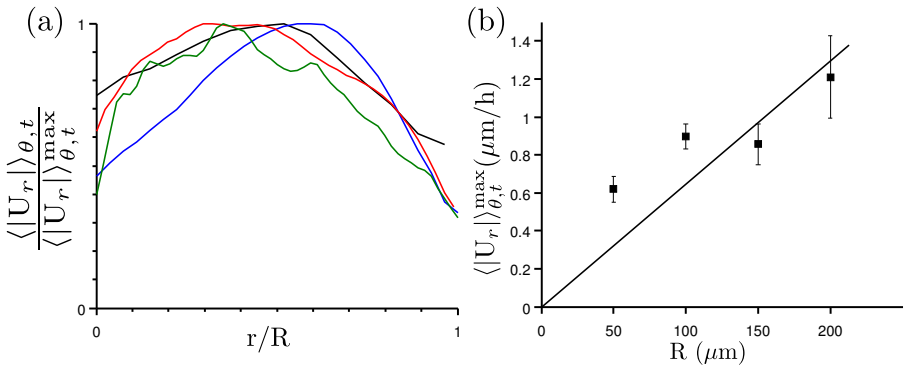

Figure 3.22 – (a) Profil radial de la moyenne temporelle (sur la durée de la première phase), de la valeur absolue de la composante radiale du champ de vitesse moyennée sur les angles, pour 4 tailles de motifs différents (Rayons 50µm (noir), 100µm (bleu), 150µm (rouge), 200µm (vert)). Les profils sont normalisés par la valeur maximale, représentée en (b). La droite noire est un repère visuel linéaire.

t>T :

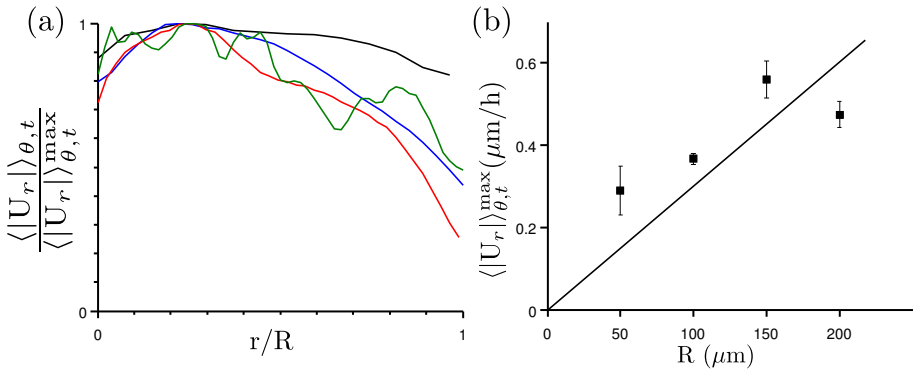

Figure 3.23 – (a) Profil radial de la moyenne temporelle (sur la durée de la seconde phase), de la valeur absolue de la composante radiale du champ de vitesse moyennée sur les angles, pour 4 tailles de motifs différents (Rayons 50µm (noir), 100µm (bleu), 150µm (rouge), 200µm (vert)). Les profils sont normalisés par la valeur maximale, représentée en (b). La droite noire est un repère visuel linéaire.

D'autre part, durant la première phase, nous remarquons que la vitesse radiale oscille avec une période bien définie (figure 3.18a). Nous pouvons compter jusqu'à 6 oscillations au cours desquelles U_R change régulièrement de signe. La période de ces oscillations mesurée par transformée de Fourier est présentée dans la figure 3.24. Elle augmente avec la taille du motif.

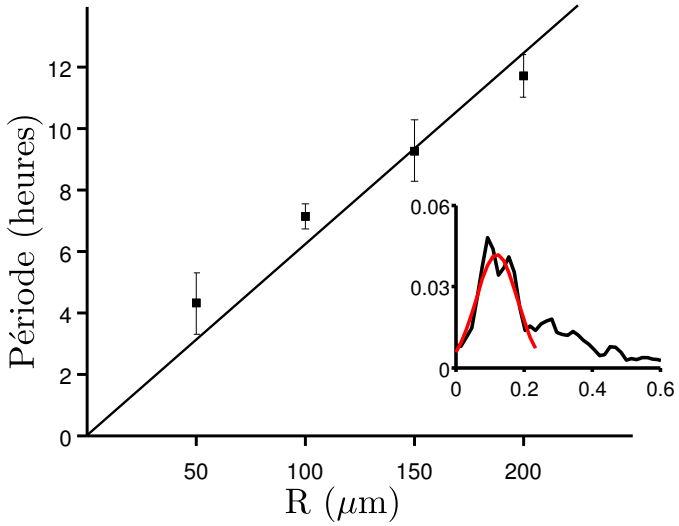

Figure 3.24 – Période des oscillations de la vitesse radiale (pour t<T), en fonction de la taille des motifs. En insert, le spectre en fréquence de $U_r(t)$ pour un motif de $R = 100$ µm. Le spectre est obtenu par transformée de Fourier de $U_r(t) - < U_r(t) >_{15h}$, où $< . >_{15h}$ est une moyenne mobile de largeur 15h. Les périodes sont obtenues par l'ajustement d'une gaussienne (courbe rouge) sur la partie présentant un pic du spectre en fréquence de $U_r(t)$. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% sur l'évaluation du maximum à partir de l'ajustement de la gaussienne. La droite rouge est le résultat de l'ajustement linéaire (passant par l'origine) : T= 0.062× R (0.062 ±0.011 (IC95)) (R^2=0.91)

De telles oscillations du champ de contrainte ont été observées récemment par Serra-Picamal *et al.* (2012) lors de la migration d'un épithelium. Ces auteurs expliquent ce phénomène avec un modèle (figure 3.25) à une dimension dans lequel l'épithélium est considéré comme une collection de cellules reliées entre elles par des forces élastiques (représentées par des ressorts). Chaque cellule se déplace sous l'effet d'une force de propulsion lorsque la densité locale est suffisamment faible, et est soumise à un frottement visqueux avec le substrat rigide. L'argument central est que la raideur des ressorts n'est pas constante, et même varie de manière non monotone avec la contrainte : en deçà d'une certaine contrainte la cellule se renforce (Riveline *et al.*, 2001) et, au dessus de ce seuil, elle flue (Trepat *et al.*, 2007). Avec ces hypothèses, des ondes de contraintes mécaniques apparaissent naturellement. D'autres hypothèses faisant appel par exemple à une communication biochimique entre cellules et impliquant un modèle de type «réaction-diffusion» seraient bien entendu également envisageables.

Ici, les cellules sont confinées avec des conditions aux limites clairement définies : les cellules situées au bord du motif adhésif ne peuvent pas se déplacer au-delà. Cette condition impose que le bord du motif soit immobile, autrement dit, $U_r(t) = 0$. Le problème de ces ondes mécaniques se propageant dans un mi-

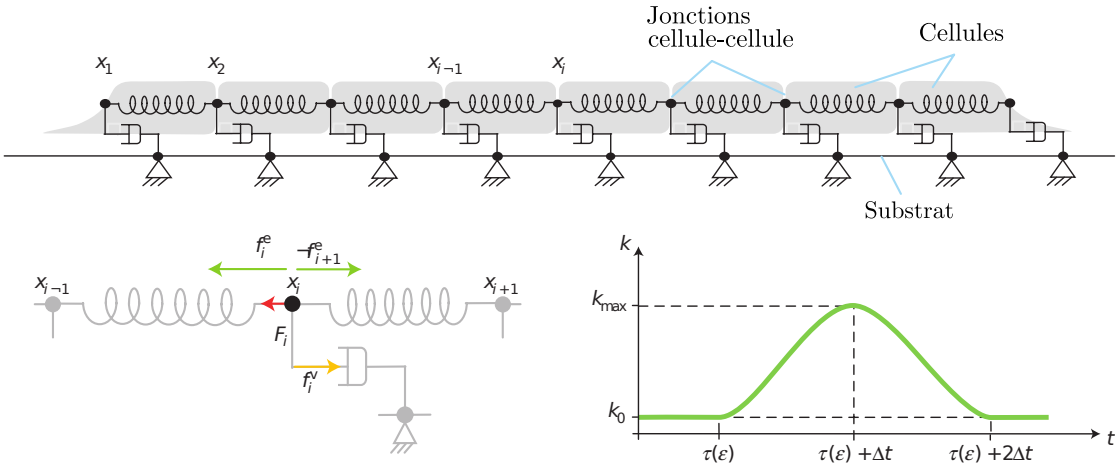

Figure 3.25 – Représentation schématique du modèle d'un épithélium en expansion, extrait de Serra-Picamal *et al.* (2012).

lieu confiné est analogue au problème de la membrane vibrante circulaire, fixée à son pourtour. La principale différence est que l'onde se propage dans les cellules de façon longitudinale, alors que la membrane vibrante est traversée d'une onde transverse. Mais les équations et la résolution sont tout à fait similaires (Sondergaard et Tanner, 2002). La solution de ce problème est une superposition de modes (figure 3.26) décrits chacun par une fonction de Bessel de première espèce (Arbenz et Bachmann, 1992).

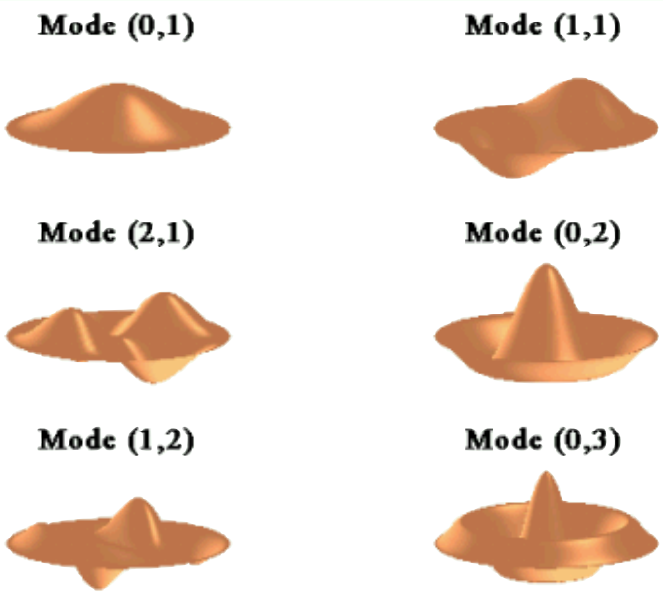

Figure 3.26 – Représentation des 6 premiers modes de Bessel d'une membrane vibrante fixée à sa périphérie (Institute of Sound and Vibration Research - University of Southampton).

L'amplitude du premier mode (mode (0,1) de la figure 3.26) varie de façon sinusoïdale et la période est

$$T = \frac{2\pi R}{2.05c}$$

où c est la vitesse de propagation de l'onde. La période des oscillations est donc proportionnelle au rayon ce qui correspond bien à nos observations (figure 3.24).

L'ajustement linéaire (passant par l'origine) de $T(R)$ (figure 3.24) donne c=50 µm/h (± 10 µm/h (IC95)), soit très proche de la vitesse de l'onde observée par Serra-Picamal *et al.* (2012), qui est de 60 µm/h.

L'analyse du champ de vitesse par analogie avec la membrane vibrante est justifiée, du moins pour le premier mode. Il est plus difficile de repérer les modes d'ordre supérieur, car :

- certains modes ne possèdent pas de symétrie radiale (tels que les modes (1,1), (2,1), (1,2), etc). Il n'est donc pas possible de moyenner les vitesses radiales sur les angles.
- les périodes des modes suivants sont plus courtes, et deviennent difficiles à détecter dans les spectres de Fourier.

3.1.4.4 Influence de la taille des motifs circulaires sur la vitesse orthoradiale

Les mouvements des cellules dans la direction orthoradiale sont également très importants pendant la première phase. La figure 3.27 montre les profils radiaux de la valeur absolue de la vitesse orthoradiale dans cette première phase, pour les 4 tailles de motifs.

Dans la première phase, la vitesse orthoradiale moyenne est maximale au bord du motif circulaire, alors qu'elle est minimale au centre. Dans les deux phases, le profil de la vitesse orthradiale est similaire quel que soit la taille du motif, sauf pour les très petits motifs (50 µm de diamètre) pour lequel la vitesse orthoradiale est beaucoup plus élevée que pour les autres tailles.

3.1.5 Un câble d'acto-myosine au bord du motif adhésif

Les images en microscopie confocale montrent clairement l'existence d'un câble d'acto-myosine à la frontière séparant les régions adhésives et non adhésives. Ce câble supra-cellulaire parcourt les cellules au raz de la surface (figure 3.28). Il est présent dès la confluence, et perdure pendant la formation du bourrelet périphé-

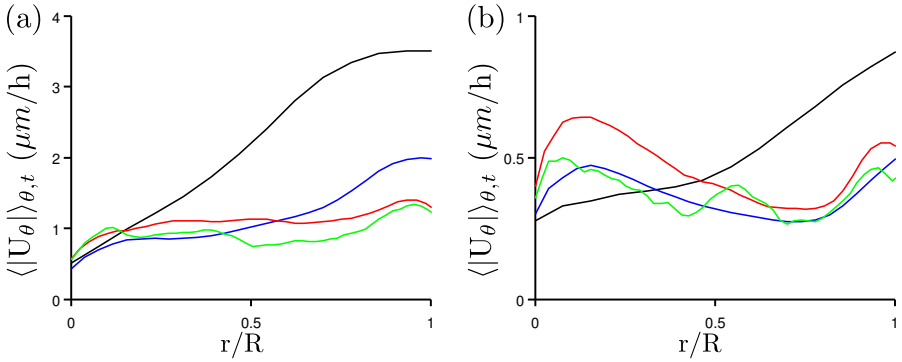

Figure 3.27 – (a) Profil radial de la moyenne temporelle de la valeur absolue de la composante orthoradiale du champ de vitesse moyennée sur les angles, pour 4 tailles de motifs différents (Rayons 50µm (noir), 100µm (bleu), 150µm (rouge), 200µm (vert)), (a) avant la formation du bourrelet, (b) après la formation du bourrelet. L'échelle spatiale est normalisée par la taille du motif circulaire. L'échelle verticale est différente pour les deux graphes.

rique.

Les expériences d'ablation laser (figure 3.29) montrent que ce câble est sous tension puisqu'il se rétracte lorsqu'il est rompu. Le temps caractéristique de rétraction du câble est ici de l'ordre de 10 secondes. En revanche, l'ablation du câble ne provoque aucun mouvement notable dans la monocouche. Ensuite le câble se reconstitue à partir du cytosquelette : environ 10 min après l'ablation, aucune trace de celle-ci n'est visible.

Le rôle de ce câble contractile est ici peu clair. Il est tout à fait possible qu'il ne joue pas de rôle actif mais soit intrinsèquement présent au bord d'un épithélium. Pour tester ses propriétés contractiles, nous utilisons dans la partie suivante la géométrie inverse, c'est-à-dire une région anti-adhésive entourée d'une région adhésive.

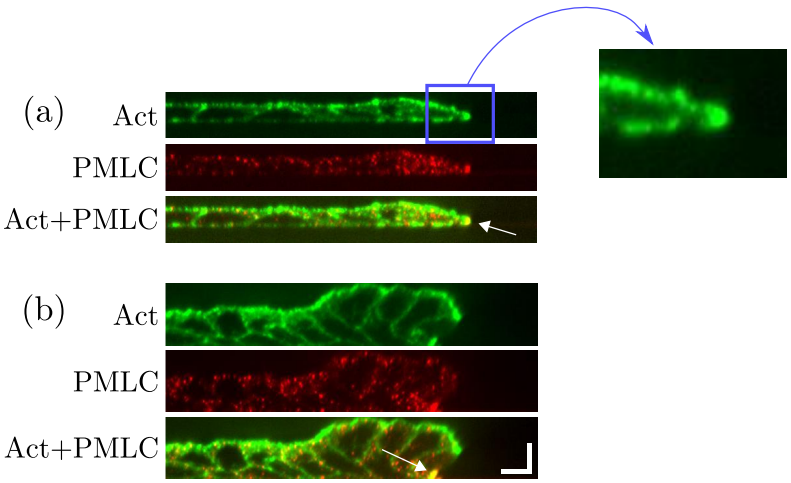

Figure 3.28 – Coupe transversale d'îlots marqués par immunofluorescence. Canal vert : actine. Canal rouge : chaîne légère phosphorylée de la myosine (PMLC) marquant la présence de myosine II active. La flèche blanche pointe vers le câble, constitué d'actine et de myosine II. (a) Cas d'un îlot juste à confluence (4.10^5 cellules/cm^2). (b) Cas d'un îlot dense (8.10^5 cellules/cm^2) avec un bourrelet périphérique. Barre = 10 µm.

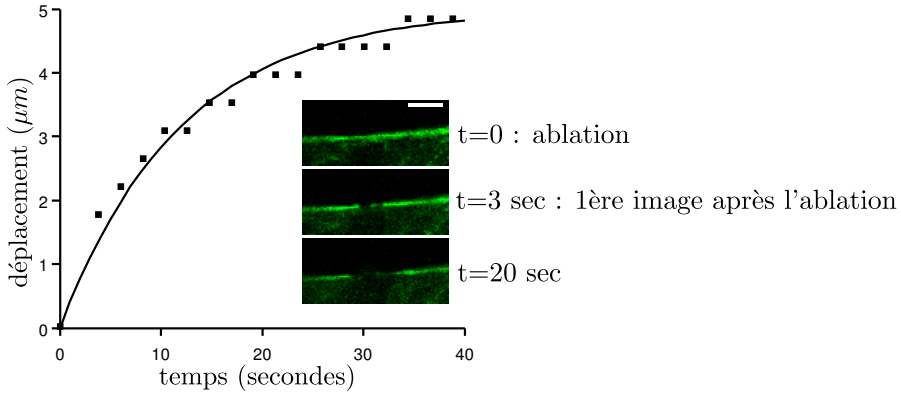

Figure 3.29 – Ablation laser d'un câble d'acto-myosine situé à la limite entre une zone adhésive et une zone anti-adhésive. Cette frontière est ici rectiligne. L'ajustement de la relaxation du câble par une exponentielle donne un temps caractéristique de 12 secondes. En insert, 3 images de microscopie confocale de cellules MDCK LifeAct : une image juste avant l'ablation, une deuxième image juste après l'ablation, la troisième image à 20 secondes. Barre = 10 µm.

3.1.6 Conclusion

En cultivant des cellules épithéliales sur des motifs adhésifs de taille contrôlée, nous avons montré que le confinement induit des mouvements importants et coordonnés des cellules : il est particulièrement spectaculaire de pouvoir déclencher de tels mouvements (qui ne sont pas sans rappeler des processus morphogénétiques) uniquement par un confinement géométrique. C'est particulièrement vrai pour les phénomènes périodiques mis en évidence. De la même manière, ces conditions aux limites ont permis de favoriser la formation de stuctures tridimensionnelles précurseurs de tubules, coexistant avec la monocouche bidimensionnelle.

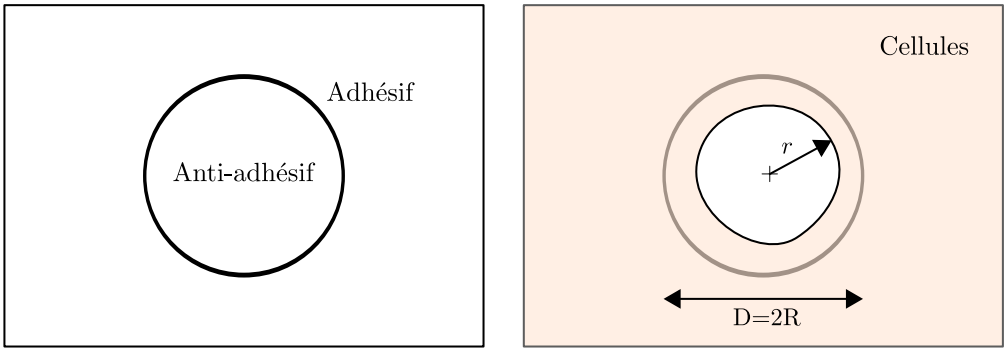

Figure 3.30 – Le motif anti-adhésif circulaire (diamètre D) est entouré d'une région adhésive, sur laquelle les cellules sont ensemencées. r est le rayon de la région sans cellule sur la région anti-adhésive.

3.2 Motifs anti-adhésifs circulaires

La présence d'un câble contractile à la périphérie des motifs circulaires adhésifs nous incite à explorer d'autres géométries pour étudier son influence.

Dans la partie précédente, les motifs adhésifs circulaires sont entourés d'une région anti-adhésive (figure 3.1). Le câble d'acto-myosine présent à la périphérie de l'îlot ne peut que se contracter. Il ne permet donc pas l'extension du tissu hors de la région adhésive. Dans la situation inverse, c'est-à-dire quand un motif anti-adhésif est entouré d'une région adhésive, le bord de l'épithélium a une concavité opposée à celle de la situation précédente (figure 3.30). La contraction exercée par le câble permet donc potentiellement aux cellules de recouvrir le motif anti-adhésif.

3.2.1 Influence de la taille du motif

Intuitivement la taille du motif anti-adhésif va être un paramètre important dans ces expériences :

- Une très petite zone (d'une taille micrométrique) anti-adhésive sera recouverte par les cellules sans que l'épithélium ne soit perturbé par la présence de cette zone «interdite». Ce cas correspond à un rayon de courbure faible.
- Les cellules confrontées à une frontière rectiligne entre les zones adhésives et anti-adhésives ne pourront pas du tout envahir la zone anti-adhésive. Ce cas correspond à un rayon de courbure grand.
- Entre ces deux extrêmes, il sera intéressant d'étudier l'existence éventuelle d'un rayon de fermeture stable ou d'une taille de domaine critique séparant deux régimes.

L'expérience montre qu'effectivement, par ordre de taille de motif anti-adhésif croissant :

Figure 3.31a : Les cellules recouvrent les motifs anti-adhésifs comme s'ils n'existaient pas. Les cellules ne sont pas ralenties dans leur migration.

Figure 3.31b : Les cellules sont ralenties dans leur migration par les motifs anti-adhésifs, mais ceux-ci sont rapidement recouverts.

Figure 3.31c : Les cellules entourent d'abord le motif anti-adhésif avant de le recouvrir par fermeture concentrique (une vidéo est disponible en ligne, l'adresse est précisée en annexe A.2.2).

Figure 3.31d : Les cellules remplissent tout l'espace autour des motifs mais ne les recouvrent jamais, ils «débordent» simplement de quelques microns dessus.

Dans les trois premiers cas, on ne voit pas la trace du motif sur l'épithélium une fois qu'il a été entièrement recouvert.

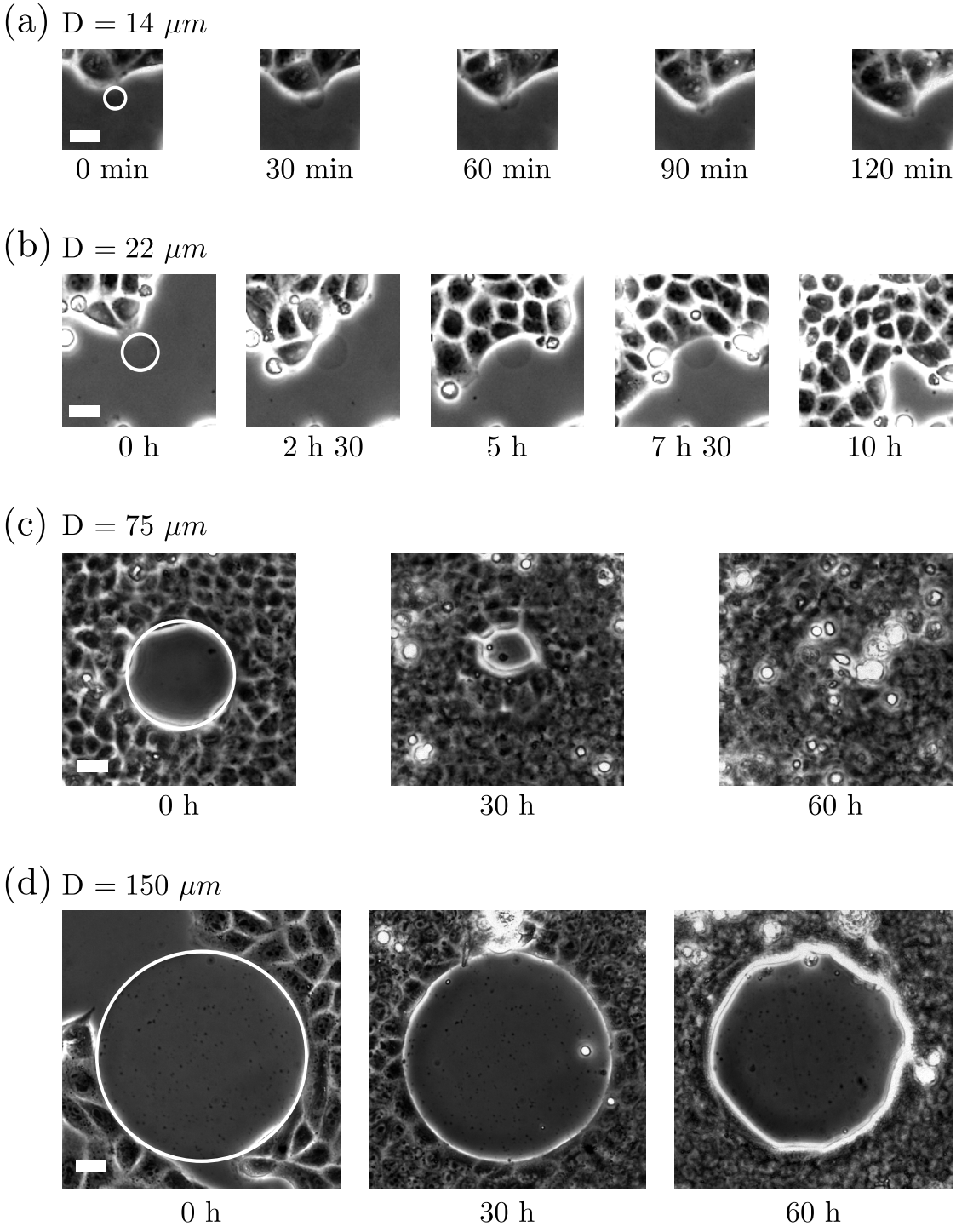

Figure 3.31 – Exemple de croissance de cellules MDCK autour de motifs anti-adhésifs circulaires (Diamètre (a) 14 µm, (b) 22 µm, (c)75 µm, (d) 150 µm). Le cercle blanc à t=0h marque le contour du motif anti-adhésif. Images en constraste de phase. Barre = 20 µm.

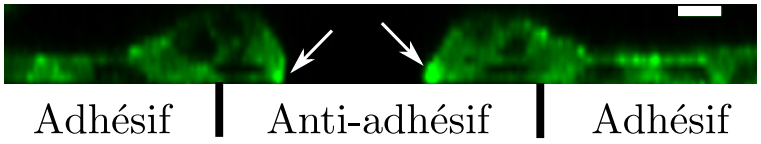

Figure 3.32 – Coupe transversale (xz) d'un îlot de cellules MDCK LifeAct recouvrant partiellement un motif circulaire anti-adhésif (R=37 µm). Les deux flèches blanches indiquent les câbles d'actine à la base des cellules, au bord de l'îlot. Barre = 10 µm.

Nous avons montré précédemment (paragraphe 3.1.5) qu'un câble d'actine était présent à la frontière du motif adhésif circulaire. Ce câble est également présent ici. A la confluence, il est situé à la base des cellules, exactement à la frontière entre les régions adhésive et anti-adhésive. Lorsque les cellules commencent à recouvrir le motif anti-adhésif circulaire, ce câble est toujours présent au bord libre mais pas à la frontière entre les zones adhésive et non-adhésive (figure 3.32). Il semble tirer et même déformer les cellules dans la direction de l'intérieur du motif. Enfin, remarquons sur cette figure la présence d'un bourrelet de cellules similaire à celui mis en évidence dans la partie précédente.

Dans toute la suite, nous nous intéressons principalement au cas (c), car il met en jeu la contraction collective des cellules. Nous étudierons le cas (d) également car nous verrons qu'il est très proche du cas (c).

Toute l'analyse qui suit est réalisée à partir de la détection du contour de l'épithélium autour du motif anti-adhésif avec la méthode décrite dans la partie «Analyse d'image» 2.4.2.13. À partir de ce contour, nous calculons l'aire A de la région sans cellule. Nous définissons le rayon effectif de cette région : $r = \sqrt{A/\pi}$.

La figure 3.33 montre l'évolution du rayon r au cours du temps, à partir de la confluence et jusqu'à la fermeture complète, pour trois motifs anti-adhésifs de même taille $R = 37.5$ µm a priori identiques. Nous pouvons voir que la fermeture ne se déroule pas du tout de façon identique pour les trois motifs. Le temps total de fermeture varie du simple au triple : 26h pour le plus rapide (en noir), 75h pour le plus lent (en bleu). L'évolution de $r(t)$ est de plus très heurtée : les cellules oscillent longtemps aux bords du motif avant d'initier la fermeture. Nous y reviendrons dans la partie 3.2.2.1. En revanche, un motif qui s'est complètement fermé ne se rouvre jamais. La fermeture (quand elle a lieu) est donc un processus complexe, soumis à de grandes fluctuations. Cependant, en répétant les expériences, nous pouvons statistiquement quantifier certaines grandeurs.

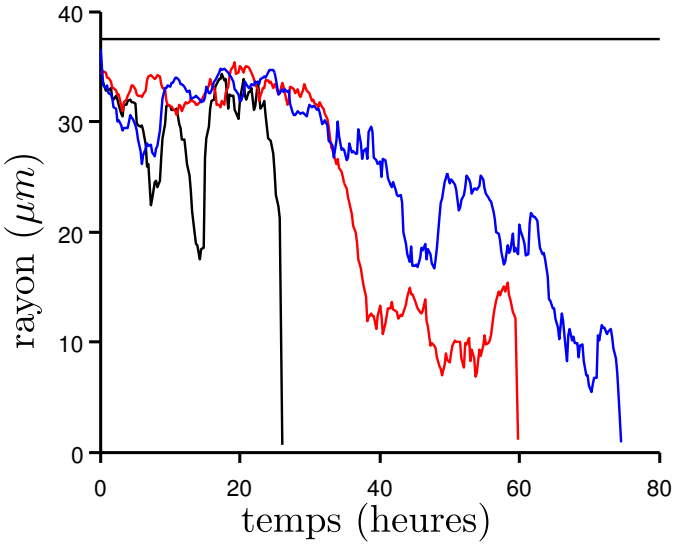

Figure 3.33 – Evolution du rayon de trois blessures différentes, au cours du temps. La ligne horizontale noire représente le rayon du motif anti-adhésif (R=37.5 µm).

3.2.2 Étude des conditions de fermeture

3.2.2.1 Temps total de la fermeture

Le processus de fermeture complète n'a lieu qu'après que les cellules ont passé un certain temps autour du motif anti-adhésif. Nous avons vu que les cellules recouvraient presque immédiatement les petits motifs et que les très grands motifs n'étaient jamais recouverts. Pour mesurer cet effet, nous définissons un temps total de fermeture, correspondant à la durée écoulée entre le début de l'observation (soit à la confluence) et le recouvrement total du motif.

Pour une taille de motif D, nous définissons également trois ratios : f_D, o_D et i_D respectivement comme la proportion de motifs complétement fermés (parmi les motifs de taille D), la proportion de motifs encore entièrement ouverts, et ceux dont l'état est intermédiaire (c'est-à-dire qui ont déjà commencé à envahir le motif sur une taille de plus de 5 µm mais qui ne se sont pas encore fermés), de telle sorte que $f_D + o_D + i_D = 1$.

La figure 3.34 décrit la répartition des motifs ouverts/fermés/intermédiaires au cours du temps pour des tailles différentes. Nous retrouvons sur cette figure le fait que plus un motif anti-adhésif est grand, plus le recouvrement par les cellules est long (figure 3.36). Par exemple, à t=60h, tous les motifs entre 50 µm et 60 µm sont recouverts, alors que 50% des motifs de 70 µm à 80 µm sont toujours partiellement ouverts.

Dans tous les cas, à partir de t=60h, il n'y a quasiment plus de motif com-

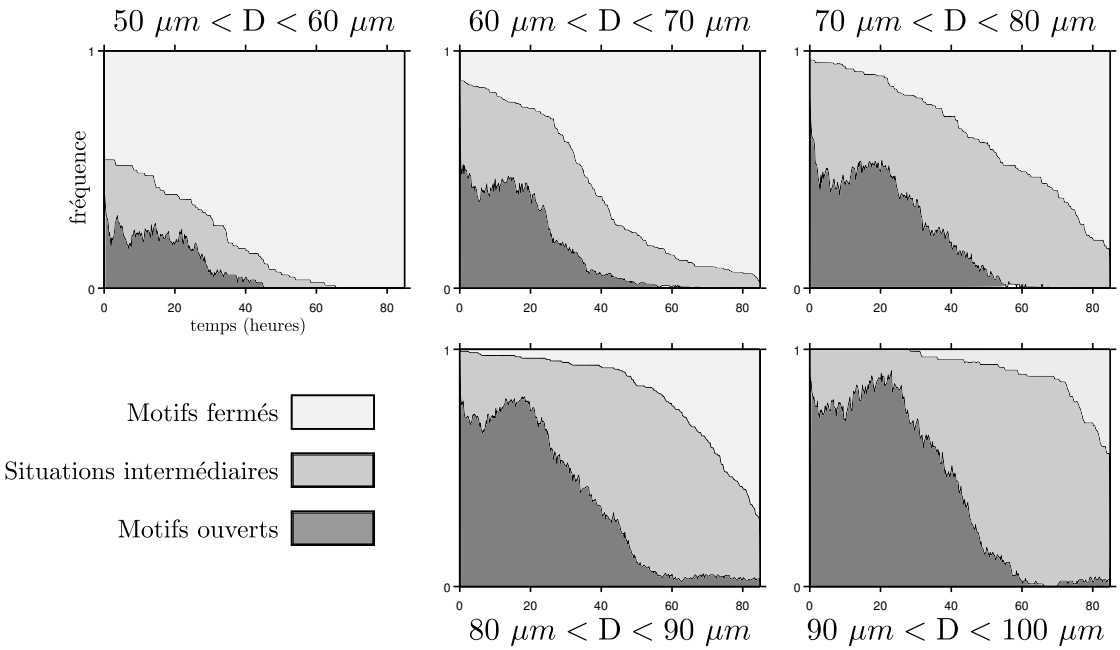

Figure 3.34 – Répartition des motifs ouverts, fermés et intermédaires, au cours du temps, et pour 5 gammes de tailles de motifs.

plétement ouvert. Le tissu a commencé à recouvrir le motif. Cet instant coïncide avec la formation du bourrelet périphérique, qui déborde toujours sur le motif anti-adhésif.

La figure 3.35 montre l'état final 4 jours après la confluence. La fermeture totale ne concerne que les motifs de moins 125 µm en moyenne (bien que nous ayons eu l'occasion d'observer des motifs de 140 µm se fermer). De plus, nous avons réalisé des cultures de cellules autour de motifs de 200 µm de diamètre, sans jamais voir de fermeture totale. La taille limite des motifs entre ceux qui se ferment et ceux qui ne se ferment pas se situe donc entre 130 et 160 µm.

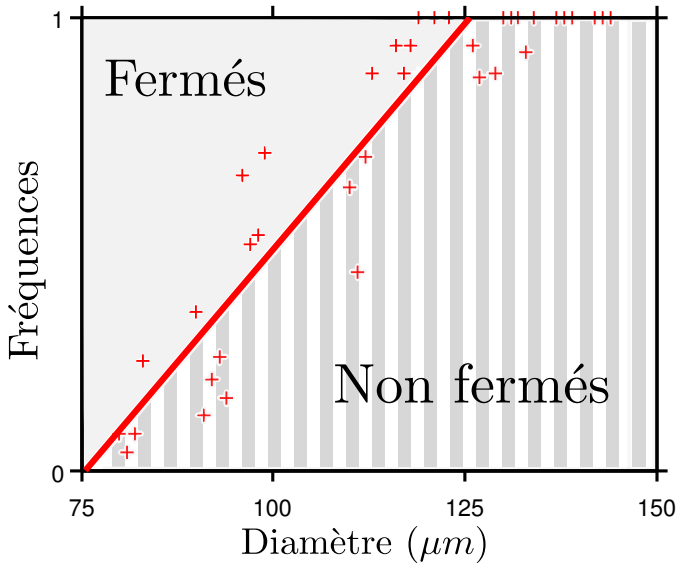

Figure 3.35 – Répartition des motifs fermés et non fermés (soit l'ensemble des motifs complétement ouverts et des motifs en situations intermédiaires) en fonction de la taille des motifs, 4 jours après la confluence.

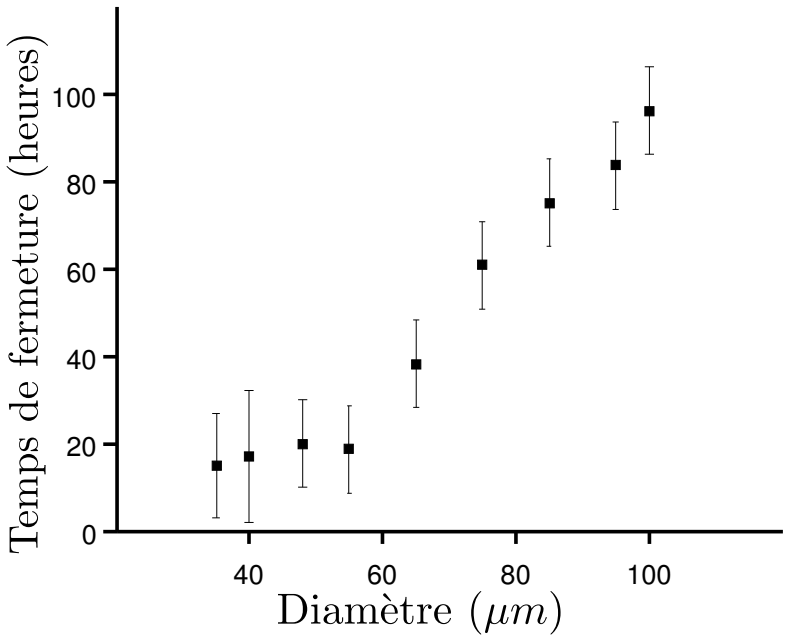

Figure 3.36 – Temps de fermeture en fonction de la taille des motifs, calculé comme l'instant où f_D>0.5. L'incertitude sur les temps de fermeture des petits motifs est importante car des ces cas-là, il est très difficile de dater la confluence dans la mesure où des motifs sont recouverts après la confluence «locale» (les cellules remplissent un large zone autour du motif, mais des trous sont toujours présents) et la confluence «globale» (les cellules remplissent véritablement tout l'espace disponible).

3.2.2.2 Approche énergétique

D'une façon analogue à Bar-Ziv *et al.* (1999) et à Bischofs *et al.* (2008), nous pouvons décrire le problème du recouvrement du motif anti-adhésif par l'îlot avec un modèle simple à deux dimensions, ne prenant en compte que deux forces : la tension de ligne et la tension de surface.

- La membrane plasmique et le cortex d'actine de chaque cellule tendent tous les deux à se contracter latéralement. Cette contractilité s'étend sur toute la surface occupée par les cellules. En résulte une tension de surface effective σ concourant à réduire l'aire de l'épithélium sur la région anti-adhésive.
- La contractilité de cortex d'actine du bord libre des cellules, ainsi que la contraction du câble d'actomyosine parcourant toute la périphérie de l'épithélium sont résumés en une tension de ligne γ. Celle-ci tend à réduire la longueur du bord libre, soit la longueur du contour du trou.

À l'équilibre (en supposant l'existence d'un rayon d'équilibre), ces deux forces se compensent :

$$\sigma\vec{n} = \gamma\frac{d\vec{t}}{ds} = \frac{\gamma}{R}\vec{n}$$

où $\vec{n}$ et $\vec{t}$ sont respectivement les vecteurs normal et tangentiel du contour, s est l'abscisse curviligne, et R est le rayon de courbure.

Nous trouvons donc $R = \gamma/\sigma$. Or dans nos expériences, il n'existe pas de rayon d'équilibre [4]. Soit le motif est recouvert en quelques heures ou en quelques dizaines d'heures, soit le motif n'est jamais recouvert. Pour le comprendre, prenons une approche énergétique. La contribution des deux forces décrites ci-dessus s'écrit :

$$E = \gamma L + \sigma S$$

où L et S sont respectivement la longueur de l'ouverture et la surface cellulaire sur le motif anti-adhésif. Dans une situation à symétrie circulaire, où la zone non couverte par les cellules est un disque de rayon r centré sur le motif de rayon R_0 :

$$L = 2\pi r$$
$$S = \pi(R_0^2 - r^2)$$

4. Nous remarquons par ailleurs que cette expression n'a pas de sens physique puisque le rayon d'équilibre, s'il existait, augmenterait avec γ et diminuerait avec σ.

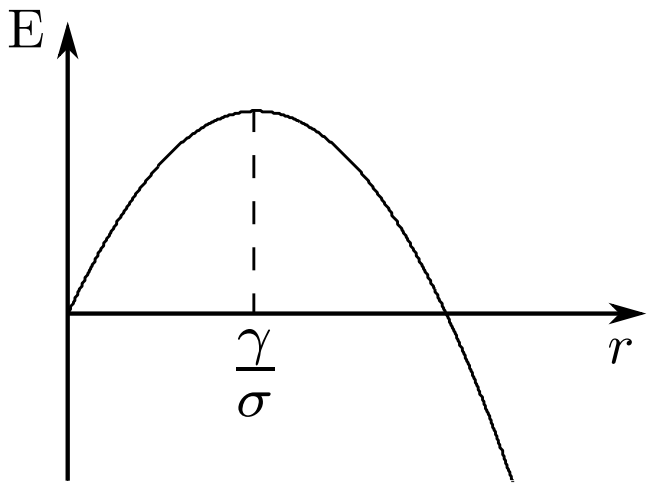

Figure 3.37 – La courbe $E(r)$ présente un maximum pour $r = \gamma/\sigma$.

Alors E s'écrit :

$$E = \gamma 2\pi r + \sigma\pi(R_0^2 - r^2)$$

Nous retrouvons que l'équilibre ($\partial E/\partial r = 0$) est atteint pour $r = \gamma/\sigma$, mais cet équilibre est instable ($\partial^2 E/\partial r^2 < 0$). Si $r < \gamma/\sigma$, alors $\partial E/\partial r > 0$: le rayon diminue pour minimiser l'énergie, les cellules recouvrent le motif. Inversement, si $r > \gamma/\sigma$, alors $\partial E/\partial r < 0$: le rayon augmente pour minimiser l'énergie (voir la figure 3.37). En d'autres termes, cela signifie qu'un motif d'une taille supérieure à γ/σ ne sera jamais recouvert, alors qu'un motif d'une taille inférieure à γ/σ le sera. Cette taille représente donc un rayon de motif critique :

$$R_c = \frac{\gamma}{\sigma}$$

Les expériences montrent que le rayon critique se situe autour de 75 µm (figure 3.34). D'autre part, Bar-Ziv *et al.* (1999) donne une valeur de σ à 4.10^{-5} N.m^{-1}. Nous pouvons donc estimer $\gamma = R_c\sigma$ à environ 3.10^{-9} N.

3.2.3 Étude de la dynamique de la fermeture

3.2.3.1 Évolution du rayon

Même si les courbes $r(t)$ sont très diverses (figure 3.33), elles ont tout de même certaines caractéristiques communes. Il y a toujours une première phase où le rayon de la blessure est proche du rayon du motif. Cette phase dure de quelques heures à quelques dizaines d'heures. L'amplitude des fluctuations est de l'ordre de 5 à

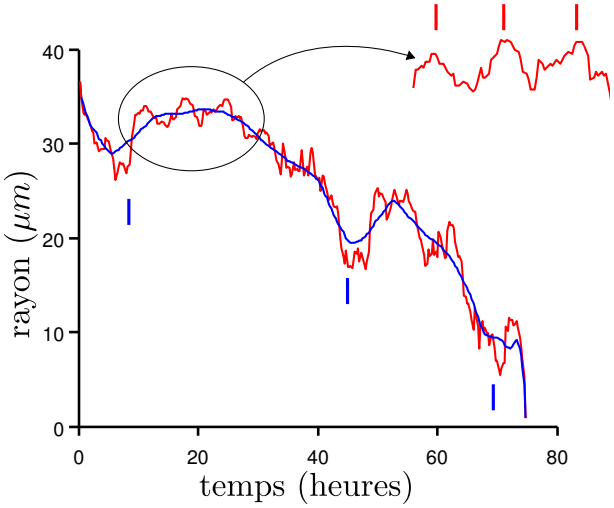

Figure 3.38 – Flucutations de $r(t)$: en rouge, la courbe r(t). Les fluctuations rapides sont de l'ordre de 6h. En bleu, la courbe $r(t)$ lissée (taille de la fenêtre de lissage : 7h). Les traits rouges et bleus marquent les fluctuations des courbes rouge et bleue, respectivement. Les fluctuations lentes sont de l'ordre de 20h. R=37.5 µm.

10 µm. Dans le cas des blessures qui ne se referment pas, cette phase se prolonge pendant toute la durée de l'expérience.

Ensuite, les cellules commencent à recouvrir effectivement le motif anti-adhésif, les fluctuations sont plus grandes : de l'ordre de 10 à 20 µm. Ces fluctuations peuvent même être beaucoup plus élevées : il est courant que des blessures dont la fermeture est quasiment achevée (à $r = 5$ µm) s'ouvrent à nouveau pour atteindre $r = R$.

Nous identifions deux modes fréquentiels de ces fluctuations : un mode de fluctuations rapides et un mode de fluctuations lentes. Un exemple est donné en figure 3.38. En ce qui concerne les fluctuations lentes, nous ne pouvons extraire qu'une ou deux oscillations par expérience, ce qui est insuffisant pour extraire une période avec précision. Cependant, le temps caractéristique de ces fluctuations est de l'ordre de 20 heures.

Quantitativement, la période des fluctuations rapides, déterminée par transformée de Fourier (figure 3.39), est indépendante de la taille des motifs anti-adhésifs, elle vaut en moyenne 6.6 heures (± 0.7 h (DS)).

Ici encore, une réponse non linéaire des cellules à la contrainte appliquée pourrait expliquer ces oscillations (Guevorkian *et al.*, 2011, Serra-Picamal *et al.*, 2012).

La figure 3.40 permet de comprendre comment des oscillations peuvent apparaître. Lorsque les cellules sont en train de recouvrir le motif anti-adhésif, de très nombreux filaments d'actine relient les cellules au dessus du motif au substrat

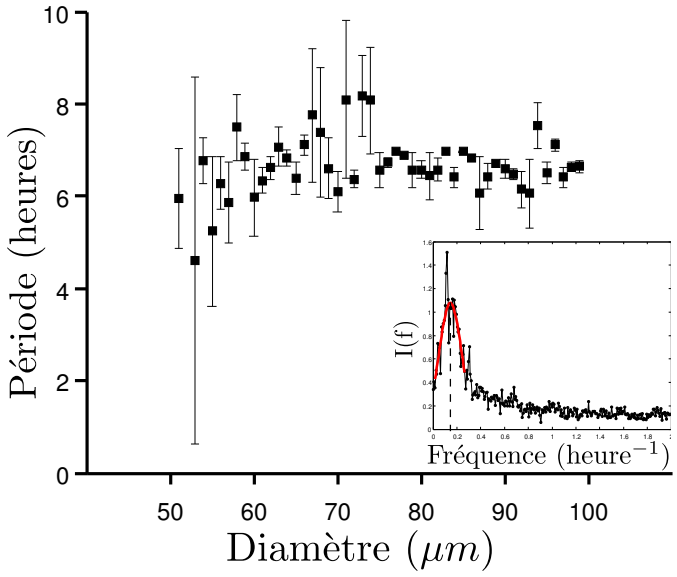

Figure 3.39 – Périodes des fluctuations rapides. En insert, le spectre (moyenné sur plusieurs expériences) de $r(t)$ pour $R = 39$ µm. Le spectre est obtenu par transformée de Fourier de $r(t) - < r(t) >_{7h}$, où $< . >_{7h}$ est une moyenne mobile de largeur 7h. Cela revient à soustraire la courbe bleue à la courbe rouge de la figure 3.38. Les périodes sont obtenues par l'ajustement d'une gaussienne (courbe rouge) sur la partie présentant un pic du spectre en fréquence de $r(t)$. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% sur l'évaluation du maximum à partir de l'ajustement de la gaussienne. La période moyenne est de 6.6 heures (± 0.7 h (DS)).

adhésif. Ces filaments (filament S, pour tension de Surface) sont approximativement perpendiculaires au bord du motif et leur contraction empêche l'avancée des cellules sur le motif anti-adhésif. D'autres filements d'actine (filaments L) sont alignés le long du bord de l'îlot et participent à la tension de ligne. Au final, un réseau complexe de filaments d'actine se développe autour du motif anti-adhésif. Au fur et à mesure de la fermeture de l'îlot, les filaments L se contractent, et étirent les filaments S, qui peuvent à leur tour réagir à cette stimulation. Si la réponse des filaments à la contrainte n'est pas linéaire, on peut s'attendre à l'émergence d'oscillations globales dans le tissu (Guevorkian *et al.*, 2011).

3.2.3.2 La phase finale de la fermeture

La phase finale de la fermeture de la blessure est indépendante de la taille du motif anti-adhésif. La figure 3.41 recense l'évolution de $r(t)$ (moyenné sur diverses fermetures) juste avant la fermeture finale pour différents rayons. Toutes les courbes coïncident sur une loi de puissance, d'exposant 0.5.

Ce résultat est en accord avec l'hypothèse d'une fermeture due au câble d'actomyosine (Cochet *et al.*, 2012). Nous récapitulons ce modèle simple ci-dessous.

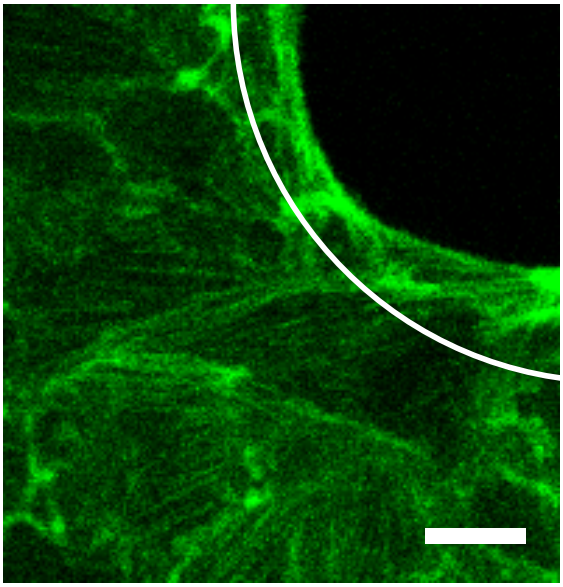

Figure 3.40 – Cellules MDCK LifeAct autour d'un motif anti-adhésif de 70 µm de diamètre. Un câble d'actine n'est pas réellement visible, mais les filaments d'actine sur le motif sont alignées avec le bord du motif. À l'extérieur du motif, les filaments sont orientés perpendiculairement au bord du motif et semblent en continuité avec les cellules surplombant le motif. Barre = 10 µm.

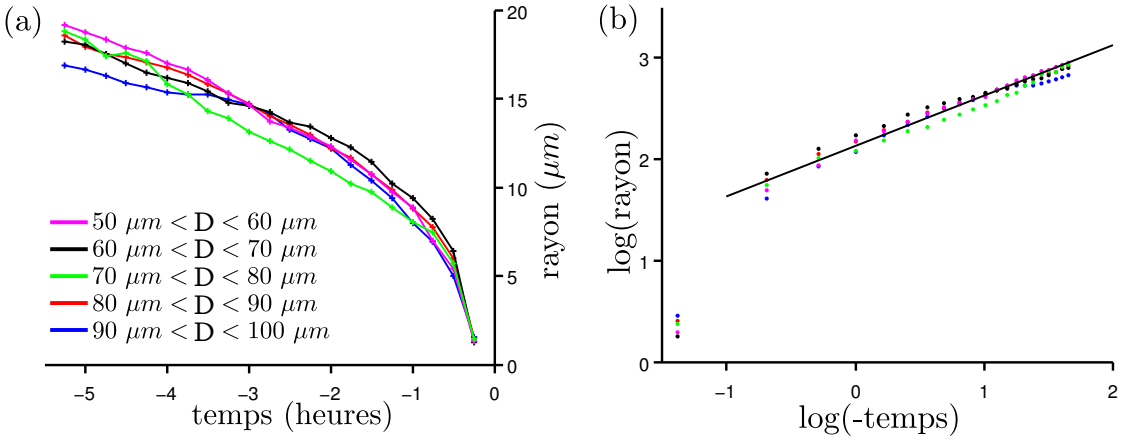

Figure 3.41 – (a) $r(t)$ dans les 10 heures avant la fermeture complète (t=0 est la date de la fermeture complète). Chaque courbe est le résultat d'une moyenne des courbes $r(t)$ sur 40 expériences. (b) La même figure en échelle log-log. La droite noire est la droite de pente 0.5, ajustant au mieux les données (la valeur pour le dernier instant n'est pas retenue pour l'ajustement, car sa valeur en échelle logarithmique est fortement dépendante du choix de l'instant t=0 – cet instant est au mieux défini à 15 minutes près, qui est la fréquence d'acquisition des images). L'ordonnée à l'origine de cette droite est 2.08 (± 0.02 (IC95)).

Nous modélisons les forces générées sur le bord d'îlot comme la somme de trois forces [5] :

- La tension de ligne due à la contractilité du câble : cette force est proportionnelle à la courbure, soit ici $F_L = \gamma/r$.
- La tension de surface $F_S = -\sigma$ dû à la contractilité des cellules.
- La force de friction : cette force rend compte de la friction du câble et des cellules, et s'écrit $F_v = -\xi\dot{r}$, où ξ est un coefficient de friction traduisant les pertes visqueuses et les interactions cellule-cellule et cellule-substrat.

Le bilan des forces s'écrit donc :

$$\frac{\gamma}{r} - \xi\dot{r} - \sigma = 0$$

Nous pouvons éliminer le terme de tension de surface. En effet, en ordre de grandeur, pour $r = 10$ µm, $\dot{r} = 5$ µm/h $= 10^{-9}$m/s :

- $F_L = \gamma/r = 3.10^{-4}$ N.m^{-1} (avec la valeur de γ déterminée dans la partie 3.2.2.2)
- $F_S = \sigma = 4.10^{-5}$ N.m^{-1}
- $F_v = \xi\dot{r} = 10^{-4}$ N.m^{-1}, avec $\xi = 10^5$ Pa.s d'après Yoshinaga et Marcq (2012) (dans l'hypothèse où c'est la friction du câble qui domine dans le terme de friction).

Nous constatons donc que pendant les derniers instants de la fermeture :

$$F_L \approx F_v > F_S$$

De plus, à partir de $r = 10$ µm, le terme de tension de ligne et le terme de friction ne font qu'augmenter alors que le terme de tension de surface reste constant. Nous éliminons donc le terme de tension de surface. Il reste :

$$\frac{\gamma}{r} - \xi\dot{r} = 0$$

Si le recouvrement complet du motif anti-adhésif s'achève à $t = 0$, alors nous pouvons écrire (pour $t < 0$) :

$$r(t) = \sqrt{2\frac{\gamma}{\xi}(-t)}$$

5. Nous faisons là encore l'hypothèse de la symétrie de révolution, ce qui permet de considérer un problème unidimensionnel.

Le rayon de la zone sans cellule atteint donc la valeur 0 par une loi en $\sqrt{t}$, ce qui est en accord avec les données expérimentales. Quantitativement $\gamma/\xi \approx 30\ \mu m^2/h$.

Pour $\gamma = 10^{-9}$ N et $\xi = 10^5$ Pa.s, $\gamma/\xi = 10^{-14}$ m^2/s, soit 36 μm^2/h. La correspondance avec les résultats expérimentaux valide donc ce modèle simple de la dynamique des derniers instants de la fermeture.

Finalement, le câble est le moteur de la fermeture puisque c'est sa contraction qui permet aux cellules de recouvrir le motif anti-adhésif, et la friction effective due au câble et aux cellules «freine» la fermeture.

3.2.3.3 Dépendance avec la densité - Bourrelet

De la même manière qu'il n'est pas possible de définir de manière univoque un temps au bout duquel les cellules se mettent à recouvrir le motif anti-adhésif, il n'est pas possible de définir une densité critique sur la zone adhésive qui déclencherait systématiquement le recouvrement de l'îlot.

La densité de cellules évolue sur le motif adhésif de manière similaire à celle décrite dans la partie «Motifs adhésifs circulaires», 3.1.2 : les cellules se densifient avec un temps de doublement d'environ 20h. Puis la densité se stabilise mais les divisions se poursuivent, provoquant de nombreuses éjections de cellules de la monocouche. La figure 3.42 montre l'aspect de l'épithélium dans cette situation. Nous pouvons voir que les cellules éjectées se trouvent majoritairement à une distance de l'ordre de 100 μm des motifs anti-adhésifs, comme nous l'avions déjà évoqué dans la partie «Motifs adhésifs circulaires» (3.1.2.2). Cette figure montre également qu'un bourrelet se forme en périphérie de l'îlot dans le cas des motifs anti-adhésifs de grande taille (diamètre supérieur à 70 μm), pour lesquels le temps de fermeture est (en moyenne) supérieur au temps de formation du bourrelet (40h).

Le bourrelet périphérique est transporté comme toutes les autres cellules lors de la fermeture. Il ne semble pas participer de manière active au recouvrement de la partie adhésive. Dans le cas des motifs plus petits, les cellules recouvrent le motif avant la formation du bourrelet.

3.2.4 Rôle des adhésions focales

Les cellules adhèrent au substrat via les adhésions focales. Sur les régions du substrat recouvertes avec le traitement anti-adhésif, les cellules ne peuvent pas adhérer. Cependant, comme le montre la figure 3.43a représentant des cellules exprimant la vinculine-GFP (la vinculine est un des constituants des adhésions

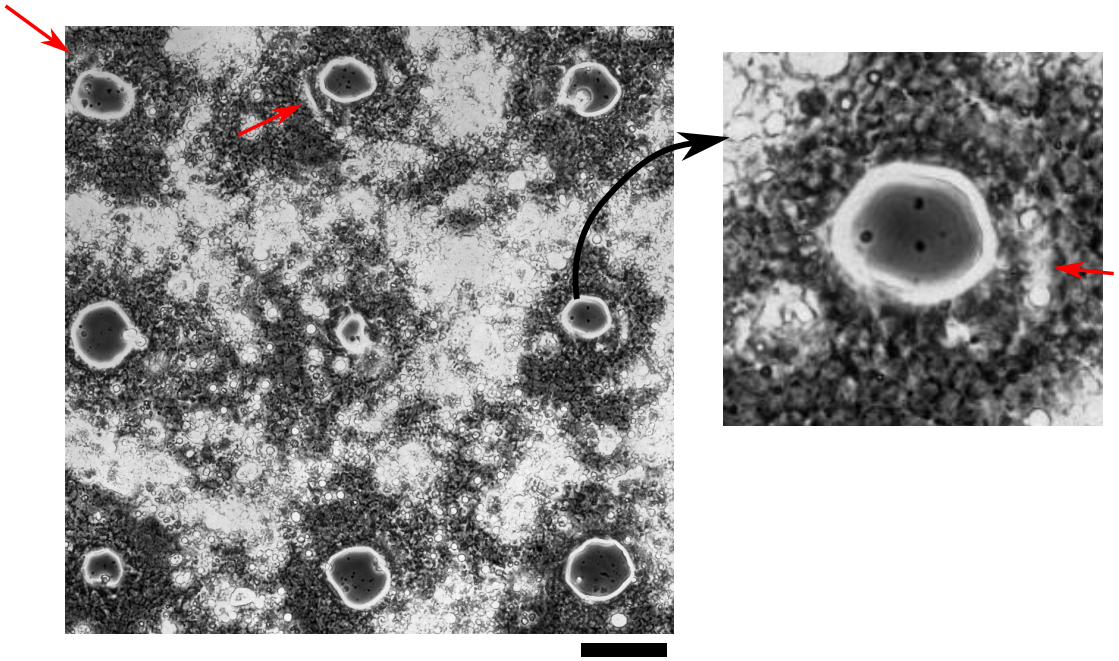

Figure 3.42 – Image en contraste de phase d'un épithélium en culture autour de motifs anti-adhésifs (diamètre 86 µm). Tous les points blancs sont des cellules éjectées de la monocouche et n'interagissant pas avec celle-ci. Nous pouvons distinguer nettement une région de largeur environ 100 µm sans cellule éjectée. Les trois flèches rouge indiquent des bourrelets, repérables par l'effet de «halo» qu'ils induisent en contraste de phase. Barre = 100 µm.

focales), des points riches en vinculine sont malgré tout présents sur la région anti-adhésive. Mais ces points n'ont pas les mêmes caractéristiques que les adhésions des cellules adhérant au substrat :

- ils sont localisés aux contacts cellule-cellule (alors que les adhésions sont réparties sous toute la cellule habituellement),
- leur mouvement est plus rapide : de 0.5 à 1 µm/min, contre 0.2 µm/min (figure 3.43c),
- et leur mouvement est très coordonné : ces points se déplacent dans la même direction à l'échelle de tout le motif anti-adhésif (figure 3.43b) et avec une vitesse très homogène.

Ces résultats suggèrent que les points riches en vinculine migrent passivement, transportés par les cellules situées sur la zone anti-adhésive.

A la frontière entre les régions adhésive et anti-adhésive, il y a de très nombreuses adhésions, et elles sont orientées de la façon suivante : elles sont dans la direction radiale là où les cellules recouvrent la région anti-adhésive (indiqué par la flèche bleue sur la figure 3.43a), et elles suivent la frontière entre les deux régions quand les cellules sont au bord de la région adhésive (indiqué par la flèche rouge

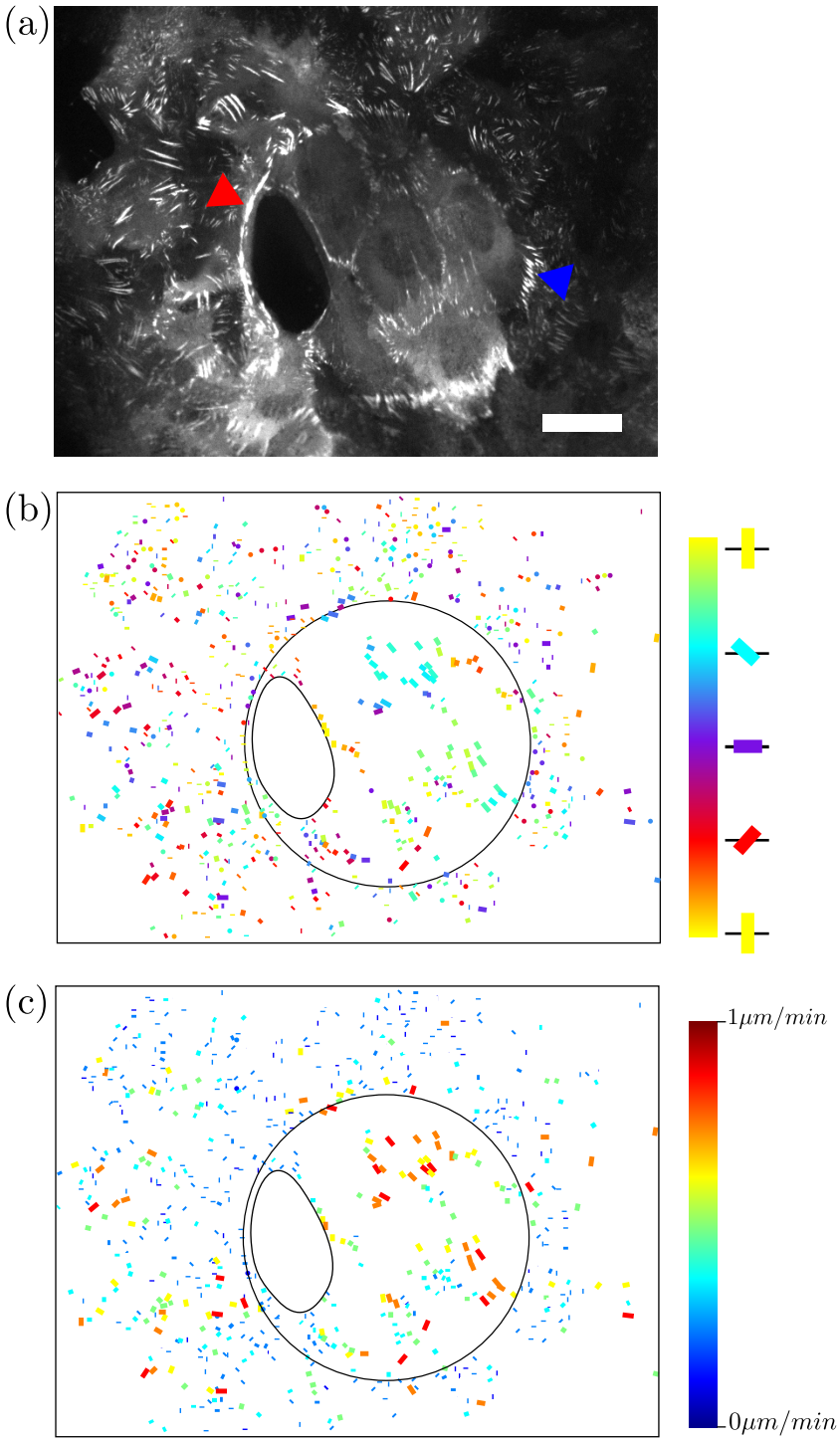

Figure 3.43 – (a) Image de microscopie confocale (z=0, juste au dessus de la surface de verre) de cellules MDCK Vinculine-GFP recouvrant partiellement un motif circulaire anti-adhésif (diamètre = 70 µm), représenté en (b) et (c). La région noire au centre de l'image est une région de la zone anti-adhésive non recouverte de cellules, également reproduite en (b) et (c). Les adhésions focales apparaissent en blanc à l'image et sont trackées pendant 100 secondes. La distance totale couverte par chaque adhésion focale est représentée par la longueur des segments. Le code couleur correspond à : (b) l'orientation du déplacement des adhésions, (c) la vitesse moyenne de déplacement des adhésions. Barre = 20 µm.

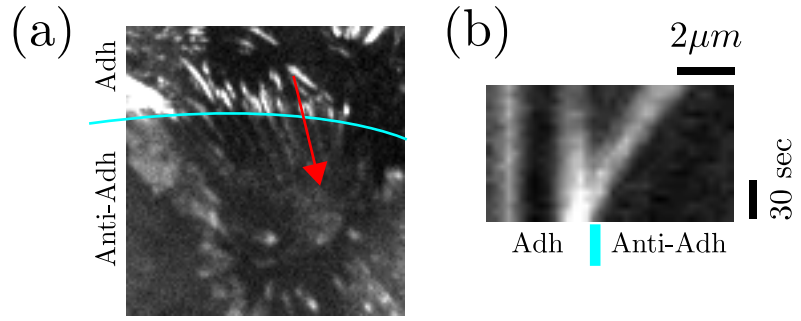

Figure 3.44 – (a) Détail de l'image 3.43a. (b) Kymographe calculé le long de la flèche rouge, suivant le mouvement d'un point de vinculine.

sur la figure 3.43a).

Enfin sur la partie haute de l'image, nous pouvons distinguer que les adhésions sur le substrat sont alignées avec des zones riches en vinculine sur la région anti-adhésive. La figure 3.44 montre comment une adhésion focale sur la région adhésive mais proche de la frontière est amenée sur la région anti-adhésive. La vitesse de ce détachement est d'environ 30 nm/sec (une vidéo est disponible en ligne, l'adresse est précisée en annexe A.2.3).

Ces résultats montrent que les adhésions situées au bord du motif anti-adhésif forment une zone d'adhérence forte, comme un point d'ancrage au substrat permettant la cohésion de la monocouche dans la région anti-adhésive. À mesure que les cellules recouvrent cette région, ces points d'ancrage sont progressivement arrachés, et la vinculine est ensuite emportée par les cellules. Elle se relocalise ensuite aux contacts cellule-cellule. Or la vinculine est également un composant des jonctions adhérentes, où elle est recrutée en réponse à une force appliquée sur la jonction (le Duc *et al.*, 2010, Yonemura *et al.*, 2010). Nous pouvons alors interpréter cette relocalisation de la vinculine comme un renforcement des jonctions cellule-cellule en l'absence d'adhésions avec le substrat.

3.2.5 Perturbations de la structure

3.2.5.1 Ablation d'une portion de câble

Nous avons établi précédemment que le câble d'actine présent le long des cellules du bord de l'épithélium joue un rôle moteur dans le mouvement des cellules vers l'intérieur du motif anti-adhésif. Les figures 3.45 et 3.46 montrent qu'après photoablation d'une portion de ce câble au cours de la fermeture, ce dernier se rétracte ainsi que toutes les cellules autour du motif anti-adhésif (une vidéo est disponible en ligne, l'adresse est précisée en annexe A.2.4). Dans cette expérience, le câble est cassé en bas de l'image. Pourtant le centre de masse de la région sans cellule (figure 3.46) ne se déplace que très peu (de l'ordre de 0.5 µm pendant la durée de l'observation, soit 100 secondes), alors que le déplacement centrifuge des cellules induit par l'ablation est partout le long du bord de l'îlot de l'ordre de 1 µm. La rupture d'une portion du câble supprime la tension que celui-ci imposait globalement aux cellules, ou tout au moins la diminue fortement, confirmant que l'intégrité du câble est un élément essentiel de l'équilibre mécanique des cellules situées sur le motif anti-adhésif.

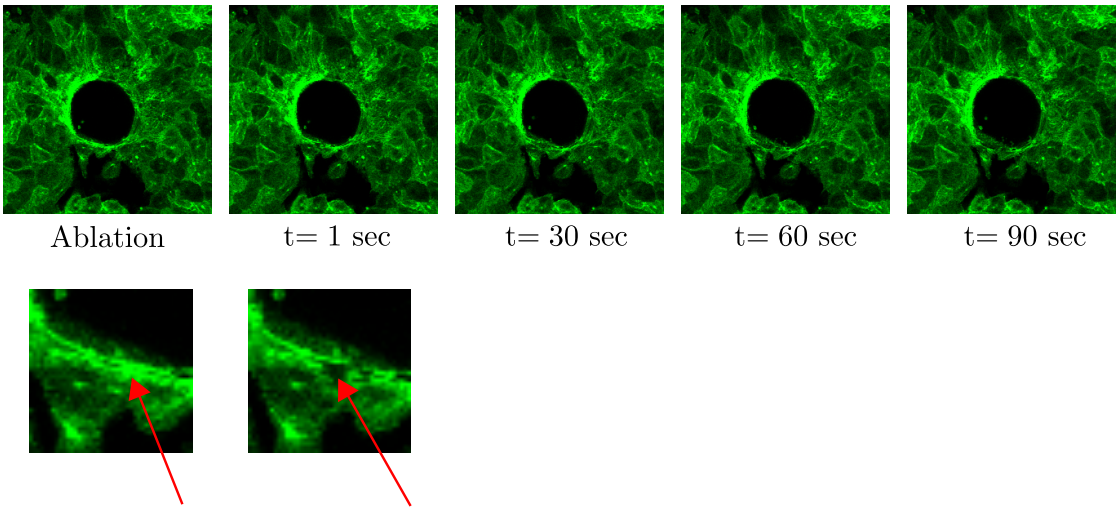

Figure 3.45 – Déroulé de l'ablation. Les flèches rouges indiquent le lieu de l'ablation.

3.2.5.2 Ablation de cellules

Après l'ablation du câble d'acto-myosine, nous effectuons maintenant l'ablation d'un groupe de trois cellules situées sur la région adhésive (figure 3.47). Cette fois, l'ablation ne perturbe pas toutes les cellules autour du motif, mais seulement le

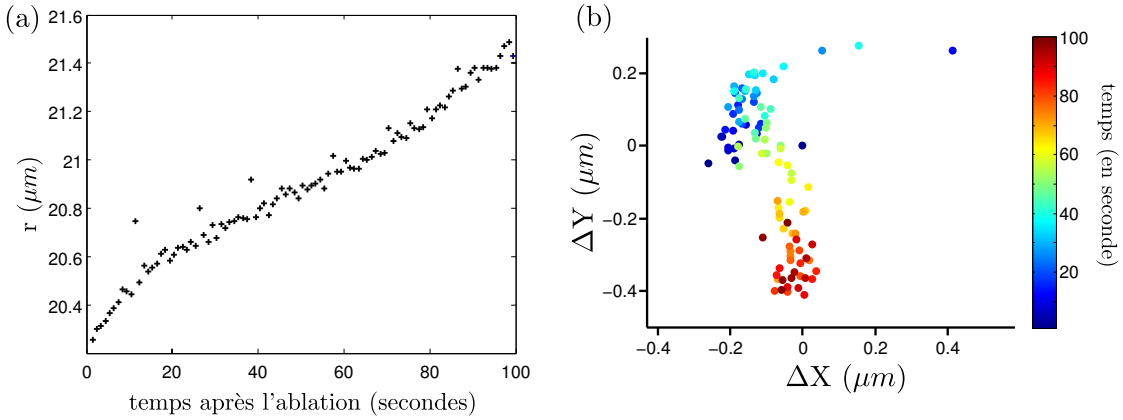

Figure 3.46 – (a) Évolution de $r(t)$ après ablation d'une portion du câble d'actine. Le rayon du motif anti-adhésif est de 39 µm. (b) Position relative du centre de masse de la région sans cellule sur le motif anti-adhésif, par rapport à la position du centre de masse avant l'ablation. Il n'y a pas de dérive du centre de masse après l'ablation : l'ouverture du trou est très isotrope.

voisinage. Plus précisément, dans un premier temps seules les cellules dans un voisinage très proche de la zone d'ablation sont perturbées. Dans un deuxième temps (environ une minute après l'ablation), les cellules proches à la fois du motif anti-adhésif et de la zone d'ablation sont perturbées. Leur mouvement est clairement dirigé vers le motif anti-adhésif. La figure 3.47b montre le déplacement du bord de la cellule le long du segment blanc. Cette cellule est celle qui se déplace le plus parmi celles concernées par le mouvement induit par l'ablation. Elle se déplace en tout d'environ 1 µm. L'effet est du même ordre de grandeur que l'ablation du câble, mais ici, la zone perturbée est beaucoup plus localisée. La figure 3.47c représente le champ de vitesse radiale. La région bleue correspond à un mouvement vers l'intérieur du motif. Ce mouvement ne concerne qu'une partie des cellules entourant le motif (environ 8 cellules).

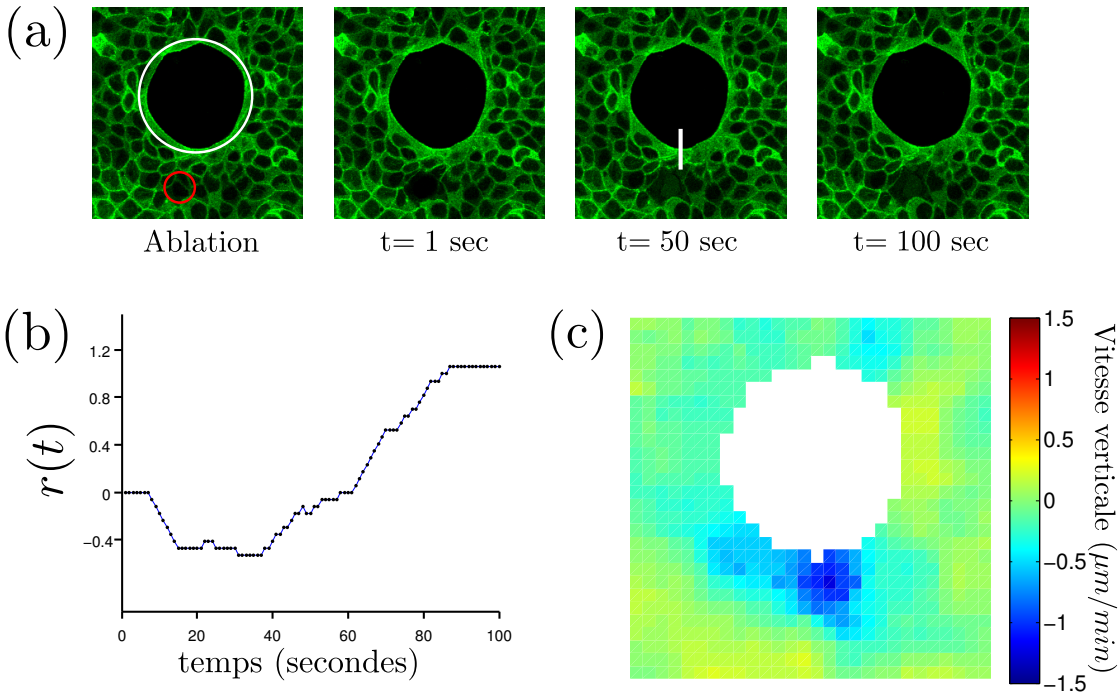

Figure 3.47 – Ablation laser de cellules sur la partie adhésive (motif anti-adhésif de diamètre 70 µm). (a) Le cercle blanc représente la frontière du motif anti-adhésif. Le cercle rouge représente le lieu de l'ablation laser. (b) Position du bord de l'îlot au cours du temps, au niveau de la ligne blanche. (c) Champ de vitesse verticale, moyenné de t = 50 sec à t = 100 sec.

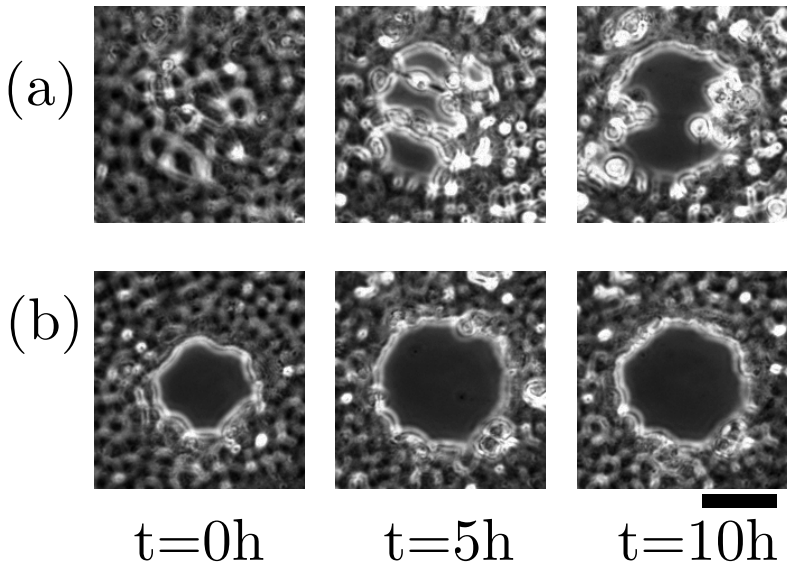

Figure 3.48 – Inhibition de la polymérisation de l'actine par la latrunculine, sur des cellules en culture sur des motifs anti-adhésifs (diamètre 90 µm). Barre 50 µm.

3.2.5.3 Inhibition

La latrunculine inhibe la polymérisation de l'actine. Lorsque nous ajoutons cette drogue au milieu au cours de la fermeture, nous observons un arrêt puis une réouverture jusqu'au bord du domaine (figure 3.48b). Lorsque la fermeture est achevée, un trou apparaît dans l'îlot anti-adhésif et s'ouvre (figure 3.48a).

Ces expériences d'ablation et d'inhibition montrent que le câble d'actine est essentiel au recouvrement du motif anti-adhésif. En cassant le câble, un mouvement global vers l'extérieur est induit. En supprimant des cellules sur la zone adhésive, un mouvement local vers l'intérieur est déclenché. Ces résultats, ajoutés à ceux concernant les conditions et la dynamique de fermeture, suggèrent que le câble joue un rôle moteur, assurant la cohésion des cellules et la transmission des forces tout le long du bord de l'îlot. Les cellules autour du motif sont, elles, un frein à la fermeture de l'épithélium.

3.2.6 Conclusion

Le recouvrement d'un motif anti-adhésif circulaire par des cellules épithéliales est directement dépendant de la taille du motif. Il s'effectue par contraction d'un câble d'actomyosine supra-cellulaire situé tout autour de l'ouverture. Cette

contraction est modélisée par une tension de ligne, dont nous estimons la valeur à 3nN.

La valeur de la taille critique au-delà de laquelle le motif n'est pas recouvert est révélatrice des forces (tension de ligne et tension de surface) mises en jeu pour le recouvrement. En particulier, nous avons estimé la tension de ligne de l'épithélium à 3 nN. Cette tension de ligne est appliquée dans les cellules par un câble d'acto-myosine supra-cellulaire situé tout autour de l'ouverture.

3.3 Pacman

Dans la partie précédente «Motifs anti-adhésifs circulaires», nous avons montré que la courbure du bord d'un îlot anti-adhésif suffit à engendrer un mouvement dans le sens de la courbure, et que le câble joue un rôle majeur dans ce mouvement. Pour les petits motifs, la courbure est forte et le câble parvient à tirer les cellules facilement sur la région anti-adhésive. Au contraire, la courbure des grands motifs ($D > 150$ µm) est si faible que le câble ne parvient pas à initier le mouvement. Toutefois, dans cette géométrie, la courbure du câble augmente à mesure que les cellules recouvrent le motif, donc la force qu'il exerce également. Le recouvrement du motif se termine donc avec des forces mises en jeu au niveau du câble plus importantes que celles engagées au départ.

Pour explorer plus avant les forces de tension qu'un câble peut générer, nous décrivons dans cette partie une expérience dans le même esprit que celle avec les motifs anti-adhésifs circulaires mais dans une situation différente : les cellules sont mises en culture sur un motif adhésif en forme de «Pacman» [6](figure 3.49). Le diamètre du motif est de 1 mm. L'angle de la pointe du Pacman mesure entre 1° et 20°. Dans ces conditions, l'extrémité de la pointe du Pacman est de taille micrométrique, et est donc très facilement recouverte par les cellules. Intuitivement, l'angle de la pointe est le paramètre important de cette expérience. Un angle très petit correspond à une ligne micrométrique anti-adhésive en travers de la zone adhésive. Cette ligne sera aisément franchie par les cellules. Un angle très grand revient au contraire à un obstacle infranchissable pour les cellules (une vidéo est disponible en ligne, l'adresse est précisée en annexe A.2.5).

Mais si dans cette expérience nous sondons également les propriétés contractiles des cellules, la situation ici est différente de la situation des motifs anti-adhésifs circulaires. Les cellules ne peuvent pas entourer toute la région anti-adhésive du Pacman alors que c'est le mode de recouvrement pour les motifs anti-adhésifs circulaires. Le recouvrement de la pointe est toujours initié à son extrémité, là où la courbure est la plus forte. Enfin, le recouvrement de la zone adhésive n'est pas limité par la taille de celle-ci, contrairement au cas des motifs circulaires où le recouvrement est borné par la taille du motif.

6. En référence au jeu vidéo créé par Tōru Iwatani en 1980 au Japon.

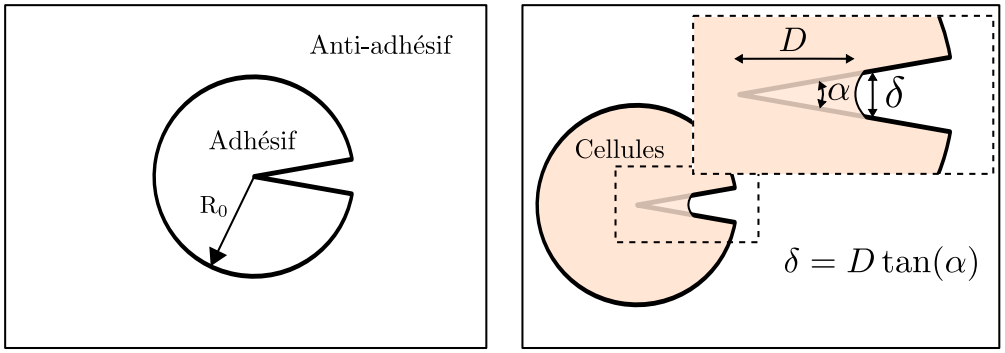

Figure 3.49 – Le «Pacman» est un motif circulaire adhésif, de rayon $R_0 = 1$mm, à l'exception d'une pointe anti-adhésive d'angle α. Les cellules sont ensemencées sur la partie adhésive. D est la longueur de la pointe anti-adhésive recouverte par les cellules. δ est la longueur transverse.

3.3.1 Recouvrement de la pointe

Nous mesurons le recouvrement de la pointe par la distance D (figure 3.49) entre le bord de l'îlot et le centre du motif avec la méthode décrite dans la partie «Analyse d'image» 2.4.2.12. À partir de D et de l'angle α de la pointe, nous définissons également la distance transverse $\delta = D \tan \alpha$.

La figure 3.50 montre l'évolution du recouvrement au cours du temps, pour différents angles. La progression des cellules sur la pointe est très variable d'un motif à un autre, pour un même angle. Cependant nous pouvons dégager deux tendances :

- une partie de la pointe est rapidement recouverte dès les premiers instants de la culture des cellules sur le motif.
- ensuite les cellules sur la pointe ralentissent leur progression ou parfois jusqu'à l'arrêt total (dans quelques cas les cellules se rétractent même de la pointe) puis finalement les cellules reprennent la progression sur la pointe.

La première phase a lieu lorsque les cellules sont peu denses et très motiles (avant et peu après la confluence). Comme les cellules mesurent en moyenne 20 µm de diamètre mais peuvent s'étaler jusqu'à 30-40 µm, elles peuvent facilement envahir la pointe en adhérant de part et d'autre de la région anti-adhésive. Dans la direction transverse, il n'y a jamais plus d'une cellule sur la pointe durant cette phase.

La seconde phase correspond à une progression plus lente des cellules sur la pointe jusqu'à la stabilisation de la longueur couverte par les cellules. Là encore, cette longueur varie beaucoup d'un motif à un autre pour le même angle (de l'ordre de 100%). Il est nécessaire de répéter un grand nombre de fois l'expérience pour

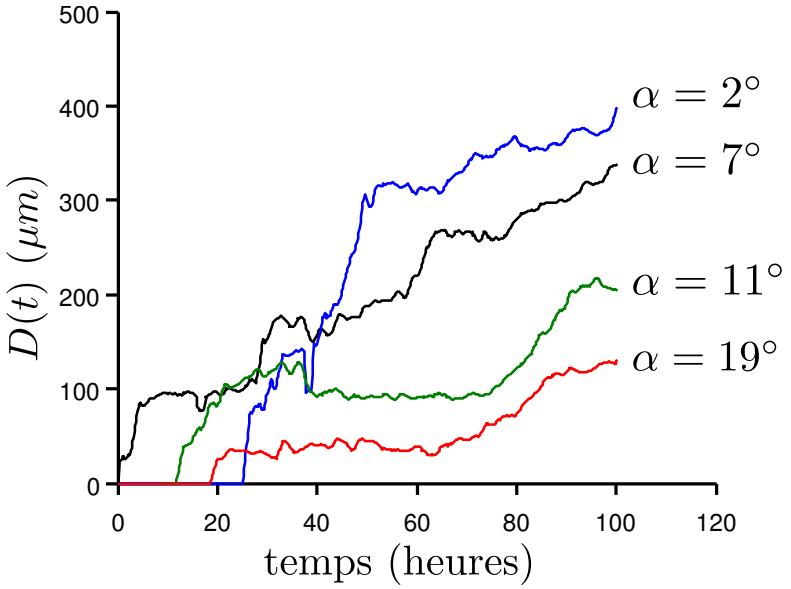

Figure 3.50 – 4 courbes $D(t)$ pour 4 angles différents. Les cellules sont confluentes à partir de t=10h.

décrire avec précision l'influence de l'angle de la pointe sur le comportement des cellules.

3.3.2 Recouvrement maximal en fonction de l'angle

La figure 3.51 représente la longueur maximale de la pointe couverte par les cellules, pour différents angles. Les pointes d'angles très faibles sont entièrement recouvertes (la distance recouverte correspond au rayon du motif). Pour les angles plus importants, les cellules ne recouvrent qu'une très petite région de la pointe.

À partir de la relation $D(\alpha)$, la distance transverse $\delta(\alpha)$ est représentée en figure 3.52. Les valeurs pour $\alpha < 6°$ n'ont pas de sens puique pour ces angles les cellules remplissent parfois toute la pointe. Nous observons que δ varie peu au dessus de cette valeur, ce qui laisse penser que le tissu détermine une extension latérale maximale au delà de laquelle il ne peut s'étirer. La moyenne de δ pour $\alpha > 10°$ est de 46 µm ($\pm$ 3 µm (DS)), soit la taille de 5 cellules à la densité 10^6 cellules/cm^2 (la taille d'une cellule est de 10 µm à cette densité). Cette extension correspond à $L_c = \delta$ (voir figure 3.53) et alors :

$$D = \frac{L_c}{2\tan(\frac{\alpha}{2})}$$

Pour les petits angles, cette relation devient $D = L_c/\alpha$.

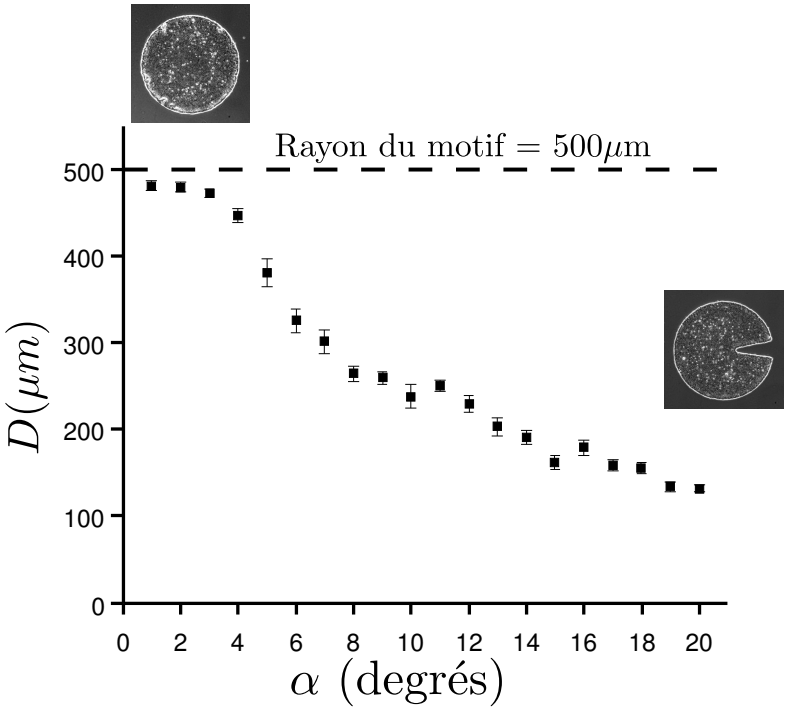

Figure 3.51 – Distance maximale couverte par les cellules, en fonction de l'angle de la pointe. La mesure a été effectuée sur des îlots 4 jours après la confluence (densité 10^6 cellules/μm^2). En insert, à gauche, l'image de cellules sur un motif d'angle 1°, et droite, l'image de cellules sur un motifs d'angle 20°.

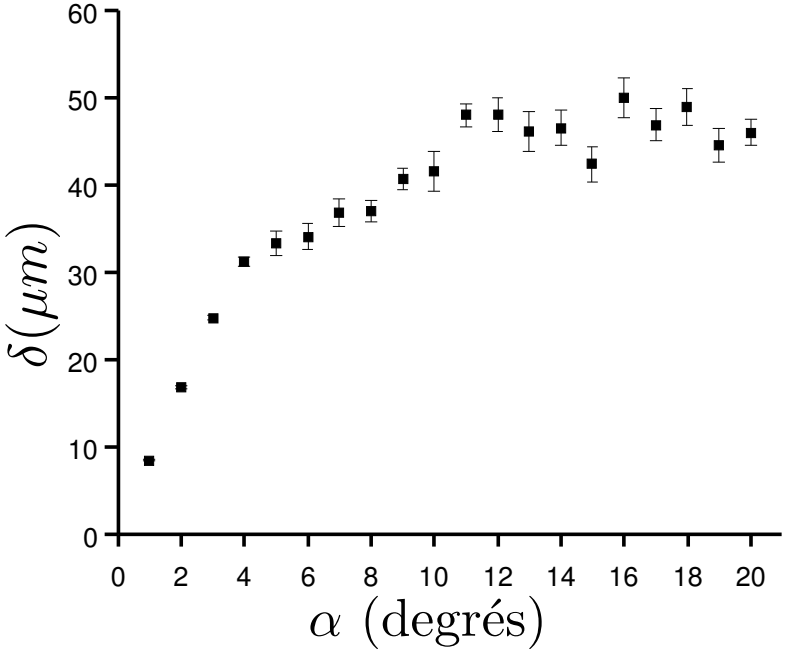

Figure 3.52 – Distance maximale transverse couverte par les cellules, en fonction de l'angle de la pointe. La distance transverse pour les angles inférieures à 5° n'a pas de sens car les cellules remplissent totalement la pointe anti-adhésive.

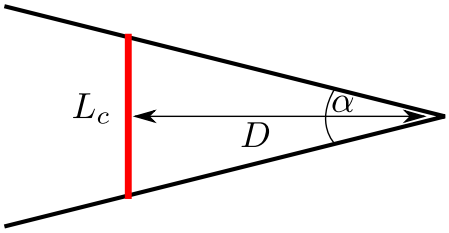

Figure 3.53 – Une longueur transverse L_c impose la longueur D

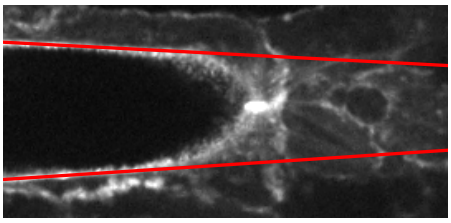

Figure 3.54 – Image de cellules MDCK LifeAct sur une pointe anti-adhésive de 5°. Les lignes rouges représentent le bord de la pointe anti-adhésive.

La relation $\delta(\alpha)$ =constante permet de comprendre l'évolution $D(\alpha)$, mais ne rend pas compte de la forme du contour du tissu sur la pointe. En effet, le contour n'est pas droit mais est courbé vers l'intérieur du motif (figure 3.54), à cause de l'équilibre (voir partie 3.2.3) qui s'établit entre une tension de ligne γ, qui tend à réduire la longueur du bord libre, c'est-à-dire à faire progresser les cellules sur la pointe, et une tension de surface σ, qui tend à réduire la surface de la monocouche au dessus de la zone non-adhésive, donc à faire reculer les cellules de la pointe. (Bischofs *et al.*, 2008).

3.3.3 Forme du profil

À l'équilibre, nous obtenons $\sigma = \gamma/R$, où R est la courbure du contour de l'îlot. Si σ et γ sont constants le long du contour des cellules sur la pointe, alors, ce contour forme un cercle de rayon R. Supposons que le cercle de rayon R soit tangent au secteur angulaire défini par α (figure 3.55). Contrairement à la situation précédente où D était imposé par la longueur du segment L_c, ici D est imposé par le rayon du cercle inscrit dans la pointe (figure 3.55b).

Géométriquement, il vient

$$D = R(\frac{1 - \sin \alpha/2}{\sin \alpha/2})$$

Pour les petits angles, nous retrouvons $D = R/(\alpha/2) = 2R/\alpha = d/\alpha$ (où d est le

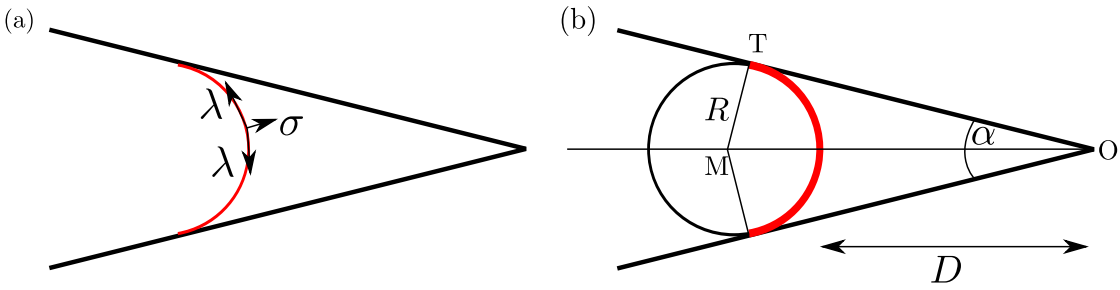

Figure 3.55 – (a) Equilibre des forces entre la tension de ligne γ et la tension de surface σ. (b) Un cercle de rayon R inscrit dans la pointe impose la distance D

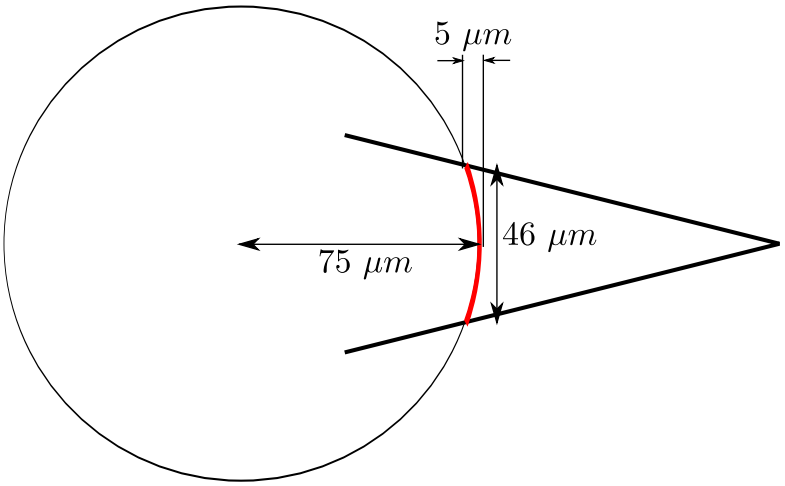

Figure 3.56 – Si l'équilibre mécanique impose un rayon de courbure de 75 µm, alors le contour de l'îlot sur la pointe anti-adhésive est très aplati (sachant que la distance transverse moyenne est de 46 µm).

diamètre du cercle), soit encore la même loi en α^{-1}.

Toutefois, le rayon critique déterminé dans la partie 3.2.3 était de 75 µm environ. Il est donnée par le même rapport γ/σ, ce qui n'est pas compatible avec nos observations.

En réalité, le contour des cellules au niveau de la pointe est bien plus courbé, il ne correspond pas à un cercle, et il n'est pas tangent au secteur (figure 3.57). Nous pouvons par exemple ajuster les contours avec une parabole, ce qui permet d'extraire facilement le rayon de courbure minimal.

Ce rayon de courbure minimal vaut en moyenne 4 µm (±1 µm (SD)), et ne semble pas dépendre de l'angle de la pointe (figure 3.58).

Cette courbure est de plus d'un ordre de grandeur supérieure à celle attendue par l'équilibre mécanique entre la tension du câble et la tension des cellules sur la pointe. Cette différence pourrait en partie venir du fait que contrairement à la situation des motifs anti-adhésifs circulaires, la situation ici n'est pas isotrope. Le

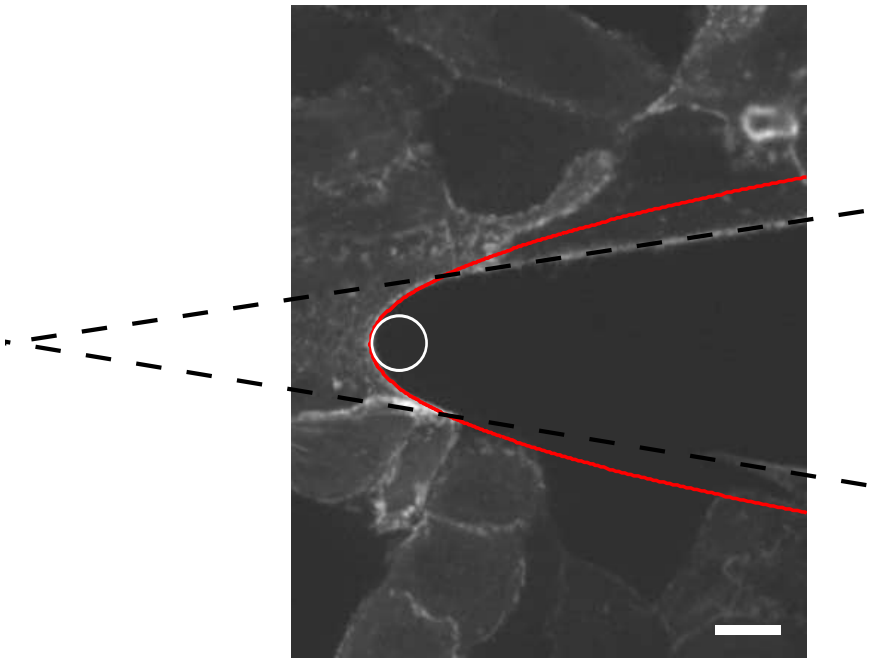

Figure 3.57 – Contour des cellules sur une pointe de 17°, et ajustement par une parabole. Le cercle blanc représente le rayon de courbure minimal de la parabole (≈ 5 µm). Le contour du bord libre est déterminé par un seuillage entropique 2.4.1. Barre = 10 µm.

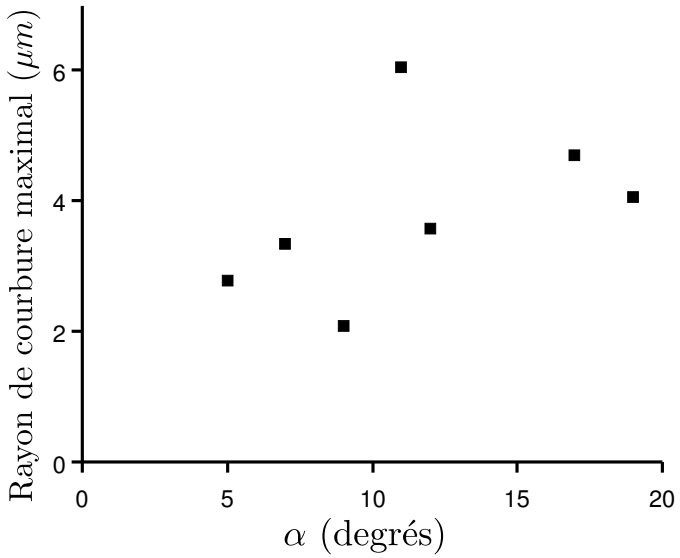

Figure 3.58 – Rayon de courbure minimal, calculé à partir de l'ajustement d'une parabole sur le contour des cellules de la pointe anti-adhésive. Un point représente une mesure.

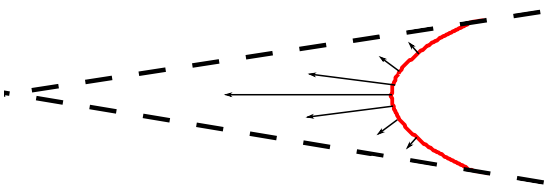

Figure 3.59 – La distance entre le bord libre de la monocouche et la frontiere de la zone non adhesive n'est pas constante, donc la tension n'est pas homogène. Cela peut expliquer la forme non circulaire du contour de l'îlot.

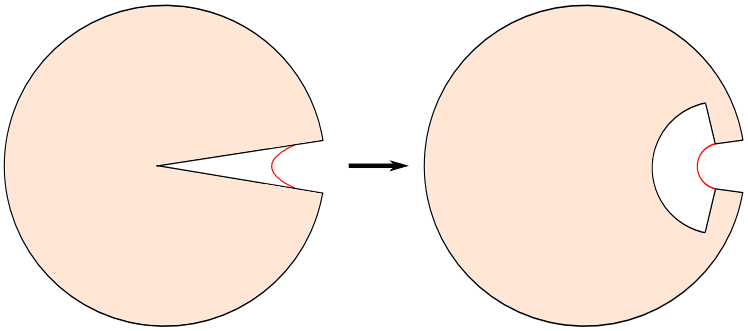

Figure 3.60 – Un exemple de transformation de la forme de la zone anti-adhésive dans le but d'obtenir des conditions de tension isotrope. La couleur rose représente la zone adhésive. La ligne rouge représente le contour des cellules sur la zone anti-adhésive. Il s'agit d'utiliser la forme pointue pour initier le recouvrement, avant de passer à une forme circulaire pour étudier le contour de l'îlot sur la partie anti-adhésive.

câble n'est pas déformé par la tension de surface partout de la même manière. En particulier, il est beaucoup plus déformé au centre de la pointe (avec beaucoup de cellules en tension dans cette direction) que vers les bords de la pointe (voir figure 3.59). Il faudrait donc inclure ces variations locales de σ dans le modèle.

Expérimentalement, une manière pratique de se soustraire de cette anisotropie pourrait être d'utiliser un traitement de surface photoactivable (Vignaud *et al.*, 2012), avec la possibilité de transformer les propriétés adhésives du substrat en cours de culture. Il serait alors possible d'initier le recouvrement d'une zone anti-adhésive en forme pointue, puis de modifier les conditions d'adhésion pour augmenter l'isotropie.

Il serait égalemement possible de réduire l'anisotropie en utilisant dès le départ

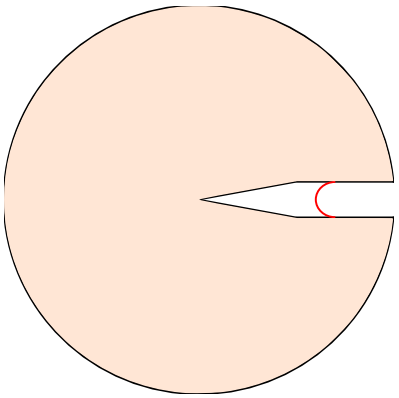

Figure 3.61 – Un exemple de motif adhésif permettant de réduire l'anistropie de la tension de surface.

un motif adapté. Par exemple, une pointe (pour initier le recouvrement) suivie d'une bande anti-adhésive de largeur donnée (figure 3.61).

3.3.4 Perturbations du câble ou de l'épithélium

3.3.4.1 Ablation d'une portion de câble

Un câble d'actine marque le contour de l'épithélium y compris sur la pointe anti-adhésive. De manière similaire au cas des motifs anti-adhésifs circulaires, nous effectuons une ablation laser de ce câble d'actine.

L'ablation est d'abord réalisée sur le câble d'actine lui-même au milieu de la largeur de la pointe (figure 3.62). Dans ce cas, les cellules se rétractent dans la direction opposée à la région de l'ablation. En particulier, les cellules proches du câble de part et d'autre de la région de l'ablation se déplacent dans la direction du câble (vers le haut et vers le bas de l'image). Les cellules situées sur la pointe, en retrait de la zone d'ablation, se déplacent dans la direction de l'extrémité de la pointe (vers la droite de l'image).

L'ablation d'une portion de câble située le long de la pointe anti-adhésive est suivie d'une rétraction du câble avec une vitesse caractéristique de 30 secondes. Ensuite les cellules situées sur la pointe acquièrent un mouvement d'ensemble vers le haut de l'image, soit dans la direction opposée à la région de l'ablation (figure 3.63, et une vidéo est disponible en ligne, l'adresse est précisée en annexe A.2.6).

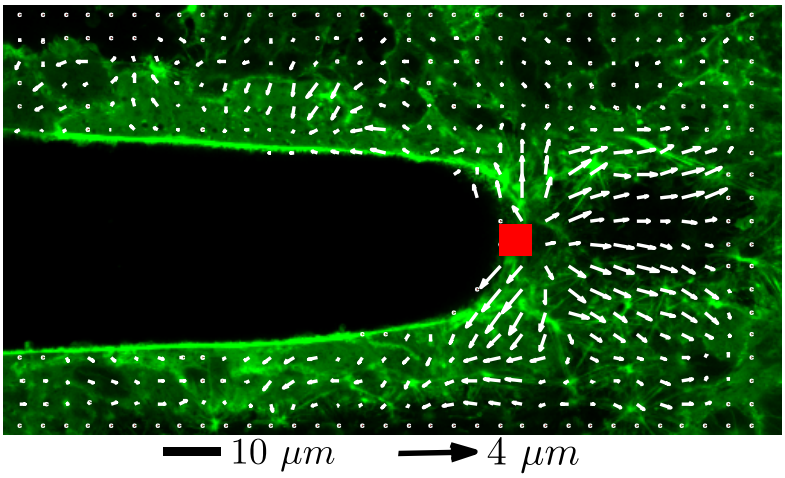

Figure 3.62 – Evolution spatiotemporelle de l'extrémité du câble d'actine après l'ablation. Le temps caractéristique de la rétraction est de 30 secondes. (b) Image en fluorescence de cellules MDCK LifeAct sur un motif de type Pacman. Les déplacements représentés ici sont les déplacements pendant 100 secondes après l'ablation. La région d'ablation du câble est délimitée par le carré rouge.

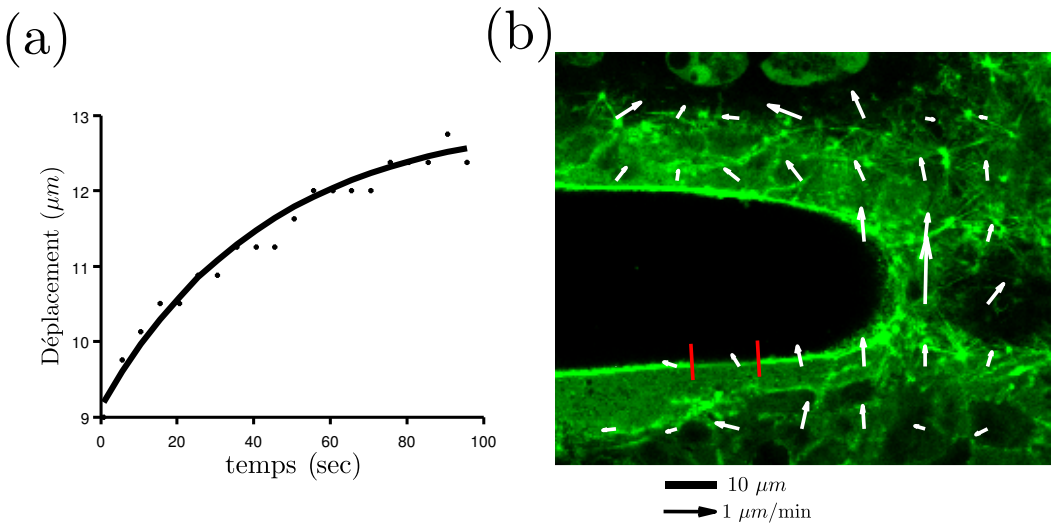

Figure 3.63 – (a) Evolution spatiotemporelle de l'extrémité du câble d'actine après l'ablation. Le temps caractéristique de la rétraction est de 30 secondes. (b) Image en fluorescence de cellules MDCK LifeAct sur un motif de type Pacman et le champ de vitesse 40 secondes après l'ablation. La région d'ablation du câble est délimitée par les traits rouges.

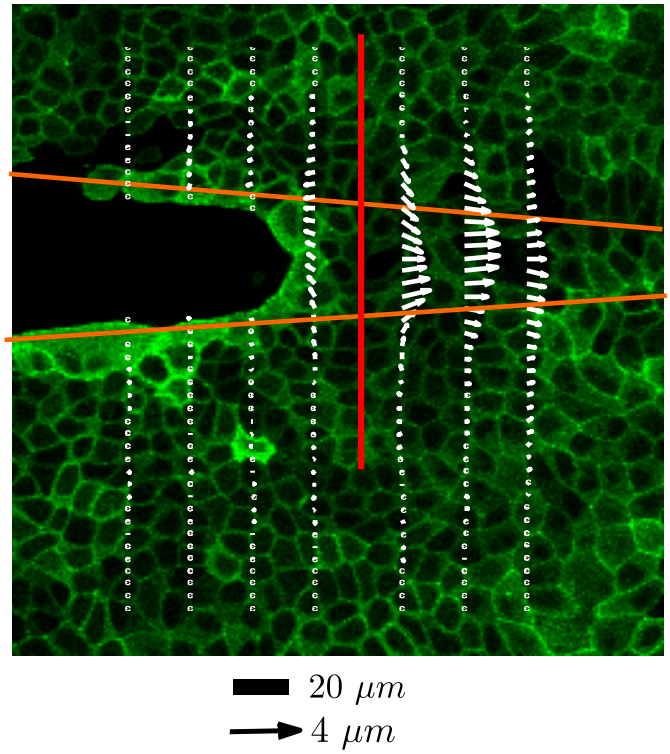

Figure 3.64 – Image en fluorescence de cellules MDCK LifeAct sur un motif de type Pacman et le champ de déplacements induit par l'ablation d'une ligne de cellule. La région d'ablation est représentée par la ligne rouge verticale. Les contours de la pointe adhésive sont figurés par les lignes orange. Les déplacements représentés ici sont les déplacements pendant 100 secondes après l'ablation.

3.3.4.2 Ablation de cellules

Nous réalisons également des ablations à l'échelle multicellulaire.

Dans l'expérience d'ablation présentée dans la figure 3.64, la région concernée par l'ablation est une ligne verticale, perpendiculaire à la direction de la pointe anti-adhésive, et s'étendant sur 50 µm de part et d'autre de la pointe.

Dans ce cas, nous constatons que les cellules situées sur la région adhésive sont peu perturbées par l'ablation. Au contraire, les déplacements des cellules situées sur la pointe adhésive sont bien plus importants. De manière surprenante, les cellules entre la région d'ablation et l'extrémité de la pointe se déplacent beaucoup plus que les cellules entre la région d'ablation et le bord libre. Nous pouvons qualitativement interpréter cette assymétrie en considérant la tension exercée sur les cellules situées sur la pointe anti-adhésive (voir figure 3.65). Ces cellules sont effet en tension entre le câble et le bord de la région adhésive. Après l'ablation, une partie du bord libre est toujours mécaniquement liée avec une partie du bord de la région adhésive non touchée par l'ablation. Puisque cette région est toujours sous tension, elle se

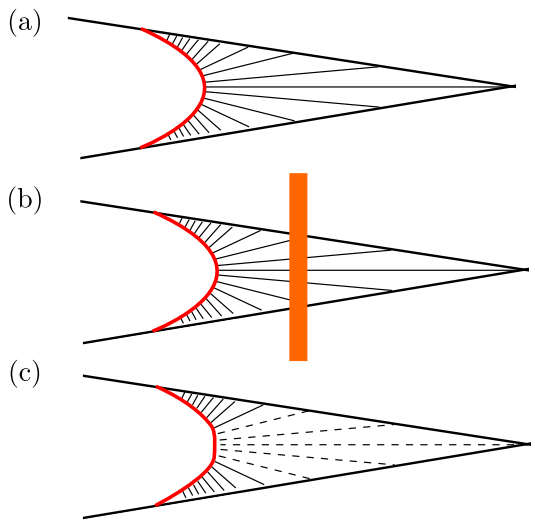

Figure 3.65 – Interprétation des mouvements des cellules après l'ablation. (a) Avant l'ablation, les cellules situées sur la pointe anti-adhésive sont en tension entre le contour de l'îlot et les cellules adhérant sur la partie adhésive. (b) La région d'ablation est représentée par la ligne orange. (c) Après l'ablation, certaines cellules ne sont plus en tension (représentée en lignes pointillées) : il s'agit d'une région limitée de la pointe à gauche de la région d'ablation d'une part, mais également toute la partie de la pointe à droite de la région d'ablation. Cette dernière région est en partie libérée des contraintes mécaniques qui la reliaient avec le bord libre.

déforme peu. Au contraire, les cellules du côté de l'extrémité de la pointe ne sont plus liées mécaniquement au bord libre puisque l'ablation a rompu la continuité de la monocouche : ces cellules ne sont plus soumises qu'à leur propre tension de surface, elles se rétractent donc vers l'extrémité de la pointe.

Une autre ablation est réalisée dans la direction parallèle à la pointe (figure 3.66). Là encore, les cellules sur la région adhésive ne sont pas perturbées par l'ablation. Les cellules sur la pointe anti-adhésive se rétractent à la fois dans une direction opposée à la région d'ablation et dans la direction du câble d'actine (vers la gauche sur la figure 3.66).

Toutes ces ablations confirment que des cellules situées sur la pointe anti-adhésive sont en tension et que cette tension est dûe au câble (qui tend à faire progresser les cellules sur la pointe) et aux cellules adhérant à la partie adhésive (qui tendent à faire reculer les cellules de la pointe).

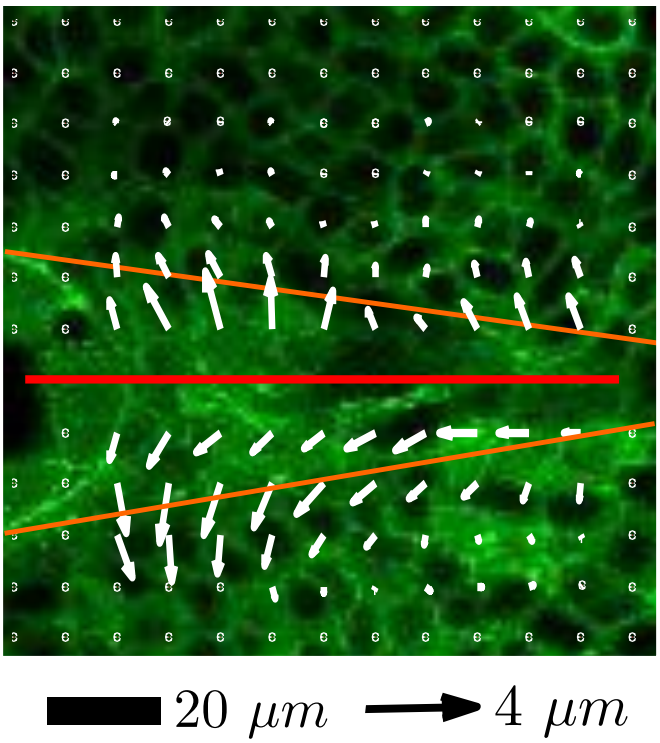

Figure 3.66 – Image en fluorescence de cellules MDCK LifeAct sur un motif de type Pacman et le champ de déplacements induit par l'ablation d'une ligne de cellules. La région d'ablation est représentée par la ligne rouge horizontale. Les contours de la pointe adhésive sont figurés par les lignes orange. Les déplacements représentés ici sont les déplacements pendant 100 secondes après l'ablation.

3.3.5 Inhibition

Des inhibitions de certains acteurs importants des propriétés mécaniques cellulaires sont réalisées. Les inhibiteurs sont ajoutées au milieu de culture 4 jours après l'ensemencement des substrats. Le recouvrement de la pointe a alors atteint un état stationnaire, décrit par la figure 3.51. Nous mesurons l'effet des inhibitions en mesurant D, la distance recouverte par les cellules, juste avant l'inhibition, et 10h après l'inhibition.

la latrunculine, (un inhibiteur de la polymérisation de l'actine) a un effet visible sur D ($< \Delta D/D >= -0.07, \mathrm{std}(\Delta D/D) = 0.03$). Le bord de l'îlot se rétracte (figure 3.67). Parfois même il apparaît une «bulle» : l'épithélium s'ouvre au-dessus de la région anti-adhésive.

L'inhibition de Rac (avec NSC23766), de Rho (avec Y27632) ne modifie pas significativement la position des cellules sur la pointe. Respectivement, $< \Delta D >$

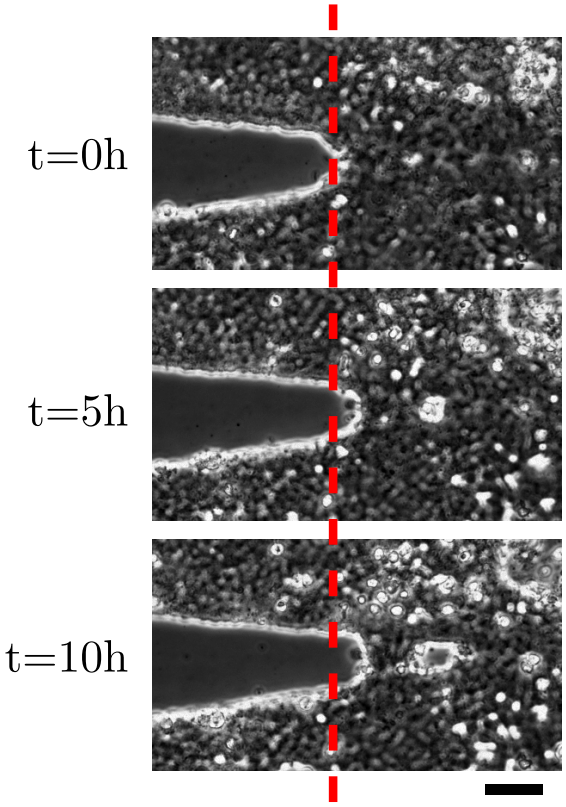

Figure 3.67 – Inhibition de la polymérisation de l'actine par la latrunculine, sur des cellules en culture sur un motif Pacman (angle 16°). Barre 50 µm.

$/D = 0.002$ (std$(\Delta D/D) = 0.06$), $< \Delta D/D >= 0.008$), std$(\Delta D/D) = 0.04$). De façon surprenante, l'inhibition de la myosine (par la blebbistatine) n'a pas non plus d'effet significatif sur la position des cellules sur la pointe ($< \Delta D/D >= -0.004, \text{std}(\Delta D/D) = 0.03$).

3.3.6 Conclusion

Tout comme un motif anti-adhésif circulaire peut être recouvert par des cellules en fonction de sa taille (partie 3.2, une pointe anti-adhésive est également plus ou moins recouverte par les cellules en fonction de son angle. Les ablations réalisées sur le câble et sur des groupes de cellules, ainsi que l'effet notable de la latrunculine sur les cellules de la pointe, confirment que les cellules situées sur la pointe sont sous tension, et que cette tension équilibre la tension de ligne du câble. Le résultat de cet équilibre sur la forme du câble n'est pas un profil circulaire, signature d'une tension de ligne et d'une tension de surface uniformes, mais plutôt une déformation d'un profil circulaire vers un profil parabolique due à l'anisotropie de la tension de

surface. La suite logique de ce travail consistera à inclure ces variations locales de la tension de ligne et de la tension de surface dans la description du profil.

Conclusion

Au cours de cette thèse, nous avons cherché à décrire le comportement d'un épithélium sur un substrat spatialement limité. Nous avons d'abord développé un traitement de surface permettant de rendre une lame de verre localement anti-adhésive, de façon pérenne, précise, et sans aucune contrainte de géométrie. Nous avons étudié trois motifs adhésif/anti-adhésif différents : un motif adhésif circulaire confinant l'épithélium dans une géométrie simple, et deux motifs anti-adhésifs permettant d'étudier les effets antagonistes de la tension de ligne et de la tension de surface.

Dans la première expérience, l'épithélium est confiné dans une géométrie circulaire. Nous avons montré que le confinement avait des effets sur la migration et sur la prolifération cellulaire. Nous avons caractérisé les champs de vitesse et observé des oscillations de grande amplitude de la vitesse radiale dont la période correspond à l'hypothèse d'une onde de contraintes se propageant dans l'épithélium et rebondissant sur les bords du substrat. Nous avons également caractérisé l'apparition d'un bourrelet tridimensionnel de cellules à la périphérie de l'épithélium, rappelant les premières étapes de la tubulogénèse.

Dans la seconde expérience, l'épithélium croît autour de motifs circulaires anti-adhésifs. Nous avons montré que le recouvrement de tels motifs nécessite un câble d'actomyosine supracellulaire, et que la tension de ce câble définit un rayon critique au-delà duquel le motif ne peut pas être recouvert par l'épithélium. Nous montrons également que la dynamique des derniers instants de la fermeture fait intervenir la friction des cellules et du câble.

Dans la dernière expérience présentée, nous avons décrit le recouvrement partiel

d'une zone anti-adhésive en forme de secteur angulaire par l'épithélium. La distance couverte par l'épithélium est directement dépendante de l'angle du secteur angulaire. La forme du bord libre de l'épithélium au dessus de la zone anti-adhésive est contrôlée par un équilibre entre le câble d'actomyosine et la contractilité des cellules sur la zone anti-adhésive.

Ces expériences de confinement d'un épithélium sur un substrat spatialement limité ont donc permis de mettre en évidence le rôle essentiel de l'interaction entre la tension de ligne et la tension de surface dans la définition de la forme du contour du bord libre. En situation confinée, les cellules épithéliales exhibent également des caractères spécifiques à cette situation, tels que des déplacements de grandes amplitudes et la formation d'une structure tridimensionnelle à la périphérie.

Le traitement de surface décrit dans cette étude autorise la conception de n'importe quelle forme de motif adhésif ou anti-adhésif. En particulier, la suite de cette étude pourra porter sur la croissance d'un épithélium sur un réseau de motifs adhésifs circulaires, décrits dans la figure 3.68. Dans une telle situation, le passage d'un motif adhésif au suivant par-dessus la zone anti-adhésive n'est possible que pour les motifs suffisamment proches. Si les motifs sont trop éloignés les uns des autres, la situation revient à une situation de confinement telle qu'elle est décrite dans la partie 3.1, avec une forme du bord libre proche de celle décrite par Bischofs *et al.* (2008) dans le cas cellulaire. Si les motifs sont très proches, les cellules peuvent recouvrir les zones anti-adhésives sans être ralenties, comme dans le cas des petits motifs anti-adhésifs circulaires de la partie 3.2. Dans les cas intermédiaires, les îlots sont temporairement confinés sur un ensemble de motifs, de manière similaire à Vianay *et al.* (2010) à l'échelle cellulaire. Dès qu'une cellule parvient à atteindre un motif adhésif encore non recouvert, elle l'envahit et permet l'expansion de l'îlot. Dans cette expérience, l'expansion de l'îlot est artificiellement «ralentie», par rapport à la croissance sur un substrat adhésif homogène, mais la densification subsiste. Finalement, l'îlot est à la fois dense et en expansion, ce qui est habituellement incompatible. Un bourrelet périphérique peut même se former, puis s'étaler à la faveur de l'envahissement d'un nouveau motif adhésif, puis se reformer encore, etc.

Cette expérience permettrait d'étudier de manière plus approfondie les interactions entre la tension de ligne, la tension de surface, la densité locale, le taux de division, ou encore la vitesse de migration.

Nous nous sommes concentrés dans cette thèse sur le confinement d'un épithé-

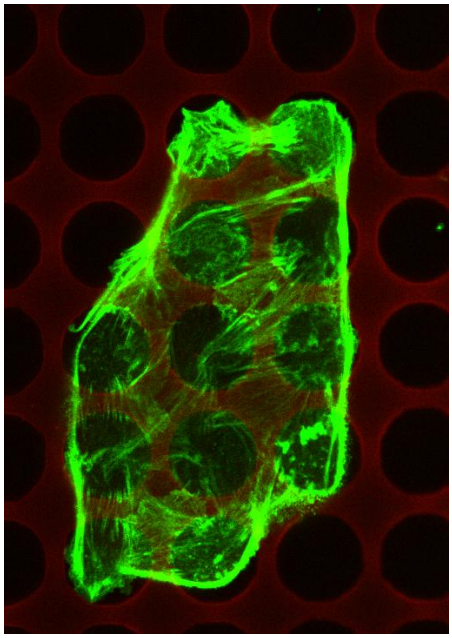

Figure 3.68 – Cellules MDCK LifeAct sur un réseau de motifs adhésifs, de rayon 13 µm, et distants de 16 µm (la distance bord à bord est de 3 µm). On remarquera le cable d'actine tout autour de l'îlot, ainsi que les filaments d'actine parcourant tout l'îlot, d'un motif à l'autre.

lium. Avec les mêmes outils, nous pouvons également étudier les interactions entre populations de cellules identiques ou différentes.

Au-delà de l'intérêt pour l'étude fondamentale des propriétés physiques des structures multicellulaires, cette étude décrit également un traitement de surface autorisant le confinement de cellules sur des motifs adhésifs pendant plusieurs semaines. Les possibilités de la microfabrication sont telles qu'il est envisageable de produire des lamelles contenant quelques milliers de motifs. Associée à des méthodes d'analyse d'images basée sur les outils morphomathématiques, cette technique de traitement de surface ouvre la voie à des expériences de biologie cellulaire à l'échelle pluricelluaire menées massivement en parallèle (high throughput).

A

Annexes

A.1 Microscopie à contraste de phase

Une stratégie pour augmenter le contraste d'objets transparents est de convertir le déphasage de la lumière transmise dûe à la présence d'objet d'indice optique différent de celui du milieu en amplitude lumineuse. C'est le principe de la microscopie à contraste de phase (Bennett *et al.*, 1951). Le principe a été énoncé par Frits Zernike en 1934 et lui a valu son Prix Nobel de physique en 1953. Même si son usage est très courant aujourd'hui, l'explication du principe mérite quelques lignes.

Lorsque la lumière traverse un échantillon, elle voit sa phase avancer ou retarder. Cette effet est dû aux propriétés ondulatoires de la lumière et à la différence d'indice entre l'échantillon et le milieu environnant. Considérons une cellule d'indice n_1 dans un milieu de culture d'indice n. L'onde lumineuse traverse la cellule d'épaisseur L à une vitesse c/n_1 (où c est la vitesse de la lumière dans le vide). L'onde lumineuse après la cellule s'écrit :

$$E(L,t) = E_{0,t}\, \mathrm{e}^{i\frac{2\pi}{\lambda}n_1 L}$$

où $E_{0,t}$ est le champ avant la cellule. L'onde a été déphasée d'une quantité $\Delta = \frac{2\pi}{\lambda}(n_1 - n)L$ par rapport à l'onde qui n'aurait pas traversé la cellule. L'indice optique d'une cellule est compris entre 1.35 et 1.37 (Curl *et al.*, 2005). L'indice optique du milieu de culture, comparable à celui de l'eau, est de 1.33. Le déphasage induit par la présence de la cellule de quelques 5 µmd'épaisseur est de 150 nm, soit une fraction de longueur d'onde de lumière visible.

Pour deux ondes S (pour «Surround») et P (pour «Particulaire») de même

amplitude E_S et déphasée d'une faible quantité Δ, on peut écrire l'une comme la somme de l'autre et d'une onde de plus faible amplitude E_D et déphasée d'un quart de longueur d'onde (voir figure A.1). Alors $E_D = i\Delta E_S$.

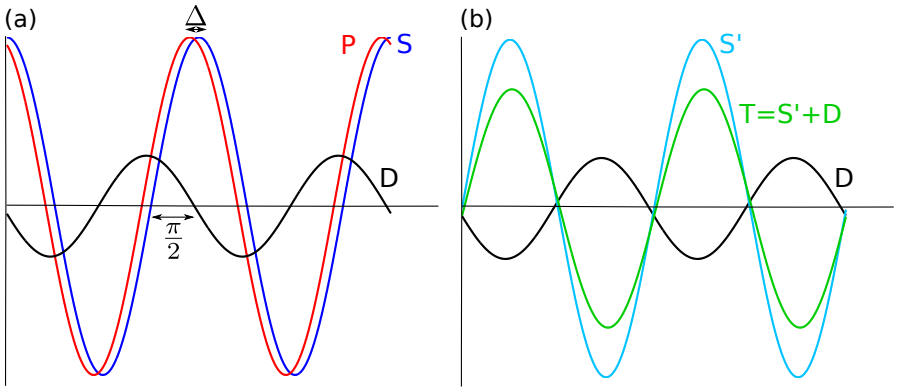

Figure A.1 – (a) Intensité des ondes S et P, et décomposition de l'onde P comme somme des ondes S et D. Si S et P sont déphasées de Δ, alors S et D sont déphasées de $\frac{\pi}{2}$. (b) L'onde totale T est la somme des ondes S' (S déphasée de $\frac{\pi}{2}$) et D.

On utilise cette réécriture pour décrire les ondes dans le cas de la traversée de la cellule : l'onde retardée par la présence de la cellule (onde P) est la somme d'une onde non retardée correspondant au cas sans cellule, dite «non déviée» (onde S) et d'une onde «déviée», de faible amplitude et déphasée de $\lambda/4$ (onde D) [1].

Dans les régions sans cellule, la lumière provient de l'onde S uniquement. Dans les régions avec cellules, la lumière provient de la somme de l'onde S et de l'onde D (voir figure A.2).

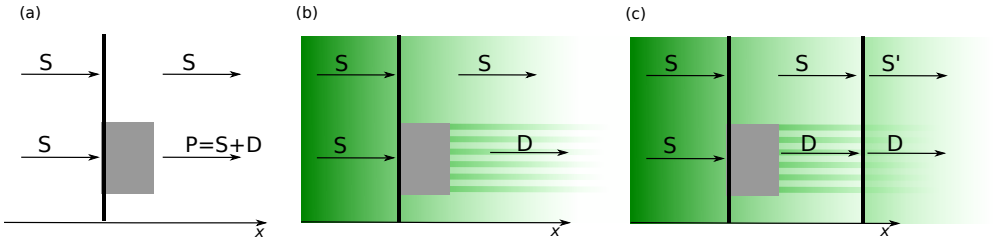

Figure A.2 – (a) L'onde S arrive sur la cellule (représentés en gris ici). L'onde P qui en ressort est décomposée en onde S (similaire à l'onde incidente), dite «onde non déviée» et onde D, dite «onde déviée». (b) L'onde S parcourt toute la surface de l'échantillon, alors que l'onde D n'apparaît que par un déphasage due à la cellule.(c) L'ajout d'une lame quart d'onde permet de déphaser S en S' sans modifier D.

L'interférence de l'onde S avec l'onde D redonne donc l'onde P, de même amplitude que l'onde S. Le contraste entre les zones avec et sans cellules est donc

1. Dans le cas général, on peut écrire P=S+D, soit D=P-S : $E_D = E_P - E_S = E_S(\mathrm{e}^{i\Delta} - 1)$. Pour Δ petit, on a $E_D = E_S(1 + i\Delta - 1) = i\Delta E_S$.

très faible. Pour accentuer ce contraste, on déphase l'onde S en S' d'une quantité θ après la traversée de la cellules (voif figure A.2). Ainsi, l'onde totale résultant de la somme de l'onde D et de l'onde S' est :

$$\begin{aligned} E_T &= E_D + E'_S \\ &= E_D + E_S \, \mathrm{e}^{i\theta} \\ &= i\Delta E_S + E_S \, \mathrm{e}^{i\theta} \end{aligned}$$

L'intensité lumineuse est définie comme le carré de la norme de l'onde :

$$\begin{aligned} I = |E_T|^2 &= E_T E_T^* \\ &= (i\Delta E_S + E_S \, \mathrm{e}^{i\theta})(-i\Delta E_S + E_S \, \mathrm{e}^{-i\theta}) \\ &= E_S^2(\Delta^2 + 1 - \Delta i(\mathrm{e}^{i\theta} - \mathrm{e}^{-i\theta})) \\ &= E_S^2(\Delta^2 + 1 + 2\Delta \sin\theta) \end{aligned}$$

On peut ajuster θ afin d'avoir la plus grande dynamique possible, c'est-à-dire la plus grande différence d'intensité entre les cas $\Delta = 0$ et $\Delta = \Delta_0$. On cherche donc à maximiser :

$$\begin{aligned} &(\Delta_0^2 + 1 + 2\Delta_0 \sin\theta) - (0^2 + 1 + 0 \cdot 2\sin\theta) \\ =&\Delta_0^2 + 2\Delta_0 \sin\theta \end{aligned}$$

ce qui revient à maximiser $\sin\theta$. C'est le cas pour $\theta = \pi/2$. Le contraste de phase est assuré par l'utilisation d'une lame quart d'onde.

Enfin, on peut encore améliorer le contraste en diminuant l'intensité de l'onde S' d'un facteur α (après le passage de l'onde par les cellules).

Ainsi, l'amplitude de l'onde totale, qui est la somme de l'onde S' non déviée (mais retardée de $\lambda/4$ et atténuée de α) et de l'onde D déviée, est

$$\begin{aligned} E_T &= \alpha E_S \, \mathrm{e}^{i\frac{\pi}{2}} + E_D \\ &= \alpha i E_S + E_S(\mathrm{e}^{i\Delta} - 1) \\ &= E_S(\cos\Delta - 1) + i(\sin\Delta + \alpha) \end{aligned}$$

Et l'intensité lumineuse est alors :

$$\begin{aligned} I_T &= E_S^2((\cos\Delta - 1)^2 + (\sin\Delta + \alpha)^2) \\ &= I_S(4\sin^2(\frac{\Delta}{2}) + 2\alpha\sin\Delta + \alpha^2) \end{aligned}$$

On cherche à avoir un contraste le plus élevé possible entre les zones à petits Δ et les zones à grands Δ. On définit le contraste :

$$\begin{aligned} K &= \frac{I_P - I_S}{I_S} \\ &= \frac{(4\sin^2(\frac{\Delta}{2}) + 2\alpha\sin\Delta + \alpha^2) - \alpha^2}{\alpha^2} \\ &= \frac{4\sin^2(\frac{\Delta}{2}) + 2\alpha\sin\Delta}{\alpha^2} \end{aligned}$$

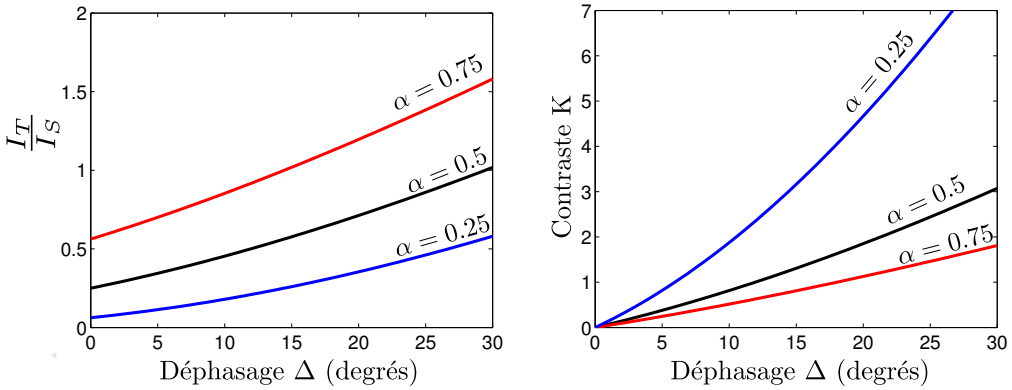

Figure A.3 – Intensité lumineuse relative provenant des cellules, et contraste lumineux, en fonction du déphasage Δ, pour 3 valeurs de α différentes (0.25, 0.5 et 0.75)

Un faible α augmente le contraste, mais diminue en même temps l'intensité lumineuse reçue des cellules I_P (figure A.3). Il faut donc trouver un compromis entre ces deux effets. En général, un facteur d'atténuation de l'ordre de 50% est choisi.

En pratique, il possible de déphaser uniquement l'onde S après traversée de l'échantillon sans modifier l'onde D par en jouant sur le parcours de la lumière. Avant l'objet, la lumière traverse un anneau de phase (ou diaphragme annulaire). Une partie de la lumière est bloquée par ce diaphragme, l'autre passe sans modification. Un disque de phase est placé après l'objectif. Ce disque en matériau transparent contient un anneau gravé à sa surface. L'épaisseur réduite a pour but de raccourcir de $\lambda/4$ le trajet optique des rayons de l'onde S. En effet, l'anneau

gravé est l'exact complémentaire de l'image du diaphragme annulaire par l'objectif. C'est une lame quart d'onde. L'onde S est avancée d'une phase $\pi/2$ par rapport à l'onde D qui elle traverse une partie de la lame de phase plus épaisse. De plus, l'anneau gravé est recouvert d'une fine couche de métal pour atténuer l'intensité de l'onde S.

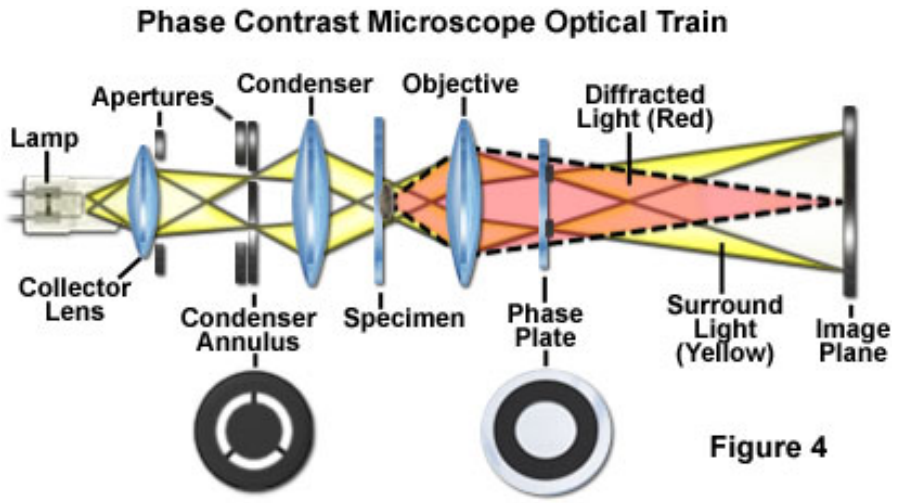

Figure A.4 – Schéma du dispositif optique avec anneau de phase et disque de phase. (Nikon MicroscopyU)

Du fait de leur nature ondulatoire, les rayons lumineux passant par les cellules sont diffractés. Donc certains rayons de l'onde D ne passent pas par la partie transparente du disque de phase, mais par la partie gravée (lame quart d'onde et film metallique). Par conséquent, l'onde D est avancée et attenuée, et interfère avec l'onde S (également avancée et atténuée) :

$$\begin{aligned} E_T &= E_D\alpha\, \mathrm{e}^{i\frac{\pi}{2}} + E_S\alpha\, \mathrm{e}^{i\frac{\pi}{2}} \\ &= E_S(\mathrm{e}^{i\Delta} - 1)\alpha\, \mathrm{e}^{i\frac{\pi}{2}} + E_S\alpha\, \mathrm{e}^{i\frac{\pi}{2}} \\ &= E_S i\alpha\, \mathrm{e}^{i\Delta} \end{aligned}$$

Et finalement l'intensité lumineuse résultante est :

$$I_T = |E_T|^2 = \alpha^2 E_S^2 = \alpha^2 I_S$$

Donc les parties des cellules qui diffractent fortement la lumière, comme les membranes cellulaires latérales, ont à l'image une intensité indépendante du déphasage Δ et apparaissent donc uniformément blanches. On parle de «halo».

Ce halo correspond donc principalement au bord des cellules et est utilisé en

analyse d'image pour détecter le contour des cellules. Cependant, il faut ajouter que la position exacte du halo ne coïncide pas exactement avec le bord de la cellule. Une déconvolution du halo est possible pour extraire la forme réelle de la cellule, mais n'est pas aisée (Yin *et al.*, 2012). En première approximation, on considère que le bord de la cellule correspond au maximum d'intensité du halo. Le halo a une largeur typique de 5 µm. L'erreur sur la position exacte du contour est donc typiquement de $\pm 1 \mu m$. Notons que pour une cellule de 50-500 μm^2, l'erreur sur la mesure de l'aire est de 100% pour les petites cellules, et de 30% pour les plus grandes.

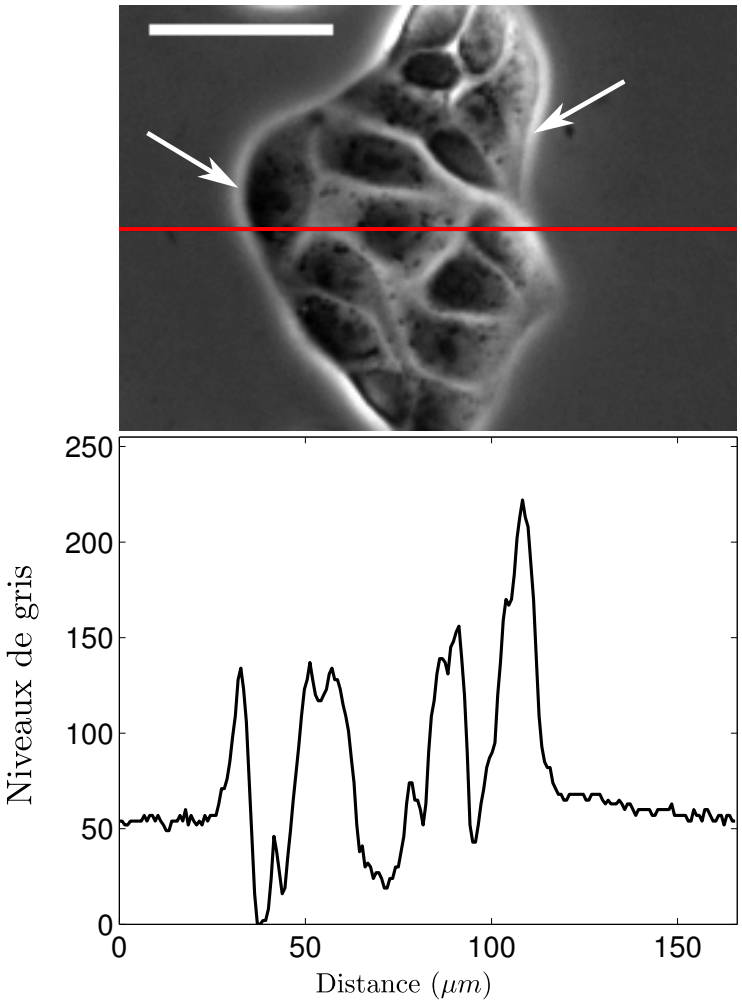

Figure A.5 – (a) Ilôt de quelques cellules MDCK sur une lame de verre, en microscopie à contraste de phase, avec un objectif 10x, barre=50 µm. Les flèches désignent le halo. (b) Profil de niveaux de gris correspondant à la ligne rouge sur l'image (a). On voit clairement que le coeur des cellules est plus foncé que le niveau de gris du substrat, et qu'un halo blanc apparaît à l'emplacement des membranes latérales des cellules.

Enfin, précisons que le halo est d'autant plus intense que la cellule diffracte

fortement la lumière. Cet effet est maximal quand le bord de la cellule est vertical, et beaucoup plus faible quant la cellule est étalée sur le substrat.

A.2 Vidéos

Des vidéos de certaines expériences sont disponibles en ligne.

- 1. Croissance de cellules sur un motif adhésif circulaire, de rayon 50 µm : `http://www.youtube.com/watch?v=jtVEYst8tmM`
- 2. Fermeture de l'épithélium autour d'un motif anti-adhésif circulaire de diamètre 70 µm : `http://www.youtube.com/watch?v=5mleBYYL0sI`
- 3. Détachement d'une adhésion focale autour d'un motif anti-adhésif circulaire. Les cellules sont marquées vinculine-GFP : `http://www.youtube.com/watch?v=FimlnSDupfE`
- 4. Ablation d'une portion du câble d'actine autour d'un motif anti-adhésif circulaire : `http://www.youtube.com/watch?v=PHzibqaSVG8`
- 5. Recouvrement d'une partie de la pointe d'un Pacman, d'angle 8° : `http://www.youtube.com/watch?v=ilfLzA3-fIs`
- 6. Ablation d'une portion du cable le long de la pointe d'un Pacman : `http://www.youtube.com/watch?v=_kibJm6J3Nw`

A.3 Automated velocity mapping of migrating cell populations

Cet article s'accompagne de deux logiciels (AVeMap et AVeMap+).
L'article entier est disponible à l'adresse suivante :
`http://xfer.curie.fr/get/XzWC3SuYrA7/Avemap_Paper.pdf`

Automated velocity mapping of migrating cell populations (AVeMap)

Maxime Deforet[1*], Maria Carla Parrini[2*], Laurence Petitjean[1], Marco Biondini[2], A. Buguin[1], Jacques Camonis[2†], Pascal Silberzan[1†]

1- Laboratoire Physico-chimie Curie – UMR 168; Institut Curie, Centre de Recherche; CNRS; UPMC; F-75248 Paris, France
2- Analysis of Transduction Pathways Group - U830 ; Institut Curie, Centre de Recherche ; Inserm ; F-75248, Paris, France

ABSTRACT

Characterizing the migration of a population of cells as required for wound-healing experiments, remains laborious and somewhat subjective. Advances in genetics and robotics allow performing many experiments in parallel but analyzing the large sets of data remains a bottleneck. Here, we propose a rapid, fully automated correlation-based method, compatible with standard video-microscopy. This method allows the computation of quantitative migration parameters via an extensive dynamical mapping of the displacements.

[*] Equal contribution

[†] Equal contribution

A.4 Structural and mechanical heterogeneity of the erythrocyte membrane reveals hallmarks of membrane stability

Notre contribution dans ce travail a été l'écriture d'un algorithme et d'une interface graphique permettant d'extraire rapidement et facilement la forme du cytosquelette à partir d'image AFM (voir par exemple les figures 3a et 5a).

L'article en entier est disponible à l'adresse suivante :

`http://xfer.curie.fr/get/7LEwefHX7Vk/Picas_paper.pdf`

Structural and mechanical heterogeneity of the erythrocyte membrane reveals hallmarks of membrane stability

Laura Picas[1], Félix Rico[1], Maxime Deforet[2], Simon Scheuring[1,*]

[1]U1006 INSERM, Aix-Marseille Université, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, F-13009 France
[2]PhysicalChemistry Curie - Institut Curie / CNRS UMR 168 / Paris, France.
* Corresponding author. simon.scheuring@inserm.fr

Abstract

The erythrocyte membrane, a metabolically regulated active structure that comprises lipid molecules, junctional complexes and the spectrin network, enables the cell to undergo large passive deformations when passing through the microvascular system. Here we use atomic force microscopy (AFM) imaging and quantitative mechanical mapping at nanometer resolution to correlate structure and mechanics of key components of the erythrocyte membrane, crucial for cell integrity and function. Our data reveals structural and mechanical heterogeneity modulated by the metabolic state. Absence of skeleton network junction complexes phosphorylation in ATP-depleted cells leads to membrane stiffening. Analysis of ghosts and shear-force opened erythrocytes show that, in absence of cytosolic kinases, spectrin phosporylation results in stiffening at the extracellular face and a reduced junction remodeling in response to loading forces. Topography and mechanical mapping of single components at the cytoplasmic face reveals that, surprisingly, spectrin phosphorylation by ATP softens individual filaments. Our findings suggest that, besides the mechanical signature of each component, the RBC membrane mechanics is regulated by the metabolic state and the assembly of its structural elements.

Keywords: Atomic force microscopy / erythrocyte / mechanics / spectrin.

Introduction

A.5 A Facile and Versatile Approach to Design Self-Assembled Monolayers on Glass using Thiol-ene Chemistry

Cet article décrit l'adhésion d'une monocouche auto-assemblée (Self-Assemby Monolayer, SAM) de PEG sur des oxydes de silicium, en particulier sur les substrats en verre dans le cadre d'une utilisation en biologie cellulaire. Une réaction de type thiol-ène à partir de composés disponibles commercialement est utilisée. Elle fournit des SAM de haute qualité, permettant de concevoir des motifs adhésifs et anti-adhésifs.

Notre contribution à ce travail a été de cultiver et d'imager des cellules MDCK ensemencées sur des substrats traités, afin d'en étudier les propriétés d'adhésivité.

L'article en entier est disponible à l'adresse suivante :

`http://xfer.curie.fr/get/Myic5OtLV25/Oberleitner_paper.pdf`

ChemComm

Dynamic Article Links ►

Cite this: DOI: 10.1039/c0xx00000x

www.rsc.org/xxxxxx

COMMUNICATION

A Facile and Versatile Approach to Design Self-Assembled Monolayers on Glass using Thiol-ene Chemistry

Birgit Oberleitner,[a,e] Antoine Dellinger,[a,c] Maxime Déforet,[a,b] Anouk Galtayries,[c] Anne Sophie Castanet[d] and Vincent Semetey*[a,b]

Received Xth June 2012, Accepted Xth XXXXXXXXX 20XX
DOI: 10.1039/b000000x

This work describes an integrated approach for designing on demand Self Assembled Monolayer (SAM) on silicon oxides and particularly glass substrate for cell biology applications. Starting from commercially available compounds, the strategy relies on thiol-ene reaction and provides high quality SAM exhibiting adhesive and anti-adhesive pattern.

The control of non-specific biomolecules adsorption (such as proteins) and cell adhesion is of high interest for various fields of biotechnology, such as bioanalytics, cell biology, tissue engineering and biomaterials. An efficient method to control adsorption[1] includes the use of well-defined oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers.[2,3] However, multiple processing steps are often required to prepare SAMs : (i) the use of glass substrate (like microscope slide and cover slide) widely used in biology requires the synthesis of trichlorosilane derivatives such as oligo(ethylene glycol)-terminated alkyltrichlorosilanes[4] or the tedious deposition of metals such as gold followed by the chemisorption of $HS(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_mOH$ derivatives and (ii) the preparation of patterned surfaces implies sophisticated technics like microcontact printing (μCP)[5] that are furthermore poorly compatible with trichlorosilane reagents. To address these problems of surface modification, we have developed a simple method relying on the powerful thiol-ene reaction[6-8] to prepare self-assembled monolayer on silicon oxide to control bioadhesion on surfaces starting from commercially available building blocks, and taking advantage of the photoreaction to easily create patterns.

Figure 1A schematically illustrates our approach. To prepare the oligo(ethylene glycol)-terminated SAM via the thiol-ene reaction, silicon oxide surfaces (Glass substrate, Si wafer) were first functionalized with an alkene terminated SAM by liquid phase deposition of undecenyltrichlorosilane.[9] Then a commercially available oligo(ethylene glycol) derivative **1** was allowed to react with the vinyl-terminated SAM in the presence of a photoinitiator such as 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (IRGACURE 651) or 2-Benzyl-2-(dimethylamino)-1-[4-(4-morpholinyl)phenyl]-1-butanone (IRGACURE 369) for a photoactivation at 254 nm or 365 nm respectively in glycerol or ethyleneglycol solution for about 10 s to provide an isosteric oligo(ethylene glycol)-terminated SAM, where the oligoethylene moity is tethered to the alkyl chain by a thioether bond. This thiol-ene based protocol turns out to be really flexible and efficient to generate oligo(ethylene glycol)-terminated SAM since it offers a convenient multiple wavelength photoinitiation and also only requires a modest equipment such as a UV bench lamp or a crosslinker widely accessible in most of the chemical and biological laboratories.

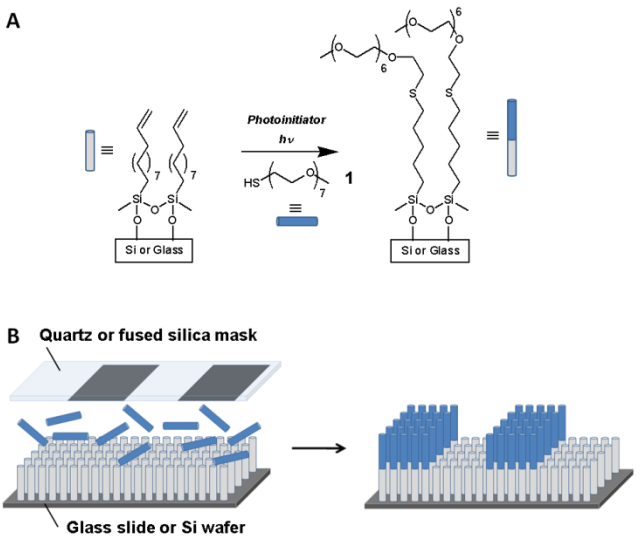

Fig. 1 (A) Addition of oligoethylene derivative on vinyl terminated self-assembled monolayer (SAM) by thiol-ene reaction, photoinitiatior = 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenone (Irgacure 651, λ = 254 nm) or 2-Benzyl-2-(dimethylamino)-1-[4-(4-morpholinyl)phenyl]-1-butanone (Irgacure 369, λ = 365 nm). (B) Procedure used to photopattern antiadhesive SAM surfaces.

The resulting hepta(ethylene glycol)-terminated SAM surface were fully characterized by standard technics. They exhibit a lower surface energy than the vinyl-terminated SAM as evidenced by its lower contact angle with water (Figure 2A). The initial vinyl-terminated surface showed an advancing contact angle of 89.1° ± 0.1° and a receding contact angle of 80.4° ± 1.1°. After the grafting of **1** by thiol-ene reaction, the advancing contact angle dropped to 49.2° ± 0.8° and the receding contact angle to 17.2° ± 2.6°. The thicknesses of the films were also examined by ellipsometry. The thickness of the vinyl-terminated

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2012

Bibliographie

Abercrombie, M. (1970). Contact inhibition in tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 6(2):128–142.

Abercrombie, M. *et al.* (1979). Contact inhibition and malignancy. *Nature*, 281(5729):259.

Abercrombie, M. et Ambrose, E. (1962). The surface properties of cancer cells : a review. *Cancer Research*, 22:525–548.

Abercrombie, M. et Heaysman, J. (1953). Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. i. speed of movement of chick heart fibroblasts in relation to their mutual contacts. *Experimental cell research*, 5(1):111.

Abreu-Blanco, M., Watts, J., Verboon, J. et Parkhurst, S. (2012). Cytoskeleton responses in wound repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(15):2469–2483.

Akhmanova, A. et Steinmetz, M. (2008). Tracking the ends : a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4):309–322.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell, fifth edition.* Garland Science.

Altschuler, S., Angenent, S., Wang, Y. et Wu, L. (2008). On the spontaneous emergence of cell polarity. *Nature*, 454(7206):886–889.

Amano, M., Nakayama, M. et Kaibuchi, K. (2010). Rho-kinase/rock : A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton*, 67(9):545–554.

Angelini, T., Hannezo, E., Trepat, X., Marquez, M., Fredberg, J. et Weitz, D. (2011). Glass-like dynamics of collective cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12):4714.

Anon, E., Serra-Picamal, X., Hersen, P., Gauthier, N., Sheetz, M., Trepat, X. et Ladoux, B. (2012). Cell crawling mediates collective cell migration to close undamaged epithelial gaps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27):10891–10896.

Arbenz, K. et Bachmann, O. (1992). *Eléments d'analyse numérique et appliquée*, volume 7. PPUR.

Askari, J., Buckley, P., Mould, A. et Humphries, M. (2009). Linking integrin conformation to function. *Journal of cell science*, 122(2):165–170.

Ayollo, D., Zhitnyak, I., Vasiliev, J. et Gloushankova, N. (2009). Rearrangements of the actin cytoskeleton and e-cadherin–based adherens junctions caused by neoplasic transformation change cell–cell interactions. *PloS one*, 4(11):e8027.

Bar-Ziv, R., Tlusty, T., Moses, E., Safran, S. et Bershadsky, A. (1999). Pearling in cells : a clue to understanding cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(18):10140.

Baum, B. et Georgiou, M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *The Journal of cell biology*, 192(6): 907–917.

Bearinger, J., Castner, D., Golledge, S., Rezania, A., Hubchak, S. et Healy, K. (1997). P (aam-co-eg) interpenetrating polymer networks grafted to oxide surfaces : Surface characterization, protein adsorption, and cell detachment studies. *Langmuir*, 13(19):5175–5183.

Bennett, A., Jupnik, H., Osterberg, H. et Richards, O. (1951). *Phase microscopy–principles and applications*. John Wiley & Sons, lnc., New York.

Bhanu, V. et Kishore, K. (1991). Role of oxygen in polymerization reactions. *Chemical Reviews*, 91(2):99–117.

Bindschadler, M. et McGrath, J. (2007). Sheet migration by wounded monolayers as an emergent property of single-cell dynamics. *Journal of Cell Science*, 120(5):876–884.

Bischofs, I., Klein, F., Lehnert, D., Bastmeyer, M. et Schwarz, U. (2008). Filamentous network mechanics and active contractility determine cell and tissue shape. *Biophysical journal*, 95(7):3488–3496.

Boal, D. (2011). *Mechanics of the Cell*. Cambridge Univ Pr.

Bosveld, F., Bonnet, I., Guirao, B., Tlili, S., Wang, Z., Petitalot, A., Marchand, R., Bardet, P., Marcq, P., Graner, F. *et al.* (2012). Mechanical control of morphogenesis by fat/dachsous/four-jointed planar cell polarity pathway. *Science Signalling*, 336(6082):724.

Bracke, M., Depypere, H., Labit, C., Van Marck, V., Vennekens, K., Vermeulen, S., Maelfait, I., Philippe, J., Serreyn, R., Mareel, M. *et al.* (1997). Functional downregulation of the e-cadherin/catenin complex leads to loss of contact inhibition of motility and of mitochondrial activity, but not of growth in confluent epithelial cell cultures. *European journal of cell biology*, 74(4):342.

Bryant, D. et Mostov, K. (2008). From cells to organs : building polarized tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(11):887–901.

Carmona-Fontaine, C., Matthews, H., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, G., Parsons, M., Stern, C. et Mayor, R. (2008). Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature*, 456(7224): 957–961.

Chen, S., Li, L., Zhao, C. et Zheng, J. (2010). Surface hydration : Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials. *Polymer*, 51(23):5283–5293.

Chlapowski, F. et Haynes, L. (1979). The growth and differentiation of transitional epithelium in vitro. *The Journal of cell biology*, 83(3):605–614.

Cochet, O., Ranft, J., Marcq, P. et Silberzan, P. (2012). *(En préparation).*

Colombelli, J. et Solon, J. (2012). Force communication in multicellular tissues addressed by laser nanosurgery. *Cell and Tissue Research*, pages 1–15.

Costa, M., Raich, W., Agbunag, C., Leung, B., Hardin, J. et Priess, J. (1998). A putative catenin–cadherin system mediates morphogenesis of the caenorhabditis elegans embryo. *The Journal of cell biology*, 141(1):297–308.

Curl, C., Bellair, C., Harris, T., Allman, B., Harris, P., Stewart, A., Roberts, A., Nugent, K. et Delbridge, L. (2005). Refractive index measurement in viable cells using quantitative phase-amplitude microscopy and confocal microscopy. *Cytometry Part A*, 65(1):88–92.

Dalsin, J. et Messersmith, P. (2005). Bioinspired antifouling polymers. *Materials today*, 8(9):38–46.

Danjo, Y. et Gipson, I. (1998). Actin 'purse string'filaments are anchored by e-cadherin-mediated adherens junctions at the leading edge of the epithelial wound, providing coordinated cell movement. *Journal of cell science*, 111(22): 3323–3332.

Davies, K. et Nowak, K. (2006). Molecular mechanisms of muscular dystrophies : old and new players. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(10):762–773.

Deforet, M., Parrini, M., Petitjean, L., Buguin, A., Camonis, J. et Silberzan, P. (2012). Automated velocity mapping of migrating cell populations (avemap). *(In revision)*.

Dembo, M. et Wang, Y. (1999). Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophysical journal*, 76(4):2307–2316.

Du Roure, O., Saez, A., Buguin, A., Austin, R., Chavrier, P., Siberzan, P. et Ladoux, B. (2005). Force mapping in epithelial cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7):2390.

Eisenhoffer, G., Loftus, P., Yoshigi, M., Otsuna, H., Chien, C., Morcos, P. et Rosenblatt, J. (2012). Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature*, 484(7395):546–549.

Engler, A., Sen, S., Sweeney, H. et Discher, D. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4):677–689.

Erez, N., Bershadsky, A. et Geiger, B. (2005). Signaling from adherens-type junctions. *European journal of cell biology*, 84(2-3):235.

Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42-the centre of polarity. *Journal of cell science*, 117(8):1291–1300.

Falconnet, D., Csucs, G., Michelle Grandin, H. et Textor, M. (2006). Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials*, 27(16):3044–3063.

Fan, Y. et Bergmann, A. (2008). Apoptosis-induced compensatory proliferation. the cell is dead. long live the cell ! *Trends in cell biology*, 18(10):467–473.

Farooqui, R. et Fenteany, G. (2005). Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement. *Journal of cell science*, 118(1):51–63.

Franke, J., Montague, R. et Kiehart, D. (2005). Nonmuscle myosin ii generates forces that transmit tension and drive contraction in multiple tissues during dorsal closure. *Current biology*, 15(24):2208–2221.

Freeman, R., Murtishaw, W. et Knox, J. (1970). Tissue culture techniques in the study of cell photobiology and phototoxicity. *Journal of Investigative Dermatology*, 54(2):164–169.

Friedl, P. et Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(7):445–457.

Frimat, J., Menne, H., Michels, A., Kittel, S., Kettler, R., Borgmann, S., Franzke, J. et West, J. (2009). Plasma stencilling methods for cell patterning. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(3):601–609.

Grant, M., Mostov, K., Tlsty, T. et Hunt, C. (2006). Simulating properties of in vitro epithelial cell morphogenesis. *PLoS computational biology*, 2(10):e129.

Guevorkian, K., Gonzalez-Rodriguez, D., Carlier, C., Dufour, S. et Brochard-Wyart, F. (2011). Mechanosensitive shivering of model tissues under controlled aspiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33):13387–13392.

Heasman, S. et Ridley, A. (2008). Mammalian rho gtpases : new insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(9):690–701.

Henkes, S., Fily, Y. et Marchetti, M. C. (2011). Active jamming : Self-propelled soft particles at high density. *Phys. Rev. E*, 84:040301.

Herrmann, H., Bär, H., Kreplak, L., Strelkov, S. et Aebi, U. (2007). Intermediate filaments : from cell architecture to nanomechanics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7):562–573.

Herzlinger, D., Easton, T. et Ojakian, G. (1982). The mdck epithelial cell line expresses a cell surface antigen of the kidney distal tubule. *The Journal of cell biology*, 93(2):269–277.

Huang, N., Yu, H., Wang, Y., Shi, J. et Mao, X. (2011). Efficient creation of cellular micropatterns with long-term stability and their geometric effects on cell behavior. *Biointerphases*, 6:143.

Hufnagel, L., Teleman, A., Rouault, H., Cohen, S. et Shraiman, B. (2007). On the mechanism of wing size determination in fly development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(10):3835.

Hutson, M., Tokutake, Y., Chang, M., Bloor, J., Venakides, S., Kiehart, D. et Edwards, G. (2003). Forces for morphogenesis investigated with laser microsurgery and quantitative modeling. *Science's STKE*, 300(5616):145.

Iwanaga, S., Akiyama, Y., Kikuchi, A., Yamato, M., Sakai, K. et Okano, T. (2005). Fabrication of a cell array on ultrathin hydrophilic polymer gels utilising electron beam irradiation and uv excimer laser ablation. *Biomaterials*, 26(26):5395–5404.

Jacinto, A., Woolner, S. et Martin, P. (2002). Dynamic analysis of dorsal closure in drosophila : : From genetics to cell biology. *Developmental cell*, 3(1):9–19.

Jaffe, A. et Hall, A. (2005). Rho gtpases : biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21:247–269.

Jeon, S., Lee, J., Andrade, J. et De Gennes, P. (1991). Protein–surface interactions in the presence of polyethylene oxide : : I. simplified theory. *Journal of colloid and interface science*, 142(1):149–158.

Jin, M., Andricioaei, I. et Springer, T. (2004). Conversion between three conformational states of integrin i domains with a c-terminal pull spring studied with molecular dynamics. *Structure*, 12(12):2137–2147.

Jupille, J. (2001). Les surfaces du verre : structure et physico-chimie. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series IV-Physics*, 2(2):303–320.

Kabla, A. (2011). Collective cell migration : Leadership, invasion and segregation. *Arxiv preprint arXiv :1108.4286*.

Kaufmann, T. et Ravoo, B. (2010). Stamps, inks and substrates : polymers in microcontact printing. *Polym. Chem.*, 1(4):371–387.

Keller, R. (2006). Mechanisms of elongation in embryogenesis. *Development*, 133(12):2291–2302.

Klein, R. (2008). Bidirectional modulation of synaptic functions by eph/ephrin signaling. *Nature neuroscience*, 12(1):15–20.

Kong, F., García, A., Mould, A., Humphries, M. et Zhu, C. (2009). Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. *The Journal of cell biology*, 185(7):1275–1284.

Köppen, M., Fernández, B., Carvalho, L., Jacinto, A. et Heisenberg, C. (2006). Coordinated cell-shape changes control epithelial movement in zebrafish and drosophila. *Development*, 133(14):2671–2681.

Kuribayashi, K., Tsuda, Y., Nakamura, H. et Takeuchi, S. (2010). Micropatterning of phosphorylcholine-based polymers in a microfluidic channel. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 149(1):177–183.

Ladoux, B., Anon, E., Lambert, M., Rabodzey, A., Hersen, P., Buguin, A., Silberzan, P. et Mège, R. (2010). Strength dependence of cadherin-mediated adhesions. *Biophysical journal*, 98(4):534–542.

Langbein, L., Rogers, M., Praetzel, S., Cribier, B., Peltre, B., Gassler, N. et Schweizer, J. (2005). Characterization of a novel human type ii epithelial keratin k1b, specifically expressed in eccrine sweat glands. *Journal of investigative dermatology*, 125(3):428–444.

Lauffenburger, D. et Horwitz, A. (1996). Cell migration : Review a physically integrated molecular process. *Cell*, 84:359–369.

le Duc, Q., Shi, Q., Blonk, I., Sonnenberg, A., Wang, N., Leckband, D. et de Rooij, J. (2010). Vinculin potentiates e-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin ii–dependent manner. *The Journal of cell biology*, 189(7):1107–1115.

Legate, K. et Fässler, R. (2009). Mechanisms that regulate adaptor binding to β-integrin cytoplasmic tails. *Journal of cell science*, 122(2):187–198.

Lei, Y., Zouani, O., Rémy, M., Ayela, C. et Durrieu, M. (2012). Geometrical microfeature cues for directing tubulogenesis of endothelial cells. *PloS one*, 7(7):e41163.

Liu, Y. (2004). Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis : pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(1):1–12.

Liu, Z., Tan, J., Cohen, D., Yang, M., Sniadecki, N., Ruiz, S., Nelson, C. et Chen, C. (2010). Mechanical tugging force regulates the size of cell–cell junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(22):9944.

Logg, K., Bodvard, K., Blomberg, A. et Käll, M. (2009). Investigations on light-induced stress in fluorescence microscopy using nuclear localization of the transcription factor msn2p as a reporter. *FEMS yeast research*, 9(6):875–884.

Lussi, J., Falconnet, D., Hubbell, J., Textor, M. et Csucs, G. (2006). Pattern stability under cell culture conditions—a comparative study of patterning methods based on pll-< i> g</i>-peg background passivation. *Biomaterials*, 27(12):2534–2541.

Ma, H., Hyun, J., Stiller, P. et Chilkoti, A. (2004). "non-fouling" oligo (ethylene glycol)-functionalized polymer brushes synthesized by surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Advanced Materials*, 16(4):338–341.

Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G., Hahn, K. et Danuser, G. (2009). Coordination of rho gtpase activities during cell protrusion. *Nature*, 461(7260):99–103.

Martin, P. (1997). Wound healing–aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276(5309):75–81.

Martin, P. et Parkhurst, S. (2004). Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development*, 131(13):3021–3034.

Massagué, J. (2000). How cells read tgf-β signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(3):169–178.

Mattila, P. et Lappalainen, P. (2008). Filopodia : molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(6):446–454.

Mayor, R. et Carmona-Fontaine, C. (2010). Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends in cell biology*, 20(6):319–328.

McAteer, J., Evan, A., Vance, E. et Gardner, K. (1986). Mdck cysts : An in vitro model of epithelial cyst formation and growth. *Methods in Cell Science*, 10(4):245–248.

Mertz, A., Banerjee, S., Che, Y., German, G., Xu, Y., Hyland, C., Cristina Marchetti, M., Horsley, V. et Dufresne, E. (2012). Scaling of traction forces with the size of cohesive cell colonies. *Physical Review Letters*, 108(19):198101.

Millon-Frémillon, A., Bouvard, D., Grichine, A., Manet-Dupé, S., Block, M. et Albiges-Rizo, C. (2008). Cell adaptive response to extracellular matrix density is controlled by icap-1–dependent β1-integrin affinity. *The Journal of cell biology*, 180(2):427–441.

Minsky, M. (1988). Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10(4):128–138.

Mrksich, M., Chen, C., Xia, Y., Dike, L., Ingber, D. et Whitesides, G. (1996). Controlling cell attachment on contoured surfaces with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20):10775.

Nelson, C., Jean, R., Tan, J., Liu, W., Sniadecki, N., Spector, A. et Chen, C. (2005). Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33):11594.

Nelson, C., Raghavan, S., Tan, J. et Chen, C. (2003). Degradation of micropatterned surfaces by cell-dependent and-independent processes. *Langmuir*, 19(5):1493–1499.

Nelson, M., Howard, D., Jensen, O., King, J., Rose, F. et Waters, S. (2011). Growth-induced buckling of an epithelial layer. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 10(6):883–900.

Nelson, P. et Daniel, T. (2002). Emerging targets : molecular mechanisms of cell contact-mediated growth control. *Kidney international*, 61:S99–S105.

Nobes, C., Hall, A. *et al.* (1995). Rho, rac, and cdc42 gtpases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81(1):53.

O Brien, L., Zegers, M. et Mostov, K. (2002). Building epithelial architecture : insights from three-dimensional culture models. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(7):531–537.

Oberleitner, B., Dellinger, A., Deforet, M., Galtayries, A., Castanet, A. et Semetey, V. (2012). A versatile approach to design self-assembled monolayers on glass using thiolene chemistry. *(Submitted)*.

Oda, H. et Tsukita, S. (2001). Real-time imaging of cell-cell adherens junctions reveals that drosophila mesoderm invagination begins with two phases of apical constriction of cells. *Journal of cell science*, 114(3):493–501.

Ostuni, E., Chapman, R., Holmlin, R., Takayama, S. et Whitesides, G. (2001). A survey of structure-property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein. *Langmuir*, 17(18):5605–5620.

Ott, A., Magnasco, M., Simon, A. et Libchaber, A. (1993). Measurement of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy. *Physical Review E*, 48(3):1642–1645.

Pawley, J. B., éditeur (2006). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer, 3rd édition.

Peterbauer, T., Heitz, J., Olbrich, M. et Hering, S. (2006). Simple and versatile methods for the fabrication of arrays of live mammalian cells. *Lab Chip*, 6(7):857–863.

Petitjean, L. (2011). *Réponse active d'un épithélium à une stimulation mécanique.* Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie.

Petitjean, L., Reffay, M., Grasland-Mongrain, E., Poujade, M., Ladoux, B., Buguin, A. et Silberzan, P. (2010). Velocity fields in a collectively migrating epithelium. *Biophysical journal*, 98(9):1790–1800.

Petrie, R., Doyle, A. et Yamada, K. (2009). Random versus directionally persistent cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8):538–549.

Picas, L., Rico, F., Deforet, M. et Scheuring, S. (2012). Structural and mechanical heterogeneity of the erythrocyte membrane reveals hallmarks of membrane stability. *(Submitted).*

Poudel, I., Menter, D. et Lim, J. (2012). Directing cell function and fate via micropatterning : Role of cell patterning size, shape, and interconnectivity. *Biomedical Engineering Letters*, 2(1):38–45.

Poujade, M., Grasland-Mongrain, E., Hertzog, A., Jouanneau, J., Chavrier, P., Ladoux, B., Buguin, A. et Silberzan, P. (2007). Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(41):15988.

Puliafito, A., Hufnagel, L., Neveu, P., Streichan, S., Sigal, A., Fygenson, D. K. et Shraiman, B. I. (2012). Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(3):739–744.

Quinlan, R., Martin, P. et Graham, A. (2004). The role of actin cables in directing the morphogenesis of the pharyngeal pouches. *Development*, 131(3): 593–599.

Raffel, M., Willert, C. et Kompenhans, J. (1998). *Particle image velocimetry : a practical guide.* Springer Verlag.

Reffay, M., Petitjean, L., Coscoy, S., Grasland-Mongrain, E., Amblard, F., Buguin, A. et Silberzan, P. (2011). Orientation and polarity in collectively migrating cell structures : Statics and dynamics. *Biophysical Journal*, 100(11):2566–2575.

Revenu, C. et Gilmour, D. (2009). Emt 2.0 : shaping epithelia through collective migration. *Current opinion in genetics & development*, 19(4):338–342.

Riedl, J., Crevenna, A., Kessenbrock, K., Yu, J., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T., Werb, Z. *et al.* (2008). Lifeact : a versatile marker to visualize f-actin. *Nature methods*, 5(7):605–607.

Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N., Schwarz, U., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B. et Bershadsky, A. (2001). Focal contacts as mechanosensors. *The Journal of Cell Biology*, 153(6):1175–1186.

Roberts, B., Pashaj, A., Johnson, K. et Wahl 3rd, J. (2011). Desmosome dynamics in migrating epithelial cells requires the actin cytoskeleton. *Experimental cell research*, 317(20):2814 – 2822.

Rodriguez-Diaz, A., Toyama, Y., Abravanel, D., Wiemann, J., Wells, A., Tulu, U., Edwards, G. et Kiehart, D. (2008). Actomyosin purse strings : renewable resources that make morphogenesis robust and resilient. *HFSP journal*, 2(4):220–237.

Rottner, K., Hall, A. et Small, J. (1999). Interplay between rac and rho in the control of substrate contact dynamics. *Current Biology*, 9(12):640–648.

Ruiz, S. et Chen, C. (2007). Microcontact printing : A tool to pattern. *Soft Matter*, 3(2):168–177.

Saez, A., Anon, E., Ghibaudo, M., Du Roure, O., Di Meglio, J., Hersen, P., Silberzan, P., Buguin, A. et Ladoux, B. (2010). Traction forces exerted by epithelial cell sheets. *Journal of Physics : Condensed Matter*, 22:194119.

Sancho, E., Batlle, E. et Clevers, H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Current opinion in cell biology*, 15(6):763–770.

Schwarzbauer, J. et Sechler, J. (1999). Fibronectin fibrillogenesis : a paradigm for extracellular matrix assembly. *Current opinion in cell biology*, 11(5):622–627.

Serra, J. (1965). L'analyse des textures par la géométrie aléatoire. *Comptes-rendus du Comité Scientifique de l'IRSID.*

Serra-Picamal, X., Conte, V., Vincent, R., Anon, E., Tambe, D., Bazellieres, E., Butler, J., Fredberg, J. et Trepat, X. (2012). Mechanical waves during tissue expansion. *Nature Physics.*

Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. 27:379–423.

Shraiman, B. (2005). Mechanical feedback as a possible regulator of tissue growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9):3318.

Simpson, K., Selfors, L., Bui, J., Reynolds, A., Leake, D., Khvorova, A. et Brugge, J. (2008). Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an sirna screening approach. *Nature cell biology*, 10(9):1027–1038.

Solon, J., Kaya-Çopur, A., Colombelli, J. et Brunner, D. (2009). Pulsed forces timed by a ratchet-like mechanism drive directed tissue movement during dorsal closure. *Cell*, 137(7):1331–1342.

Sondergaard, N. et Tanner, G. (2002). Wave chaos in the elastic disk. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 66(6 Pt 2):066211.

Steinberg, M. (1962). Mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells, ii : Time-course of events. *Science*, 137(3532):762–763.

Stoker, M. et Rubin, H. (1967). Density dependent inhibition of cell growth in culture. *Nature*, 215(5097):171–172.

Stupack, D. et Cheresh, D. (2002). Get a ligand, get a life : integrins, signaling and cell survival. *Journal of cell science*, 115(19):3729–3738.

Supatto, W., Débarre, D., Moulia, B., Brouzés, E., Martin, J., Farge, E. et Beaurepaire, E. (2005). In vivo modulation of morphogenetic movements in drosophila embryos with femtosecond laser pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4):1047.

Sveen, J. (2004). An introduction to matpiv v. 1.6. 1. *World Wide Web Internet And Web Information Systems*.

Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W. et Ogita, H. (2008). Nectins and nectin-like molecules : roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(8):603–615.

Tambe, D., Hardin, C., Angelini, T., Rajendran, K., Park, C., Serra-Picamal, X., Zhou, E., Zaman, M., Butler, J., Weitz, D. *et al.* (2011). Collective cell guidance by cooperative intercellular forces. *Nature materials*, 10(6):469–475.

Taneri, S., Zieske, J. et Azar, D. (2004). Evolution, techniques, clinical outcomes, and pathophysiology of lasek : review of the literature. *Survey of ophthalmology*, 49(6):576–602.

Tang, X., Yakut Ali, M. et Saif, M. T. A. (2012). A novel technique for micropatterning proteins and cells on polyacrylamide gels. *Soft Matter*, 8:7197–7206.

Théry, M. (2010). Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *Journal of Cell Science*, 123(24):4201–4213.

Theveneau, E. et Mayor, R. (2010). Integrating chemotaxis and contact-inhibition during collective cell migration : small gtpases at work. *Small GTPases*, 1(2):113.

Theveneau, E. et Mayor, R. (2012). Neural crest delamination and migration : From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental Biology*, 366(1):34–54.

Thiery, J. *et al.* (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6):442–454.

Thomas, C., Lhoest, J., Castner, D., McFarland, C. et Healy, K. (1999). Surfaces designed to control the projected area and shape of individual cells. *Journal of biomechanical engineering*, 121:40.

Thoresen, T., Lenz, M. et Gardel, M. (2011). Reconstitution of contractile actomyosin bundles. *Biophysical Journal*, 100(11):2698.

Tourovskaia, A., Barber, T., Wickes, B., Hirdes, D., Grin, B., Castner, D., Healy, K. et Folch, A. (2003). Micropatterns of chemisorbed cell adhesion-repellent films using oxygen plasma etching and elastomeric masks. *Langmuir*, 19(11):4754–4764.

Tourovskaia, A., Figueroa-Masot, X. et Folch, A. (2006). Long-term microfluidic cultures of myotube microarrays for high-throughput focal stimulation. *Nature protocols*, 1(3):1092–1104.

Trepat, X., Deng, L., An, S., Navajas, D., Tschumperlin, D., Gerthoffer, W., Butler, J. et Fredberg, J. (2007). Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature*, 447(7144):592–595.

Vianay, B., Käfer, J., Planus, E., Block, M., Graner, F. et Guillou, H. (2010). Single cells spreading on a protein lattice adopt an energy minimizing shape. *Physical review letters*, 105(12):128101.

Vicsek, T. et Zafiris, A. (2010). Collective motion. *Arxiv preprint arxiv :1010.5017*.

Vignaud, T., Galland, R., Tseng, Q., Blanchoin, L., Colombelli, J. et Théry, M. (2012). Reprogramming cell shape with laser nano-patterning. *Journal of Cell Science*.

Wang, C., Jamal, L. et Janes, K. (2011). Normal morphogenesis of epithelial tissues and progression of epithelial tumors. *Wiley Interdisciplinary Reviews : Systems Biology and Medicine*.

Webb, D., Parsons, J. et Horwitz, A. (2002). Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells–over and over and over again. *Nature cell biology*, 4(4):E97–E100.

Welch, M. et Mullins, R. (2002). Cellular control of actin nucleation. *Annual review of cell and developmental biology*, 18(1):247–288.

Windoffer, R., Borchert-Stuhlträger, M. et Leube, R. (2002). Desmosomes : interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. *Journal of cell science*, 115(8):1717–1732.

Yin, Z., Kanade, T. et Chen, M. (2012). Understanding the phase contrast optics to restore artifact-free microscopy images for segmentation. *Medical Image Analysis*, 16(5):1047–1062.

Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A. et Shibata, M. (2010). α-catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nature cell biology*, 12(6):533–542.

Yoshinaga, N. et Marcq, P. (2012). Contraction of cross-linked actomyosin bundles. *Physical Biology*, 9(4):046004.

Zegers, M., O'Brien, L., Yu, W., Datta, A. et Mostov, K. (2003). Epithelial polarity and tubulogenesis in vitro. *Trends in cell biology*, 13(4):169–176.

Zigmond, S. (2004). Formin-induced nucleation of actin filaments. *Current opinion in cell biology*, 16(1):99–105.