



HAL
open science

Influence de contrainte mécaniques sur le développement du cancer

Morgan Delarue

► **To cite this version:**

Morgan Delarue. Influence de contrainte mécaniques sur le développement du cancer. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2013. Français. NNT: . tel-01044604

HAL Id: tel-01044604

<https://theses.hal.science/tel-01044604>

Submitted on 4 Aug 2014

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 PARIS-DIDEROT**

Spécialité

Biophysique

École doctorale Matière condensée et interface (ED 518)

Présentée par

Morgan Delarue

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS-DIDEROT

**Influences de contraintes mécaniques sur le développement
du cancer**

soutenance prévue le 27 septembre 2013 devant le jury composé de :

Giovanni CAPPELLO	Directeur de thèse
Jean-Marc DI MEGLIO	Président du Jury
Jean-François JOANNY	Invité
Frank JÜLICHER	Examinateur
Valérie LOBJOIS	Rapportrice
Fabien MONTEL	Co-directeur de thèse, Invité
Jacques PROST	Invité
Jean-Paul RIEU	Rapporteur
Danijela VIGNJEVIC	Examinatrice

Remerciements

Ecrire des remerciements n'est jamais simple. Mais je suppose que je pourrais dire qu'en somme ce fut une bonne thèse, avec de bons côtés. Et cela grâce à mes directeurs de thèse, que je tiens à remercier. Giovanni tout d'abord, qui lors de mon M2, alors que je cherchais un stage et hésitais, m'a donné comme conseil que se décider, c'est de ne jamais regretter ses choix – ce conseil s'appliquant d'ailleurs pour d'autres cas. Merci pour tous ces bons moments, et pour ces discussions (entre autres) scientifiques que nous avons eu. Fabien, tu as su m'apprendre beaucoup de ce que je sais, et je sens que cette thèse n'aurait pas pu être la même si tu n'avais pas été là. Merci à vous pour ces bons moments, aussi bien humains que scientifiques.

Je tiens en second lieu à remercier Jacques et Jean-François. Cela a été un réel plaisir de travailler avec vous, et j'espère que ce sera le cas bien plus tard aussi. Merci pour toutes ces discussions passionnantes que nous avons eu. Je veux également remercier Danijela pour m'avoir appris beaucoup de la biologie que j'ai faite durant cette thèse.

Une bonne thèse passe aussi par de bonnes ententes, et une chose est sûre, on s'amuse bien à Curie. Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai côtoyé (je ne ferais pas une liste exhaustive), et plus particulièrement Anneliene et les membres de l'ADIC. Evidemment, j'ai fait de très belles rencontres dans l'équipe, et je veux remercier toutes les personnes de l'équipe Viovy : Fabien, Stefano, Karla, Sylvain, Jérôme, Benoît, Vélan, Ju, Marine, Bruno, Youba, Ludo, Vivi, F-D, Davide, Ezgi, Scott, Iago, Petra, Maëva, Nadège, Qi Hao, Gio, Steph, Laurent, Jean-Louis (présente et/ou passée, j'espère n'oublier personne). Au sein de l'UMR 168, je veux tout d'abord et surtout remercier Alice, vieille amie s'il en est, qui a toujours été là lorsqu'il fallait, ainsi qu'Edouard, même si ami de plus récente date, tu restes une très bonne découverte ! Merci également à John pour sa bonne humeur et sa patience lorsqu'il s'est agit de m'apprendre à faire de la biologie.

Je tiens également à remercier certaines personnes qui m'ont beaucoup apporté au sein de l'UMR 144. Merci donc à Nadia, Toto, Alex, Matthieu et son équipe, ainsi que Paolo. Merci également à Zofia pour sa patience.

Si nous remontons le temps, je tiens à remercier mes amis qui m'ont soutenu et/ou que j'ai découverts tout au long de ces longues années post-bac. Tout d'abord mes amis de Cachan, et plus particulièrement Alice (oui, encore toi), Adèle ma coloc', Jon mon binôme, Guigui, Thomas, Nico, Matthieu, Lu. . . bon, j'espère ne pas oublier de monde, et en même temps je doute que quelqu'un que j'aurais oublié lise ces quelques lignes un jour. S'il le fait, et que c'est un réel oubli, pardonne-moi, je sais que tu en as la force ! Mes plus vieux amis viennent de Rouen, et je nommerais surtout la DK Team Bub's, Nyaou, Nefer, et Davy, mais aussi Toitoiné, Bédouin, Alex et Julien.

Je veux pour terminer remercier ma famille, présente et nouvelle. Un spécial merci à ma mère qui m'a bien poussé sur les bons rails.

Et pour vraiment finir, je remercie ma femme d'être là pour moi lorsqu'il le faut.

Table des matières

1	État des connaissances	7
1.1	Progression tumorale	7
1.1.1	Cancer et régulation du cycle cellulaire	8
1.1.2	Cancer et apoptose	11
1.1.3	Activation du stroma	13
1.1.4	Invasion et dissémination métastatique	15
1.2	Mécanotransduction et prolifération	16
1.2.1	Mécanotransduction	16
1.2.2	La voie Hippo	17
1.2.3	Prolifération et mécanique	18
1.3	Caractéristique de tissus biologique	19
1.3.1	Tissu : liquide ou solide ?	19
1.3.2	Temps caractéristique	21
1.4	Sphéroïdes multicellulaires	21
1.4.1	Formation	21
1.4.2	Le sphéroïde comme une sous-unité de la tumeur	22
1.4.3	Structuration d'un sphéroïde	23
1.5	Notre problématique	24
2	Réponse mécanique sous compression	27
2.1	Compression de sphéroïdes	27
2.1.1	Mesure du volume de sphéroïde	27
2.1.2	Compression indirecte	28
2.1.3	Compression directe	31
2.1.4	Effet sur d'autres lignées	32
2.2	Contrainte mécano-osmotique	33
2.3	Influence sur le volume des cellules	36
2.3.1	Augmentation de la densité : effet passif	36
2.3.2	Réduction du rayon du sphéroïde	37
2.4	Anisotropie et mécanique	39
2.4.1	Orientation privilégiée des cellules au sein d'un sphéroïde ?	40
2.4.2	Anisotropie ?	41
2.5	Conclusions et perspectives	42

3 Réponse biologique sous compression	45
3.1 Retour sur la réduction du taux de croissance	45
3.1.1 Visualisation des protéines	45
3.1.2 Pas de changement sur l'apoptose	46
3.1.3 Réduction de la prolifération	47
3.1.4 Modèle de croissance surfacique	47
3.1.5 Taux et longueur de prolifération	49
3.1.6 Simulations numériques (Jens Elgeti)	51
3.2 Blocage au point de Restriction	52
3.2.1 Arrêt en fin de G1	52
3.2.2 Arrêt de prolifération au point de restriction / surexpression de p27 ^{Kip1}	54
3.3 Front antiprolifératif, séquentialité	55
3.3.1 Front antiprolifératif	56
3.3.2 Corrélations spatiales	57
3.3.3 Réversibilité	57
3.3.4 Séquentialité	58
3.4 Activation de la voie Hippo	60
3.5 Conclusions et perspectives	61
4 Flux cellulaire et invasion	67
4.1 Flux cellulaire	67
4.1.1 Premières preuves	68
4.1.2 Visualisation du flux cellulaire	68
4.1.3 Existence d'un flux convergent - sphéroïde à l'état stationnaire	70
4.1.4 Existence d'un flux divergent - sphéroïde en croissance	71
4.1.5 Champ de vitesse	72
4.1.6 Transport des nanoparticules	73
4.1.7 Extraction des paramètres	74
4.1.8 Discussion des paramètres	75
4.2 Invasion	76
4.2.1 Invasion sous contrainte mécanique	77
4.2.2 Influence de la taille et de la pression	78
4.3 Conclusions et perspectives	79
5 Mesure de force développée par un tissu	83
5.1 État de l'art	83
5.2 Version 1 : membrane horizontale	84
5.2.1 Mesure de la force	84
5.2.2 Chambre avec paroi déformable	85
5.2.3 Résultats du design - cahier des charges	86
5.3 Version 2 : membrane verticale	87
5.3.1 Design de la puce	87
5.3.2 Déformation de la membrane - définition d'un score	87
5.3.3 Viabilité d'un tissu	89
5.4 Conclusions et perspectives	89
6 Discussion et Conclusions générales	93

7	Annexe Protocoles	97
7.1	Culture cellulaire et formation des sphéroïdes	98
7.2	Estimation du volume des cellules par mesure de la distance noyau-noyau	99
7.3	Cryosections, marquages par immunofluorescence, et calcul de densités	102
7.4	Cytométrie de flux et histogrammes d'ADN	104
7.5	Western blots et mesure du niveau de protéines	106
7.6	Assemblage de dispositifs microfluidiques	108
8	Annexe Calculs	111
8.1	Influence de la présence de Dextran sur les autres solutés	112
8.2	Matrice de déformation pour un milieu linéaire anisotrope	114
8.3	Croissance surfacique	116
8.4	Résolution analytique de l'équation de transport des nanoparticules	119
8.5	Déformation d'une fine membrane circulaire	121

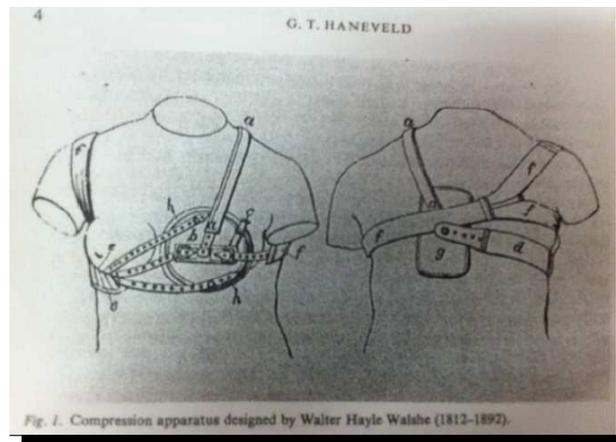
Avant-propos

Il est admis étymologiquement que la dénomination “cancer” viendrait du médecin grec Hippocrate en comparaison avec le crabe, car celui-ci possède *des veines étendues de tous côtés de même que le crabe a des pieds* [1]. Cancer était à l’époque confondu avec “tumeur”, venant du latin signifiant excroissance, gonflement. Une des premières façons de traiter ces gonflements était tout simplement d’appuyer dessus [2].

Assez vite donc ces gonflements furent traités par des méthodes de compression, allant de la plaque de plomb appuyant sur ceux-ci à d’autres méthodes un peu plus élaborées. Une des premières études rapportées est celle de Amatus Lusitanus en 1571 qui prétendait avoir soigné un durcissement (une tumeur ?) par une méthode de compression [3]. Des études plus systématiques furent menées, notamment par le clinicien John Hunter vers la fin du 18^{ème} siècle ; celui-ci rapporte pouvoir soigner des cancers par compression, car selon lui la pression obstrue les vaisseaux sanguins, amenant à une atrophie de la zone comprimée [4].

Le traitement du cancer par compression simple ou combinée avec d’autres méthodes fut étudié en profondeur sur des cas de durcissements du sein par Samuel Young en Angleterre [5] ou par Joseph Récamier en France [6]. Récamier rapporte que sur 100 patientes atteinte de ce mal, 16 étaient considérées incurables, 30 se remirent complètement par la simple compression et 21 virent une nette amélioration de leur état. Pour 21 autres, la compression fut combinée avec des ablations ou des cautérisations, et les patientes vécurent. Il resta en revanche que pour 12 d’entre elles, la compression ne changea rien et ces patientes moururent. Selon Récamier, la compression devait être *douce*, et non forte comme le suggérait Hunter [7]. Des dispositifs très ingénieux furent développés afin d’exercer des compressions douces avec des matériaux mous, dans le but de les rendre le plus homogène possible, comme illustré ci-dessus avec un dispositif proposé par Walter Walshe [8].

Les détracteurs de cette méthode arguaient que rien ne prouvait que les guérisons étaient définitives, ni que les maux dont souffraient ces patients étaient réellement des cancers. Pourtant cette méthode a été exportée à d’autres types de grosseurs, et des études ont montré qu’elle était efficace sur des tissus tels que l’utérus, le rectum, ou même les lèvres [2]. Cette idée a ressurgi dans les années 80 dans les études du Suédois Helmstein qui décida de soigner des cancers de la vessie en injectant un ballon qu’il gonflait à une pression d’environ 28 kPa [9]. La pression ainsi exercée par le ballon, supérieure à la pression systolique (pression en sortie de l’artère cardiaque,



de l'ordre de 16 kPa), amène à une nécrose des tissus par réduction du flux sanguin. Mais une étude approfondie montre que cette méthode ne donne de très bons résultats que pour un unique type de carcinome de la vessie [10].

Certaines interrogations demeurent à ce jour :

- Si la compression fonctionne, faut-il appuyer *fort* comme le suggèrent certaines études, afin de passer au dessus de la pression systolique et d'étouffer les tissus, ou *doucement* comme avait l'air de le penser Récamier ?
- Pourquoi cette méthode ne donne-t-elle pas des résultats positifs dans tous les cas ? Un cas rapporté en 1763 par van Swieten montre que la compression d'un néoplasme squirrheux - très dur, très fibreux - par deux plaques de cuivre a provoqué un envahissement, et une mort rapide du patient [11].

Quelles seraient les modes d'action de la compression, aussi bien d'un point de vue physique que biologique ? Des études plus récentes suggèrent que les tumeurs sont naturellement soumises à des contraintes mécaniques lors de leur croissance [12]. L'application de contraintes semble pouvoir renverser le phénotype cancéreux de tumeurs du sein [13], tout en étant nécessaire à la progression tumorale [14]. Dans ce cadre, Jean-François Joanny et Jacques Prost ont développé le concept de contrainte homéostatique, qui est la contrainte maximale qu'un tissu biologique homogène peut développer [15]. La progression d'une tumeur et la formation de métastases pourraient être guidées par cette contrainte homéostatique.

Nous nous posons expérimentalement des questions sur l'influence de contraintes mécaniques sur la progression du cancer :

1. Existe-t-il dans ce cadre simple une pression qui arrêterait la croissance d'un tissu biologique homogène ?
2. Si une contrainte mécanique a un effet sur la croissance d'un tissu, à quel niveau ce situerait cet effet ? réduirait-elle la prolifération cellulaire ? augmenterait-elle la mort cellulaire ? de quelle manière ?
3. Comment serait affecté le mouvement cellulaire au sein d'un tissu sous contrainte mécanique ?
4. Une contrainte mécanique peut-elle promouvoir l'envahissement d'un tissu ?
5. Pouvons-nous mesurer la contrainte développée par un tissu ? Quels seraient les paramètres l'influençant ?

Nous commençons cette thèse par décrire un état de l'art sur la compréhension du cancer aujourd'hui, dans lequel nous montrons qu'il peut exister un dialogue mécanique entre la tumeur et son environnement, dialogue qui pourrait aussi guider le développement du cancer. Nous avons développé une méthodologie nous permettant d'exercer des contraintes mécaniques précises sur des modèles de tumeur *in vitro*. Le chapitre 2 est consacré à cette méthode et à la compréhension mécanique de l'influence de ces contraintes. Nous mettons en évidence que la compression de tumeurs implique une réduction du volume des cellules au cœur de celles-ci. Nous montrons dans le chapitre 3 que cette réduction déclenche une cascade de réponse moléculaire impliquant l'arrêt de la croissance des tumeurs. Nous étudions par la suite l'influence de telles contraintes sur le mouvement cellulaire, et nous mettons en évidence dans le chapitre 4 que les mouvements internes des cellules (flux cellulaires) et externes (invasion) sont modifiés lorsque la tumeur est comprimée. En particulier, une compression peut promouvoir l'invasion. Enfin, le chapitre 5 présente un dispositif microfluidique développé afin de mesurer les forces exercées par des tissus biologiques. Nous terminons cette thèse par des conclusions générales et une discussion. Les perspectives de ce travail sont traitées au fur et à mesure des chapitres.

État des connaissances

Nous commencerons ce chapitre par les différentes étapes pouvant amener une cellule à la formation de tumeurs, puis de tumeurs secondaires - les métastases. Nous verrons entre autres que la progression d'une tumeur peut être guidée par le micro environnement tumoral, et qu'un dialogue biochimique fort existe entre ces deux éléments. Nous poserons ensuite les bases de l'existence d'un dialogue mécanique pouvant se superposer au dialogue biochimique. Nous continuerons ce chapitre en discutant des propriétés mécaniques des tissus biologiques, puis des modèles *in vitro* de tumeurs utilisés au cours de cette thèse. Nous terminerons en exposant les objectifs de la thèse.

• • •

1.1 Progression tumorale

Cela fait maintenant environ un siècle que le chirurgien Stephen Paget comparait les cellules tumorales aux graines des plantes. Elles sont selon lui “emmenées dans toutes les directions, mais elles ne peuvent seulement vivre et croître que si elles tombent dans le terroir adéquat” [16]. Cette métaphore de la graine et du terroir (*seed and soil* en anglais) réfère pour le terroir au micro environnement tumoral, aussi dénommé le stroma. Chaque stroma est différent de même que chaque tumeur peut l'être. Néanmoins, leurs évolutions sont intrinsèquement couplées.

Le stroma est constitué de plusieurs types de cellules dans un réseau de matrice extracellulaire : des fibroblastes qui modèlent la matrice, des cellules immunitaires et inflammatoires, ainsi que des cellules endothéliales, formant les vaisseaux sanguins [17, 18]. Il y a beaucoup de variabilité dans la composition du stroma, mais cette variabilité n'est pas corrélée avec le degré de malignité de la tumeur [19]. C'est en revanche la communication entre le stroma et la tumeur qui déterminera son phénotype. Les cellules tumorales altèrent leur micro environnement afin d'en obtenir son soutien.

Le cancer est une maladie évoluant en plusieurs étapes [20]. L'accumulation d'aberrations génétiques peut comme nous le verrons amener une cellule à proliférer davantage et à mourir moins (phénomène d'hyperprolifération), ce qui entraîne la formation de micro tumeurs. Une micro tumeur remodèle le stroma pour le rendre permissif à son extension. Ainsi, des cellules peuvent s'échapper de la tumeur primaire vers des organes distants. Si ces nouvelles *graines* tombent dans le bon *terroir*, elles peuvent donner naissance à des tumeurs secondaires, appelées métastases, responsables du décès de 80-90 % des personnes atteintes d'un cancer [21, 22].

Nous allons dans un premier temps nous intéresser à caractériser la prolifération et la mort cellulaire, ainsi que les mutations pouvant amener à l'hyperprolifération.

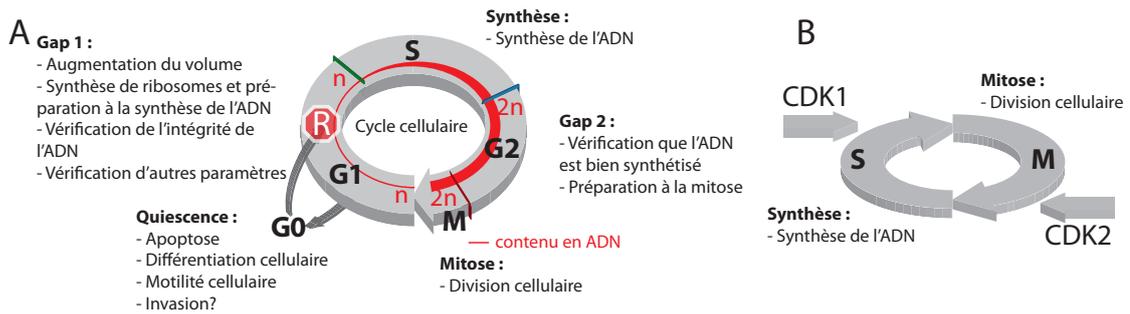


FIGURE 1.1 – Cycle cellulaire. A : cycle cellulaire chez les cellules matures, qui comprend 4 phases distinctes ; deux phases d'intervalle (Gap 1 et Gap 2, aussi appelées G1 et G2) insérées entre une phase de synthèse, S, et une phase de division (la mitose), M. La phase de quiescence G0 est en dehors du cycle cellulaire : la cellule est en repos. Les principales actions réalisées durant ces phases sont présentées sur le schéma. Le "R" indique le point de contrôle de G1 nommé le point de restriction. B : cycle cellulaire chez l'embryon. Deux phases du cycle existent : la phase S, caractérisée par un haut niveau de CDK2, suivie de la phase M, caractérisée par un haut niveau en CDK1.

Cancer et régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire assure la pérennité des cellules générations après générations. Une cellule mère double tout son contenu avant de donner naissance à deux cellules filles.

Durant le cycle cellulaire, la cellule interprète de nombreux signaux influençant sa division et son destin. Dans cette partie, nous présenterons le cycle cellulaire ainsi que ses différents points de contrôle, puis nous verrons comment une dérégulation peut amener à la formation de cellules tumorales.

Le cycle cellulaire Le cycle cellulaire est constitué de quatre phases bien distinctes, résumées sur la figure 1.1A. Durant le cycle, la quantité d'ADN est doublée pendant la phase de synthèse S. La cellule entre ensuite en mitose (phase M), qui est la séparation de la cellule mère en deux cellules filles, en fin de cycle cellulaire. Ces deux phases sont séparées par deux intervalles, ou *gap* en anglais. Ainsi, entre la division cellulaire en phase M et la prochaine synthèse de l'ADN en phase S, un premier intervalle, la phase G1 (gap 1), assure un contrôle de plusieurs paramètres. Entre la phase S et la phase M un deuxième intervalle, la phase G2 (gap 2), permet de contrôler l'ADN et vérifier qu'il est complètement et correctement répliqué [23].

Alors que les phases S et M sont bien conservées dans de nombreux types cellulaires, les phases G1 et G2 peuvent quant à elles varier [23]. Dans les premiers stades du développement, seules S et M sont présentes [24]. Durant ce cycle cellulaire raccourci (figure 1.1B), l'oscillation en opposition de phase de deux kinases dépendantes de cyclines, CDKs, assure le passage d'une phase à l'autre [25, 26, 27]. La CDK1, associée à la cycline A, culmine en M, tandis que la phase de synthèse S a besoin, pour être initiée, d'un haut niveau de CDK2, associée à la cycline E. Le cycle cellulaire est rapide chez l'embryon (de l'ordre de 30 minutes) et s'allonge progressivement pour incorporer les phases de contrôle G1 et G2 [25]. Pour entrer dans la phase S, toutes les cellules doivent accomplir la même condition : activer les CDKs.

Les radiations, ou l'influence de mutagènes chimiques, peuvent induire des erreurs dans la réplication de l'ADN, l'insertion/la délétion de fragments d'ADN, conduisant à des mutations [28, 29, 30]. Les phases d'intervalle limitent les risques dus à la présence de mutation : sans garde-fou, une cellule mutée ne possédant que les phases S et M continuerait dans son état de

dégénérescence. Les phases d'intervalle G1 et G2 permettent des contrôles de qualité de l'ADN, et en cas de dommage, des complexes protéiques de réparation de l'ADN sont activés pour le réparer avant d'entrer en S ou en M. De nombreux points de contrôles existent tout au long du cycle cellulaire, notamment dans G1, et aux transitions G1/S et G2/M. Nous allons présenter p53, protéine qui est impliquée dans le contrôle de certains de ces points, afin de montrer l'ajustement fin du cycle cellulaire.

p53 L'activation des CDKs assure le passage d'une phase à l'autre. Or les CDKs peuvent être inactivées par des protéines inhibitrices, comme celles de la famille Cip/Kip. Cette famille comprend trois homologues : p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2} [31]. Ces protéines sont intrinsèquement désordonnées, c'est-à-dire qu'elles manquent de structure tertiaire stable, ce qui leur confère la propriété de pouvoir se lier à toutes les CDKs [32]. Ces protéines peuvent être activées suite à de nombreux signaux, et leur fonction principale est l'intégration de ceux-ci.

p53, protéine encodée par le gène TP53, est centrale dans la mise sur pause du cycle cellulaire [33]. En cas de dommage de l'ADN notamment, un module d'activation de p53 agit sur la transcription de p21^{Cip1} pour mettre la cellule en pause [23]. p53 a un rôle majeur dans la progression cancéreuse, et 50% des cancers possèdent des mutations de TP53 [34].

Le cycle cellulaire possède les phases intervalles G1 et G2 pour veiller à l'intégrité de l'ADN et des différents organelles, et pour interpréter les signaux externes pouvant provenir du milieu extérieur ou des cellules adjacentes dans le cas d'organismes multicellulaires. La phase G1 est une phase cruciale en ce sens qu'elle intègre une multitude de signaux influençant son devenir, et en particulier l'engagement de la cellule dans le cycle cellulaire. Des erreurs dans cette phase notamment peuvent promouvoir une progression tumorale. Parmi les points de contrôle existant, le point de restriction est présent en G1 et assure l'engagement de la cellule dans le cycle cellulaire.

G1, pRb et p27^{Kip1} La diminution de l'activité de CDK1 marque la fin de la mitose et permet de charger des complexes pré-répliatifs sur l'ADN contenant les origines de répliations [23]. Les CDKs de G1 assurent la répliation de l'ADN : l'activation de CDK2 permet le recrutement au niveau des origines de répliation des hélicases qui vont dérouler l'ADN, des primases et des polymérases qui vont initier la synthèse de l'ADN [35, 36]. La progression à travers G1 et l'activation de la CDK2 se fait par l'inactivation de la protéine du rétinoblastome pRb. Cette protéine est la première à avoir été qualifiée de suppresseur de tumeur. Elle a été découverte dans les tumeurs du rétinoblastome frappant les jeunes enfants dont le gène l'encodant, RB, est muté [37, 38]. Le passage en G1 est contrôlé par l'état de phosphorylation de pRb. Lorsque cette protéine n'est pas ou peu phosphorylée (état hypophosphorylé), elle séquestre et inhibe les membres de la famille des facteurs de transcription E2F. Lorsqu'elle est hyperphosphorylée, le complexe est déstabilisé, et E2F active ses gènes cibles, qui sont entre autre des cyclines, des CDKs, ou l'ADN polymérase [39]. pRb est phosphorylé par les CDKs de G1, et lorsqu'il est phosphorylé, cet état est maintenu jusqu'à la fin de M où le niveau de CDK1 diminue. Ceci assure que lorsque la cellule a passé ce point de phosphorylation de pRb, point de contrôle nommé le point de restriction, la cellule progressera dans le cycle cellulaire jusqu'à la prochaine phase G1, conférant à ce point une bi-stabilité [40]. Ce point est aussi connu sous le nom de point d'engagement des cellules. La figure 1.2 présente un schéma des différents partenaires clés jouant un rôle dans la progression à travers le point de restriction.

La cycline E et la CDK2 ne sont pas majoritaires en début de G1, où les CDK4 et CDK6, homologues de CDK2, se lient à la famille des cyclines D. Ces complexes protéiques initient la phosphorylation de pRb [41], et il semblerait d'ailleurs que pRb soit leur unique substrat [42]. pRb peut également être phosphorylé par les complexes de cycline E et de CDK2 dont le niveau augmente pendant G1. Tous les sites de phosphorylation de pRb ne sont pas équivalents, et certains suffisent à déstabiliser le complexe avec E2F qui peut activer certains de ses gènes cibles [43], dont la cycline E [39]. Ainsi, en fin de G1, la phosphorylation de pRb s'accélère, et le point

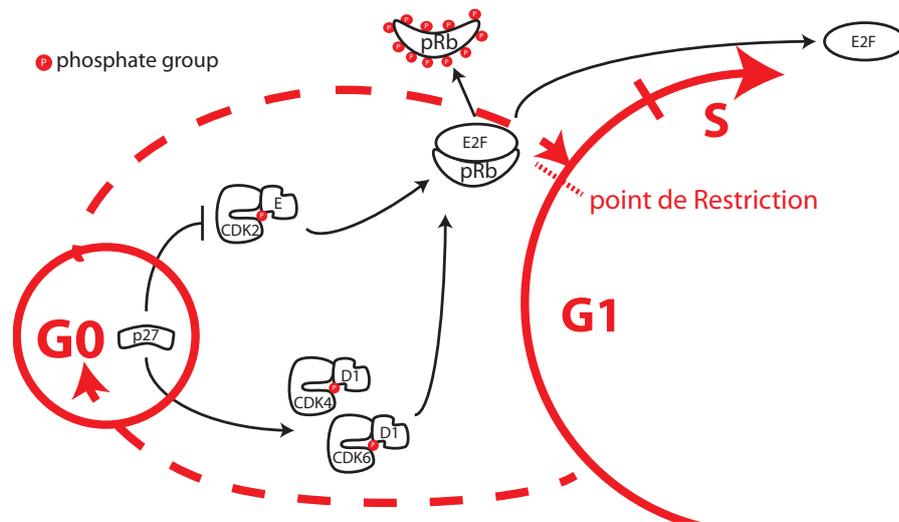


FIGURE 1.2 – Schéma du point de restriction incluant différents partenaires clés jouant un rôle dans la progression à travers la phase G1. Au début du cycle, les complexes de cycline D1/CDK4-6 phosphorylent pRb. Durant la progression dans G1, le niveau de CDK2 augmente, et les complexes de cycline E/CDK2 achèvent la phosphorylation de pRb. Ceci permet de relâcher les co-facteurs de transcription E2F, et ce dernier active ses gènes cibles, assurant la progression à travers S. p27^{Kip1} aide à la formation des complexes de cycline D1 / CDK4/6, mais inhibe les complexes cycline E / CDK2. Un haut niveau de p27^{Kip1} permet un arrêt dans le cycle cellulaire en inhibant la phosphorylation de pRb par la CDK2.

de restriction est passé dans une boucle de rétroaction positive. Les complexes de cycline D1 et de CDK4/6 ne sont pas essentiels à la progression dans G1 car il a été montré que la cycline E pouvait restaurer les phénotypes prolifératifs dans des souris déficientes en cycline D [44].

Les protéines inhibitrices de CDK comme celles de la famille Cip/Kip peuvent inhiber la phosphorylation de pRb, et ainsi bloquer la prolifération cellulaire, forçant la cellule à sortir du cycle cellulaire, et entrer dans la phase G0. Parmi les membres de cette famille, p27^{Kip1} joue un rôle essentiel. Cette protéine est toujours présente à un niveau basal dans la cellule en G1. Paradoxalement, elle aide à la formation des complexes de cycline D / CDK4/6, mais inhibe les complexes de cycline E / CDK2. À mesure que la cellule progresse dans G1, les complexes de cycline D séquestrent de plus en plus de p27^{Kip1}, libérant les CDK2 qui peuvent achever la phosphorylation de pRb. La CDK2 peut aussi phosphoryler p27^{Kip1} pour cibler sa dégradation [45]. De nombreuses modifications de p27^{Kip1} se produisent durant G1, jouant aux niveaux transcriptionnel et traductionnel, de sa stabilité, ou encore de sa localisation nucléaire [45]. De faibles niveaux de p27^{Kip1} corrélerent avec des pauvres perspectives dans de nombreux cancers [23].

Le point de restriction intègre toutes sortes de signaux en G1, et un certain nombre de conditions doivent être remplies avant de passer ce point et d'initier la synthèse de l'ADN. Entre autres conditions le point de restriction contrôle que la cellule aura suffisamment de ressources. Si la cellule est dans un milieu pauvre en facteurs de croissance, des récepteurs membranaires activent des protéines de la famille FoxO, qui sont les facteurs de transcription de p27^{Kip1} [46]. Cette activation provoque la surexpression de p27^{Kip1}. Si la cellule n'a pas passé le point de

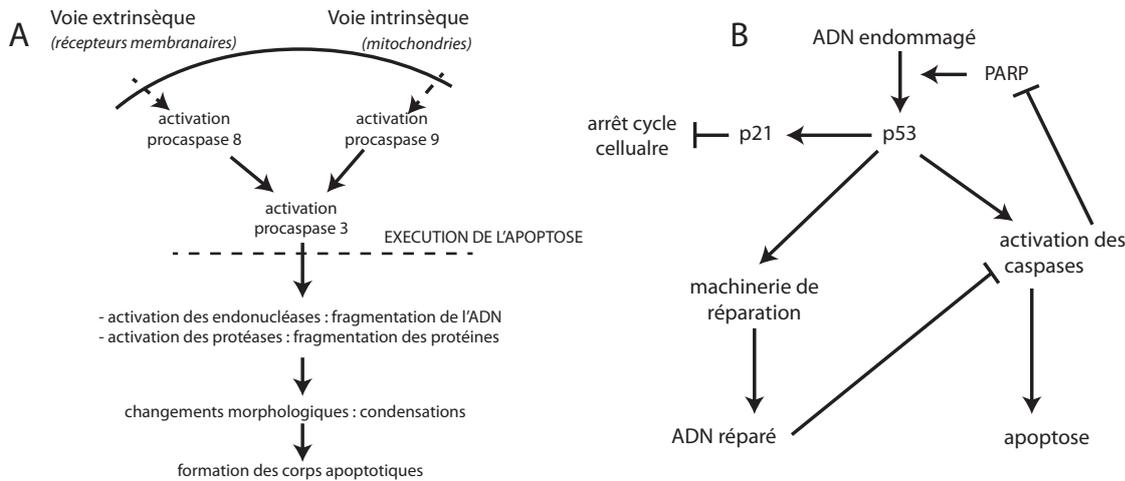


FIGURE 1.3 – A : les deux voies classiques de l'apoptose, partant de signaux extrinsèques ou intrinsèques, amenant à l'activation des procaspases 3, exécutrices de l'apoptose. B : rôle de p53 dans l'apoptose suite à la réparation de dommages liés à l'ADN. En cas de dommage de l'ADN, certains complexes protéiques dont ceux contenant PARP peuvent stimuler p53. Celui-ci active p21^{Cip1} afin de mettre la cellule en pause. p53 stimule le recrutement de la machinerie de réparation de l'ADN, en même temps qu'il stimule l'activation des caspases. Celles-ci clivent et inactivent PARP et initient l'apoptose. Si l'ADN est réparé, il semblerait que certains complexes puissent inhiber l'activation des caspases et arrêter l'apoptose. Sinon, la cellule meurt.

restriction, la progression dans G1 est alors stoppée par l'inhibition de la phosphorylation de pRb, et la cellule entre en quiescence.

Il apparaît évident que les points de contrôle sont essentiels dans la maintenance de l'intégrité de l'ADN d'une cellule. La mutation de ces points de contrôle ou de protéines centrales comme p53 ou pRb peut entraîner une prolifération anormale. Si les éventuels dommages ne peuvent être réparés, la cellule peut se suicider. C'est l'apoptose, ou la mort contrôlée d'une cellule.

Cancer et apoptose

Durant le développement du ver *C. Elegans*, le devenir de toutes les cellules a été défini dès la première division. Il a alors été montré que ce devenir peut-être une mort programmée. Depuis, ce phénomène, appelé apoptose, a été très bien caractérisé et possède une séquence bien déterminée. Son rôle principale est de maintenir l'homéostasie des cellules et d'éliminer les cellules endommagées, de manière contrôlée [47]. L'apoptose est très affectée dans les cellules cancéreuses.

L'apoptose L'apoptose est un processus énergie-dépendant qui implique des protéases de la famille des caspases. L'énergie chimique utilisée par la cellule provient de l'hydrolyse d'ATP (adénosine triphosphate), qui libère de l'énergie lorsqu'elle est transformée en adénosine diphosphate, ADP. La plupart des réactions biologiques nécessitent l'utilisation d'ATP. L'apoptose est opposée à un autre type de mort cellulaire, énergie-indépendant : la nécrose. Des dommages physiques ou chimiques peuvent amener à de l'apoptose ou de la nécrose selon le type de dommage et son intensité [48, 49]. En particulier, la quantité d'énergie disponible peut guider le choix entre apoptose et nécrose.

Que l'origine de l'apoptose soit extrinsèque (agents chimiques par exemple) ou intrinsèque (problèmes sur l'ADN), les voies d'apoptoses convergent toujours vers l'activation de la sous-

Apoptose pré-nécrotique	
Arrondissement des cellules et diminution de leur taille	
Fragmentation nucléaire	
Condensation intense de la chromatine	
Membrane cytoplasmique presque intacte	
Membranes lysosomales intactes	
Externalisation de signaux “mange-moi”	
Nécrose	Nécrose secondaire
Pas de fragmentation nucléaire	Fragmentation nucléaire
Condensation modérée de la chromatine	Condensation intense de la chromatine
	Relargage de caspase-3 activée
Gonflement de la cellule	Gonflement de la cellule
Perméation des membranes lysosomales	Perméation des membranes lysosomales
Perméation de la membrane cytoplasmique	Perméation de la membrane cytoplasmique

TABLE 1.1 – Différences et points communs entre apoptose pré-nécrotique, nécrose et nécrose secondaire.

famille de protéines exécutrices de l’apoptose dont la caspase-3 fait partie [50]. La procaspase 3 est clivée et activée par d’autres caspases (notamment les caspase-8 et caspase-9), ce qui lui confère une rétention nucléaire. Une fois cette activation réalisée, il semblerait que la cellule s’engage irréversiblement dans le processus apoptotique autocatalytique, de la même manière que le passage du point de restriction engage irréversiblement la cellule dans le cycle cellulaire. Ce processus implique la fragmentation de l’ADN en petits morceaux (180-200 paires de base [51]), la dégradation des composants comme les organelles, la réticulation des protéines entre elles, et la formation de corps apoptotiques, plus petits et très compacts [50]. Ce corps se met alors à sécréter des signaux “mange-moi” [52], qui attirent principalement des macrophages qui phagocytent ces corps [53].

Rôle de p53 p53 a également un rôle central dans l’apoptose, puisque cette protéine inhibe l’activation de protéines anti-apoptotiques comme BCL-2 [54], alors qu’en même temps elle peut aider à l’activation des caspases [55]. En cas de dommages sur l’ADN, p53 est activé par des complexes protéiques afin de tenter sa réparation. PARP est une protéine faisant partie des complexes de réparation de cassures simple brin de l’ADN, connue pour positivement réguler l’activation de p53 [56].

La figure 1.3B montre un schéma représentant une vue simplifiée de l’action de p53 dans l’apoptose et la réparation de l’ADN, incluant des partenaires clefs. Dans un premier temps, p53 active p21^{Cip1}, comme nous l’avons vu, afin de bloquer la progression de la cellule dans le cycle cellulaire. p53 active également le recrutement de protéines de réparation de l’ADN. Dans un second temps, p53 peut activer les caspases. La caspase-3 clive PARP dans le noyau. PARP comme enzyme de réparation consomme beaucoup d’énergie, et une des finalités de l’apoptose étant le clivage de l’ADN, l’énergie dépensée par la PARP est une perte [55]. Deux scénarii peuvent alors se produire, montrant l’ajustement très fin de ces deux processus. Soit l’ADN n’est pas réparable, et dans ce cas, la cellule s’engage irréversiblement vers l’apoptose et meurt. Soit la machinerie de réparation répare l’ADN. Dans ce dernier cas, une étude suggère que l’ADN réparé doit agir en quelque sorte contre l’activité des caspases et stopper l’apoptose [57]. Il semblerait ainsi que les cellules ayant activé p53 ne sont pas nécessairement condamnées.

Nécrose apoptotique Revenons sur les dernières étapes de l'apoptose. Dans la situation d'un organisme pluricellulaire, les cellules en fin d'apoptose sécrètent des signaux attirant la phagocytose par des macrophages. Des signaux "trouve-moi" permettent au macrophage d'être attirés par les corps apoptotiques [58], alors que la présence de signaux "mange-moi" et l'absence de signaux "ne-me-mange-pas" assurent que les macrophages ne phagocytent que des cellules apoptotiques [52, 59]. Cette voie, appelée efférocytose, n'est pas la voie canonique de l'apoptose. En effet, dans de nombreux cas (organismes unicellulaires, absence de macrophages, etc), les corps apoptotiques ne peuvent être phagocytés. La fin de l'apoptose ressemble ainsi histologiquement à une nécrose, mais reste différente de ce processus énergie-indépendant. Cette nécrose est alors qualifiée de nécrose secondaire, ou nécrose apoptotique. Le tableau 1.1 résume les différences entre apoptose pré-nécrotique, nécrose et nécrose secondaire [60].

Le début de la nécrose secondaire ressemble fortement au début de l'apoptose. La différence apparaît ensuite, dans le cas d'absence de macrophages. Les changements morphologiques arrivant à la cellule sont alors similaire à ceux de la nécrose, mais il semblerait que ce programme soit la fin naturelle de l'apoptose. L'apoptose consiste en la mort contrôlée de la cellule, et ce processus final autocatalytique libère des signaux pro-inflammatoires et immunogéniques [53], ainsi que d'autres signaux contagieux pour les cellules environnantes. Par exemple les fragments produits durant la nécrose secondaire sont responsables d'un certain nombre de maladies comme l'asthme [61] ou encore athérosclérose [62]. L'efférocytose contrôle mieux la fin de l'apoptose en empêchant le relargage de ces signaux. Elle est également plus rapide que la dégradation autocatalytique, et est énergétiquement favorable. En effet, de l'énergie peut être récupérée de la digestion des corps apoptotiques.

Hyperprolifération Si nous considérons les fréquences d'altérations de p53 et pRb, ainsi que les mutations des facteurs en amont ou en aval, la grande majorité des cellules tumorales ont des points de contrôle défectueux. Que ceux-ci servent à engager l'apoptose ou limiter la prolifération n'a donc pas grande importance. Dans les deux cas, cela implique qu'une cellule peut se diviser de manière anarchique, sans contrôle de qualité de son ADN, empêchant donc soit sa mort contrôlée soit sa réparation. C'est l'hyperprolifération des cellules : les cellules se divisent plus et meurent moins.

Activation du stroma La distance limite moyenne de diffusion de l'oxygène dans un tissu biologique est de l'ordre de la centaine de micromètres [63]. Les cellules tumorales se développent localement et forment des micro tumeurs. Celles-ci n'étant pas directement alimentées par des vaisseaux sanguins, les cellules du centre commencent à manquer d'oxygène lorsque la micro tumeur atteint une taille supérieure à la centaine de micromètres. Ce phénomène, l'hypoxie, entraîne directement la surexpression de HIF (*hypoxia induced factor*, facteur induit par l'hypoxie) [64]. HIF est un facteur se liant à l'ADN [65], qui aide à restaurer le manque d'oxygène en induisant entre autre la glycolyse - création d'énergie par la voie anaérobique [66]. La voie normale de création de l'énergie, la voie aérobie, est moins active dans les cellules cancéreuses, qui présentent dans de nombreux cas une activité de HIF plus intense [67]. Il est à noter que dans le cas de la glycolyse, la création d'énergie est plus importante durant la phase G1 [68]. L'hypoxie finit par entraîner l'apoptose des cellules au centre de la micro tumeur [66]. La mort cellulaire limite ainsi la taille de ces micro tumeurs au millimètre environ. La reprise de la croissance nécessite l'activation du stroma.

La figure 1.4 résume les changements dans le stroma résultant de son activation par la micro tumeur. En réponse à l'hypoxie, HIF aide à la synthèse de PDGF (*platelet derived growth factor*, facteur de croissance dérivé des plaquettes) et VEGF (*vascular endothelial growth factor*, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), favorisant l'angiogénèse, i.e. la néo-vascularisation de la tumeur [64]. Sans cette étape la micro tumeur ne peut pas croître à des tailles supérieures au

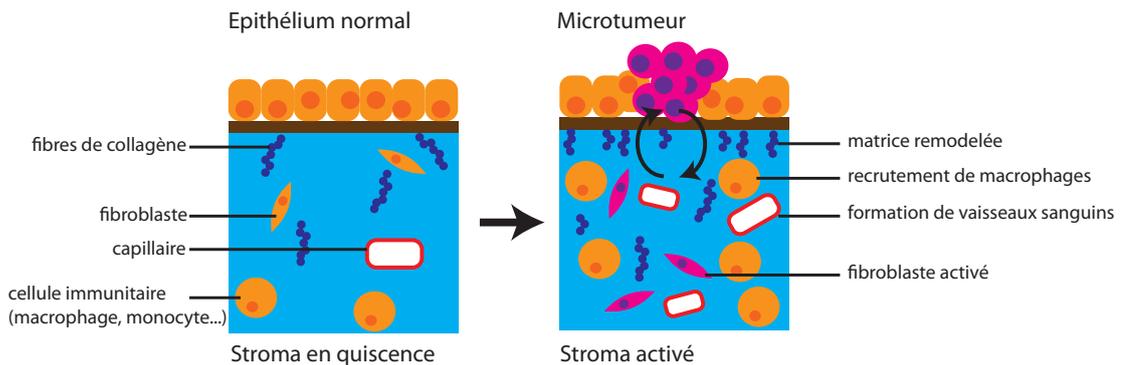


FIGURE 1.4 – Activation du stroma par la tumeur. Une cellule d'un épithélium normal acquiert des mutations qui la font proliférer anormalement. La micro tumeur sécrète un grand nombre de facteurs transformants, activant ainsi le stroma. Les fibroblastes se transforment, les cellules du système immunitaire telles que les macrophages sont recrutées, et les cellules endothéliales créent d'autres vaisseaux sanguins. La matrice est remodelée et rendue plus connective (desmoplasie).

millimètre. D'autres facteurs de croissance sont également sécrétés, comme bFGF (*basic fibroblast growth factor*, facteur de croissance basic de fibroblaste) qui aide également à l'angiogénèse, mais aussi TGF- β (*transforming growth factor β* , facteur de croissance transformant β) et des interleukines [18]. La sécrétion de ces facteurs provoque l'arrêt de l'homéostasie du stroma par des voies paracrines [69].

Durant l'activation, des macrophages sont recrutés (la nécrose secondaire présente au cœur d'une tumeur relargue des signaux immunogéniques recrutant des macrophages [70]), des vaisseaux sanguins sont créés, et les fibroblastes sont activés, participant au remodelage de la matrice extracellulaire qui devient plus connective (figure 1.4). La micro tumeur peut alors croître, et sa croissance exponentielle est elle-même guidée par ce stroma [18]. Dans les tumeurs malignes, une constante production de VEGF assure la formation continue de vaisseaux sanguins [71]. Il existe ainsi un fort dialogue biochimique entre le stroma et la tumeur, chacun influençant le phénotype de l'autre. Beaucoup d'études récentes visent par ailleurs à une "renormalisation" du stroma, à comprendre comme sa désactivation [72]. Par exemple, l'invasion d'un tissu dépend fortement de l'angiogénèse et donc de VEGF, mais également des récepteurs à VEGF, notamment VEGFR2 (*VEGF receptor 2*, récepteur à VEGF 2). Il a été montré qu'un traitement à base d'anticorps anti-VEGFR2 inhibait totalement l'invasion, mais également que le phénotype revient à la normal : le stroma retourne à son état pré-malin [71].

Myofibroblastes Les fibroblastes sont les cellules formant la matrice extracellulaire. Ils peuvent être activés par divers facteurs, et sont en particulier présents dans les processus de cicatrisation, mais aussi dans d'autres organes sains [73]. Les facteurs de croissance sécrétés par la tumeur, bFGF et TGF- β , peuvent activer les fibroblastes du stroma. Ces fibroblastes associés à la tumeur, ont une forme plus allongée, en forme de fuseau, et présentent des caractéristiques partagées avec celles des cellules des muscles lisses et des fibroblastes [74, 75]. Ils sont qualifiés de fibroblastes de muscle lisse activés, ou plus simplement de myofibroblastes. Ils possèdent des caractéristiques contractiles, et sont notamment les cellules qui génèrent la plus grande force lors des processus de cicatrisation de blessures [74]. Leur présence a été signalé dans de nombreux cancers, comme le sein [76], la prostate [77] ou encore la peau [78]. Le stroma est modifié par ces myofibroblastes, la matrice étant rendue plus connective dans un processus appelé la desmoplasie [79]. Ceci augmente

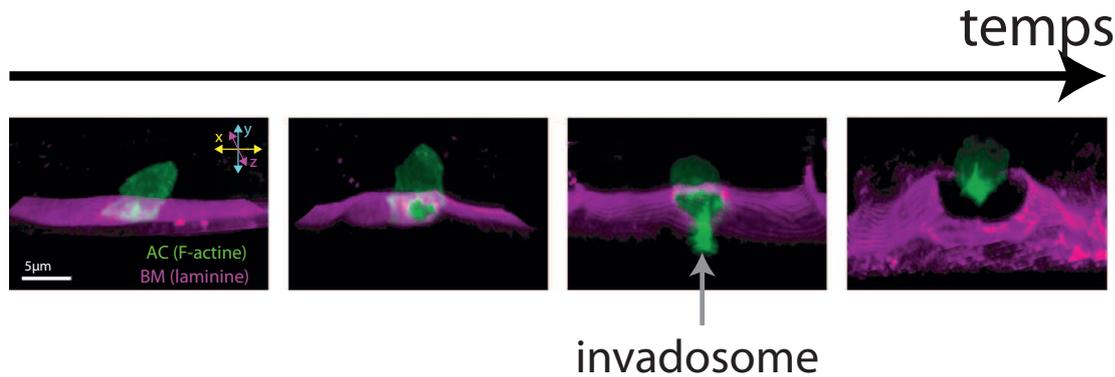


FIGURE 1.5 – Cellule AC traversant une lame basale chez *C. Elegans* (image adaptée de [89]). La formation d’invadosome (visible en vert par un marquage de l’actine) est essentielle à l’invasion à travers la lame basale (en magenta).

la rigidité du stroma, et nous pourrions nous demander si ce stroma, mécaniquement activé, peut lui aussi aider à la progression tumorale. Il est supposé que l’activation de ces fibroblastes précède le début de l’invasion [80].

Invasion et dissémination métastatique

Les carcinomes, tumeurs épithéliales, sont séparés de leur stroma par une lame basale. L’envahissement du micro environnement passe par la dégradation de cette lame. Une fois dégradée, les cellules tumorales, aidées par les cellules stromales, migrent vers les vaisseaux sanguins et peuvent y pénétrer. Elles peuvent alors a priori disséminer dans des organes distants. C’est le processus d’invasion et de dissémination métastatique.

Lame basale Durant l’organogénèse, les épithélium, endothélium, ou encore nerfs se séparent de leur stroma par une fine matrice amorphe, appelée lame basale [81, 82, 83]. La lame basale joue un rôle important dans l’adhésion cellulaire, la filtrations de protéines, ou encore la morphogénèse [84]. La dégradation de cette lame et le passage d’une cellule d’un côté à l’autre est appelé l’invasion. Ce processus est observé durant le développement où des trophoblastes peuvent franchir la lame basale pour former le placenta [85], mais aussi lorsque des cellules de la crête neurale ou des myoblastes la traverse durant leur migration [86, 87]. Durant le développement de *C. Elegans*, la cellule AC, cellule de gonade, traverse deux lames basales pour migrer de l’utérus jusqu’à la vulve. Pour envahir, la cellule lance des protrusions appelées invadosomes, et dégrade, grâce à des métalloprotéases, la lame basale. La cellule peut ainsi migrer de l’autre côté de la lame [88] (figure 1.5A).

Le groupe de Sherwood a montré que l’invasion de la cellule AC est possible car son programme de prolifération est désactivé : en le réactivant, la cellule perd sa capacité à envahir et reste sur place à se diviser [90]. Ceci sous-entend que dans ce cas une cellule peut soit proliférer, soit envahir. Un autre argument en faveur d’une dichotomie prolifération/migration ou invasion vient du constat que $p27^{Kip1}$, protéine inhibitrice de prolifération, peut également promouvoir la migration cellulaire lorsqu’elle est cytoplasmique [91].

L’envahissement du tissu adjacent requière plus que le simple passage à travers la lame basale : il faut également pouvoir migrer. Les cellules épithéliales de la tumeur peuvent entre autres mutations acquérir une transformation appelée EMT (*epithelial to mesenchymal transition*, tran-

sition épithéliale vers mésenchymale), transition pendant laquelle elles acquièrent un phénotype beaucoup plus mobile [92, 93]. Une fois les cellules tumorales dans le stroma, elles peuvent migrer vers les vaisseaux sanguins, et entrer dans la circulation sanguine par un processus appelé intravasation.

Métastases Le nombre de cellules tumorales dans le sang est corrélé avec la malignité de la tumeur, et plusieurs groupes dont le nôtre sont intéressés à leur capture à des fins de diagnostic et de thérapie (voir [94] pour une revue des différentes méthodes de capture). Si elles survivent aux différentes contraintes présentes dans la circulation sanguine, elles peuvent en sortir par un processus appelé extravasation [95], et disséminer dans un organe distant [96].

La formation de tumeurs secondaires n'est pas un processus efficace [97]. Pour se faire, la micro tumeur doit activer son nouveau stroma, et la formation de tumeurs secondaires, appelées métastases, peut dans ce cas se produire. Durant toutes les étapes allant de l'activation du stroma à la formation de métastases, un fort dialogue biochimique entre les cellules tumorales et les différentes cellules stromales se produit. Le stroma peut même être mutagène pour la tumeur, augmentant éventuellement la probabilité que les cellules accumulent les aberrations nécessaires au développement de la tumeur [18]. Pouvons-nous imaginer d'autres types de dialogues entre la tumeur et son micro environnement qui pourraient influencer sa croissance, son développement, ou tout simplement la progression cancéreuse ?

La croissance d'une tumeur requière souvent une compétition pour de la place. La tumeur, confinée, augmente son volume au détriment des tissus environnants, et d'un point de vue mécanique, nous pouvons imaginer que pour pousser dans un environnement confiné, la tumeur doit développer une pression. Réciproquement, les tissus environnants et/ou le stroma peuvent répondre mécaniquement, entraînant un dialogue mécanique, qui viendrait se superposer au dialogue biochimique discuté auparavant. Nous allons discuter présenter les bases d'un tel dialogue mécanique.

.....

1.2 Mécanotransduction et prolifération

La mécanotransduction est la transformation d'un signal mécanique en signal biochimique, que la cellule peut interpréter. La cellule est continuellement soumise à des sollicitations mécaniques, venant se superposer aux sollicitations biochimiques existantes [98].

Mécanotransduction Les cellules ressentent la tension de leur micro environnement via les contacts focaux que celles-ci créent. Par exemple, les intégrines, qui sont des protéines transmembranaires assurant l'adhésion d'une cellule à un substrat, sont des plateformes pour beaucoup de protéines inter et intracellulaires [99]. Notamment, ces plateformes servent de points de réticulation pour les filaments d'actine formant le cytosquelette.

Les voies de mécanotransductions comprennent toutes un facteur de transcription qui, sous certaines contraintes mécaniques, peut être activé ou inactivé, activant ou inhibant ainsi la synthèse de ses gènes cibles [98]. Les trois grandes familles de tels facteurs de transcription comprennent :

- la β -caténine, qui lorsqu'elle n'est pas phosphorylée a une rétention cytoplasmique, et se relocalise dans le noyau en cas de phosphorylation. Elle active des gènes pro-prolifératifs [100].
- NF- κ B, naturellement séquestré dans le cytoplasme par IKK. Lors de contraintes de cisaillement notamment, la phosphorylation de IKK relâche NF- κ B qui se déplace dans le noyau et participe à l'activation de gènes anti-apoptotiques [101].
- YAP et TAZ, deux homologues, possédant naturellement une localisation nucléaire lorsqu'ils ne sont pas phosphorylés, activant leur gènes cibles pro-prolifératifs. L'activation

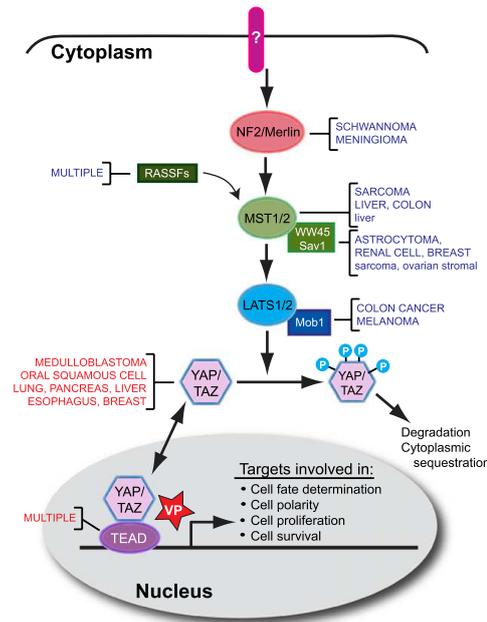


FIGURE 1.6 – Présentation de la voie Hippo. Figure obtenue de [104]. Différents signaux peuvent activer la voie Hippo. Son activation entraîne une chaîne de phosphorylation. NF2 phosphoryle Mst1/2, qui peuvent phosphoryler à leur tour Lats1/2, entraînant la phosphorylation de YAP et TAZ.

de cette voie entraîne leur phosphorylation, puis leur séquestration cytoplasmique et leur dégradation. L'activation de ses protéines a donc un effet anti-prolifératif [102].

Chacune de ces voies a ses spécificités, et elles peuvent interagir entre elles ; notamment YAP peut s'associer à la β -caténine dans le cytoplasme pour l'aider à aller dans le noyau même sans être phosphorylée, alors que les complexes de β -caténine peuvent séquestrer YAP dans le cytoplasme sans qu'il ne soit phosphorylé non plus [103].

YAP et TAZ font parti de la voie appelée la voie Hippo. L'activation de cette voie est anti-proliférative. Dans le cadre de contrôle mécanique de la croissance des tumeurs, nous allons présenter cette voie un peu plus en détail.

La voie Hippo L'activation canonique de la voie Hippo passe par une cascade de phosphorylation se terminant par la phosphorylation des deux co-facteurs de transcriptions YAP et TAZ, provoquant ainsi leur rétention cytoplasmique, et leur dégradation [104] (voir figure 1.6).

Dans la voie canonique, des signaux encore mal connus activent NF2, déclenchant l'activation de la voie. Les mutations de NF2 ne sont pas rares dans certains cancers, attestant de l'activation anti-proliférative de cette voie, mais étonnamment ses autres composants sont rarement mutés [104]. NF2 active les protéines Mst1 et Mst2, qui peuvent activer Lats1 et Lats2, qui sont les kinases de YAP et TAZ.

Il a été montré que des contraintes de tension du cytosquelette peuvent activer cette voie, amenant les cellules à un arrêt de la prolifération [105, 106].

Prolifération et mécanique Les contraintes mécaniques peuvent avoir des effets à l'échelle du tissu : une tumeur est soumise à des contraintes, et celles-ci peuvent diminuer la prolifération cellulaire, comme nous allons le voir.

L'existence de forces développées et ressenties pas la tumeur a été montré récemment in vivo par le groupe de Jain [12]. Des tumeurs fraîchement excisées, coupées dans leur plan sagittal à 80% de leur hauteur, relaxent, suggérant que celles-ci sont sous contrainte mécanique. L'excision et une coupe similaire d'un tissu sain ne présente en revanche aucune relaxation. La propre croissance de la tumeur impose une contrainte mécanique interne, dont cette étude montre qu'elle est en partie stockée par la matrice extracellulaire. La même étude révèle que la déplétion des myofibroblastes diminue partiellement la contrainte stockée par la tumeur, suggérant qu'en plus de la contrainte interne due à la croissance, se superpose une contrainte externe exercée en partie par les cellules activées du stroma.

Or des contraintes mécaniques peuvent influencer la prolifération cellulaire. En 1998, le groupe de Ingber exerce des contraintes mécaniques sur des cellules endothéliales isolées [107]. Pour se faire, les cellules sont placées sur des surfaces avec des motifs de fibronectines de différentes concentrations. La fibronectine est une protéine assurant l'adhésion cellulaire à un substrat. Les cellules adhérant à la fibronectine par des contacts focaux ressentent une tension du cytosquelette, qui augmente à mesure que la concentration de fibronectine diminue. Les cellules qui ressentent une grande tension sont bloquées dans le cycle cellulaire, au niveau du point de restriction, par une surexpression de la protéine inhibitrice de CDK, p27^{Kip1}. Une étude plus récente suggère que l'élasticité de la matrice en contact avec les cellules peut également directement réguler la phosphorylation de pRb, en agissant directement sur les complexes de cycline D / CKD4/6 [108]. Ces études montrent ainsi un lien direct entre prolifération cellulaire et contrainte mécanique ressentie in vitro, à l'échelle de la cellule.

Les dialogues mécaniques et biochimiques sont intrinsèquement couplés in vivo. Une solution pour les découpler est de travailler in vitro, où l'environnement biochimique et l'environnement mécanique peuvent être précisément contrôlés. Une étude pionnière en ce sens est celle réalisée par le groupe de Farge [109]. Un morceau de colon est prélevé d'une souris génétiquement prédisposée à développer un cancer du colon. Ce tissu est conservé in vitro, dans un environnement biochimique constant, puis une pression de l'ordre de 1 kPa est appliquée. Ce morceau de colon sous pression présente une activation de la β -caténine, montrant qu'une contrainte mécanique seule pourrait suffire à activer in vitro cette voie mécanosensible. La pression développée par le transit intestinal pourrait ainsi stimuler à l'échelle du tissu des gènes amenant à l'hyperprolifération et à l'apparition de micro tumeurs. Il y a à ce jour très peu de données connues sur l'ordre de grandeur des pressions développées chez l'homme tant au niveau du transit qu'au niveau des pressions développées par les différents organes eux-mêmes, mais une étude montre que celle associée au transit dans le colon de rats est de l'ordre de 1 kPa [110].

Afin d'avoir une estimation in vitro de la pression développée par un tissu, Jain et ses collègues mettent des cellules dans des gels d'agarose de différentes concentrations. Étant confinées dans les trois dimensions, les cellules poussent localement et forment des agrégats cellulaires [111]. La rigidité d'un gel d'agarose est une fonction directe de sa concentration, ainsi, plus un gel est concentré, et plus il est rigide. Cette étude révèle que les agrégats ainsi formés ne poussent pas avec le même taux de croissance selon la concentration du gel, et que ceux-ci saturent à des tailles d'autant plus faibles que la rigidité du gel est grande. La croissance de tels agrégats se faisant à rigidité constante, la contrainte mécanique qu'ils ressentent augmente avec leur taille. Bien que les gels soient de concentrations différentes, les contraintes exercées par les agrégats sont du même ordre de grandeur, et la pression développée par ces derniers est estimée à 10 kPa. La suite de cette étude par le même groupe montre que la réduction du taux de croissance des agrégats peut être dans leur cas assimilée à une légère réduction de la prolifération cellulaire,

et une augmentation de l'apoptose sur des temps longs (de l'ordre d'une dizaine de jours) [112]. En digérant l'agarose avec de l'agarase, ces agrégats sont libérés de toutes contraintes. Leur croissance reprend et ils atteignent la taille qu'ils auraient eu s'il n'y avait pas eu de milieu rigide les contraignant : ce phénomène d'inhibition de prolifération apparaît donc comme étant réversible.

Ces études pionnières nous montrent qu'aussi bien au niveau cellulaire que multicellulaire, la prolifération peut être affectée par des contraintes mécaniques. Nous allons dans la suite nous intéresser aux caractéristiques mécaniques des tissus biologiques.

•••••

1.3 Caractéristique de tissus biologique

Un tissu biologique est un système complexe présentant différentes caractéristiques selon l'échelle spatiale considérée :

- À l'échelle microscopique, des protéines peuvent s'échanger de cellules en cellules, entrer dans le tissu et en sortir, faisant émerger des propriétés de milieu poreux aux tissus.
- À l'échelle mésoscopique, celle des cellules, il peut y avoir apparition de cellules par division, disparition par apoptose, ou encore glissements cellules à cellules, voire des réarrangements. Un comportement fluide des tissus biologiques peut ainsi être observé.
- À l'échelle macroscopique, un tissu peut être comprimé, déformé, voire présenter des fractures. Nous verrons que ceci peut entraîner un comportement solide.
- Enfin, les tissus peuvent être considérés comme des systèmes composites. En effet, nous pourrions imaginer que la présence de matrice extracellulaire modifie leurs propriétés mécaniques.

Nous nous intéressons aux cas, plus simplistes, où les tissus biologiques sont considérés homogènes dans leur composition (non composite), et où la porosité ne joue pas de rôle. Dans cette section, nous allons montrer que selon le temps caractéristique de l'application d'une contrainte, un tissu biologique peut être considéré soit comme un solide, soit comme un liquide.

Tissu : liquide ou solide ? Le développement d'approches pour l'étude de tissus biologiques *in vitro* a amené à la création de sphéroïdes multicellulaires. Un sphéroïde est un assemblage de cellules qui, lorsqu'elles sont agrégées *in vitro*, prennent la forme d'une boule, sur plusieurs jours - la prochaine section détaillera plus ces objets, ainsi que les différentes manières de les former.

Phillips et Steinberg ont formé des sphéroïdes à partir de cellules de poulet et les ont centrifugés à environ 1000 g (figure 1.7) pendant différents temps : soit la centrifugation était courte (de l'ordre d'une dizaine de minute, [113]), soit elle était longue (de l'ordre d'un jour, [114]). Au bout de quelques minutes, les sphéroïdes sont aplatis. Le but de leur expérience est d'observer le ré-arrondissement de ces sphéroïdes selon le temps qu'ils ont passé à être centrifugés.

Les sphéroïdes centrifugés pendant quelques minutes reviennent très rapidement à leur forme initiale (en une ou deux minutes). Cette observation suggère que le sphéroïde se comporte comme un solide élastique. Les cellules le composant se déforment, et l'ensemble revient à sa forme initiale dès que la contrainte est arrêtée.

Les sphéroïdes centrifugés pendant une journée présentent un comportement très différent. Au lieu de revenir rapidement à leur forme initiale, ils s'arrondissent mais très lentement, exhibant un comportement de fluide visqueux. Les cellules, pendant cette longue centrifugation, ne se sont pas seulement déformées, mais se sont également déplacées les unes par rapport aux autres. Le retour à la sphère doit donc passer par un glissement de cellules à cellules : celles-ci frottent les unes aux autres, et une viscosité effective peut émerger de ces frottements. De plus, certains sphéroïdes ne reviennent pas totalement à leur forme initiale. Cette observation peut être expliquée par des

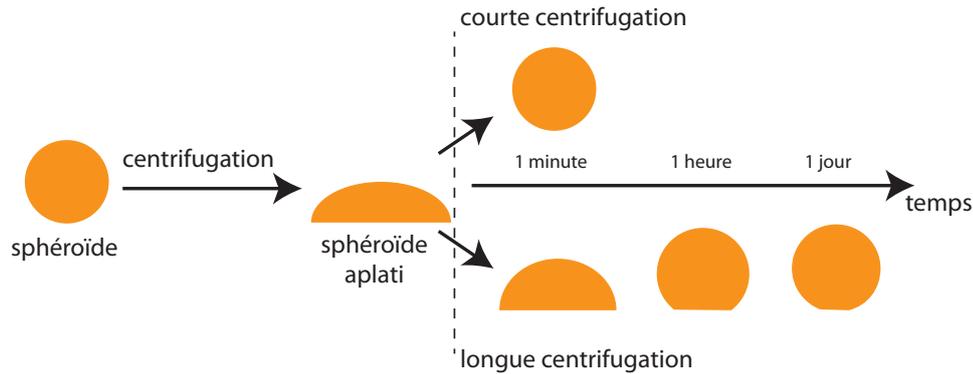


FIGURE 1.7 – Expérience de centrifugation de sphéroïdes [113, 114]. Des sphéroïdes de cellules de poulet sont centrifugés à environ 1000 g, soit pendant des temps courts (une dizaine de minutes), soit pendant des temps longs (1 jour). Les sphéroïdes prennent rapidement une forme aplatie, qui relaxe lorsque la centrifugation est terminée. La relaxation est rapide (de l'ordre de la minute) si la centrifugation est courte, tandis qu'elle est longue (de l'ordre du jour) si la centrifugation est longue.

réarrangement cellulaires, comme les transitions observées en embryogénèse : la centrifugation peut apporter l'énergie nécessaire à cette transition, mais est par la suite dissipée. Pour réarrondir le sphéroïde, il faudrait apporter cette énergie perdue [115].

Ainsi, les sphéroïdes, modèles de tissus biologiques *in vitro*, sont soit des matériaux viscoélastiques dans lesquels les cellules se déforment d'abord rapidement, puis coulent, soit des liquides ou encore des matériaux élasto-plastiques dans lequel des réarrangements cellulaires permettent l'écoulement du tissu en-dessus d'une certaine contrainte [114]. Ces différents comportements sont dictés par le temps et l'intensité de la contrainte [116].

Aux temps courts Aux temps courts, un tissu biologique peut être considéré comme un système viscoélastique, possédant une élasticité E et une viscosité apparente η . Des expériences de fracture de sphéroïdes montrent que si un agrégat est étiré rapidement entre deux tiges, il se déforme élastiquement, tandis que s'il est étiré lentement, il finit par se couper en deux, se fracturer [117]. De ces expériences, une élasticité de l'ordre de 1-10 kPa, représentant l'élasticité de la cellule, est extraite, de même qu'une viscosité émerge du mouvement cellule-cellule et des réarrangements, de l'ordre de 10^6 Pa.s.

Aux temps longs Des expériences de compression unidirectionnelle de sphéroïdes par des plaques parallèles mettent en avant les propriétés de liquide élastico-visqueux des tissus biologiques [118, 119, 120]. La mesure des rayons de courbure de sphéroïdes comprimés entre deux plaques peut amener, via la loi de Laplace, à la définition de la tension de surface γ . La tension de surface est la propension qu'a un liquide à minimiser sa surface à la suite d'un déséquilibre non favorable des forces ressenties par les molécules (les cellules dans le cas d'un tissu biologique) à la surface. Ces expériences donnent toutes en ordre de grandeur une valeur similaire pour la tension de surface de l'ordre de 10 mN/m. La viscosité est quant à elle estimée à partir de la cinétique de relaxation vers la forme sphérique une fois la compression achevée. Elle est dans ce cas de l'ordre de 10^5 Pa.s.

Viscosité Une propriété partagée par ces expériences, qu'elles soient à temps long ou à temps court, est la viscosité. Il faut faire attention à la définition de viscosité, qui émerge d'observations macroscopiques. Alors qu'aux temps courts, la viscosité peut avoir pour origine le glissement

cellule à cellule, aux temps plus longs, elle peut également émerger de réarrangements cellulaires. Il reste néanmoins à définir ce temps caractéristique : quelles est l'échelle de temps à considérer ?

Le groupe de Jean-François Joanny et Jacques Prost a montré que la division cellulaire et la mort cellulaire peuvent fluidifier un tissu biologique, pour un temps caractéristique étant celui de la division/la mort cellulaire [121]. En effet, en se divisant, une cellule double son volume et déplace son environnement, alors qu'en mourant, une cellule libère de la place, permettant des réarrangements. De ces divisions/morts émergent une viscosité effective, qui est d'autant plus faible que ces événements sont fréquents.

Nous pouvons dans ce cadre comprendre que dans les expériences ayant une durée d'un jour comme celles de centrifugation, plusieurs événements de division et mort peuvent aider à la formation d'un état de cellules réarrangées. Pour que la relaxation se fasse, il faut attendre un temps caractéristique similaire afin de refluidifier le tissu.

Temps caractéristique Dans les différentes expériences de contrainte mécanique sur cellules / tissus, le temps caractéristique est important. Les contraintes mécaniques qui peuvent être ressenties par les tumeurs sont à des temps caractéristiques grands devant le temps de division cellulaires, comme dans les expériences du groupe de Jain [111].

Pour terminer cette introduction, nous présentons les tumeurs modèles utilisées durant cette thèse : les sphéroïdes multicellulaires.

•••••

1.4 Sphéroïdes multicellulaires

Parmi les différents systèmes modèles existants, celui des sphéroïdes multicellulaires (SMC) apparait comme étant le plus proche d'une tumeur. Il consiste en une agrégation de cellules d'un même type. L'adhésion cellulaire et les mouvements de cellules / divisions et apoptoses fluidifient cet agrégat sur des temps longs, aussi bien qu'au bout de quelques jours, une tension de surface émerge et l'agrégat cellulaire prend la forme d'un boule. Ce système a été introduit par Sutherland dans les années 70 comme système modèle permettant l'étude de tumeurs in vitro [122]. Depuis, il est très utilisé pour l'étude in vitro de la délivrance de drogues [123], de la prolifération cellulaire en 3 dimensions [124], de l'invasion [125], de l'angiogénèse [126] ou du cycle cellulaire [127]. Il existe plusieurs méthodes pour les former, dont les trois principales sont la méthode d'accrétion par agitation orbitaire [128], d'agrégation en goutte pendante [129], ou d'agrégation sur coussin d'agarose [130]. Nous avons essayé chaque méthode. Les deux premières sont schématisées sur la figure 1.8. Chacune présente ses avantages et inconvénients, résumés dans la table 1.2.

Formation Pour des raisons pratiques, et parce que nous voulons être capable de manipuler facilement les SMC, nous avons décidé d'utiliser la méthode du coussin d'agarose, présenté sur la figure 1.9. Un faible volume d'agarose mou (1%) est ajouté dans un puits afin de créer un coussin d'agarose. Ce coussin est concave à cause de phénomènes capillaires. Les cellules n'adhérant pas à l'agarose, elles se rassemblent au fond des puits par l'action de la gravité, et adhèrent entre elles. Des structures tridimensionnelles se créent et une tension de surface émerge de cette assemblage. Au bout de 48h, un SMC est créé.

Ces objets tridimensionnels imitent très bien les gradients physiologiques pertinents existant dans une tumeur [131]. Les cellules du bord, en contact direct avec le chimiostat imposé par l'expérimentateur, ont un meilleur accès aux facteurs vitaux comme oxygène ou facteurs de croissance que les cellules du centre, qui peuvent entrer en apoptose. Il apparait donc que les cellules du bord sont en bonne condition pour proliférer, tandis que les cellules du centre forment un cœur apoptotique, situation également rencontrée in vivo. Les corps apoptotiques ne pouvant être nettoyés par les macrophages, l'apoptose se termine en nécrose secondaire.

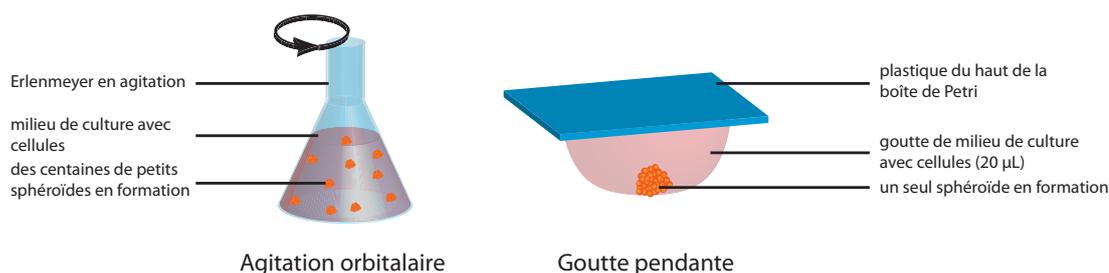


FIGURE 1.8 – Formation de sphéroïdes par la méthode d’agitation orbitaire et par la méthode de la goutte pendante. Par agitation orbitaire, un erlenmeyer, ayant subi un traitement de surface anti-adhésif pour les cellules, est rempli de milieu de culture contenant des cellules. Il est mis en agitation de sorte que sa surface se mette en mouvement : les cellules s’agrègent et forment de nombreux sphéroïdes. Pour la méthode de la goutte pendante, 20 μL de milieu de culture contenant des cellules est disposé sur le haut d’une boîte de Pétri, puis retourné. Par action de la gravité, les cellules se regroupent et s’assemblent en bas de la goutte.

méthode	avantages	inconvénients
agitation orbitaire	création d’un grand nombre de SMC très rapidement, méthode fonctionnant pour un grand nombre de lignées	taille des SMC variable et petite, difficile d’en disposer individuellement, pas très sphérique
goutte pendante	SMC très homogène en taille, rapide à faire, bien sphérique	faible nombre, petit, dur à disposer, ne fonctionne pas pour beaucoup de lignées
coussin d’agarose	SMC relativement homogène en taille, très facile à disposer et à manipuler individuellement, sphérique	plus long à préparer, ne marche pas pour beaucoup de lignées

TABLE 1.2 – Avantages et inconvénients des différentes méthodes pour former des sphéroïdes.

Le sphéroïde comme une sous-unité de la tumeur

Lorsque la tumeur est encore à un stade avasculaire, nous pouvons comprendre la pertinence des SMC comme modèle de tumeur : la microtumeur n’est alors alimentée que par le bord, et atteint une taille limite déterminée par la diffusion des facteurs essentiels. Cette taille, de l’ordre du millimètre, est du même ordre de grandeur que la taille limite que peuvent atteindre des sphéroïdes, pour les mêmes raisons. Néanmoins, nous avons vu que lorsque la tumeur est plus grosse, une angiogénèse menant à une néovascularisation de celle-ci apparaît. Les cellules de la tumeur sont alimentées à partir des vaisseaux sanguins et celles directement en contact avec ces derniers ont un meilleur accès aux facteurs vitaux que celles s’en éloignant. Comme nous l’avons vu précédemment, une des causes de mort cellulaire est l’hypoxie, qui aide à la génération de vaisseaux sanguins. Ainsi, la distance typique entre deux vaisseaux est de l’ordre de la centaine de micromètres, distance qui est bien corrélée avec la diffusion/consommation de molécules d’oxygène [132]. Les cellules les plus proches des vaisseaux consomment l’oxygène et autres facteurs essentiels, et les cellules lointaines meurent. En cela, un

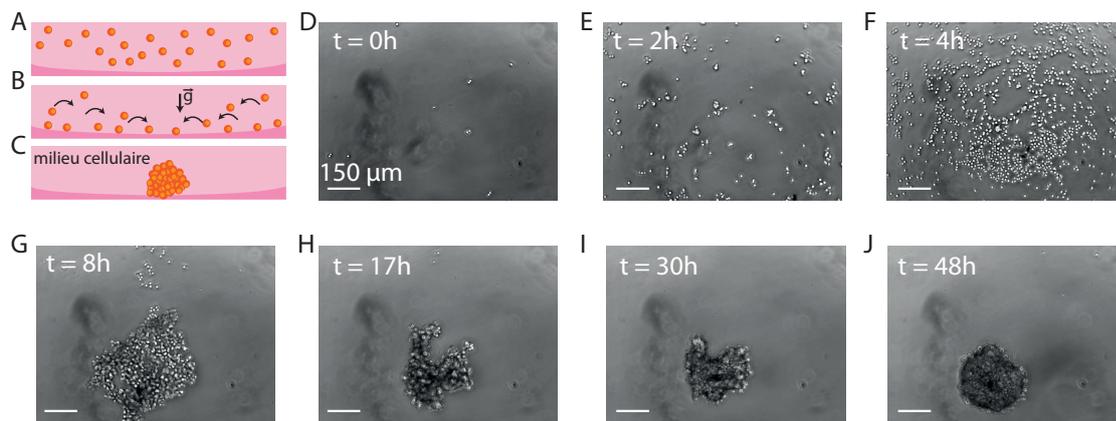


FIGURE 1.9 – Formation de sphéroïdes multicellulaires par la méthode du coussin d'agarose. A-C : schéma ; 2000 cellules sont mises en suspensions dans un puits de 1 cm de diamètre contenant un coussin d'agarose à 1% au fond. Les cellules n'adhérant pas à l'agarose, elles sédimentent par l'action de la gravité. L'agarose étant courbé par des effets capillaires, les cellules se regroupent au centre. Elles adhèrent entre elles et forment un sphéroïde. D-J : photos de ce processus durant 48h ; D : 0h, E : 2h, F : 4h, G : 8h, H : 17h, I : 30h et J : 48h. Échelle : 150 μm .

SMC peut être vu comme une sous-unité de la tumeur, à une échelle locale entre deux vaisseaux adjacents. Bien que ses propriétés mécaniques peuvent être différentes de celles de la tumeur, qui est plus riche autant sur le plan de la diversité cellulaire que de la diversité de la matrice extracellulaire, nous pouvons faire l'hypothèse que le sphéroïde, qui est à une espèce d'échelle mésoscopique de la tumeur, nous donne accès à des informations locales de la tumeur, essentielles à sa compréhension globale.

Structuration d'un sphéroïde Différentes techniques ont été employées afin de mesurer la distribution de plusieurs grandeurs au sein d'un MSC, comme résumé sur la figure 1.10 [131]. Nous observons que les cellules du bord ont un meilleur accès à l'oxygène et au glucose, leur permettant une meilleure synthèse de l'énergie (ATP). Les cellules du centre sont donc en majorité en mort cellulaire, alors que les cellules du bord se divisent majoritairement.

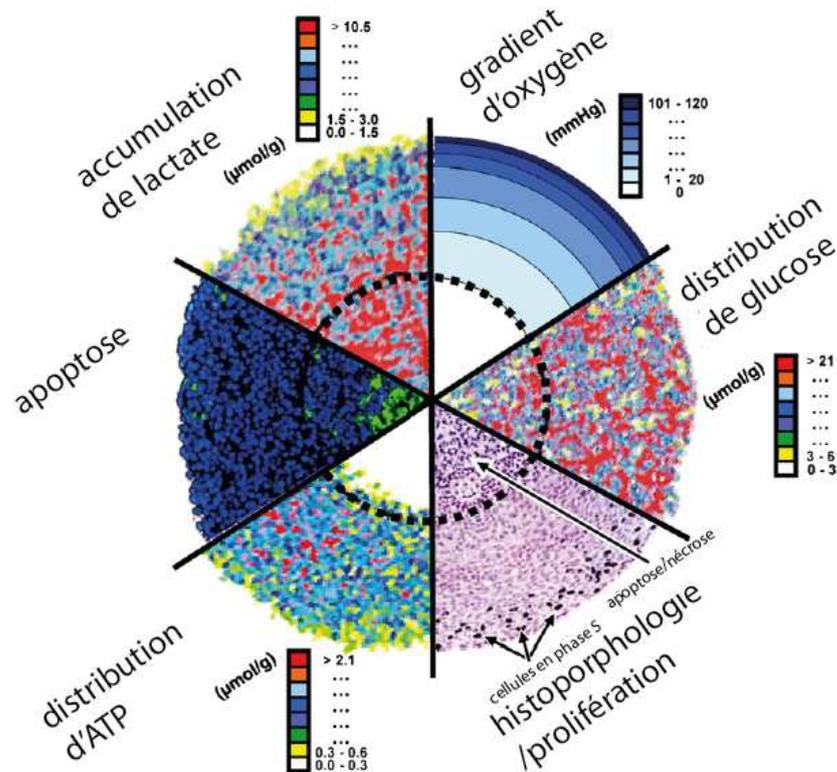


FIGURE 1.10 – Gradients de différentes grandeurs au sein d’un MSC. Schéma adapté de [131]. Les cellules du bord consommant l’oxygène et le glucose, les deux sources d’énergie, nous remarquons un gradient de ces espèces dans le sphéroïde. Ainsi, la distribution d’ATP est plus importante au bord qu’au centre, et le lactate, base conjuguée de l’acide lactique, s’accumule au centre du sphéroïde où il y a moins d’oxygène. Ceci amène à une structuration du SMC : les cellules meurent plus au centre, et se divisent plus au bord.

.....
 1.5 Notre problématique

Tout au long de cette introduction, nous avons vu que la tumeur n’est pas un objet isolé, mais en interaction avec son micro environnement, et que ces interactions, aussi bien de nature biochimiques que mécaniques peuvent avoir une influence sur le développement du cancer. L’activation du stroma et l’intensité du dialogue pouvant exister influencent fortement le phénotype de la tumeur. Nous allons dans cette thèse nous intéresser aux interactions mécaniques, en regard notamment de l’hypothèse de Paget : *le terroir* mécanique peut-il influencer la progression cancéreuse ?

Nous avons développé une nouvelle méthodologie permettant de comprimer de manière isotrope un SMC, nous permettant de travailler à environnement biochimique et mécanique contrôlé. Durant cette thèse, nous étudions :

- l’influence de contraintes mécaniques constantes sur la croissance et la mécanique de SMC

(chapitre 2)

- l'origine moléculaire de l'influence de la contrainte mécanique (chapitre 3)
- l'influence de contraintes mécaniques constantes sur le mouvement interne de cellules dans des SMC (flux de cellules) et externes (invasion) (chapitre 4)
- les contraintes développées par un SMC en croissance, à l'aide d'un dispositif microfluidique (chapitre 5)

Réponse mécanique sous compression

Ce premier chapitre de résultats est dédié à l'étude d'un point de vue physique de la compression de SMC. Dans une première partie, nous détaillons la méthode utilisée pour appliquer une contrainte mécanique sur une sphéroïde. Nous verrons que le taux de croissance du sphéroïde est fonction de la contrainte de compression appliquée, et qu'il diminue à mesure que la compression augmente, cet effet étant réversible [133, 134]. Dans une seconde partie, nous nous intéresserons à l'influence mécanique de cette compression. Nous montrerons alors qu'elle implique une compression rapide du sphéroïde de quelques pourcents, et nous présenterons une méthode développée afin d'avoir accès à la taille des cellules au sein du SMC. Enfin, nous verrons que le volume des cellules est réduit de manière non-homogène : les cellules du centre sont plus réduites que les cellules du bord.

.....

2.1 Compression de sphéroïdes

Cette première partie présente la méthode utilisée pour comprimer des SMC. Nous avons utilisé une approche originale, suggérée par Bernard Cabane (ESPCI, Paris). Cette approche consiste à utiliser un biopolymère, le Dextran, afin d'exercer une contrainte mécano-osmotique, que nous appellerons par la suite contrainte mécanique ou compressive, sur un sphéroïde. Dans une première approche, la contrainte est exercée indirectement par le Dextran, qui n'est pas en contact avec le SMC. Dans une seconde approche, le SMC est en contact direct avec le Dextran.

Mesure du volume de sphéroïde Les premières expériences ont été réalisées sur des sphéroïdes de CT26, cellules provenant de carcinomes de colon de souris. Le protocole de formation des sphéroïdes et de culture cellulaire est détaillé en Annexe Protocoles, à la fin de cette thèse.

Afin de s'assurer de la sphéricité des sphéroïdes, nous avons marqué le bord d'un sphéroïde de CT26 à l'aide d'un marqueur membranaire, le Wheat Germ Agglutinin. Celui-ci est ajouté dans le milieu de culture, et marque la membrane plasmique des cellules en 5 minutes. Le SMC est imagé par un microscope confocal afin d'acquérir des tranches optiques $I(i,j,k)$ séparée de $1 \mu\text{m}$ en z . Pour chaque pixel (i,j) , nous choisissons quel indice k correspond au maximum de netteté dans la position latérale, ce qui nous permet d'obtenir une surface tridimensionnelle (figure 2.1A). En calculant le rayon moyen pour chaque position z , nous obtenons le profil du sphéroïde (figure 2.1B). Un quart de cercle a été ajusté afin de montrer la sphéricité du SMC, et de celui-ci, nous pouvons extraire un angle de contact entre la surface et le SMC qui est de $\theta_c = 157^\circ$, angle similaire à celui d'un goutte d'eau sur une surface super-hydrophobe [135].

Nous avons estimé l'erreur faite sur le rayon du sphéroïde selon que celui-ci soit un peu étalé (rayon R') ou totalement sphérique (rayon R) (figure 2.1C). En considérant que le volume ne varie pas, nous pouvons écrire la relation entre R' et R :

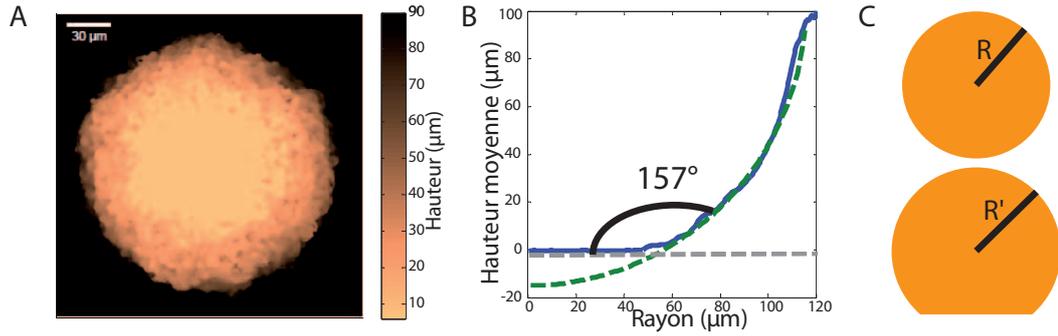


FIGURE 2.1 – Profil d'un sphéroïde de CT26. A : extraction de l'intensité pour chaque plan z. B : profil du sphéroïde; le quart de cercle en pointillé vert ajuste le reste du profil, et l'angle de contact est marqué. C : schéma de la variation du rayon du sphéroïde selon que celui-ci soit légèrement mouillant ou pas du tout.

$$R' = \left(\frac{2}{1 - \frac{3}{2} \cos \theta_c + \frac{1}{2} \cos^3 \theta_c} \right)^{1/3} R$$

Avec la valeur obtenue de θ_c , ceci donne $R' = 1.0015R$. L'erreur sur l'évaluation du rayon dans ces conditions est très faible, et reste inférieure à $1 \mu\text{m}$ pour des rayons de sphéroïde de l'ordre de $500 \mu\text{m}$. Or, sachant que nous ne pouvons pas mesurer le rayon du sphéroïde à mieux que $5 \mu\text{m}$, l'incertitude due à la sphéricité du SMC est complètement négligeable.

Les SMC étant bien sphériques, la mesure de leur diamètre nous donne une mesure directe de leur volume. Par la suite, nous tracerons pour la croissance des sphéroïdes le volume de ceux-ci normalisé au volume initial. La figure 2.2A présente des photos de la croissance d'un sphéroïde de CT26.

Compression indirecte L'idée de base est d'enfermer le SMC dans un sac de dialyse en cellulose reconstituée, fermé à ses extrémités, et plongé dans un milieu de culture contenant un biopolymère, le Dextran, ayant un poids moléculaire de 100 kDa (figure 2.2B). Le poids de coupure du sac est choisi de telle sorte que ce biopolymère ne puisse pas pénétrer à l'intérieur du sac, mais qu'il reste perméable à l'oxygène, aux nutriments et aux facteurs de croissances. En résulte alors une pression osmotique qui tend à vider le sac de son eau. Le sac se dégonfle, et exerce ainsi une contrainte mécanique sur le sphéroïde, directement fonction de la concentration en Dextran dans le milieu extérieur. L'avantage de cette méthode est de pouvoir isoler le sphéroïde du milieu extérieur contenant le Dextran, et donc des effets osmotiques directs. La pression ainsi appliquée a été calibrée comme dans [136, 137].

La figure 2.2C présente des courbes de croissance du volume, normalisé au volume initial (diamètre initial de l'ordre de $400 \mu\text{m}$) pour différents SMC de CT26. La croissance des SMC sans contrainte mécanique est présentée en bleu. Lorsque les SMC sont petits en début de croissance, toutes les cellules ont un accès presque équivalent aux facteurs essentiels : toutes les cellules prolifèrent, et la croissance est exponentielle. À mesure que ceux-ci croissent, les cellules au centre commencent à entrer en apoptose : le nombre de cellules qui meurent augmente. Ce nombre augmente jusqu'à un point où la mort cellulaire équilibre en nombre la division cellulaire : le volume du sphéroïde sature.

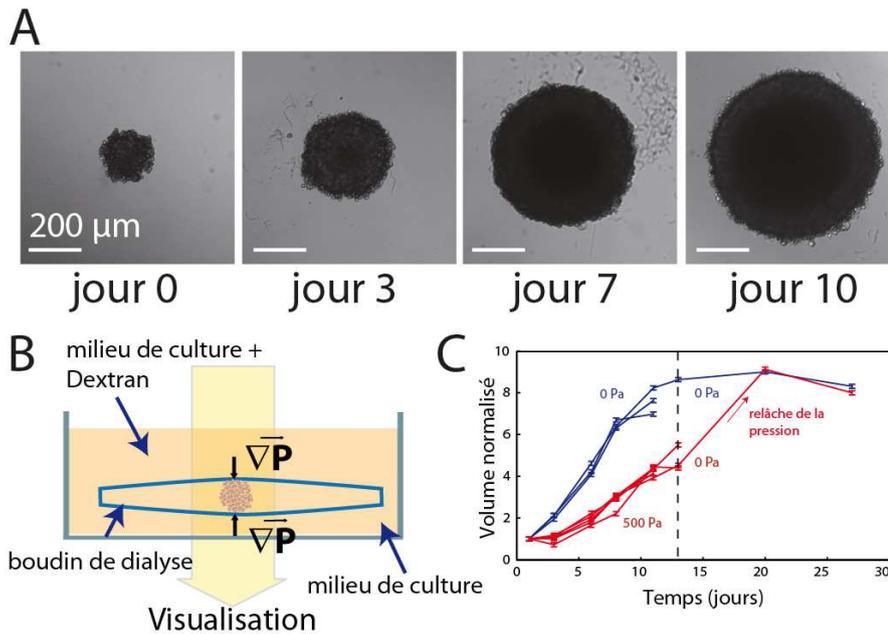


FIGURE 2.2 – Méthode de compression indirecte de SMC par effet osmotique. A : croissance libre d'un SMC. B : schéma du dispositif. Un SMC est plongé dans un sac de dialyse fermé. Ce sac est immergé dans du milieu de culture contenant du Dextran, qui ne peut pas entrer dans le sac. Nous imageons par dessous grâce à un microscope inversé. C : courbes de croissance de SMC dans le dispositif, soit sous 0 Pa (bleu) ou sous 500 Pa (rouge). Les barres d'erreur correspondent à l'incertitude sur la mesure du diamètre du SMC, qui est estimée à $\pm 10 \mu\text{m}$.

Ces effets de saturation de la taille de SMC en croissance libre sont assez controversés. En effet, des expériences menées par le groupe de Freyer dans les années 80 montrent que la saturation est contrôlée par la concentration en oxygène et en glucose du milieu environnant [138, 139, 140]. Ainsi une telle saturation pourrait venir d'un renouvellement insuffisant du milieu [141]. Étant donné que dans nos expériences les SMC sont tous soumis au même chimiostat, nous supposons que la saturation en volume de ces derniers est identique.

Nous observons sur la figure 2.2C que la croissance de SMC sous une contrainte mécanique aussi faible que 500 Pa est radicalement réduite, et ce très rapidement après l'application de la contrainte. Si nous attendons assez longtemps, nous observons que les SMCaturent à des volumes plus petits que lorsqu'ils ne sont pas sous contrainte. La pression est relâchée 13 jours après le début de l'expérience. Le sac de dialyse dégonflé contenant le SMC est remis dans un milieu sans Dextran; le sac se regonfle dès les premières heures, et la contrainte est relâchée rapidement comparé au temps de division cellulaire. Nous remarquons que la croissance reprend, et que le sphéroïde atteint la taille maximale qu'il aurait atteint sans contrainte, montrant que cette inhibition de prolifération est réversible.

Ces expériences nous ont permis dans un premier temps de reproduire les observations faites par le groupe de Jain sur les agrégats inclus dans des gels d'agarose de différentes rigidités. Cependant, il faut noter que dans leur cas, la rigidité est imposée, et que la contrainte mécanique ressentie par les agrégats cellulaires est due à leur propre croissance, et varie avec cette dernière.

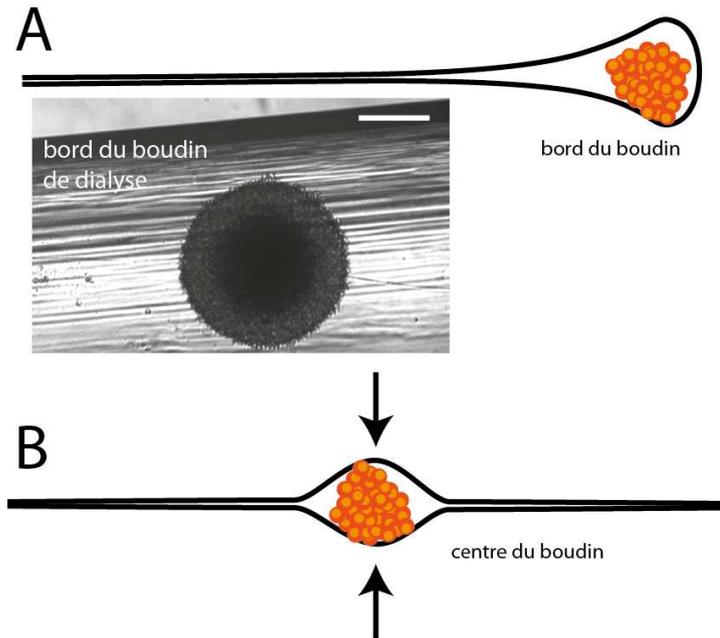


FIGURE 2.3 – Inconvénients de l'expérience de mise sous contrainte mécanique grâce à des sacs de dialyse. A : le SMC peut se trouver bloqué sur le bord du sac, B : la contrainte est unidirectionnelle. Échelle : 200 μm .

Dans notre cas, la contrainte mécanique est imposée et constante. Nous observons néanmoins un comportement similaire : la croissance de ces amas multicellulaires est inhibée, et ce de manière réversible. Ces expériences ont cependant quelques défauts :

- Pour un unique sphéroïde, nous utilisons une verrerie de 100ml, remplie de 40 mL de milieu cellulaire. Ceci augmente énormément les risques de contamination et limite considérablement le nombre d'expériences que nous pouvons réaliser.
- Les sacs de dialyse ne sont pas dégonflés de la même manière partout. En effet, au bord de ceux-ci la déformation ne peut être totale à cause de la courbure finie du sac, et il arrive que certains SMC bloqués sur ce bord poussent sans contrainte (figure 2.3A). Cette observation nous a néanmoins permis de vérifier que la présence du Dextran dans le milieu extérieur n'influence pas directement la croissance des MSC, mais que c'est bien la contrainte exercée par la membrane qui en est à l'origine.
- Enfin, la contrainte exercée n'est pas isotrope, mais plutôt unidirectionnelle. Les sacs ne pouvant se courber parfaitement, ceux-ci n'épousent pas la forme des SMC à l'intérieur (figure 2.3B). Cependant si la contrainte exercée est faible, les SMC conservent leur forme sphérique, la pression ainsi appliquée devant être redistribuée. Si nous montons plus haut en pression (au dessus de 5 kPa typiquement), le sphéroïde commence à se déformer et à prendre une forme d'ellipsoïde aplati, ce qui nous limite dans la gamme de pression employée. Il faut ainsi que la contrainte reste inférieure à la pression de Laplace : $P_{\text{osmo}} < 2\gamma/R$. Avec R de l'ordre de 200 μm et γ de l'ordre de 10 mN/m, ceci donne une contrainte de l'ordre de 10 kPa.

Pour toutes ces raisons, nous avons changé l'approche de l'expérience, la rendant par la

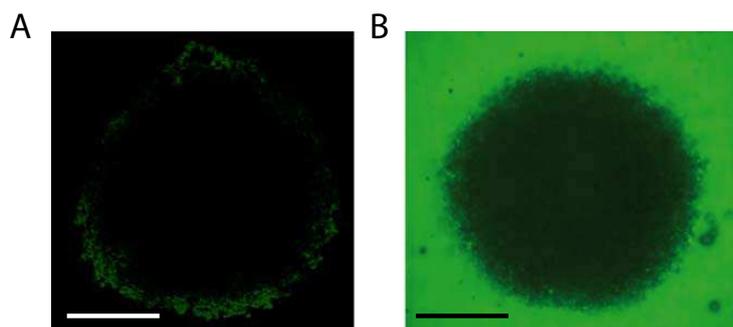


FIGURE 2.4 – Pénétration du Dextran dans un SMC de CT26. Le sphéroïde est immergé dans du Dextran conjugué avec un fluorophore (FITC) pendant 48h. Il est ensuite soit coupé au niveau du plan équatorial puis imagé (A) soit imagé directement en microscopie confocale (B). Dans les deux cas, nous pouvons nous apercevoir que le Dextran ne pénètre que sur les 2-3 premières couches de cellules, mais pas au centre du SMC. Échelle = 200 μm .

même plus simple d'utilisation : nous immergeons le SMC directement dans le milieu contenant le Dextran.

Compression directe Nous plongeons directement les SMC dans le milieu cellulaire contenant le Dextran, et obtenons des résultats similaires à la méthode indirecte. En l'absence de membrane de dialyse, il a fallu tout d'abord s'assurer que le Dextran ne pénètre pas dans le sphéroïde, de manière à agir sur celui-ci en entier et non pas sur les cellules individuelles.

Des SMC sont immergés dans une solution contenant du Dextran conjugué à un fluorophore, le FITC (en vert sur la figure 2.4). La présence de Dextran dans le SMC est ensuite révélée par fluorescence, soit par des cryosections au niveau du plan équatorial (coupes de tissu au préalable gelé), soit par de la microscopie confocale au plan équatorial. Dans les deux cas, nous pouvons observer que le Dextran ne pénètre que sur la première couche de cellule.

La figure 2.5 présente le schéma de principe de l'expérience ainsi que les courbes de croissance des SMC sous différentes conditions de contraintes. Puisque la compression est cette fois isotrope, la mesure du diamètre donnera toujours une mesure du volume. Nous pouvons ainsi étendre la gamme de pression. Nous observons que les SMC sous contrainte mécanique répondent de la même façon que lors des expériences avec une sollicitation indirecte du Dextran. Le taux de croissance est réduit, et l'est d'autant plus que l'intensité de la compression est importante. Enfin, nous observons qu'il existe une saturation de l'effet dans la gamme de pression considérée : à partir de 5 kPa, le taux de croissance n'est plus modifié par l'augmentation de l'intensité de la contrainte.

De même que dans les expériences précédentes, cet effet est réversible. Nous sommes également limité en valeur supérieure sur la gamme de contrainte car nous ne voulons pas déclencher de réponse osmotique des cellules. Les expériences de stress osmotique menées déclenchant des réponses de ces voies considèrent des osmolytes avec des concentrations de l'ordre de 100 mM [142], alors que dans notre cas, la concentration en Dextran est de l'ordre de 0.5 mM pour une pression de 5 kPa, soit deux ordres de grandeur en dessous. Enfin, nous établissons la contrainte en remplaçant de moitié le milieu cellulaire par du milieu contenant le Dextran. Ceci nous oblige à utiliser des solutions avec des concentrations deux fois plus importantes. Nous avons limité nos études à des contraintes inférieures à 20 kPa car nous avons observé que des sphéroïdes peuvent

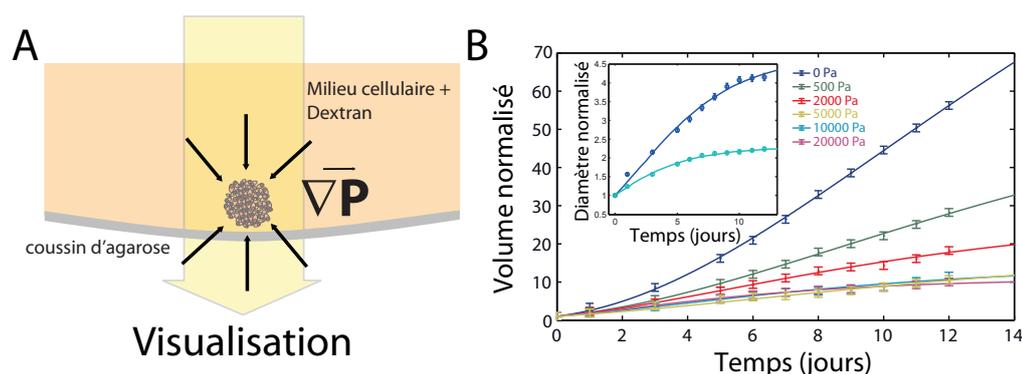


FIGURE 2.5 – Expérience de compression par ajout direct de Dextran dans le milieu cellulaire. A : principe de l’expérience. Un SMC est directement plongé dans du milieu de culture contenant du Dextran. B : courbes de croissance.

se désagréger pour des contraintes de l’ordre de 50 kPa.

Effet sur d’autres lignées Afin de vérifier la robustesse du phénomène observé, nous avons mené la même étude sur des sphéroïdes formés à partir de 4 autres lignées cellulaires. Nous avons choisi ces lignées afin de tester l’effet sur le type de cancer (carcinome contre sarcome, sein contre colon par exemple) et le grade du cancer (plus invasif contre moins invasif) :

- Les **HT29** sont des cellules de carcinomes de colon humain, moins invasives que les CT26.
- Les **BC52** sont des cellules de cancer du sein humain.
- Les **FHI** sont des cellules de Schwann (cellules formant les gaines de myéline des axones dans le système nerveux périphérique) immortalisées à partir de cellules de Schwann primaires.
- Les **AB6** sont des cellules de sarcomes murins (tumeur s’établissant, contrairement aux carcinomes, dans le centre de tissus conjonctifs).

La figure 2.6 présente les courbes de croissance de ces sphéroïdes. En dépit d’une certaine variabilité, nous remarquons que toutes les lignées répondent qualitativement de la même façon, à savoir par une réduction de leur taux de croissance. Ceci semble indiquer que ce phénomène de réduction de prolifération n’est pas cantonné à un type de cancer, ni même à un grade. En perspectives, il serait très intéressant de vérifier si cette propriété est aussi observée sur des cellules issues de cultures primaires.

La compression de SMC, qu’elle soit directe ou indirecte, a donc pour effet une réduction réversible de son taux de croissance. À ce stade, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses quant à ce qu’il se passe au niveau cellulaire :

1. La compression peut impliquer une diminution de la prolifération cellulaire au sein du SMC.
2. La compression peut impliquer une augmentation de l’apoptose au sein du SMC.
3. Les deux derniers effets peuvent être concomitants, ou bien la réduction de prolifération peut impliquer une augmentation de l’apoptose par exemple.
4. La compression peut augmenter la densité cellulaire, pouvant notamment diminuer l’apport de facteurs essentiels, ou déclencher directement des voies biochimiques.

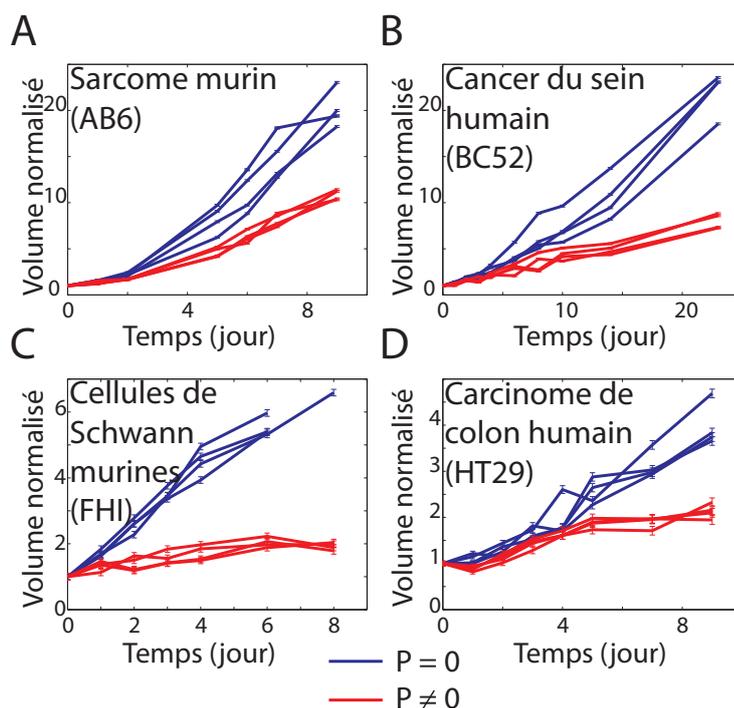


FIGURE 2.6 – Courbe de croissance de sphéroïdes de différentes lignées cellulaire sous contrainte mécanique (rouge) ou en l’absence de contrainte mécanique (bleu). A-B-C : la contrainte mécanique est de 5 kPa. D : la contrainte mécanique est de 10 kPa.

Les trois premiers points relèvent des réponses biologiques des cellules à cette contrainte mécanique, et seront étudiés dans le prochain chapitre de cette thèse. Le dernier point quant à lui peut soit être une réponse passive (compression d’un milieu élastique), soit être une réponse active des cellules à la stimulation mécanique.

Avant d’étudier l’influence de la contrainte sur le volume des cellules / du sphéroïde, nous allons présenter les différents contrôles réalisés au cours de cette thèse, qui nous permettent d’affirmer que la contrainte appliquée de cette sorte résulte en une contrainte mécanique ressentie par le sphéroïde.

.....

2.2 Contrainte mécano-osmotique

La plupart des contrôles effectués concernent des cellules individuelles (2D) plongées dans du milieu de culture contenant du Dextran à des concentrations équivalentes à 5 ou 10 kPa.

Effet sur le volume des cellules Nous avons dans un premier temps cultivé des cellules dans une solution contenant du Dextran à 55 g/L, similaire à une pression de 5 kPa. Nous avons, grâce à un Coulter Counter, mesuré le diamètre de cellules, leur nombre et leur viabilité (tableau 2.1). Nous observons qu’il n’y a pas de résultat mesurable sur le diamètre des cellules. En effet, dans cette mesure, le diamètre semble augmenter de quelques pourcents, alors que sous contrainte hyperosmotique, le volume d’une cellule diminue généralement. Cette observation montre que ce genre de mesure n’est pas très précise. Des mesures indépendantes effectuées dans l’équipe par

Contrainte (kPa)	Viabilité (%)	τ	τ_{G1} (% τ)	τ_S (% τ)	$\tau_{G2/M}$ (% τ)	Diamètre (μm)
0	94.4	18	7.6 (42)	8.1 (45)	2.3 (13)	14.2
5	90.9	22	9 (41)	9.9 (45)	3 (14)	14.7

TABLE 2.1 – Comparaison de différentes grandeurs pour des cellules individuelles dans un milieu de culture normal ou contenant du Dextran. La viabilité, le temps de doublement (τ) et le volume sont mesurés à partir d’un Coulter Counter. Les temps passés dans chacune des phases sont obtenus à partir de l’analyse d’histogrammes d’ADN réalisés en cytométrie de flux. Les temps sont donnés en heure. Les notations % τ indiquent quel pourcentage du cycle cellulaire est occupé par la phase considérée.

Sylvain Monnier montrent que l’ajout de Dextran diminue le volume de 5 %. Nous verrons par la suite que le volume des cellules au centre des sphéroïdes diminue bien plus que 5 %.

Effet sur la mort cellulaire Nous remarquons une légère augmentation de la mort cellulaire de l’ordre de 3 % du nombre total de cellules. Nous verrons dans le chapitre 3 qu’à temps court la mort cellulaire ne semble également pas être affectée dans les sphéroïdes.

Effet sur la prolifération Nous remarquons que le temps de doublement augmente légèrement (environ 20 %). Nous avons extrapolé celui-ci du nombre de cellules présentes 2 jours après le début de l’expérience, connaissant celui des CT26 dans des conditions normales de croissance (18h). Soit chacune des phases du cycle s’allonge légèrement, soit les cellules passent plus de temps en quiescence. Afin de vérifier ceci, nous avons mesuré le pourcentage de cellules présentes dans chaque phases du cycle cellulaire grâce à la cytométrie de flux (voir figure 3.5C). Nous remarquons dans ce cas que le temps passé dans une phase particulière du cycle n’est pas affecté. Nous déduisons que l’augmentation de la durée du cycle n’opère donc pas sur une phase en particulier en présence de Dextran. Nous verrons dans le chapitre 3 que ce n’est pas le cas pour les cellules dans les sphéroïdes.

Réponse osmotique Les stress osmotiques sont connus pour activer des voies de réponses dont des protéines appelées MAPK, (*mitogen activated protein kinases*, kinases activées par des mitogènes) [142]. Ces protéines, une fois activées, déclenchent des réponses cellulaires par des chaînes de phosphorylation. Les MAPK comprennent ERK (p44/42), JNK et p38. Nous mesurons leur niveau total et leur niveau activé (phosphorylé) par Western blot. Nous le normalisons ensuite par le niveau de ces protéines extraites de cellules cultivées dans des conditions normales. Dans ce cas, la valeur 1 signifie que la protéine considérée n’est pas affectée par la condition. Nous remarquons une légère activation de celles-ci à 2D, et une forte activation à 3D (figure 2.7B). Les signatures d’activation ne sont pas les mêmes, et il semblerait que bien qu’une contrainte mécanique puisse les activer à 3D, cette activation ne puisse pas être expliquée au niveau de cellules individuelles cultivées en présence de Dextran.

Influence sur les autres osmolytes Pour s’assurer que la présence de Dextran ne modifie pas la concentration d’autres osmolytes en solution, nous avons calculé la variation relative de la concentration d’un osmolyte, par exemple le glucose, due à la présence de Dextran. Le détail de ce calcul est donné dans l’Annexe Calculs. La variation relative de concentration $\delta c/c$ est de l’ordre de 10^{-5} - 10^{-4} aux concentrations de Dextran utilisées. L’effet étant très faible sur les osmolytes en solution, nous pouvons donc supposer que le mode d’action du Dextran n’est pas dû à des changements de potentiels chimiques.

Ces résultats obtenus à 2D nous laissent penser que le Dextran n’agit pas sur les cellules individuelles - il ne pénètre de toutes façons pas au centre du sphéroïde, mais reste cantonné à la périphérie. Son action émerge plutôt de l’organisation tridimensionnelle du sphéroïde. Nous pouvons voir cette pression comme une pression de déplétion, tendant à diminuer le volume

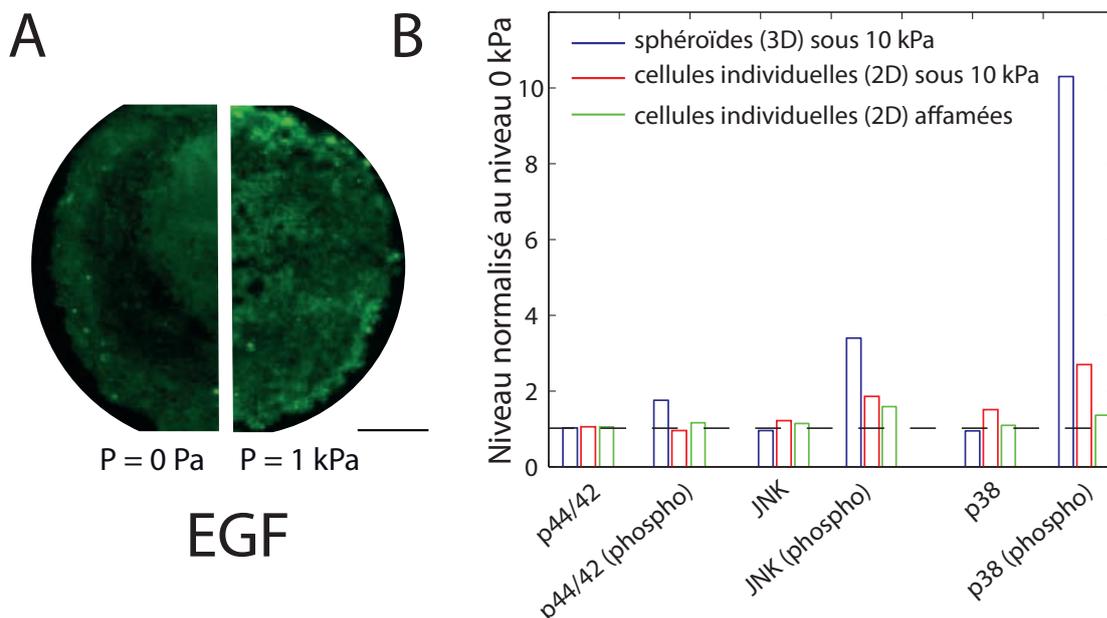


FIGURE 2.7 – A : Diffusion de l'EGF au sein de sphéroïdes sous contrainte compressive de 0 kPa ou de 1 kPa. Échelle : 100 μm . B : Niveau total des différentes MAPK et leur niveau activé (phosho) dans différentes conditions, normalisé au niveau basal dans des conditions normales de culture. Bleu : sphéroïde sous contrainte, normalisé par le niveau de sphéroïde sous aucune contrainte. Rouge : cellules individuelles en présence de Dextran, normalisé par le niveau de cellules individuelles sans Dextran. Vert : cellules individuelles dans des conditions de faible concentration en sérum, normalisé par des cellules individuelles dans des conditions normales de culture.

accessible au sphéroïde. Nous pouvons donc assimiler cette contrainte mécanique à une contrainte compressive.

Effet sur la diffusion de facteurs de croissance Un contrôle important pour terminer est de savoir si, compte tenu du caractère compressif de la contrainte, une éventuelle augmentation de la densité cellulaire pourrait limiter/diminuer la diffusion de facteurs de croissances ou autres facteurs essentiels. Pour répondre à cette question, nous avons immergé des petits sphéroïdes dans une solution contenant de l'EGF fluorescent (*epidermal growth factor*, facteur de croissance de l'épiderme) dans le milieu de culture à une concentration physiologique (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ce dernier n'est pas consommé par les CT26. Deux jours après, nous prélevons et révélons sa présence par fluorescence de cryosections réalisées au niveau du plan équatorial (figure 2.7A).

Nous remarquons la présence d'EGF partout dans le sphéroïde, suggérant que la diffusion de celui-ci n'est pas influencée par la compression. Nous avons tenté de réaliser la même expérience pour des sphéroïdes plus gros. L'expérience est plus délicate car le centre nécrotique des sphéroïdes est auto-fluorescent. Nous avons néanmoins remarqué que la diffusion n'est pas affectée, et que l'EGF ne pénètre pas jusqu'au centre, mais à une distance d'environ 150 μm du bord.

Enfin, les MAPKs sont connues pour être activées dans des conditions où la cellule manque de facteurs essentiels. Nous avons alors également comparé la signature de l'activation des MAPK

pour des cellules cultivées dans des conditions d'affaiblissement (passage de 10 % en sérum à 0.5 %), et constatons que dans ce cas également, cette condition ne semble pas expliquer l'activation des MAPK dans les cellules de sphéroïdes comprimés (figure 2.7B).

Ainsi, la contrainte compressive appliquée à l'aide du Dextran provoque une diminution du taux de croissance des sphéroïdes, mais celle-ci ne peut pas être expliquée ni par des effets osmotiques au niveau de cellule individuelles, ni a priori par des effets de compression diminuant l'accessibilité aux facteurs essentiels.

Dans la suite de ce chapitre et le suivant, nous étudierons la réponse mécanique, au niveau des cellules, puis la réponse biochimique, au niveau des protéines, dans des SMC comprimés.

• • • • •

2.3 Influence sur le volume des cellules

Les sphéroïdes sont des objets multicellulaires denses, opaques, rendant leur observation tridimensionnelle souvent délicate. L'utilisation de microscopie confocale conventionnelle nous permet de pénétrer jusqu'à des profondeurs de l'ordre de $70 \mu\text{m}$. La microscopie bi-photon peut améliorer cette longueur, et la pénétration peut monter jusqu'à une centaine de microns. Cette profondeur n'est pas encore satisfaisante pour obtenir des informations partout dans le sphéroïde si celui-ci est plus grand que $100 \mu\text{m}$.

Afin d'estimer le volume cellulaire à l'intérieur des sphéroïdes, nous avons donc décidé d'extrapoler cette information à partir d'informations à 2 dimensions. La méthode que j'ai développée est expliquée en détail dans l'Annexe Protocole de cette thèse.

Augmentation de la densité : effet passif

Des SMC sont coupés au niveau de leur plan équatorial par cryosection, puis tous les noyaux sont marqués en utilisant un intercalant de l'ADN, le DAPI. Les coupes sont ensuite imagées à haute résolution avec une épaisseur optique constante grâce à un microscope confocal. Afin d'avoir accès à une distribution du volume des cellules au sein des sphéroïdes, l'approche envisagée a été d'avoir une estimation locale de la distance noyau à noyau. Cette distance est une bonne estimation du diamètre, observable qui nous donne accès au volume. Pour mesurer cette distance noyau-noyau, nous avons calculé la fonction d'autocorrélation de l'intensité de fluorescence dans le plan équatorial. Une région d'intérêt circulaire d'environ 4 diamètres cellulaires est choisie aléatoirement dans la coupe, à une distance r du centre du sphéroïde. La fonction d'autocorrélation est calculée et intégrée sur tous les angles, en faisant l'hypothèse qu'il n'y a en moyenne pas de direction privilégiée de l'orientation des cellules (tissu isotrope). Nous observons sur la figure 2.8A que cette fonction d'autocorrélation présente typiquement 3 pics. Celui à l'origine, dont la largeur correspond au rayon moyen d'un noyau, et les deux autres, dont la position correspond à la distance moyenne du premier et du deuxième noyau voisin respectivement. Ensuite, la corrélation est perdue. Cette observation est le signe qu'il n'y a pas d'organisation à longue portée des cellules au sein du sphéroïde, comme dans un matériau amorphe. La distance $d(r)$ entre les deux premiers pics correspond à la distance moyenne entre le centre de chacun des noyaux. Nous prenons $d(r)$ cette distance comme estimation locale du diamètre cellulaire.

Ce processus Monte Carlo est répété $N \geq 200$, et N couples $(r, d(r))$ sont créés. Ils sont ensuite regroupés dans un histogramme dont la valeur de chaque point est la médiane des points dans chaque fenêtre, et dont l'incertitude correspond à l'incertitude sur la mesure de la médiane.

Nous avons appliqué une contrainte de 10 kPa à des SMC de HT29, puis nous avons effectué une mesure du diamètre local des SMC à différents temps après que la contrainte ait été appliquée (figure 2.8B). Nous remarquons qu'avant compression le diamètre des cellules est homogène à l'intérieur du sphéroïde. Ce diamètre moyen de $15.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$ est en accord avec d'autres mesures

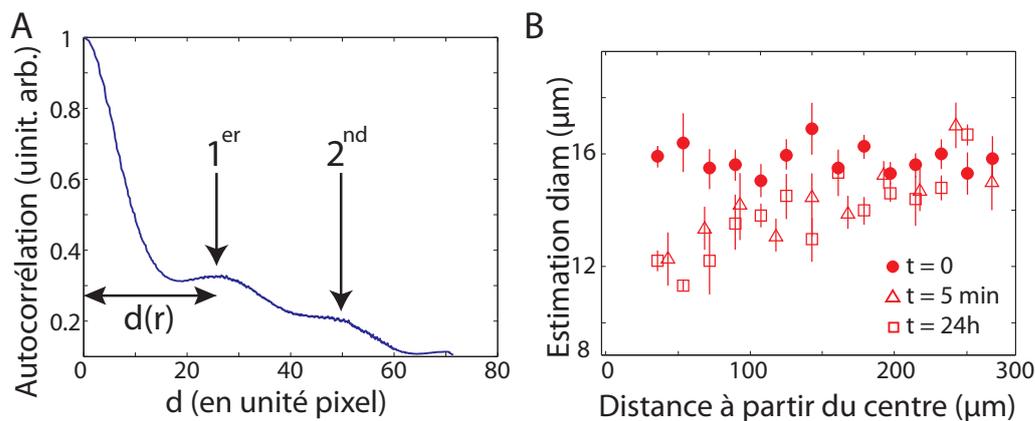


FIGURE 2.8 – Estimation du diamètre local des cellules dans un sphéroïde. A : fonction d'autocorrélation calculée localement sur une coupe de SMC de HT29. B : estimation du diamètre pour différents temps après exposition à une contrainte mécanique ; $t = 0$ h (\bullet), $t = 5$ min (\triangle) et $t = 24$ h (\square). Le calcul des barres d'erreur est expliqué dans le texte et en Annexe Protocoles.

de diamètre sur cette lignée cellulaire (réalisé par Coulter Counter, et mesuré directement par Sylvain Monnier), sur une population de cellules asynchrones. Très peu de temps après avoir appliqué la contrainte (moins de 5 min), nous observons que le diamètre des cellules est réduit de manière non-homogène à l'intérieur du SMC : les cellules du centre sont plus comprimées que les cellules du bord. Un jour après l'établissement de la contrainte, ce profil de réduction du diamètre est maintenu. Le fait que la contrainte s'établisse aussi vite suggère que le sphéroïde répond de manière passive à la contrainte, comme un milieu élastique.

Ce phénomène de réduction de diamètre cellulaire a également été observé pour des sphéroïdes issus de CT26 et de BC52 sous une contrainte de 5 kPa, avec à chaque fois une diminution inhomogène du diamètre (figures 2.9A et 2.9B). De plus, nous pouvons noter que cette décroissance perdure dans le temps, puisque 5 jours après l'établissement de la contrainte, ce profil est conservé pour des sphéroïdes de HT29 alors que le sphéroïde qui n'est pas sous contrainte conserve un profil homogène (figure 2.9C).

Réduction du rayon du sphéroïde

Nous observons que le volume des cellules diminue de manière non-homogène, avec une réduction plus importante au centre. Cette réduction implique aux temps courts une réduction du rayon du sphéroïde. La réduction étant très rapide devant le temps de division cellulaire, nous supposons que le nombre de cellule n'est pas modifié pendant cette phase. Afin d'obtenir une évaluation de cette réduction, nous calculons simplement le nombre de cellules dans un SMC dans les deux cas. Nous modélisons le profil de rayon des cellules au sein du sphéroïde comme indiqué sur la figure 2.10A. Nous considérons que le rayon des cellules est constant lorsqu'il n'y a pas de contrainte (rayon r_0), et évolue linéairement entre le rayon au centre r_P et le rayon au bord r_0 lorsque la contrainte est appliquée. Enfin, nous notons R_0 le rayon du sphéroïde avant la compression, et R_P le rayon juste après la compression.

Nous pouvons ainsi avoir une estimation de la densité de cellules $\rho(r)$ dans les deux cas. Le

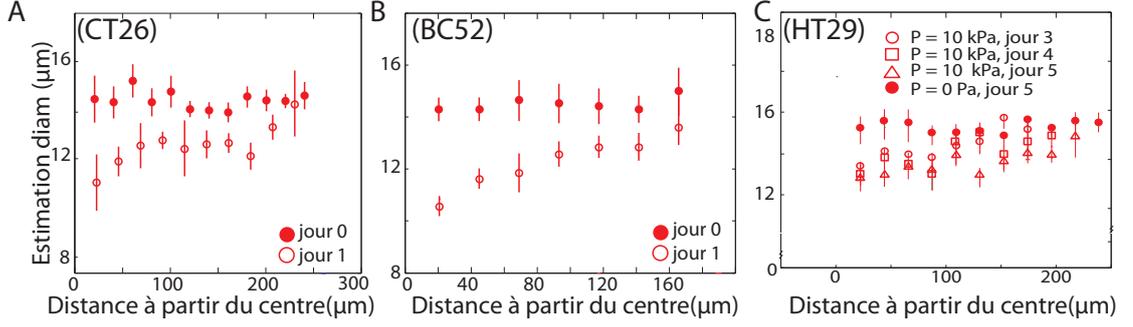


FIGURE 2.9 – Réduction du diamètre cellulaire sous contrainte pour des sphéroïdes de CT26 (A) et de BC52 (B) sous 5 kPa de contrainte. Les sphéroïdes de HT29 sous 10 kPa de contrainte conservent cette réduction de diamètre au moins jusqu'à 5 jours après l'établissement de la contrainte (C).

nombre de cellules avant compression s'écrit :

$$N_0 = \int_0^{R_0} \rho(r) 4\pi r^2 dr = \frac{R_0^3}{r_0^3}$$

et le nombre de cellules juste après compression :

$$N_P = \int_0^{R_P} \rho(r) 4\pi r^2 dr = g(\alpha) R_P^3 / r_0^3 \quad \text{avec} \quad g(\alpha) = -3 \frac{\ln(\alpha) + 1/2(3 - \alpha)(1 - \alpha)}{(1 - \alpha)^3}$$

où $\alpha = r_P / r_0$ est le ratio du rayon des cellules au centre d'un sphéroïde comprimé sur le rayon des cellules au bord.

Ceci nous permet d'écrire :

$$R_P = g(\alpha)^{-1/3} R_0$$

Si nous prenons pour les SMC de CT26 $r_0 \sim 7.5 \mu\text{m}$ et $r_P \sim 5,2 \mu\text{m}$, nous obtenons $R_P \sim 0,914 R_0$, soit une réduction d'environ 8-9% du rayon du sphéroïde.

En mesurant la croissance d'un SMC tous les jours, la prolifération cellulaire compense rapidement cette faible diminution du rayon, ce qui explique pourquoi nous ne la voyons pas sur les courbes de croissance. Nous avons donc effectué une cinétique rapide du phénomène. Le rayon initial de deux SMC de CT26 a été mesuré, puis nous avons changé le milieu de ces deux SMC soit avec le même milieu pour avoir un témoin, soit avec du milieu contenant du Dextran pour le comprimer. Le rayon de chacun de ces SMC a été mesuré toutes les 30 secondes (figure 2.10B).

Nous observons dans un premier temps que dans les deux cas, le rayon du SMC est réduit, et qu'il relaxe à la même vitesse. Ceci suggère fortement que cet effet de contraction est uniquement dû au changement de milieu. En moins de deux heures, cette relaxation est terminée.

À la suite de cette phase, nous observons que la croissance reprend avec une augmentation d'environ 1 % par heure, du même ordre de grandeur que ce que nous trouvons sur les courbes de croissance (cf valeurs du chapitre 3). Nous observons en revanche que lorsque le sphéroïde est comprimé, le rayon ne relaxe pas totalement, et qu'il est réduit d'environ 8-9 %, valeur qui est en accord avec la valeur prédite par les observations précédentes, ce qui permet de valider l'observation de réduction du volume cellulaire par une autre approche. Cette expérience étant simple à faire, nous pouvons l'étendre à d'autres valeurs de contrainte mécanique. Nous l'avons

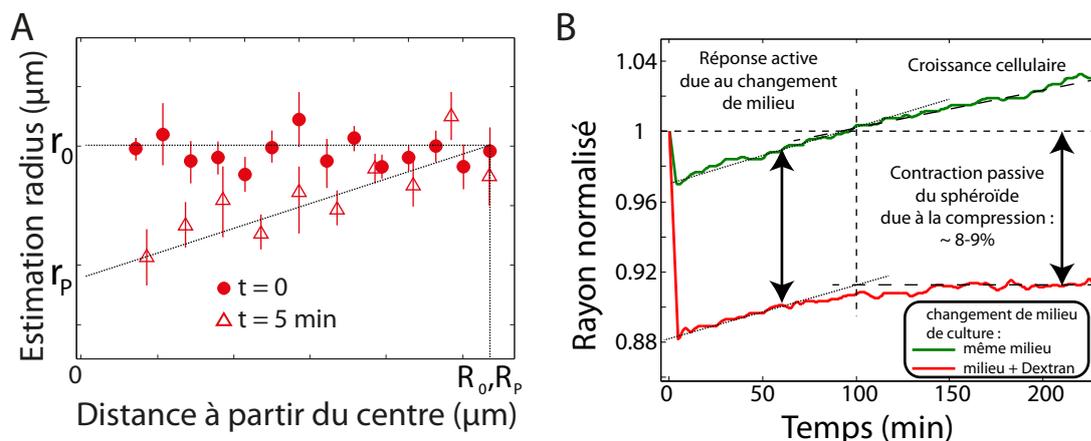


FIGURE 2.10 – A : réduction du rayon cellulaire dans un sphéroïde directement après une compression de 5 kPa ; nous modélisons cette décroissance par des fonctions affines, nous permettant d’obtenir une expression de la densité cellulaire. B : réduction du rayon d’un sphéroïde juste après l’application d’une contrainte de 5 kPa.

P (kPa)	Réduction du rayon (%)	r_P/r_0	r_p (μm)
0	0	1	7.5
1	6-7	~ 0.78	~ 5.85
5	8-9	~ 0.70	~ 5.25

TABLE 2.2 – Résultats de la réduction du rayon de SMC de CT26 sous différentes valeurs de contrainte mécanique, après la phase de décontraction, et estimation de r_p , en supposant $r_0 = 7.5 \mu\text{m}$ constant.

effectué pour des sphéroïdes sous 1 kPa, et nous trouvons également une phase de décontraction suivie d’un plateau. Ces résultats sont résumés dans le tableau 2.2, et les valeurs de réduction sont celles après la phase de décontraction.

Nous observons donc que cette réduction dépend de la pression, et que la réduction de volume des cellules semble être d’autant plus grande que la compression est importante. Ceci nous permet de définir une élasticité de l’ordre de 5 kPa, en accord avec d’autres données. Il semblerait cependant que cette élasticité ne soit pas linéaire avec la contrainte.

.....

2.4 Anisotropie et mécanique

Pour terminer ce chapitre sur les influences mécaniques de la compression de SMC, j’aimerais revenir sur la diminution du volume des cellules au sein du sphéroïde, diminution qui s’avère être non homogène. Si le sphéroïde était une boule solide isotrope, nous pourrions facilement montrer que dans ce cas la diminution serait homogène et reliée au module élastique du milieu. Si cette diminution avait pour origine un effet osmotique, alors la diminution serait également homogène, le potentiel chimique s’équilibrant au sein du SMC.

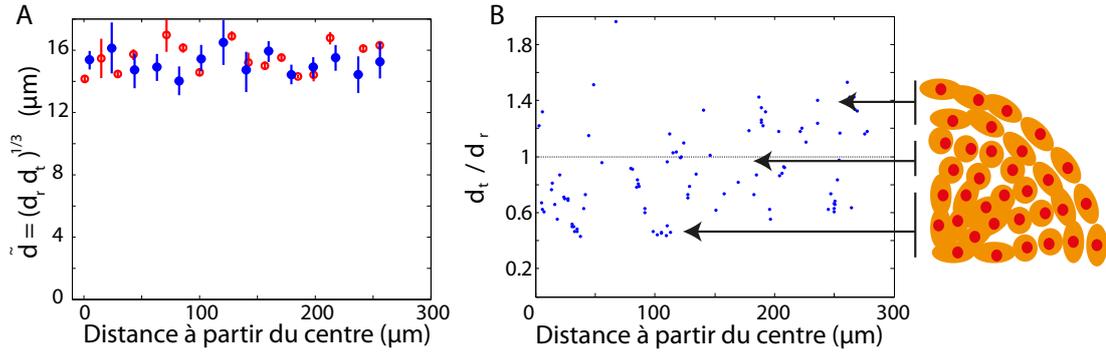


FIGURE 2.11 – Étude de l’anisotropie pouvant exister dans les sphéroïdes de HT29 sans contrainte mécanique. A : le diamètre \tilde{d} de la cellule (\circ rouge) et le diamètre d (\bullet bleu), B : le rapport entre d_r et d_t . Un schéma de sphéroïde est ajouté : les cellules sont étirées au centre, et allongées au bord.

Orientation privilégiée des cellules au sein d’un sphéroïde ?

Les résultats présentés ci-dessous sont préliminaires. Ils ont été obtenus sur des sphéroïdes de HT29.

Lorsque nous avons effectué la mesure de l’estimation du diamètre local des cellules au sein du SMC, nous avons supposé que les cellules n’avaient pas d’orientation privilégiée. Nous présentons dans cette section des SMC sans aucune contrainte mécanique appliquée, et montrons qu’une orientation privilégiée semble exister.

Au lieu de mesurer la simple distance moyenne $d(r)$ entre noyaux voisins, en fonction de leur distance r au centre du SMC, nous mesurons l’anisotropie de cette distance. Dans la pratique, nous avons choisi des régions d’intérêt rectangulaires et orthogonales entre elles dont la largeur correspond à un diamètre cellulaire, et la longueur à 5-6 diamètres cellulaires, l’une dans la direction radiale, l’autre dans la direction tangentielle (détail en Annexe Protocole). Nous mesurons ainsi la distance plus proche voisins radiale à une distance r du centre, $d_r(r)$, et la distance plus proche voisin tangentielle à cette même distance r du centre, $d_t(r)$. En considérant la cellule comme une ellipse, son volume serait alors $v_c = \pi/6 d_r d_t^2$. Nous pouvons donc estimer un diamètre moyen de la cellule $\tilde{d} = (d_r d_t^2)^{1/3}$, que nous comparons à l’estimation du diamètre dans le cas de l’hypothèse isotrope faite au début de ce chapitre.

En l’absence de contrainte, \tilde{d} est constant dans le sphéroïde et similaire à la valeur obtenue en faisant une hypothèse isotrope (figure 2.11A), ce qui suggère que l’approximation effectuée pour avoir une estimation locale du diamètre cellulaire est une bonne approximation. La figure 2.11B montre le rapport entre le diamètre radial de l’ellipse et le diamètre tangentiel d_t/d_r . Si ce rapport vaut 1, l’ellipse est une sphère. Si le rapport est inférieur à 1, la cellule est étirée selon la direction radiale, et si le rapport est supérieur à 1, elle est allongée sur la direction tangentielle. Ce nuage de point montre la dispersion de la mesure, indiquant sa sensibilité au bruit. Lors des coupes de cryosection, il n’est en effet pas impossible d’étirer un peu la coupe, ce qui est, dans le genre de mesure que nous effectuons, une grande source de bruit.

Nous observons tout du moins que les cellules du bord semblent être allongées alors que les cellules du centre semblent être étirées (voir figure 2.11B). Il est connu que les cellules du bord participent à la création de la tension de surface, et que celles-ci chevauchent tangentiellement plusieurs cellules [143]. Nous verrons dans le chapitre 4 qu’il existe un flux cellulaire radial, et qu’au centre du sphéroïde, ce flux est convergent. Les cellules pourraient s’orienter dans la direc-

tion du flux. L'orientation privilégiée des cellules pourrait orienter les fibres de stress, conférant au matériau des propriétés anisotropes.

Anisotropie ? Supposons qu'un sphéroïde soit un solide anisotrope et linéaire pour des déformations aux temps court, eut égard aux dernières observations. Nous pourrions aussi bien considérer le sphéroïde comme non-linéaire, mais nous n'avons pas plus de données pour une modélisation. Compte tenu des symétries sphériques du problème, nous pouvons écrire la matrice des déformations $[D]$, reliant le tenseur des contraintes $[\sigma]$ au tenseur des déformations $[u]$ de la manière suivante :

$$[\sigma] = [D][u] = \begin{pmatrix} A & C & C \\ D & B & E \\ D & E & B \end{pmatrix} [u]$$

chacun de ces termes étant positif, et A étant plus grand que chacun des autres termes. L'établissement de cette matrice est expliquée en Annexe Calculs en fin de thèse. Cette matrice suppose une invariance en θ et ϕ , et qu'une contrainte radiale ne donne pas la même déformation tangentielle, qu'une contrainte tangentielle donnerait radialement. Dans le cas d'une symétrie sphérique, $u_{rr} = \partial_r u_r$ et $u_{\theta\theta} = u_{\phi\phi} = u_{tt} = u_r/r$. Il vient donc $\sigma_{\theta\theta} = \sigma_{\phi\phi} = \sigma_{tt}$ en notant t l'axe tangentiel, qui peut être indifféremment θ ou ϕ . L'équilibre des forces s'écrit $\text{div}[\sigma] = 0$, et projeté sur l'axe radial :

$$\partial_r \sigma_{rr} + \frac{2}{r} (\sigma_{rr} - \sigma_{tt}) = 0$$

Nous cherchons une solutions en loi de puissance :

$$u_r = ar^\alpha$$

avec $\alpha > 0$ et dépendant des 5 paramètres A, B, C, D et E de manière non triviale. En notant ΔP la pression imposée au bord par l'expérimentateur, nous pouvons écrire la condition au bord $\sigma_{rr}(r = R) = -\Delta P$. Nous obtenons après résolution :

$$u_{rr} = -\frac{\alpha \Delta P}{\alpha A + 2C} \left(\frac{r}{R}\right)^{\alpha-1} \quad (2.1)$$

$$u_{tt} = -\frac{\Delta P}{\alpha A + 2C} \left(\frac{r}{R}\right)^{\alpha-1} \quad (2.2)$$

Enfin, nous pouvons écrire au premier ordre le diamètre des cellules au sein du sphéroïde, en supposant les déformations petites :

$$d(r) = d_0 \left(1 + \frac{1}{3} \text{Tr}[u]\right) = d_0 \left(1 - \frac{1}{3} \frac{(\alpha + 2)\Delta P}{\alpha A + 2C} \left(\frac{r}{R}\right)^{\alpha-1}\right) \quad (2.3)$$

avec d_0 le diamètre avant compression des cellules. Afin que le rayon décroisse vers 0, il faut nécessairement $\alpha \leq 1$. Nous pouvons faire les remarques suivantes dans ce modèle :

1. Les termes diagonaux sont essentiels. Si $C = D = E = 0$, nous pouvons facilement montrer que la condition $\alpha \leq 1$ ne peut être satisfaite.
2. Ce modèle impose qu'à la fois u_{rr} et u_{tt} soient négatifs, indiquant une compression dans toutes les directions, mais avec $u_{rr} = \alpha u_{tt}$, impliquant une déformation plus importante dans la direction tangentielle que dans la direction radiale.

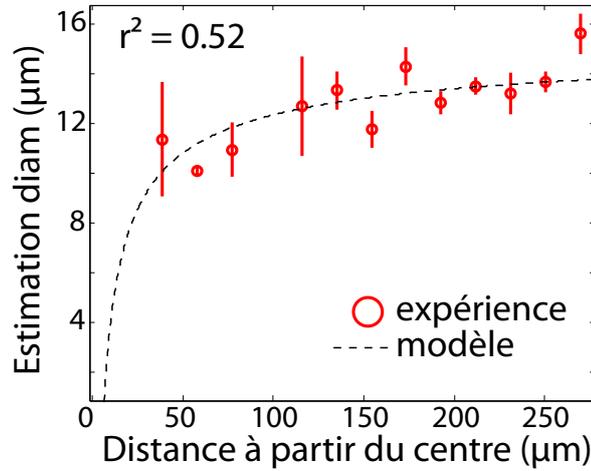


FIGURE 2.12 – Ajustement du modèle anisotrope sur les données de réduction du volume des cellules dans un SMC de HT29, 1 jour après la compression.

3. La réduction de taille n'est pas nulle au bord : $d(R) = d_0 \left(1 - \frac{1}{3} \frac{(\alpha+2)\Delta P}{\alpha A + 2C}\right)$. Or nous observons que la déformation est très faible au bord. Ceci impliquerait que $(\alpha + 2)\Delta P \ll \alpha A + 2C$.
4. Le diamètre dans ce modèle diverge en $r = 0$: il faudrait rajouter un diamètre minimum en deçà duquel les cellules ne peuvent se comprimer. Il faut néanmoins préciser que "0" dans ce cas correspond également à une singularité pour le sphéroïde, qui est la dernière cellule. À cette échelle, l'approximation de milieu continu est en défaut.

Nous avons ajusté ce modèle à l'estimation du diamètre cellulaire (figure 2.12). L'ajustement donne un coefficient de corrélation de 0.52. Nous pouvons extraire de celui-ci $\alpha = 0.55 \pm 0.3$, et $\alpha A + 2C = 40 \pm 20$ kPa, les incertitudes provenant de l'ajustement donné avec un intervalle de confiance à 1σ .

Nous observons tout d'abord que les modules élastiques sont du même ordre de grandeur que ceux observés dans l'introduction. Nous remarquons que la condition évoquée dans le point 3 donne

$$\frac{1}{3} \frac{(\alpha + 2)\Delta P}{\alpha A + C} \sim 16\%$$

ce qui prévoit une réduction du diamètre des cellules au bord d'environ 16 %. Étant données les incertitudes sur ces mesures, nous ne pouvons savoir si tel est le cas.

D'autres sources d'anisotropie pourraient exister, comme par exemple un étirement du cytosquelette ou de la matrice extracellulaire au sein du SMC (voir par exemple [144]), ou encore un axe préférentiel de la division cellulaire.

.....

2.5 Conclusions et perspectives

Nous avons mesuré les réponses mécaniques d'un sphéroïde sous contrainte mécanique isotrope. Grâce à la méthode de compression mécano-osmotique, nous pouvons appliquer une

contrainte mécanique soit indirecte, transmise par un sac de dialyse, soit directe. Cet effet est contrôlé par la concentration de Dextran.

Nous avons montré que :

1. La compression de sphéroïdes en croissance induit une réduction de leur taux de croissance, et que cette réduction est réversible. Ce résultat a été montré sur 5 lignées cellulaires différentes.
2. La compression d'un sphéroïde réduit son volume d'une manière dépendant de la valeur de la pression. Le volume des cellules diminue donc au sein du sphéroïde, mais cette diminution est inhomogène : les cellules du centre du sphéroïde sont plus comprimées que les cellules du bord.
3. Il semble que les cellules pour un sphéroïde sans pression aient une orientation privilégiées au sein de ce dernier : elles seraient allongées sur le bord du sphéroïde, et étirées en son centre. De ceci pourrait émerger une réponse anisotrope à cette compression isotrope.

Notons que le fait que l'activation des MAPK que nous observons ne peut être expliquée ni par une contrainte osmotique, ni par l'affamement des cellules est important en soi. Ce résultat suggère que l'activation que nous observons est peut-être particulière à la contrainte observée.

Perspectives

Il y a à mon sens deux perspectives intéressantes à la suite de ces travaux. La première concerne la réduction du rayon du sphéroïde, et la seconde la compréhension de la réduction inhomogène du volume des cellules.

Nous avons montré précédemment que la réduction du diamètre du sphéroïde était corrélée avec la diminution inhomogène du volume des cellules au sein du sphéroïde. Les expériences menées pour faire ces mesures sont relativement simples, contrairement aux mesures permettant d'avoir accès localement au volume des cellules. Une des suites logiques de ce travail serait donc d'explorer l'espace des phases de ce phénomène, à savoir l'effet de la taille du sphéroïde et l'effet de la valeur de la pression. Nous avons remarqué au début de ce chapitre que la réduction du taux de croissance dépendait fortement de la pression, mais que cet effet saturait pour des valeurs de compression supérieures à 5 kPa. Si la réduction de prolifération a pour cause la réduction de volume des cellules, il serait intéressant d'observer si la réduction du rayon du sphéroïde, dont nous avons remarqué qu'elle dépendait de la pression, sature elle aussi. Ensuite, travailler sur la taille du sphéroïde est important, car ces objets nucléent de la matrice extracellulaire, qui est d'autant plus présente que le sphéroïde est gros. La présence de cette matrice pourrait changer la réponse en compression des SMC. Enfin, la première phase de relaxation du sphéroïde mériterait une étude plus approfondie. Observerions-nous le même phénomène en présence de blebbistatine, qui réduirait la contractilité active des cellules ?

Les résultats sur la réduction inhomogène du volume des cellules est un résultat assez récent, pour lequel nous n'avons pas encore d'explication. De même, l'anisotropie préexistante dans un sphéroïde est un des derniers résultats obtenus. Jens Elgeti réalise des simulations de sphéroïdes dans lesquelles il est capable de déterminer un ordre nématique, à savoir dans son cas l'orientation de l'axe des cellules virtuelles composant un sphéroïde. De même que dans notre cas, il observe que les cellules du bord ont une orientation plutôt tangentielle. Nous pouvons tenter d'expliquer notre résultat en supposant que les cellules s'alignent dans la direction du flux cellulaire, que nous présenterons dans le chapitre 4. Il faudrait également plus de données pour tester l'hypothèse de réponse isotrope non-linéaire.

Réponse biologique sous compression

Nous avons montré dans le chapitre précédent que la compression de SMC induisait à temps court (quelques minutes) la réduction inhomogène du volume des cellules au sein du sphéroïde, et à temps long (quelques jours) la réduction du taux de croissance du sphéroïde. Nous étudions dans ce chapitre le lien entre la réponse à temps court et la réponse à temps long, en précisant que la réponse rapide pourrait être à l'origine de l'arrêt de prolifération. Nous verrons ainsi que les cellules les plus comprimées, i.e. celles du centres, arrêtent de se diviser, au travers d'un front antiprolifératif naissant au centre du sphéroïde où la diminution de volume est maximale, et se déplaçant vers le bord du sphéroïde. Ce front entraîne une diminution du taux de croissance du sphéroïde [133, 134]. Nous verrons que l'apoptose ne semble pas être affectée pendant cette phase [133, 134]. Nous terminerons ce chapitre par la discussion de la mécano-sensibilité amenant à l'intégration de ce signal de réduction de volume, passant notamment par l'activation de la voie Hippo.

.....

3.1 Retour sur la réduction du taux de croissance

Les courbes de croissances présentées sur les figures 2.2, 2.5 et 2.6 du chapitre 2 montrent que la compression de SMC réduit fortement leur taux de croissance, et ce de manière réversible. Ces figures montrent également une réponse dont l'amplitude dépend de la valeur de la pression appliquée. Nous montrons que cette réduction du taux de croissance est due à une réduction de prolifération des cellules au sein du SMC, où la réduction de volume observée est la plus grande.

Visualisation des protéines Afin d'avoir accès à la répartition spatiale des protéines dans un sphéroïde comprimé, nous utilisons des marquages par immunofluorescence de cryosections de SMC, détaillés en Annexe Protocoles. À l'instant où nous voulons observer cette répartition, nous congelons le sphéroïde à -80°C , puis le coupons à -25°C en de fines tranches de 3 à 5 μm , au niveau du plan équatorial, afin d'obtenir une information radiale dans le SMC. Nous effectuons ensuite des marquages d'immunofluorescence dans lesquels les protéines d'intérêt sont révélées par fluorescence ; nous marquons également tous les noyaux grâce au DAPI.

Si la protéine est nucléaire, nous pouvons détecter la position du noyau en seuillant la dérivée seconde de l'image, puis traçons un histogramme avec une méthode de boîte glissante. Nous effectuons la même chose avec l'image de DAPI, ceci nous donnant une information approximative sur le nombre total de cellules. Nous normalisons l'histogramme de la protéine d'intérêt par celui de tous les noyaux afin d'obtenir une densité de protéines positives pour le marquage. Cette dernière étape nous permet de nous affranchir du nombre exact de noyau, et donc de l'épaisseur de la cryosection, qui peut varier.

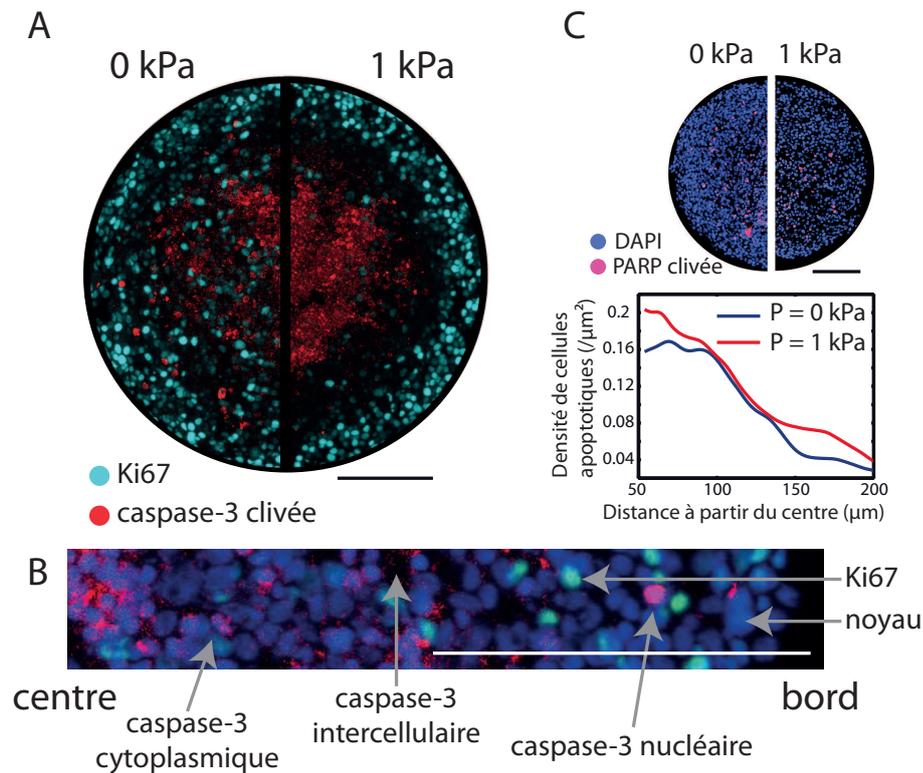


FIGURE 3.1 – Évolution de la prolifération et de l’apoptose au sein de sphéroïdes de CT26 sous 0 kPa ou sous 1 kPa. A : marquage de Ki67 en turquoise pour la prolifération et de la caspase-3 clivée en rouge pour l’apoptose. B : Nous observons que la caspase-3 clivée peut être présente soit dans le noyau des cellules, soit dans leur cytoplasme, soit dans l’espace intercellulaire. C : marquage de la PARP clivée (rouge) pour l’apoptose et de tous les noyaux avec du DAPI (bleu). Échelle : 100 μm pour toutes les images. $N \geq 5$.

Pas de changement sur l’apoptose Nous avons vu en introduction que l’apoptose se terminait par l’activation de protéines exécutrices, comme notamment la caspase-3. Deux jours après l’établissement de la contrainte mécanique, nous avons marqué cette protéine dans deux sphéroïdes, le premier n’ayant subi aucune compression, et le second ayant subi une compression de 1kPa (figure 3.1A, en rouge). Nous observons un nuage rouge au centre du sphéroïde, correspondant à l’activation de la caspase-3. Ce signal est difficile à interpréter.

La difficulté vient du fait que la procaspase 3 est clivée et activée dans le cytoplasme. Elle clive ensuite ses protéines cibles notamment dans le noyau. Comme nous l’avons vu en introduction, en l’absence de macrophages, cette apoptose se termine en nécrose secondaire, dont une des caractéristiques est le relargage de la caspase-3 clivée. Nous pouvons ainsi en trouver dans l’espace intercellulaire. Ces trois observations sont montrées sur la figure 3.1B. Le fait de pouvoir en trouver entre les cellules nous apprend également que nous n’observons pas l’apoptose à un instant donné, mais intégrée sur le temps typique de dégradation de la caspase-3 clivée.

Nous avons vu en introduction que la PARP, protéine de réparation de l’ADN, était clivée

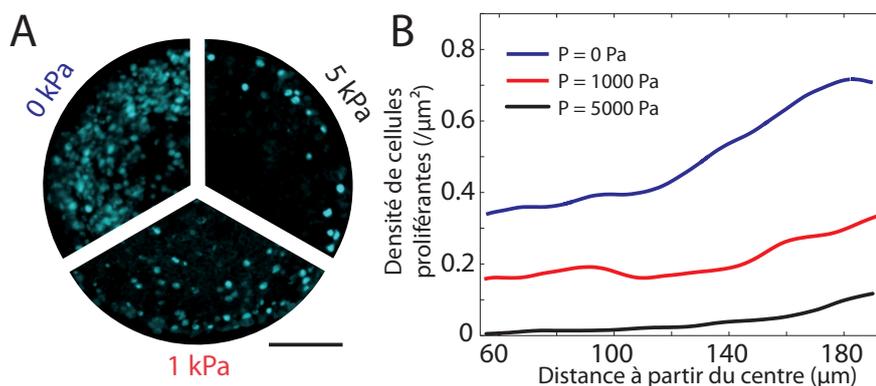


FIGURE 3.2 – Réduction de la prolifération cellulaire au sein d'un SMC de CT26 pour 3 valeurs de la pression : 0 kPa, 1 kPa et 5 kPa. A : marquages de Ki67, B : densités extraites des marquages, et ajustement exponentiel de ces densités. L'échelle est de 100 μm .

et inactivée par la caspase-3 clivée. C'est une protéine nucléaire, dégradée totalement avant la fin de l'apoptose. Nous avons effectué ce marquage (figure 3.1C) et observons que le signal est nucléaire et quantifiable. Nous avons tracé la distribution de cette protéine, et retrouvons qu'il y a plus d'apoptose au centre du sphéroïde. Nous concluons également qu'il n'y a pas de différence qualitative, 2 jours après l'établissement de la contrainte, sur les cellules apoptotiques.

Réduction de la prolifération Ki67 est une protéine très utilisée pour observer l'état de prolifération d'un tissu biologique. En effet, bien que sa fonction ne soit pas encore déterminée, une de ses caractéristiques est que cette protéine nucléaire est exprimée lorsque la cellule est dans le cycle cellulaire, indépendamment de la phase G1/S/G2/M, et est absente de la cellule lorsque celle-ci est en quiescence (phase G0) [145].

La figure 3.1A montre en regard deux sphéroïdes, deux jours après l'établissement de la contrainte mécanique, soit sous 0 kPa, soit sous 1 kPa. Nous avons marqué en turquoise Ki67. Nous remarquons que bien que l'apoptose ne soit pas modifiée, la prolifération cellulaire est réduite, de manière hétérogène : il y a moins de cellules qui prolifèrent, mais particulièrement au centre du sphéroïde, où la réduction du volume des cellules est la plus importante.

Nous retrouvons ainsi les caractéristiques d'un sphéroïde : un excès de prolifération au bord, et un excès de mort cellulaire au centre [131]. Sous contrainte mécanique, l'apoptose est qualitativement inchangée, et la prolifération diminue fortement au centre.

Modèle de croissance surfacique La figure 3.2A présente trois sphéroïdes de CT26 comprimés à 0 kPa, 1 kPa et 5 kPa, et marqués avec Ki67. Nous remarquons que plus la compression est importante, plus la prolifération est réduite au centre. À 5 kPa, pression pour laquelle nous observons une saturation de l'effet de réduction du taux de croissance des sphéroïdes de CT26, seules les cellules du bord prolifèrent. Il apparaît donc que le bord réagit différemment du centre.

Nous remarquons que les profils de densité de prolifération tracés sur la figure 3.2B sont bien ajustés par une exponentielle écrite :

$$\rho_d(r) = \rho^B + \delta\rho^S e^{(r-R)/\lambda}$$

où λ serait une longueur typique de prolifération, ρ^B et $\delta\rho^S$ respectivement la densité de prolifération dans le sphéroïde et un incrément de densité de cellules en prolifération au bord. Les ajustement montrent que la longueur typique de prolifération n'est que peu affectée par la contrainte par rapport aux autres valeurs. Sous contrainte, la valeur de λ diminue de 40%, passant de 54 μm à 37 μm , alors que ρ^B diminue de plus d'un facteur 300. Les marquages d'immunofluorescence présentent un état figé de la situation du sphéroïde au moment où il a été gelé pour effectuer la cryosection. Nous supposons que la densité de cellules en prolifération peut s'écrire $\rho_d(r) = \rho(r) k_d(r) dt$ où $k_d(r)$ serait le taux de prolifération des cellules à une distance r . Nous supposons que la densité de cellule est constante en première approximation, $\rho(r) = \rho_0$, et écrivons :

$$k_d(r, P) = k_d^B(P) + \delta k_d^S(P) e^{(r-R)/\lambda(P)}$$

pour lequel λ correspondrait à la longueur typique de prolifération, k_d^B et δk_d^S respectivement le taux de prolifération des cellules dans le sphéroïde et un incrément de prolifération au bord du sphéroïde. L'apoptose n'est pas affectée par la contrainte mécanique, et nous supposons qu'elle ne dépend pas de la position à l'intérieur du sphéroïde : $k_a(r, P) = k_a$. Le nombre de cellules se divisant N_d pendant dt et le nombre de cellules entrant en apoptose N_a pendant dt s'écrivent respectivement :

$$N_d = \int_0^R k_d(r) \rho_0 4\pi r^2 dr dt \quad (3.1)$$

$$N_a = \int_0^R k_a(r) \rho_0 4\pi r^2 dr dt \quad (3.2)$$

La variation du nombre de cellules entre t et $t + dt$ vaut :

$$N(t + dt) - N(t) = \partial_t N dt = N_d - N_a$$

Nous pouvons résoudre N_d et N_a :

$$N_d = \frac{4}{3} \pi R^3 \rho_0 k_d^B dt + 4\pi R^2 \delta k_d^S \lambda \left(1 - 2\frac{\lambda}{R} + 2\left(\frac{\lambda}{R}\right)^2 (1 - e^{-R/\lambda}) \right) dt \quad (3.3)$$

$$N_a = \frac{4}{3} \pi R^3 \rho_0 k_a dt \quad (3.4)$$

Enfin, la densité constante permet d'écrire $N = \rho_0 V = \rho_0 \frac{4}{3} \pi R^3$. Nous obtenons l'équation suivante sur le rayon :

$$\partial_t R = \frac{1}{3} (k_d^B - k_a) R + \delta k_d^S \lambda \left(1 - 2\frac{\lambda}{R} + 2\left(\frac{\lambda}{R}\right)^2 (1 - e^{-R/\lambda}) \right) \quad (3.5)$$

λ étant petit devant le rayon pour de gros sphéroïdes, nous développons au premier ordre en λ/R :

$$\partial_t R = \frac{1}{3} (k_d^B - k_a) R + \delta k_d^S \lambda + O\left(\frac{\lambda}{R}\right) \quad (3.6)$$

Cette équation peut-être réécrite en terme de volume V et de surface S du sphéroïde :

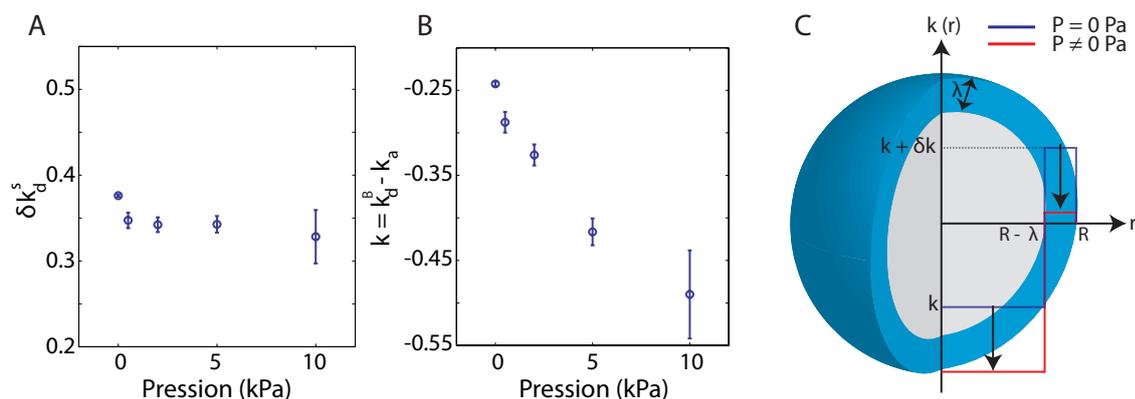


FIGURE 3.3 – Taux de croissance issus de l’ajustement du modèle de croissance surfacique sur les courbes de croissances de sphéroïdes de CT26. A : influence de la compression sur l’incrément de prolifération, avec $\lambda = 70 \mu\text{m}$. B : influence de la compression sur le taux de croissance et C : schéma du modèle, et conséquence de l’influence de la contrainte mécanique sur le taux de prolifération des cellules au sein du sphéroïde.

$$\partial_t V = (k_d^B - k_a) V + \delta k_d^S \lambda S \quad (3.7)$$

Cette équation est celle d’une croissance surfacique, similaire à l’équation introduite par Bertalanffy en 1957 [146]. Les cellules du bord du sphéroïde ont une croissance différente des autres : leur taux de croissance est incrémenté d’un taux de croissance surfacique sur une longueur de prolifération λ . Si le sphéroïde est petit (plus petit que λ), toutes les cellules sont des cellules du bord, et la croissance est exponentielle. Nous revenons sur les hypothèses de k_a et ρ constants en Annexe Calculs, et observons que le résultat n’est qualitativement pas modifié. Nous pouvons dans ce cas définir un taux de prolifération surfacique effectif.

Taux et longueur de prolifération Nous avons ajusté les courbes de croissance avec ce modèle. Les lignes pleines de la figure 2.5 du chapitre précédent correspondent à l’ajustement des données avec ce modèle de croissance surfacique. Nous observons une très bonne corrélation entre ce modèle et nos données. Les figures 3.3A et 3.3B présentent les paramètres issues des ajustement en fonction de la pression appliquée. Pour extraire δk_d^S , nous supposons que λ est constant et égal à $70 \mu\text{m}$ (estimation faite à partir des marquages de la figure 3.1A). Comme nous l’avons observé sur les cryosections, nous retrouvons le fait que la prolifération diminue partout, mais avec un effet différent à la périphérie. L’incrément de prolifération sur la longueur λ semble avoir une dépendance bien plus faible que le taux global.

La conséquence de ces résultats est que lorsque nous appliquons une contrainte mécanique, le taux de croissance est simplement translaté vers le bas. Nous avons vérifié que ce modèle ajuste également bien les courbes de croissance obtenues pour les autres lignées cellulaires. Nous retrouvons qu’en dépit d’une certaine variabilité, la réponse à la contrainte est la même : un taux de croissance qui diminue (un facteur 2 en moyenne) et un incrément de prolifération en surface qui reste presque constant.

Comparons les CT26 et les HT29. Qualitativement, le taux de prolifération au centre diminue d’un facteur 2, mais les intensités de compression ne sont pas les mêmes : 5 kPa pour les CT26

lignée cellulaire	k_0^B	k_P^B	$(\delta k^S \lambda)_0$	$(\delta k^S \lambda)_P$
CT26	-0.24 ± 0.01	-0.42 ± 0.03	25.9 ± 0.7	24.8 ± 2.1
AB6	-0.02 ± 0.01	-0.04 ± 0.02	40.5 ± 3.4	29.1 ± 2.4
BC52	-0.07 ± 0.01	-0.15 ± 0.01	24.1 ± 1.6	24 ± 0.7
FHI	-0.59 ± 0.05	-1.08 ± 0.37	83.6 ± 3.4	91.3 ± 11.1
HT29	-0.002 ± 0.0001	-0.13 ± 0.12	12.7 ± 0.6	16.4 ± 8.8

TABLE 3.1 – Taux de croissance extraits de l’ajustement du modèle sur toutes les lignées cellulaires envisagées. L’indice 0 correspond à aucune contrainte appliquée, et l’indice P à la compression. Pour les CT26, les AB6, les BC52 et les FHI, la contrainte envisagée ici est de 5 kPa ; elle est de 10 kPa pour les HT29. Les incertitudes correspondent à la déviation standard de ces paramètres pour l’ajustement de courbes par condition. Les taux k sont donnés en jour^{-1} , et $\delta k^S \lambda$ en $\mu\text{m} \cdot \text{jour}^{-1}$.

et 10 kPa pour les HT29. Si nous appliquons une contrainte de 5 kPa aux HT29, la diminution du taux au centre est bien plus faible. Ceci suggère qu’avec l’évolution du cancer, les cellules ressentent davantage la contrainte. Il semblerait également que pour les AB6, cellules issues de sarcomes, l’incrément de prolifération au bord diminue avec la pression. Nous ne pouvons évidemment pas généraliser ces observations, car il faudrait plus de statistiques sur différentes lignées.

Discussion sur le paramètre λ Afin d’extraire δk_d^S , il faut donner une valeur à λ . Pour la courbe de la figure 3.3A, la valeur de λ a été estimée à $70 \mu\text{m}$ à partir des cryosections. L’ajustement des marquages d’immunofluorescence donne une valeur pour λ autour de $45 \mu\text{m}$, ce qui est moins que les $70 \mu\text{m}$ utilisés pour le graphique. Enfin, nous avons remarqué que selon la protéine choisie pour marquer pour le cycle, cette valeur pouvait même être moindre. En effet, si la prolifération est marquée avec pRb (T373) (nous présenterons cette protéine dans la prochaine section), nous estimons λ à $30 \mu\text{m}$. Il semblerait également qu’elle ne soit pas la même que la longueur caractéristique de l’apoptose, qui est autour de $100 \mu\text{m}$ (figure 3.1C), ce qui est cohérent avec la diffusion de l’oxygène. Tout ceci nous amène à nous poser la question sur l’origine de cette longueur et les paramètres la fixant. Sont-ce des paramètres uniquement physiologiques, comme la diffusion de l’oxygène ou d’autres facteurs essentiels ? ou bien cette longueur est-elle fixée par des arguments mécaniques, la division étant plus simple au bord qu’au centre car il y aurait moins de voisins ?

Pendant le cycle cellulaire, une cellule double exactement son volume, afin d’assurer la pérennité de la taille génération après génération. Il y a à notre connaissance deux moments dans le cycle où une restriction du volume pourrait limiter la division. Le point de restriction que nous avons présenté est connu pour être un point de contrôle de la taille cellulaire en fin de G1 [147]. Également, juste avant d’engager la mitose, la cellule s’arrondit et son volume augmente rapidement de 50 % [148, 149]. Cette rapide augmentation (environ 30 min) implique une déformation élastique du milieu environnant. Le paramètre contrôlant ceci serait le module élastique des cellules environnant, E . Si le facteur limitant est en revanche l’augmentation du volume sur tout le cycle, dans ce cas elle se fait sur des temps longs (environ un jour), et la viscosité du milieu environnant, η , limite la progression. Les effets au bord peuvent s’expliquer par la tension de surface γ du sphéroïde. Envisageons les deux cas.

En considérant que pour se diviser une cellule doit déformer élastiquement son environnement, une longueur caractéristique serait $\lambda_{\text{el}} \sim \gamma/E$. Avec les valeurs typiques connues et ce que nous avons extrait dans le chapitre précédent ($\gamma \sim 10 \text{ mN/m}$ et $E \sim 10\text{-}100 \text{ kPa}$), cela donnerait $\lambda_{\text{el}} \sim 0.1\text{--}1 \mu\text{m}$, inférieur d’au moins 1-2 ordres de grandeurs à la valeur observée. En considérant

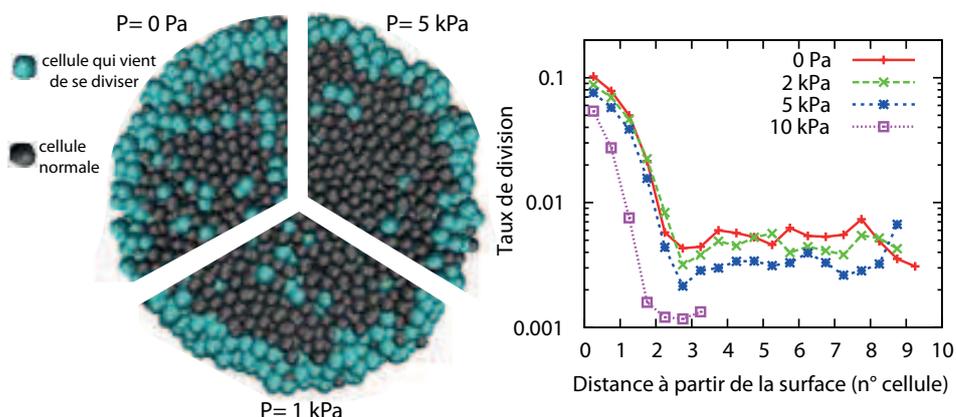


FIGURE 3.4 – Cryosections virtuelles et quantifications de la division cellulaire au sein de sphéroïdes numériques. Les cellules qui viennent de se diviser sont marquées en bleu. Leur localisation est observée dans le plan équatorial des sphéroïdes virtuels. Les distributions de la division cellulaire sont tracées en fonction de la distance à partir de la surface.

qu’au contraire la déformation du milieu est plutôt visqueuse car lente, nous pourrions définir $\lambda_{\text{visc}} \sim \gamma\tau/\eta$. Cette définition donnerait avec les valeurs typiques connues ($\tau \sim 1$ j en prenant le taux de division au bord, $\eta = 10^5 - 10^6$ Pa.s), $\lambda_{\text{visc}} \sim 100 - 1000$ μm , soit environ 1-2 ordres de grandeur trop grand. La réalité semble être entre les deux limites.

Simulations numériques (Jens Elgeti)

Jens Elgeti a simulé lors de son post-doctorat à l’Institut Curie la croissance de sphéroïdes et l’influence de contraintes mécaniques sur cette croissance. Il considère une cellule comme un assemblage de deux particules en interaction répulsives. Lorsque la distance entre ces deux particules est égale à une distance seuil, cette cellule se divise et deux nouvelles particules sont ajoutées : une cellule mère donne dans ce cas deux cellules filles. Ces cellules peuvent également disparaître (apoptose, à un taux constant) et interagir entre elles (adhésion cellulaire). Lorsque ces particules sont ensemble dans un espace libre, elles forment en 3 dimensions un sphéroïde numérique. Pour appliquer une contrainte mécanique, d’autres particules sont ajoutées dans le milieu extérieur, avec d’autres propriétés. Elles sont passives, donc n’interagissent pas directement avec le sphéroïde. Lors de chocs sur celui-ci, elles lui transmettent de leur impulsion, et ainsi une contrainte mécanique est appliquée, d’une manière similaire à la nôtre. Enfin, il n’y a pas d’accès différents aux facteurs essentiels, qui sont supposés ne pas être limitant.

Jens peut ainsi réaliser des cryosections virtuelles de ses sphéroïdes, sur lesquels il “marque” les cellules qui viennent de se diviser récemment. Il observe que même en l’absence de gradient de facteurs physiologiques, les cellules se divisent plus naturellement au bord qu’au centre (figure 3.4). En présence de contrainte mécanique, il retrouve nos observations expérimentales : la division est réduite partout dans le sphéroïde, et plus particulièrement au centre de celui-ci.

Ces résultats de simulation numérique sont importants car ils ne présupposent pas d’accès différentiel à des facteurs essentiels, et pourtant les cellules se divisent naturellement plus au bord. Sous contrainte mécanique, les cellules se divisent également moins au centre. Nous allons dans la suite de ce chapitre présenter des résultats tentant d’expliquer le lien entre la réduction

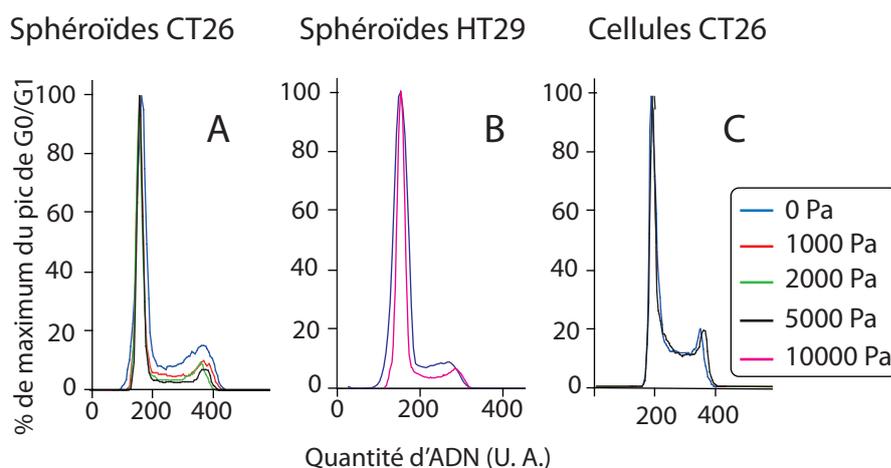


FIGURE 3.5 – Histogrammes d’ADN obtenus par cytométrie de flux. A : à partir de cellules de sphéroïdes de CT26, B : à partir de cellules de sphéroïdes de HT29, C : à partir de cellules individuelles de CT26 soumises à des concentration de Dextran similaires à celles de sphéroïde. Pour chaque histogramme, $N \geq 20000$ cellules ont été comptées.

à court terme du volume des cellules et la réduction à long terme de la prolifération cellulaire.

.....

3.2 Blocage au point de Restriction

Nous allons par la suite présenter des corrélations temporelles et spatiales entre la réduction du volume des cellules - rapide devant le temps de synthèse protéique et très rapide devant le temps de division cellulaire, et l’arrêt de la prolifération. Nous présentons dans un premier temps des résultats obtenus par cytométrie de flux, qui nous permettent de déterminer dans quelle phase du cycle cellulaire la cellule est arrêtée lors d’une compression. Nous combinons enfin Western blots et marquages par immunofluorescence afin d’étudier les changements spatiaux et temporels de l’expression de protéines clés au niveau du point de restriction.

Arrêt en fin de G1 La cytométrie de flux est une technique permettant l’analyse haut débit de contenu protéique ou d’ADN au sein des cellules. J’ai développé un protocole permettant d’analyser le contenu en ADN des cellules d’un sphéroïde, détaillé en Annexe Protocoles. Nous rassemblons et dissociions en cellules individuelles des SMC sous contrainte, puis nous marquons l’ADN de celles-ci grâce à du iodure de propidium (PI). La fluorescence émise par le PI de chaque cellule est mesurée et enregistrée. L’intensité de fluorescence est directement proportionnelle au contenu en ADN de la cellule. La cellule passant d’une quantité $1n$ à une quantité $2n$ durant le cycle, chaque phase a une signature en ADN qui lui est propre. Nous traçons des histogrammes de quantité d’ADN. Le premier pic de ces histogrammes correspond aux phases G0 et G1 du cycle cellulaire à une quantité $1n$ d’ADN. Le second pic, correspondant à une quantité $2n$ d’ADN, est donc le pic des phases G2 et M, et le plateau entre les deux pics correspond à la phase de synthèse S de l’ADN, durant laquelle la cellule double son contenu en ADN. Notons que le second pic ne correspond en revanche pas à une quantité exactement double du premier. Cela vient du fait qu’en phases G2 et M, l’ADN est progressivement condensé, ce qui entraîne une réduction de l’accessibilité de l’agent intercalant [150]. Chaque

P	CT26			HT29			CT26 (2D)		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
0	58	28	14	70	15	15	42	45	13
1	62	28	10	-	-	-	-	-	-
2	64	25	11	-	-	-	-	-	-
5	69	21	10	-	-	-	41	45	14
10	-	-	-	80	9	11	-	-	-

TABLE 3.2 – Quantifications des histogrammes d’ADN en utilisant le logiciel ModFit. Les pressions sont données en kPa, et les valeurs représentent le pourcentage total de cellules dans une phase donnée par rapport au nombre total de cellules comptées.

histogramme est normalisé au maximum du pic de G0/G1.

La figure 3.5 présente de tels histogrammes. Nous avons effectué cette expérience sur des cellules issues de sphéroïdes de CT26 et de HT29 (figure 3.5A et figure 3.5B), sous différentes contraintes mécaniques, deux jours après que la contrainte ait été appliquée. En contrôle, nous avons ajouté du Dextran à une concentration correspondant à 5 kPa (55 g/L) sur des cellules individuelles de CT26 (2D), afin de mesurer l’effet direct du Dextran sur le cycle cellulaire (figure 3.5C). Nous constatons en premier lieu sur cette dernière expérience que le Dextran, à ces concentrations, ne semble pas affecter de manière particulière l’une ou l’autre des phases du cycle cellulaire sur des cellules individuelles, comme nous l’avons exposé au chapitre précédent. En revanche, lorsque les cellules sont cultivées en 3 dimensions et que les SMC sont soumis à des contraintes compressives, nous remarquons que les populations de cellules dans les phases S, G2 et M se vident au profit des phases G0/G1. Pour les deux lignées, plus la contrainte est grande, et plus les cellules s’accumulent en G0/G1. Cette observation est cohérente avec ce que nous observons des marquages d’immunofluorescence montrant une augmentation des cellules en quiescence. Nous remarquons également que le pic G0/G1 des histogrammes de SMC sous contrainte est plus fin : les cellules semblent être bloquées à une quantité précise d’ADN. Ce résultat est robuste et a été observé plusieurs fois. Le point de restriction est situé temporellement avant la phase S. Son fonctionnement implique que les cellules peuvent commencer à synthétiser l’ADN avant le début de la phase S [151]. Nous pourrions éventuellement interpréter l’affinement du pic G0/G1 comme une inhibition de synthèse précoce de l’ADN (après le point de restriction et avant S).

Les histogrammes d’ADN sont quantitatifs. Il existe une littérature foisonnante (voir notamment [150, 152]) et un certain nombre de logiciels pour quantifier les histogrammes. Les deux premiers pics sont bien ajustés par une gaussienne, et le nombre de cellule en phase S peut être déduit de la différence entre l’aire totale et l’aire des deux autres pics avec quelques corrections. Nous avons utilisé le logiciel ModFit afin de quantifier les histogrammes. Les résultats de ces quantifications sont résumés dans le tableau 3.2.

Les quantifications résument les observations effectuées. Nous notons de plus que :

- pour les cellules issues de SMC comprimés, le rapport entre le nombre de cellules dans la phase S sur le nombre de cellules dans les phases G2 et M reste à peu près constant ; cela suggère que ces phases ne sont pas affectées par la compression.
- si nous comparons sans contrainte mécanique les cellules de CT26 issues soit de SMC soit de culture, i.e. 3D contre 2D, nous remarquons que celles-ci ne passent pas le même temps dans chacune des phases, avec en particulier une phase S réduite en 3D par rapport à la 2D. Nous ne connaissons pas le temps de division des cellules à 3D, nous ne pouvons présenter que le temps relatif passé dans chacune des phases.

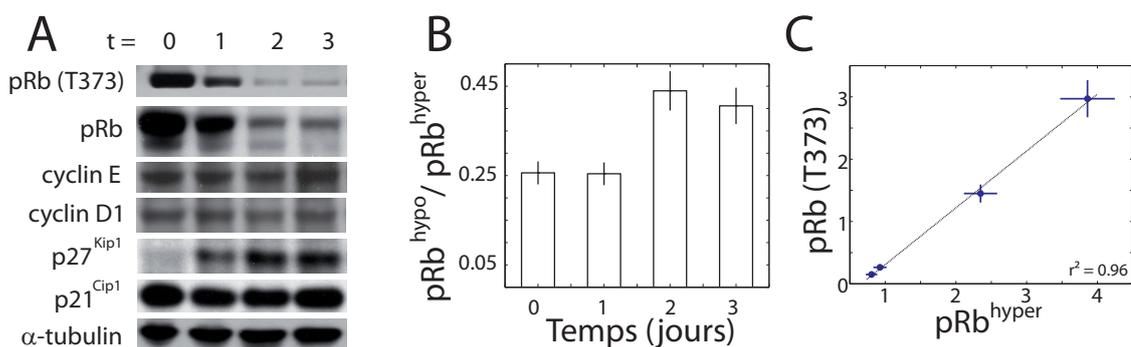


FIGURE 3.6 – Résultats de Western blots sur des extraits de SMC de HT29 à différents temps après l'établissement de la contrainte mécanique. A : Western blots, B : quantification du ratio de pRb hypophosphorylé sur hyperphosphorylé; C : corrélation entre les niveaux de pRb phosphorylé à la thréonine 373 et le niveau de phosphorylation totale de pRb. $N \geq 3$.

Les cellules de SMC sous contrainte mécanique apparaissent donc bloquées avec une quantité 1n d'ADN. Les différentes observations nous laissent supposer que celles-ci sont bloquées avant S. Le seul point de contrôle de fin de G1 étant le point de restriction, nous supposons que les cellules sont bloquées à ce niveau.

Arrêt de prolifération au point de restriction / surexpression de p27^{Kip1}

de SMC afin d'effectuer des Western blots (voir Annexe Protocoles). Nous rassemblons 50 sphéroïdes ayant été soumis aux mêmes conditions. Après 2 rinçages, nous ajoutons directement un milieu d'extraction avec une forte concentration en détergent, et agitons vigoureusement à température ambiante afin d'extraire toutes les protéines. Nous les dénaturons et effectuons le Western blot par la suite de manière classique.

Afin d'étudier le niveau des différentes protéines clés jouant un rôle au niveau du point de restriction, j'ai travaillé sur une méthode pour extraire les protéines

Les expériences de Western blot ont uniquement été réalisées sur les HT29. En effet, c'est l'unique lignée cellulaire pour laquelle nous avons des renseignements sur l'état de mutation de son cycle cellulaire (référence ATCC numéro HTB-38). La figure 3.6 présente les résultats de Western blots sur p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, les cyclines D1 et E, pRb, pRb phosphorylé à la thréonine 373, ainsi que α -tubuline. Ils ont été effectués à différents temps après l'établissement de la contrainte mécanique.

Nous remarquons qu'un jour après l'établissement de la contrainte mécanique, p27^{Kip1} est surexprimé dans les cellules des SMC de HT29 (figure 3.6A). Cette surexpression augmente avec le temps. p21^{Cip1} n'est en revanche pas surexprimé. Les niveaux des cyclines E et D1 ne sont pas modifiés par la compression. Nous remarquons que le niveau de pRb diminue avec le temps, suggérant un processus de dégradation et/ou une diminution de sa synthèse. La figure 3.6B montre la quantification du rapport de pRb hypophosphorylé sur hyperphosphorylé. Nous constatons dans le temps une augmentation du nombre de pRb hypophosphorylé. Ces résultats regroupés suggèrent un arrêt de la prolifération au niveau du point de restriction. Il a été montré qu'une surexpression de p27^{Kip1} pouvait induire une dégradation de pRb [153]. Ainsi, l'effet combiné de la dégradation et de la diminution de phosphorylation de pRb peut inhiber la prolifération.

Parmi les 16 sites de phosphorylation de pRb, la phosphorylation au niveau de la threonine 373

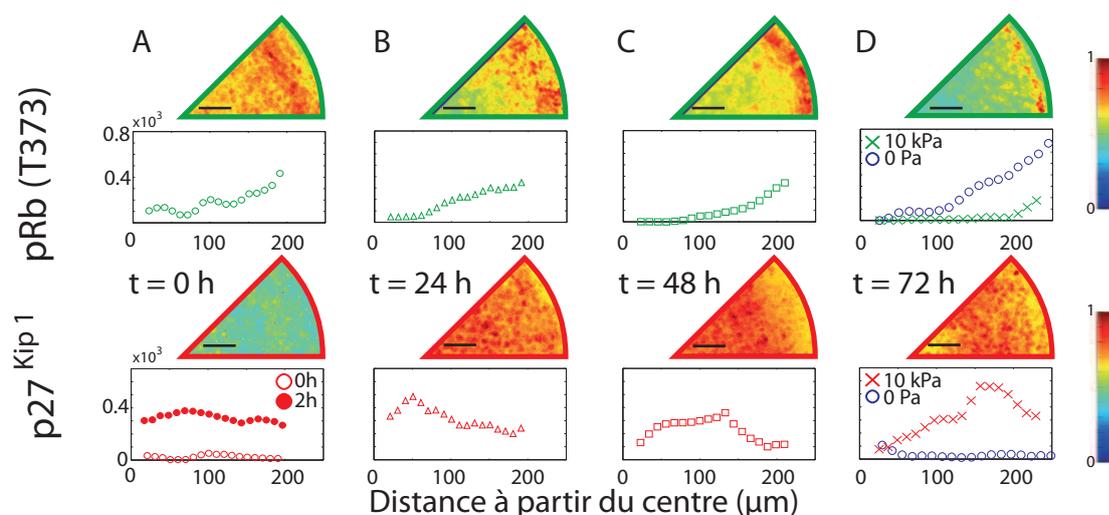


FIGURE 3.7 – Marquages par immunofluorescence de pRb (T373) et p27^{Kip1}, à différents temps suivant la compression des SMC; haut : moyenne d’images de fluorescence, bas : densité de la protéine considérée en fonction de la distance à partir du centre du sphéroïde. A : t = 0 jour pour pRb (T373), 0 jour et 2 h pour p27^{Kip1}, B : t = 1 jour, C : t = 2 jours et D : t = 3 jours soit sans pression, soit sous contrainte mécanique. Pour les images, les couleurs indiquent l’intensité, comme représenté sur les échelles à droite des figures. $N \geq 3$.

(pRb (T373)) est une condition suffisante pour passer le point de restriction [154]. La figure 3.6C montre que le niveau de pRb (T373) est très bien corrélé au niveau de pRb hyperphosphorylé. Puisque l’état de prolifération d’une cellule dépend de l’hyperphosphorylation de pRb, l’étude du niveau de pRb (T373) permet de déterminer le niveau de phosphorylation de pRb, et ainsi de l’état de prolifération d’une cellule. En cela, pRb (T373) est un bien meilleur indicateur de prolifération que Ki67. Enfin, aucune activation d’apoptose n’est détectée par Western blot à 3 jours.

Les Western blots permettent une quantification rapide du niveau des protéines. Nous n’avons en revanche pas du tout accès à la localisation spatiale de celles-ci. Nous nous focalisons dans la prochaine section sur l’étude de la variation spatio-temporelle de p27^{Kip1}, protéine inhibitrice de prolifération, et pRb (T373), indiquant si la cellule a passé le point de restriction et prolifère.

.....

3.3 Front antiprolifératif, séquentialité

Nous avons montré dans les sections précédentes que la réduction de prolifération se fait principalement au centre du sphéroïde, où la diminution du volume des cellules est la plus forte. Nous avons montré que cette diminution de prolifération s’effectue par un arrêt de la division cellulaire, les cellules étant bloquées en fin de G1 au niveau du point de restriction. Cet arrêt est corrélé à une surexpression d’une protéine inhibitrice de prolifération, p27^{Kip1}, impliquant la diminution de la phosphorylation de pRb, représentée par pRb (T373). Dans cette section, nous montrons que la diminution de volume implique une surexpression de p27^{Kip1} majoritairement au centre du sphéroïde, qui induit l’arrêt de la prolifération par une diminution de pRb (T373) au travers d’un front antiprolifératif se déplaçant du centre vers le bord du SMC. Nous observons par

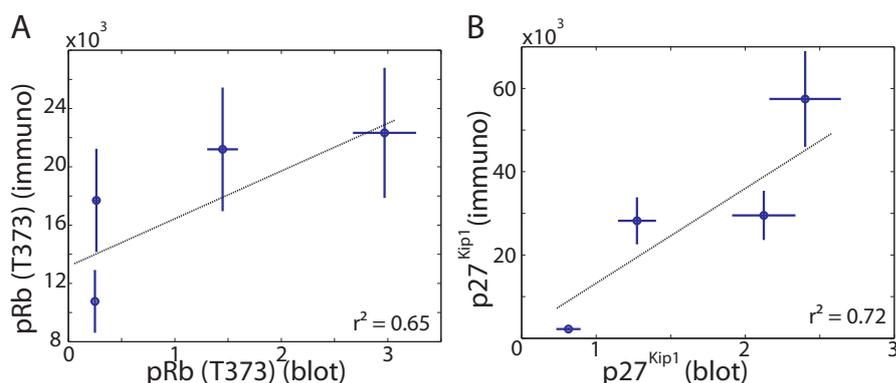


FIGURE 3.8 – Corrélations entre les marquages obtenus par Western blots et par immunofluorescence, pour p27^{Kip1} et pRb (T373). Des régressions linéaires ont été effectuées, dont les coefficients de corrélation sont indiqués sur les figures

ailleurs que cette inhibition est réversible, ce qui est en bon accord avec la réversibilité observée au niveau de la croissance des sphéroïdes.

Front antiprolifératif Nous analysons par immunofluorescence les mêmes sphéroïdes que ceux utilisés pour les Western blots. Nous marquons p27^{Kip1}, protéine inhibitrice de prolifération surexprimée lors de la compression, et pRb (T373), protéine indiquant la prolifération et dont l'expression est directement modulée par p27^{Kip1}. Les résultats sont indiqués sur la figure 3.7.

Nous remarquons qu'initialement, la prolifération est plus importante au bord qu'au centre, en accord avec les résultats observés par les marquages de Ki67. À mesure que le temps passe, la prolifération diminue. Nous remarquons que la prolifération diminue par le centre, vers le bord. Au bout d'un jour, le profil de prolifération a commencé à diminuer, peu, et au bout de 3 jours, la prolifération n'est uniquement localisée qu'au bord du sphéroïde. Nous montrons également que la réduction de prolifération ne s'effectue pas partout en même temps, mais plutôt progressivement du centre vers le bord.

L'analyse de p27^{Kip1} nous révèle que bien qu'il faille environ 1 journée pour commencer à observer la diminution de pRb (T373), la surexpression de p27^{Kip1} est quant à elle rapide, puisque 2h à peine après l'établissement de la contrainte mécanique, p27^{Kip1} est surexprimé à un niveau qui est le même qu'au bout d'une journée. Nous remarquons qu'au bout de 24h, ce profil est stabilisé avec une expression de p27^{Kip1} plus forte au centre qu'au bord : l'expression de p27^{Kip1} semble anticorrélée au volume des cellules. Le profil de p27^{Kip1} se déplace en un front antiprolifératif allant du centre vers le bord. La diminution de pRb (T373) semble d'ailleurs suivre ce front. Au bout de 3 jours, le maximum du profil de p27^{Kip1} est localisé à 2-3 cellules du bord, alors que celui de pRb (T373) présente son maximum au bord. Ce même front a été observé sur les SMC de BC52 sous 5 kPa, et le maximum du profil de p27^{Kip1} localisé à 2-3 couches de cellules du bord également observé pour les SMC de CT26 sous 5 kPa, indiquant la robustesse du mécanisme de cette mise en quiescence.

Notons la diminution de p27^{Kip1} observée au centre du sphéroïde après l'arrêt de prolifération constaté par la diminution de pRb (T373). Ceci semble indiquer que bien qu'il faille une forte surexpression de p27^{Kip1} pour arrêter la prolifération, un niveau plus faible pourrait suffire à maintenir l'état de quiescence. Nous remarquons que vers les jours 4-5, l'apoptose semble aug-

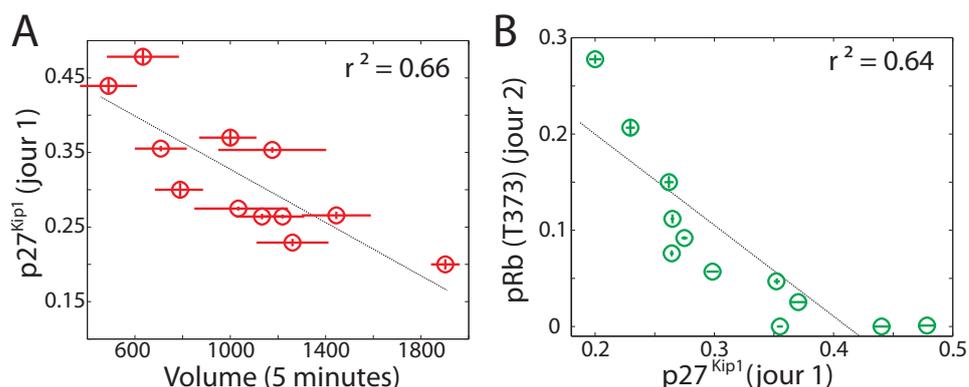


FIGURE 3.9 – Corrélation spatiale existant entre $p27^{Kip1}$ au bout d'un jour et le volume au bout de 5 min (A), et entre pRb (T373) au bout de 2 jours et $p27^{Kip1}$ au bout d'un jour (B). Des régressions linéaires ont été réalisées et les coefficients de corrélation sont indiqués sur les figures.

menter au centre des sphéroïdes, ce qui pourrait également expliquer la diminution de $p27^{Kip1}$.

L'intégrale des densités de protéines obtenue par l'analyse des marquages par immunofluorescence correspond à la proportion de cellules positives pour ce marquage. Remarquons que ces nombres sont bien corrélés au niveau moyen des protéines obtenu par Western blots (figure 3.8). La concordance de ces valeurs nous autorise à utiliser la proportion de cellules positives pour le marquage d'intérêt comme niveau moyen de la protéine au sein du sphéroïde.

Corrélations spatiales Nous avons remarqué dans le paragraphe précédent que le front antiprolifératif part du centre pour aller vers le bord. Nous étudions la corrélation spatiale qu'il existe entre les niveaux de pRb (T373), de $p27^{Kip1}$, et le volume des cellules. Nous observons que le profil de réduction de volume des cellules est rapide, et que 5 min au plus après l'établissement de la contrainte, ce profil est stabilisé. Nous remarquons qu'il faut environ 1 jour au profil de $p27^{Kip1}$ pour se stabiliser avec une valeur importante au centre, et que la réduction de prolifération commence réellement 2 jours après le début de la compression. Nous avons donc choisi de tracer le profil de $p27^{Kip1}$ au bout de 1 jour en fonction du volume des cellules 5 minutes après le début de la contrainte, et celui de pRb (T373) au bout de 2 jours en fonction du profil de $p27^{Kip1}$ au bout de 1 jour.

Nous remarquons que la réponse de $p27^{Kip1}$ semble être proportionnelle à la réduction de volume des cellules (figure 3.9A). De plus, la diminution de pRb (T373) est elle-même d'autant plus importante que la surexpression de $p27^{Kip1}$ l'est (figure 3.9B). Ainsi, l'amplitude de la réponse dépend de l'amplitude de la réduction de volume, dont nous avons vu qu'elle dépendait elle-même de l'amplitude de la contrainte appliquée.

Réversibilité Nous avons relâché la compression 5 jours après avoir appliqué cette contrainte, sur des SMC de HT29. Le volume relaxe vite, et 1 jour après que la contrainte soit relâchée, celui-ci est de nouveau homogène dans le sphéroïde. Nous avons mesuré par immunofluorescence l'évolution de $p27^{Kip1}$ et pRb (T373).

Nous remarquons que la séquence d'inhibition de prolifération est réversible. Lorsque nous relâchons la contrainte, nous observons (figure 3.10B) que la prolifération repart par le bord vers le centre, en sens inverse du front antiprolifératif. $p27^{Kip1}$ diminue quant à lui partout dans

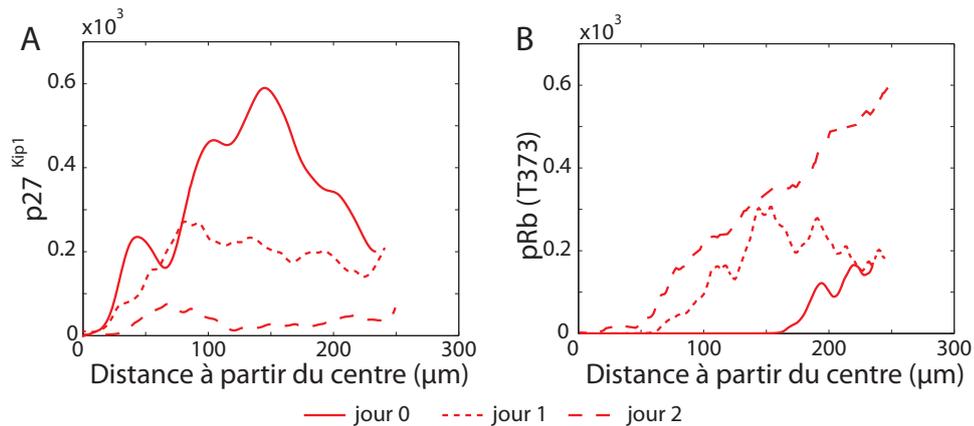


FIGURE 3.10 – Évolution de $p27^{Kip1}$ et pRb (T373) lors de la relâche de la contrainte mécanique 5 jours après son établissement. En ligne pleine : jour 0 ; en tirets fins : jour 1 et en tirets larges, jour 2.

le sphéroïde (figure 3.10A), de manière homogène. Ceci est en accord avec une dégradation de cette protéine, et sous-entend que sa surexpression est corrélée avec la diminution de volume, qui maintenant sont niveau haut dans le sphéroïde. Au bout de 2 jours, la dégradation de $p27^{Kip1}$ est terminée et le niveau de $p27^{Kip1}$ est à son niveau basal.

Séquentialité Je termine cette section par un paragraphe résumant les différents résultats obtenus. Nous avons montré qu’il existe une séquentialité dans l’arrêt de la prolifération, et une corrélation spatiale entre différentes grandeurs. Le schéma que nous pouvons considérer, qui est résumé sur la figure 3.11, est le suivant :

1. L’établissement de la contrainte mécanique implique une diminution rapide du volume des cellules. Cette diminution est inhomogène et plus importante au centre. Elle est en accord avec une réponse passive des cellules qui réduisent de taille.
2. Cette diminution passive du volume des cellules implique une réponse active. Nous ne connaissons pas le lien direct entre la réduction du volume des cellules et la surexpression de l’inhibiteur de prolifération $p27^{Kip1}$, mais nous constatons qu’au bout de quelques heures, le niveau de $p27^{Kip1}$ augmente dans les cellules, et augmente préférentiellement au centre, où la réduction du volume est la plus forte. Ce temps de surexpression est compatible avec une synthèse active de cette protéine.
3. La surexpression de $p27^{Kip1}$ entraîne une diminution de la phosphorylation de pRb , représentée par pRb (T373), et probablement sa dégradation. Ceci est une signature d’un arrêt de prolifération au niveau du point de restriction. Nous constatons un retard d’environ 1 jour dans l’arrêt de la prolifération. Ce retard est cohérent avec l’arrêt d’une population asynchrone de cellules qui se divisent, dont le temps de division est d’environ 1 jour.

Cette séquence est réversible. La ré-augmentation du volume est rapide. Nous insistons sur le fait que la dégradation homogène de $p27^{Kip1}$ au sein du sphéroïde est une autre indication forte que sa surexpression est induite par la réduction du volume des cellules.

Il manque à cette séquence un lien entre la réduction du volume et l’augmentation de $p27^{Kip1}$. Autrement dit, il reste à discuter l’existence de ce senseur de volume/de contrainte. Avant de

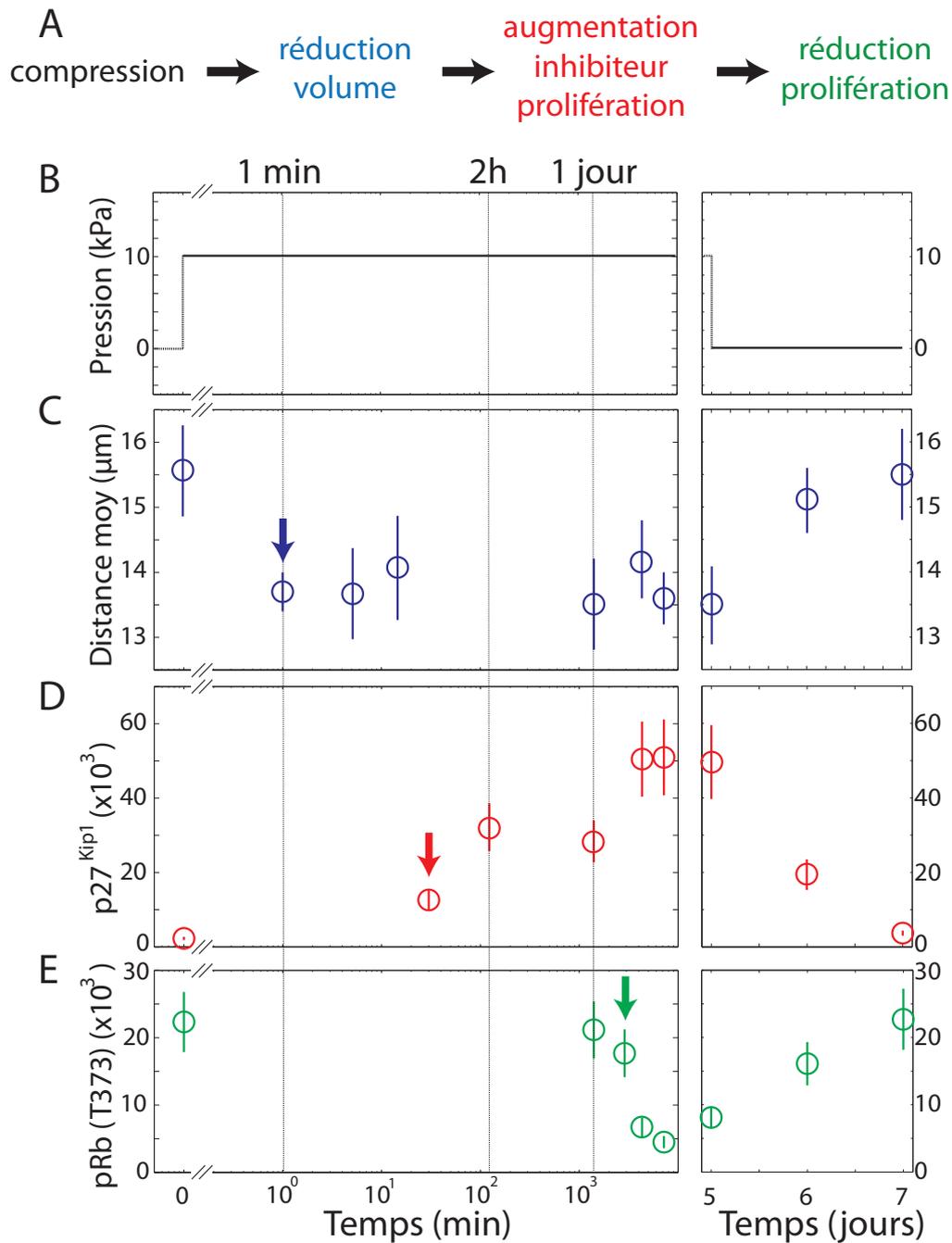


FIGURE 3.11 – Séquence allant de l'application de la contrainte mécanique jusqu'à l'arrêt de la prolifération (A), et la réversibilité. B : contrainte mécanique, C : distance moyenne entre cellules dans le SMC, D : nombre de cellules surexprimant p27^{Kip1} et E : nombre de cellules exprimant pRb (T373). Notez l'échelle logarithmique lors de l'établissement de la contrainte. Des flèches indiquent le temps caractéristique de changement de chaque quantité.

NF2	Niveau total constant. Pas d'activation.
↓	
Mst1/2	Niveau total constant. Pas d'activation.
↓	
Lats1/2	Lente dégradation sur 48h. Activation à court terme ($\leq 6h$), maintenue à 48h.
↓	
YAP/TAZ	Lente dégradation, et lente activation. L'activation commence vers 24h pour être forte à 48h.

TABLE 3.3 – Résumé des observations de Western blot sur les différents protagonistes de la voie Hippo.

conclure et de donner des pistes de ce senseur, nous allons présenter un travail sur l'activation de la voie Hippo, connue pour être mécano-sensible, dans le cadre de SMC sous contrainte mécanique.

•••••

3.4 Activation de la voie Hippo

Nous avons présenté en introduction la voie Hippo, qui dans son activation canonique, déclenche une chaîne de phosphorylation allant de NF2 à Mst1/2, puis à Lats1/2, pour enfin phosphoryler YAP et TAZ, deux co-facteurs de transcription. Leur phosphorylation entraîne leur séquestration cytoplasmique et leur dégradation. Ces co-facteurs de transcription activant des gènes pro-prolifératifs, l'activation de cette voie entraîne une réponse anti-proliférative.

En collaboration avec le groupe de D. Lallemand à l'Institut Curie (UMR144), j'ai travaillé avec Alizée Boin, sur l'activation de cette voie. Nous avons comprimé des SMC de BC52 à une pression de 5 kPa. Nous avons analysé à l'aide de Western blots l'activation des différents partenaires clés de cette voie, puis par immunofluorescence, nous avons analysé leur localisation subcellulaire. La plupart des résultats présentés ont été obtenus par Madhumitha Narasimhan, étudiante en stage de M1, en co-direction entre Alizée Boin et moi-même.

L'activation de la voie a d'abord été montrée par Western blots, obtenus à partir d'extraits totaux protéiques de cellules de sphéroïdes de BC52. Les résultats sont résumés dans le tableau 3.3.

Nous observons que les niveaux totaux de NF2 et Mst1/2 ne sont pas changés, et que ces protéines ne sont pas activées lors de l'application de la contrainte (flèches barrées). Lats1/2 est en revanche activée, et progressivement dégradée. À partir de 24h après l'établissement de la contrainte, nous observons une augmentation de phospho-YAP et phospho-TAZ, qui est très forte à 48h. Avec cette phosphorylation, nous observons une dégradation progressive de ces deux protéines. Cette dégradation entraîne une diminution de l'expression des gènes cibles leur étant classiquement associés : la voie Hippo est donc activée, mais pas par la voie canonique classique.

Nous nous sommes donc focalisés sur YAP et sur TAZ afin d'observer leur localisation et leur expression au sein d'un SMC par cryosection et marquage par immunofluorescence (figure 3.12). Les résultats présentés ici correspondent à des SMC de BC52 sous 0 ou 5 kPa à 48h.

Nous observons que sans contrainte, YAP a une localisation cellulaire qui est majoritairement cytoplasmique. Il n'y a pas de localisation privilégiée de la forme phosphorylée. Deux jours après l'application de la contrainte compressive, nous observons que la localisation de YAP est modifiée. En effet, il est clair que cette protéine est majoritairement nucléaire au centre des sphéroïdes. Notons que YAP phosphorylé colocalise avec le YAP nucléaire au centre des sphéroïdes. Ces

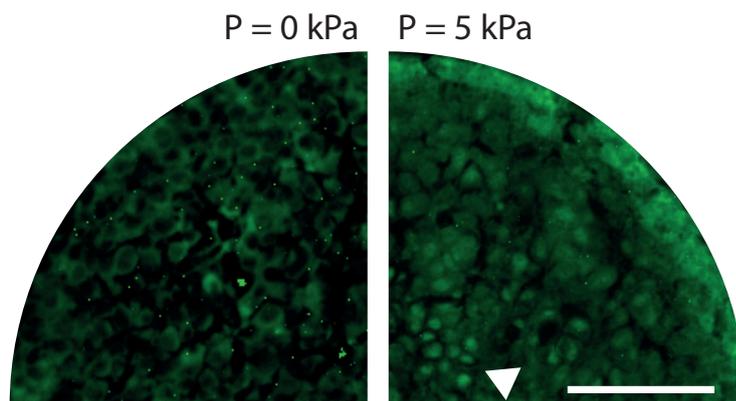


FIGURE 3.12 – Marquages de YAP dans des SMC de BC52 48h après l'établissement de la contrainte. Échelle : 100 μm . Nous remarquons qu'en l'absence de contrainte, YAP est diffus et présente une localisation cytoplasmique, alors qu'en présence de contrainte, il y a moins de YAP, et il est surtout concentré dans le noyau des cellules au centre (flèche blanche).

résultats ont également été obtenus pour TAZ.

Rappelons que la phosphorylation de YAP entraîne une rétention cytoplasmique dans l'activation canonique de cette voie. L'activation que nous observons ici est par ailleurs lente (48h), et la réduction de prolifération observée ne peut pas lui être associée. En revanche, YAP est phosphorylé et nucléaire à 48h, temps pour lequel le volume des noyaux est réduit, le front anti-prolifératif de $p27^{\text{Kip1}}$ est passé, et pRb (T373) est absent au centre. Nous pouvons dans ce cas précis nous demander si l'activation de cette voie ne correspondrait pas à une autre fonction de ces facteurs de transcription. Il a par exemple été récemment montré que TAZ jouait un rôle dans la survie des cellules en cas d'hypoxie [155].

.....

3.5 Conclusions et perspectives

Ces études biologiques sur la réponse de SMC à une contrainte en compression nous ont amené à des analyses de plus en plus fine. Nous observons une réduction du taux de croissance de SMC comprimés, et remarquons que celle-ci peut être expliquée principalement par la réduction du nombre de cellules en prolifération, plutôt que par une augmentation de la mort cellulaire. Nous avons lié la contrainte mécanique à une diminution du volume des cellules, principalement au centre du sphéroïde. Cette diminution est très rapide devant le temps de division cellulaire, et ne peut être la signature d'expression génique. Nous avons vu qu'elle entraîne une surexpression de $p27^{\text{Kip1}}$, protéine inhibitrice de prolifération, dans une proportion corrélée à la réduction de volume. Cette protéine entraîne par la suite une réduction de prolifération en bloquant les cellules au point de restriction, dans une proportion qui est elle-même corrélée à la surexpression de $p27^{\text{Kip1}}$.

Ainsi, la réduction de prolifération, entraînant la diminution du taux de croissance des SMC, est-elle induite par la réduction du volume des cellules. Cette réduction étant elle-même dépendante de l'amplitude de la contrainte appliquée, nous avons un lien direct entre contrainte compressive et réduction du taux de croissance.

Enfin, nous montrons que la voie Hippo est activée. Son activation ne passe néanmoins pas

par une activation canonique de la voie. En effet, nous trouvons une activation de YAP et TAZ, mais celle-ci se situe dans le noyau des cellules. L'action normale de ses deux co-facteurs de transcription est la synthèse de gènes pro-prolifératifs, ce qui ne peut-être le cas ici, car YAP et TAZ ainsi activés se retrouvent dans le noyau de cellules en quiescence.

Dans leurs expériences de 1998, Inger et ses collègues soumettent le cytosquelette de cellules endothéliales à des contraintes en tension. Ils montrent que les cellules ainsi tendues arrêtent de proliférer en étant bloquées au niveau du point de restriction, par une surexpression de p27^{Kip1} [107]. Il trouvent que les niveaux de cyclines D1 et E ne sont pas changés, et que cette inhibition ne passe pas par une surexpression de p21^{Cip1}. Bien que la contrainte que nous appliquons ait un signe opposé, nous trouvons les mêmes résultats.

Dans les expériences de Sasaki, des cellules épithéliales sont également soumises à une tension de leur cytosquelette par une méthode similaire à celles développée par le groupe de Ingber en 1997 [156]. Ils observent une activation non-canonique de la voie Hippo, avec la relocalisation nucléaire de YAP phosphorylé [106]. Bien que la phosphorylation observée de YAP ne soit pas au même site, l'analogie de la réponse entre tension et compression semble forte.

Une tension exercée sur le cytosquelette va plutôt agir au niveau du cortex des cellules en passant par l'activation de Rho GTPases qui vont remodeler ce dernier. L'apparition de longues fibres de stress en est une signature. Ainsi l'ajout de drogue agissant sur les filaments d'actine ou sur les kinésines perturbe la réponse en tension, tandis que l'ajout de drogue agissant sur les microtubules ne change rien (voir [105, 106, 107] par exemple).

Il n'existe à notre connaissance aucune étude travaillant sur une compression isotrope de cellules. La première idée serait de supposer qu'en compression ce seraient plutôt les microtubules que l'actine qui réagirait. Néanmoins, pour garder l'analogie avec la tension, pouvons-nous imaginer un mécanisme dans lequel l'actine soit atteinte? Comme mentionné dans le chapitre précédent, l'orientation possible des cellules pourrait créer l'apparition de fibre de stress, mais cette hypothèse reste encore à être démontrée. Un autre mode d'action pourrait être la réduction de volume qui, entraînant un remodelage du cytosquelette, peut être à l'origine de la réponse observée.

Le point de restriction est connu pour être un point de contrôle du volume des cellules dans une grande variété d'organismes [147], notamment chez la levure. Pour entrer dans le cycle cellulaire, une levure doit avoir un volume supérieur à un certain volume seuil pour passer l'équivalent du point de restriction nommé START. Cette condition est nécessaire mais pas suffisante. Bien que la question soit encore soumise à débat chez les cellules mammifères [157], un faisceau de preuves tend vers l'idée qu'une cellule entre dans le cycle cellulaire en ajuster son volume dans la phase G1. En effet, une étude menée en 2004 montre que si une cellule fille après division a un volume trop petit, la phase G1 sera alors allongée; en revanche, si la cellule fille a un volume trop grand, la phase G1 sera alors plus courte [158]. Il semble que la phase G1 d'une cellule mammifère ait un rôle de phase tampon en ce qui concerne le volume de la cellule. Une donnée qui va dans ce sens est résumée dans le tableau 3.4. Lors de l'étude de 3 lignées différentes, nous avons remarqué que la durée totale des phases S/G2/M du cycle est presque identique, tandis que la durée de G1 est d'autant plus grande que le diamètre de la cellule est grand.

Toutes ces expériences et indications nous laissent fortement supposer que les cellules sont capables de ressentir leur volume. La manière dont celui-ci est régulé durant le cycle cellulaire est encore un mystère, et la façon dont une cellule peut ressentir son volume n'est pas très bien connue, sauf chez la levure. Cette dernière mesure son volume en mesurant la concentration de différents complexes protéiques, qui sont liés à la cycline 3, Cln3, orthologue chez la levure de la cycline D1 [147]. D'un point de vue physique, le volume étant la grandeur conjuguée de la pression, une hypothèse simple est qu'il puisse être un senseur de la contrainte compressive. D'un point de vue biologique, quel serait le senseur du volume dans notre cas? Les expériences nous

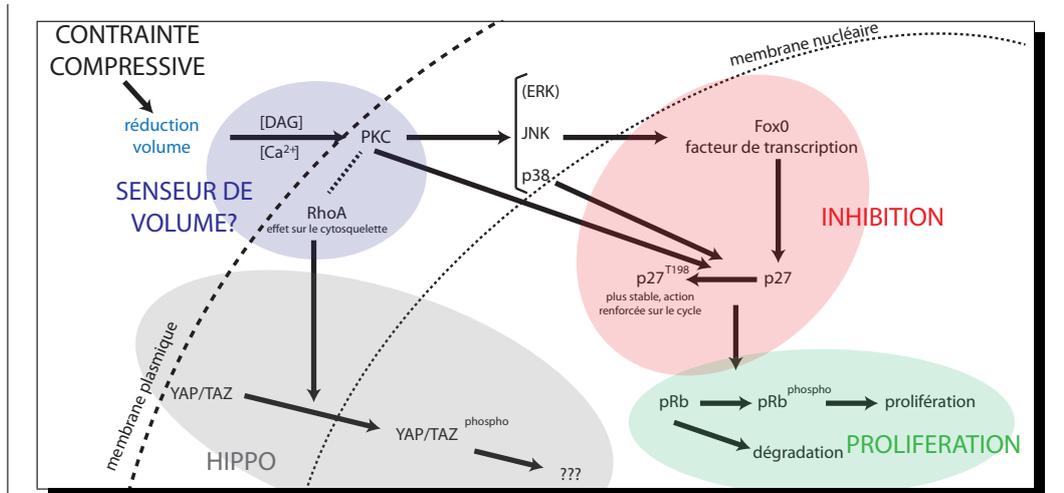
	% G0/G1	%S	%G2/M	τ_{G1}	$\tau_{S/G2/M}$	τ_{div}	diamètre (μm)
CT26	42	45	13	7.6h	10.4h	18h	14.2
HT29	60	18	22	14.4h	9.6h	24h	15.7
Hela	65	14	21	16.9	9.1	26h	17

TABLE 3.4 – Analyse de cycle cellulaire pour différentes lignées possédant des temps de division τ_{div} différents. À partir des quantités de cellules dans les différentes phases, et en supposant que toutes ces cellules sont proliférantes (aucune cellule en G0), nous pouvons extraire la durée de la phase G1, τ_{G1} , et la durée cumulée des autres phases, $\tau_{S/G2/M}$.

montrent que la compression réduit le volume de la cellule. Cette réduction quasi instantanée peut entraîner une rapide augmentation de beaucoup de facteurs au sein de la cellule, et également au niveau de la membrane. Que l'augmentation de ces facteurs entraîne un lien direct avec l'activation de la voie Hippo et la surexpression de p27 reste néanmoins à être démontré.

Un bilan des connaissances actuelles a été réalisé, nous permettant de proposer un nouveau mécanisme, présenté dans les perspectives.

Perspectives



La protéine kinase C, PKC, est une protéine cytoplasmique qui possède une localisation membranaire lorsqu'elle est activée. Son activation est assurée par la présence d'inositol, et éventuellement de diacylglycérole (DAG) et de calcium (Ca^{2+}) [159]. L'inositol et DAG peuvent être obtenus par le clivage de phosphatidyl inositol diphosphate par la phospholypase C au niveau de la membrane plasmique. PKC existe sous 15 isozymes. Leur activation est différente selon le contexte : certaines ont besoin de DAG et de calcium, d'autres de DAG uniquement, et certaines d'aucun des deux. Nous nous intéressons à cette protéine car elle est connue pour interagir directement avec les protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK) ERK, JNK et p38 [160]. Nous avons observé dans notre cas une activation de JNK et p38. PKC, tout comme p38, peuvent phosphoryler p27^{Kip1} à la thréonine 198, lui conférant une plus grande stabilité [161, 162]. Enfin, PKC interagit avec RhoA, une petite GTPase qui est connue pour agir sur le remodelage du cytosquelette [163].

$\text{PKC}\alpha$ est une des 15 isozymes de PKC. Cette dernière requière DAG et du calcium pour s'activer. Lors d'une réduction rapide de volume, nous supposons que la concentration cytosolique et membranaire de certaines protéines augmente. Ceci peut augmenter la cinétique de création de DAG, ainsi que la concentration en calcium, activant $\text{PKC}\alpha$. $\text{PKC}\alpha$ activerait les MAPK, en particulier JNK, qui est connue pour activer le facteur de transcription FoxO responsable de la synthèse de p27^{Kip1} [164]. $\text{PKC}\alpha$ et p38 pourraient phosphoryler p27^{Kip1} ce qui lui conférerait une plus grande action d'inhibition : la dégradation de pRb et son inhibition de prolifération bloquerait donc la prolifération cellulaire. L'activation de $\text{PKC}\alpha$ passe également par une plus grande stabilité de son complexe avec RhoA [163]. RhoA peut directement activer la voie Hippo dans le cas où le cytosquelette est sous tension [105].

Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait tout d'abord s'assurer de l'activation de $\text{PKC}\alpha$ au niveau membranaire. Ceci peut s'effectuer grâce à des cryosections et marquages par immunofluorescence. Dans un second temps, nous pouvons vérifier l'activation de FoxO par JNK. L'utilisation de Fura-2 AM, drogue inhibitrice des canaux calciques, pourrait également nous aider à connaître l'implication du calcium dans cette voie. Enfin, une drogue inhibitrice de RhoA pourrait nous permettre de mieux comprendre l'implication du cytosquelette dans l'activation non-canonique de la voie Hippo.

Pour terminer, il resterait à comprendre, si cette voie existe, sa fonction.

Une autre perspective que nous pourrions développer est l'étude d'une réponse adaptative à la contrainte. Nous pouvons pour cela imaginer deux expériences. Dans une première, nous comprimons le SMC peu de temps, mais suffisamment pour activer la voie impliquant la surexpression de p27^{Kip1} (1 à 2h). La dégradation de p27^{Kip1} étant lente (sur 1 ou 2 jours), l'application d'une telle contrainte à une fréquence de 1-2 fois par jour pourrait entretenir un haut niveau de p27^{Kip1} et amener à une réponse telle que nous l'avons observée : pourrions-nous faire croire au SMC, en le comprimant peu, qu'il l'est en permanence ?

La seconde expérience part du même principe. La compression, en bloquant les cellules au niveau du point de restriction, les synchronise temporellement. Si nous relâchons la contrainte quelques heures (il semblerait que le point de restriction se situe à 3h de la transition G1/S [165]), les cellules pourraient avoir le temps de passer le point de restriction : pourrions-nous faire croire à un SMC comprimé, en relâchant la contrainte quelques heures par jour, qu'il ne l'est pas ?

Enfin, nous avons vu que l'apoptose semble augmenter alors que la cellule est en quiescence. Il serait important de travailler sur cette activation à des temps plus longs.

Flux cellulaire et invasion

De la migration cellulaire collective ou individuelle est observée dans une grande variété de processus biologiques, qui peuvent avoir des origines diverses. Des transformations morphologiques en embryogénèse, telles que la gastrulation ou la fermeture dorsale, amènent à des mouvements cellulaires individuels ou collectifs, et ce sans processus de prolifération cellulaire [166, 167]. Le renouvellement de tissu chez les mammifères conduit à des processus de migration collectifs. Par exemple dans le cas du petit intestin, les cellules migrent du fond des cryptes, où la division des cellules souches assure le renouvellement des cellules, vers le haut des villis, où les cellules entrent en apoptose et sont délaminiées [168]. La question de savoir si ce flux cellulaire est une cause ou une conséquence de la prolifération cellulaire en bas des cryptes est toujours débattue.

Des mouvements cellulaires sont également observés dans les tumeurs : en réponse à des gradients chimiques, les cellules d'une tumeur peuvent migrer soit individuellement soit collectivement et envahir le tissu voisin [169]. De l'imagerie *in vivo* montre d'ailleurs un mouvement dirigé des cellules vers les vaisseaux sanguins [170]. Dans ce chapitre, nous discutons de l'existence de mouvements cellulaires dans les SMC dus à la simple division cellulaire, puis de l'influence de contraintes mécaniques sur celui-ci [171]. Nous nous intéressons ensuite aux mouvements cellulaires sortant des SMC dans des processus d'invasion, et de l'influence de contraintes compressives sur ceux-ci.

• • • • •

4.1 Flux cellulaire

Les résultats obtenus sur le flux cellulaire l'ont uniquement été sur les CT26.

Nous avons dans les chapitres précédents montré qu'une contrainte mécanique influençait un SMC de multiples manières. Nous n'avons, dans ces approches, jamais considéré la dynamique de ces objets. Prenons l'équation de conservation de la masse pour un sphéroïde :

$$\partial_t \rho + \operatorname{div} \rho \vec{v} = \rho k_g(r)$$

dans laquelle ρ représente une mesure de la densité cellulaire locale, \vec{v} un champ de vitesse et $k_g(r)$ le taux de prolifération local des cellules, à savoir le taux de division retransché du taux d'apoptose. Nous pouvons récrire cette équation

$$\frac{D\rho}{Dt} + \rho \operatorname{div} \vec{v} = \rho k_g(r)$$

en faisant ressortir la dérivée en suivant le mouvement de la densité. Nous avons remarqué que la densité de cellule était constante sans contrainte mécanique appliquée. Lorsqu'une contrainte compressive est appliquée, la densité augmente de manière hétérogène, et très rapidement devant le temps de division cellulaire. Au bout de 5 jours après l'application de la contrainte, le profil de densité reste inchangé. Ces observations nous permettent de faire l'hypothèse qu'au premier

ordre

$$\frac{D\rho}{Dt} = 0$$

en considérant que la densité est constante. L'équation de conservation de la masse devient alors :

$$\operatorname{div}\vec{v} = k_g(r)$$

Cette équation suppose donc qu'un champ de vitesse peut émerger dans un tissu, et ce uniquement dû à la division cellulaire. Nous verrons dans ce chapitre qu'un tel flux existe, et qu'il peut être expliqué en ne considérant que le champ de vitesse émergeant de la division cellulaire.

Ouriel Caën, alors étudiant en M2, a effectué un stage de 3 mois sur ce sujet et a réalisé les premières expériences.

Premières preuves Dans les années 80, les expériences menées par Dorie furent les premières à mettre en évidence l'existence d'un flux cellulaire dans des sphéroïdes [172, 173]. Deux approches ont été utilisées. Dans la première, des billes de polystyrène sont mises en contact avec des SMC déjà formés. Les billes, dont le diamètre fait 9, 15 ou 25 μm , sont internalisées, d'une façon indépendante de leur taille. Dans leur seconde approche, des cellules individuelles sont marquées par de la ^3H -thymidine, thymidine dont les atomes d'hydrogènes sont remplacés par des isotopes de tritium. Ces cellules sont également mises en contact des SMC, et sont internalisées. Des cryosections sont réalisées, et la position des billes ou des cellules radioactives est révélée permettant de tracer des histogrammes de leur localisation au sein du sphéroïde, en fonction de la distance à partir du bord. Ils ont ainsi mis en évidence l'existence d'un mouvement cellulaire, convergent, dans les SMC. Plusieurs paramètres furent testés, comme notamment la taille des billes, qui n'influçait pas le flux. Leurs expériences pionnières ont néanmoins quelques désavantages :

1. Pour ne pas changer trop fortement les interactions entre cellules au sein du sphéroïde, les marqueurs externes utilisés ne doivent pas être présents en trop grande quantité. Ceci a le désavantage de créer une faible statistique. En effet, ils rapportent ne pouvoir compter que 150 évènements pour des coupes de 30 sphéroïdes, ce qui représente en moyenne 5 billes ou cellules marquées à la ^3H -thymidine par coupe. Ceci les oblige à utiliser un grand nombre de SMC afin d'avoir une statistique correcte.
2. L'effet de la taille n'est pas traité - et délicat même à traiter dans leur cas, du fait du grand nombre de sphéroïdes à utiliser. Les histogrammes tracés le sont toujours par rapport au bord du SMC. Ceci a pour effet de perdre toute information concernant la croissance du sphéroïde. Nous verrons pourtant que l'effet de la croissance est important.

En utilisant une nouvelle méthodologie, nous avons marqué des SMC et suivi le mouvement des cellules du bord. Le grand nombre d'évènements obtenu par SMC nous permet d'obtenir une statistique satisfaisante par SMC pour tracer une distribution radiale de ces cellules.

Visualisation du flux cellulaire La stratégie retenue pour la visualisation du mouvement des cellules périphériques a été de marquer toutes les cellules du bord, plutôt que d'y attacher des cellules ou des billes. Le marqueur utilisé, conçu et réalisé par l'équipe de Jean-Michel Siaugue (Université Pierre et Marie Curie, Paris), consiste en des nanoparticules présentant une structure cœur-coquille [174]. Un cœur de silice poreuse est dopé avec des fluorophores tels que rhodamine ou fluorescéine. Ce cœur est ensuite doublement fonctionnalisé avec de longues chaînes de polyéthylène glycole, assurant une stabilité colloïdale entre les particules. Des terminaisons NH_2 ou COOH confèrent une meilleure biocompatibilité, et assurent également une internalisation naturelle de ces billes par voie d'endocytose dans les

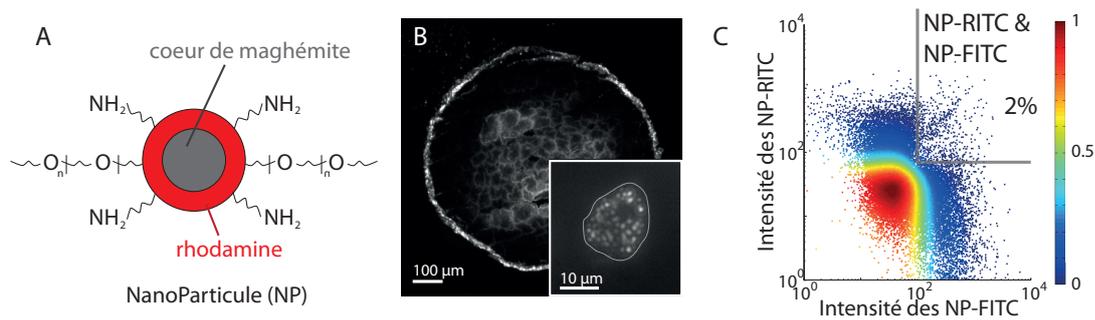


FIGURE 4.1 – Méthode de marquage des cellules. A : nanoparticule (NP) utilisée ; B : un sphéroïde marqué par les nanoparticules. Nous observons au centre le cœur autofluorescent. Insert : cellule individuelle marquée par les nanoparticules. ; C : résultat du contrôle d'échange des NPs entre cellules obtenu en cytométrie de flux (N = 40000 évènements enregistrés).

cellules (voir figure 4.1A). Nous avons choisi de travailler avec les nanoparticules, fonctionnalisées avec les terminaisons NH_2 , pour toutes ces raisons.

L'insert de la figure 4.1B montre une cellule de CT26 marquée par ces NPs. Nous observons que les NPs endocytées se regroupent sous forme de paquets à l'intérieur de la cellule. Pour marquer un SMC, nous le plongeons dans une solution de milieu cellulaire contenant les NPs à une concentration de $4 \cdot 10^{16} \text{ L}^{-1}$ pendant 1 heure à 37°C . Les NPs naturellement endocytés marquent uniquement la première couche cellulaire. Après rinçage, nous observons en cryosection le marquage homogène de la première couche de cellules par les NPs (figure 4.1B). Nous marquons plusieurs SMC et suivons l'évolution de la distribution des NPs, représentant la distribution de cellules, dans le temps. Notons que ces nanoparticules n'ont pas d'effet sur le temps de division ni sur les phases individuelles du cycle cellulaire. Nous apercevons au centre du sphéroïde un marquage fort qui ressort dans le même canal de fluorescence que les NP-RITC (nanoparticules fonctionnalisées avec de la rhodamine). Cette autofluorescence apparaît lorsque le cœur apoptotique des sphéroïdes est bien formé. Nous ne savons pas exactement à quoi il correspond, mais pensons qu'il doit être entre autre constitué de débris cellulaires.

Un point crucial sur lequel nous avons porté notre attention est de savoir si les cellules échangent les NPs entre elles. Afin d'infirmer ce point, nous avons différencié deux types de cellules, en marquant la moitié avec des NP-FITC (nanoparticules fonctionnalisées avec de la fluorescéine) et l'autre moitié avec des NP-RITC. Nous avons ensuite mélangé ces cellules et formé des sphéroïdes à partir de ce mélange de cellules marquées soit en rouge soit en vert. Le SMC est bicolore. Ainsi, si les cellules des SMC échangent des particules, nous devrions avoir au bout de quelques jours des cellules présentant les deux types de NPs. Nous avons dissocié les SMC bicolores 4 jours après les avoir formés, et mesuré le niveau de fluorescence des cellules de ces SMC, soit dans le canal de RITC, soit dans le canal de FITC, par cytométrie de flux. La figure 4.1C représente pour chaque cellule la quantité de NP-RITC en fonction de la quantité de NP-FITC. Nous pouvons noter sur ce graphique que seulement 2% de la population totale en cellules sont doublement positives. Cette population représente les cellules qui se sont échangées les NPs pendant 4 jours. Nous négligeons donc cet effet et supposons que les NPs restent dans les cellules initialement marquées.

Si une cellule se divise, elle sépare en moyenne en deux son contenu. Ceci nous permet d'observer le mouvement de ces cellules en fonction de la division cellulaire. Nous mesurons également

Sphéroïde à l'état stationnaire

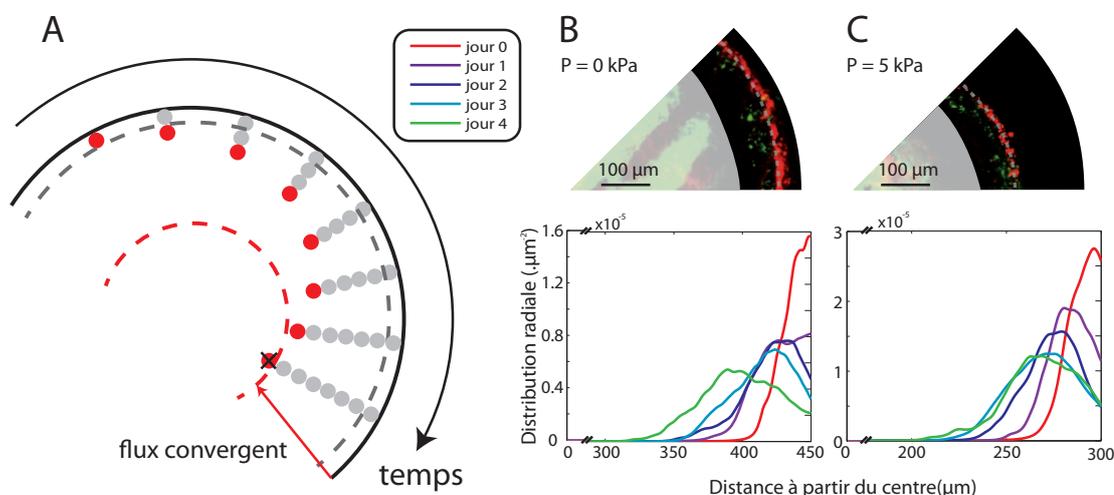


FIGURE 4.2 – Existence d’un flux cellulaire convergent dans des SMC à l’état stationnaire de taille. A : schéma de principe ; B et C, haut : superposition de cryosections de SMC marqué au jour 0, et au jour 4. L’autofluorescence du centre a été caché pour une meilleure lisibilité. B et C, bas : profils de densité radiale des NPs dans les SMC.

l’influence de la contrainte mécanique sur l’effet. Nous exerçons une contrainte mécanique de 5 kPa sur des SMC de CT26. Nous ne travaillons qu’avec une condition de contrainte mécanique, et avons choisi 5 kPa, car elle correspond au début de la saturation de l’effet sur le taux de croissance pour les SMC de CT26.

Existence d’un flux convergent - sphéroïde à l’état stationnaire

Intéressons-nous dans un premier temps à la caractéristique d’un flux cellulaire dans des SMC à l’état stationnaire de taille. Après 30 jours de croissance, des sphéroïdes sans contrainte mécanique saturent en diamètre autour de $900 \mu\text{m}$, et des sphéroïdes sous 5 kPa saturent autour de $600 \mu\text{m}$. L’état stationnaire de taille n’impose pas un arrêt de la division cellulaire. Les cellules se divisent toujours au bord du sphéroïde, mais l’apoptose présente au centre est telle que par unité de temps, la mort cellulaire équilibre la division cellulaire. Ainsi, si une cellule se divise au bord d’un SMC à l’état stationnaire de taille, par conservation du volume, une des deux cellules filles doit être “poussée” vers l’intérieur du sphéroïde. Si nous considérons que seulement une couche de cellule se divise, comme dans le schéma de la figure 4.2A, alors cette cellule du bord va mécaniquement, uniquement par l’action de l’excès de division cellulaire au bord, entrer à l’intérieur du sphéroïde. Lorsqu’elle est à une distance d’environ $100\text{-}200 \mu\text{m}$ du bord, cette dernière entre éventuellement en apoptose par manque d’oxygène, puis en nécrose secondaire, et son contenu ressort du SMC, assurant ainsi la stabilité de l’état stationnaire de taille.

Nous avons marqué plusieurs sphéroïdes à l’état stationnaire de taille avec des NP-RITC. Nous coupons un sphéroïde à différents temps au niveau du plan équatorial, et mesurons la densité radiale des NP-RITC. Les figures 4.2B et C montrent de telles cryosections, où le jour initial est marqué en rouge, et le quatrième jour après le marquage en vert. Nous remarquons

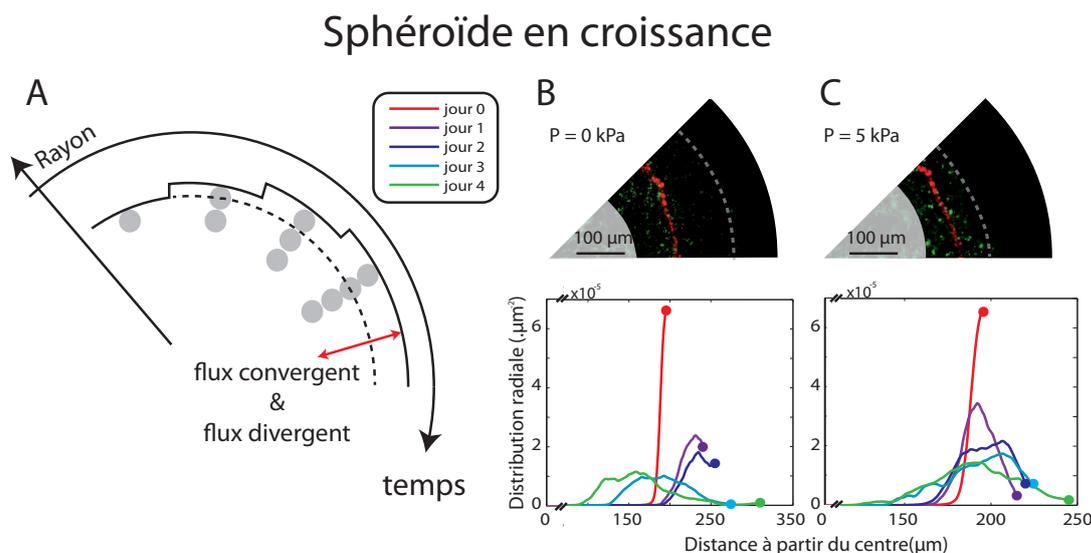


FIGURE 4.3 – Co-existence d’un flux cellulaire convergent et divergent dans des SMC en croissance. A : schéma de principe ; B et C, haut : superposition de cryosections de SMC marqué au jour 0, et au jour 4. Des pointillés indiquent le rayon des SMC au jour 4. L’autofluorescence du centre a été caché pour une meilleure lisibilité. B et C bas : profils de densité radiale des NPs dans les SMC. Des points indiquent le rayon du sphéroïde.

que le marquage est initialement localisé sur la première couche de cellules. Quatre jours après, les cellules qui étaient initialement au bord avancent dans le tissu. Nous estimons une vitesse à partir du déplacement du maximum de la distribution, d’environ $20 \mu\text{m} \cdot \text{jour}^{-1}$, qui est cohérente avec un flux convergent de cellules se déplaçant dans champ de vitesse dû à la division cellulaire. Les CT26 ont un diamètre moyen de $14.5 \mu\text{m}$ pour un temps de division à 2D de 18h, ce qui donnerait une vitesse de déplacement de $14.5/18 \times 24 = 19.3 \mu\text{m} \cdot \text{jour}^{-1}$. Sous 5 kPa de contrainte mécanique, nous observons également un flux convergent de cellules. Cependant, la vitesse est réduite d’un facteur 2. Cet réduction est cohérent en ordre de grandeur avec la diminution d’un facteur 2 du taux de prolifération k que nous avons mesuré au chapitre précédent.

Ces résultats sont une autre démonstration du flux cellulaire convergent observé dans l’étude de Dorie. Nous montrons en plus que lorsqu’une contrainte mécanique est appliquée à un SMC, la diminution de division cellulaire amène à une diminution de ce flux convergent. Ces résultats sont démontrés dans le cadre d’un sphéroïde à l’état stationnaire de taille, qu’en est-il lorsque le volume de celui-ci augmente ?

Existence d’un flux divergent - sphéroïde en croissance

Lorsque le SMC est en croissance, les deux cellules filles récemment divisées peuvent a priori être poussées à l’intérieur du SMC comme expliqué dans le paragraphe précédent, mais aussi participer à l’augmentation du rayon du sphéroïde. Si tel est le cas, il devrait alors se superposer au flux convergent un flux cellulaire divergent, dû à la création de masse (figure 4.3A). Afin de vérifier cette prédiction, nous avons effectué la même expérience que précédemment mais avec des SMC n’ayant pas encore atteint l’état stationnaire de taille. Nous marquons donc des SMC lorsque leur diamètre est de $350 \mu\text{m}$, et suivons l’évolution des cellules marquées.

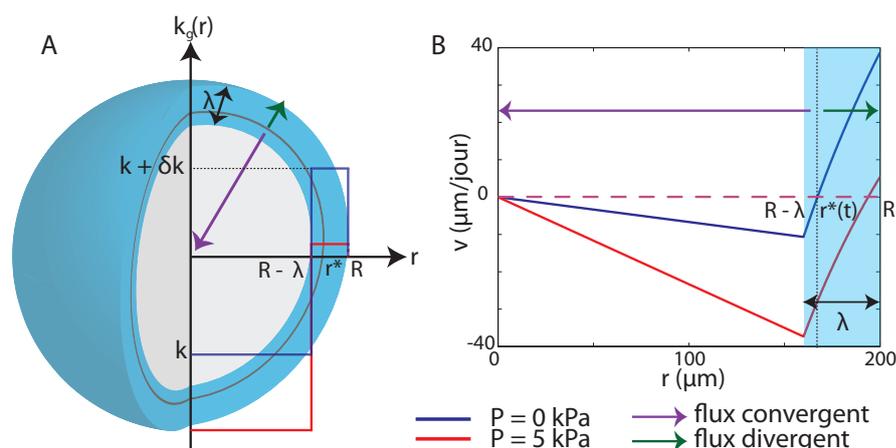


FIGURE 4.4 – Modèle de calcul du champ des vitesses. A : taux de prolifération des cellules dans le sphéroïde. Il existe un certain rayon, noté r^* , pour lequel le champ de vitesse change de signe. Avant ce rayon, le flux est convergent (flèche violette), et après, il est divergent (flèche verte) ; B : champ des vitesses calculé à partir de l'équation de conservation de la masse, avec les paramètres du chapitre précédent. r^* et les flèches représentant les différentes composantes du flux sont représentées.

Les figures 4.3B et 4.3C montrent l'évolution temporelle de tels sphéroïdes marqués. Nous remarquons que sans aucune contrainte appliquée, 4 jours après le marquage, toutes les cellules marquées semblent être à une distance du centre inférieure à la distance initiale. Pourtant, nous observons des traces de cellules plus en dehors de cette zone. L'analyse des distributions des NPs nous montre que les cellules marquées suivent initialement le bord du SMC en croissance. Au bout de 3 jours, le maximum de la distribution semble revenir dans le sphéroïde, et au bout de 4 jours, les cellules sont à une distance inférieure au rayon initial du SMC. Si nous nous plaçons dans le référentiel du centre du sphéroïde, nous assistons à un mouvement de va-et-vient des cellules. Elles s'éloignent d'abord du centre, pour ensuite y converger. Cette observation, également faite pour des SMC sous contrainte mécanique, mais dans des proportions moindres, nous indique qu'en plus d'un flux cellulaire convergent, il existe un flux cellulaire divergent. Les expériences et analyses de Dorie n'ont pu mettre en évidence ce flux, car les distributions étaient tracées par rapport au bord du sphéroïde, soit un référentiel en mouvement par rapport au centre du sphéroïde.

Sous contrainte mécanique, les deux flux cellulaires sont très réduits, indiquant encore une fois que ceux-ci peuvent avoir pour origine la division cellulaire. Nous allons dans la prochaine section modéliser cet effet.

Champ de vitesse Le point de départ de la modélisation est, comme nous l'avons vu, l'équation de conservation de la masse dans le cas où la dérivée en suivant le mouvement de la densité cellulaire est nulle :

$$\operatorname{div} \vec{v} = k_g(r)$$

Nous prenons comme taux de croissance le même que celui que nous avons pris dans le chapitre précédent, comme indiqué sur la figure 4.4A.

Nous pouvons facilement résoudre le champ de vitesse dans les coordonnées sphériques dans ces conditions. Nous trouvons :

$$\begin{aligned} v(r) &= \frac{1}{3}kr & \text{si } r \leq R(t) - \lambda \\ v(r) &= \frac{1}{3}(k + \delta k)r - \frac{1}{3}\delta k \frac{(R(t) - \lambda)^3}{r^2} & \text{si } r \geq R(t) - \lambda \end{aligned}$$

Ce champ de vitesse est tracé sur la figure 4.4B, avec pour k , δk et λ les valeurs extraites dans le chapitre précédent (nous prenons $\lambda = 40\mu\text{m}$ ici). Nous retrouvons sur ce champ de vitesse les observations faites précédemment. Si le SMC est à l'état stationnaire de taille, la vitesse au bord $v(R)$ est nulle. Dans ce cas, la vitesse est négative partout dans le sphéroïde, et le flux est uniquement convergent. Dans le cas où la vitesse au bord n'est pas nulle, il existe une valeur de r , notée r^* sur la figure, telle que la vitesse pour r plus petit que r^* soit négative, et positive pour r plus grand que r^* . La zone où la vitesse est positive constituera le flux divergent. Nous comprenons que nous ne pouvons l'observer que pour un SMC en croissance.

Pour un SMC en croissance, la distribution de NPs est initialement située au bord, où la vitesse est positive. Cette distribution est au début transportée par un mouvement divergent. Elle est néanmoins située sur un gradient de vitesse, ce qui a pour effet d'élargir la distribution. À un certain moment, une partie de cette distribution entre dans la zone où la vitesse est négative, et son maximum se déplace alors vers le centre. Ceci peut expliquer le mouvement de va-et-vient observé dans la figure 4.3.

La vitesse au bord du SMC correspond au taux de croissance de celui-ci. Si nous développons $v(R)$ au premier ordre en λ/R , ce qui est l'hypothèse de notre modèle, nous retrouvons l'équation de croissance surfacique présenté dans la partie précédente. Le rayon d'un SMC dans ce modèle sature à une valeur $R_\infty = -3\delta k \lambda/k$.

Transport des nanoparticules Les NPs sont agrégées dans les cellules qu'elles marquent.

Lorsqu'une cellule se divise, leur nombre est globalement divisé par deux entre les deux cellules filles. Leur nombre est conservé dans le temps.

Supposons que ces NPs soient transportées à l'intérieur du SMC. Nous pouvons envisager trois modes de mouvement, comme précisé dans [175]. Le premier est un mode de transport convectif où les NPs sont soumises au champ de vitesse susmentionné. Le second est un mode de transport par chimiotaxie : les cellules du centre, par exemple, manquant d'oxygène migrent selon le gradient d'oxygène, ce mouvement étant alors plutôt divergent. Nous choisissons pour cette analyse de négliger ce phénomène, pensant qu'il doit être marginal dans le sphéroïde. Le dernier type de transport est un transport diffusif, comme expliqué dans [121]. Le taux de diffusion dans ce cas est de l'ordre de $D \sim d^2/\tau$ où d est le diamètre d'une cellule et τ le temps de division. Le rapport entre les flux diffusif et convectif est alors de l'ordre de d/R , qui est petit devant 1. Nous négligeons le transport par diffusion. Dans ce cas, l'équation de transport s'écrit :

$$\partial_t p(r, t) + \text{div} \vec{v} p(r, t) = 0$$

Les grandes lignes de la résolution analytique de cette équation sont données en Annexe Calculs. Nous trouvons dans les deux régions :

$$\begin{aligned} p(r, t) &= p_0 \left(r e^{-kt/3}, 0 \right) e^{-kt} & \text{si } r \leq R(t) - \lambda \\ p(r, t) &= p_0 \left(\tilde{r}, 0 \right) e^{-(k+\delta k)t} & \text{si } r \geq R(t) - \lambda \end{aligned}$$

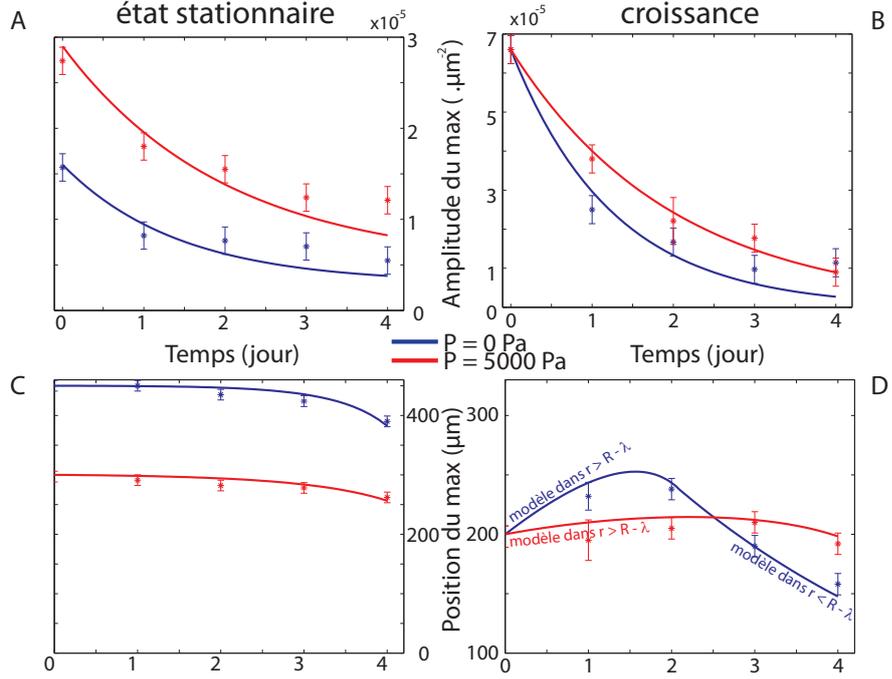


FIGURE 4.5 – Analyse des données expérimentales par le modèle de transport convectif. A et B : ajustement de la décroissance du maximum de la distribution des NPs dans le cas de l'état stationnaire et le cas en croissance. C : ajustement de la position du maximum de la distribution des NPs dans le cas état stationnaire. D : Évaluation numérique de la variation de la position du maximum de la distribution de NPs avec les paramètres extraits en A, B et C. Dans tous les cas, les barres d'erreur correspondent à l'erreur commise sur l'évaluation des différentes grandeurs. Chaque expérience a été réalisée $N \geq 3$.

avec $\tilde{r}^3 = e^{-(k+\delta k)t} r^3 + \int_0^t \delta k (R(t') - \lambda)^3 e^{-(k+\delta k)t'} dt'$. p_0 correspond à la distribution initiale des NPs. Dans la région du bord, l'amplitude de la distribution est décroissante, tandis que dans la région au centre, celle-ci est croissante - rappelons que $k \leq 0$.

Extraction des paramètres Les données expérimentales auxquelles nous avons accès sont l'amplitude et la position du maximum de la distribution des NPs. Dans les deux régions, la distribution est une fonction de la distribution initiale, modulée par une exponentielle. Nous pouvons extraire de ces données la décroissance du maximum, et donc $(k + \delta k)$ dans le cas de sphéroïdes à l'état stationnaire ou en croissance. Nous pouvons aussi montrer qu'à l'état stationnaire, la position du maximum peut s'écrire dans la région $r \geq R_\infty - \lambda$:

$$r(t) = R_\infty \left(a + (1 - a)e^{(k+\delta k)t} \right)$$

avec a valant

$$a = \frac{\delta k}{k + \delta k} \left(1 - \frac{1}{3} \left(1 - \frac{k + \delta k}{\delta k} \right) \right)$$

où $(k + \delta k)$ est extrait et fixé par l'ajustement de la décroissance du maximum, R_∞ est le rayon à l'état stationnaire, donnée expérimentale et donc également fixée. Le seul paramètre libre est δk .

P (kPa)	$(k + \delta k)_{stat}$	$(k + \delta k)_{croiss}$	k	δk	λ
0	0.7 ± 0.1	0.75 ± 0.1	-0.1 ± 0.2	0.8 ± 0.2	19 ± 38
5	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	-0.3 ± 0.2	0.8 ± 0.2	37 ± 25

TABLE 4.1 – Paramètres extraits des différents ajustements des données par le modèle de transport convectif. Les indices *stat* et *croiss* désignent respectivement les expériences avec des SMC à l'état stationnaire de taille et en croissance. Les incertitudes pour $(k + \delta k)$ proviennent des incertitudes sur l'ajustement des courbes. L'incertitude sur δk provient de la propagation d'erreur de l'incertitude obtenue par l'ajustement des courbes de position de maximum de la distribution. Enfin, les incertitudes sur k et sur λ proviennent de la propagation d'erreur des incertitudes sur les autres paramètres. Les taux sont donnés en j^{-1} , et λ en μm .

Nous extrayons $(k + \delta k)$ de la décroissance du maximum, et δk , puis k , du mouvement de cette position. Ceci permet d'extraire k et δk indépendamment. Enfin, λ est extrait en connaissant toutes ces grandeurs et le rayon à l'état stationnaire.

L'ajustement de la décroissance du maximum ainsi que de la position de celui-ci pour le cas de l'état stationnaire sont montrés sur les figures 4.5A, 4.5B et 4.5C, et les paramètres extraits résumés dans le tableau 4.1. Nous remarquons que les décroissances sont bien ajustées par le modèle de décroissance exponentielle. Nous observons que les derniers points sont un peu moins bien ajustés. Cela provient certainement du fait que la distribution commence à s'échapper de la région $r \geq R - \lambda$. De cette décroissance nous extrayons la somme $k + \delta k$, dans les deux cas. Nous observons que les valeurs selon les deux types d'expérience sont en accord l'une avec l'autre, et que cette somme diminue si la contrainte mécanique imposée augmente.

L'ajustement de la position du maximum de la distribution évoluant dans le cas de l'état stationnaire nous permet d'extraire indépendamment tous les autres paramètres. Nous les supposons également valables dans le cas de l'expérience en croissance. Afin de vérifier le modèle dans le cas des expériences en croissance, nous calculons numériquement la solution, avec les paramètres extraits dans le cas de l'état stationnaire, dans les deux régions, et traçons cette solution en regard des données expérimentales recueillies (figure 4.5D). Nous observons que le modèle est en excellent accord avec les données expérimentales.

Discussion des paramètres Nous retrouvons dans un premier temps le constat déjà fait dans le cas des ajustements des courbes de croissance du chapitre précédent : k , négatif, diminue fortement avec la contrainte appliquée, alors que l'incrément de prolifération à la périphérie, δk , reste quant à lui constant. Ceci nous permet de vérifier les conclusions précédentes avec l'analyse de données provenant d'expériences différentes que les précédentes. Les paramètres extraits sont par ailleurs du même ordre de grandeur que ceux extraits lors du chapitre précédent.

Ces ajustements nous apportent une valeur pour λ , valeur que nous ne pouvons pas extraire des expériences précédentes, mais seulement estimer. La valeur de λ est de l'ordre de grandeur des $30 \mu m$, cohérente avec la valeur estimée grâce aux marquages d'immunofluorescence des cryosections de pRb (T373). L'erreur sur λ est grande, car elle provient de la propagation de beaucoup d'incertitudes du même ordre de grandeur. Nous pourrions faire varier certains paramètres, comme les taux en oxygène ou en facteur de croissance, pour voir s'ils auraient une influence sur λ .

En résumé, ces expériences ont mis en évidence des flux cellulaires, convergents et divergents, à l'intérieur de tissu, dont l'unique moteur semble être la division cellulaire. Cette même division peut apporter du bruit diffusif, et le transport pourrait également se faire par chimiotaxie. Le

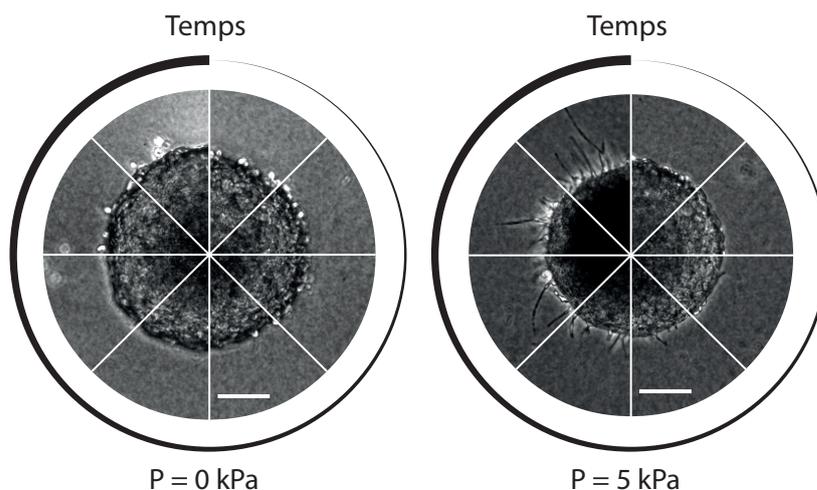


FIGURE 4.6 – SMC inclus dans du collagène I, sous différentes contraintes compressives : 0 kPa ou 5 kPa. Le temps varie de 0 à 24, et les images correspondent à des huitièmes d'image. Un image toutes les 3h est donc indiquée. Échelle : 100 μm .

bon accord entre notre modèle et les données expérimentales nous permet de négliger ces modes de transports. Ceci justifie également l'approximation au premier ordre de ρ pour la résolution analytique du champ de vitesse. Un papier de ElWain et Pettet présente un modèle incluant la chimiotaxie [175]. Dans leur étude, ils parviennent à la conclusion qu'un flux cellulaire convergent pourrait ralentir la sortie de cellules migrant contre un gradient d'oxygène par exemple. Ils appellent cet effet "nager à contre courant" (*swimming against the tide*). Ainsi, une cellule du centre, située dans un environnement défavorable, pourrait migrer vers des concentrations plus grandes en facteurs essentiels. L'application d'une contrainte mécanique pourrait favoriser le déplacement de cette cellule :

1. En diminuant la division cellulaire, une cellule a une probabilité plus grande de migrer.
2. En diminuant le flux convergent, une cellule voulant migrer en dehors d'un sphéroïde par chimiotaxie ressentirait une friction plus faible, et pourrait parcourir une plus grande distance dans le sphéroïde.

Nous allons dans la prochaine partie nous intéresser à l'invasion de SMC de CT26 dans un gel de collagène, et étudier l'influence d'une contrainte mécanique compressive sur cette dernière.

.....

4.2 Invasion

Nous avons vu durant l'introduction que le processus de dissémination métastatique passait par la dégradation de la lame basale, et la migration vers le stroma. Pour franchir la lame basale, une cellule protrude des invadosomes, similaires à ceux des cellules AC lors du passage de la lame basale chez *C. Elegans*. Récemment une étude a montré qu'un feuillet de cellules comprimé dans une dimension acquérait un phénotype invasif, à savoir dans ce cas, l'apparition de protrusions [176].

Nous posons la question de l'influence de contrainte compressive sur l'invasion dans le cas de sphéroïdes comprimés.

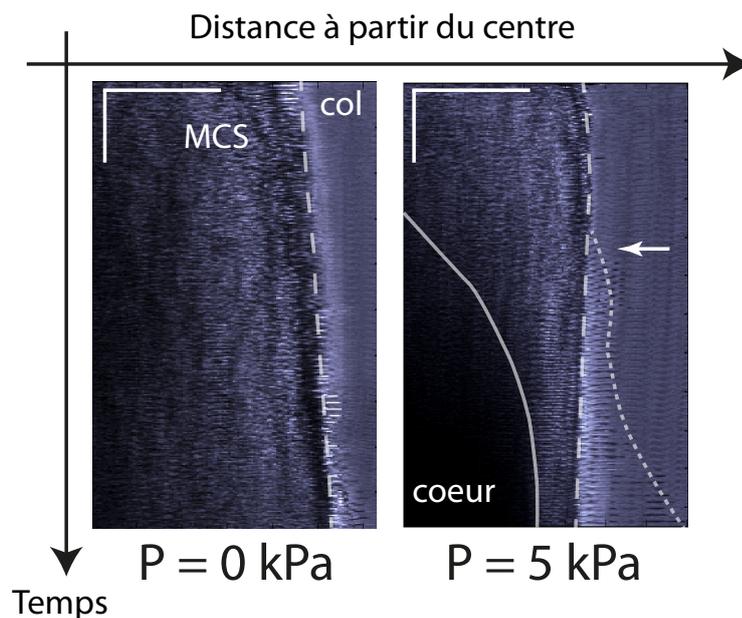


FIGURE 4.7 – Kimographe représentant l'évolution spatio-temporelle de SMC inclus dans du collagène I. Chaque bande représente une image. Les pointillés blancs représentent le bord du SMC dans le temps. La flèche blanche montre le début de l'apparition des premières protrusions. La ligne pleine montre l'évolution du cœur, tandis que la ligne en pointillés serrés représente l'évolution des protrusions. Échelles : temps, 5h ; espace, $100 \mu\text{m}$.

Invasion sous contrainte mécanique

Afin de tester l'influence de contraintes mécaniques sur l'invasion, nous incluons des SMC dans des gels de collagène de type I à 2 mg/mL . Une fois le gel polymérisé, nous appliquons la contrainte mécanique en ajoutant dans le milieu une solution de Dextran. Cet instant marque l'instant initial de l'expérience. Nous travaillons à une compression de 5 kPa sur des agrégats de CT26, ces cellules étant connues pour être invasives. Notons que bien que la taille des pores d'un gel de collagène dépende fortement de sa concentration, mais aussi de sa vitesse et de sa température de réticulation, elle se situe entre 1 et $10 \mu\text{m}$ [177]. Le rayon de gyration du Dextran étant de l'ordre de 10 nm [178], il n'y a pas de pression appliquée sur le gel de la part du Dextran, et celui-ci agit sur le sphéroïde de la même manière que précédemment.

La figure 4.6 présente l'évolution de SMC soit sous 0 kPa , soit sous 5 kPa . L'image est constituée de 8 images, prises toutes les 3h. Nous remarquons que le sphéroïde évoluant sans contrainte mécanique grossit dans le temps. Il ne se passe rien à part sa croissance. L'observation des films avec une image prise toutes les 5 min montre un mouvement d'ensemble à la surface du SMC. Il semblerait que l'interaction du SMC avec le collagène change radicalement l'effet en surface.

Lorsque le SMC est soumis à une contrainte compressive de 5 kPa , nous observons deux phases distinctes d'évolutions. Dans une première phase durant une dizaine d'heures, la surface du sphéroïde devient bien plus lisse que lorsque celui-ci n'est pas sous contrainte mécanique. Peut-être pouvons-nous attribuer ce phénomène à une augmentation de la tension interfaciale. Après 10 h, nous observons l'apparition de protrusions. Leur nombre augmente à mesure que le

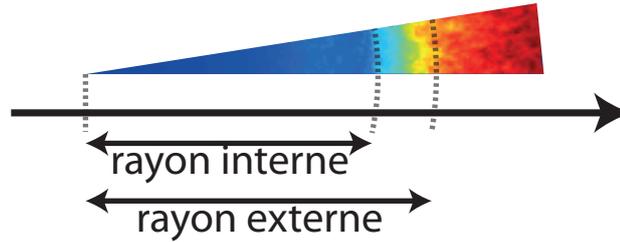


FIGURE 4.8 – Schéma de principe pour la mesure de l'indice d'invasion. Une image est moyennée sur l'angle, et codée en couleur afin de repérer les densités des différentes parties. Le centre est le sphéroïde, et le bord correspond aux protrusions. Nous mesurons le rayon des protrusions et le rayon du sphéroïde. L'indice d'invasion correspond au volume occupé par les protrusions normalisé au volume du sphéroïde.

temps passe. Nous observons également l'apparition d'un cœur foncé au centre du SMC.

Il est intéressant de noter que, bien que les sphéroïdes de BC52 et de HT29 répondent de manière similaire à une contrainte mécanique, aucune invasion n'est observée lorsque nous effectuons le même genre d'expérience.

Nous avons réalisé des kimographes à partir d'un rayon représentatif de ces images (figure 4.7). Nous remarquons que sous 0 kPa, le rayon du SMC augmente linéairement dans le temps. Lorsque le SMC est sous contrainte, il semblerait que le rayon de ce dernier diminue légèrement avec le temps à partir du moment où les protrusions apparaissent (vers 10h). Le cœur augmente quant à lui rapidement, et son bord se localise à une vingtaine de microns de la surface, ce qui correspond à un diamètre cellulaire. Il semble que l'augmentation de ce cœur soit corrélée à l'apparition des protrusions, et qu'il se déplace à la même vitesse. Il apparaît d'ailleurs à peu près au même moment. Nous pouvons nous demander s'il ne s'agirait pas d'un effet optique, d'autant que les marquages histologiques ne révèlent pas à première vue une augmentation de l'apoptose. Enfin, l'analyse des films montre que la réduction du diamètre du SMC est accompagnée d'une traction du collagène l'entourant. Les coupes histologiques montrent un réseau d'actine dense à la périphérie du SMC comprimé dans le collagène, réseau qui n'est pas présent dans le cas où les SMC sont sans contrainte dans le collagène.

Dans les paragraphes suivants, nous étudions l'effet de la taille du SMC ainsi que l'effet de la valeur de la contrainte.

Influence de la taille et de la pression

Pour étudier l'influence de différents paramètres, il faut une mesure de ce que nous considérons comme plus ou moins invasif. Nous avons choisi une mesure basée sur la densité de protrusions.

Pour effectuer cette mesure, nous moyennons chaque image angulairement, comme présenté sur la figure 4.8. Nous pouvons extraire de cette image un rayon interne, R_s , correspondant au rayon du SMC, et un rayon externe, R_p , correspondant au rayon occupé par les protrusions. Nous définissons l'indice d'invasion comme le volume occupé par les protrusions rapporté au volume du sphéroïde : $i_{\text{invasion}} = (R_p^3 - R_s^3)/R_s^3$. Une meilleure mesure consisterait peut-être en la reconstitution tridimensionnelle d'un SMC, puis la projection d'une densité tridimensionnelle de ces protrusions. La mesure que nous avons effectuée a l'avantage d'être simple à mettre en place, et ne nécessite aucun marquage préalable.

Nous avons, pour mesurer l'effet des différents paramètres, imposés soit le rayon initial, soit

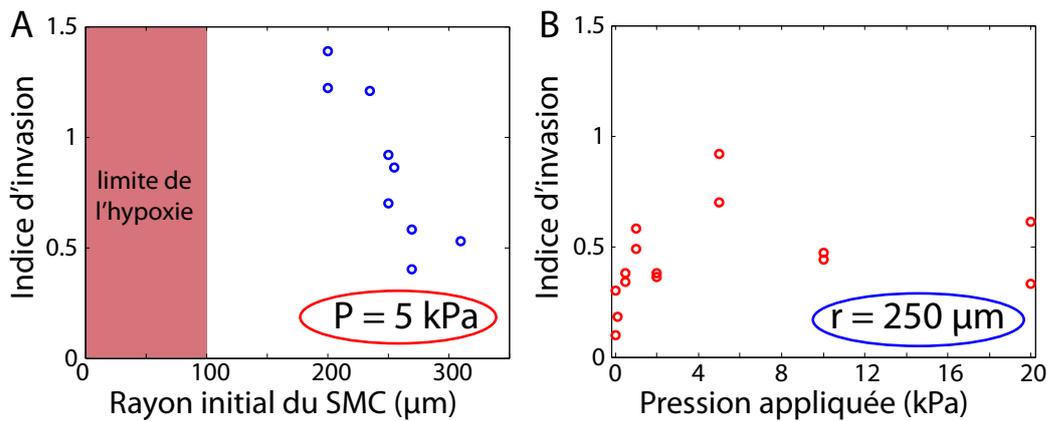


FIGURE 4.9 – Influence des différents paramètres sur l’invasion des SMC dans les gels de collagène. A : influence du rayon initial, la valeur de la compression étant fixée à 5 kPa ; B : influence de la valeur de la compression, le rayon initial étant fixé à 250 μm . Les valeurs pour $N = 2$ expériences indépendantes sont présentées.

la valeur de la compression. Nous mesurons l’indice d’invasion ainsi défini 48h après l’application de la contrainte compressive. Les résultats sont présentés sur la figure 4.9.

Analysons dans un premier temps les résultats obtenus sur l’influence de la taille initiale (figure 4.9A). Parmi les 5 points de taille réalisés, il semble que plus la taille est petite, plus l’indice d’invasion ainsi défini augmente. Pour des raisons pratiques de manipulation des SMC, nous n’avons pas encore analysé l’influence de la taille lorsque celle-ci est encore plus petite.

La figure 4.9B présente l’influence de la valeur de la compression sur l’invasion, le rayon initial de ceux-ci étant fixé à 250 μm . Il ressort de cette analyse que l’indice d’invasion dépend de la valeur de la pression appliquée. L’invasion augmente lorsque nous augmentons la pression. Avec les valeurs que nous avons, nous remarquons que l’invasion présente un maximum pour une valeur de 5 kPa. Pour des valeurs de compression supérieures à 5 kPa, il semblerait que l’indice d’invasion diminue. Notons que nous ne pouvons pas affirmer s’il s’agit réellement d’une diminution, ou plus d’une saturation.

.....

4.3 Conclusions et perspectives

Nous avons montré dans ce chapitre que des mouvements cellulaires internes et externes existent dans les SMC, et que ceux-ci peuvent être modulés par l’application d’une contrainte compressive. La division cellulaire entrainerait le mouvement de cellules à l’intérieur du tissu. Nous avons montré l’existence de deux types de flux cellulaires : un flux convergent, conséquence d’un excès de division au bord du sphéroïde et de mort au centre du sphéroïde. Un flux divergent se superpose à ce flux convergent lorsque le tissu est en croissance : la création de matière vient dans ce cas pousser les cellules vers le bord. Nous avons montré que l’application d’une contrainte compressive réduit fortement les flux convergent et divergent. Notons que la conservation du flux implique qu’un flux doit être opposé à ce flux cellulaire. Nous observons que le sphéroïde relargue des substances acides dans le milieu cellulaire. Le cœur nécrotique du sphéroïde étant acide (accumulation de lactate, de HIF), cette indication peut être un preuve du contre-flux.

Ce flux convergent peut être utile dans le cas de la délivrance de drogues. En effet, une

des difficultés dans le traitement par chimiothérapie est d'atteindre le centre de la tumeur. Il a été montré que les fortes contraintes compressives au centre d'une tumeur, ayant pour origine soit la croissance propre de la tumeur, soit l'action d'un stroma contenant notamment des myofibroblastes contractiles, a pour conséquence une fermeture des vaisseaux sanguins [12]. Ceci implique que la vascularisation de la tumeur est plus efficace au bord de cette dernière. Ce phénomène, créant une pression hydrostatique importante au centre des tumeurs, est en partie responsable de la mauvaise délivrance des drogues au sein de la tumeur. Ainsi, de plus en plus de thérapies essaient-elles de vectoriser leur drogues directement au sein de la tumeur, avant de déclencher leur effet. L'hyperthermie notamment utilise cette idée. Nous pensons que l'utilisation d'un flux cellulaire convergent au sein d'une tumeur peut être un bon moyen de guider vers le centre de la tumeur des particules, par les cellules elle-mêmes. Ces dernières seraient marquées à la bordure de la tumeur, et advecteraient les particules en son centre. D'autres types de traitements nécessitant une advection vers de le centre de la tumeur pourraient bénéficier de cet effet. Nous pouvons noter que la plupart des traitements anti-cancéreux utilisent des drogues anti-mitotiques, comme le taxol. Ces drogues ayant pour effet l'inhibition de la division cellulaire, elles bloquent le flux, ce qui les empêchent de pénétrer le centre de la tumeur. Ceci pourrait être une explication de la résistance aux drogues de certaines tumeurs.

Ces flux peuvent avoir une importance dans le cas de l'invasion de tissu environnant. Il est connu que les cellules peuvent migrer dans les directions de gradients de chimio-attractants [179]. Dans ce cas, les cellules du centre d'une tumeur, souffrant d'hypoxie, sont dans une région avec de pauvres concentrations de facteurs de croissance, et un pH plus acide que la moyenne dû à l'accumulation de lactate. Ces cellules peuvent être celles qui migrent en dehors de la tumeur. Il a été observé que les cellules peuvent migrer en direction des vaisseaux sanguins, suivant ainsi un gradient d'oxygène [170, 179]. L'existence d'un flux cellulaire peut apparaître comme une barrière à cette invasion. En effet, les cellules du centre de la tumeur voulant migrer vers son bord doivent se déplacer à contre-courant. Elles subissent dans ce cas la friction de la part des autres cellules advectées vers le centre de la tumeur. L'application d'une contrainte mécanique réduisant ce flux, la migration de cellules du centre de la tumeur vers le bord apparaît donc comme simplifiée.

Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus dans les chapitres précédents. L'application d'une contrainte mécanique réduit fortement le volume des cellules au centre d'un sphéroïde, déclenchant ainsi un front anti-prolifératif allant du centre de la tumeur vers le bord. Les cellules arrêtent ainsi de proliférer, par une surexpression de $p27^{Kip1}$, dont le niveau de surexpression dépend de la contrainte appliquée. Ces cellules en quiescence ont donc une propension plus grande à migrer puisqu'elles ne se divisent pas. D'autre part, peut-être que la grande densité de cellules au centre du SMC implique une réduction de l'oxygène ou des facteurs de croissance accessible, augmentant la probabilité de migration des cellules en dehors du sphéroïde. La présence de $p27^{Kip1}$ peut également augmenter la création de protrusions, ce dernier pouvant aider à la migration cellulaire [91]. Enfin, l'application d'une contrainte mécanique diminuant fortement le flux convergent au centre de la tumeur, les cellules, pour toutes les raisons précédentes, auraient une probabilité bien augmentée de migrer en dehors du SMC. Rappelons que des sphéroïdes de BC52 et de HT29, soumis aux mêmes conditions, n'envahissent pas. Les HT29 tout comme les CT26, sont des cellules de carcinomes de colon, les secondes étant à un stade plus avancé que les premières. Nous pouvons postuler que bien que la réponse mécanique en terme de prolifération soit la même, le stade du cancer et donc l'accumulation d'autres mutation est peut-être nécessaire pour acquérir ce phénotype invasif.

Perspectives

Une des premières pistes qui mériterait d'être explorée est l'utilisation du flux cellulaire à des fins de délivrance de drogues. Notons que les nanoparticules utilisées ont un cœur magnétique de maghémite. Nous pouvons utiliser ces particules pour faire de l'hyperthermie. Nous pourrions ainsi mener une étude permettant de mesurer la survie d'un SMC à de l'hyperthermie dont les cellules du bord auraient été marquées avec les NPs, à différents temps après le marquage. Nous pourrions observer si l'advection des NPs au centre augmenterait l'efficacité de ce type de traitement. Dans la même ligne, ces particules peuvent être fonctionnalisées avec de la bléomycine, drogue connue pour déclencher l'apoptose des cellules [174]. Sachant que nous pouvons moduler la vitesse du flux cellulaire par application d'une contrainte compressive, nous pourrions mesurer l'effet de l'advection d'une telle drogue sur la survie du SMC. Enfin, et ceci est donné à titre plus anecdotique, nous pourrions tirer parti du flux cellulaire afin de distinguer les cellules du bord des cellules du centre du sphéroïde. Connaissant théoriquement la vitesse de propagation du front de cellules périphériques au sein du sphéroïde, nous pouvons connaître théoriquement la position des cellules marquées par les NPs. Nous pourrions dissocier totalement un SMC en ses cellules individuelles, et trier ces cellules selon que les NPs soient présentes ou pas. Les cellules ainsi récupérées sans les NPs correspondraient aux cellules du centre.

Sachant que les effets que nous observons démarrent du centre, nous pourrions imaginer l'expérience évolutive/adaptative suivante : nous appliquons une contrainte de 5 kPa à des SMC, et attendons 2-3 jours que les cellules du centre soient en quiescence par leur réduction de volume. Nous récupérons uniquement les cellules du centre, reformons des SMC à partir de ces cellules, et réappliquons une contrainte mécanique sur les SMC, etc. Nous pourrions ainsi observer l'adaptation de ces cellules aux contraintes mécaniques. Comment évolueraient les cellules selon cette *pression évolutive* ? Se diviseraient-elles en des tailles de plus en plus petites ? Répondraient-elles de moins en moins ? Envahiraient-elles de plus en plus ?

Enfin, il serait intéressant de relier les expériences d'invasion à celles de flux cellulaire. Ceci amène à la question de savoir d'où les cellules envahissent dans un sphéroïde. Ces cellules viennent-elles du bord ou du centre, où la quiescence est majoritaire ? Une manière de répondre à cette question serait d'utiliser le même marquage des cellules que lors de l'expérience de flux. Nous pourrions marquer les sphéroïdes au bord, et attendre une semaine que la plupart des cellules marquées aient été advectées au centre du sphéroïde. Nous pourrions ensuite inclure ces SMC dans le gel de collagène I et appliquer une contrainte compressive. L'analyse histologique des SMC pourrait nous révéler d'où viennent les cellules envahissantes. Dans la même lignée, des marquages et analyses plus poussées de coupes de SMC devraient permettre d'analyser plus précisément les protrusions.

Enfin, il apparaît évident que l'étude doit aussi être menée sur des SMC plus petits. Nous pourrions également mesurer cet effet sur différents mutants, comme des mutants sur Arp2/3, protéine assurant la stabilité de fagots d'actines dans les protrusions.

Mesure de force développée par un tissu

Un des points de départ de cette thèse est la compétition mécanique pouvant exister entre tissus. Nous avons étudié dans tous les chapitres précédents l'influence de contraintes mécaniques constantes sur le volume de tissus tumoraux. Nous allons dans ce dernier chapitre discuter de la mesure de contraintes mécaniques développées par un tissu à volume constant.

L'utilisation de la microfluidique comme approche nous a apparu être la meilleure option. Le développement d'un dispositif a été long, et a fait l'objet entre autres du Post Doctorat de Fabien Montel, et des stages de Louis Pasquier de Franlieu et d'Alexis Chambost. Nous présentons les développements effectués en fonction des contraintes observées, et les deux dernières versions du dispositif microfluidique. Nous remercions Laurent Malaquin, Guillaume Mottet et Vélain Taniga pour leur aide et leurs conseils apportés tout au long de ces développements.

.....

5.1 État de l'art

Très peu d'études ont été menées sur la mesure de contrainte mécaniques développées par un tissu biologique. Nous présentons les deux seules à notre connaissance.

La première étude est celle réalisée par le groupe de Jain en 1997, dans laquelle des cellules sont incluses dans des gels d'agarose de différentes rigidités (cf chapitre introductif) [111]. Dans ces expériences, les cellules se divisent localement et n'ont d'autre choix que de s'agréger. Le tissu ainsi formé exerce une contrainte contre le gel de rigidité constante et le déforme. L'équilibre des forces implique que la contrainte que ressent ce tissu en croissance est égale à la contrainte qu'il exerce lui-même : c'est ce que le groupe de Jain appelle la contrainte mécanique induite par la croissance (*growth induced mechanical stress*). À un état stationnaire, la contrainte qu'il ressent est la contrainte maximale qu'il peut développer. En mesurant la déformation du gel environnant, ils ont pu remonter à une estimation de cette contrainte maximale, qui est de l'ordre de 10 kPa, et semble indépendante de la rigidité du gel. Ces expériences pionnières ont néanmoins quelques désavantages :

1. La relation entre la contrainte et la déformation n'est pas nécessairement élastique et peut avoir une forme non linéaire plus complexe.
2. Les barres d'erreur sont grandes, et les fluctuations sont associées à des fluctuations dans la préparation du gel et dans les tailles des sphéroïdes formés : y a-t-il une influence du volume des sphéroïdes sur la contrainte maximale développée ?
3. La géométrie du système n'est pas maîtrisée. Notamment, ils observent la formation de craques dans l'agarose ; les sphéroïdes relaxent dans ces cassures et prennent une forme oblongue [112]. Ce résultat indique également que la relation entre contrainte et déformation n'est pas simple.
4. Enfin, la croissance de ces sphéroïdes se fait à rigidité constante. Ceci implique que la contrainte et la déformation augmentent avec leur taille : volume et contrainte sont donc

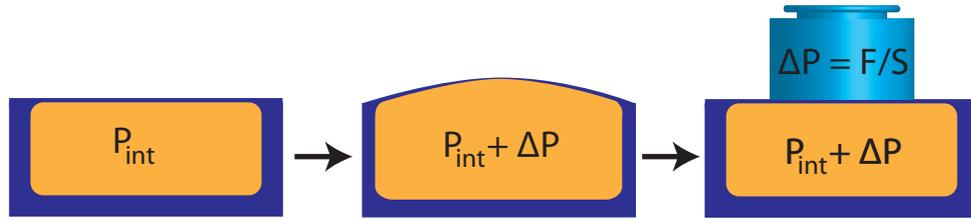


FIGURE 5.1 – Schéma de principe de la mesure à volume constant de contrainte développée par un tissu. Un tissu est enfermé dans une boîte rigide, avec une des parois déformables ; le tissu développe une contrainte P_{int} . Sa propre croissance augmente la contrainte qu'il développe : le tissu déforme la chambre avec une contrainte supplémentaire ΔP . Nous appliquons une force permettant de redonner à la chambre sa géométrie initiale : l'équilibre des forces est alors rétabli, et la contrainte imposée pour rétablir la géométrie est directement égale à la contrainte développée par le tissu.

couplés dans ces expériences.

Les trois premiers points ont récemment été améliorés dans les expériences menées par le groupe de Pierre Nassoy [180]. Leur approche est d'encapsuler des cellules dans des coques sphériques d'alginate, dont la taille et l'épaisseur sont bien contrôlées. Lorsque les cellules agrégées dans cette coque touchent le bord, elles vont croître dans des conditions similaires à celles des expériences de Jain, mais dans une géométrie contrôlée et reproductible. La rhéologie de tels objets est bien connue, et les coques étant calibrées, ils peuvent en déduire la contrainte développée par le tissu.

Il reste à savoir si un SMC répond de la même manière lorsqu'il pousse à rigidité, contrainte, ou volume constant. Dans ce chapitre, nous voulons mesurer la contrainte développée par un tissu en croissance en travaillant à volume constant.

.....

5.2 Version 1 : membrane horizontale

La microfluidique permet de créer des dispositifs avec des géométrie parfaitement déterminées et reproductibles. Ces dispositifs (puces, dans le langage microfluidique) sont fabriquées à partir de polydiméthylsiloxane, ou PDMS, qui en présence d'agent réticulant forment des gels dont la rigidité, autour de 300 kPa, dépend de la concentration en agent réticulant. La concentration classique est de 10% en masse de PDMS. Ce matériau, est adapté à la culture d'objets biologiques puisqu'il est perméable aux gaz. Le coefficient de diffusion de l'oxygène est tel qu'il faut quelques heures pour remplacer ce dernier dans une puce [181]. Ce matériau peut être précisément moulé, et collé à lui-même lors d'une activation par un plasma à oxygène, qui crée des radicaux libres en surface du PDMS pouvant interagir avec d'autres surfaces activées. C'est comme ceci que les puces que nous avons fabriqué ont été assemblées (cf Annexe Protocoles). Les pressions hydrostatiques appliquées dans les différentes parties des puces sont imposées grâce à un contrôleur de pression.

Mesure de la force Pour travailler à volume constant, supposons que nous pouvons enfermer le tissu dans une boîte avec des murs infiniment rigides. Afin de mesurer la contrainte développée par ce tissu, un des côtés de la boîte est constituée d'une mince paroi déformable. La figure 5.1 présente un schéma de cette mesure.

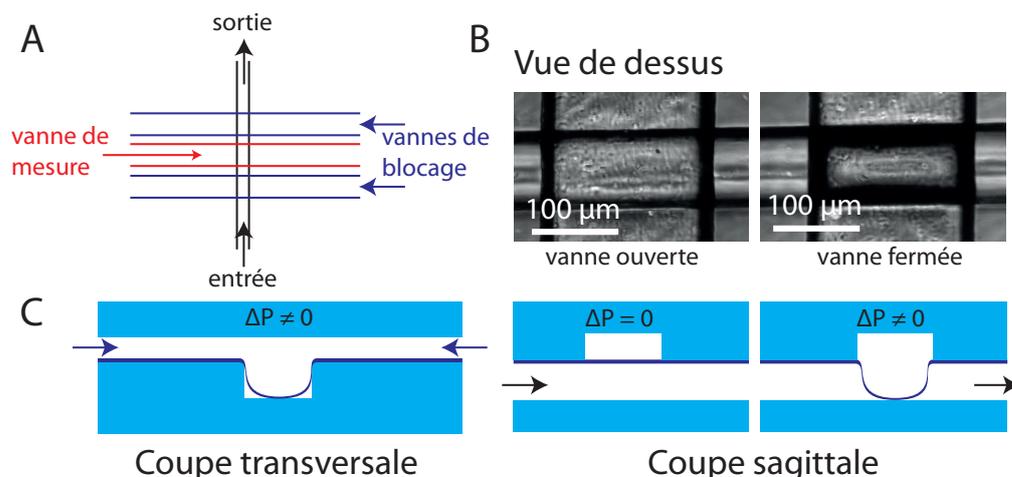


FIGURE 5.2 – Schéma du dispositif microfluidique permettant la mesure de la contrainte développée par un tissu. A : vue de dessus du dispositif, qui est constitué de 3 vannes parallèles, séparées d'un canal orthogonal par une membrane de $10 \mu\text{m}$. Le canal sert à apporter le tissu, tandis que les deux vannes externes servent à le bloquer, la vanne centrale servant à la mesure de la contrainte développée comme expliqué dans le paragraphe précédent. B : photographie de deux vannes, l'une ouverte, l'autre fermée. C : schéma montrant la fermeture des vannes, en coupes transversale et sagittale. La membrane de $10 \mu\text{m}$ de PDMS est en bleu plus foncé pour la distinguer du reste.

À mesure que le tissu enfermé dans la boîte se développe, la contrainte qu'il exerce sur la boîte augmente. Le tissu déforme préférentiellement la paroi la plus mince. La déformation de la paroi peut-être mesurée, et une pression peut-être appliquée sur cette paroi afin de rendre à la boîte la géométrie qu'elle avait avant la déformation. Dans ce cas, la contrainte développée par le tissu peut être mesurée et compensée à tout instant, et le tissu se développe à volume constant.

Chambre avec paroi déformable En microfluidique, les chambres avec des parois déformables sous pression sont très utilisées. De telles parois sont appelées vannes de Quake. Elles consistent en de fines membranes de PDMS (de l'ordre de $10 \mu\text{m}$), collées sur des morceaux de PDMS, comme indiqué sur la figure 5.2C. Lorsqu'une contrainte hydrostatique est appliquée, cette vanne se déforme. Elle peut ainsi fermer un canal. Nous allons nous servir de ces vannes de deux manières différentes : soit pour bloquer un canal, soit pour mesurer la contrainte développée par un tissu.

La géométrie sur laquelle nous avons travaillé est présentée sur la figure 5.2A. La puce est constituée d'un assemblage de deux parties en PDMS. Le bas comprend un canal, dans lequel nous pouvons faire entrer un sphéroïde. Le haut est constitué de 3 canaux parallèles, fermés et séparés du bas par une membrane de $10 \mu\text{m}$ de PDMS, afin de former 3 vannes de Quake. Ces deux parties sont assemblées pour former la puce. L'application d'une surpression de 1 bar permet de fermer une vanne, comme indiqué sur la photo de la figure 5.2B et sur le schéma de la figure 5.2C. Ainsi l'approche est-elle de bloquer un sphéroïde entre les deux vannes externes, afin de créer une chambre de culture pour ce tissu. La vanne restant au milieu doit servir à mesurer la

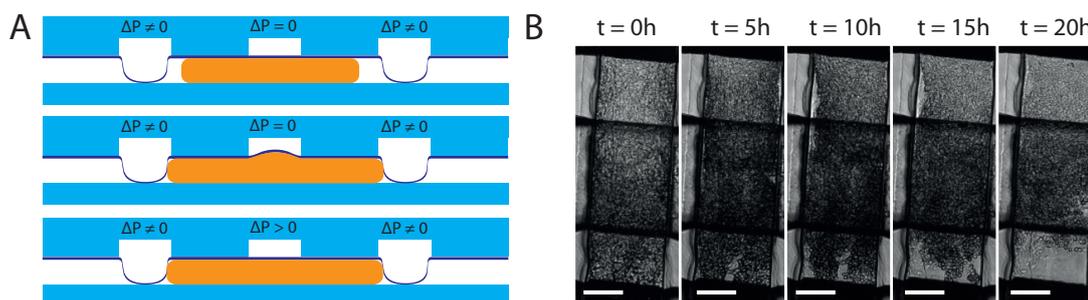


FIGURE 5.3 – Résultats de la croissance avec ce design. A : principe de l'expérience, B : évolution dans le temps d'un sphéroïde bloqué dans la puce. Échelle = 100 μm .

contrainte développée par le tissu de la chambre de culture, comme présenté dans le paragraphe précédent (cf figure 5.3A).

Résultats du design - cahier des charges

Nous formons des sphéroïdes de petite taille afin de les faire entrer dans la puce. J'ai développé une interface me permettant de changer les pressions grâce à un joystick, ce qui permet de pouvoir à la fois observer ce qu'il se passe et contrôler la pression. Lorsqu'un SMC arrive à l'entrée du canal, il est progressivement déformé à mesure que la pression imposée augmente, puis pénètre dans le canal. Nous fermons progressivement les deux vannes afin de créer une chambre de culture. La puce est placée dans une chambre d'incubation dont la température et le CO_2 sont contrôlés. Nous imageons le tissu dans cette chambre.

La figure 5.3B présente des images prises toutes les 5h après le début de l'expérience. À notre grande surprise, le tissu meurt à l'intérieur de cette chambre. Nous pensons que la cause première de cette mort est l'absence d'un renouvellement suffisant en facteurs essentiels. Le fait que l'oxygène diffuse à travers le PDMS nous permet de supposer que ces facteurs limitants se trouvent dans le milieu cellulaire. Afin de nourrir le tissu, nous comptons sur le fait que les vannes ne ferment pas totalement le canal. Ainsi, en laissant une différence de pression entre l'entrée et la sortie, un flux de milieu cellulaire devrait-il nourrir le tissu. Nous pensons que la croissance du tissu augmente la résistance hydraulique à l'intérieur du canal. Afin de maintenir un flux suffisant de milieu cellulaire, il faudrait augmenter la différence de pression. L'inconvénient d'une telle manipulation est le risque que le SMC passe sous une des vannes de blocage.

Il apparaît donc qu'un point crucial que nous avons négligé est le remplacement du milieu cellulaire. Pour y remédier, nous avons essayé plusieurs choses :

1. Nous avons essayé l'assemblage de la puce sur de l'agarose. Ceci aurait permis de nourrir le tissu par diffusion du milieu à travers l'agarose.
2. Nous avons également essayé de complexifier le design existant. Nous avons rajouté un canal orthogonal au canal où le tissu est présent, et situé sous ce dernier. Les deux canaux sont séparés par une membrane laissant diffuser la nourriture. Ce design fonctionne mais est très compliqué à mettre en œuvre, car cette puce est composée de deux matériaux différents (un plastique et le PDMS), et comprend 5 étages à lieu de 3, soit autant de difficultés à l'alignement. Elle est de plus délicate à utiliser de part le grand nombre d'entrées et de sorties qu'elle possède.

Nous avons donc repensé le design, en incluant les prérequis suivants :

1. Il faut que celui-ci possède une fine membrane permettant la mesure de la contrainte développée par le tissu.
2. Il faut que celui-ci puisse permettre un renouvellement du milieu en perturbant le moins possible le tissu emprisonné.

.....

5.3 Version 2 : membrane verticale

Design de la puce Après près de 5 ans de travaux menés à la recherche d'un design permettant ce genre de mesures, nous sommes arrivés au design présenté sur la figure 5.4A. Cette puce, symétrique, comprend deux parties : une partie supérieure avec deux vannes de Quake, et une partie inférieure avec une membrane verticale séparant deux chambres de culture.

Un sphéroïde est apporté par le long canal droit de 300 μm jusqu'à la membrane verticale. La vanne de Quake de la partie supérieure est mise sous une surpression de 1 bar pour créer une chambre de culture, comme indiqué sur la photo de la figure 5.4B. Grâce à des hauteurs d'extrusion différentes sur le moule de la puce, des canaux étroits de 4 μm peuvent permettre l'alimentation du tissu. Cette hauteur est suffisamment petite pour empêcher les cellules de la traverser. Une surpression est ainsi appliquée par les côtés, et le milieu flux par le canal d'entrée du tissu.

Nous poussons un sphéroïde à l'intérieur du canal droit. Il est bloqué au niveau de la membrane verticale, et nous fermons la vanne de blocage, afin de créer une chambre de culture. À mesure que le tissu se développe, il déforme la membrane verticale. Une pression peut être appliquée de l'autre côté afin de garder le volume de la chambre constant (figure 5.4C).

Nous avons voulu cette puce symétrique car elle permet de créer deux chambres de cultures en regard, séparées par une membrane imperméable déformable. Cette propriété nous permettra d'étudier la compétition tissulaire d'un point de vue purement mécanique. Nous discuterons de ce point dans les conclusions et perspectives de ce chapitre.

**Déformation de la membrane -
définition d'un score**

La membrane du milieu est plus épaisse que dans la version précédente de la puce (30 μm contre 10 μm), mais reste néanmoins encore très déformable. Les photos de la figure 5.5A montrent la membrane déformée par des surpressions de 5, 15 et 40 kPa. Plus la valeur de la surpression est importante, et plus la variation de la déformation diminue.

Nous avons tracé sur la figure 5.5B la déformation de la membrane en fonction de la surpression appliquée. Nous nous apercevons que la déformation augmente en fonction de cette surpression, mais pas de manière linéaire. En considérant une membrane circulaire élastique fine (épaisseur très petite devant sa dimension), soumise à une surpression ΔP , nous pouvons relier la déformation à la flèche à la valeur de la surpression (détail du calcul en Annexe) :

$$h = \left(\frac{1}{16} \frac{r^4}{e E} \right)^{1/3} \Delta P^{1/3}$$

expression dans laquelle E représente le module d'Young, e l'épaisseur de la membrane et r son rayon. La membrane de ce design est rectangulaire et non circulaire. Le changement de géométrie doit affecter le pré-facteur mais pas la dépendance en pression. Nous avons ajusté les points expérimentaux avec une fonction du type $h = a\Delta P^{1/3}$. Le résultat est donné sur la figure 5.5B, et nous pouvons voir qu'il est en bon accord avec les données. Nous remarquons dans ce modèle que les dépendances de l'épaisseur de la membrane et du module d'Young sont assez faibles par rapport à la dépendance de la taille de la membrane.

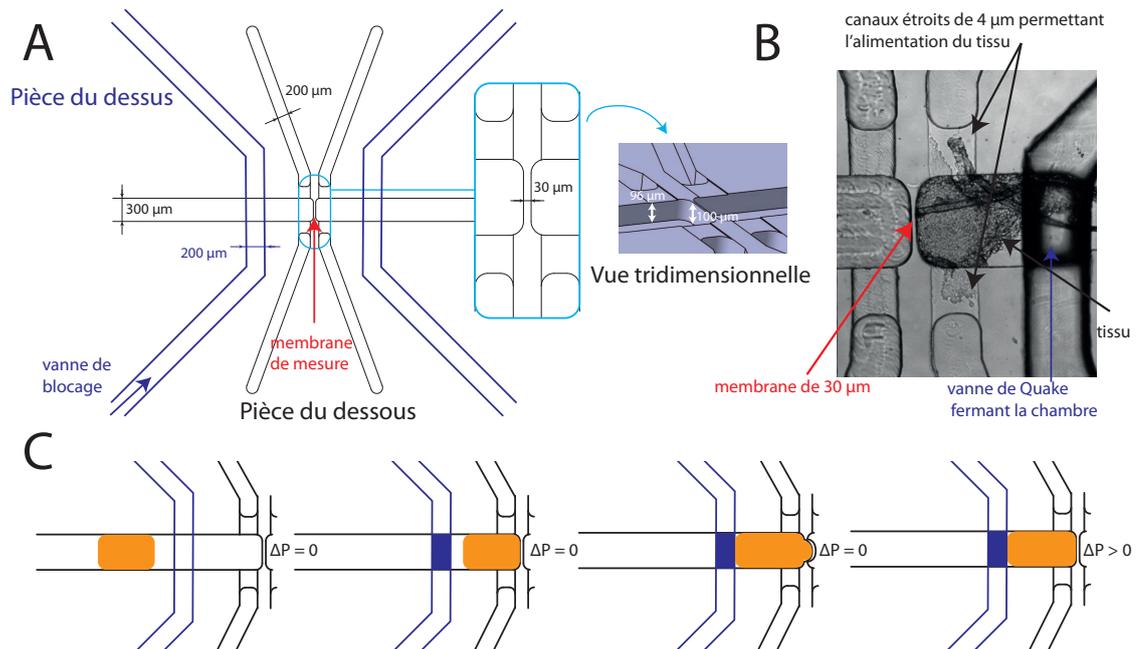


FIGURE 5.4 – Schéma de la puce microfluidique. A : Elle est constituée de deux parties : une partie haute, comprenant deux vannes de Quake, et une partie basse pouvant créer deux chambres de culture. Sur la partie basse, l'extrusion est réalisée à deux niveaux : la puce est extrudée sur son ensemble à $100\ \mu\text{m}$, mais les parties fermant la chambre sont extrudées à $96\ \mu\text{m}$, créant ainsi des espaces de $4\ \mu\text{m}$, dans lesquels les cellules ont du mal à passer. Ces espaces permettent l'alimentation du tissu. B : photo d'un tissu dans la chambre de culture ainsi formée. C : Schéma de fonctionnement de la puce. Un sphéroïde est poussé dans la puce et est bloqué au niveau de la membrane verticale. La vanne de blocage ferme la puce pour créer une chambre de culture. Si le tissu déforme la membrane verticale, une pression est appliquée pour lui rendre sa forme.

Enfin, nous avons défini un score de la déformation de la membrane de la manière suivante : une région d'intérêt rectangulaire est définie encadrant la membrane en son centre et la partie de la puce où elle va être déformée (rectangle rouge sur la photo de la figure 5.5A). Nous prenons pour score le maximum de la corrélation entre la région d'intérêt où la membrane n'est pas déformée (référence) et la région d'intérêt où la membrane est déformée par l'action d'une pression. Ce score est normalisé à sa plus haute valeur (celle où il n'y a pas de déformation). Nous avons tracé ce score pour différents cas sur la figure 5.5C. Nous observons que pour du PDMS classique (10 % en agent réticulant, \circ), le score diminue avec la surpression appliquée. Nous avons également calculé ce score dans une région où il n'y avait pas la membrane (\square), pour mesurer la sensibilité de ce dernier. Nous remarquons donc que dans ce cas, la mesure du score est sensible à des déformations de $2,5\ \text{kPa}$. Si nous considérons que le tissu développera une contrainte de l'ordre de $10\ \text{kPa}$, le score n'est pas assez sensible. Pour augmenter la sensibilité, nous avons polymérisé une goutte de PDMS au niveau de la membrane avec une concentration en agent réticulant plus faible (5 % en agent réticulant), et qui possède ainsi une plus petite rigidité. Le reste de la puce est polymérisé à 10 % en agent réticulant. Nous nous apercevons dans ce cas (\triangle) que le score est beaucoup plus sensible à la déformation de la membrane, et que la sensibilité limite passe de 2.5

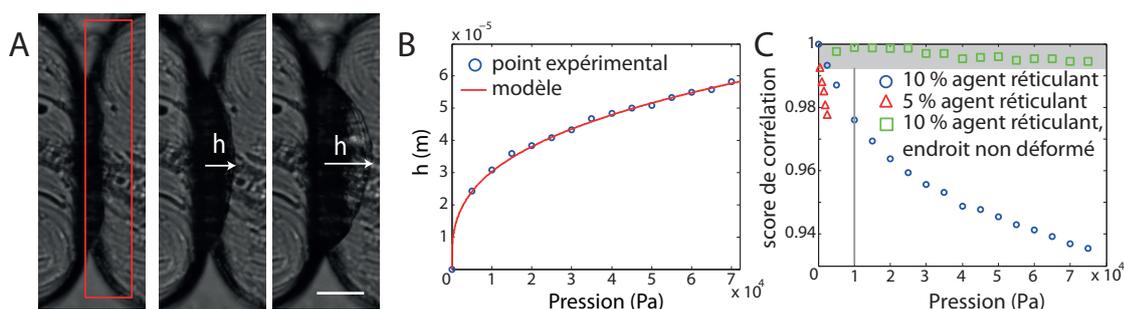


FIGURE 5.5 – Déformation de la membrane et mesure d’un score de corrélation. A : Images de la membrane pour des surpressions de 5, 15 et 40 kPa. Rectangle rouge : région d’intérêt choisie pour le calcul du score de déformation de la membrane. Échelle : $45 \mu\text{m}$. B : déformation de la membrane h en fonction de la surpression appliquée (\circ), et modèle ajusté sur les données (ligne pleine). C : Score de la déformation de la membrane en fonction de la surpression appliquée, pour une membrane en PDMS à 10 % d’agent réticulant (classique, \circ), pour une membrane à 5 % d’agent réticulant (\triangle) et calculé dans une zone où il ne doit pas y avoir de variation, à part les éventuelles dérives du système (\square). Le score est normalisé par sa plus haute valeur. La zone grisée représente la limite de détection, et la ligne droite la valeur de la surpression de 10 kPa.

kPa à 500 Pa, soit un gain d’un facteur 5. Si besoin, nous pouvons encore diminuer la rigidité de la membrane pour augmenter la sensibilité.

Viabilité d’un tissu Nous avons enfermé un tissu dans la puce, et observé son évolution dans le temps (figure 5.6A). Nous remarquons que dès l’instant initial, des cellules semblent être bloquées dans les canaux servant à l’alimentation du tissu. Cela provient peut-être de l’adressage du sphéroïde dans le canal, qui se fait avec une forte surpression (≥ 30 kPa) afin de le pousser jusqu’au bout. Nous remarquons que contrairement à la version précédente de la puce, 10 h après le tissu est en vie et les cellules se divisent : il a rempli la chambre. La membrane est d’ailleurs légèrement déformée. À 20h, la chambre est remplie, et des cellules commencent à s’échapper par les côtés.

La figure 5.6B montre le score de déformation de la membrane tracé en fonction du temps, à partir de 10h. Nous remarquons que le champ est stable (\square) mais que la membrane semble continuer de se déformer (\circ). Ces déformations sont faibles, mais peuvent être observées par le score d’autocorrélation. Nous pouvons conclure que non seulement un tissu est viable, mais qu’en plus il développe une force et déforme la membrane.

• • • • •

5.4 Conclusions et perspectives

Nous avons présenté dans ce chapitre les principales évolutions qui nous ont amené à la création du design de puce microfluidique présenté. Les pré-requis pour mesurer la contrainte développée par un tissu à volume constant sont remplis. Une membrane verticale est en contact avec un tissu enfermé dans une chambre, et nourri par les extrémités. Nous avons vu que non seulement un tissu enfermé peut vivre et se développer dans ce dispositif, il peut également développer une force suffisante pour déformer la membrane.

De tous nos travaux, la conclusion est qu’il semble que l’alimentation du tissu soit la partie la plus délicate. Le design utilisé emploie des canaux transversaux de petite taille dans lesquels

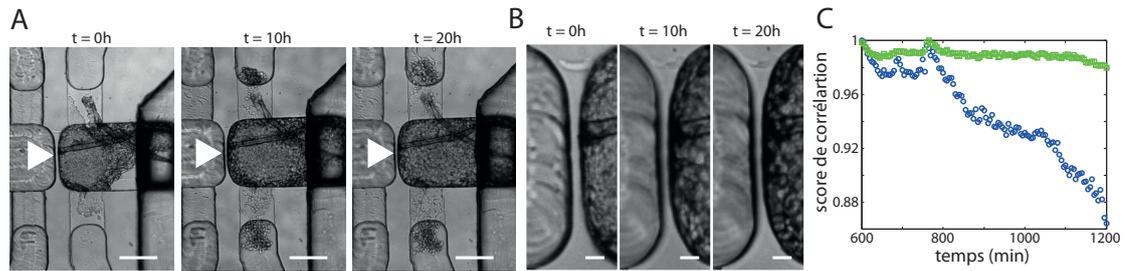


FIGURE 5.6 – Viabilité d'un tissu dans la puce. A : croissance d'un tissu dans la puce, avec l'instant initial et 10h et 20h après. Échelle : $200\mu\text{m}$. La flèche blanche indique la membrane. B : zoom sur la membrane, échelle $50\mu\text{m}$. C : score de déformation de la membrane entre 10h et 20h après le début de l'expérience ; \circ : membrane, \square : endroit stable du champ.

les cellules ne sont pas censées passer. Ce n'est pas le cas, mais nous pourrions imaginer soit de faire des canaux plus étroits encore, soit de fermer la chambre où il y a le tissu à l'aide d'un gel photopolymérisable, comme le PEGDA par exemple.

Ces travaux, encore très prospectifs, nous montrent à quel point la mesure de force développée par des tissus est difficile et encore loin d'être aboutie.

Perspectives

La microfluidique est un outil très versatile et dynamique, car nous pouvons changer de pression rapidement. La géométrie est très bien contrôlée, et nous pouvons, en travaillant avec des chambres de petites tailles, étudier l'influence de paramètres non accessibles comme les taux de prolifération de surface. De plus, nous pouvons travailler avec des tissus minces, et pouvons utiliser de la microscopie en direct.

Dans un premier temps, nous devons mesurer la pression maximale développée par un tissu en croissance. Nous pourrions comparer cette pression entre lignées, mais aussi à la pression de 5 kPa observée chez les CT26, pression correspondant à la valeur à laquelle l'effet sur la croissance des sphéroïdes sature. Enfin, nous pouvons facilement changer le volume de la chambre, et donc le volume du tissu, et mesurer l'impact de celui-ci sur la pression développée par le tissu.

Cette puce nous permet également de travailler à pression appliquée constante, en appuyant directement sur la membrane avec une pression hydrostatique. Nous pourrions mesurer le taux de croissance du tissu dans la chambre et tenter de retrouver les mêmes dépendances que dans les chapitres précédents. De plus, en créant de toutes petites chambres, nous pourrions faire en sorte de ne pas avoir d'apoptose au centre des tissus. Nous pourrions donc travailler uniquement avec l'effet de surface, et voir la dépendance de cet incrément de prolifération en surface en fonction de la contrainte appliquée.

Comme nous l'avons mentionné, cette puce microfluidique est symétrique. Nous avons donc deux chambres en regard, séparées par une membrane imperméable à tout échange chimique, mais déformable. L'idée serait de faire de la compétition tissulaire avec pour seul ingrédient la mécanique. Nous pouvons prédire que dans ce cas, la compétition serait guidée par un équilibre entre la propension qu'aurait un tissu à ressentir un contrainte appliquée, et la contrainte qu'il peut lui-même développer.

Enfin, nous pourrions utiliser cette puce pour tester certaines hypothèses que nous avons sur l'influence de la contrainte mécanique sur l'invasion. Nous pourrions enfermer le tissu en le bloquant par un gel de collagène et travailler à volume constant. Nous avons remarqué qu'il semblerait que l'invasion augmente avec la pression appliquée. Or, si le tissu travaille à volume constant, la pression dans la chambre augmente à mesure que celui-ci croît. Existe-t-il une pression seuil déclenchant l'invasion ? Comment évoluerait la pression développée par le tissu dans le cas où celui-ci peut envahir ?

Discussion et Conclusions générales

.....

Discussion

Nous avons commencé cette thèse en évoquant le dialogue biochimique fort existant entre une tumeur et son micro environnement, et en nous demandant s'il ne pouvait pas exister un dialogue mécanique qui, couplé au dialogue biochimique, guiderait, ou restreindrait, la progression tumorale.

À l'aide d'une approche *in vitro*, nous avons travaillé à environnement biochimique constant, le plus simple possible, en éliminant toutes les interactions qu'une tumeur pourrait avoir avec les cellules composant son micro environnement. La tumeur est modélisée par des sphéroïdes multicellulaires, petites boules de cellules représentant la tumeur avascularisée, avant l'activation du stroma. Seule la contrainte mécanique constante est imposée. Le premier constat que nous avons fait est que la contrainte mécanique diminue le taux de croissance de ces sphéroïdes. Cette observation, effectuée sur de nombreux types cellulaires, allant de cellules formant des tumeurs de cancer du sein, du système nerveux, de sarcomes, à deux types cellulaires de cancer de colon à différents stades, montre qu'elle est valable sur plusieurs types et stades de cancers. Elle suggère fortement que le mécanisme la contrôlant ne doit pas être affectée lors de la transformation de cellule saine en cellule tumorale.

Lors du contrôle mécanique de la croissance de sphéroïdes, nous nous sommes aperçu que le point de restriction est activé. L'action de la CDK 2 assurant le passage de G1 à S est inhibée par la surexpression d'une protéine inhibitrice de prolifération, p27^{Kip1}. La contrainte mécanique comprime rapidement la cellule, sur des temps typiquement inférieurs à ceux de la synthèse protéique. Cette compression peut être à l'origine d'un front anti-prolifératif dans les sphéroïdes, bloquant la prolifération cellulaire au niveau du point de restriction, et engageant ces cellules vers la quiescence, 2-3 jours après l'application de la contrainte. Il est à noter que pendant cette phase, nous n'observons pas d'augmentation de l'apoptose, mais que celle-ci semble augmenter 4-5 jours après l'application de la contrainte, principalement dans le centre du sphéroïde.

Ceci nous amène à nous questionner sur la notion même de point de contrôle : l'activation d'un point de contrôle a-t-il pour but l'arrêt dans le cycle cellulaire, ou bien l'engagement de l'apoptose ? Comme nous l'avons vu en introduction, p53 peut amener et à un arrêt dans le cycle, et à l'apoptose. L'apoptose peut être inhibée si l'arrêt du cycle donne les résultats escomptés en terme de réparation de l'ADN, sinon l'apoptose prend le dessus. Dans notre cas, il semblerait que la cellule se mette dans un premier temps en quiescence, pour ensuite entrer en apoptose. Si tel est le cas, quel est alors la cause de l'entrée en quiescence, ce problème que la cellule tente de réparer ? Cette question revient en quelque sorte à nous demander la fonction qu'aurait la voie de mise en quiescence suite à la compression d'une cellule.

Le point de restriction est connu pour être, dans de nombreux organismes, un point de contrôle du volume des cellules. Cette condition volumique existe chez les algues, les levures, les bactéries

ou encore les xénopes [147]. Chez les cellules mammifères, bien que cette condition au niveau du point de restriction fasse encore débattre, il est presque clair que pour passer G1, la cellule doit posséder un volume supérieur à un certain volume seuil [158].

La contrainte mécanique que nous appliquons réduit le volume des cellules. La densité est augmentée fortement au centre, mais l'effet se propageant jusqu'au bord, ou la densité est bien moins réduite, nous excluons l'hypothèse que la quiescence soit induite par une réduction de l'accès aux facteurs essentiels contenu dans le milieu cellulaire. Nous avons par ailleurs vérifié que la diffusion de facteurs de croissance ne semblait pas être modifiée par la contrainte mécanique. Néanmoins, le volume est réduit. Pour passer le point de restriction, une cellule doit augmenter son volume jusqu'à un certain volume seuil. Étant comprimée, cela représente un travail, donc un coût énergétique $P_{\text{centre}} * \delta V$ supplémentaire. Puisque nous travaillons à environnement biochimique constant, les cellules n'ont pas accès dans ces conditions à cette quantité supplémentaire. Nous pouvons alors nous demander si la cause de cet arrêt au point de restriction n'est peut-être pas une tentative de surpasser ce manque énergétique.

L'autophagie consiste en la dégradation et le recyclage d'organelles ou autres complexes protéiques. Elle a une fonction homéostatique, et aide à l'augmentation de la survie de la cellule [182]. Par le catabolisme de macromolécules, les nécessités énergétiques peuvent être rencontrées grâce aux substrats générés par autophagie, permettant ainsi une synthèse adaptée des protéines [183]. Si la cellule ne parvient toujours pas à remplir les conditions, elle finira par mourir. Dans le cas de l'autophagie, la cellule peut d'ailleurs se suicider en activant les caspases. Ainsi, la détection de l'apoptose telle que nous l'avons faite est incomplète car nous n'avons que la fin de l'histoire : peut-être n'est ce pas de l'apoptose, mais de l'autophagie. Il a par ailleurs été montré un lien très fort entre l'autophagie et l'affamement. Via des facteurs sensibles à l'énergie, la cellule active p27^{Kip1} afin d'assurer l'arrêt du cycle cellulaire, s'ensuivant une activation de l'autophagie [184].

Si tel est le cas, l'activation de protéines classiques durant l'autophagie devrait être observée. Cette hypothèse expliquerait également la diminution de p27^{Kip1} observée au centre des sphéroïdes après la mise en quiescence. Si la cellule meurt, p27^{Kip1} n'est plus observé. Il a de plus été montré que la voie Hippo jouait un rôle durant la mort cellulaire, ce qui pourrait expliquer l'activation tardive (à partir de deux jours après l'établissement de la contrainte mécanique) de cette voie [155].

Nous avons par la suite montré que la prolifération cellulaire pouvait induire un flux cellulaire, les cellules du bord se déplaçant par une pression due à la division cellulaire, et les cellules disparaissant au centre par apoptose. Ceci assure un renouvellement continu des cellules au bord. Sans parler de fonction de ce flux, nous pouvons noter que dans ces conditions, les cellules du bord sont constamment nouvelles. Or, la tumeur acquière au fur et à mesure de l'évolution de la maladie des mutations génétiques lui assurant de nouvelles fonctions - dégradation de la membrane basale, phénotype plus migratoire notamment. Ces mutations sont acquises par des cycles de division sans contrôle de qualité de l'ADN. Le flux cellulaire implique en quelque sorte que les cellules du bord de la tumeur sont toujours les plus neuves en terme d'adaptation. Nous avons montré que l'application d'une contrainte mécanique, réduisant la prolifération cellulaire, réduit également ce flux cellulaire, ralentissant en quelque sorte l'exploration de l'espace génétique par la tumeur.

Enfin, nous avons montré que des sphéroïdes de CT26 sous contraintes mécaniques, lorsqu'ils sont inclus dans des gels de collagène, présentent un phénotype invasif. Une observation qui nous avait surpris est que des sphéroïdes de BC52 et de HT29 n'avaient pas ce phénotype invasif dans les mêmes conditions. Les cellules de CT26 sont des cellules de carcinomes de colons murin, à un stade plus avancé que les cellules de HT29, cellules de carcinomes de colon humain. Pourtant, lors des expériences de croissance, les deux types cellulaires répondent de la même manière par

un arrêt de la prolifération, suggérant que cet arrêt n'est pas, quant à lui, dépendant du stade.

Il apparaît donc que la contrainte mécanique peut être bénéfique pour le contrôle de la croissance des tumeurs en diminuant la prolifération, mais aussi négative dans la progression de la maladie en déclenchant un phénotype invasif, mais que ces réponses diffèrent selon le stade du cancer. Quelles seraient les origines et conséquences de contraintes mécaniques ressenties par une tumeur *in vivo* ?

En réponse à l'hypoxie, une tumeur active son stroma, et active entre autre la transformation des fibroblastes en myofibroblastes. Lors du processus de cicatrisation de blessures, des fibroblastes sont activés et entourent la blessure, représentant la génération de force contractile la plus importante [185]. La réponse inflammatoire observée par l'activation du stroma dans le cas du cancer est de même type, et nous pouvons imaginer que les myofibroblastes contractent la tumeur, comme le groupe de Jain semble l'avoir observé [12]. C'est ce genre de réponse qui amène à la définition du cancer par certains groupes comme "une blessure qui ne guérit jamais" (*a wound that never heals*) [186]. De plus, la contrainte mécanique peut également apparaître *in vivo* de la propre croissance de la tumeur [12].

En plus d'un dialogue biochimique existant entre la tumeur et son micro environnement, la tumeur peut répondre aux sollicitations mécaniques, et peut elle-même créer ces sollicitations mécaniques. Les micro tumeurs sont très nombreuses dans le corps humain, et seulement très peu dégénèrent, suggérant un rôle de contrôle fort du micro environnement. Une des premières réponses du stroma suite à son activation biochimique pourrait être mécanique : les myofibroblastes, plus contractiles, entourent et compriment la tumeur. Ceci aurait pour effet de contrôler mécaniquement la croissance des tumeurs, et de l'inhiber. De cette manière, le flux cellulaire est réduit, l'apparition de nouvelles mutations à la périphérie également, et la micro tumeur semble être contrôlée dans un équilibre biochimique et mécanique. L'équilibre d'un tel contrôle dépend donc de la capacité d'une tumeur à s'adapter et à rendre son environnement permissif, en regard du contrôle que le stroma peut avoir. Si par exemple l'angiogénèse prend le dessus, la croissance de la tumeur peut reprendre, celle-ci ayant un accès plus grand aux facteurs essentiels, et trouvant le moyen de générer plus de force, outrepassant la contrainte appliquée par les myofibroblastes. Dans ce cas, la tumeur peut également poursuivre son exploration de l'espace génétique, et éventuellement accumuler les mutations nécessaires à l'invasion. Nous avons vu que dans le cas de sphéroïdes de CT26, l'invasion pouvait être activée par la contrainte mécanique car le stade du cancer semble le permettre. Il apparaît donc qu'en quelque sorte la tumeur se soit adaptée à cette contrainte mécanique : la réduction de prolifération et de flux cellulaire facilitent dans ce cas la sortie des cellules de la tumeur.

• • • • •

Conclusions générales

Pour résumé, nous avons développé une méthodologie nous permettant d'appliquer des contraintes compressives constantes sur des modèles de tumeurs *in vitro*. Les conclusions de ces travaux sont les suivantes :

1. Au niveau du tissu : une contrainte mécanique réduit fortement le taux de croissance des tumeurs *in vitro*. Ce résultat semble indépendant du type et du grade de la tumeur.
2. Au niveau cellulaire : une contrainte compressive réduit le volume des cellules, de manière hétérogène, les cellules du centre étant plus comprimées que les cellules du bord.
3. Au niveau moléculaire : cette réduction de volume semble activer une voie anti-proliférative, mettant la cellule en quiescence par une surexpression de p27^{Kip1}. Ce résultat également semble indépendant du type et du grade de la tumeur.

4. Les division et mort cellulaires impliquent un flux radial, qui est convergent au centre. Ce flux cellulaire est réduit lors de l'application d'une contrainte mécanique.
5. La compression déclenche l'invasion cellulaire pour des tumeurs in vitro formées de cellules issues de tumeurs à un grade plus avancé, mais pas pour des cellules issues de tumeurs moins invasives.

Les travaux menés dans cette thèse, in vitro, sur un modèle de tumeur simple et avec un dialogue biochimique absent, montrent un nouveau rôle des contraintes mécaniques dans la progression du cancer. Ils suggèrent un mécanisme de contrôle de la progression de micro tumeur, venant se superposer à celui, biochimique, déjà existant. Il semblerait que l'un peut par ailleurs activer l'autre, et inversement. Que celui-ci restreigne la progression tumorale ou la promeut, il en est un élément intrinsèque.

Annexe Protocoles

Cette annexe présente les différents protocoles utilisés et développés tout au long de cette thèse.

1. Culture cellulaire et formation des sphéroïdes
2. Estimation du volume des cellules par mesure de la distance noyau-noyau
3. Cryosections, marquages par immunofluorescence, et calcul de densités
4. Cytométrie de flux et histogrammes d'ADN
5. Western blots et mesure du niveau de protéines
6. Assemblage de dispositifs microfluidiques

•••••

Culture cellulaire et formation des sphéroïdes

La culture cellulaire de 5 lignées a été assurée durant cette thèse. La manière de procéder est identique selon la lignée, seul le milieu de culture varie. Le milieu de culture de base est du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), auquel nous ajoutons 10 % de sérum fœtal bovin, contenant la majorité des facteurs de croissance dont les cellules ont besoin, et 1 % d'antimycotique-antibiotique, afin de prévenir d'éventuelles contaminations de nos cultures. Seules les FHI, cellules de Schwann, n'ont pas le même milieu de culture. Il consiste en un mélange 1 :1 de DMEM et de F12.

Culture cellulaire Les cellules sont cultivées dans des flasques de 75 cm² de surface. Les cellules s'y développent jusqu'à un certain niveau de confluence. La confluence est définie comme la surface occupée par les cellules rapportée à la surface totale disponible. Lorsque nous cultivons des cellules, la confluence est une grandeur importante à laquelle il faut veiller. En effet, il ne faut pas que les cellules soient initialement à une confluence trop faible. Tous les facteurs de croissance dont ont besoin les cellules pour se développer correctement ne sont pas présents dans le milieu cellulaire et certains sont synthétisés par les cellules elle-mêmes. Pour cette raison, les cellules peuvent ressentir leur densité, et un nombre de cellules trop faible peut limiter le développement des cellules.

Nous semons tous les 2-4 jours selon les lignées environ 10⁶ cellules dans ces flasques ; et nous les laissons se développer jusqu'à une confluence d'environ 80-90 %. La trypsine est une enzyme permettant de digérer les protéines. Ajoutée au milieu de culture, elle digère toutes les protéines, et aide à la rupture du lien des intégrines, détachant les cellules. Nous pouvons ainsi resuspendre ces cellules, les diluer, et les ressemer.

Formation des sphéroïdes Nous avons choisi de former les sphéroïdes par la méthode du coussin d'agarose, soit dans des plaques 48 puits, soit dans des plaques 96 puits. Le schéma classique est celui présenté en chapitre introductif.

Nous polymérisons un gel d'agarose à 1 %, et versons 150 μL (50 μL) dans les puits d'une plaque 48 puits (respectivement 96 puits). Il est primordial de s'assurer que le gel soit bien polymérisé avant de continuer. Nous resuspendons les cellules d'intérêt comme indiqué précédemment, et effectuons des dilutions afin de verser environ 2000 cellules par puits dans les deux cas.

Le nombre initial N de cellules est important. C'est ce nombre qui donnera le rayon initial du sphéroïde lorsqu'il sera formé - $R_{\text{ini}} \sim N^{1/3} * r_0$, où r_0 est le rayon d'une cellule. Dans les conditions indiquées, le rayon initial est de l'ordre de 100 μm . Un sphéroïde forme sa propre matrice extracellulaire (nous avons notamment observé du collagène ou encore de la fibronectine dans ceux-ci). Ainsi, la croissance d'un sphéroïde, et surtout sa forme, dépendent de sa taille initiale. Si nous formons un sphéroïde avec un diamètre initial de l'ordre de 500 μm et comparons sa croissance à celui de diamètre initial de 200 μm , les deux satureront vers un diamètre de 1 mm, mais le premier aura une forme moins sphérique que le second. Ceci vient probablement du fait que la matrice rigidifie le sphéroïde. Notons que ceci suggère que la matrice joue un rôle mécanique également. Enfin, il ne faut pas, pour les raisons d'autocrinie évoquées, former des sphéroïdes avec un nombre très faible de cellules (entre 2-3 cellules) car celui-ci ne se développera pas dans la plupart des cas.

.....

Estimation du volume des cellules par mesure de la distance noyau-noyau

Les sphéroïdes sont des objets denses et difficiles à imager sur des distances plus grande que la centaine de micromètres. Une des difficultés provient de leur cœur qui est opaque, certainement à cause de la matrice extracellulaire et/ou des débris cellulaires. Nous voulons avoir une méthode nous permettant un niveau équivalent d'information selon la distance par rapport au centre du sphéroïde, afin de mesurer le diamètre cellulaire. Nous avons pour ceci choisi d'estimer le diamètre cellulaire à partir d'informations à 2 dimensions.

Des sphéroïdes sont coupés au niveau de leur plan équatorial, puis les noyaux sont marqués grâce à un intercalant de l'ADN, le DAPI. Ces coupes sont ensuite imagées avec un microscope confocal, à un grossissement de 40x. Nous choisissons une région d'intérêt circulaire à l'intérieur de cette coupe, comme représenté schématiquement sur la figure 7.1A. La taille de cette région d'intérêt est choisie suffisamment grande pour qu'il y ait un nombre de noyaux important, mais suffisamment petite pour pouvoir garder un caractère local.

À une dimension, l'autocorrélation consiste à mesurer la similitude d'un signal à lui-même, en le translatant dans le temps d'une certaine quantité τ . Le signal est décalé de τ , multiplié par le signal à $\tau = 0$, et intégré, le résultat de cette opération étant la fonction d'autocorrélation à τ . Sans déplacement, l'autocorrélation est maximale, car le signal correspond à lui-même. Chaque maximum dans la fonction d'autocorrélation se situe à une distance moyenne où le signal se ressemble. L'approche est la même à deux dimension, mais l'image est translatée d'un vecteur \vec{r} et non plus d'un scalaire. En coordonnées polaires, ceci revient à décaler le centre de l'image de (d, θ) .

Nous avons choisi de calculer la fonction d'autocorrélation G par des transformées de Fourier de la région d'intérêt (ROI) :

$$G_{\text{ROI}}(d, \theta) = TF^{-1}|TF(\text{ROI})|^2$$

où TF dénote la transformée de Fourier, et TF^{-1} la transformée de Fourier inverse. Le résultat est une image, que nous moyennons sur l'angle θ , en supposant qu'il n'y a pas d'orientation privilégiée des cellules. Nous normalisons cette fonction et obtenons le profil typique montré sur la figure 7.1B, représentant la fonction d'autocorrélation en fonction du déplacement d de son centre. Cette fonction est maximale pour zéro déplacement d . Nous observons que la fonction passe par un second maximum. Ce maximum correspond à la corrélation d'un noyau de l'image avec son plus proche premier voisin. De même, le troisième maximum correspond à la distance moyenne avec son second voisin. Nous remarquons que la corrélation est vite perdue : après deux voisins, le signal de corrélation chute à zéro. Ceci suggère qu'il n'y a pas d'ordre dans le sphéroïde à longue distance. Nous prenons comme estimation du diamètre cellulaire la distance $d(r)$ correspondant à la distance typique entre le centre de deux noyaux adjacents, à une distance r du centre.

Ce processus aléatoire (Monte Carlo) est répété un grand nombre ($N \geq 200$) de fois, et N couples $(r, d(r))$ sont ainsi calculés. Nous regroupons ces points dans un histogramme (figure 7.1C). La largeur de la fenêtre correspond à la taille de la région d'intérêt. Dans cette fenêtre, $n < N$ points sont regroupés, correspondant à la mesure du diamètre cellulaire à une distance r du centre. Nous calculons la médiane de ces points, et l'erreur sur la médiane (déviations standard / \sqrt{n}), afin d'obtenir l'évolution de l'estimation du diamètre des cellules dans un sphéroïde.

Autre manière de mesurer la densité de cellules Dans nos premières études (voir [133, 134]), nous avons supposé que la densité de cellules ne variait pas, à la précision de nos mesures près. Nous repérons la position de chaque noyaux (voir prochaine section), et nous calculons des

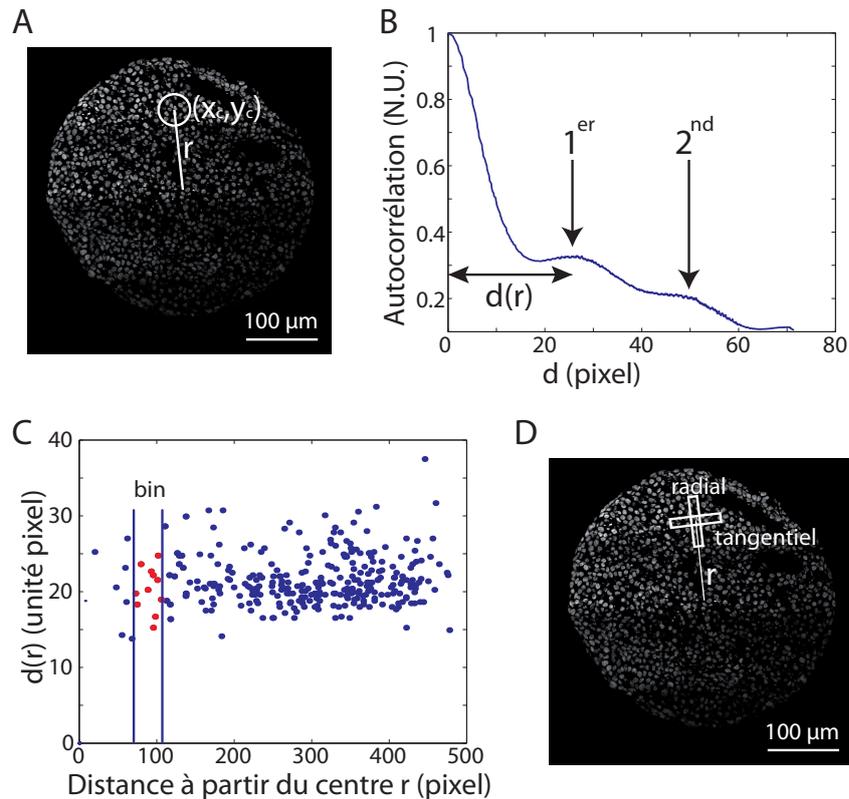


FIGURE 7.1 – Explication de la mesure de l'estimation du diamètre cellulaire par la méthode d'autocorrélation. A : un sphéroïde est coupé au plan équatorial, et les noyaux sont marqués grâce à du DAPI. Une région d'intérêt circulaire est choisie aléatoirement à une distance r du centre. B : La fonction d'autocorrélation est calculée et intégrée sur les angles afin d'obtenir une distribution radiale de celle-ci. Plusieurs pics sont visibles, et la distance $d(r)$ entre les deux premiers pics, distance moyenne entre premiers voisins, est choisie comme estimation du diamètre cellulaire. C : $N \geq 200$ points sont réunis dans un graphique, et un histogramme est construit à partir de ceux-ci : la largeur de la fenêtre correspond à la taille de la région d'intérêt, sa valeur est la médiane des points, et la barre d'erreur est l'erreur sur la médiane. D : Pour mesurer l'anisotropie dans le tissu, nous choisissons deux régions d'intérêt rectangulaires et orthogonales, dont la largeur est environ un diamètre nucléaire, et la longueur correspond à 5-6 noyaux. Nous pouvons obtenir dans ces conditions la distance plus proche voisins dans la direction radiale, et dans la direction tangentielle.

histogrammes de la position de chacun de ces noyaux : l'histogramme sous contrainte mécanique était alors similaire à celui sans contrainte. En fait, nous nous sommes aperçu que cette façon de faire donne une approximation grossière du nombre de noyaux. En effet, beaucoup de noyaux sont dans ce cas détectés plusieurs fois. Cela provient du fait que le DAPI est plus intense dans les nucléoles du noyau.

La méthode de calcul de la densité par autocorrélation représente donc une amélioration car elle ne supervise pas la localisation de chaque noyau. Ceci nous permet de gagner en sensibilité,

et de montrer que la densité de cellules augmente dans le centre des sphéroïdes sous contrainte mécanique.

Caractérisation de l'anisotropie Afin d'obtenir des informations sur l'anisotropie dans le tissu, nous choisissons à la place de la région d'intérêt circulaire deux régions d'intérêt rectangulaires orthogonales, comme indiqué sur la figure 7.1D. La largeur de ces rectangles correspond en moyenne à une cellule, tandis que la longueur correspond à 5-6 cellules. Nous calculons de la même manière l'autocorrélation, mais sans intégrer sur les angles. Nous mesurons ainsi directement la distance aux premiers voisins radiale, et la distance aux premiers voisins tangentielle. La suite des analyses est faite de la même manière.

Nous avons vérifié que l'hypothèse isotrope n'est pas en défaut : nous pouvons définir un diamètre effectif de la cellule allongée, et le comparer au diamètre que nous mesurons précédemment. Nous nous apercevons que celui-ci évolue de la même manière. La caractérisation de l'anisotropie est donc un raffinement de la méthode précédente.

.....

Cryosections, marquages par immunofluorescence, et calcul de densités

Nous avons effectué des cryosection et marquages par immunofluorescence afin d'avoir accès à la distribution radiale de protéines d'étude.

Cryosection Au moment où nous voulons analyser un sphéroïde, nous mesurons son diamètre, puis nous l'incluons dans un gel et solidifions l'ensemble à -80°C . Le gel avec le sphéroïde qu'il contient est ensuite monté sur un cryotome refroidi à -25°C . Nous effectuons des coupes gelées d'épaisseur contrôlée. Dans la plupart des cas, nous coupons le sphéroïde en des coupes de $5\mu\text{m}$.

Lorsque nous pénétrons dans le sphéroïde, nous mesurons son diamètre au fur et à mesure des coupes afin de nous assurer de notre position dans ce dernier. Nous collectons ainsi les coupes au centre (figure 7.2A). Notons que nous prenons les coupes avec une tolérance d'un dizaine de pourcents sur le diamètre. Nous avons par exemple noté (confère chapitre 2), que la simple manipulation d'un sphéroïde pouvait le stresser et diminuer son rayon de quelque pourcents.

Une fois le sphéroïde coupé, nous collectons les coupes sur des lames (figure 7.2B) et les conservons à -20°C .

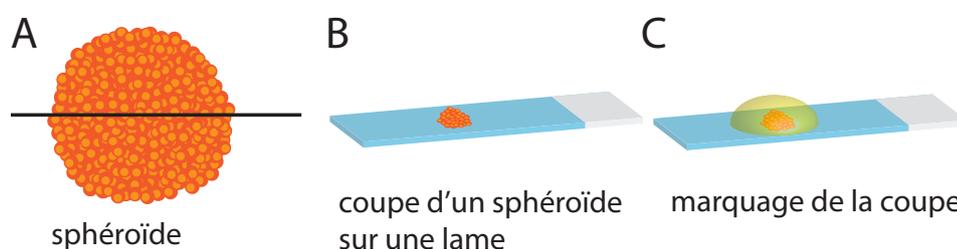


FIGURE 7.2 – Processus de cryosection et marquage. Un sphéroïde est inclus dans du milieu et gelé à -80°C , puis coupé au niveau de son plan équatorial (A). La coupe est transférée sur une lame (B) et est ensuite marquée pour révéler la position de la protéine d'intérêt (C).

Marquage par immunofluorescence Un marquage par immunofluorescence consiste en l'utilisation d'anticorps spécifiques à l'antigène d'une protéine afin de pouvoir la détecter. En immunofluorescence, les structures natives des protéines sont conservées.

La première étape du marquage consiste dans notre cas à la fixation de l'échantillon, c'est-à-dire à la réticulation de toutes les protéines entre elles, grâce à un aldéhyde, le paraformaldéhyde (PFA). Nous avons choisi de ne pas fixer l'échantillon, avant la coupe, mais après. La raison principale est que la fixation + solidification abiment le tissu. Une manière de remédier à ceci, est de passer le tissu en sucrose ($\sim 30\%$ de sucrose). Ceci a pour effet de vider l'eau (effet osmotique), et d'assurer une meilleure solidification. Néanmoins, le tissu diminue de taille (environ $20-30\%$). Ce qui nous intéresse avant tout étant les distances, nous préférons ne pas utiliser le sucrose. De plus, à la lumière de nos résultats, rien ne nous assure que la réduction de taille du tissu se fasse de manière homogène.

Une fois l'étape de fixation réalisée, le protocole suit les étapes suivantes, toutes à température ambiante :

1. Rinçage avec une solution saline de chlorure d'ammonium à 50 mM pendant $10'$
2. Rinçage 2 fois $5'$ avec PBS
3. Blocage des épitopes avec de la BSA (*bovine serum albumin*) à 2% dans du PBS pendant $30'$

4. Rinçage 2 fois 5' dans PBS/BSA 1%
5. Incubation de l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt, à une concentration typique de 1/200, pendant 1h
6. Rinçage 3 fois 5' dans PBS/BSA 1%
7. Incubation de l'anticorps secondaire, conjugué avec un fluorophore et dirigé contre l'anticorps primaire, à une concentration typique de 1/200, pendant 1h. Pendant cette étape peuvent être rajoutées d'éventuelles drogues ou agent intercalant de l'ADN. Le DAPI est classiquement utilisé à une concentration de 1/1000.
8. Rinçage 3 fois 5' avec PBS
9. Montage de la lamelle avec du milieu de montage, protégeant le marquage, permettant de coller la lamelle

Notons qu'avec des coupes de 5 μm , plus petites que la taille d'un noyau, nous n'avons pas besoin d'étape de perméation des membranes plasmique ou nucléaire.

Distribution radiale Nous choisissons pour la plupart des marquages des protéines nucléaires, car elles possèdent une localisation bien déterminée. Pour repérer la position d'un noyau positif pour un marquage, nous seuillons la dérivée seconde de l'image afin de repérer tous ces extrema. Des opérations morphologiques nous permettent de réduire localement ces extrema à un point, représentant la position du noyau. Nous traçons ensuite des histogrammes de ces positions par rapport à la distance au centre du sphéroïde.

La même démarche est effectuée sur tous les noyaux de la coupe grâce au marquage de DAPI. Comme nous l'avons vu dans la section précédente, cette démarche est approximative, et nous perdons le détail de ce qu'ils se passe entre autres au centre de la coupe, mais elle nous donne une bonne approximation de la densité cellulaire. Les histogrammes sont tracés grâce à une méthode de boîte glissante, avec une taille de boîte de 30 μm (deux cellules) [187]. Nous normalisons l'histogramme de la position des noyaux positifs pour le marquage considéré par l'histogramme de la position de tous les noyaux. Ceci nous permet de nous affranchir de l'épaisseur de la coupe. Nous obtenons ainsi des densités de présence pour les noyaux considérés. Nous avons également utilisé cette méthode pour tracer les densités de nanoparticules lors des expériences de flux cellulaire.

Nombre de cellules L'intégrale d'une telle densité nous donne accès au nombre de noyaux positifs pour le marquage considéré (méthode utilisée dans le chapitre 3). Pour estimer l'erreur faite sur cette mesure, nous supposons que la plus grande source d'incertitude provient de la détection des noyaux. Nous varions le seuil de détection de ces noyaux, pour obtenir deux cas limites : tous les noyaux sont au moins détectés, et le minimum de noyau est au moins détecté. Nous calculons le nombre de noyaux dans ces deux cas extrêmes et dans le cas classique. L'erreur sur la mesure, à 1 σ , correspond alors en moyenne à 20 % de la valeur mesurée.

Marquage des cellules Les autres étapes sont les mêmes que pour marquer des cellules individuelles.

1. 3 mL d'éthanol froid (sorti du - 20°C) à 70 % sont ajoutés au 1 mL de solution contenant les cellules, goutte à goutte en agitant vigoureusement à l'aide d'un vortex.
2. La fixation doit durer au moins 2h, et l'ensemble est conservé à 4°C. Les échantillons ainsi fixés peuvent être conservés jusqu'à 1 semaine.
3. Le jour de l'expérience, les échantillons sont culottés une première fois à 500g pendant 10', puis rincés avec du DPBS, et une seconde fois à 100g.
4. Les cellules sont ressuspendues dans 300 μL de solution de marquage contenant le iodure de propidium (PI) à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, et 10 μL de RNase A.

La RNase assure la destruction des ARN en solution. En effet, le PI peut se lier à l'ADN comme à l'ARN. Sa fréquence d'émission est décalée différemment lorsqu'il est lié à l'un ou à l'autre, mais il y a un recouvrement des deux spectres : il faut donc détruire les ARN pour mesurer proprement la quantité d'ADN.

Certaines méthodes exploitent néanmoins ces décalages. L'acridine orange est une molécule ayant les mêmes propriétés de fixation que le PI, mais les spectres d'émission sont bien séparés selon que cette molécule soit liée à l'ADN ou à l'ARN. Ceci permet de mesurer, en plus de la quantité d'ADN, la quantité d'ARN présent dans la cellule.

Quantité d'ADN et histogramme Les cellules ainsi marquées passent dans un cytomètre de flux. Dans celui-ci, les cellules passent une par une devant un faisceau laser. Elles circulent dans un liquide de cœur entouré d'un liquide de gaine, assurant leur focalisation. La quantité de fluorescence est mesurée et stockée dans la machine. La quantité d'ADN étant une fonction de l'intensité de fluorescence de PI, cela permet de tracer des histogrammes d'ADN.

Le premier pic correspond à une quantité $1n$ d'ADN, soit aux phases G0 et G1. Le second pic correspond à une quantité $2n$ d'ADN, soit aux phases G2 et M. Entre ces deux pics, la phase S est présente. L'intégrale sous la courbe correspond au nombre total de cellules, ainsi l'intégrale sous le premier pic correspond par exemple au nombre de cellules dans les phases G0 + G1.

De nombreux modèles existent, plus ou moins compliqués, pour analyser ces histogrammes [150, 152]. La différence entre tous ces modèles se situe surtout au niveau de la phase S, à savoir la définition de son début et de sa fin. La plupart considèrent un modèle de trapèze, comme indiqué sur la figure 7.3D.

Nous avons utilisé le logiciel ModFit afin d'extraire les proportions de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Notons que le % G0/G1 correspond au nombre total de cellules en G0 + G1. Cette méthode est insuffisante pour résoudre la différence entre les deux. L'utilisation d'un protocole avec un marquage à base d'acridine orange le pourrait. En effet, les cellules en G1 ont une activité métabolique beaucoup plus importante que les cellules en G0. La quantité d'ARN, contenue majoritairement dans les ribosomes, est donc plus importante en G1 qu'en G0, ce qui permettrait une discrimination.

•••••

Western blots et mesure du niveau de protéines

Nous avons utilisé les Western blots afin de quantifier les niveaux totaux en protéines au sein de sphéroïdes. Le protocole développé est le suivant :

1. Rassembler 80 sphéroïdes dans un tube de 15 mL plongé dans de la glace.
2. Aspirer tout le milieu, et rincer 2 fois avec du PBS, puis laisser dans la glace. À ce stade, les échantillons peuvent être conservés quelques jours à -20°C.
3. Ajouter 70 μ L de tampon RIPA (*radioimmunoprecipitation assay*) et agiter au vortex à température ambiante pendant 20'. Le tampon est modifié et possède 4 % en agent détergeant SDS (sodium dodécyle sulfate) au lieu de 1 % classique pour mieux solubiliser l'ensemble. Il possède également un mélange d'inhibiteur de phosphatase, d'inhibiteur de protéase, et de benzonase.
4. Chauffer 5' à 100°C.
5. Ajouter 13 μ L de tampon dénaturant de Laemmli, puis chauffer 5' à 100°C. Se conserve pendant des semaines à -20°C.

Pour équilibrer les quantités de protéines, nous mesurons les diamètres des sphéroïdes, et extrayons les protéines correspondant à un même volume totale de sphéroïdes.

Une fois l'extraction faite, les protéines sont chargées sur des gels à 4-12% de polyacrylamides. Une différence de potentiel de 150 V assure la migration pendant 1h30 des protéines. Les gels sont ensuite transférés sur des membranes de nitrocellulose, et nous marquons les membranes pour révéler les protéines. Le protocole de marquage ressemble beaucoup au protocole de marquage en immunofluorescence :

1. Les membranes sont rincées 2 fois 5' dans du PBST (PBS + 0.05 % Tween 20%).
2. Blocage pendant 1h dans une solution de PBST avec 5 % lait.
3. Rinçage 2 fois 5' PBST.
4. Incubation de l'anticorps primaire (concentration typique de 1/1000) pendant la nuit à 4°C.
5. Rinçage 3 fois 5' PBST.
6. Deuxième phase de blocage éventuellement, pendant 30'.
7. Incubation de l'anticorps secondaire, conjugué avec une molécule HRP (*horseradish peroxidase*), qui permet la conversion d'un signal chimique en lumière, (électro-chimio-luminescence, ou ECL), pendant 1h à la concentration typique de 1/5000.
8. Rinçage 3 fois 5' PBS puis rinçage plus long de 20'.

Pour révéler les membranes, un produit créant de l'ECL est ajouté. Les membranes réagissent avec des films photosensibles, ce qui permet de fixer le signal. Ce sont ces films qui sont présentés sur la figure du chapitre 3.

Quantification des Western blots Pour quantifier un Western blot, nous avons besoin d'une protéine dont nous soyons sûr que son niveau ne varie pas. Nous supposons que c'est le cas de l' α -tubuline. La quantité d'une protéine est proportionnelle au niveau de l'intensité sur les films. Nous sommes donc cette intensité pour en extraire le niveau.

Nous associons le niveau d'une protéine à l'intensité émise, normalisée par l'intensité de la bande d' α -tubuline. L'incertitude sur cette mesure provient de l'incertitude sur la détection du bord de la bande. Nous avons associé cette incertitude à environ 10 % de la valeur détectée.

Pour les expériences concernant les MAPK, deux normalisations ont été effectuées : pour la première, la bande d'intérêt est normalisée avec le niveau de tubuline. La seconde normalisation

est effectuée par le niveau de cette protéine avant l'expérience, afin d'observer les variations par rapport au témoin.

Enfin, nous avons remarqué en combinant les expériences de Western blot et d'immunofluorescence, que le niveau des protéines mesuré par Western blot est bien corrélé avec le nombre de noyaux exprimant cette protéine, mesuré par l'intégrale des densités de noyaux positifs pour le marquage considéré.

.....

Assemblage de dispositifs microfluidiques

Nous allons présenter dans cette annexe l'assemblage des deux puces microfluidiques développées durant cette thèse. Les étapes sont résumées sur la figure 7.4.

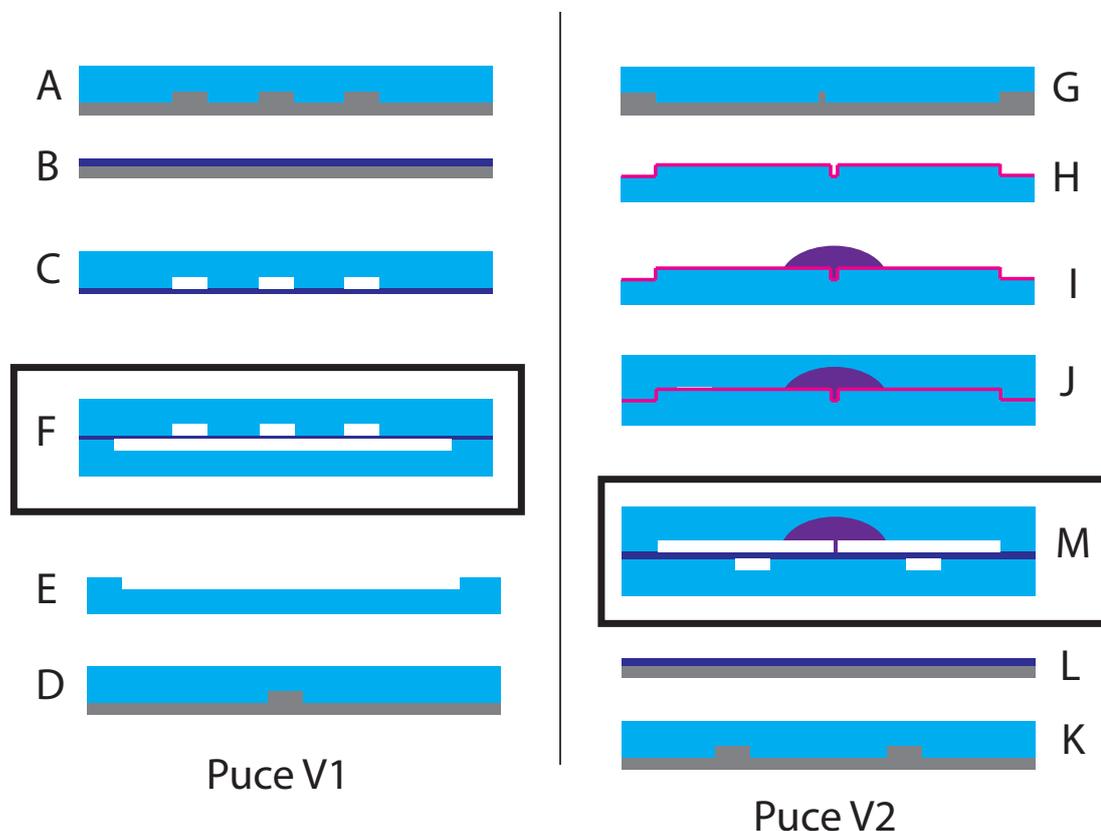


FIGURE 7.4 – Assemblage des deux dispositifs, la première version (A-F) et la seconde (G-M). Puce version 1 : A, moulage du haut de la puce avec du PDMS ; B, spin-coating d'une fine membrane de $10\ \mu\text{m}$ de PDMS (fausse couleur bleu foncé) ; C, collage de ces deux parties par plasma ; D, moulage du bas de la puce (coupe transversale) ; E, coupe sagittale du bas de la puce ; F, assemblage du haut et du bas par collage plasma. Puce version 2 : G, moulage du contre-moule en PDMS ; H, traitement avec du triméthylesilane de ce contre-moule (fausse couleur rose) ; I, réticulation partielle d'un goutte de PDMS 5% au centre du contre moule (fausse couleur violette) ; J, moulage de PDMS sur le reste du contre moule, K, moulage de la partie basse de la puce, L, spin-coating d'une fine membrane de $10\ \mu\text{m}$ de PDMS (fausse couleur bleu foncé) ; et M assemblage des deux parties, la membrane de mesure étant à 5% PDMS au milieu, et les deux membranes de blocage sous la puce.

Puce Version 1 Cette puce consiste en l'assemblage d'une partie haute, contenant les 2 vannes de blocage et une vanne de mesure, et d'un partie basse, contenant un simple canal. Les vannes et canal sont simplement moulés à partir de PDMS classique (10 % en agent réticulant). Une fois celui-ci coulé, le tout est mis dans un four à 65° pendant la nuit pour assurer la réticulation.

Les vannes sont formées à partir d'une fine membrane de PDMS collées aux canaux du haut. Pour former cette membrane, nous ajoutons une goutte au centre d'une plaque de silicium préalablement traitée avec du triméthylsilane afin de la rendre inactive avec le PDMS, et cette plaque est mise en rotation pendant 1' à 5000 tours par minute. Une fois le PDMS étalé, il est réticulé sur la nuit dans un four à 65°C.

Pour coller du PDMS à du PDMS, la technique la plus utilisée consiste à activer par un plasma oxygène la surface du PDMS, créant ainsi des radicaux libres. Deux surfaces ainsi activées mises en contact vont réagir, et par une polymérisation radicalaire, vont créer des liens covalents entre elles. Nous activons et collons de cette manière le haut de la puce et la membrane de 10 μm afin de créer les trois vannes (figure 7.4C), puis collons le haut au bas pour former la puce (figure 7.4F).

Les trous pour les connectiques sont effectués au préalable grâce à un emporte-pièce de 1mm de diamètre.

Puce Version 2 Comme nous ne pouvons pas créer de structures en renforcement pour former la membrane centrale directement, nous formons un contre-moule en PDMS d'une structure en aluminium représentant la puce que nous voulons, puis moulons la puce sur ce moule directement.

Nous formons le contre-moule en moulant du PDMS classique, et en le réticulant à 65° (figure 7.4G). La surface du contre-moule est traitée avec du triméthylsilane afin que du PDMS n'y adhère pas par la suite (fausse couleur rose sur le schéma de la figure 7.4H). Afin d'avoir une membrane centrale plus déformable, nous pré-polymérisons d'abord du PDMS à 5 % d'agent réticulant au niveau de la membrane, et 45' après avoir été à 65°C, nous coulons du PDMS classique par dessus, et laissons l'ensemble dans le four. Après démoulage, nous obtenons le haut de la puce.

Le bas de la puce se crée de la même manière que le haut de la puce V1. Nous formons deux canaux et les collons à une membrane de PDMS de 10 μm .

Les deux parties sont assemblées par un collage au plasma à oxygène afin de former la puce présenté sur la figure 7.4M.

Annexe Calculs

Cette Annexe de calculs présente les grandes lignes de certains calculs menés durant cette thèse.

1. Influence de la présence de Dextran sur les autres solutés
2. Matrice de déformation pour un milieu linéaire anisotrope
3. Croissance surfacique
4. Résolution analytique de l'équation de transport des nanoparticules
5. Déformation d'une fine membrane circulaire

.....

Influence de la présence de Dextran sur les autres solutés

Nous montrons ici que l'ajout de Dextran ne modifie que très peu la concentration d'autres solutés en solutions, comme par exemple le glucose, par des effets osmotiques. Le schéma à considérer est celui de la figure suivante :

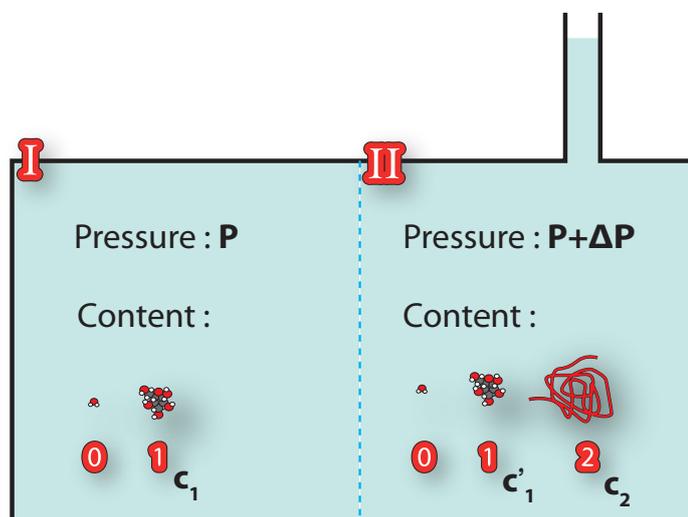


FIGURE 8.1 – Deux compartiments I et II sont séparés par une membrane, comme dans nos expériences, la membrane représentant soit la membrane du sac de dialyse, soit la première rangée de cellule. La membrane est imperméable pour le Dextran (espèce (2)), mais perméable pour l'eau (0) et d'autres petites molécules comme le glucose (1). Nous voulons savoir si l'ajout de Dextran ne modifie pas la concentration de ces petites molécules. Nous notons c'_1 la concentration de celles-ci dans le milieu extérieur, et c_1 leur concentration à l'intérieur, et calculons la différence de concentrations due à l'ajout de Dextran, $\delta c_1 = c'_1 - c_1$.

Nous appelons I le compartiment intérieur, séparé du compartiment extérieur II par une membrane semi-perméable laissant diffuser librement toutes les espèces ayant un poids moléculaire suffisamment faible, bloquant donc le Dextran dans le compartiment extérieur. La pression dans le compartiment extérieur est de ΔP supérieure à la pression dans I . Cet écart de pression est dû aux effets osmotiques.

Nous pouvons écrire l'égalité des potentiels chimiques pour l'espèce (1) entre les deux compartiments :

$$\mu_{1,I}(P, T, c_1) = \mu_{1,II}(P + \Delta P, T, c'_1)$$

Cette égalité peut être réécrite :

$$\mu_0(P, T) + kT \ln \left(\frac{c_1}{c_0} \right) = \mu_0(P, T) + v\Delta P + kT \ln \left(\frac{c'_1}{c_0} \right)$$

où $\mu_0(P, T)$ correspond au potentiel chimique de l'eau aux pression et température normales P et T , et v est le volume molaire de l'eau. Pour de faibles variations de concentration, nous

pouvons noter que la différence de concentration $\delta c_1 = c'_1 - c_1$ s'écrit :

$$-v\Delta P \sim kT \frac{\delta c_1}{c_1}$$

Que vaut ΔP ? L'équilibre du potentiel chimique de l'eau entre les deux compartiments s'écrit :

$$\mu_{0,I}(P, T) + v\Pi_I = \mu_{0,II}(P + \Delta P, T) + v\Pi_{II}$$

Ainsi, nous pouvons écrire $\Delta P = \Pi_I - \Pi_{II}$ qui est la différence de potentiels chimique entre les deux compartiments. Cette différence est due à :

1. l'ajout de Dextran, créant une contrainte osmotique notée Π_{osm}
2. le passage des petites molécules (1), qui compensent partiellement l'effet avec une variation de concentration δc_1

Nous pouvons écrire, pour une espèce (1) diluée :

$$\begin{aligned}\Pi_I &\sim -kTc_1 \\ \Pi_{II} &\sim -kTc'_1 - \Pi_{\text{osm}}\end{aligned}$$

d'où $\Delta P = \Pi_{\text{osm}} + kT\delta c_1$. Tout ceci nous permet, en combinant les équations, d'écrire au premier ordre la variation de la pression appliquée et de la concentration de (1) :

$$\begin{aligned}\Delta P &\sim \Pi_{\text{osm}}(1 - v c_1) \\ \frac{\delta c_1}{c_1} &\sim -\frac{v\Pi_{\text{osm}}}{kT}(1 - v c_1)\end{aligned}$$

La variation de concentration est négative : l'espèce (1) essaie de compenser l'effet du Dextran. La correction vc_1 est faible. En considérant pour (1) le glucose, avec une concentration classique de 4 mM, et un diamètre de 1 nm, et pour l'eau un diamètre de 0.29 nm pour une concentration de 50 M, ce terme vaut $vc_1 \sim v_1c_1/v_{\text{eau}}c_{\text{eau}} \sim 2.10^{-3}$. La pression ΔP est donc majoritairement due à la pression osmotique appliquée par le Dextran. Pour une pression de l'ordre de 1 kPa à une concentration en Dextran de 20 g/L, nous trouvons que $\delta c_1/c_1$ est de l'ordre de 10^{-5} . La concentration des autres espèces n'est pas affectée par l'ajout de Dextran en solution.

• • • • •

Matrice de déformation pour un milieu linéaire anisotrope

Nous présentons le calcul qui nous permet de donner la matrice de déformation, $[D]$, reliant le tenseur des contraintes $[\sigma]$ au tenseur des déformations $[u]$.

Dans le cas isotrope, les coefficients de cette matrice, D_{ijkl} s'écrivent, avec $\{i, j, k, l\} \in \{r, \theta, \phi\}$:

$$D_{ijkl} = \lambda \delta_{ij} \delta_{kl} + \mu (\delta_{ij} \delta_{kl} + \delta_{il} \delta_{jk})$$

où λ et μ sont les coefficients de Lamé. Pour prendre en compte l'anisotropie du matériau, nous supposons que celui-ci peut avoir des orientations privilégiées, i.e. une polarisation privilégiée. Pour ceci, nous écrivons $\delta_{ij} = p_i p_j$, où p est un vecteur unitaire. Nous écrivons alors toutes les combinaisons possibles :

$$\begin{aligned} D_{ijkl} &= \lambda \delta_{ij} \delta_{kl} + \mu (\delta_{ik} \delta_{jl} + \delta_{il} \delta_{jk}) \\ &+ \lambda_1 \delta_{ij} p_k p_l + \lambda_2 \delta_{kl} p_i p_j \\ &+ \mu_1 (p_i p_k \delta_{jl} + p_j p_l \delta_{ik} + p_i p_l \delta_{jk} + p_j p_k \delta_{il}) \\ &+ \mu_2 p_i p_j p_k p_l \end{aligned}$$

Or, en supposant que la polarisation soit radiale, car seuls $u_{rr} = \partial_r u_r$ et $u_{\theta\theta} = u_{\phi\phi} = u_r/r$ sont non-nuls dans notre cas, $p_r = 1$, et $p_\theta = p_\phi = 0$. Après calcul et en regroupant les termes, nous pouvons ainsi écrire :

$$\begin{aligned} \sigma_{rr} &= (\lambda + 2\mu + \lambda_1 + \lambda_2 + 4\mu_1 + \mu_2) u_{rr} + (\lambda + \lambda_2) (u_{\theta\theta} + u_{\phi\phi}) \\ \sigma_{\theta\theta} &= (\lambda + \lambda_1) u_{rr} + (\lambda + 2\mu) u_{\theta\theta} + \lambda u_{\phi\phi} \\ \sigma_{\phi\phi} &= (\lambda + \lambda_1) u_{rr} + \lambda u_{\theta\theta} + (\lambda + 2\mu) u_{\phi\phi} \end{aligned}$$

Nous notons ces coefficients A , B , C , D et E :

$$\begin{aligned} A &= \lambda + 2\mu + \lambda_1 + \lambda_2 + 4\mu_1 + \mu_2 \\ B &= \lambda + 2\mu \\ C &= \lambda + \lambda_2 \\ D &= \lambda + \lambda_1 \\ E &= \lambda \end{aligned}$$

et écrivons la matrice

$$[D] = \begin{pmatrix} A & C & C \\ D & B & E \\ D & E & B \end{pmatrix}$$

La sous-matrice

$$\begin{pmatrix} B & E \\ E & B \end{pmatrix}$$

est symétrique. Nous supposons une équivalence en θ et en ϕ , ce qui explique aussi pourquoi $D_{r\theta} = D_{r\phi}$ et $D_{\theta r} = D_{\phi r}$. Notons enfin que A est supérieur à tous les autres coefficients.

Cette matrice permet d'écrire les contraintes radiales et tangentielles :

$$\begin{aligned} \sigma_{rr} &= A u_{rr} + C u_{\theta\theta} + C u_{\phi\phi} \\ \sigma_{\theta\theta} &= D u_{rr} + B u_{\theta\theta} + E u_{\phi\phi} = \sigma_{\phi\phi} = \sigma_{tt} \end{aligned}$$

l'indice r indiquant l'indice radial, et t tangentiel (i.e. orthoradial ou azymutal). L'équilibre des forces s'écrit sur l'axe radial :

$$\partial_r \sigma_{rr} + \frac{2}{r} (\sigma_{rr} - \sigma_{tt}) = 0$$

Ce qui donne pour équation pour le déplacement :

$$A \partial_{rr} u_r + \frac{2C}{r} \partial_r u_r + \frac{2}{r} \left((A - D) \partial_r u_r + (2C - B - E) \frac{u_r}{r} \right) = 0$$

Nous recherchons des solutions en loi de puissance de la forme $u_r \propto r^\alpha$. Ceci amène à l'équation suivante :

$$A\alpha^2 + (A + 2C - 2D)\alpha + (2C - 2B - 2E) = 0$$

Si $B + E - C \geq 0$, i.e. $2\mu \geq \lambda_2$, alors l'une des puissance est positive et l'autre négative. Le déplacement ne pouvant diverger en "0", $u_r \propto r^{\alpha_+}$. La condition au bord étant $\sigma_{rr}(r = R) = -P$, Nous pouvons écrire après résolution les déplacements radial et tangentiel :

$$u_{rr} = -\frac{\alpha P}{\alpha A + 2C} \left(\frac{r}{R} \right)^{\alpha_+ - 1}$$

$$u_{tt} = -\frac{P}{\alpha A + 2C} \left(\frac{r}{R} \right)^{\alpha_+ - 1}$$

Afin d'obtenir une décroissance, il faut nécessairement que $\alpha_+ - 1 \leq 0$. Ceci impose $\lambda + 3\lambda_2 + 4\mu_1 + \mu_2 \geq 0$, condition qui est toujours vérifiée.

Enfin, la variation de volume s'écrit :

$$v(r) = v_0(1 + u_{rr})(1 + u_{\theta\theta})(1 + u_{\phi\phi})$$

Ce qui donne au premier ordre :

$$v(r) \sim v_0(1 + Tr[u])$$

Tr représentant l'opérateur trace. Le diamètre s'écrit alors :

$$d(r) \sim d_0 \left(1 + \frac{1}{3} Tr[u] \right)$$

que l'on peut développé comme indiqué dans le chapitre 2.

•••••

Croissance surfacique

Dans cette annexe, nous allons étendre le calcul de la croissance surfacique à un cas plus général, où l'apoptose n'est pas forcément considérée constante, ni même la densité. Le taux de prolifération, pour un sphéroïde de rayon R , s'écrit :

$$k_d(r) = k_d^b + \delta k e^{-(R-r)/\lambda_d}$$

avec k_d^b étant le taux de division au centre, δk un incrément de prolifération à la périphérie, et λ_d une longueur caractéristique de la division cellulaire. Nous avons vu que l'apoptose saturait au centre et diminuait à mesure que les cellules étaient proches du bord. Nous modélisons l'apoptose par une exponentielle décroissante, sur une longueur caractéristique λ_a :

$$k_a(r) = k_a \left(1 - e^{-(R-r)/\lambda_a}\right)$$

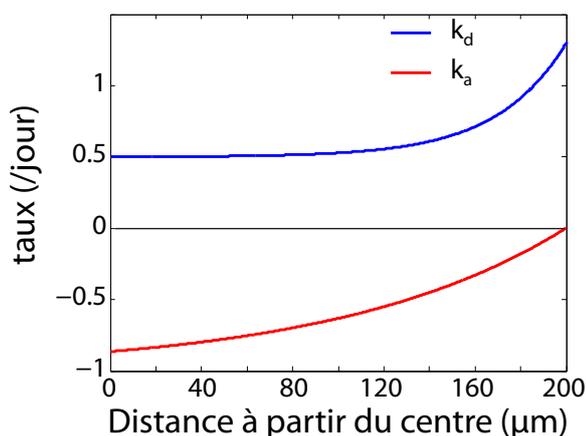


FIGURE 8.2 – Taux du modèle. Les paramètres utilisés sont : $k_d^b = 0.5$, $k_a = 1$, $\delta k = 0.8$, $\lambda_d = 30\mu\text{m}$, $\lambda_a = 100\mu\text{m}$, $R = 200\mu\text{m}$. Les taux sont données en jour^{-1} . Nous avons tracé $k_a(r)$ pour un meilleur lisibilité.

La figure 8.2 montre ces taux avec les valeurs indiquées dans la légende. Faute de modèle dont nous soyons sûr, nous prenons pour la densité de cellules la même que celle exposée dans le chapitre 2, avec r_0 étant le rayon des cellules au bord du sphéroïde, et r_p le rayon des cellules au centre, lorsque celui est comprimé :

$$\rho(r) = \frac{1}{v_c(r)} = \frac{3}{4\pi r_c(r)^3} \quad \text{avec} \quad r_c(r) = \frac{r_0 - r_p}{R} r + r_p$$

Le nombre de cellules qui entrent en division N_d , ou en apoptose N_a , pendant dt , s'écrit :

$$N_d = \int_0^R k_d(r)\rho(r)4\pi r^2 dr dt$$

$$N_a = \int_0^R k_a(r)\rho(r)4\pi r^2 dr dt$$

Dans un premier temps, prenons $\lambda_a = \lambda_d = \lambda$. Nous donnerons le cas général à la fin du calcul. Il vient dans ce cas que la variation du nombre de cellules, $N(t + dt) - N(t)$ s'écrit :

$$N(t + dt) - N(t) = N_d - N_a = \int_0^R \left((k_d^b - k_a)\rho(r)4\pi r^2 + (\delta k + k_a)e^{-(R-r)/\lambda}\rho(r)4\pi r^2 \right) dr dt$$

Nous appelons le premier terme δN^b la variation pendant dt du nombre de cellules au centre, et δN^s la variation au bord. En écrivant $k = k_d^b - k_a$ et $\Delta k = \delta k + k_a$, nous remarquons qu'inclure une meilleure définition à l'apoptose ne change pas le résultat du calcul.

Le nombre de cellules à l'instant t se calcul de la même façon que dans le chapitre 2, nous ne donnons que le résultat :

$$N(t) = \int_0^R \rho(r)4\pi r^2 dr = \frac{4}{3}\pi R^3 \rho_0 g(\alpha) \text{ avec}$$

$$g(\alpha) = -3 \frac{\ln(\alpha) + 1/2(3 - \alpha)(1 - \alpha)}{(1 - \alpha)^3}, \quad \alpha = \frac{r_p}{r_0}$$

g est la fonction que nous avons trouvé dans le chapitre 2. Nous définissons la densité ρ_0 comme étant la densité sans contrainte mécanique, à savoir $\rho_0 = 3/4\pi r_0^3$. Nous avons remarqué que α ne dépendait pas du temps. Ainsi, la variation du nombre de cellules s'écrit :

$$N(t + dt) - N(t) = \partial_t N dt = 4\pi R^2 \rho_0 g(\alpha) \partial_t R dt$$

Le nombre de cellules au centre δN^b se calcul directement à partir du calcul précédent :

$$\delta N^b = \int_0^R k\rho(r)4\pi r^2 dr dt = \frac{4}{3}\pi R^3 \rho_0 k dt g(\alpha)$$

Le calcul du nombre de cellules au bord est plus compliqué. Avec le changement de variable $u = \frac{r_0 - r_p}{R}r + r_p$, nous pouvons récrire l'équation :

$$\delta N^s = \int_0^R \Delta k e^{-(R-r)/\lambda} \rho(r)4\pi r^2 dr dt$$

$$= 3\Delta k dt e^{-R/\lambda(1-\alpha)} \int_{r_p}^{r_0} \frac{R^3}{r_0^3(1-\alpha)^3} \frac{(u - r_p)^2}{u^3} e^{u/\lambda'} du \quad \text{avec} \quad \lambda' = \lambda \frac{r_0(1-\alpha)}{R}$$

Dans nos expériences, λ est petit devant le rayon du sphéroïde, et α est proche de 1. Ceci implique que λ' est très petit devant r_0 . Nous intégrons par parti pour faire ressortir les ordres successifs en λ'/r_0 . Voici le calcul des deux premiers ordres :

$$\delta N^s = 4\pi R^2 \lambda \rho_0 \Delta k dt + 4\pi R \lambda^2 \rho_0 \Delta k dt \frac{1 - 4\alpha + 3\alpha^2}{1 - \alpha} + O\left(\left(\frac{\lambda'}{r_0}\right)^3\right)$$

Que se passe-t-il pour la fonction modulant le second ordre lorsque α se rapproche de 1 ? Au premier ordre pour α proche de 1, nous obtenons :

$$\frac{1 - 4\alpha + 3\alpha^2}{1 - \alpha} \sim 1 - 3\alpha$$

et ne diverge pas lorsque α tend vers 1. Les ordres successifs sont en puissances de λ'/r_0 toujours plus grande. Nous allons donc rester au premier ordre en λ'/r_0 . Il est intéressant de noter à ce point du calcul que le nombre de cellules qui vont se diviser en surface s'écrit exactement de la même manière que lorsqu'il n'y a pas de variation de la densité. Cela provient du fait que les densités sont les mêmes au bord indépendamment de la contrainte appliquée. L'évolution du nombre de cellules s'écrit alors :

$$\begin{aligned} N(t + dt) - N(t) &= N_d - N_a = \delta N^b + \delta N^s \\ 4\pi R^2 \rho_0 g(\alpha) \partial_t R &= \frac{4}{3} \pi R^3 \rho_0 k g(\alpha) + 4\pi R^2 \lambda \rho_0 \Delta k \\ \partial_t R &= \frac{1}{3} k R + \Delta k \lambda g^{-1}(\alpha) \end{aligned}$$

Nous retrouvons une équation très similaire à celle présentée dans le chapitre 3. α ne variant pas dans le temps, seul le taux en surface est affecté par l'ajout d'une densité hétérogène. La fonction $g^{-1} \in [0, 1]$ et est croissante en α , avec $g^{-1}(1) = 1$. α est décroissant avec la valeur de la contrainte. Un développement limité autour de 1 donne $g^{-1}(\alpha) \sim 1/4 + 3/4\alpha$ au premier ordre.

Enfin, si λ_a est différent de λ_d , nous écrivons l'incrément de prolifération effectif en surface :

$$\Delta k \lambda = (\delta k \lambda_d + k_a \lambda_a) g^{-1}(\alpha)$$

C'est ce taux que nous mesurons par l'ajustement des courbes, et nous montrons qu'il ne varie que peu avec la pression. Plusieurs interprétations comme le fait que les paramètres peuvent varier dans le même sens peut expliquer ceci. Nous pourrions par ailleurs nous demander si sa plus grande variation ne viendrait pas de l'effet dû à la densité.

En conclusion, une modélisation incluant des paramètres plus réalistes ne modifient pas l'effet observé au centre, et modifie légèrement l'effet au bord, mais ne change pas l'équation de notre modèle de croissance surfacique. L'ajustement des courbes de croissance nous montre que le taux dans le centre k est très affecté par la contrainte appliqué, ce qui est peu le cas du taux au bord.

•••••

Résolution analytique de l'équation de transport des nanoparticules

Dans cette annexe nous allons donner les grandes étapes de résolution de l'équation de transport des NPs par le champs de vitesse.

Rappelons que l'équation de transport s'écrit

$$\partial_t p(r, t) + \operatorname{div} \vec{v} p(r, t) = 0$$

que nous récrivons dans le cas de coordonnées sphériques

$$\partial_t p(r, t) + \frac{1}{r^2} \partial_r r^2 v(r, t) p(r, t) = 0$$

Résolution dans la zone $0 < r < R(t) - \lambda$ Dans cette zone la vitesse s'écrit $v(r) = 1/3kr$. L'équation de transport devient alors :

$$\partial_t p + kp + \frac{1}{3} r \partial_r p = 0$$

Nous posons $p(r, t) = e^{-kt} p_1(r, t)$, l'équation devient :

$$\partial_t p_1(r, t) + \frac{k}{3} r \partial_r p_1(r, t) = 0$$

Nous effectuons le changement de variable suivant : $x = r e^{-kt/3}$, dans ce cas :

$$\partial_r p_1(r, t) = e^{-kt/3} \partial_x p_1(x, t)$$

$$\partial_t p_1(r, t) = \partial_t p_1(x, t) - \partial_x p_1(x, t) \frac{kr}{3} e^{-kt/3}$$

Ceci donne $\partial_t p_1(x, t) = 0$, donc $p_1 = f(x)$. Pour $t = 0$, $f(x) = f(r)$, ainsi, en notant $p_0(r, 0) = p(r, 0)$, il vient :

$$p(r, t) = e^{-kt} p_0 \left(r e^{-kt/3}, 0 \right)$$

Résolution dans la zone $R(t) - \lambda < r < R(t)$ Dans cette zone le champs de vitesse s'écrit :

$$v(r, t) = \frac{1}{3}(k + \delta k)r - \frac{1}{3} \delta k \frac{(R(t) - \lambda)^3}{r^2}$$

En posant $x = r e^{-(k+\delta k)t/3}$, il vient :

$$\partial_t p(x, t) + (k + \delta k)p(x, t) - \frac{\delta k}{3} \frac{(R(t) - \lambda)^3}{x^2} \partial_x p(x, t)$$

Nous posons $p(x, t) = e^{-(k+\delta k)t} q(x, t)$ et obtenons

$$\partial_t q(x, t) - \frac{\delta k}{3} \frac{(R(t) - \lambda)^3}{x^2} \partial_x q(x, t)$$

Nous effectuons enfin les changements de variable suivants :

$$X = x^3$$

$$T = \int_0^t \delta k (R(t') - \lambda)^3 e^{-(k+\delta k)t'} dt'$$

L'équation devient :

$$\partial_T q(X, T) - \partial_X q(X, T) = 0$$

soit q ne dépend que de $X+T$. Ainsi $p(r, t) = e^{-(k+\delta k)t} g(\tilde{r})$ avec

$$\tilde{r}^3 = e^{-(k+\delta k)t} r^3 + \int_0^t \delta k (R(t') - \lambda)^3 e^{-(k+\delta k)t'} dt'$$

À $t = 0$, $\tilde{r} = r$, il vient donc :

$$p(r, t) = p_0(\tilde{r}, 0) e^{-(k+\delta k)t}$$

Position du maximum en fonction du temps Pour calculer la position du maximum dans le temps, il suffit de dire qu'à l'instant initial, il est situé en $r_m(0) = \tilde{r}_m(0) = R$. Nous ne pouvons effectuer la résolution analytique pour un sphéroïde en croissance, mais pouvons l'effectuer à l'état stationnaire de taille. À cet instant, $R(t) = R_\infty = \text{cste}$. Il nous est dans ce cas possible d'intégrer $\tilde{r} = R$ et d'en déduire l'expression de la position du maximum donné dans le chapitre 4.

.....

Déformation d'une fine membrane circulaire

Nous présentons dans cette annexe le calcul menant à la relation entre la déformation d'une membrane et la contrainte appliquée. Considérons dans un premier temps une membrane fine sphérique. Le rayon interne est R_1 et le rayon externe est R_2 , comme indiqué sur la figure 8.3A.

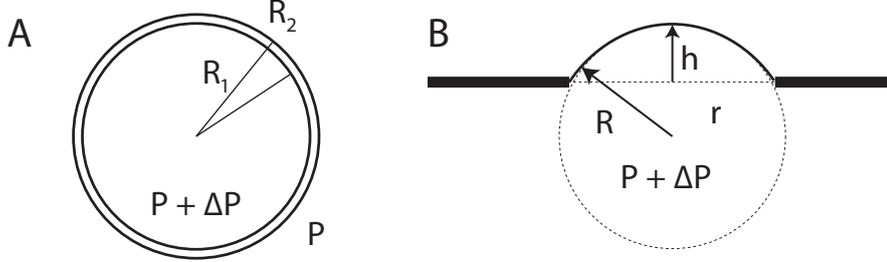


FIGURE 8.3 – A : déformation d'un sphère fine de rayon interne R_1 et de rayon externe R_2 , B : déformation d'une membrane circulaire de rayon r (coupe transversale).

Cette sphère élastique est soumise à une pression interne $P_i = P + \Delta P$ et une pression externe $P_e = P$. Son épaisseur $e = R_2 - R_1$ est très petite devant les rayons R_1 et R_2 .

Nous écrivons les déformations radiale et angulaires en symétrie sphérique :

$$\begin{aligned} u_{rr} &= \partial_r u_r \\ u_{\theta\theta} = u_{\phi\phi} &= \frac{u_r}{r} = u_{tt} \end{aligned}$$

où u_r est le déplacement radial.

Le module de Poisson du PDMS étant égal à $1/2$ [188], nous pouvons écrire la contrainte sur les différentes coordonnées :

$$\begin{aligned} \sigma_{rr} &= \frac{4E}{3} (u_{rr} + u_{tt}) - P(r) \\ \sigma_{\theta\theta} &= \frac{4E}{3} \left(\frac{1}{2} u_{rr} + \frac{3}{2} u_{tt} \right) - P(r) = \sigma_{\phi\phi} = \sigma_{tt} \end{aligned}$$

L'équilibre des forces, projeté sur r , s'écrit :

$$\partial_r \sigma_{rr} + \frac{2}{r} (\sigma_{rr} - \sigma_{tt}) = 0$$

Cette équation se réécrit en fonction du déplacement :

$$\partial_{rr} u_r + \frac{2}{r} \partial_r u_r - \frac{2}{r^2} u_r = \partial_r P(r)$$

Le matériau est incompressible, ce qui impose que $\text{div } u_r = 0$. Ainsi, $\Delta P(r) = 0$, et la pression $P(r)$ dans le matériau s'écrit $P(r) = a + b/r$.

Nous recherchons des solutions de l'équation homogène en loi de puissance et trouvons que les puissances $+1$ et -2 sont solutions. La solution de cette équation est :

$$u_r = C_1 r + \frac{C_2}{r^2} + \frac{b}{2}$$

L'incompressibilité impose $b = 0$ et $C_1 = 0$. Nous notons $P(r) = a = P_0$. La contrainte radiale s'écrit :

$$\sigma_{rr} = -\frac{4E}{3} \frac{C_2}{r^3} - P_0$$

Les conditions aux limites s'écrivent

$$\sigma_{rr}(r = R_2) = -P \quad \text{et} \quad \sigma_{rr}(r = R_1) = -(P + \Delta P)$$

Nous calculons les coefficients dans l'approximation de membrane fine, et notons $R_1 \sim R_2 \sim R$, avec $R_2^3 - R_1^3 \sim 3eR^2$. Nous obtenons pour C_1 et C_2 dans ces conditions :

$$C_2 = \frac{R^4 \Delta P}{4eE}$$

$$P_0 = P - \frac{R}{e} \Delta P$$

nous permettant de calculer u_r .

Nous considérons maintenant une membrane circulaire de rayon r , déformée par une surpression ΔP d'un côté, comme schématisé sur la figure 8.3B. Si ses dimensions sont assez grandes devant son épaisseur, nous pouvons négliger les effets de bord, et assimiler sa déformation à celle de la sphère élastique. La déformation au centre h vaut dans ce cas $h = u_r(r = R)$. Ceci nous donne la relation suivante :

$$h = \frac{R^2 \Delta P}{4eE}$$

Or le premier terme est négligeable devant le second pour une membrane assez fine et/ou des déformations importantes. Le théorème de Pythagore nous permet de relier h, r et R :

$$R = \frac{h^2 + r^2}{2h} \sim \frac{r^2}{2h}$$

si les déformations sont petites devant la taille de la membrane (ce qui est notre cas). Ceci amène à la relation suivante :

$$h = \frac{\Delta P r^4}{16eEh^2}$$

que nous pouvons récrire :

$$h = \left(\frac{1}{16}\right)^{1/3} \frac{r^{4/3}}{(eE)^{1/3}} \Delta P^{1/3}$$

La déformation au niveau de la flèche de la membrane dépend donc de la suppression à la puissance $1/3$. Cette loi de puissance ajuste très bien nos données, pour une membrane rectangulaire. Le changement de géométrie de la membrane ne doit pas modifier la dépendance en pression, mais uniquement le pré-facteur. Il est également très probable que les dépendances en épaisseur et en module élastique E ne soient pas modifiées.

Bibliographie

- [1] Paul d'Égine. *Épitomé*, 625-690.
- [2] Haneveld GT. *Archivum Chirurgicum Neerlandicum*, 31, 1979.
- [3] Lusitanus A. *Venetis*, cent. 3, curat. 32, 1557.
- [4] Palmer JF traduit de l'anglais par Richelot G. *Oeuvres complètes de John Hunter*, part 1, 1839-1841, Paris.
- [5] Young S. *London*, 1815.
- [6] Récamier JCA. *Revue médicale*, 1, 1827.
- [7] Récamier JCA. *Recherches sur le traitement du cancer par la compression méthodique simple ou combinée, et sur l'histoire générale de la même maladie*, Paris, 1829.
- [8] Walshe WH. *The nature and treatment of cancer*, London, 1846.
- [9] Helmstein K. *Opuscula Medica*, 9, 1966.
- [10] England HR, Rigby C, Shephard BGF, Terisdder GC, and Blandy JP. *Br J of Urology*, 45, 1973.
- [11] van Swieten GLB. *Leiden*, 2, 1763.
- [12] Stylianopoulos et al. *Proc Natl Acad Sci*, 109, 2012.
- [13] Venugopalan G et al. *Mol Biol Cell*, 23, abstract numéro 1673, 2012.
- [14] Fritsch A et al. *Nat Phys*, 6, 2010.
- [15] Basan M, Risler T, Joanny JF, Sastre-Garau X, and Prost J. *HSFP J*, 4, 2009.
- [16] Paget S. *Lancet*, 1, 1889.
- [17] Liotta LA and Kohn EC. *Nature*, 411, 2001.
- [18] Mueller MM and Fusenig NE. *Nat Rev*, 4, 2004.
- [19] Dvorak HF, Senger DR, and Dvorak AM. *Cancer Metastasis Rev*, 2, 1983.
- [20] Sahai E et al. *Nat Rev Canc*, 10, 2007.
- [21] Fidler IJ, Gersten DM, and Hart IR. *Adv Canc Res*, 28, 1978.
- [22] Nicolson GL. *Biochem Biophys Acta*, 695, 1982.
- [23] Massagué J. *Nature*, 432, 2004.
- [24] Graham CF and Morgan RW. *Dev Biol*, 14, 1966.
- [25] Newport J and Kirshner M. *Cell*, 30, 1982.
- [26] Kane DA and Kimmel CB. *Development*.
- [27] Sibon OC, Stevenson VA, and Theurkauf WE. *Nature*, 388, 1997.
- [28] Bertran J. *Mol Aspects Med*, 21, 2000.

- [29] Aminetzach YT, Macpherson JM, and Petrov DA. *Science*, 309, 2005.
- [30] Burrus V and Waldor M. *Res Microbiol*, 2004.
- [31] Hengst L and Reed SI. *Curr Top Microbiol Immuno*, 227, 1998.
- [32] Yoon MK, Mitrea DM, and Ou L. *Biochem Soc Trans*, 40, 2012.
- [33] Levine AJ, Momand J, and Finlay CA. *Nature*, 351, 1991.
- [34] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, and Harris CC. *Science*, 253, 1991.
- [35] Kelly TJ and Brown GW. *Annu Rev Biochem*, 69, 2000.
- [36] Prasanth SG, Mendez J, Prasanth KV, and TStillman B. *Phil Trans R Soc Lond*, 359, 2004.
- [37] Knudson. *Proc Natl Acad Sci*, 68, 1971.
- [38] Chintagumpala M et al. *The Oncologist*, 12, 2007.
- [39] Stevaux O and Dyson NJ. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 2002.
- [40] Yao G et al. *Nat Cell Bio*, 10, 2008.
- [41] Morgan DO. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13, 1997.
- [42] Sherr CJ. *Cell*, 116, 2004.
- [43] Lentz NH, Georges LL, and Baldassare JJ. *Cell Cycle*, 2006.
- [44] Geng Y et al. *Cell*, 97, 1999.
- [45] Blain SW, Scher HI, Cordon-Cardo C, and Koff A. *Cancer Cell*, 3, 2003.
- [46] Accili D and Arden K C. *Cell*, 117, 2004.
- [47] Horvitz HR. *Chembiochem*, 4, 2003.
- [48] Hirsch T et al. *Oncogene*, 15, 1997.
- [49] Zeiss CJ. *Vet Pathol*, 40, 2003.
- [50] Elmore S. *Toxicol Pathol*, 35, 2007.
- [51] Bortner CD, Oldenburg NB, and Cidlowski JA. *Trends Cell Bio*, 5, 1995.
- [52] Erwig LP and Henson PM. *Cell Death Differ*, 15, 2008.
- [53] Henson PM and Hume DA. *Trends Immunol*, 27, 2006.
- [54] Miyashita T et al. *Oncogene*, 9, 1994.
- [55] Pietenpol JA and Stewart ZA. *Toxicology*, 181, 2002.
- [56] Wieler S, Gagné JP, Vaziri H, Poirier GG, and Benchimol S. *J of Biol Chem*, 278, 2003.
- [57] Geske FJ and Lazaro EG. *Human Pathol*, 32, 2001.
- [58] Elliot MR et al. *Nature*, 461, 2009.
- [59] Brown S et al. *Nature*, 418, 2002.
- [60] Silver MT. *FEBS Lett*, 584, 2010.
- [61] Uller L, Persson CG, and Erjefalt JS. *Trends Pharmacol Sci*, 27, 2006.
- [62] Tabas I. *Cell Death Differ*, 11, 2004.
- [63] Carmeliet P and Jain RK. *Nature*, 407, 2000.
- [64] Semenza GL. *Curr Opin Genet Dev*, 8, 1998.
- [65] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, and Semenza GL. *Proc Natl Acad Sci*, 92, 1995.
- [66] Carmeliet P et al. *Nature*, 394, 1998.

- [67] Pugh CW and Ratcliffe PJ. *Nat Med*, 6, 2003.
- [68] Bao Y et al. *Cancer Research*, 2013.
- [69] Werner S and Grose R. *Physiol Rev*, 83, 2003.
- [70] Zitvogel L et al. *Adv Immunol*, 84, 2004.
- [71] Skobe M, Rockwell P, Goldstein N, Vosseler S, and Fusening NE. *Nat Med*, 3, 1997.
- [72] Jain RK. *Science*, 307, 2005.
- [73] Micke P and Östman A. *Lung Cancer*, 45, 2004.
- [74] Gabbiani G, Ryan GB, and Majne G. *Experientia*, 27, 1971.
- [75] Shao ZM, NGuyen M, and Barsky SH. *Oncogene*, 19, 2000.
- [76] Chauhan H et al. *J Clin Pathol*, 56, 2003.
- [77] Olumi AF et al. *Cancer Res*, 59, 1999.
- [78] Skobe M and Fusening NE. *Proc Natl Acad Sci*, 95, 1998.
- [79] Willis RA. Pathology of tumor. pages 135–140, 1960.
- [80] De Wever O and Mareel M. *J Pathol*, 200, 2000.
- [81] Hay ED. *Cell Biology of Extracellular Matrix*, Session plénière, 1982.
- [82] Yamada KM et al. *J Cell Biochem*, 28, 1985.
- [83] Martinez-Hernandez A and Amenta PS. *Lab Invest*, 48, 1983.
- [84] Liotta LA, Nageswara Rao C, and Wewer UM. *Ann Rev Biochem*, 55, 1986.
- [85] Duc-Goiran P et al. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 83, 1999.
- [86] Hughes SM and Blau HM. *Nature*, 345, 1990.
- [87] Poelman RE et al. *Anat Embryol*, 182, 1990.
- [88] Sherwood DR. *Trends in Cell Bio*, 16, 2006.
- [89] Hagedorn EJ and Sherwood DR. *Curr Opin Cell Bio*, 23, 2011.
- [90] Sherwood DR. *Communication personnelle*.
- [91] Besson A, Gurian-West M, Schmidt A, Hall A, and Roberts JM. *Genes Dev*, 18, 2004.
- [92] Starz-Gaiano P and Montell DJ. *Eur Opin Genet Dev*, 14, 2004.
- [93] Balkwill F. *Nat Rev Canc*, 4, 2004.
- [94] Autebert J et al. *Methods*, 57, 2012.
- [95] Luzzi KJ et al. *Am J of Path*, 153, 1998.
- [96] Chambers AF. *Nat Rev Canc*, 2, 2002.
- [97] Bissell MJ and Hines WC. *Nat Med*, 17, 2011.
- [98] Mendez MG and Janney PA. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 2012.
- [99] Huang H, Kamm RD, and Lee RT. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, 2004.
- [100] Farge E. *Curr Biol*, 13, 2003.
- [101] Chen et al. *Bone*, 33, 2003.
- [102] Zhao B, Tumaneng K, and Guan KL. *Nat Cell Bio*, 13, 2011.
- [103] Morgan JT, Murphy CJ, and Russell P. *Exp Eye Res*, 115, 2013.
- [104] Stanger BZ. *Genes Dev*, 26, 2012.
- [105] Dupont et al. *Nature*, 474, 2011.

- [106] Wada KI, Itoga K, Okano T, Yonemura S, and Sasaki H. *Dev*, 138, 2011.
- [107] Huang S, Chen CS, and Ingber DE. *Mol Biol of the Cell*, 9, 1998.
- [108] Klein EA et al. *Curr Biol*, 19, 2009.
- [109] Whitehead J et al. *HSFP J*, 5, 2008.
- [110] Tsukamoto K et al. *Am J Physiol*, 293, 2007.
- [111] Helmlinger G, Netti PA, Lichtenbeld HC, Melder RJ, and Jain RK. *Nat Biotech*, 15, 1997.
- [112] Cheng G, Tse J, Jain RK, and Munn LL. *Plos One*, 4, 2009.
- [113] Phillips HM and Steinberg MS. *J Cell Sci*, 30, 1978.
- [114] Phillips HM, Steinberg MS, and Lipton BH. *Dev Biol*, 59, 1977.
- [115] Marmottant P et al. *Proc Natl Acad Sci*, 106, 2009.
- [116] Gonzalez-Rodriguez D et al. *Science*, 910, 2012.
- [117] Gonzalez-Rodriguez D et al. *Soft Matter*, 9, 2013.
- [118] Foty RA, Pflieger CM, Forgacs G, and Steinberg MS. *Dev*, 122, 1996.
- [119] Forgacs G, Foty RA, Shafir Y, and Steinberg MS. *Biophys J*, 74, 1998.
- [120] Mgharbel A, DElanoë-Ayari H, and Rieu JP. *HSFP J*, 3, 2013.
- [121] Ranft J et al. *Proc Natl Aca Sci*, 107, 2010.
- [122] Sutherland RM. *JNCI J Natl Cancer Inst*, 46, 1971.
- [123] Friedrich J, Seidel C, Elnor R, and Kunz-Schughart LA. *Nat Protocol*, 4, 2009.
- [124] Rodriguez Enriquez et al. *J Cell Physiol*, 216, 2008.
- [125] Durek C et al. *J Urol*, 162, 1999.
- [126] Bingle L, Lewis CE, Corke KP, Reed MW, and Brown NJ. *Br J Canc*, 94, 2006.
- [127] Laurent J et al. *BM Cancer*, 2013.
- [128] Furukawa KS et al. *Cell Transplantation*, 10, 2001.
- [129] Timmins NE and Nielsen LK. *Methods Mol Med*, 140, 2007.
- [130] Mueller-Klieser W and Kunz-Schughart LA. *J Biotechnol*, 148, 2010.
- [131] Hirschhaeuser F et al. *J of Biotech*, 148, 2010.
- [132] Baish JW et al. *Proc Natl Aca Sci*, 108, 2010.
- [133] Montel F Delarue M et al. *Phys Rev Lett*, 107, 2011.
- [134] Montel F Delarue M et al. *New J of Physics*, 14, 2012.
- [135] Feng L et al. *Advanced Material*, 14, 2002.
- [136] Bonnet-Gonnet C, Belloni L, and Cabane B. *Langmuir*, 10, 1994.
- [137] Bouchoux A, Cayemite PE, JArdin J, Gesan-Guizon G, and Cabane B. *Biophys J*, 96, 2009.
- [138] Freyer JP and Sutherland RM. *J of Cellular Physiol*, 124, 1985.
- [139] Freyer JP and Sutherland RM. *Cancer Res*, 46, 1986.
- [140] Freyer JP. *Cancer Res*, 48, 1988.
- [141] Drado D and Höhme S. *Physical Biology*, 2, 2005.
- [142] Joaquin M et al. *The EBMO J*, 31, 2012.
- [143] Manning ML, Foty RA, Steinberg MS, and Schoetz EM. *Proc Natl Aca Sci*, 107, 2010.

- [144] Santini MT, Rainaldi G, and Indovina PL. *Oncology Hematology*, 36, 2000.
- [145] Endl E and Gerdes J. *Exp Cell Res*, 257, 2000.
- [146] Bertalanffy LV. *Q Rev Biol*, 32, 1957.
- [147] Jorgensen P and Tyers M. *Curr Bio*, 14, 2004.
- [148] Kunda P, Pelling AE, Liu T, and Baum B. *Curr Bio*, 18, 2008.
- [149] Piel M. *Communication personnelle*.
- [150] Darzynkiewicz Z. *Curr Protoc Cytom*, 56, 2011.
- [151] Connel-Crowley L, Elledge SJ, and Harper JW. *Curr Bio*, 8, 1998.
- [152] Darzynkiewicz Z. *Curr Protoc Cytom*, 7.5.1, 1997.
- [153] Broude EV et al. *Oncogene*, 26, 2007.
- [154] Lentz NH, George LL, and Baldassare JJ. *Cell Cycle*, 2006.
- [155] Bendinelli P et al. *Eu J Canc*, 48, 2013.
- [156] Chen CS et al. *Science*, 276, 1997.
- [157] Echave P, Conlon J, and Lloyd AC. *Cell Cycle*, 6, 2007.
- [158] Dolznig H, Grebien F, Sauer T, Beug H, and Müllner EW. *Nat Cell Bio*, 6, 2004.
- [159] Asaoka Y, Nakamura SI, Yoshida K, and Nishizuka Y. *Tr Biochem Sci*, 17, 1992.
- [160] Mauro A et al. *J Cell Sci*, 115, 2002.
- [161] De Vita F et al. *Cell Cycle*, 11, 2012.
- [162] Dumitru CA et al. *J Leukocyte Bio*, 91, 2012.
- [163] Ard R et al. *Mol Biol Cell*, 23, 2012.
- [164] Essers MAG et al. *EMBO J*, 23, 2004.
- [165] Pardee AB. *Science*, 246, 1989.
- [166] Toyama Y, Peralta XG, Wells AR, Kiehart DP, and Edwards GS. *Science*, 321, 2011.
- [167] Pouille P, Ahmadi P, Brunet A, and Farge E. *Science Signalling*, 2, 2009.
- [168] Kaur P and Potten C. *Cell Tissue Kinet*, a, 1986.
- [169] Roussos ET, Condeelis JS, and Patsialou A. *Nat Rev Canc*, 11, 2011.
- [170] Condeelis J and Seegal JE. *Nat Rev Canc*, 3, 2003.
- [171] Delarue M et al. *Phys Rev Lett*, 110, 2013.
- [172] Dorie Mj et al. *Exp Cell Res*, 141, 1982.
- [173] Dorie Mj, Kallman RF, and Coyne MA. *Exp Cell Res*, 166, 1986.
- [174] Georgelin T, Bombard S, and Siaugue JM. *Angew Chem Int Ed*, 49, 2010.
- [175] Pettet GJ, Please CP, and Tindall MJ. *Bull Math Biol*, 63, 2001.
- [176] Tse et al. *Proc Ntle Acad Sci*, 109, 2012.
- [177] Yang Y, Motte S, and Kaufman LJ. *Biomaterials*, 31, 2010.
- [178] Belder AN. *Amersham Bioscience Handbook*.
- [179] Condeelis J, Singer RH, and Seegal JE. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 2005.
- [180] Alessandri K et al. *Proc Natl Acad Sci*, accepté pour publication, 2013.
- [181] Cox ME and Dunn B. *J Pol Sci*, 24, 1986.
- [182] Baehrecke EH. *Nat Cell bio*, 6, 2005.

-
- [183] Lum JJ, De Buardinis RJ, and Thompson CB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 2005.
- [184] Liang et al. *Nat Cell Bio*, 9, 2007.
- [185] van Burden HE, von der Hoff JW, Torensma R, Maltha JC, and Skuijpers-Jagman AM. *J Dent Res*, 84, 2005.
- [186] Dvorak HF. *N Engl J Med*, 315, 1986.
- [187] Montel F, Fontaine E, St-JEan P, Castelnovo M, and Faivre-Moskalenko C. *Biophys J*, 96, 2007.
- [188] Polymer Data Handbook.