



HAL
open science

Pertinence et limites des tensions de surface et de ligne pour rendre compte des formes des cellules épithéliales

Nicolas Harmand

► **To cite this version:**

Nicolas Harmand. Pertinence et limites des tensions de surface et de ligne pour rendre compte des formes des cellules épithéliales. Physique [physics]. Université Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019UNIP7002 . tel-02892746

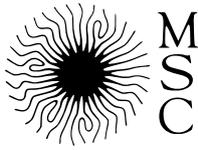
HAL Id: tel-02892746

<https://theses.hal.science/tel-02892746v1>

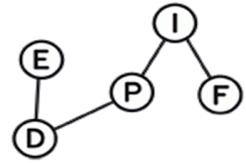
Submitted on 7 Jul 2020

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.



université
PARIS
DIDEROT
PARIS 7



THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Paris,

Discipline : **Physique**

Laboratoire Matière et Systèmes Complexes

École Doctorale de Physique en Île-de-France

Présentée et soutenue publiquement le 29 novembre 2019

par **Nicolas Harmand**

Pertinence et limites des tensions de surface et de ligne pour rendre compte des formes de cellules épithéliales

Directrice de Thèse : Sylvie HÉNON

Devant la commission d'examen formée de :

M.	Jean-François JOANNY	<i>Collège de France</i>	Président
Mme.	Hélène DELANOË-AYARI	<i>Université Claude Bernard</i>	Rapportrice
M.	Guillaume CHARRAS	<i>University College London</i>	Rapporteur
Mme.	Olivia DU ROURE	<i>CNRS</i>	Examinatrice
M.	Raphaël CLÉMENT	<i>CNRS</i>	Examinateur
Mme.	Sylvie HÉNON	<i>Université Paris Diderot</i>	Directrice



Except where otherwise noted, this is work licensed under <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Laboratoire Matière et
Systèmes Complexes
10 rue Alice Domon et
Léonie Duquet
75013 Paris

École Doctorale de Physique
en Île-de-France
24 rue Lhomond
75005 Paris

Remerciements

Ce travail de thèse a été le fruit de l'interaction entre beaucoup de personnes, et je voudrais les remercier ici. Ces remerciements ont deux objectifs. Le premier est d'exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui m'ont accompagné pendant ces trois années de travail et le deuxième est de donner un aperçu au lecteur de l'importance des relations humaines que l'on entretient pour mener à bien un tel travail.

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse, et en premier lieu Hélène Delanoë-Ayari et Guillaume Charras, les rapporteurs de cette thèse, qui ont lu en détail ce manuscrit et y ont apporté des commentaires très intéressants et constructifs. Merci aux autres membres du jury : Jean-François Joanny qui m'a fait découvrir la physique statistique et, plus tard, la mécanique du vivant en cours à l'ESPCI et qui a grandement participé à mon choix d'étudier ce sujet. Olivia du Roure, avec qui j'ai pu interagir plusieurs fois au cours de ma thèse, toujours de façon sympathique et constructive, et qui faisait partie du jury qui m'a accordé mon financement doctoral, dès la genèse de ce projet. Je la remercie également de s'être arrangée, malgré les difficultés et imprévus, pour venir assister à ma soutenance. Enfin, Raphaël Clément, que j'ai rencontré en conférence et avec qui j'ai eu des discussions fructueuses, notamment concernant l'inférence de force. Enfin, à tous les membres du jury, je voudrais dire merci pour la discussion qui a suivi la soutenance, qui fût très intense et très intéressante.

Je voudrais aussi remercier les professeurs qui ont façonné mon parcours intellectuel pour m'amener à étudier ce sujet de thèse. Tout d'abord, mes professeurs de physique de classe préparatoire, M. Castelnau et M. Lepez qui m'ont donné le goût pour cette matière et ne se sont jamais satisfaits de mes résultats ! Ensuite, arrivé à l'ESPCI, Pascale Dupuis-Williams m'a fait réaliser à quel point le monde vivant était un monde merveilleux à explorer pour le physicien. Manu Prakash m'a ensuite partagé son extraordinaire engouement pour la biophysique qui ne m'a alors plus lâché.

Je voudrais remercier chaleureusement Sylvie Hénon, qui m'a accepté, il y a presque 4 ans, en stage de M2, ce qui fut le début de cette aventure. Du début de ce stage à la fin de

cette thèse, Sylvie a su m'encadrer exactement comme il fallait. Ni trop proche de ce que je faisais pour me laisser m'exprimer, ni trop éloignée afin de me porter assistance lorsque j'étais un peu perdu, avec des idées toujours fructueuses pour me débloquer. Trouver cette distance idéale est, il me semble, très difficile et je voudrais lui exprimer toute ma reconnaissance pour cet accompagnement.

Merci également à tout le laboratoire MSC, qui a été un lieu idéal pour s'épanouir pendant cette thèse. Merci à Alain, qui m'a accompagné tout au long de mon travail, et notamment au début lorsqu'il s'agissait de m'apprendre la culture cellulaire, mais aussi pour toutes ces discussions, parfois enrichissantes et parfois simplement déconnantes qu'on a pu avoir lors des repas du midi ou dans les couloirs du laboratoire. Merci à David qui m'a aussi bien épaulé pendant le début de ma thèse, et avec qui les débats scientifiques et moins scientifiques sont toujours de haute volée! Merci à la branche parisienne du RILCAS dont le président (à renverser), Tom, a été d'un soutien sans faille pendant cette thèse, avec qui l'on discute de tout et de rien avec un grand plaisir, et ma soeur de thèse, Sara, avec qui on a partagé nos gloires et nos misères jusqu'au bout. Merci également au bureau 767A, au sein duquel j'ai fait mes débuts dans le laboratoire et notamment Alice pour sa camaraderie, Aurore qui nous donnait tous les jours une aide formidable sous la forme d'un sourire plein d'énergie, Lorraine qui était toujours plein de soutien et Zejun qui remplissait le bureau d'une énergie stimulante. Merci aussi à Jean-Louis qui n'a eu de cesse de me faire pencher à gauche, même si je ne suis pas encore prêt à me renverser complètement. Mon bureau suivant, le 454A a été tout aussi agréable : Étienne avec qui l'on peut toujours avoir une conversation sympathique, Darius qui apporte toujours son grain de sel dans le bureau avec ses extravagances et ses tours de magie stupéfiants, Sophie, Ghid, Martin qui sont les membres du LIED avec qui l'on partage ce bureau et qui sont toujours sympathiques. Mon regret est de ne pas avoir accepté suffisamment leurs invitations à une petite bière après la journée pour profiter de leur compagnie. Les autres copains de MSC qui ont été d'un grand soutien : Chatoune, Mélina, Alex, Florian Vicky, Val, Dimitrije, Rémy, Solène, Sham, Hélène ou encore Camille, merci à vous!

Merci aussi à tous les membres du laboratoire avec qui j'ai pu avoir des discussions fructueuses pour mon travail de thèse, et notamment François Graner, Andrew Callan-Jones, Jean-Baptiste Fournier, Julien Dervaux, Cyprien Gay, François Gallet, et Atef Asnacios qui m'a donné sa confiance. Merci aux membres de mon comité de thèse, Pierre Sens et Adrian Daer pour avoir bien voulu faire ces points d'étapes importants avec moi. Merci à Christophe Poulard pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et qui a pris le temps de me former sur sa manip de fabrication des substrats à profil sinusoidal. Merci à la plateforme d'imagerie ImagoSeine, chez qui j'ai fait la plupart de mes images de microscopie confocale pendant ma thèse. Merci aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer

pendant ma thèse, Damien et Vanessa, ça a été une expérience très enrichissante. Merci également aux membres du laboratoire qui participent tous les jours à le faire fonctionner correctement, et notamment le service informatique avec Jean, Patrick et Wilfrid, mais aussi l'administration avec Carole et Lucie qui m'ont toujours facilité la tâche autant que possible.

Au cours de cette thèse, j'ai eu l'occasion de découvrir le monde de l'enseignement au sein de l'équipe des TP de Matlab à l'ESPCI, ce qui fût très enrichissant. Un grand merci à eux, qui ont rendu cette expérience très agréable, et notamment à la cheffe de cet orchestre, Isabelle Rivals.

Je remercie toutes les personnes en dehors du laboratoire qui m'ont soutenu pendant cette thèse et parfois bien avant. Un grand merci aux rois de la glisse : Bibi, Romain et Minh, avec qui on a toujours pu partager nos déboires de thésards. La bande des globe-trotteurs, Adrien, Marion, Claire et Manu, avec qui j'ai pu prendre des pauses revigorantes pendant cette thèse. Merci aussi à mes compagnons de jeux : Votte, Ervan et Tiny.

Enfin, merci à ma famille qui a été d'un soutien sans faille pendant toutes ces années. Merci à Maman, Papa et Sarah pour l'écoute et la confiance que vous m'avez accordées. Merci à Élodie, sans qui je n'aurai probablement pas pu y arriver, qui a su encaisser tous mes coups de moins bien en m'apaisant et célébrer avec moi toutes les réussites que j'ai pu avoir pendant ces 3 années de thèse.

Table des matières

Avant-propos	1
1 Introduction	5
1.1 Les épithéliums et leur environnement biologique	5
1.1.1 Les types d'épithéliums	6
1.1.2 L'embryogenèse	10
1.2 Les cellules épithéliales	14
1.2.1 La membrane plasmique	14
1.2.2 Le cytosquelette	15
1.2.3 Les moteurs moléculaires du cytosquelette	22
1.2.4 Les adhésions	26
1.3 Approches physiques	29
1.3.1 Approches expérimentales	33
1.3.2 Approches théoriques	36
2 Méthodes expérimentales	43
2.1 Choix expérimentaux généraux	43
2.1.1 Système biologique	43
2.1.2 Imagerie	47
2.2 Cellules épithéliales cultivées sur un substrat à profil sinusoïdal	55
2.2.1 Fabrication des substrats à profil sinusoïdal	55
2.2.2 Montage mis en œuvre	57
2.3 Analyse d'image	58
2.3.1 Analyse d'image sur substrat à profil sinusoïdal	58
2.3.2 Analyse d'image sur substrat plat	61
3 Modélisations cellulaire et continue	65
3.1 Géométrie du problème et hypothèses de calcul	65
3.1.1 Substrat plat	67
3.1.2 Substrat courbé	68
3.2 Modèles pour l'énergie de la cellule	71

3.2.1	Énergies de surface	71
3.2.2	Tension de ligne	73
3.2.3	Confinement	74
3.3	Modélisation continue	76
4	Influence de la courbure du substrat sur la forme des cellules épithéliales	79
4.1	Hauteur des cellules	79
4.1.1	Résultats	79
4.1.2	Comparaison avec les prédictions théoriques	86
4.2	Influence de l'expression des E-Cadhérines	90
4.2.1	Résultats	90
4.2.2	Comparaison avec les prédictions théoriques	90
4.3	Influence de l'activité des myosines	92
4.3.1	Résultats	93
4.3.2	Comparaison avec les prédictions théoriques	94
4.3.3	Le profil d'énergie	97
4.3.4	Répartition des noyaux cellulaires	100
4.3.5	Test de la modélisation continue	101
4.3.6	Ponts épithéliaux	104
5	Inférence de force en 3D	107
5.1	Mise en œuvre	107
5.1.1	Dans le plan de l'épithélium	108
5.1.2	Dans la direction apico-basale	116
5.2	Résultats	119
5.2.1	Cartes de tensions dans le plan de l'épithélium	119
5.2.2	Dans la direction apico-basale	122
5.2.3	Carte des pressions	129
5.2.4	In-vivo	133
	Conclusion	135
	A Données complémentaires pour l'inférence de force	139
	Bibliographie	145

Avant-propos

On peut en observer tous les jours, certains sont banals tandis que d'autres sont perçus comme extraordinaires, certains sont considérés comme de la nourriture, d'autres sont vus comme des nuisibles et enfin, quelques-uns sont jugés dignes d'interactions sociales. Les êtres vivants fascinent les hommes et pas seulement pour l'utilité qu'ils en tirent. Ils sont fascinants par leur diversité, mais aussi par leurs points communs, leur unité. C'est cette altérité, ni trop grande, ni trop faible, qui rend le monde biologique aussi attrayant pour les esprits curieux. La diversité du vivant se manifeste notamment par les différences morphologiques entre les espèces. Dans ce travail de thèse, la démarche a été de chercher des principes généraux qui peuvent rendre compte de l'extraordinaire diversité morphologique observée au sein du vivant. L'approche du physicien est réductionniste, et cela s'applique également au monde vivant. Cependant, il faut prendre garde à ne pas être trop ambitieux dans cette approche : rendre compte de la diversité morphologique de l'ensemble des êtres vivants avec une théorie est, bien évidemment, complètement illusoire. Il faut donc fixer des limites qui soient raisonnables pour ces travaux. Par raisonnables, on entend qu'il faut que l'objet d'étude soit suffisamment restreint pour ne pas tomber dans l'écueil de la simplification excessive d'un système qui a un niveau de complexité très élevé, empêchant ainsi de tirer des conclusions qui soient utiles à la compréhension. Il faut aussi que l'objet d'étude soit suffisamment général afin d'essayer d'étendre la compréhension de la morphologie des êtres vivants au-delà d'un cas particulier.

Pour comprendre la morphologie des êtres vivants, on peut se placer à différentes échelles. En effet, on peut comprendre la forme d'un animal en l'étudiant à une échelle macroscopique, à la lumière de la théorie de l'évolution notamment. Il s'agira alors d'associer une caractéristique morphologique à une fonction comme la forme des ailes pour les oiseaux ou la morphologie des poissons pour la nage. Cette approche a certains succès même si toutes les caractéristiques morphologiques macroscopiques ne sont pas associées à des fonctions. On peut aussi travailler à des échelles nanométriques en cherchant la structure des molécules qui constituent les êtres vivants. De ces découvertes aux échelles

moléculaires on peut alors tenter de comprendre successivement la morphologie des constituants de plus grande taille, les cellules qui constituent des tissus, qui eux-mêmes forment des organes fonctionnels pour un être vivant complet.

On choisit de se placer à une de ces échelles intermédiaires : celle de la cellule. Étudier une échelle intermédiaire est très intéressant car cela oblige à prendre en compte des données de toutes les échelles connexes. Il faut pouvoir à la fois intégrer les concepts des échelles de longueurs inférieures tout en étant capable de rendre compte des observations faites aux échelles de longueur supérieures. De plus, la cellule étant la brique élémentaire commune à tous les êtres vivants, cet objet d'étude ne souffre pas de perte de généralité.

On va donc essayer de comprendre comment les cellules acquièrent leur forme. Mais certaines cellules sont très différentes d'autres, de par leur forme mais aussi leur structure interne et leur composition. On va donc se restreindre à un seul type de cellules : les cellules épithéliales. De plus, les cellules épithéliales ne concernent que les animaux ce qui exclut la majorité du monde vivant. Ces cellules constituent les tissus épithéliaux qui tapissent l'extérieur des organes des animaux : ils ont un rôle, entre autres, de barrière entre l'intérieur et l'extérieur d'un organisme. Pour remplir ce rôle, les cellules épithéliales sont collées les unes aux autres dans ces tissus. Cette propriété a amené D'Arcy Thompson, en 1917 [1] à dresser une analogie entre les tissus épithéliaux et un système physique beaucoup plus simple : les mousses liquides. En effet, il y a une ressemblance morphologique frappante entre ces tissus et une mousse de savon par exemple, pour laquelle les bulles d'air seraient des cellules. De cette analogie a découlé une approche physique qui vise à rendre compte de la forme des cellules épithéliales avec les outils que l'on a pour les mousses liquides.

Le but de cette thèse est d'explorer les limites de cette approche et les raffinements qu'on peut lui apporter pour comprendre comment les cellules épithéliales acquièrent leur forme, en ayant une approche à la fois expérimentale et théorique. On l'a scindée en cinq chapitres.

Le premier chapitre est une introduction du sujet. On commencera par présenter les tissus épithéliaux et leur rôle, en accordant également une place aux processus morphogénétiques qui mettent en jeu ces tissus. On décrira ensuite les constituants biologiques des cellules épithéliales, en insistant sur les plus importants pour comprendre la forme des cellules : la membrane plasmique, le cytosquelette et les moteurs moléculaires. On discutera également des adhésions formées par les cellules épithéliales, qu'elles soient entre deux cellules ou entre une cellule et son substrat. On présentera enfin les approches physiques qui ont été mises en œuvre, notamment les mesures des paramètres physiques des cellules et les modèles qui sont proposés pour rendre compte de la forme des cellules épithéliales. Ce chapitre a donc vocation à être une ressource utile à un futur apprenti-chercheur qui

commence à travailler sur ce vaste sujet.

Le deuxième chapitre vise à présenter les méthodes expérimentales mises en œuvre. Le but est ici d'en faire un chapitre auquel on pourra se référer pour tout le reste du manuscrit lorsqu'un détail expérimental sera demandé. Il a été néanmoins rédigé de façon à expliquer la démarche qui a amené à faire les choix expérimentaux qui ont été faits, et regroupe tout ce qu'un futur apprenti-chercheur voudra savoir avant de commencer un travail expérimental dans la continuité de celui présenté dans cette thèse. Il couvre les choix expérimentaux qui ont été faits concernant le système biologique utilisé, les méthodes de prise d'images, la microfabrication des substrats utilisés et les méthodes d'analyse d'images que l'on a mises en œuvre.

Le troisième chapitre présente le modèle que l'on a développé pour rendre compte des données expérimentales. Les hypothèses et les étapes des calculs y sont détaillées pour qu'ils puissent être reproduits sans information supplémentaire. On y présente un modèle cellulaire et un modèle continu de la forme des cellules sur un substrat courbé.

Le quatrième chapitre présente les résultats expérimentaux obtenus sur la forme des cellules sur un substrat courbé. On y détaille les mesures obtenues et l'analyse de ces mesures à la lumière des modèles présentés dans le chapitre de modélisation. On verra également les résultats obtenus si on a une altération biologique des jonctions intercellulaires ou de l'activité des cellules. On y présentera enfin des résultats plus préliminaires concernant le décollement des cellules du substrat.

Le cinquième et dernier chapitre concerne une méthode numérique d'analyse des tensions mises en jeu dans l'épithélium : l'inférence de force. On en présente le principe algorithmique et d'analyse d'image pour ensuite l'appliquer à nos échantillons expérimentaux.

Introduction

Le vrai point d'honneur d'un scientifique n'est pas d'être toujours dans le vrai. Il est d'oser, de proposer des idées neuves, et ensuite de les vérifier.

Pierre-Gilles de Gennes

En biologie comme en physique, les échelles de longueur auxquelles le scientifique est confronté ont une importance capitale. Et oui, toute théorie est vraie... dans son domaine de validité! Bien sûr, le domaine de validité d'une théorie ne correspond pas uniquement à l'échelle de longueur considérée mais également à la nature des objets étudiés par cette théorie. On va donc s'attacher à préciser ces deux aspects dans cette introduction en exposant ce qui constitue une cellule épithéliale (échelle de longueur inférieure) et ce à quoi elle est exposée dans son environnement (échelle de longueur supérieure). Enfin, on s'intéressera aux approches physiques cherchant à comprendre la forme des cellules épithéliales.

1.1 Les épithéliums et leur environnement biologique

On va expliciter ici les ensembles que peuvent former un groupe de cellules épithéliales : les tissus. On se situe donc dans les échelles de longueur allant de la dizaine de micromètres (une cellule) au centimètre soit la gamme allant de la cellule unique au tissu représentée sur la figure 1.1.

Pour illustrer ce que sont les tissus épithéliaux, on va donner des exemples de tissus présents dans des organismes matures et qui constituent les organes de notre corps d'être humain. On va aussi discuter du cas de l'embryogenèse, processus qui met en jeu des

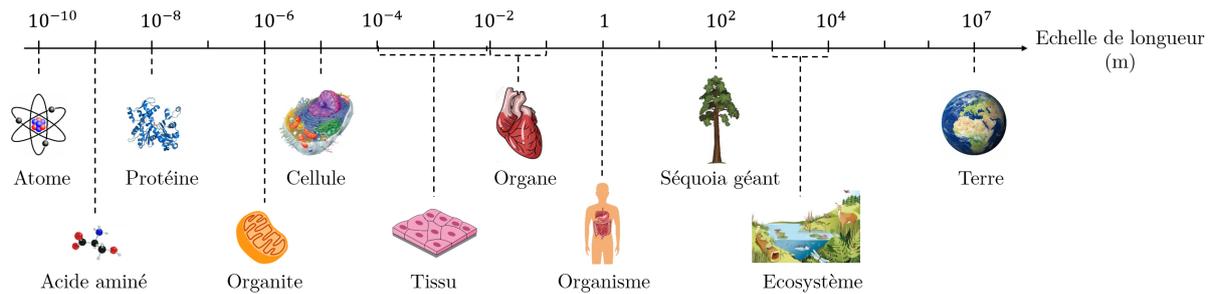


FIGURE 1.1 – Les échelles de longueur en biologie. Le cœur de l'étude proposée ici est à l'échelle de longueur de la cellule soit une dizaine de microns. Toutefois, les échelles de longueurs de la protéine ($\sim 10^{-8}\text{m}$) au tissu ($\sim 10^{-4} - 10^{-2}\text{m}$) pourront être pertinentes pour appréhender ces travaux.

tissus épithéliaux de façon prédominante.

1.1.1 Les types d'épithéliums

Chez les animaux, on distingue quatre grands types de tissus biologiques : les tissus musculaires, les tissus nerveux, les tissus conjonctifs et les tissus épithéliaux. On ne s'attardera ici que sur les tissus épithéliaux même si on évoquera l'organisation des tissus musculaires dans la section relative au cytosquelette d'actine.

Les tissus épithéliaux sont caractérisés par le fait que les cellules qui les composent sont au contact les unes des autres de façon à ce qu'il n'y ait pas de matrice extracellulaire entre chaque cellule, au contraire des tissus conjonctifs pour lesquels les cellules sont toutes séparées par la matrice extracellulaire. Cette propriété rend les tissus épithéliaux particulièrement efficaces pour remplir leur fonction principale dans l'organisme : être un revêtement entre l'intérieur et l'extérieur des organes. Ainsi, c'est un tissu épithélial qui compose la peau mais aussi qui tapisse l'intérieur des vaisseaux sanguins, de l'œsophage ou de l'intestin. Cette fonction de revêtement entre l'intérieur et l'extérieur ne consiste pas à faire office de barrière hermétique mais plutôt d'être capable de laisser passer certaines molécules bien choisies. Il s'agit également pour l'épithélium de pouvoir capter l'état de son environnement (mécanique ou chimique) pour le reste du corps et également d'assurer l'intégrité mécanique de l'organe qu'il recouvre.

Des épithéliums bien particuliers ont des fonctions supplémentaires. Les glandes, par exemples, ont des fonctions de sécrétions d'hormones. On peut citer aussi les épithéliums ciliés, du système respiratoire par exemple, qui ont une fonction de mise en mouvement d'un fluide ou de capteur à l'aide du battement de leurs cils. On ne développera pas ces fonctions particulières dans la suite du chapitre.

Afin de classer les tissus épithéliaux, on les distingue selon deux critères : la forme des cellules qui les composent et leur agencement.

Les cellules épithéliales très étalées sur leur substrat, c'est-à-dire dont leur longueur caractéristique dans le plan du substrat est plus grande que leur longueur caractéristique dans la direction orthogonale au substrat, sont appelées pavimenteuses (*squamous* en anglais). Elles sont représentées en (A) et (E) sur la figure 1.2. Lorsque les cellules ont des longueurs caractéristiques comparables dans toutes les directions, on les appelle cuboïdales. Elles sont représentées en (B) sur la figure 1.2. Enfin, lorsque les cellules sont plutôt plus hautes que larges, à l'inverse des cellules pavimenteuses, on les appelle colonnaires. Elles sont représentées en (C) et (D) sur la figure 1.2.

Le deuxième critère est l'agencement et ici il y a deux cas possibles. Si les cellules sont organisées en mono-couche, c'est-à-dire que toutes les cellules du tissu vont être en contact avec le substrat et avec le milieu extérieur ou la lumière¹ (*lumen* en latin), l'épithélium est dit simple. On en voit un schéma en (A) et (B) sur la figure 1.2. Si les cellules sont organisées en plusieurs couches, l'épithélium est dit stratifié, représenté en (E) sur la figure 1.2. On distingue aussi le cas intermédiaire de l'épithélium pseudo-stratifié, en (D) sur la figure 1.2.

Ces critères sont illustrés dans le schéma de la figure 1.2

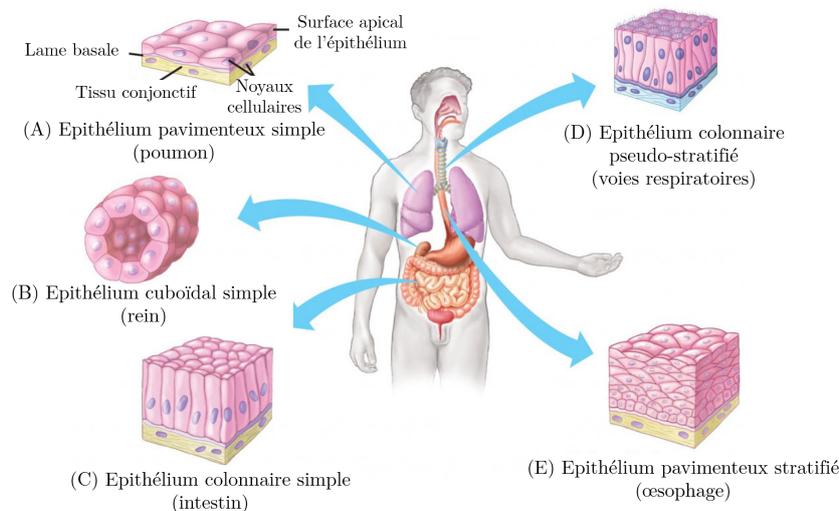


FIGURE 1.2 – Schéma représentant les différents types de tissus épithéliaux dans le corps humain. On y voit les trois organisations que peuvent prendre ces tissus (simples, stratifiés et pseudo-stratifiés) et les trois classes de formes que peuvent prendre les cellules (pavimenteuses, cuboïdales et colonnaires). Copyright 2009, Pearson Education Inc.

On va présenter ici quelques exemples afin d'illustrer ce que sont ces épithéliums dans un organisme comme le corps humain.

1. La lumière correspond à l'intérieur d'un tube en biologie

Épithéliums stratifiés

En étant stratifié, le tissu épithélial acquiert une meilleure résistance à des contraintes venant de l'extérieur, qu'elles soient mécaniques ou chimiques. De ce fait, on trouvera plus souvent des épithéliums stratifiés dans des zones fortement sollicitées.

Un cas extrême est la peau, plus précisément l'épiderme, où les agressions infligées par le monde extérieur au tissu peuvent être de natures très variées et avec des intensités parfois grandes. Pour se protéger encore mieux qu'avec un épithélium stratifié classique, l'épiderme est kératinisé. Cela signifie qu'il est composé d'une couche externe de cellules mortes, sans noyau ni cytoplasme mais très riche en kératine, un filament intermédiaire dont on parlera dans la section dédiée. Cette couche de cellules kératinisées rend même la peau largement imperméable, ce qui donne à l'épiderme un rôle très marqué de barrière contre le monde extérieur. Du point de vue de sa structure, l'épithélium stratifié qu'est l'épiderme n'est pas scindé en deux parties mais a plutôt un gradient de phénotype cellulaire le long de l'axe orthogonal à la surface extérieure : les cellules ont des rôles, des compositions et des formes différentes selon qu'elles sont plutôt du côté de l'intérieur du corps ou plutôt vers l'extérieur comme on le voit sur la figure 1.3.

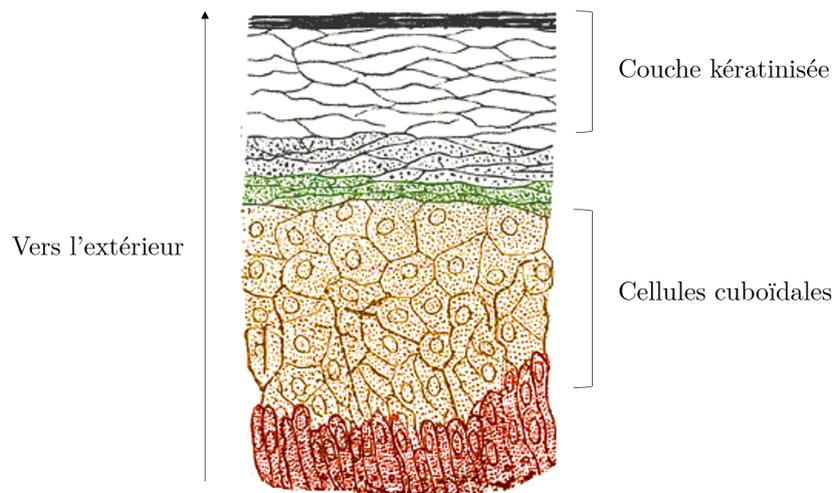


FIGURE 1.3 – Schéma de l'épiderme. On y voit un changement progressif du phénotype cellulaire au fur et à mesure que l'on se rapproche de la couche externe. Vers l'intérieur les cellules sont cuboïdales tandis que vers l'extérieur elles deviennent pavimenteuses jusqu'à être kératinisées sur la couche la plus externe. Adapté d'un schéma de Henry Vandyke Carter.

Ainsi, les cellules de l'épiderme sont plutôt cuboïdales vers l'intérieur et deviennent progressivement pavimenteuses au fur et à mesure que l'on s'approche de l'extérieur.

Pour les épithéliums stratifiés qui ne sont pas kératinisés, les agressions subies sont généralement de moins grandes ampleurs. On peut citer par exemple la plupart des muqueuses du corps humain les plus proches du contact avec le monde extérieur comme la

bouche ou l'œsophage.

L'objet étudié dans cette thèse se limite cependant aux épithéliums simples. Certains concepts et résultats pourront être étendus dans une certaine mesure aux épithéliums stratifiés mais la structure de ces derniers demande un traitement particulier.

Épithéliums simples

On arrive à l'objet d'étude de cette thèse : l'épithélium simple. A partir de maintenant et jusqu'à la fin du document, on se restreindra à ce type de tissus épithéliaux.

Comme illustré dans la figure 1.2, les épithéliums simples ont la particularité d'être une monocouche de cellules épithéliales. Ainsi, toutes les cellules sont en contact avec le substrat d'un côté et la lumière de l'autre.

La paroi de l'intestin grêle est un exemple d'épithélium simple colonnaire. Cette paroi est faite de villosités permettant d'augmenter grandement la surface d'échange de l'intestin pour remplir ses fonctions d'échange de nutriments. Ces villosités, d'environ 1mm de haut, sont structurées de façon à assurer le renouvellement continu des cellules. Elles sont représentées sur la figure 1.4.

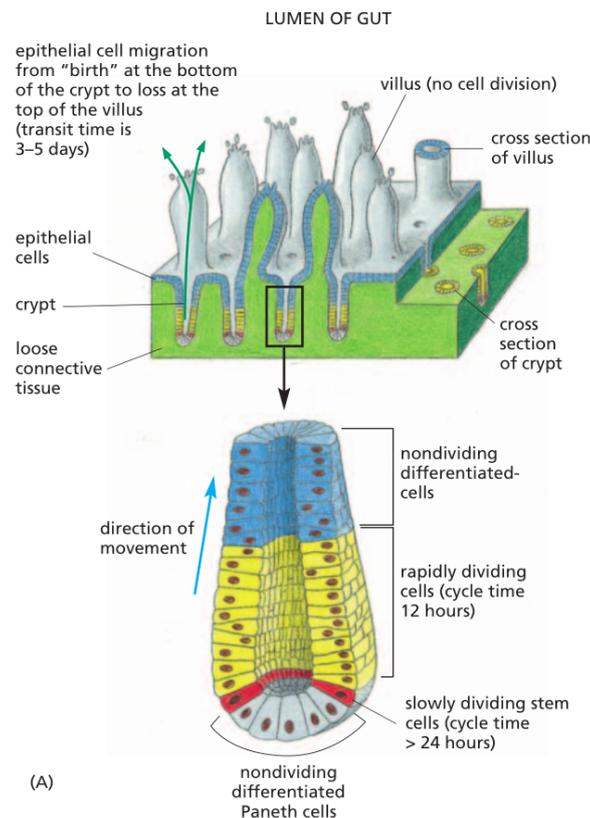


FIGURE 1.4 – Schéma des villosités intestinales (en haut). Le schéma du bas montre les différents types de cellules dans les cryptes qui sont à l'œuvre pour assurer le renouvellement des cellules dans les villi. Adapté de [2].

Des cellules souches, dans les creux des villosités appelées cryptes, donnent naissance à des cellules plus différenciées et qui se divisent rapidement (typiquement toutes les 12 heures). Les cellules issues de ces divisions migrent ensuite vers le haut de la villosité pour alimenter le stock de cellules qui constitue la majeure partie de ce tissu. Elles sont alors pleinement différenciées. Afin de conserver la quantité de cellules du tissu, les cellules les plus anciennes et donc tout en haut de la villosité sont extrudées.

Parmi les épithéliums cuboïdaux simples, on peut citer les tubules rénaux, illustrés en figure 1.5. Ces tubules ont pour rôle d'absorber de l'eau provenant du fluide qui parcourt

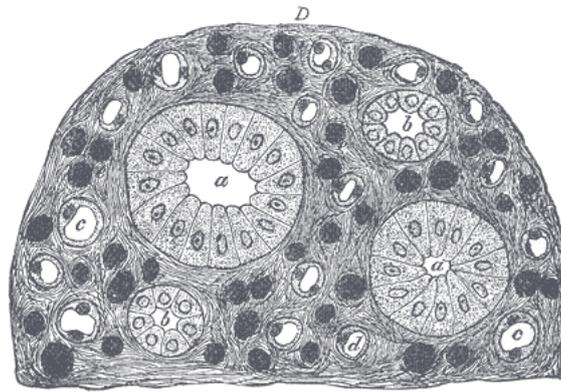


FIGURE 1.5 – Dessin d'une coupe transversale de rein de porc. On s'intéresse ici aux tubes collecteurs, principaux en (a) et secondaires en (b). On y voit un épithélium cuboïdal simple tapissant le contour de ces tubes. Les MDCK, lignée cellulaire que l'on a utilisée pour les expériences présentées plus tard, sont issues de ces tubes. Dessin de Henry Vandyke Carter [3]

le tube et de sécréter ou, au contraire, absorber certaines molécules dans ce même fluide. Les cellules utilisées pour les expériences de cette thèse proviennent d'un tubule rénal d'un chien. On appelle cette lignée *MDCK* et on en parlera plus en détail dans le chapitre consacré aux choix expérimentaux. On peut noter ici que ces cellules de tubules rénaux évoluent dans un environnement très courbé puisque le rayon de courbure du tube peut être presque aussi petit que la taille typique d'une cellule.

A travers ces exemples, on voit que la forme des cellules épithéliales peut être très différente d'un tissu à l'autre. De plus, on voit que cette forme est fortement liée à la fonction du tissu. Comprendre comment les cellules épithéliales acquièrent leurs formes pourrait donc apporter des éclairages sur les mécanismes à l'œuvre donnant à chaque tissu leur fonction spécifique.

1.1.2 L'embryogenèse

Comment à partir d'une cellule œuf simple, peut émerger la complexité des formes d'un être vivant ? Comme on va le voir, cette question fascine les sociétés humaines depuis des

générations. En particulier, comment l'organisme parvient-il à créer des formes qui sont d'une grande robustesse pour remplir correctement ses fonctions physiologiques, mais qui nécessitent aussi des tissus biologiques d'une grande plasticité.

La complexité des formes au sein d'un être vivant donné est extraordinaire mais la diversité des formes que peut prendre le vivant lorsque l'on compare les espèces entre elles l'est tout autant. Cette diversité des espèces peut sembler aller à l'encontre d'une tentative réductionniste de dégager des principes généraux gouvernant l'embryogenèse. On s'attachera toutefois dans cette section à exposer ces principes généraux afin d'éviter une énumération de particularités, ce qui n'est pas le but de ce document.

Un peu d'histoire

Les travaux scientifiques à propos de l'embryogenèse ont commencé dès l'antiquité, Aristote décrivait alors l'opposition entre l'hypothèse préformiste et la théorie de l'épigénèse [4]. L'hypothèse préformiste considère que l'être vivant est déjà formé dans toute sa complexité dans l'œuf et sa croissance se fait de façon homothétique jusqu'à la naissance. C'est cette hypothèse préformiste qui a prévalu jusqu'à la fin du XIX^{ème} siècle.

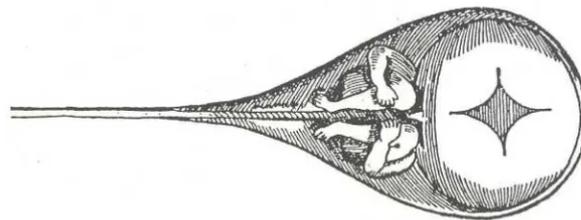


FIGURE 1.6 – Un spermatozoïde humain selon l'hypothèse préformiste. On y trouve un minuscule humain déjà complètement formé (appelé homonculus). Dessin de Nicolaas Hartsoeker, 1694 [5]

Cependant, dès 1651, le médecin anglais William Harvey rejette cette théorie et formule l'hypothèse selon laquelle l'embryogenèse se fait à partir d'un œuf simple même chez les mammifères [6]. Mais c'est seulement à la fin du XIX^{ème} siècle que la théorie de l'épigénèse prend le dessus. Cette théorie, à l'opposé de l'hypothèse préformiste, stipule que les organes apparaissent progressivement au cours de la croissance de l'embryon. Elle s'imposera notamment grâce aux découvertes expérimentales de l'ovule chez le mammifère en 1827 [7], et de la fusion d'un spermatozoïde et d'un ovule pour former une cellule œuf en 1876 [8].

On va maintenant donner deux exemples de phénomènes morphogénétiques afin d'illustrer l'importance de la forme des cellules épithéliales dans ces processus.

Le cas de la gastrulation

La gastrulation est une étape du développement embryonnaire. Elle a pour conséquence de transformer la monocouche de cellules épithéliales qu'est l'embryon en un ensemble de deux ou trois couches. Cette étape intervient 13 jours après la fécondation chez l'humain. Il est à noter que cette étape est vitale pour l'embryon : des anomalies lors de la gastrulation sont létales. C'est après la gastrulation que beaucoup de processus de différenciation vont avoir lieu et donner naissance, petit à petit, aux organes de l'embryon.

Au cours de la gastrulation, les cellules migrent et voient leur forme changer très rapidement, comme on peut le voir sur la figure 1.7. Afin de former une structure interne à la monocouche épithéliale préexistante, l'épithélium doit accomplir une étape d'invagination. Elle consiste à créer un ou plusieurs plis vers l'intérieur de l'embryon puis de le refermer presque complètement.

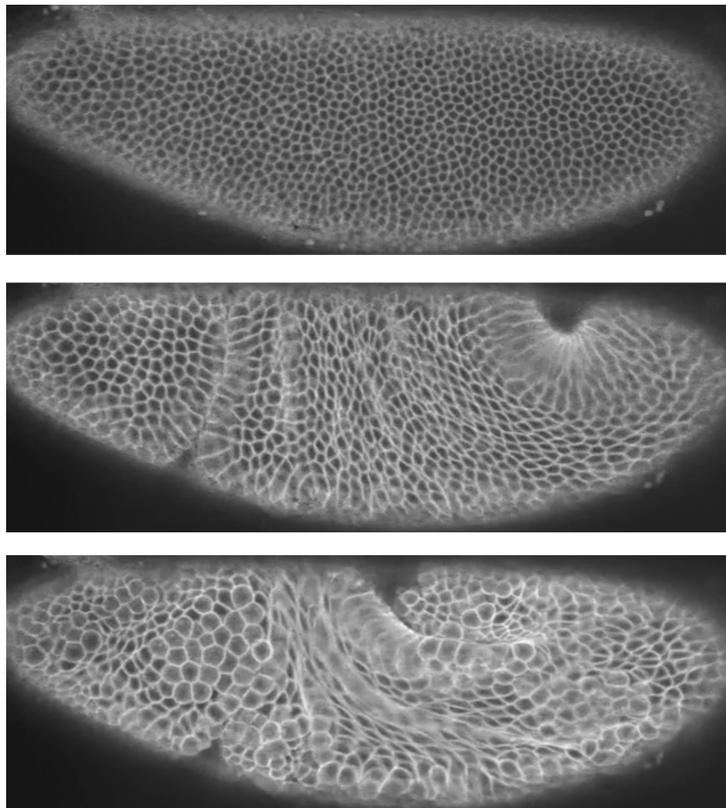


FIGURE 1.7 – La gastrulation chez l'embryon de drosophile. On y voit l'état initial de l'embryon en haut, puis environ 15 minutes après au milieu et environ 25 minutes après l'état initial en bas. Les cellules doivent subir des changements de forme importants et rapides afin de créer les plis nécessaires à l'invagination. Extrait de la vidéo du *Laboratory for the Physics of Life* à Princeton University.

La gastrulation met en œuvre une grande complexité biochimique et notamment des signalisations d'expressions génétiques qui sont finement calibrées en temps et en espace.

Cependant, cet évènement morphogénétique met en lumière l'importance du changement de forme des cellules épithéliales. En effet, on voit sur la figure 1.7 que les plis formés ne pourraient pas se faire sans changements importants de forme des cellules, et notamment aux endroits fortement courbés de l'embryon. Les faces apicales et basales des cellules doivent y adopter des formes très différentes.

La fermeture du tube neural

La fermeture du tube neural est aussi un évènement morphogénétique largement étudié, notamment chez l'embryon de poulet. Il met en jeu la création d'un tube à partir d'un feuillet épithélial plan comme on le voit sur le schéma 1.8.

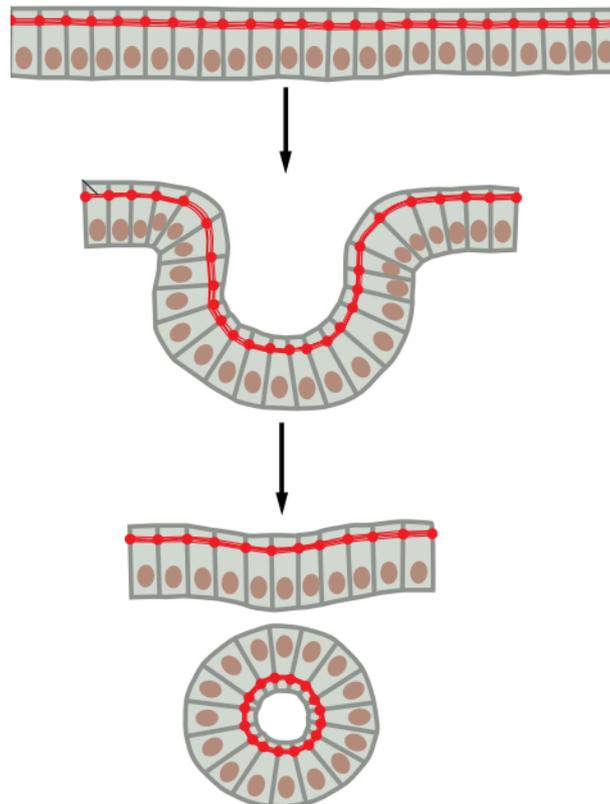


FIGURE 1.8 – Schéma représentant la transformation d'un feuillet épithélial en un tube épithélial. La formation du tube neural de l'embryon des vertébrés en est un exemple. On voit sur ce schéma que, pour former un tube, l'épithélium doit créer des régions de courbures opposées en changeant la forme de ses cellules en des positions bien choisies. Adapté de [2].

Comme pour la gastrulation, cet évènement morphogénétique met en jeu beaucoup de phénomènes biochimiques très complexes. On peut cependant voir que la capacité des cellules épithéliales à changer de forme de façon contrôlée est nécessaire à la réussite d'une telle opération. En effet, ces changements de forme doivent avoir lieu à des endroits précis

de façon à créer une courbure dans un sens au centre et des courbures de signes opposés de part et d'autre.

Comme on l'a vu dans toute cette section, les cellules épithéliales peuvent adopter des formes très différentes selon les organes dans lesquels elles se trouvent et les fonctions qu'elles doivent remplir. On vient de voir aussi que la capacité des cellules épithéliales à changer de forme de façon dynamique est nécessaire à la formation des tubes, organes et autres formes complexes dont les êtres vivants sont faits. C'est avec cette motivation en tête que l'on va entreprendre de mieux cerner les fondements physiques qui gouvernent la forme des cellules épithéliales. Mais d'abord, on va détailler une partie de la complexité interne des cellules épithéliales pour mieux définir l'objet de notre étude.

1.2 Les cellules épithéliales

Changeons d'échelle maintenant pour passer aux composants subcellulaires des cellules épithéliales. On s'attardera en particulier sur ceux qui ont une grande importance pour comprendre la forme des cellules.

1.2.1 La membrane plasmique

La membrane plasmique est la frontière entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Elle est constituée d'une bicouche lipidique d'environ 5 nm d'épaisseur et de protéines. Toutes ces molécules sont maintenues ensemble par des liaisons covalentes ce qui rend la membrane plasmique très fluide et dynamique. Les lipides (la plupart du temps des phospholipides) qui constituent la membrane sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles ont une tête hydrophile et une queue hydrophobe, comme on le voit sur la figure 1.9. Dans l'eau, ces molécules forment spontanément des bicouches, même dans un environnement dépourvu de constituants biologiques. Cet assemblage permet aux queues hydrophobes d'avoir un contact minimal avec des molécules d'eau tandis que les têtes polaires y sont exposées. La membrane plasmique est imperméable à la plupart des espèces chimiques solubles dans l'eau.

Les protéines qui traversent la bicouche lipidique sont appelées protéines transmembranaires et elles jouent des rôles de médiation avec l'environnement extérieur de la cellule comme l'adhésion, le transport de molécules ou la transmission de signaux chimiques et mécaniques. On parlera notamment des protéines transmembranaires *cadhérines* et *intégrines* dans la section relative aux adhésions.

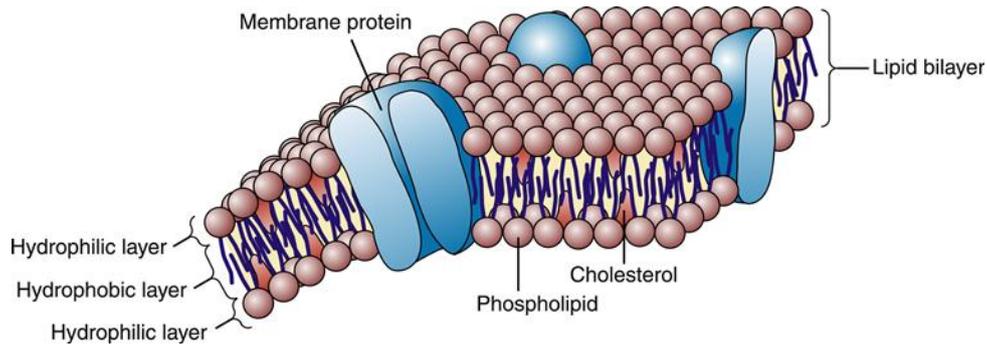


FIGURE 1.9 – La membrane phospholipidique. On y voit les têtes polaires (hydrophiles) et les queues apolaires (hydrophobes) des phospholipides. Les protéines transmembranaires (en bleu) ont des fonctions variées comme le transport de molécules au travers de la membrane. Schéma de Jacquelyn L. Banasik.

1.2.2 Le cytosquelette

Comme on l'a vu, les cellules épithéliales doivent s'organiser entre elles pour remplir leur fonction de tissu épithélial. Elles doivent avoir la bonne forme, avoir la bonne structure interne et être résistantes à des contraintes mécaniques. Les cellules épithéliales doivent également pouvoir changer de forme selon les circonstances, se déplacer ou encore se diviser. Toutes ces fonctions sont assurées par un réseau tridimensionnel de protéines assemblées en filaments : le cytosquelette.

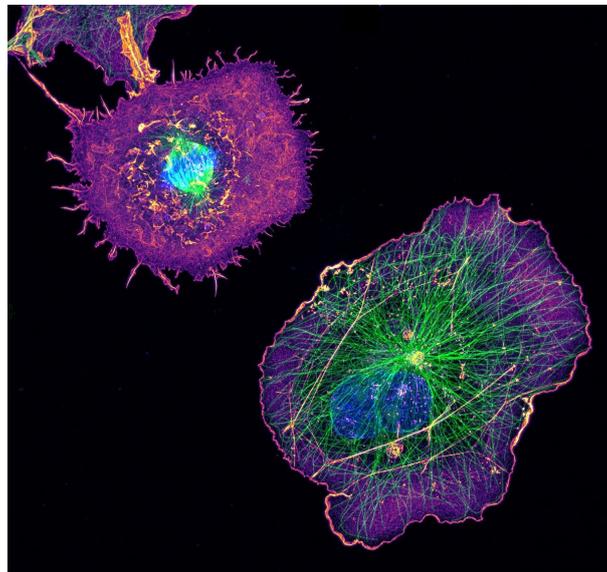


FIGURE 1.10 – Image du cytosquelette de cellules COS (fibroblastes de rein de singe). En vert les microtubules, en violet l'actine et en bleu le noyau. On voit que ces deux cellules a priori similaires ont des organisations de leur cytosquelette très différentes car elles sont dans des états différents : celle du haut est en pleine division cellulaire et on peut y voir son fuseau mitotique formé de microtubules. Image de Christophe Letterier.

Il existe trois grandes familles de filaments : les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Tous ces filaments sont issus de l'auto-association de protéines dont la taille typique est de quelques nanomètres. Cette auto-association donne un assemblage hélicoïdal de ces protéines. Comme on va le voir, ces différents filaments sont composés de protéines distinctes et qui vont leur donner des propriétés très différentes, aussi bien concernant la mécanique que la stabilité de la polymérisation.

Contrairement aux autres polymères de la cellule (comme l'ADN), les filaments qui composent le cytosquelette n'ont pas de liaisons covalentes entre leurs sous-unités protéiques. Ce sont des liaisons faibles qui sont responsables de l'assemblage et de la stabilité des filaments. Cette propriété rend le cytosquelette particulièrement dynamique.

Beaucoup d'autres protéines régulent de nombreuses propriétés de ces filaments comme leur dynamique d'assemblage/désassemblage, leur distribution spatiale ou leur assemblage entre eux. Les moteurs moléculaires en sont un exemple important puisqu'ils permettent la génération de forces mécaniques une fois attachés aux filaments, et en consommant de l'ATP (adénosine triphosphate), une molécule servant la plupart du temps de ressource en énergie utilisable par les protéines de la cellule. Ces moteurs moléculaires et les autres protéines qui régulent les propriétés des filaments sont, la plupart du temps, spécifiques à chaque type de filament.

Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont une famille de fibres d'un diamètre autour de 10nm formés par auto-assemblage de protéines fibrillaires et sans consommation d'ATP. Comme on va le voir, ce diamètre est plus grand que celui des filaments d'actine (7nm) et plus petit que celui des microtubules (25nm) d'où leur qualificatif d'*intermédiaire*². Généralement, le rôle des filaments intermédiaires est de donner un appui structurel à différentes parties de la cellule. Il s'agit toutefois d'une famille très large de filaments qui peuvent remplir des fonctions très différentes. En l'occurrence, les types de filaments intermédiaires sont une marque du type cellulaire contrairement à l'actine et aux microtubules qui sont ubiquitaires. On ne donnera donc pas de liste exhaustive des types de filaments intermédiaires mais on va citer quelques exemples qui sont présents dans les cellules épithéliales.

Les lamines par exemple sont un constituant essentiel de la *lamina nucléaire*, une couche de quelques dizaines de nanomètre d'épaisseur et recouvrant l'intérieur de l'enveloppe du noyau et lui donnant sa résistance mécanique. Ces filaments intermédiaires sont présents dans tous les types cellulaires ce qui en fait une exception au sein de cette famille du cytosquelette.

2. Historiquement, ce qualificatif d'intermédiaire vient de leur taille comprise entre celle des filaments d'actine et celle des filaments de myosines que l'on trouve dans le muscle.

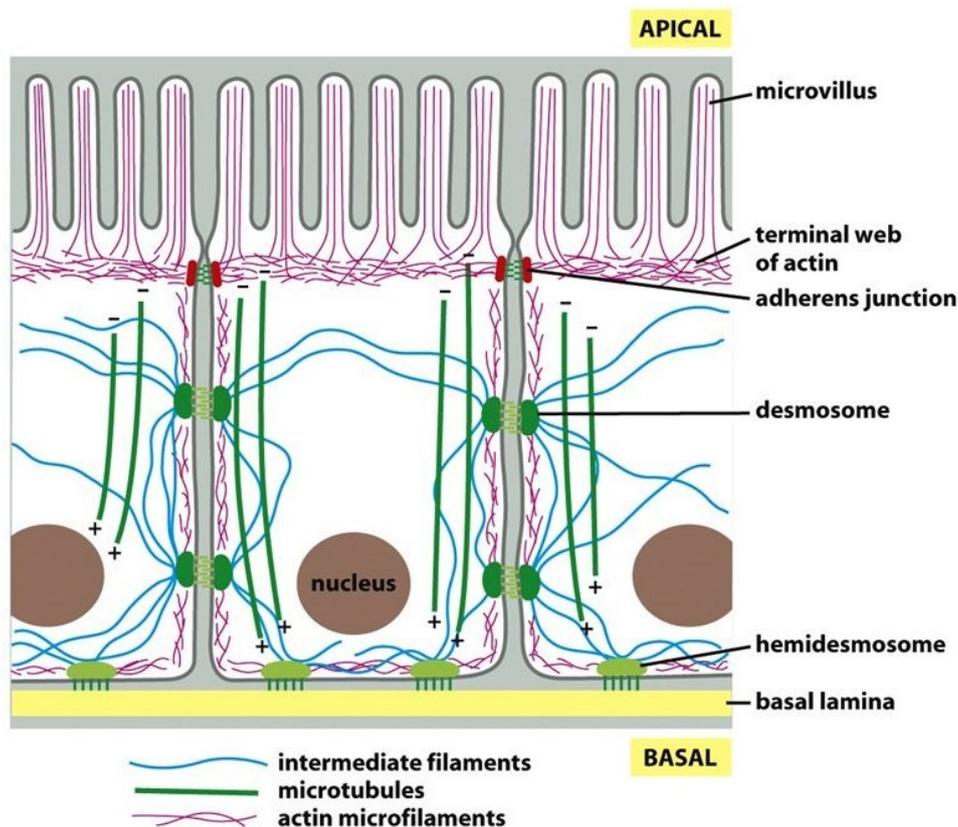


FIGURE 1.11 – Schéma du cytosquelette de cellules épithéliales. Les filaments intermédiaires, microtubules et filaments d'actine ont des rôles très distincts dont découle une organisation spatiale dans la cellule très différente également. Adapté de *Molecular Biology of the Cell* [2].

On a cité ici un constituant du cytosquelette présent dans le noyau, mais la plupart du temps le cytosquelette est un composant cytoplasmique de la cellule dont le réseau est plus étendu que celui des lamines.

Les kératines, quant à elles, constituent une famille de filaments intermédiaires particulièrement importants pour les cellules épithéliales. Ces filaments sont essentiels pour former les cheveux et ongles chez l'humain, mais également les cornes, les sabots ou les plumes chez d'autres animaux.

Cette famille de filaments intermédiaires est très diverse. On dénombre environ 50 kératines différentes (du point de vue de leur séquence d'acides aminés) rien que chez l'humain. Ces kératines sont présentes dans 30 types cellulaires différents, toujours chez l'humain, dont une dizaine servant à remplir la fonction de formation des cheveux, poils et ongles. Cette diversité est utilisée dans les diagnostics de cancers : chaque type de kératine étant très spécifique d'un organe ou d'un tissu, déterminer le type de kératine exprimé par une tumeur permet de déterminer l'origine du cancer.

Dans le cytosquelette des cellules épithéliales, les kératines se lient à des points de

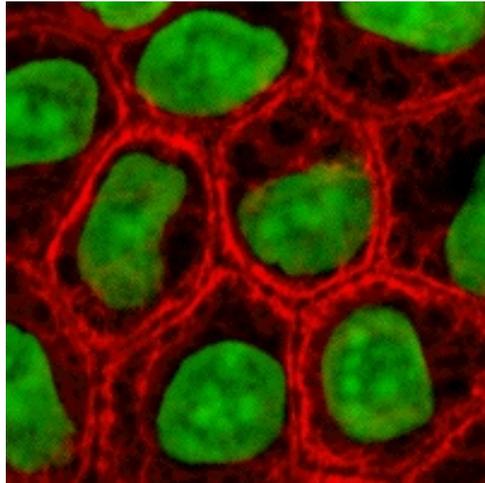


FIGURE 1.12 – MDCK avec la kératine marquée (en rouge). On voit bien la localisation des kératines aux jonctions intercellulaires. Image de John Schmidt.

contacts cellulaires : les desmosomes, dont on parlera dans la partie consacrée aux adhésions intercellulaires. Ces filaments sont illustrés en bleu dans la figure 1.11.

Les microtubules

Les microtubules sont formés de la protéine tubuline. La brique élémentaire du microtubule est en fait un hétérodimère composé de deux protéines : la α -tubuline et la β -tubuline. La β -tubuline peut lier une molécule de GTP et l'hydrolyse en GDP. Comme on va le voir, cette hydrolyse de la GTP a une grande importance dans la dynamique du microtubule.

La tubuline est extrêmement commune : on la trouve dans toutes les cellules eucaryotes. Les tubulines de différentes espèces peuvent être légèrement différentes cependant, par exemple la tubuline humaine est identique à 75% à la tubuline de levure (en terme de séquence d'acides aminés). De même, il y a quelques formes différentes de tubulines qui peuvent être exprimées au sein d'une même espèce mais ces différences sont minimales, si bien qu'elles peuvent copolymériser entre elles.

Après polymérisation des sous-unités de tubuline, le microtubule est un cylindre creux dont le périmètre est de 13 sous-unités alternées de α -tubuline et β -tubuline comme on le voit dans la vue en coupe de la figure 1.13. Ce cylindre a un diamètre intérieur d'environ 13nm [9] et un diamètre extérieur d'environ 25nm [10]. L'hélice que forme le microtubule a, comme on le voit en figure 1.13, un pas de la taille d'un dimère de α -tubuline et β -tubuline soit environ 10nm.

La longueur de persistance d'un microtubule est de plusieurs millimètres ce qui en fait le filament le plus résistant à la courbure. Ainsi, une cellule n'excédant généralement pas plus de 100 μ m dans une direction, les microtubules ne peuvent être courbés par les

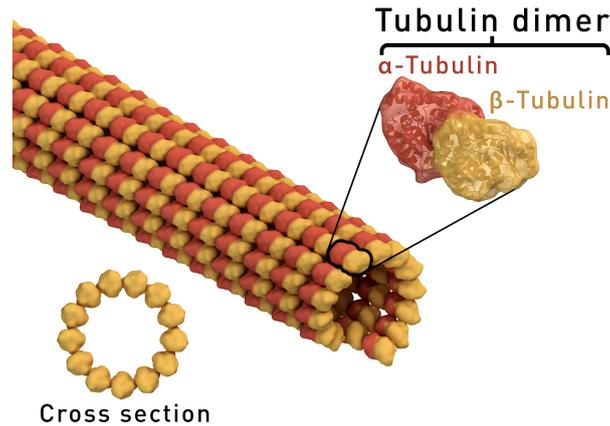


FIGURE 1.13 – Structure moléculaire d'un microtubule. Illustration de Thomas Splettstößer.

fluctuations thermiques. D'autres forces peuvent cependant courber les microtubules mais ils restent les filaments les plus rectilignes de la cellule.

De par leur structure moléculaire, les microtubules ont également la propriété d'être polaires. En effet, les sous-unités de tubulines sont elles-mêmes polaires et leur assemblage ne peut se faire que si elles sont toutes dans le même sens, ce que rend le microtubule polaire également. Cette polarité rend les deux bouts du microtubule différents : on appelle l'extrémité la plus dynamique l'extrémité (+), et l'extrémité la plus stable l'extrémité (-). On trouve des α -tubulines à l'extrémité (-) et une des β -tubulines à l'extrémité (+).

La polymérisation ou dépolymérisation spontanée dépend de la concentration de sous-unités de tubulines : si elle est faible le microtubule se dépolymérise et si elle est grande il y a polymérisation spontanée. Ces événements peuvent être utilisés par la cellule pour effectuer un travail comme par exemple pousser la membrane plasmique dans le cas d'une polymérisation ou tirer sur les chromosomes le long du fuseau mitotique lors de la mitose dans le cas d'une dépolymérisation.

Cette polymérisation peut être altérée par des toxines que l'on trouve dans la nature. En effet, l'équilibre fin entre polymérisation et dépolymérisation des microtubules étant essentiel à la survie des cellules eucaryotes, il s'agit d'une attaque de choix, tant pour sa puissance que pour la variété de cibles disponibles. On les trouve le plus souvent dans les plantes ou les champignons qui évitent ainsi de se faire simplement manger par un prédateur dont ils ne peuvent pas fuir. Pour les microtubules, la *colchicine*, que l'on trouve dans la colchique d'automne, se lie aux tubulines libres et les stabilise sous cette forme ce qui cause la dépolymérisation des microtubules. D'autres molécules peuvent être utilisées pour déstabiliser les microtubules comme la *vinblastine* ou la *vincristine*, toutes deux extraites de la pervenche de Madagascar. L'effet inverse est obtenu avec le *taxol*, une molécule extraite de l'écorce de certaines espèces d'if (notamment l'if du Pacifique), qui

se lie aux microtubules et les stabilise. Les effets très toxiques du taxol sont utilisés en chimiothérapie pour éradiquer les tumeurs. En effet, cibler les microtubules représente une attaque particulièrement efficace contre les cellules qui prolifèrent puisqu'elles ne peuvent alors plus se diviser. Toutefois, un tel traitement peut aussi créer des dommages sur les cellules saines qui prolifèrent rapidement comme celles présentes dans les intestins, les follicules pileux ou la moelle osseuse.



(a) Colchique d'automne, une plante originaire d'Irlande et de Grande-Bretagne. On en extrait la colchicine, une toxine qui dépolymérise les microtubules. Photo de Réginald Hulhoven.



(b) Pervenche de Madagascar, une plante que l'on ne trouve que sur cette île. On en extrait la vinblastine et la vincristine, deux toxines qui déstabilisent les microtubules. Photo de Krzysztof Ziarnik.



(c) If du Pacifique, que l'on trouve en particulier sur la côte ouest des États-Unis et du Canada. On en extrait le taxol, une molécule stabilisant les microtubules. Photo de Walter Siegmund.

FIGURE 1.14 – Les plantes dont sont extraites certaines toxines des microtubules. Ces drogues leur permettent d'être très toxiques pour les eucaryotes et elles ont donc peu de prédateurs.

Toutes ces molécules sont des outils très utilisés en biologie cellulaire et notamment par les biophysiciens puisqu'ils permettent de modifier le cytosquelette et donc les propriétés mécaniques de la cellule.

L'actine

La brique élémentaire des filaments d'actine est la protéine globulaire actine. Contrairement aux microtubules, les filaments d'actines sont composés de monomères d'actine et non de dimères. On trouve également un site de liaison avec un nucléotide pouvant être hydrolysé. Pour l'actine il s'agit d'ATP (ou ADP dans sa forme hydrolysée) plutôt que de GTP/GDP dans le cas des microtubules.

On trouve l'actine dans toutes les cellules eucaryotes, avec une conservation au cours de l'évolution très forte puisque les actines des différentes espèces sont au moins identiques à 90%. Cependant, comme pour la tubuline, plusieurs formes d'actine sont exprimées pour une même espèce. Chez les vertébrés par exemple, on trouve trois types d'actine qu'on appelle α -actine, β -actine et γ -actine. La α -actine n'est exprimée que dans les cellules musculaires alors que les formes β et γ sont exprimées dans la quasi-totalité des autres cellules.

Du point de vue de la structure, les filaments d'actine peuvent être vus comme deux sous-filaments enroulés l'un autour de l'autre pour former une hélice droite comme on le voit sur la figure 1.15. Cette hélice a un diamètre d'environ 7nm ce qui en fait le filament le plus fin du cytosquelette. Le pas de l'hélice formée est de 37nm.

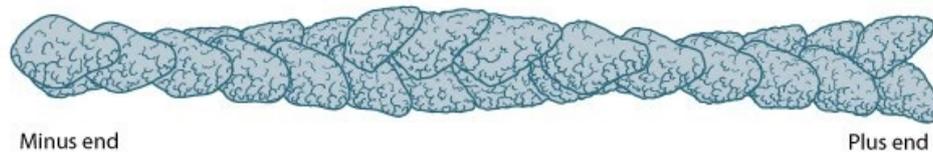


FIGURE 1.15 – Un filament d'actine. On distingue sa structure en hélice et sa polarité avec une extrémité (-) et une extrémité (+). Illustration du *Mecanobiology Institute*, Singapour.

Les filaments d'actine ont une longueur de persistance de l'ordre de quelques dizaines de micromètres, soit la taille typique d'une cellule animale. Ainsi, les filaments d'actine se courbent beaucoup plus facilement que les microtubules.

De même que pour les microtubules, les filaments d'actine sont polaires car les monomères d'actine sont eux-mêmes polaires et qu'ils s'assemblent tous dans le même sens. Comme pour les microtubules, on appelle l'extrémité la plus dynamique l'extrémité (+), et l'extrémité la plus stable l'extrémité (-). La polymérisation spontanée de l'actine est souvent utilisée par la cellule pour générer des forces, comme lorsqu'une cellule génère des protrusions pour avancer sur un substrat.

Comme pour les microtubules, l'universalité de l'actine chez les cellules eucaryotes d'une part et son caractère indispensable aux fonctions cellulaires élémentaires d'autre part en font une cible particulièrement efficace. On trouve donc des toxines altérant la polymérisation de l'actine dans la nature, et notamment chez des plantes. La *latrunculine* par exemple, extraite de l'éponge de mer *Latrunculia* (que l'on voit en figure 1.16b), se lie aux monomères d'actine et les stabilise sous cette forme au détriment de la forme polymérisée. La *latrunculine* a donc pour effet de dépolymériser les filaments d'actine de la cellule. Cette toxine est très utilisée en biologie cellulaire et encore plus lorsque l'on

s'intéresse à la mécanique de la cellule étant donné le rôle important des filaments d'actine sur cette dernière.



(a) Amanite phalloïde, un champignon que l'on trouve en Europe. On en extrait la phalloïdine, une toxine qui stabilise les filaments d'actine. Photo de Vincenzo Ricceri.



(b) *Latrunculia apicalis*, une espèce d'éponge de mer dont on extrait la latrunculine. Cette toxine permet de déstabiliser les filaments d'actine. ©Bjorn Gulliksen.

FIGURE 1.16 – Les plantes dont sont extraites certaines toxines des filaments d'actine. Ces drogues leur permettent d'être très toxiques pour les eucaryotes et elles ont donc peu de prédateurs.

Pour obtenir l'effet inverse on peut utiliser la *phalloïdine*. Cette molécule extraite de diverses variétés de champignons comme l'amanite phalloïde (dont on voit une photo en figure 1.16a), se lie à la F-actine, et empêche la dépolymérisation des filaments.

1.2.3 Les moteurs moléculaires du cytosquelette

Les kinésines et les dynéines

Il y a deux grandes familles de moteurs moléculaires associés aux microtubules : les kinésines et les dynéines. Les kinésines se déplacent le long des microtubules et sont un complexe protéique formant deux têtes et une queue. Les deux têtes se lient aux microtubules tandis que la queue est utilisée pour se lier à la membrane d'une vésicule ou d'un organite afin de le transporter. La queue des kinésines peut aussi se lier à un autre microtubule. L'énergie nécessaire pour ce transport est obtenue par hydrolyse de l'ATP, qui génère un changement de conformation de la protéine et qui la fait avancer d'un pas. La famille des kinésines est très large et la plupart ont un rôle spécifique dans la

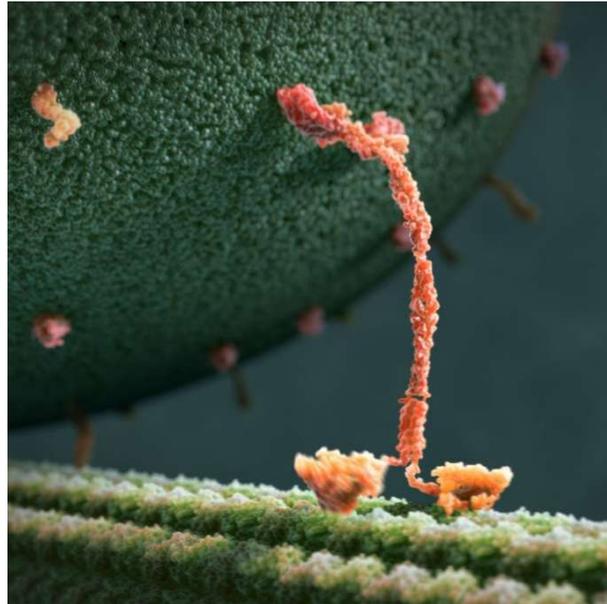


FIGURE 1.17 – Une kinésine (en rose) se déplaçant le long d'un microtubule en transportant une vésicule. Extrait de l'animation *The inner life of a cell*.

formation du fuseau mitotique et dans la séparation des chromosomes pendant la division cellulaire. Les kinésines ont un mouvement très processif, c'est-à-dire qu'elles pourront faire un grand nombre de pas le long d'un microtubule (plusieurs centaines en moyenne) avant de se détacher. Ainsi, une kinésine seule pourra effectuer un travail significatif, ce qui n'est pas le cas pour les myosines comme on le verra ensuite.

Les dynéines, l'autre grande famille de moteurs moléculaires spécifiques aux microtubules, ont une structure similaire pour la plupart. Elles ont aussi un rôle majeur pour le déplacement de vésicules dans la cellule et, de plus, certaines sont spécialement utilisées pour le battement des cils et flagelles.

Les myosines

Comme on l'a évoqué précédemment, les filaments d'actine jouent un grand rôle dans la mécanique de la cellule ou du tissu en créant des forces contractiles. Ces effets mécaniques apparaissent lorsque les filaments d'actine sont assemblés en structures plus ou moins ordonnées et sous l'effet de moteurs moléculaires spécifiques : les myosines.

Les myosines sont une super-famille de moteurs protéiques qui ont en commun de se lier aux filaments d'actine et de consommer de l'ATP pour générer des forces. Il s'agit d'une super-famille de protéines très bien conservée au cours de l'évolution si bien que les myosines de différentes espèces sont la plupart du temps substituables entre elles. On ne parlera ici que des myosines de type II qui sont les mieux connues et sont responsables de l'essentiel de la contractilité des cellules. Ces protéines ont deux têtes et une queue comme

les kinésines mais leur mouvement le long du filament se fait très différemment. Pour la myosine, une seule tête s'attache au filament d'actine. Ensuite, une molécule d'ATP se lie à cette tête ce qui détache la myosine du filament d'actine. La tête de la myosine avance alors d'un pas, sans être de nouveau attachée au filament d'actine. L'hydrolyse de la molécule d'ATP induit ensuite un changement de conformation et la myosine se lie de nouveau à l'actine. Elle retrouve sa conformation initiale, un pas plus en avant le long du filament d'actine, en libérant la molécule d'ADP restée attachée à sa tête : c'est à cette étape qu'une force est générée le long du filament. La queue de la myosine se lie avec les queues d'autres myosines pour former des *filaments épais* du muscle, ou *mini-filaments* dans les autres types cellulaires. En se liant entre elles en filament, elles ont toujours des membres attachés au filament d'actine.

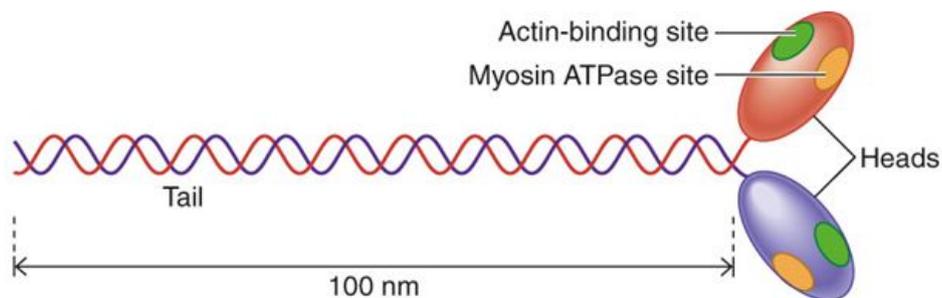


FIGURE 1.18 – Une myosine-II dont on voit les deux têtes possédant un site de liaison avec l'actine et un site de liaison et d'hydrolyse de l'ATP. La queue se lie à d'autres myosines pour former les *filaments épais* du muscle, ou *mini-filaments* dans les autres types cellulaires. ©2007 Thomson Higher Education.

Dans le muscle, les filaments d'actine sont organisés de façon très ordonnée pour former des sarcomères schématisés en figure 1.19. Les filaments d'actine y sont disposés de façon à avoir leur extrémité (-) qui se font face et avec un espace entre les deux. Ces extrémités (-) des deux filaments d'actine sont reliées par un filament de myosine. L'extrémité (+) des filaments d'actine est, elle, attachée à un complexe protéique appelé Z-line. Pour effectuer une contraction, les myosines avancent vers l'extrémité (+) des filaments d'actine ce qui réduit l'espace qui les sépare. Cette structure se répète de façon périodique pour donner une contraction en série et ainsi augmenter la quantité de contraction totale.

Cette contraction à l'échelle de quelques filaments d'actine est parallélisée en orientant ces sarcomères dans la même direction au sein de structures plus grandes appelées myofibrilles. Ces myofibrilles sont ensuite ordonnées au sein des fibres musculaires pour ensuite donner le muscle final. C'est donc grâce à un arrangement quasi-cristallin de l'orientation des sarcomères, de l'échelle du filament d'actine à l'échelle du muscle complet, que l'on parvient à contracter ses muscles.

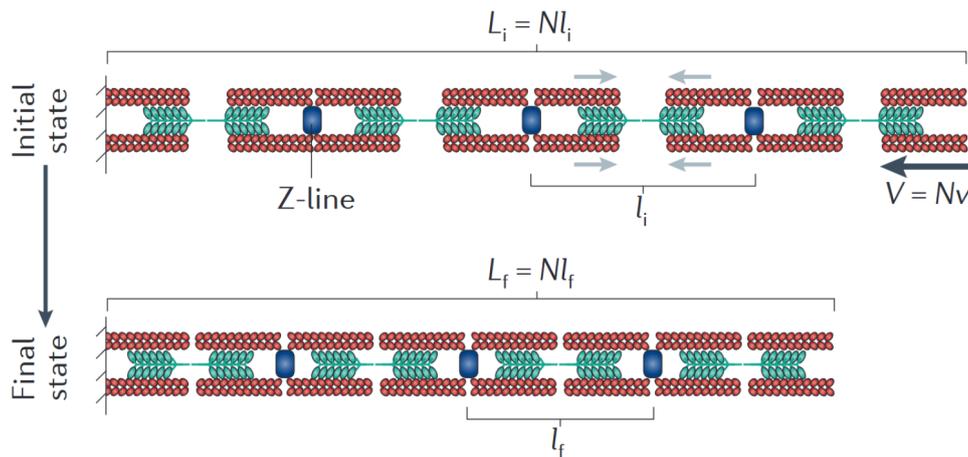


FIGURE 1.19 – Organisation des filaments d’actine (en rouge) et de myosine (en vert) dans un sarcomère. Le schéma du bas montre la contraction qui a eu lieu suite au déplacement des myosines le long des filaments d’actine. [11]

Dans la structure ordonnée du sarcomère, la contraction émerge directement de l’organisation des filaments d’actine et de myosine. Mais les myosines peuvent aussi générer de la contractilité dans les cellules non musculaires alors qu’elles n’ont pas de telles structures. C’est ce qui arrive dans le cortex d’actine des cellules épithéliales schématisé en figure 1.20. Un tel cortex est tout de même contractile et il l’est d’autant plus que l’activité

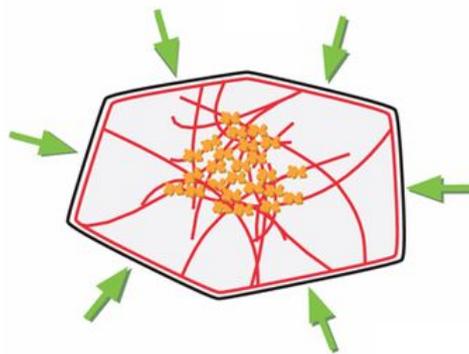


FIGURE 1.20 – Le cortex d’actine de la face apicale d’une cellule épithéliale. Les filaments d’actines sont en rouge et les myosines sont en orange. La résultante de l’activité des myosines y est contractile. Illustration de [12].

des myosines est importante. Certaines structures plus ordonnées que le cortex d’actine existent dans les cellules épithéliales comme la ceinture d’actine qui se forme au niveau des jonctions adhérentes dont on parlera dans la section suivante.

Tout comme les filaments du cytosquelette, les moteurs moléculaires ont des toxines qui peuvent altérer leur fonctionnement.

Pour la myosine-II, il est possible d’en supprimer l’activité en utilisant de la *blebbi-*

statine. Cette toxine empêche la myosine de consommer de l'ATP ce qui inhibe complètement son activité. Grâce à la blebbistatine, il est possible de diminuer cette activité partiellement en appliquant un dosage inférieur au niveau de saturation des myosines par la blebbistatine dans le système. La molécule *Y-27632* remplit également ce rôle de diminution de l'activité des myosines mais cette fois en agissant sur les voies de signalisations qui régulent le fonctionnement des myosines.

1.2.4 Les adhésions

La capacité des cellules à adhérer entre elles est une condition nécessaire à l'existence des organismes pluricellulaires. Cette adhérence peut être directe, et on parlera alors d'adhésions intercellulaires, mais la cohésion d'un groupe de cellules peut aussi se faire si elles adhèrent toutes au même substrat. Les adhésions intercellulaires ou cellule-substrat ont aussi des rôles de régulation et de signalisation en plus de leur rôle de cohésion mécanique.

On notera que les adhésions intercellulaires ou entre cellule et substrat ne sont pas spécifiques aux organismes pluricellulaires et elles sont aussi vitales pour la plupart des organismes unicellulaires. On se contentera cependant de parler ici des adhésions qui concernent les cellules épithéliales, donc au sein d'organismes pluricellulaires.

Les différents types d'adhésions que l'on retrouve pour les cellules épithéliales sont résumées dans le schéma 1.21

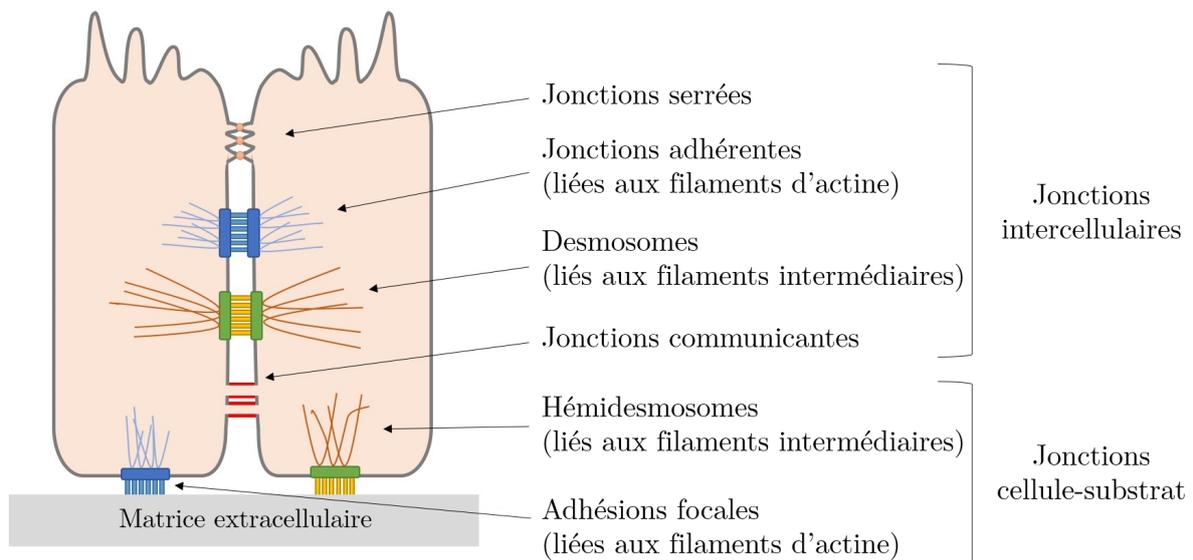


FIGURE 1.21 – Les jonctions cellulaires que l'on trouve dans les cellules épithéliales. Dessin de Qianhe Lu.

Adhésions intercellulaires

On classe les jonctions intercellulaires des cellules épithéliales en 4 types.

Les jonctions serrées (*tight junctions* en anglais) assurent l'étanchéité du tissu. Ce sont celles qui sont les plus proches de la face apicale, comme on le voit sur la figure 1.21. Les jonctions serrées ne sont pas complètement étanches en réalité mais sont plutôt des canaux sélectifs sous certaines conditions pour laisser passer des ions ou de l'eau par exemple. Cela peut servir notamment à maintenir un pH très différent de part et d'autre de l'épithélium. Les jonctions serrées jouent un rôle important dans la régulation de la polarité apico-basale des cellules épithéliales. Cette polarité se forme spontanément chez les cellules épithéliales car les faces basales, intercellulaires, et apicale ont un environnement protéique à leur contact très différent. Il faut maintenir et orienter correctement cette polarité afin que la cellule présente les protéines d'adhésion intercellulaire aux faces intercellulaires et forme des microvilli à la face apicale par exemple.

Les jonctions communicantes (*gap junctions* en anglais) sont représentées comme les plus proches de la face basale sur le schéma 1.21. Elles ont pour principal rôle de connecter directement les cytoplasmes des cellules concernées. Cette connexion n'est pas libre, elle est plutôt très régulée afin de ne laisser passer que certaines molécules selon la situation.

Les jonctions qui nous intéressent le plus ici sont celles qui auront un grand rôle mécanique car elles sont directement reliées au cytosquelette de chaque cellule : les jonctions adhérentes et les desmosomes. Les jonctions adhérentes sont reliées à des filaments d'actine tandis que les desmosomes sont reliés à des kératines, des filaments intermédiaires dont on a parlé dans la section précédente.

Entre les deux cellules adhérentes, ces liens sont assurés, pour les desmosomes et pour les jonctions adhérentes, par les cadhérines, une famille de protéines transmembranaires. Le nom cadhérine vient de la dépendance forte de la protéine dans la concentration en ions Ca^{2+} . Si la concentration en Ca^{2+} est très diminuée, les adhésions intercellulaires médiées par les cadhérines ne seront plus effectives. Cette dépendance est utilisée pour altérer volontairement ces adhésions, à la manière des toxines que l'on utilise pour altérer le cytosquelette. Une autre façon de détruire les adhésions intercellulaires est d'utiliser la protéase *trypsine* qui a comme particularité de dissoudre également les jonctions cellule-substrat dont on parlera dans la section suivante. La trypsine joue donc un autre rôle cette fois : détacher les cellules épithéliales des autres cellules et du substrat, ce qui est très utile en culture cellulaire, comme on le verra dans le chapitre relatif aux procédures expérimentales.

Dans les épithéliums, les filaments d'actine reliés aux jonctions adhérentes ont une organisation particulière : ils relient les jonctions adhérentes que la cellule a sur tout son contour. On a alors la formation d'une ceinture d'actine composé de filaments alignés et

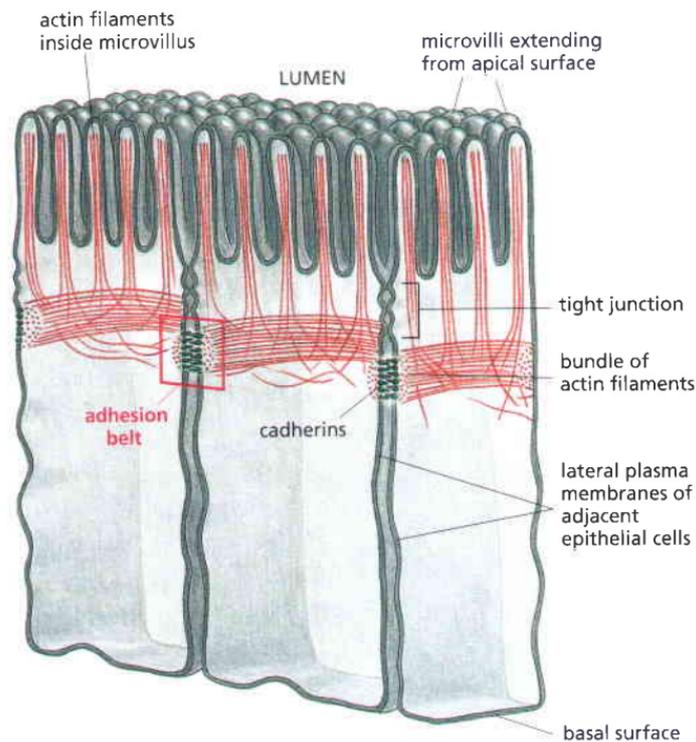


FIGURE 1.22 – Schéma représentant les jonctions adhérentes dans un épithélium. On y voit les jonctions adhérentes reliées entre elles par des ceintures d'adhésions faites de filaments d'actine qui font le tour de la cellule. Les cellules représentées ici sont des cellules d'intestins qui ont la particularité d'avoir des microvilli afin d'augmenter leur surface d'échange avec la lumière. Adapté de *Molecular Biology of the Cell* [2].

regroupés ensemble en *bundle* comme on le voit sur la figure 1.22. Cette propriété structurale combinée aux propriétés contractiles de l'acto-myosine va avoir des conséquences importantes sur les forces et énergies mises en jeu comme on va le voir dans la section suivante de cette introduction.

Le lien entre les cadhérines et les filaments d'actine se fait notamment via les caténines. Cette famille de protéines est également largement ciblée en biologie cellulaire quand on veut perturber les adhésions intercellulaires.

Adhésions cellule-substrat

Les cellules épithéliales d'un tissu donné ne sont pas connectées entre elles uniquement par les adhésions intercellulaires, mais aussi en adhérant à un même substrat : la lame basale. La lame basale est une matrice extracellulaire qui est synthétisée par les cellules à son contact. Une partie provient des cellules épithéliales et le reste provient des cellules situées de l'autre côté de la lame basale, le plus souvent ces cellules sont des fibroblastes du tissu conjonctif sous-jacent. Généralement, la lame basale est composée de glycoprotéines,

principalement les *laminines* et le *collagène de type IV*, qui sont organisées en réseau de façon à donner une bonne rigidité à ce substrat. On y trouve également les *fibronectines* qui jouent un rôle dans les adhésions cellules-substrat, tout comme les laminines.

Les intégrines sont les principales protéines transmembranaires des adhésions cellule-substrat, à l'image des cadhérines dans les adhésions intercellulaires. Les intégrines sont des protéines qui jouent également un grand rôle dans la mécanotransduction, c'est-à-dire la traduction de signaux mécaniques en signaux chimiques ou inversement. Dans la cellule, les intégrines se lient au cytosquelette d'actine au niveau des adhésions focales, ou à des filaments intermédiaires au niveau des hémidesmosomes, comme on le voit sur le schéma 1.21.

1.3 Approches physiques

Dans les sections précédentes, on a grossièrement défini l'objet étude qu'est la cellule épithéliale, un objet d'une très grande complexité. On souhaite désormais exposer les approches physiques, expérimentales et théoriques, cherchant à comprendre les propriétés géométriques et mécaniques des cellules épithéliales. On a vu que des éléments du cytosquelette, en particulier l'actomyosine, étaient contractiles. On a aussi montré une partie de la composition des adhésions que peut former la cellule avec son environnement. Peut-on essayer de traduire ces interactions très complexes entre la cellule et son environnement et au sein de la cellule en termes physiques ? Plus précisément, il s'agit de traduire les propriétés de contractilité ou d'adhérence des cellules en termes de forces ou d'énergies par exemple.

D'Arcy Wentworth Thompson a été pionnier dans cette démarche. En 1917, il écrit *On Growth and Form* [1]³ dans lequel il tente d'expliquer la forme des objets vivants à des échelles très variées en utilisant des concepts physiques et mathématiques. Sa démarche consiste à utiliser des arguments très généraux, c'est-à-dire sans plonger dans la complexité moléculaire des différents phénomènes. Les chapitres 7 et 8, intitulés *The Forms of Tissues, or Cell-aggregates* sont particulièrement pertinents pour le sujet d'étude de cette thèse. L'hypothèse de D'arcy Thompson est que la forme des cellules est à l'équilibre thermodynamique et correspond à la minimisation des énergies de surfaces de la cellule.

L'énergie de surface correspond à la quantité d'énergie à fournir pour augmenter la surface d'une unité. Ce coût énergétique provient du fait que les molécules d'un liquide ont des interactions attractives, c'est-à-dire qu'il est énergétiquement favorable pour une molécule de liquide d'avoir d'autres molécules à son voisinage ; au contraire les molécules d'eau à la surface d'un liquide sont énergétiquement frustrées car elles ont moins de

3. C'est ici la seconde édition de 1945, plus complète, qui est citée

molécules dans leur voisinage. Cette situation est représentée sur le schéma 1.23. Ainsi,

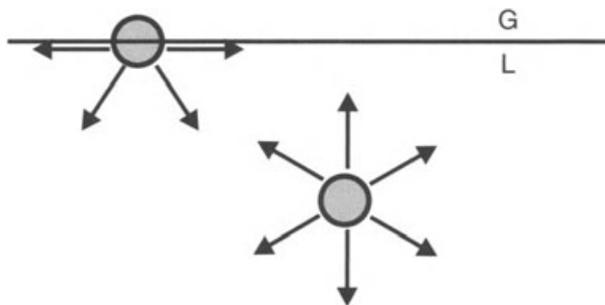


FIGURE 1.23 – La molécule à l’interface entre le liquide (L) et le gaz (G) a deux fois moins de molécules voisines avec qui elle a une interaction attractive. De cette frustration énergétique découle la tension de surface. Adapté de [13]

les liquides ajustent leur forme pour minimiser leur surface. C’est le compromis entre cette tendance et l’effet de gravité qui donne leurs formes aux bulles, aux gouttes, et même aux petites vaguelettes qui se forment à la surface d’un étang dans lequel on a jeté un caillou. Il en résulte une énergie par unité de surface que l’on appelle tension de surface.

La tension superficielle est également la force par unité de longueur exercée par la surface dans son plan. On va prendre, pour l’illustrer, l’exemple d’une goutte de liquide (L) posée sur un solide (S) en présence d’un gaz (G) pour illustrer ces forces sur le schéma 1.24. Sur la ligne triple de contact entre les trois phases (S), (L) et (G), l’interface entre le

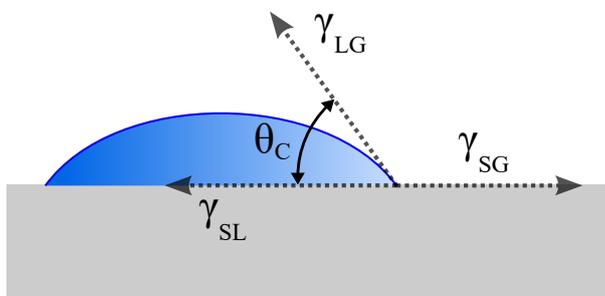


FIGURE 1.24 – Goutte de liquide sur un substrat solide. L’angle de contact est déterminé par le rapport entre les tensions de surface des trois interfaces mises en jeu : Solide-Liquide (SL), Liquide-Gaz (LG) et enfin Solide-Gaz (SG).

liquide et le gaz exerce une force par unité de longueur γ_{LG} parallèle à l’interface liquide-gaz et orientée vers celle-ci. Il en est de même pour les interfaces entre le solide et le liquide (γ_{SL}) et entre le solide et le gaz (γ_{SG}). L’angle de contact θ_c est alors obtenu en projetant ces trois forces sur l’axe horizontal et en supposant l’équilibre mécanique :

$$\cos \theta_c = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}}.$$

4. Cette relation est appelée de la loi de de Young-Dupré, établie en 1805 par Thomas Young et formalisée 60 ans plus tard par Athanase Dupré.

Dans le cas des cellules, existent également des énergies de surfaces mais elles n'ont pas une origine moléculaire comme pour les liquides, elles sont plutôt la résultante de la contractilité de l'actomyosine, de l'adhérence intercellulaire et de l'adhérence cellule-substrat. D'arcy Thompson donne ainsi une traduction physique à ces phénomènes cellulaires en comparant les cellules à des bulles. On en voit une illustration en figure 1.25 : une jonction quadruple symétrique (A) est un équilibre instable pour des bulles et elles se réarrangent spontanément en deux jonctions triples (B).

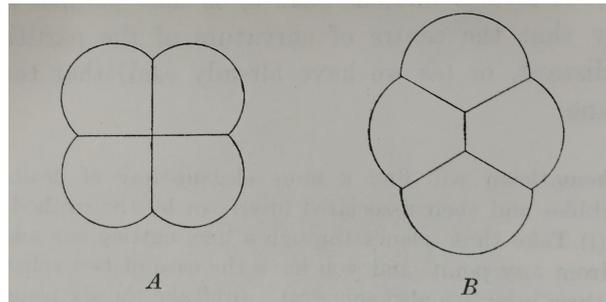


FIGURE 1.25 – Les configurations (A) et (B) sont à l'équilibre mécanique puisque les tensions de surfaces s'équilibrent à la jonction entre les films dans les deux cas. Cependant, la configuration (A) est instable. C'est la configuration (B) qui est stable avec des angles de contacts à 120° entre les segments. Extrait de [1].

Il est remarquable de noter que l'on a depuis eu des images tout à fait semblables de cellules que l'on voit en figure 1.26 [14]. Il s'agit de quatre cellules de la rétine de la drosophile. Les auteurs ont également mis en évidence la ressemblance morphologique entre cette organisation des cellules et celle de quatre bulles.

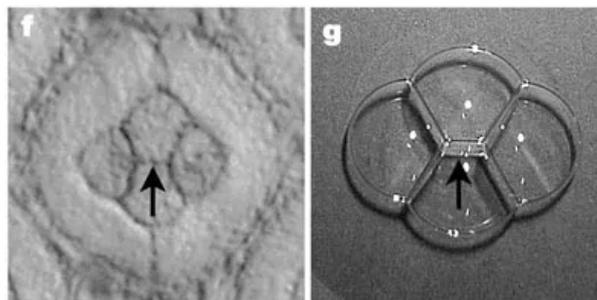


FIGURE 1.26 – La ressemblance de morphologie entre ce groupe de quatre cellules de la rétine de drosophile (f) et les quatre bulles de savons (g) est frappante. Dans le cas des bulles de savon, les angles de contacts sont tous de 120° car toutes les tensions de surfaces mises en jeu sont égales [14].

Cependant, comme on l'a vu précédemment, les cellules épithéliales ont des surfaces très différentes les unes des autres : la face basale adhérant au substrat, la face latérale adhérant à une cellule voisine et la face apicale étant en contact avec le milieu extérieur. Il en résulte qu'une simple analogie avec une bulle ne peut pas capturer cette complexité

car la tension de surface n'est pas uniforme dans la cellule épithéliale. Il faut donc avoir une représentation qui met en jeu des tensions de surfaces différentes selon l'interface considérée comme on le voit dans le dessin 1.27. On suppose que sur la figure 1.27, t

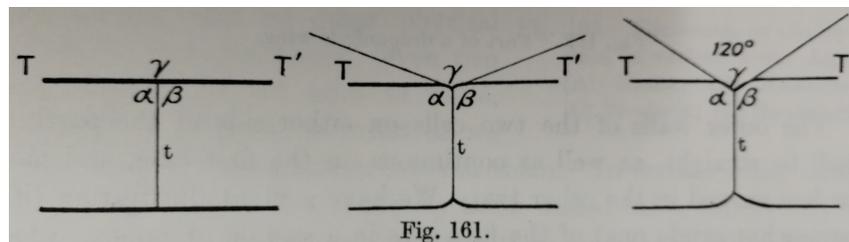


FIGURE 1.27 – Les angles de contact pour des cellules dont la tension de surface n'est pas uniforme. A gauche, on voit un cas où la tension de surface t est très petite devant T et T' . A droite, est dessiné le cas où les trois tensions de surface t , T et T' sont égales et il en résulte un angle de contact de 120° . Au milieu, il s'agit d'un cas intermédiaire avec t plus petit que T et T' mais du même ordre de grandeur. Extrait de [1].

correspond à la tension de surface du segment intercellulaire tandis que les T et T' sont les tensions de surface des faces apicales des deux cellules voisines. Si la tension de surface t est extrêmement petite devant T et T' , la jonction se fera avec un angle de 90° . Cela peut être le cas si l'adhérence entre les cellules est très forte, diminuant fortement la tension de surface entre elles. Si $t = T = T'$, on a un angle de 120° et on retrouve le cas des bulles de liquide simples. Le cas représenté au milieu sur la figure 1.27 correspond à t plus petit que T et T' mais du même ordre de grandeur. Ce cas correspond pour la cellule épithéliale, à une adhérence intercellulaire qui diminue la tension de surface intercellulaire sans la réduire à une valeur négligeable devant la tension de surface de la face apicale.

Les théories de D'Arcy Thompson n'auront que peu d'échos en son temps et c'est seulement en 1963 que les concepts d'énergies de surfaces sont à nouveau utilisés, cette fois par Malcolm Steinberg, pour formuler l'hypothèse d'adhésion différentielle (ou *differential adhesion hypothesis* en anglais) [15]. Cette hypothèse stipule que deux groupes de cellules ayant des affinités différentes (en rouge et en gris sur la figure 1.28) vont tendre à se ségréger en deux sous-groupes. Steinberg apporte un éclairage quantitatif à cette différence d'affinité en mettant en avant le rôle des énergies de surfaces dans ce processus. Ainsi, les cellules vont changer de voisins au fur et à mesure des réarrangements en privilégiant les voisins du même sous-groupe ce qui donne lieu à une ségrégation. On peut également prédire de cette hypothèse que c'est le groupe de cellules ayant l'énergie de surface la plus faible avec l'environnement extérieur qui aura tendance à se retrouver dans la couche externe : les cellules grises dans la figure 1.28. Ce type de séparation de groupes de cellules en sous-groupes est très courant dans les processus de morphogénèse.

Ce n'est que plus tard que l'on découvrira l'existence des cadhérines et que l'on pourra donner une explication moléculaire à l'hypothèse d'adhésion différentielle. En effet, si

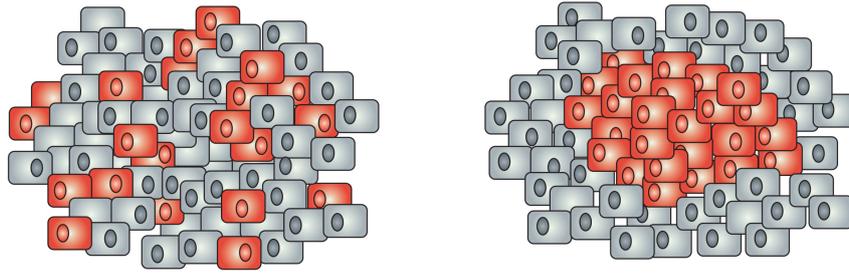


FIGURE 1.28 – L’hypothèse d’adhésion différentielle explique la ségrégation de tissus cellulaires en sous-groupes de cellules. Le schéma de gauche donne l’état initial mélangé de cellules grises et rouges et le schéma de droite donne l’état final dans lequel les sous-groupes de cellules se sont séparés pour maximiser les contacts les plus favorables énergétiquement. Adapté de [16].

les cellules rouges et grises n’expriment pas les cadhérines dans les mêmes quantités, les énergies d’adhésion entre les deux ne seront pas aussi favorables que les énergies d’adhésion au sein d’un sous-groupe.

Aujourd’hui les approches physiques pour comprendre la forme des cellules et des tissus sont largement utilisées. On va maintenant discuter de certains résultats plus contemporains donnant un éclairage pour la compréhension de la forme des cellules épithéliales.

1.3.1 Approches expérimentales

La physique peut venir éclairer des sujets de biologie de deux manières : en apportant des concepts et en apportant des outils. Les outils apportés par les physiciens pour la compréhension des phénomènes biologiques sont nombreux. Pour mieux observer, on peut citer, parmi d’autres, la microscopie optique et ses raffinements (microscopie confocale, super résolution...) ou la microscopie électronique. Afin de mesurer des propriétés mécaniques quantitativement, on peut citer également des outils précieux comme les pinces optiques ou magnétiques mais aussi les techniques d’aspiration par micropipettes. Ces outils apportés par la physique sont donc d’une grande importance pour la biologie cellulaire mais on va aussi s’attarder sur les résultats obtenus par l’apport des concepts physiques et de mécanique à la biologie cellulaire.

Mesures de grandeurs physiques

Comme on l’a vu avec D’Arcy Thompson, utiliser le concept de tension de surface pour décrire la forme des cellules épithéliales semble prometteur. Pour commencer, il conviendrait de mesurer ce que seraient ces tensions de surface pour les cellules. La plupart des méthodes utilisées pour les gouttes liquides (goutte pendante, angle de contact...) ne peuvent évidemment pas être utilisées pour des cellules épithéliales car ces dernières

peuvent changer drastiquement de comportement dès lors qu'elles sont mises dans un environnement très différent du tissu épithélial. Ainsi, il est nécessaire de travailler directement sur les cellules dans le tissu épithélial.

La tension de la face apicale des cellules est, a priori, la plus aisée à mesurer. Il s'agit en effet d'une face libre et elle est donc plus accessible que les faces latérales et basales qui sont exposées respectivement aux autres cellules et au substrat. De plus, les adhésions des faces latérales et basales contribuent directement à la tension de surface de leur interface ce qui rend leur interprétation encore plus compliquée.

Comme on l'a vu précédemment, cette tension peut avoir une origine biologiquement active (le cortex d'actomyosine) et une origine moléculaire (la membrane plasmique). La tension de la membrane plasmique a été mesurée sur des globules rouges par une analyse de l'amplitude de ses fluctuations. Les résultats obtenus pour cette tension sont d'environ $6.5 \times 10^{-4} \text{ mN/m}$ [17] et de $2 \times 10^{-2} \text{ mN/m}$ [18]. Bien que ces valeurs semblent assez éloignées, on peut dire que la tension de membrane contribue peu aux tensions de surfaces mesurées dans les cellules épithéliales dont les valeurs sont vraisemblablement un ordre de grandeur plus élevé, comme on va le voir. Cependant, cette valeur ne semble pas complètement négligeable.

Les mesures de la tension de surface apicale peuvent se faire en aspirant partiellement la cellule dans une micropipette, mise au point en 1954 par Mitchison et Swann [19] [20]. Cette technique nécessite de mesurer la pression nécessaire pour aspirer la cellule comme on le voit sur la figure 1.29. En considérant la cellule comme un liquide, la pression

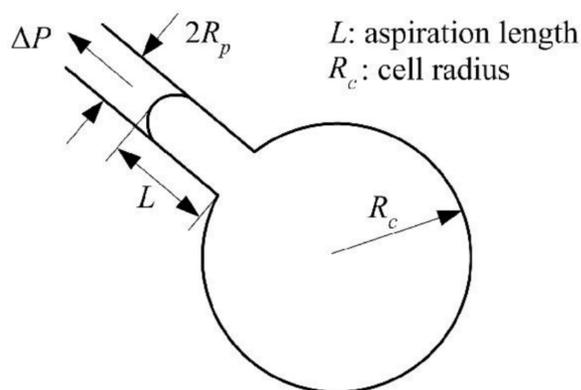


FIGURE 1.29 – Schéma de l'aspiration d'une cellule ronde par une micropipette. La tension corticale de la cellule est alors une fonction de la dépression ΔP , la taille de la cellule R_c et le rayon de la micropipette R_p . Adapté de [21].

mesurée, la taille de la micropipette et la taille de la cellule donnent la tension corticale via la loi de Laplace :

$$\Delta P = 2\gamma_c \left(\frac{1}{R_p} - \frac{1}{R_c} \right)$$

Avec ΔP la dépression nécessaire pour que la cellule soit aspirée dans la micropipette, γ_c la tension corticale de la cellule, R_p le rayon de la micropipette et R_c le rayon de courbure de la cellule. Cette relation n'est vraie que lorsque la distance sur laquelle la cellule est aspirée dans la micropipette (L sur la figure 1.29) est égale au rayon de la micropipette R_p .

Cette technique d'aspiration de cellules par micropipette a été utilisée sur beaucoup de types cellulaires différents. Les valeurs obtenues pour la tension corticale par cette technique vont de 0.03 mN/m pour les granulocytes humains [22], à 1.5 mN/m [23] ou 4.3 mN/m [24] pour *Dictyostelium* en passant par des valeurs plus conventionnelles comme 0.4 mN/m pour le fibroblaste [25].

Pour les MDCK, la lignée cellulaire que l'on a utilisée pour les expériences de cette thèse, les valeurs de la littérature sont le plus souvent obtenues par des mesures faites à l'AFM (Atomic Force Microscopy). Cependant, on se rend compte rapidement que les choses peuvent être très compliquées puisque les différentes méthodes peuvent donner des résultats différents d'un ordre de grandeur : 2 mN/m [26] et 0.2 mN/m [27] pour la même lignée cellulaire : les MDCK ! La deuxième mesure à 0.2 mN/m est faite avec une méthode classique de microscopie à force atomique où l'on vient indenter la face apicale des MDCK pour en mesurer la tension. La première mesure à 2 mN/m utilise également la microscopie à force atomique mais sans indentation : la sonde émet des ondes acoustiques afin de mesurer cette tension. Cependant, une valeur autour de 0.2 mN/m est communément admise comme étant un ordre de grandeur fiable pour la tension de surface de la face apicale des MDCK.

De façon plus large, les tensions de surface des cellules sont toujours très inférieures aux tensions de surface des liquides qui sont de l'ordre de quelques dizaines de mN/m. Cela s'explique par le fait que, comme on l'a vu dans la section relative au cytosquelette, ces deux tensions sont de nature très différentes : moléculaire pour les liquides et dominée par l'activité de l'acto-myosine pour les cellules. On trouve des tensions de surfaces qui varient de 0.02 mN/m pour le neutrophile humain [28] jusqu'au record de *Dictyostelium amoeba* avec 4.1mN/m [29].

Concernant la tension de surface intercellulaire, il convient de la séparer en deux contributions : une contribution positive du cortex d'acto-myosine et une contribution négative aux adhésions intercellulaires. L'énergie d'adhésion d'une paire de molécules de cadhérines est d'environ $5 \cdot 10^{-20}$ J. C'est en fait très insuffisant pour réduire fortement la tension de surface intercellulaire puisque cela ne représente finalement qu'une très faible proportion de la tension corticale de cellules de poisson-zèbre [30] par exemple. Dans cette étude, les auteurs ont contourné la difficulté de mesurer directement la tension de surface intercellulaire en utilisant simultanément deux mesures différentes. Le rapport entre la

tension de surface intercellulaire et la tension corticale a été obtenu en mesurant les angles de contacts selon le même principe que celui présenté en figure 1.27. Le rapport entre la tension de surface intercellulaire et la tension corticale obtenu varie de 0.5 à 0.7 selon les conditions. L'énergie d'adhésion ensuite obtenue est de seulement 10% de la tension corticale ce qui ne suffit pas à rendre compte de la diminution de tension intercellulaire observée.

Au maximum, il a été mesuré des énergies d'adhésion d'environ 30% de la valeur de la tension corticale dans des agrégats de carcinome chez l'embryon [31] mais même dans ce cas, cette énergie d'adhésion ne suffit pas à expliquer la baisse de la tension de surface intercellulaire. Il y a donc une diminution de la tension corticale aux surfaces intercellulaires et cette diminution joue un rôle majeur dans l'adhésion entre deux cellules.

Des techniques indirectes de manipulation laser ont été utilisées pour mesurer la tension de surface intercellulaire. On peut utiliser une pince optique pour déplacer une jonction intercellulaire et observer sa relaxation. Dans l'embryon de Drosophile, les tensions mesurées par cette technique ont donné environ 0.05 mN/m [32].

Pour les MDCK, des manipulations lasers similaires mais à l'échelle du tissu ont donné une tension de surface intercellulaire de 0.7 mN/m [33].

1.3.2 Approches théoriques

Les approches théoriques visant à comprendre la forme des cellules épithéliales font très largement appel aux simulations numériques comme on va le voir. Beaucoup d'approches coexistent aujourd'hui : certaines sont à deux dimensions, d'autres à trois dimensions. Certaines sont continues et d'autres discrètes, certains prennent la cellule comme brique élémentaire et d'autres ont des descriptions subcellulaires.

Modèles de vertex 2D

Les modèles de vertex consistent à considérer la forme des cellules épithéliales via la position de leurs sommets (ou *vertex* en anglais) qui marquent les points de contact entre au moins trois cellules voisines. Les règles et méthodes précises de mise en œuvre et de simulation diffèrent d'un modèle à l'autre et peuvent être adaptées à un problème biologique particulier [34]. Ces modèles de vertex ont été développés au départ pour étudier la forme et l'arrangement des bulles dans des mousses [35].

La position des vertex évolue dans le temps et cette évolution est régie par la forme d'une énergie pour le système complet. On considère une énergie du système qui dépend des positions des vertex, que l'on note r_i , $E(r_i)$. La force exercée sur le vertex i sera

simplement

$$F_i = -\frac{\partial E}{\partial r_i}$$

Les termes énergétiques utilisés sont très variés et peuvent concerner toutes les caractéristiques géométriques des cellules ou des segments intercellulaires. On va en donner ici quelques-uns des plus courants en partant de l'énergie utilisée dans [36] [37] [38] et illustrée dans la figure 1.30 :

$$E = \frac{K}{2}(A - A_0)^2 + \Lambda l + \Gamma P^2$$

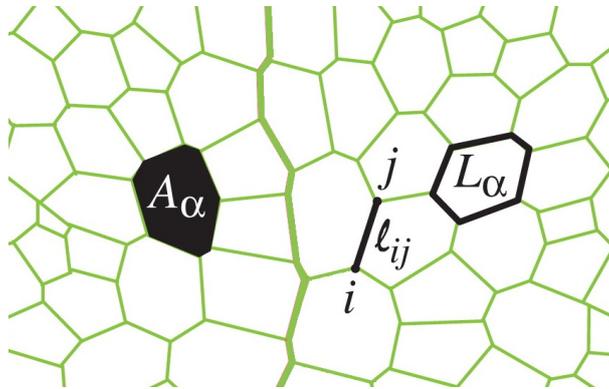


FIGURE 1.30 – Schéma d'un modèle de vertex apical. Les contours des cellules sont en vert. A_α est l'aire de la cellule α , l_{ij} est la longueur du segment entre les vertex i et j et L_α est le périmètre de la cellule α . Adapté de [37]

Ces termes recouvrent des phénomènes physiques et biologiques très différents :

- $\frac{K}{2}(A - A_0)^2$ est une compressibilité élastique en volume de la cellule à hauteur constante avec K le coefficient de compressibilité, A l'aire de la face apicale et A_0 son aire préférentielle. Ce terme est aussi parfois utilisé pour rendre compte d'une élasticité de la surface apicale des cellules.
- Λl est un terme de tension de ligne Λ qui s'applique à tous les segments entre deux cellules et qui est proportionnel à la longueur du segment l . Biologiquement, il rend compte de la contribution de la ceinture d'acto-myosine contractile qui entoure les cellules épithéliales. Ce terme peut aussi être utilisé en tant que tension de surface intercellulaire intégrée sur l'épaisseur des cellules. Il s'agit alors de rendre compte à la fois de la contractilité de la face latérale de la cellule et de ses adhésions.
- ΓP^2 est un terme de contractilité Γ du périmètre P de la cellule. Il rend compte également de la contribution de la ceinture d'acto-myosine contractile qui entoure les cellules épithéliales.

Toutes ces contributions doivent être sommées sur l'ensemble qui les concerne : la com-

pressibilité en volume concerne les cellules tandis que la tension de ligne concerne les segments intercellulaires.

Certains modèles préfèrent une tension de surface apicale à une élasticité, remplaçant le premier terme de l'énergie par $\gamma_a A$ avec γ_a la tension de surface apicale et A son aire [39]. Dans certains cas, la contractilité du périmètre de la face apicale est remplacée par une élasticité en $K(P - P_0)^2$ [40] et donc avec un nouveau paramètre qui donne un périmètre préférentiel énergétiquement P_0 .

Les modèles de vertex peuvent également inclure un terme de force extérieure à ajouter aux forces qui dérivent de l'énergie du système. Ces forces extérieures peuvent être utilisées pour rendre compte d'une tension ou d'une compression appliquée à l'ensemble du tissu [39] [41] [33] ou d'une pression exercée par un fluide extérieur [42] [43] par exemple. Le terme de force extérieure peut aussi correspondre à une propulsion intrinsèque des vertex due à l'activité des cellules [40].

Enfin, certains modèles incluent une force de dissipation visqueuse s'appliquant directement sur le vertex [44] [40].

Tous ces modèles sont largement utilisés pour reproduire des événements morphogénétiques observés ou pour obtenir des résultats concernant la forme et la dynamique des cellules épithéliales in-vitro.

Les modèles de vertex à 2D que l'on a présentés ici sont tous des modèles de vertex apicaux, c'est-à-dire que la projection du modèle se fait sur le plan apical des cellules épithéliales. Il existe une autre classe de modèles de vertex à 2D qui sont cette fois projetés sur un plan orthogonal au plan apical. On les appellera modèle de vertex latéraux. Dans ces modèles, les cellules sont des quadrilatères avec deux côtés représentant les faces latérales des cellules, un côté la face apicale et un dernier la face basale, comme on le voit sur la figure 1.31.

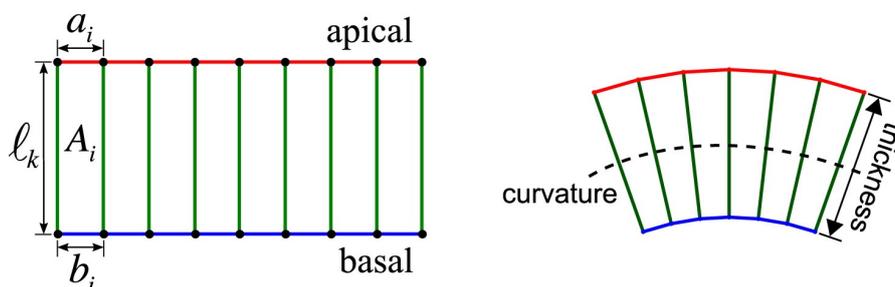


FIGURE 1.31 – Schéma d'un modèle de vertex 2D latéral. Les jonctions intercellulaires sont en vert, les faces basales en bleu et les faces apicales en rouge. Contrairement aux modèles de vertex 2D apicaux, ils permettent de faire évoluer le système vers un état courbé (schéma de droite). Adapté de [45]

Les termes énergétiques utilisés dans ces modèles sont souvent une adaptation à la

nouvelle projection de ceux utilisés dans les modèles de vertex 2D apicaux.

Ces modèles de vertex latéraux 2D se sont avérés utiles pour certains processus morphogénétiques comme l'invagination chez l'embryon de drosophile pour former le sillon ventral [42] [46], ou dans des géométries très courbées dans une direction [47].

Modèles de vertex 3D

Pour construire un modèle de vertex en trois dimensions, on peut se contenter dans certains cas de faire une extension des modèles de vertex 2D apicaux en relaxant la contrainte sur la planéité de l'épithélium. Ainsi, le tissu sera un feuillet courbé de faces apicales. C'est donc un objet à 2D qui évolue dans un espace à trois dimensions. Cette simplification aide beaucoup à l'implémentation du modèle et repose sur l'hypothèse que la forme de la face basale ne va pas jouer un rôle déterminant dans l'évolution du tissu. Les modèles de vertex apicaux en 3D sont utiles pour gérer les surfaces courbées des embryons de drosophile [48] [49] ou plus généralement pour prendre en compte l'influence de la courbure sur les cellules épithéliales [50].

Les modèles de vertex purement 3D représentent les cellules dans l'espace avec tous leurs sommets et toutes leurs faces différenciées : apicales, basales et intercellulaires comme on le voit sur la figure 1.32. Ces modèles permettent de traiter le cas de géométries

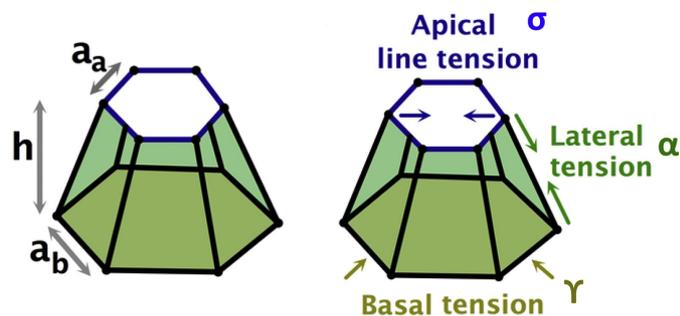


FIGURE 1.32 – Schéma d'un modèle de vertex 3D où l'on voit que les faces basales, apicales et latérales sont pleinement représentées. Adapté de [43]

complexes telles qu'on en trouve en embryogenèse [43] mais aussi des agrégats cellulaires [51] dans lesquels les cellules ont des voisins dans toutes les directions.

Ils ont permis également de montrer la nécessité d'une tension apicale pour maintenir l'intégrité des tissus qui prolifèrent [52]. Lorsque l'épithélium forme une coquille, avec la face apicale tournée vers l'intérieur comme on le voit sur la figure 1.33, le modèle de vertex 3D prédit que les divisions cellulaires peuvent mettre à mal la forme et l'arrangement régulier des cellules. De même, la régularité de la courbure de la coquille dans son ensemble peut également se déstabiliser suite aux divisions cellulaires successives. On voit sur la figure 1.33 l'évolution temporelle de cette coquille. Au départ (a et e sur la figure 1.33),

tous les ingrédients du modèle sont présents dans la simulation : élasticité du volume, élasticité de la surface (ici les surfaces apicales et basales sont fixées égales), élasticité de la hauteur et enfin contractilité apicale sous la forme d'une élasticité du périmètre de la face apicale. La coquille évolue ensuite avec ce modèle de vertex (b et f) au fur et à mesure des divisions cellulaires qui la font grossir. Dans le cas où le modèle est conservé complètement (c et g puis d et h), l'évolution continue en ne créant pas d'irrégularités de la courbure ou de la forme des cellules par rapport à l'état précédent. Dans le cas où le modèle est modifié pour faire disparaître la tension apicale (j et l puis k et m), la courbure de la coquille devient de plus en plus irrégulière au fil des divisions cellulaires, de même pour la forme des cellules.

De plus, les autres ingrédients du modèle ne peuvent pas rattraper l'absence de tension apicale. Ce modèle de vertex 3D prédit donc que la tension localisée sur le périmètre de la face apicale est nécessaire pour retrouver les courbures, formes et arrangements cellulaires réguliers que l'on observe dans les coquilles épithéliales *in-vivo*.

Modélisations continues

Des approches continues ont également été proposées plus récemment pour décrire les tissus épithéliaux. Il s'agira de se placer à des échelles de longueurs suffisamment grandes devant la taille d'une cellule pour ne pas avoir à décrire la forme des cellules individuellement. L'épithélium devient alors une nappe 2D évoluant dans un espace 3D. Des études très générales ont mis en œuvre la correspondance entre modèle de vertex et modélisation continue [50] [53] mais cette approche a aussi été fructueuse dans des contextes de morphogénèse des ailes de drosophile [54].

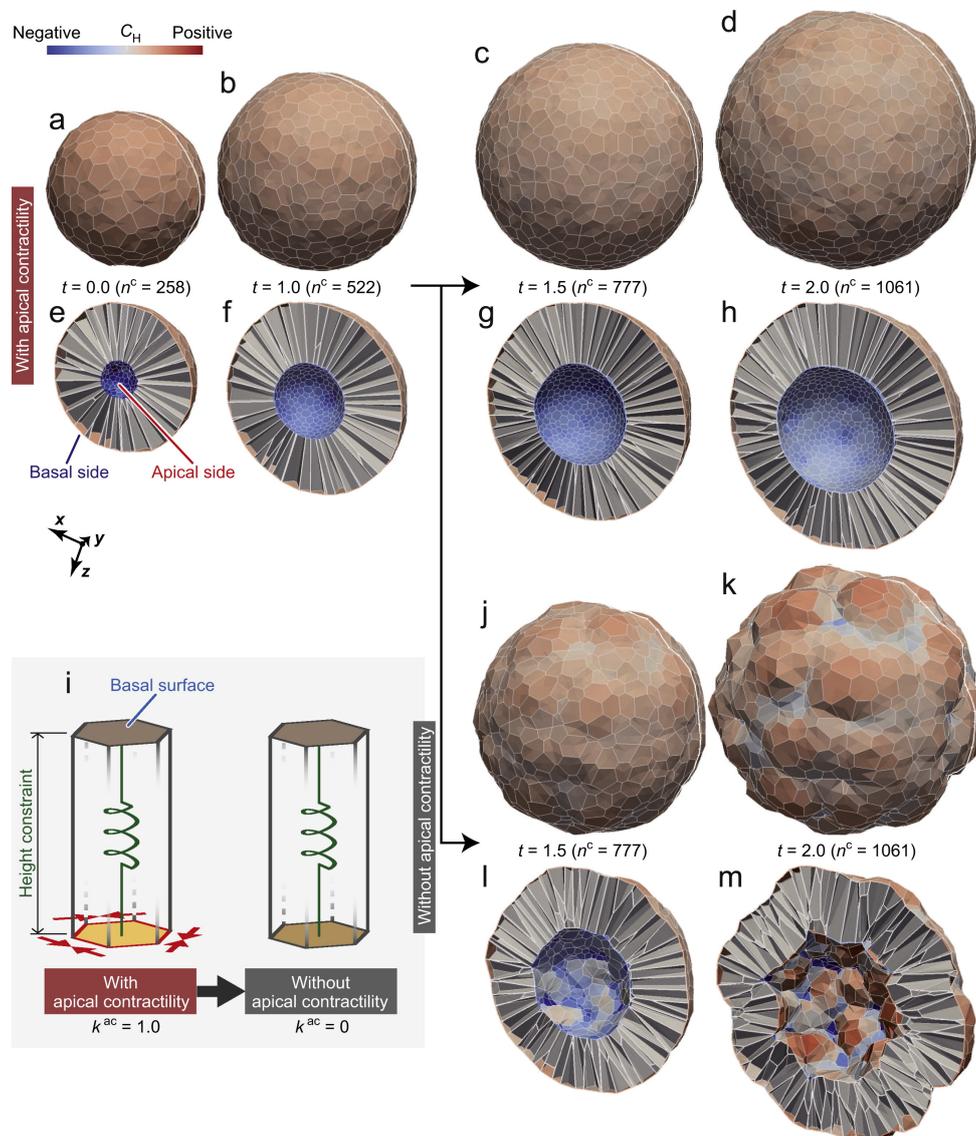


FIGURE 1.33 – Modèle de vertex 3D d’une coquille épithéliale avec prolifération. La prolifération des cellules au cours du temps crée des irrégularités de courbure de la coquille et de forme des cellules (k et m) qui n’apparaissent pas si le modèle inclue une tension du périmètre de la face apicale (d et h). Figure de [52]

Méthodes expérimentales

*Ce n'est qu'en essayant
continuellement que l'on finit par
réussir... En d'autres termes, plus ça
rate et plus on a de chances que ça
marche.*

Proverbe Shadock

Ce chapitre vise à expliciter l'ensemble des conditions expérimentales et d'analyses utilisées pour ce travail. Il s'agit également d'expliquer tous les choix faits dans leur contexte.

2.1 Choix expérimentaux généraux

2.1.1 Système biologique

Cellules utilisées

Comme on l'a vu dans l'introduction, les épithéliums sont présents dans beaucoup d'organismes différents et peuvent avoir des caractéristiques différentes selon leur fonction et leur environnement biologique à un instant donné. On souhaite étudier les propriétés physiques des épithéliums, il serait donc plus commode de minimiser la variabilité biologique induite par tous ces facteurs. Même si le but de ce travail est de dégager des propriétés générales à tous les tissus épithéliaux simples, on va se restreindre pour la partie expérimentale à un épithélium en particulier. De même, on ne veut pas que les propriétés de l'épithélium choisi soient modifiées au cours du temps par le reste de l'organisme ou qu'elles varient entre les individus duquel il est prélevé.

On a donc choisi de travailler sur des cellules in-vitro, c'est-à-dire isolées du reste de l'organisme et plus particulièrement sur une lignée cellulaire donc en ne prélevant pas les cellules d'un animal différent à chaque expérience. Les lignées cellulaires sont immortalisées, c'est-à-dire qu'elles peuvent se diviser à l'infini et proviennent d'un individu en particulier. On peut ainsi réaliser des expériences sur des cellules qui sont les mêmes d'un échantillon à l'autre et donc aussi d'un groupe de recherche à l'autre.

Il existe des lignées cellulaires pour la plupart des types de tissus. Pour choisir la lignée qu'on va utiliser il faut que ce soit un épithélium simple. Parmi les épithéliums simples, on a choisi les cellules *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) [55]¹. Cette lignée cellulaire a été isolée par S. H. Madin et N. B. Darby en 1958 à partir de cellules provenant du tubule rénal d'un chien.

Elles sont très utilisées en tant que lignée épithéliale ce qui permet d'utiliser beaucoup de résultats déjà établis, en biologie et en physique, sur ces cellules mais aussi de comparer nos résultats avec ceux obtenus par d'autres groupes de recherche. Les MDCK sont aussi aisées à cultiver car leur type dérive très peu au cours du temps ou en fonction de la densité de cellules. Il existe plusieurs sous-types de MDCK disponibles commercialement. Les MDCK II de la *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC) sont un sous-type adapté car ce sont celles qui ont le phénotype le plus stable : les autres sous-types ont tendance à dériver (en muscle lisse pour les MDCK I) lorsque les conditions optimales de culture ne sont pas respectées [56]. Dans la suite on appellera cette lignée de type sauvage, c'est-à-dire non génétiquement modifiée, *MDCK WT* pour *Wild Type*.

On utilise également une lignée de MDCK II génétiquement modifiée pour exprimer la protéine chimère *EcadGFP*, c'est-à-dire de la E-cadhérine attachée à la *GFP* (pour *Green Fluorescent Protein*) [57]. L'intérêt est de pouvoir visualiser la localisation de la E-cadhérine dans la cellule. On pourra ainsi mesurer précisément la forme de l'interface intercellulaire et aussi connaître la répartition de la E-cadhérine sur cette interface. L'autre intérêt est que cela nous donne une lignée cellulaire exprimant une plus grande quantité de E-cadhérine car la *EcadGFP* est exprimée en plus de la E-cadhérine normale. On pourra ainsi utiliser cette lignée pour tester l'influence de la quantité de E-cadhérine exprimée dans la cellule.

Substrat utilisé

Le substrat sur lequel les MDCK sont cultivées a une influence sur leur forme. Les deux facteurs importants à choisir ici sont la rigidité du substrat et sa nature chimique.

1. L'isolation de la lignée MDCK n'a en fait jamais été publiée. La référence donnée ici est la publication de l'isolation de deux autres lignées par les mêmes auteurs la même année et donne donc une bonne idée du processus utilisé.

On a préalablement essayé de cultiver les MDCK sur trois substrats différents : du verre, du polydiméthylsiloxane (PDMS) et des gels de polyacrylamide.

Le verre a un module d'Young de l'ordre de 70GPa ce qui en fait un matériau infiniment rigide pour les cellules qui ont une sensibilité à la rigidité jusqu'à quelques dizaines de kPa. Sur le verre les MDCK sont très plates (hauteur moyenne de l'ordre de 2.5µm) et cela ne convient pas pour notre analyse car la forme précise de la face apicale, par exemple, devient difficilement mesurable.

Le PDMS standard (Sylgard 184 ; 10% réticulant) a un module d'Young de 2.6MPa [58] ce qui en fait encore un matériau infiniment rigide pour les cellules. Sur le PDMS les cellules ont une hauteur d'environ 5µm, ce qui est bien adapté pour l'analyse d'image. La différence observée entre la hauteur des cellules sur le verre et sur le PDMS vient, selon toute vraisemblance, de leur différence de propriété chimique. En particulier, comme on le verra plus loin, on dépose une couche de fibronectine sur le substrat et la qualité de ce dépôt peut changer selon la nature chimique du substrat.

Les gels de polyacrylamide que l'on a préparés ont un module d'Young de 3kPa et 5 kPa. Sur ces gels les cellules ont une forme très cuboïdale avec une hauteur d'environ 10µm. C'est le cas qui se rapproche le plus du milieu physiologique des cellules mais nous ne pouvons pas en faire des substrats à profil sinusoïdal.

On utilisera donc le PDMS comme substrat dans la plupart des cas étudiés dans cette thèse.

On déposera également une couche (ou *coating*) de fibronectine sur le substrat. Le but est de faciliter l'adhérence des cellules sur le substrat initialement, d'une part, (au bout d'un certain temps les cellules produisent leur propre fibronectine), et de pouvoir visualiser le substrat en déposant de la fibronectine fluorescente, d'autre part.

Culture cellulaire

Les cellules MDCK WT ont été cultivées dans un milieu composé de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), de 10% (en volume) de sérum de veau foetal (SVF) et de *penicillin-streptomycin* à 100U/mL. Le milieu de culture des MDCK EcadGFP est le même à l'exception de l'ajout de *G418* (Généticine) à 50µg/mL. Le *G418* est un antibiotique qui sélectionne les MDCK EcadGFP car elles ont aussi eu une modification génétique leur donnant la résistance au *G418*. Sans cet ajout, la population de MDCK EcadGFP a tendance à exprimer de moins en moins la protéine chimère EcadGFP au fil des générations.

Les cellules sont cultivées dans des flacons de culture T25 à 37°C et sous 5% de CO₂. Le passage des cellules se fait à l'aide de trypsine et on divise la quantité de cellules dans le nouveau flacon par 6. Cette opération est faite lorsque les cellules arrivent juste à

confluence, soit typiquement tous les 3-4 jours. Le passage des cellules permet de renouveler le milieu de culture qui s'est appauvri en nutriments et s'est acidifié. Cela permet aussi de maintenir la population de cellules en croissance, puisqu'on fait le passage juste à la confluence, ce qui préserve mieux le type cellulaire des MDCK au fil des générations.

La culture des cellules pour les expériences commence par l'ensemencement des cellules sur les substrats placés dans des puits. On doit choisir la densité initiale de cellules qui conditionnera le temps que mettront les cellules à arriver à confluence et finalement le paramètre le plus important ici : la durée après confluence au moment de l'observation au microscope. On souhaite que ce paramètre soit invariant d'une expérience à l'autre car il a une grande influence sur la forme des cellules. On choisit d'observer les cellules 48 heures après la confluence car cela se rapproche fortement d'un état stationnaire pour la forme des MDCK [59]. On choisit également d'ensemencer les cellules 48h avant la confluence : un compromis entre une durée assez courte et le fait de ne pas avoir trop de cellules dès le départ, ce qui pourrait empêcher beaucoup de cellules d'accéder au substrat. Le temps de doublement des MDCK à faible confluence a été mesuré à 16h [60] alors qu'on a mesuré un temps de 24h lorsque les cellules sont plus proches de la confluence. On prendra donc une estimation d'un temps de doublement de 20h pour calculer la densité initiale de cellules dont on a besoin, ce qui donne 1.2 doublements par jour. Ainsi, en 48h, la quantité de cellules aura été multipliée par $2^{2.4} \simeq 5.3$. On prend une surface moyenne au moment de la confluence de $100 \mu\text{m}^2/\text{cellule}$ ce qui donne une densité initiale $d = \frac{1\text{cellule}}{5.3*100 \mu\text{m}^2} \simeq 1900$ cellules/ mm^2 .

L'ensemencement se fait dans des puits de plaques de culture standards (24 puits) dont le rayon est de 7.5 mm. On a alors besoin de $N_{\text{cellules}} = 1900 * \pi * 7.5^2 \simeq 340000$ cellules/puits. Le comptage des cellules se fait à l'aide d'une cellule de Malassez.

Le milieu est renouvelé 48h après l'ensemencement et les cellules sont fixées dans le Paraformaldehyde (PFA) à 4% - en volume dans du tampon phosphate salin (PBS) - 96h après l'ensemencement. Le PFA fixe les cellules en réticulant les protéines entre elles. Après cette étape les cellules ne sont plus actives mais conservent leur forme pendant plusieurs mois. Cela va permettre d'observer toutes les cellules au même temps après la confluence (ici 48h) et de marquer les cellules avec des molécules fluorescentes comme on va le voir dans la partie suivante.

Pour certaines expériences, on a ajouté de la blebbistatine au milieu de culture (pour une concentration finale à $5 \mu\text{M}$ ou $50 \mu\text{M}$) pendant 15 minutes juste avant de fixer les cellules. Cette drogue a pour effet d'inhiber l'activité des moteurs myosine-II [61]. Son action est rapide et on a choisi la durée d'exposition conformément à l'usage habituel de cette drogue [62] [63]. La concentration de $50 \mu\text{M}$ correspond à une saturation de l'effet de la blebbistatine sur la contractilité tandis que $5 \mu\text{M}$ diminue de moitié la contractilité par

rapport au cas saturé [62].

2.1.2 Imagerie

Microscopie confocale

On souhaite mesurer la forme des cellules en 3D ce que ne permet pas la microscopie optique à champ large, notamment pour sa résolution trop faible dans la direction de l'axe optique. En effet, le microscope à champ large capte beaucoup de lumière qui ne provient pas du plan focal ce qui réduit fortement le niveau de détail observé pour l'objet dans le plan focal.

Pour pallier à ce problème, Marvin Minsky a inventé le microscope confocal en 1957 [64]. L'idée est de placer un sténopé, ou *pinhole* en anglais, devant la caméra de façon à ne capter que la lumière provenant du plan focal comme illustré sur le schéma 2.1. De même, la lumière qui éclaire l'échantillon passe par un sténopé de façon à éclairer au minimum les zones de l'échantillon hors du plan focal et à côté du point observé.

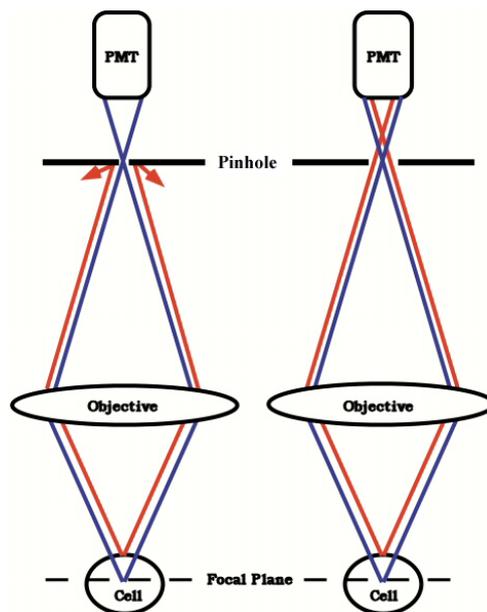


FIGURE 2.1 – Schéma illustrant le rôle du sténopé. À gauche la lumière hors du plan focal (en rouge) n'atteint pas la caméra contrairement à la situation de droite où le sténopé est plus grand. Un microscope à champ large n'a tout simplement pas de sténopé

Un inconvénient du microscope confocal est qu'il collecte moins de lumière et donc nécessite des sources lumineuses plus puissantes, des capteurs plus performants et des temps d'expositions plus importants qu'un microscope classique. Ces technologies ont évolué pour permettre au microscope confocal d'être un outil très performant à partir des années 90 notamment en remplaçant les lampes à décharge par des lasers pour éclairer l'échantillon.

Une autre limitation de la microscopie confocale est la longue durée nécessaire pour prendre une image. Étant donné que la source lumineuse n'éclaire qu'un point de l'échantillon à la fois, il faut faire un balayage de tout cet échantillon pour obtenir l'image finale, ce qui peut être très long. Ce problème a été grandement atténué par l'utilisation d'un disque de Nipkow ou *spinning disk*. Il s'agit de paralléliser le balayage en éclairant plusieurs points suffisamment éloignés en même temps comme on le voit sur le schéma 2.2.

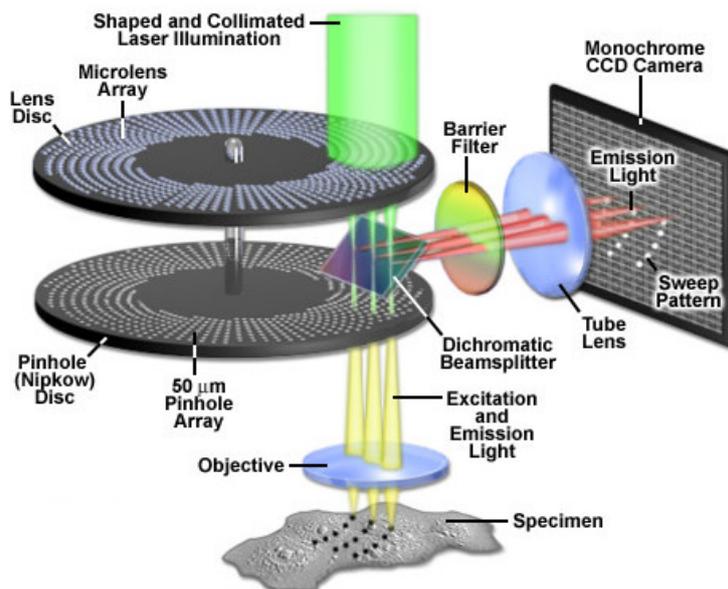


FIGURE 2.2 – Schéma du disque de Nipkow ou *spinning disk*. Une multitude de sténopés sont positionnés sur un disque en rotation afin de paralléliser le balayage de l'échantillon. Le disque supérieur est un disque de microlentilles permettant de focaliser la lumière sur les *pinholes*, ce qui augmente la quantité de lumière passant à travers les sténopés de plus d'un ordre de grandeur (de 4% à 58%). Source : Yokogawa.

On utilise le microscope de la plateforme d'imagerie ImagoSeine² dont les références sont :

- microscope inversé motorisé DMI8 (Leica).
- tête spinning disk grand champ CSU-W1 (Yokogawa - Andor) à 4,000rpm
- caméra sCMOS Orca-Flash 4 V2+ (Hamamatsu)
- logiciel d'acquisition MetaMorph

Marquages utilisés

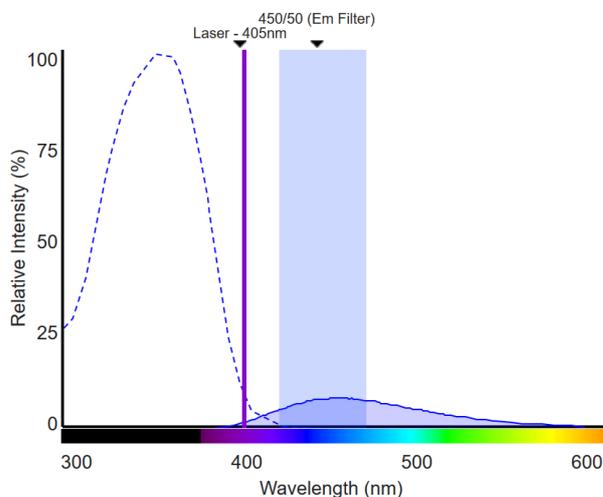
On souhaite observer les différents composants des cellules séparément pour deux raisons. La première est que cela permet de mesurer la forme des cellules plus précisément.

2. <https://imagoseine.ijm.fr/706/equipement-spinning-disk.htm>

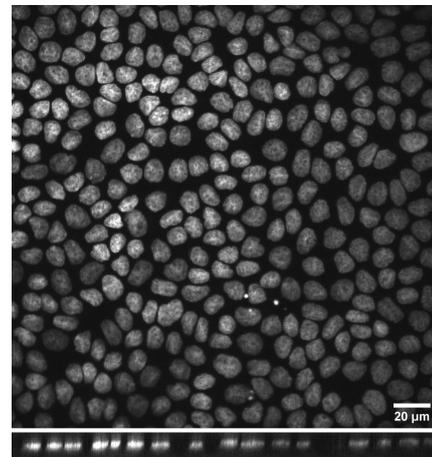
En effet, si on observe uniquement un composant du contour des cellules, le noyau n'en perturbera pas le signal même s'il en est très proche. La deuxième raison est que cela permet de mieux comprendre la structure de la cellule dans un état donné car on peut observer la localisation de différentes protéines bien choisies.

Pour y parvenir, on utilisera des marqueurs fluorescents. En attachant des marqueurs ayant des longueurs d'onde d'absorption différentes à des constituants différents, on pourra les observer séparément si on dispose de sources lumineuses et de filtres adéquats.

Pour le noyau des cellules, on a utilisé un marquage au 4',6-diamidino-2-phenylindole ou **DAPI**. Cette molécule, qui se lie à l'ADN, a des maxima d'absorption à 358nm (proche UV) et d'émission à 461nm (bleu) [65]. Le laser utilisé pour l'excitation du DAPI émet à 405nm ce qui est assez loin du maximum mais il s'agit d'un standard qui fonctionne suffisamment bien. Pour récupérer le signal de fluorescence, le filtre d'émission laisse passer la lumière dans la bande 425-475nm ce qui est très bien centré sur le maximum d'émission du DAPI. Ces données spectrales sont reportées sur la figure 2.3a. Pour faire le marquage, les cellules sont immergées pendant 20 minutes dans une solution de DAPI à 0.6 μ M dans du PBS. Le DAPI est largement utilisé pour marquer le noyau des cellules fixées car il donne une très bonne qualité de signal en fluorescence et passe à travers la membrane des cellules ce qui évite de devoir la perméabiliser.



(a) Spectres d'absorption et d'émission du DAPI.

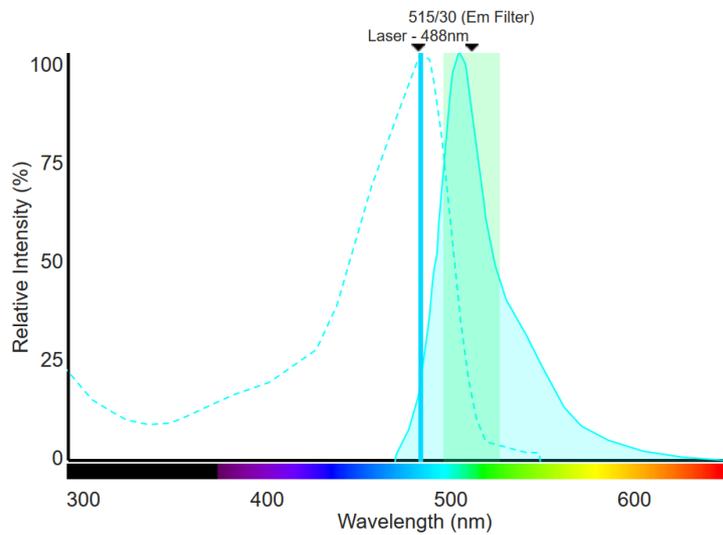


(b) Exemple d'image de MDCK obtenu avec un marquage au DAPI.

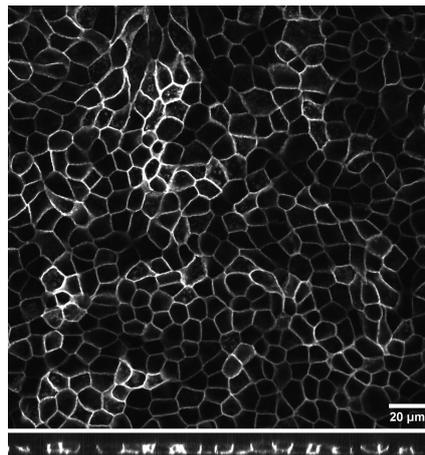
FIGURE 2.3 – Le marquage au DAPI pour les noyaux des cellules.

La protéine fluorescente verte, plus souvent appelée *GFP* [66] [67] [68] de l'anglais *Green Fluorescent Protein*, nous permet ici de marquer les jonctions intercellulaires comme expliqué dans le paragraphe concernant la lignée de MDCK EcadGFP. Les données spectrales de la GFP ainsi que le laser et le filtre d'émission utilisés sont reportés sur la figure 2.4a. Pour observer également les jonctions intercellulaires dans les MDCK WT, on a

aussi essayé de faire un marquage de la β -caténine mais la qualité des images était trop mauvaise pour les exploiter.



(a) Spectres d'absorption et d'émission de la GFP.

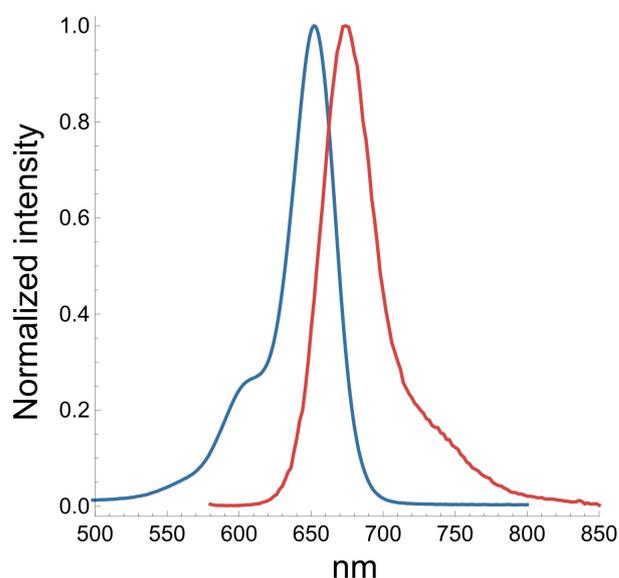


(b) Exemple d'image de MDCK EcadGFP.

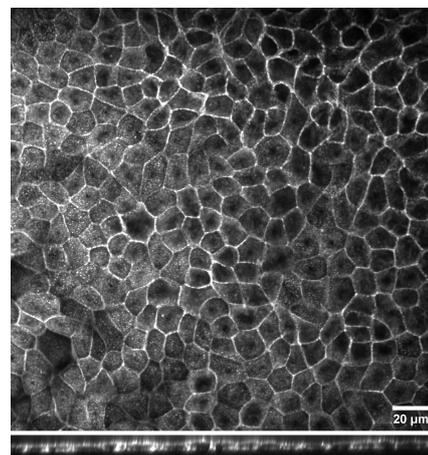
FIGURE 2.4 – Le marquage des E-Cadherin à la GFP pour les contours des cellules.

Marquer l'actine filamentueuse (ou F-actine) permet de visualiser tout le contour des cellules : jonctions intercellulaires, face apicale et face basale. C'est donc un marquage particulièrement précieux pour les MDCK WT qui n'ont pas de marquage de la E-cadherin. Cela permet aussi de visualiser la répartition de la F-actine dans la cellule et ainsi avoir une idée des zones de tension. La F-actine est marquée à l'aide de *SiR-actin*, un composé de l'entreprise Spirochrome, qui est formé de jasplakinolide (molécule se liant spontanément à la F-actine) et de *silicon rhodamine* (SiR) (un fluorophore qui absorbe dans le rouge et émet dans le rouge lointain) [69] Les données spectrales concernant la SiR-actin sont reportées sur la figure 2.5a. Pour faire le marquage, les cellules sont immergées

pendant environ 12 heures dans une solution de SiR-actin à 100nM dans du PBS. Ce marquage ne nécessite pas de perméabiliser la membrane des cellules, comme pour le DAPI. C'est la raison pour laquelle la SiR-actin a été utilisée plutôt que la phalloïdine, marqueur standard de la F-actine.



(a) Spectres d'absorption et d'émission de la SiR-actin.



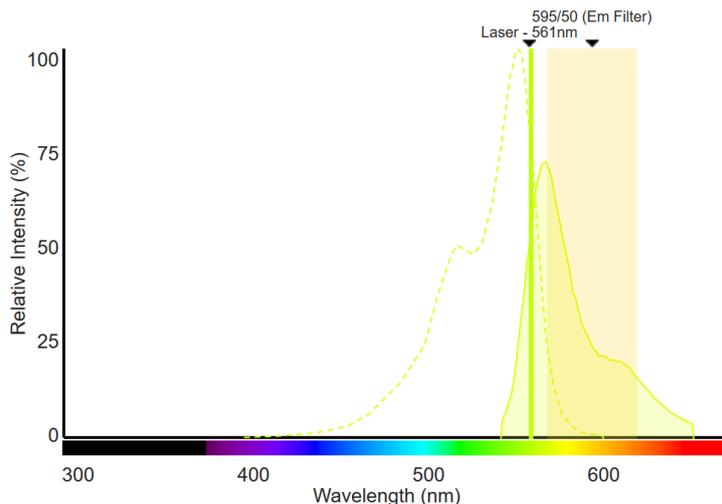
(b) Exemple d'image de MDCK avec un marquage SiR-actin.

FIGURE 2.5 – Le marquage de la F-actine à la SiR-actin.

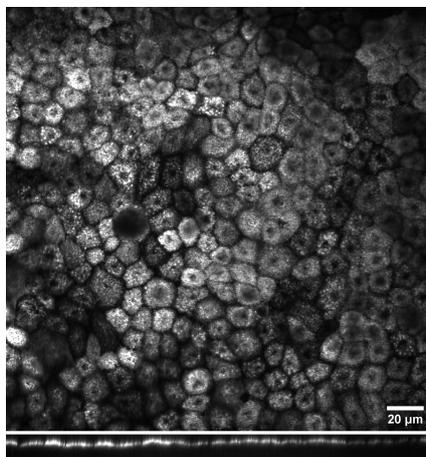
La face apicale des cellules est marquée par le fluorophore Dylight 549 attaché au marqueur apical gp135 [70]. D'abord on attache un anticorps anti-gp135 (DSHB, référence 3F2/D8) obtenu chez la souris en immergeant les cellules dans la solution commerciale diluée au 25ème pendant 20 minutes. Ensuite on immerge les cellules dans une solution de fluorophores Dylight 549 attachés à un anticorps anti-souris obtenu chez la chèvre pendant 30 minutes. Les données spectrales du Dylight 549 sont reportées sur la figure 2.6a. Ce marquage ne nécessite pas de perméabiliser les cellules.

Pour observer la membrane apicale, on a aussi essayé de faire un marquage au WGA (de l'anglais *Wheat germ agglutinin*). Il s'agit d'une protéine qui marque les glycoprotéines. Elle est utilisée de façon standard pour marquer les pores nucléaires des cellules. Sur des cellules fixées et sans perméabilisation, le WGA se lie bien à la membrane apicale. Les résultats étaient assez bons mais pas aussi clairement définis qu'avec le marquage de gp135.

Le substrat est marqué en faisant un *coating* de fibronectine fluorescente. Pour l'obtenir, on utilise un kit contenant le fluorophore préparé pour se lier aux protéines de façon générique. Pour les MDCK WT, on utilise un fluorophore qui émet dans le vert car c'est le dernier canal de fluorescence pas encore utilisé : le DyLight 488. Les données spectrales



(a) Spectres d'absorption et d'émission du Dylight 549.



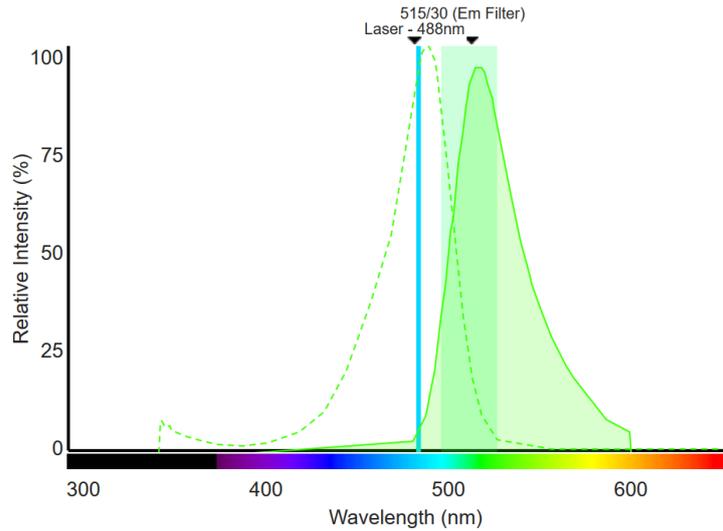
(b) Exemple d'image de MDCK avec un marquage de gp135 au Dylight 549.

FIGURE 2.6 – Le marquage de la face apicale au Dylight 549.

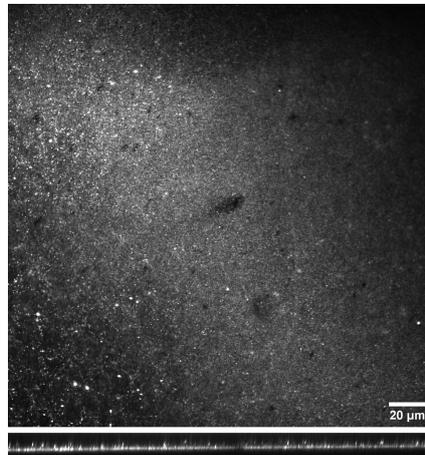
du DyLight 488 sont reportées sur la figure 2.7a.

Pour les MDCK EcadGFP, le marquage du substrat suit le même principe à la différence près que l'on choisit un fluorophore qui émet aux mêmes longueurs d'onde que pour le marquage au gp135 (membrane apicale). En effet, les quatre canaux sont déjà utilisés mais on peut sans problème utiliser celui de la membrane apicale car son signal sera toujours bien séparé dans l'espace de celui du substrat en pratique. Il n'y a donc pas de risque de confondre ces deux éléments. Le fluorophore est le Dylight 549 dont on a déjà donné les caractéristiques spectrales en figure 2.6a. Un exemple du résultat obtenu est donné en figure 2.8

On résume dans ce tableau les fluorophores utilisés pour chaque lignée de MDCK :



(a) Spectres d'absorption et d'émission du Dylight 488.



(b) Exemple d'image de MDCK avec un marquage de la fibronectine au Dylight488.

FIGURE 2.7 – Le marquage de la fibronectine au Dylight488 pour localiser le substrat.

	Wild type	EcadGFP
gp135 (membrane apicale)	Dylight 549	Dylight 549
F-actine	SiR-actin	SiR-actin
E-cadhérine	pas marqué	GFP
Noyau	DAPI	DAPI
Fibronectine	Dylight 488	Dylight 549

Paramètres utilisés

Le temps d'exposition et la puissance des lasers conditionnent le contraste de l'image finale. Le choix optimal pour ces deux paramètres vise à exploiter toute la gamme dyna-

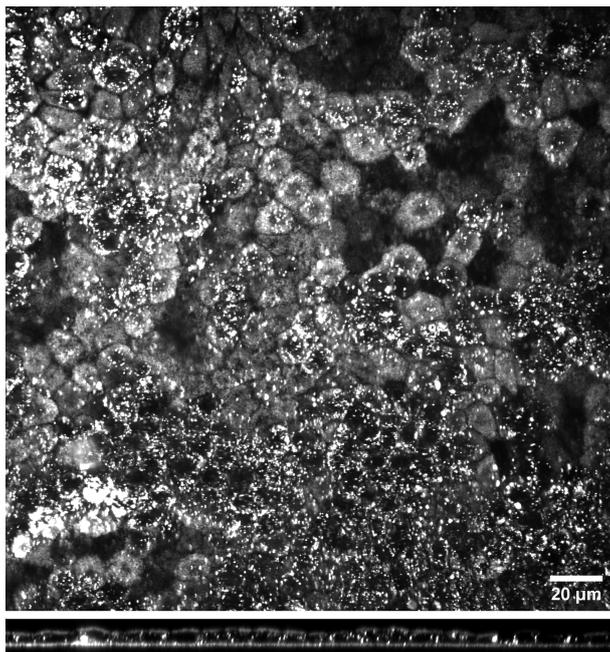


FIGURE 2.8 – Image de MDCK E-Cadhérine GFP avec le marquage de gp135 (membrane apicale) et de la fibronectine (substrat) au Dylight 549

mique de la caméra sans faire saturer les pixels. Pour notre dispositif, la saturation n'est généralement atteinte que pour des temps d'exposition supérieurs à 1000ms par image avec une puissance de laser réglée à 80%. On n'ira pas au-delà cependant car des temps d'expositions plus longs avec une telle puissance de laser peuvent donner lieu à du photoblanchiment qui dégraderait le signal de fluorescence au cours de la prise d'image (en particulier pour la SiR-actin, le Dylight 549 et le Dylight 488).

Le choix de l'objectif conditionne la résolution finale des images, la taille du champ de vue ainsi que la distance de travail. Comme on le verra dans la section relative au montage mis en œuvre, les cellules ne sont pas collées à la lamelle de microscope dans nos expériences. Cela implique d'avoir une distance de travail plus grande (au moins 200µm) que celle possible avec les objectifs 100X ou 63X à immersion dans l'huile. On prend donc l'objectif offrant la meilleure résolution possible tout en satisfaisant la distance de travail désirée : le 63X à immersion dans l'eau, qui a une distance de travail de 220µm.

La taille du champ est également importante car elle conditionne le nombre de cellules visibles sur une image et donc la puissance statistique des mesures réalisées ensuite. Il est toujours possible d'assembler des champs connexes mais la qualité s'en trouve toujours détériorée aux jonctions entre ces champs. Cela rend aussi la prise d'image plus longue. Avec cet objectif et la caméra utilisée, la taille du champ est de 230µm ce qui est très satisfaisant car cela donne environ 400 cellules par champ.

Le niveau d'échantillonnage dans la direction de l'axe optique (que l'on appellera

souvent *axe z* dans la suite) est choisi en accord avec le pouvoir de résolution maximal que l'on peut avoir avec l'objectif 63X à eau : environ 250nm pour le DAPI. Ce choix de 250nm d'échantillonnage en *z* correspond également bien au niveau de détail dont on aura besoin pour mesurer correctement la forme des cellules par la suite.

2.2 Cellules épithéliales cultivées sur un substrat à profil sinusoïdal

Dans cette section on va détailler les conditions expérimentales spécifiques à l'expérience des MDCK cultivées sur substrat à profil sinusoïdal.

2.2.1 Fabrication des substrats à profil sinusoïdal

L'objectif est de pouvoir cultiver les cellules sur des substrats dont le profil de hauteur est sinusoïdal dans une direction, c'est-à-dire en forme de tôle ondulée.

Fabrication des moules

Pour fabriquer les substrats à profil sinusoïdal, on doit d'abord fabriquer les moules sur lesquels couler le PDMS. La création d'un profil de hauteur sinusoïdal n'est pas possible directement avec des techniques de photolithographie classique. Pour y parvenir on exploite une instabilité mécanique créant des motifs sinusoïdaux dans certaines conditions [71] [72]. On utilise le dispositif de Christophe Poulard au Laboratoire de Physique des Solides de l'Université Paris Sud. Les étapes de la fabrication des moules à profil sinusoïdale est résumée sur le schéma 2.9. Le principe est d'étirer un échantillon de PDMS puis de l'exposer aux UV et enfin de relâcher la déformation. L'exposition aux UV ayant oxydé en surface le PDMS, cela crée une couche de plus grande rigidité. Lorsque la déformation est relâchée, des rides se forment pour accommoder de la disparité de module d'Young entre la couche oxydée et le reste de l'échantillon. Les paramètres que l'on peut choisir pour obtenir les profils sinusoïdaux sont le taux de déformation de l'échantillon et la durée d'exposition aux UV. La longueur d'onde λ et l'amplitude A du profil sinusoïdal résultant sont données par [72]

$$\lambda \propto h \sqrt[3]{\frac{E_s}{E_c}}$$

$$A \propto \lambda \sqrt{\epsilon}$$

Avec h l'épaisseur de la couche oxydée (qui est une fonction croissante de la durée d'exposition aux UV), E_s le module d'Young de la couche oxydée, E_c le module d'Young du

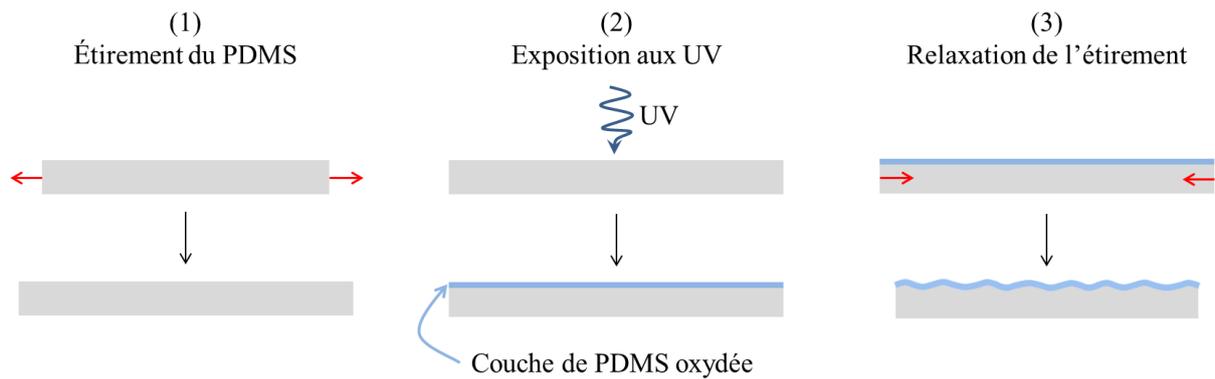


FIGURE 2.9 – Fabrication des moules de PDMS à profil sinusoïdal. La première étape consiste à étirer un échantillon, les flèches rouges représentant un déplacement sur ce schéma. En (2) on expose l'échantillon aux UV ce qui forme une fine couche de PDMS oxydée qui est plus rigide que le reste de l'échantillon. En (3) on relâche l'étirement imposé en (1) et cela forme une surface à profil sinusoïdal due à une instabilité mécanique.

PDMS et ϵ le taux de déformation appliqué à l'échantillon. On notera qu'il est toutefois assez difficile de se placer dans les conditions de déformation et de durée d'exposition aux UV qui créent un profil sinusoïdal pour le substrat. Pour des durées d'exposition de 15 minutes, il n'y a pas d'instabilité en dessous de 15% de déformation et l'instabilité crée des motifs non sinusoïdaux dès 30% de déformation. On obtient finalement les moules avec des caractéristiques satisfaisantes suivantes :

ϵ	UV	$A(\mu\text{m})$	$\lambda(\mu\text{m})$
20%	20min	6.7	54
25%	10min	5.6	40
30%	20min	10	49
20%	30min	11	110
20%	20min	16	96

Fabrication des substrats

La première étape de création des substrats à profil sinusoïdal est de silaniser les moules obtenus précédemment. L'opération de silanisation consiste à déposer une fine couche d'un silane (du tridecafluoro-1,1,2, 2,-tetrahydrooctyl-1-trichlorosilane) sur toute la surface du moule. Pour cela on dépose les moules et quelques gouttes de silane dans une cloche à vide pendant 45 minutes. Cette étape de silanisation est nécessaire pour pouvoir décoller plus tard le PDMS que l'on déposera sur les moules. On coule ensuite le PDMS³ sur le moule silanisé que l'on met au *spin coater* pendant 90 secondes à 450rpm. Cette vitesse

3. Sylgard 184 + 10% réticulant

de rotation est choisie pour obtenir des substrats de $200\mu\text{m}$ d'épaisseur environ. Cette épaisseur doit être bien contrôlée comme on le verra dans la section relative au montage mis en œuvre. Cependant, le spin coater ne donne pas des épaisseurs de PDMS bien contrôlées et homogènes à cette vitesse de rotation (il est mieux adapté et calibré à partir de 2000rpm), et notamment sur les moules à profil sinusoïdal qui rendent l'étalement moins homogène. On utilisera donc des vitesses de rotation légèrement supérieures (jusqu'à 470rpm) pour les substrats dont l'amplitude du profil sinusoïdal est grande. Le tout est ensuite placé à l'étuve (60°C) pendant la nuit puis le substrat fin en PDMS est décollé.

Pour les substrats plats, on suit le même principe à la différence près que l'on coule le PDMS sur un disque en époxy plan plutôt que sur les moules à profil sinusoïdal. L'épaisseur est alors mieux contrôlée, notamment au centre du disque, mais il reste difficile d'obtenir des substrats bien horizontaux à cette vitesse de rotation.

2.2.2 Montage mis en œuvre

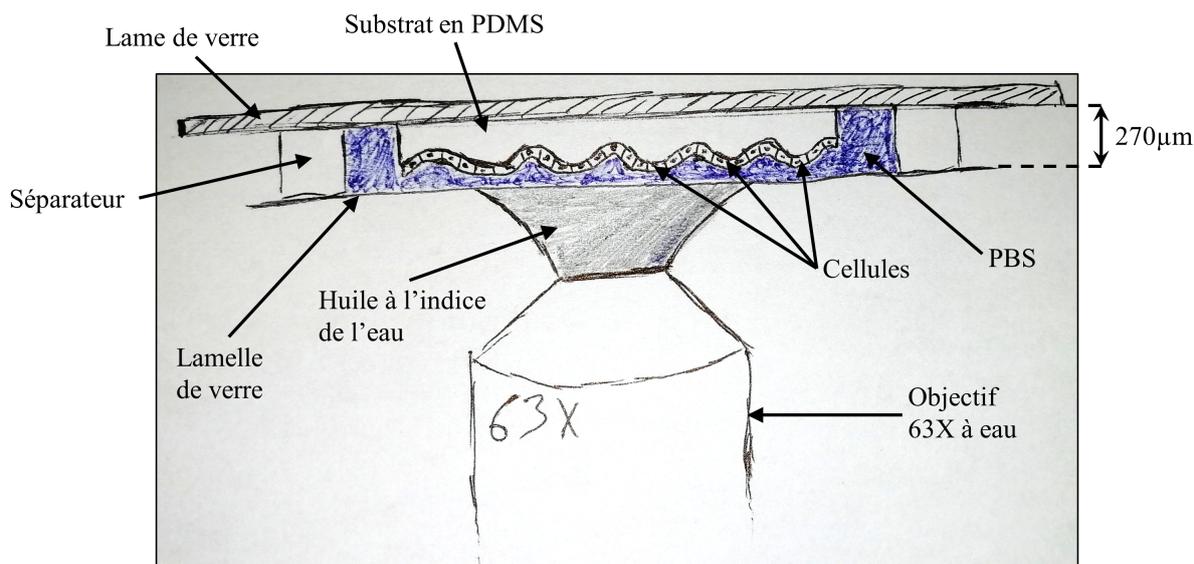


FIGURE 2.10 – Schéma du montage mis en œuvre au microscope. Les cellules ont leur face apicale vers l'objectif.

Les échantillons utilisés pour le montage présenté en figure 2.10 sont obtenus en déposant le substrat (sur lequel les cellules fixées et marquées sont attachées) sur une lame de microscope. On dépose ensuite un espaceur carré de $270\mu\text{m}$ d'épaisseur autour du substrat puis on dépose $65\mu\text{L}$ de PBS sur le substrat. On scelle l'ensemble à l'aide d'une lamelle de verre carrée ($22\times 22\text{mm}$) de type #1.5H. Les objectifs sont optimisés pour fonctionner avec une lamelle de $170\mu\text{m}$ d'épaisseur et cette référence garantit une épaisseur très précise autour de $170\mu\text{m}$.

Sur le schéma 2.10 du montage, on voit pourquoi le substrat doit avoir une épaisseur bien contrôlée : s'il est trop fin, les cellules sont à une distance plus grande que la distance de travail de l'objectif et elles ne peuvent pas être observées. A l'inverse, si le substrat est trop épais, les cellules positionnées sur les crêtes sont écrasées par la lamelle de verre ce qui rend l'expérience inexploitable.

2.3 Analyse d'image

D'une manière générale, on a utilisé MATLAB (version 2018b) et ImageJ pour faire l'analyse d'image. On a aussi utilisé MIJ⁴ [73], un outil permettant d'appeler des instructions d'ImageJ dans MATLAB. Cet outil est très utile pour produire rapidement les instructions d'analyse d'image désirées mais rend l'exécution particulièrement lente, c'est pourquoi on traduit la plupart de ces instructions en MATLAB lorsqu'elles sont bien robustes. Dans la suite de cette section concernant l'analyse d'image, on va expliquer les différentes étapes qui permettent d'obtenir les mesures désirées mais on ne rentrera pas dans le détail du code. Ces codes étant trop longs pour être inclus en annexe dans ce manuscrit, ils seront disponibles sur la page web professionnelle de Sylvie Hénon⁵.

2.3.1 Analyse d'image sur substrat à profil sinusoïdal

La géométrie du substrat sinusoïdal rend l'analyse d'image en 3D difficile. On s'est donc limité à mesurer de façon semi-automatisée la hauteur des cellules sur les crêtes et dans les creux du substrat.

La première étape se fait à la main : elle consiste à déterminer la position des crêtes et des creux sur l'image. L'utilisateur trace simplement un trait sur ImageJ (lancé dans MATLAB) le long de chaque creux et le long de chaque crête. Le programme crée alors les vues en coupe de chaque creux et de chaque crête.

La seconde étape a pour but de détecter la position des cellules sur ces vues en coupe. Pour cela on utilise l'image obtenue via le canal de fluorescence du DAPI. La plupart du temps un simple seuillage par la méthode d'Otsu suffit, comme on le voit sur la figure 2.11, ce qui rend cette étape automatique. La position des cellules est alors obtenue grâce à la fonction *Analyze Particles* d'ImageJ, qui nécessite d'avoir obtenu un seuillage de bonne qualité des noyaux, c'est-à-dire sans qu'il y ait de noyaux coupés en deux ni de noyaux existant mais non détectés. Pour certains échantillons plus bruités on a préféré sélectionner les noyaux à la main en les pointant simplement à la souris (environ 5% des échantillons).

4. On trouvera les instructions sur le site <http://bigwww.epfl.ch/sage/soft/mij/>

5. <http://www.msc.univ-paris-diderot.fr/~henon/>

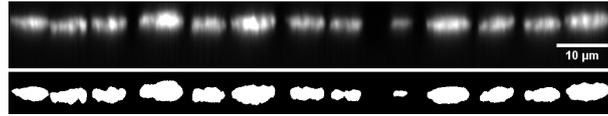


FIGURE 2.11 – Image typique du DAPI en coupe (en haut). Seuillage par la méthode d'Otsu (en bas). Le seuillage est validé car il a bien séparé tous les noyaux et n'a coupé aucun noyau en plusieurs morceaux.

La troisième étape se fait automatiquement et consiste à faire la mesure de la hauteur des cellules. Pour cela on sélectionne les canaux de fluorescence qui correspondent aux surfaces apicale et basale : fibronectine, gp135 et actine. Après renormalisation de leur intensité, on somme ces canaux pour obtenir une image qui affiche clairement les faces apicales et basales des cellules. On en donne un exemple typique en figure 2.12a. À chaque position de cellule (identifiée grâce au DAPI), le programme trace le profil d'intensité le long de l'axe apico-basal et moyenné sur une largeur de $2\mu\text{m}$. Sur ce profil, le programme identifie les deux maxima locaux les plus susceptibles de correspondre respectivement à la position apicale et basale de la cellule, comme on le voit sur la figure 2.12b. Les critères pour identifier ces maxima sont principalement liés à l'épaisseur minimale de la cellule, fixée à $1\mu\text{m}$ ici, et à la position du substrat comparée à celle de la cellule voisine : elles ne peuvent pas être trop différentes. Cette étape de mesure automatique se fait cependant en affichant en permanence le résultat pour l'utilisateur de façon à ce qu'il puisse vérifier la qualité des mesures rapidement. Chacune des mesures est ainsi vérifiée et certaines sont réajustées ou écartées si la position du substrat et/ou de la face apicale n'a pas été correctement mesurée. Lorsqu'une mesure est possible à la main alors on la fait mais parfois le signal est de trop mauvaise qualité et on abandonne la mesure. Environ 5% des mesures sont réajustées à la main et 1% sont abandonnées.

La dernière étape est faite à la main et consiste à mesurer la géométrie du substrat. Avec une vue en coupe orthogonale à la direction des sillons du substrat, on trace simplement une ligne qui relie deux crêtes et une ligne qui relie deux creux, comme le voit sur la figure 2.13. La longueur d'onde du profil sinusoïdal est simplement donnée par la longueur des lignes tracées et l'amplitude de ce profil est égale à la différence de position des lignes le long de l'axe z . Cependant, le profil des substrats n'est parfois pas tout à fait sinusoïdal : les creux peuvent être un peu plus larges que les crêtes et inversement. Pour prendre en compte cette asymétrie, on trace également une ligne qui relie deux points d'inflexion successifs, c'est la ligne *inflexion* de la figure 2.12a. On mesure une longueur d'onde apparente des creux comme étant égale au double de la distance entre deux points d'inflexion successifs encadrant un creux. L'amplitude apparente des creux est égale au double de la distance, selon l'axe z , entre la position des creux et celle des points d'inflexion. On fait de même pour les crêtes et ainsi, on mesure une longueur d'onde et une amplitude

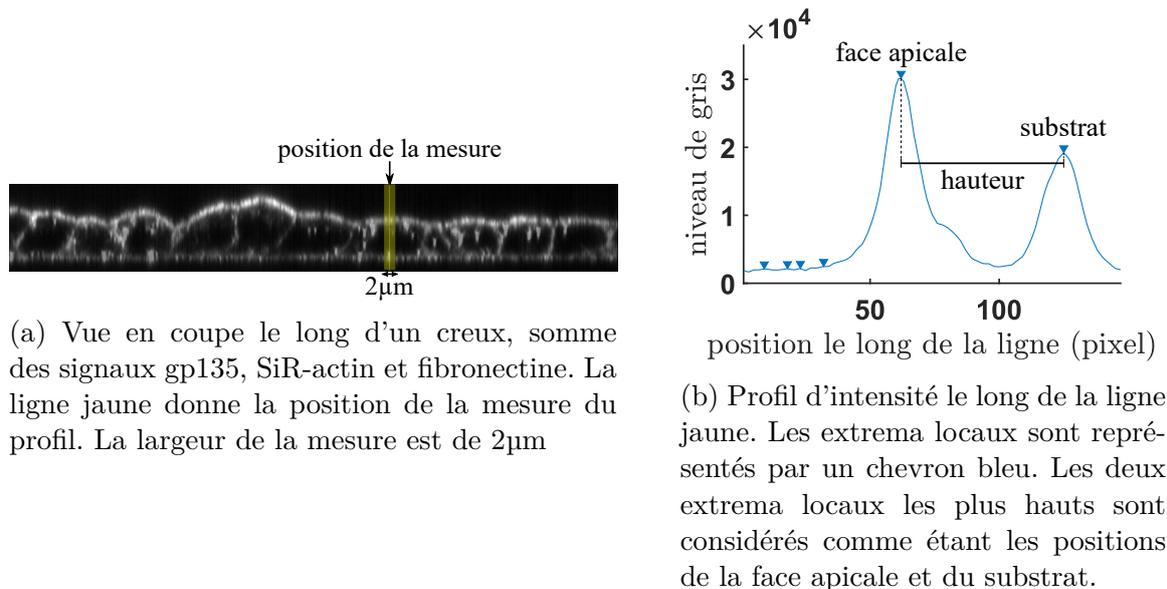


FIGURE 2.12 – Mesure de la hauteur des cellules sur le substrat à profil sinusoïdal.

apparente pour les creux, et une autre longueur d'onde et amplitude apparente pour les crêtes. Cela nous permet ensuite de calculer assez précisément les courbures respectives des creux et des crêtes.

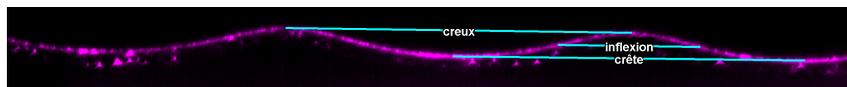


FIGURE 2.13 – Vue en coupe dans la direction orthogonale aux sillons du substrat du signal de la fibronectine. On mesure les caractéristiques géométriques en pointant les sommets des crêtes, les fonds des creux et les points d'inflexion.

Sur substrat à profil sinusoïdal on va aussi avoir besoin de mesurer la surface des cellules. Cette mesure est beaucoup moins facile à automatiser que sur substrat plat et, par conséquent, on se contente de mesures à la main. Plus précisément il s'agit de prendre l'image obtenue dans les canaux de fluorescence qui donnent bien les jonctions intercellulaires : la F-actine et, pour les MDCK EcadGFP, les E-cadhérines. On utilise ensuite l'outil *Wand* d'ImageJ qui dessine le contour de l'ensemble des pixels contigu à un pixel sélectionné ayant une valeur proche en niveau de gris, comme on le voit sur la figure 2.14.

La tolérance d'écart au niveau de gris du pixel sélectionné est un paramètre choisi par l'utilisateur. Plus cette tolérance est grande, plus la zone sélectionnée sera grande. Si la tolérance est fixée à 0, seuls les pixels ayant exactement le même niveau de gris que le pixel sélectionné seront dans la zone délimitée par l'outil *Wand*. Par exemple, pour la figure 2.14, la tolérance était fixée à 61 unités de niveau de gris. En délimitant les cellules

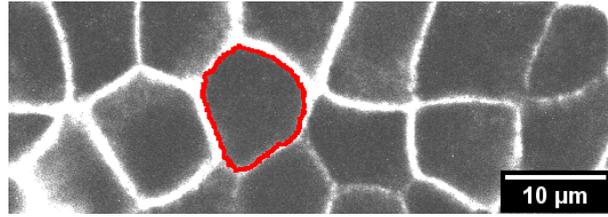


FIGURE 2.14 – Exemple de mesure de surface à la main. Le signal en niveau de gris correspond aux E-cadhérine. Le contour sélectionné à l'aide de l'outil *Wand* d'ImageJ est en rouge.

à la main, on peut obtenir une mesure satisfaisante de leurs surfaces, mais cette technique ne permet pas d'obtenir de grands échantillons statistiques.

2.3.2 Analyse d'image sur substrat plat

Sur substrat plat, l'analyse d'image est plus aisée que sur substrat à profil sinusoïdal ce qui va nous permettre d'automatiser plus de mesures. On souhaite extraire les données suivantes :

- hauteur, surface, périmètre et volume des cellules
- angles des jonctions tricellulaires (et leurs variantes impliquant quatre ou cinq cellules)
- angles de raccord entre les faces apicales et intercellulaires
- courbure des faces apicales

Mesure des caractéristiques géométriques des cellules

La première étape consiste à segmenter le contour des cellules. Plus précisément, on cherche à obtenir une image binaire du contour des cellules sous forme de squelette, c'est-à-dire avec des contours cellulaires ayant une largeur d'un pixel. Cette étape se fait de façon semi-automatique en utilisant les outils d'ImageJ principalement. Tout d'abord il faut utiliser toutes les images qui donnent l'information du contour des cellules. Ainsi, pour les MDCK EcadGFP, on somme le marquage de la F-actine et le marquage de la E-Cadhérine tandis que pour les MDCK WT on n'utilise que le signal de la F-actine. Pour obtenir le meilleur rapport signal/bruit, on somme également les images provenant des plans entre la mi-hauteur des cellules et la face apicale. Un exemple d'une image ainsi obtenue est donnée en figure 2.15(a). On privilégie la partie la plus proche de la face apicale des cellules, car elle donne des contours mieux définis que la partie basale et également car c'est une zone d'intérêt, comme on le verra dans le chapitre concernant l'inférence de force.

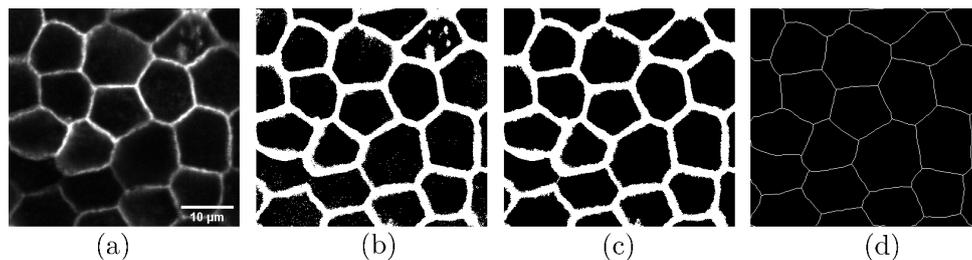


FIGURE 2.15 – Les étapes principales de la segmentation du contour des cellules. En (a), signal de E-cadhérine moyenné sur une épaisseur de $1.5\mu\text{m}$ (6 plans). En (b) image binaire obtenue après seuillage local. En (c) corrections de l'image binaire : remplissage des trous, suppression des points parasites et ajout d'une jonction cellule-cellule à la main. En (d) squelette du contour des cellules.

Une fois que l'on a sommé toutes ces images, on utilise un seuillage pour segmenter les cellules. La méthode que l'on a trouvée la plus efficace ici est d'utiliser un seuillage local, implémenté dans ImageJ, : *Auto Local Threshold*⁶. Un exemple de résultat d'une telle méthode est donné en figure 2.15(b). Cette méthode est locale car elle calcule le seuil pour chaque pixel en fonction des valeurs des pixels dans une zone de rayon R définie par l'utilisateur. L'avantage d'une telle méthode est qu'elle permet de s'affranchir des variations d'intensité sur des grandes distances caractéristiques (typiquement la taille du champ). On choisit un rayon R de l'ordre de la taille d'une cellule de façon à ce que chaque pixel ait un pixel de contour de cellule dans sa zone. Le critère de seuillage retenu est la plupart du temps *Otsu* mais parfois *Mean* donne de meilleurs résultats.

Une fois que le seuillage le plus satisfaisant possible est obtenu, il faut corriger les quelques erreurs restantes à la main. Certaines cellules sont coupées en deux par un segment qui n'existe pas en réalité, il faut donc les effacer. Il y a aussi quelques jonctions (<1%) qui n'apparaissent pas dans l'image seuillée, il faut donc les tracer à la main. Enfin, il y a des groupes de pixels isolés qui apparaissent dans les cellules et qu'il faut effacer aussi. Pour cela on utilise l'outil *Analyze Particles* qui permet de détecter et d'effacer les groupes de pixels contigus avec un critère de taille. Ainsi, on supprime ces pixels résiduels sans supprimer les pixels de contours, qui eux forment un ensemble contigu très étendu. De même, on remplit les trous dans le signal avec la fonction *Analyze Particles* mais en inversant l'image. Ces corrections sont illustrées en figure 2.15(c).

Une fois ces corrections faites, il faut transformer l'image segmentée en squelette via la fonction *Skeletonize* d'ImageJ. Suite à cette opération il y a souvent quelques autres corrections à faire à la main et notamment en enlevant des segments parasites (souvent de 1-2 pixels de long) qui ont germé des segments réellement intercellulaires. Pour éviter la plupart de ces segments parasites, on peut aussi utiliser un filtre de flou gaussien

6. On trouvera les détails de cette méthode ici : imagej.net/Auto_Local_Threshold

($\sigma = 2\ \mu\text{m}$) puis faire un seuillage simple (Otsu) et enfin utiliser la fonction *Skeletonize*. C'est ce qui a été fait pour obtenir l'image de la figure 2.15(d). L'image finale est donc une image binaire des jonctions intercellulaires dont la largeur est un pixel.

On a aussi utilisé une alternative à ces étapes manuelles : le plugin *Tissu Analyzer* d'ImageJ [74]. La différence principale est que l'utilisateur obtient directement une image du squelette des jonctions intercellulaires. Les étapes de corrections à la main, comme la suppression d'un segment qui n'existe pas réellement, sont également facilitées, notamment par la superposition du résultat de la segmentation et de l'image réelle.

Modélisations cellulaire et continue

All models are wrong, but some are useful.

George Box

Le but de la modélisation est de prédire la forme des cellules sur un substrat à profil sinusoïdal et, plus précisément, de prédire quelle est la hauteur des cellules dans les creux du substrat comparée à celle des cellules sur les crêtes.

3.1 Géométrie du problème et hypothèses de calcul

La géométrie dans laquelle on place les cellules est contrainte par la forme des substrats dont on a expliqué la fabrication au chapitre précédent, on en voit un schéma en figure 3.1. Ainsi, dans une direction, y , le substrat est invariant tandis qu'il a un profil sinusoïdal

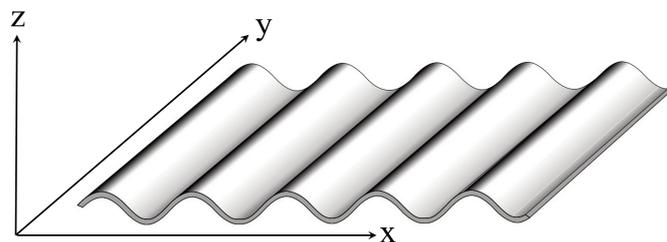


FIGURE 3.1 – Schéma du substrat utilisé, en forme de tôle ondulée. Les axes x , y et z seront utilisés ainsi tout au long de ce chapitre.

dans la direction x . La direction z correspond à la direction orthogonale au plan moyen du substrat.

Il y a plusieurs quantités géométriques dont on aura besoin dans ce calcul : les surfaces des différentes interfaces de la cellule, le périmètre de la face apicale, le volume et la hauteur de la cellule. Dans cette section, on va calculer la dépendance de ces quantités entre elles pour réduire le nombre de variables géométriques.

Notations

Les notations générales adoptées sont :

- H la hauteur des cellules
- V le volume d'une cellule
- $S_{1/2}$ la surface à mi-hauteur des cellules
- $P_{1/2}$ la périmètre à mi-hauteur des cellules
- $\alpha = \frac{P_{1/2}}{\sqrt{S_{1/2}}}$: un facteur de forme de la surface à mi-hauteur
- $R_{1/2} = \frac{P_{1/2}}{2\pi} = \frac{\alpha}{2\pi} \sqrt{S_{1/2}}$: une taille caractéristique dans le plan de l'épithélium
- S_{cc} la surface de l'interface cellule-cellule
- S_b la surface basale d'une cellule
- S_a la surface apicale d'une cellule
- γ_{cc} l'énergie par unité de surface associée à l'interface cellule - cellule
- γ_b l'énergie par unité de surface associée à la face basale
- γ_a l'énergie par unité de surface associée à la face apicale
- A l'amplitude crête à crête du profil sinusoïdal du substrat
- λ la longueur d'onde du profil sinusoïdal du substrat

Les notations propres à chaque sous-partie du calcul seront explicitées dans lesdites sous-parties.

Hypothèses générales

Ici on va expliciter les hypothèses générales que l'on fait pour les calculs géométriques. Les hypothèses concernant explicitement l'obtention de la forme via la minimisation de l'énergie des cellules seront décrites dans les parties suivantes.

Le schéma sur lequel on se base est présenté en Fig. 3.2.

On suppose que les jonctions intercellulaires ne sont pas courbées dans le plan orthogonal à la direction des sillons du substrat à profil sinusoïdal. En réalité, la courbure des jonctions intercellulaires est faible dans ce plan, donc la quantité de surface négligée par

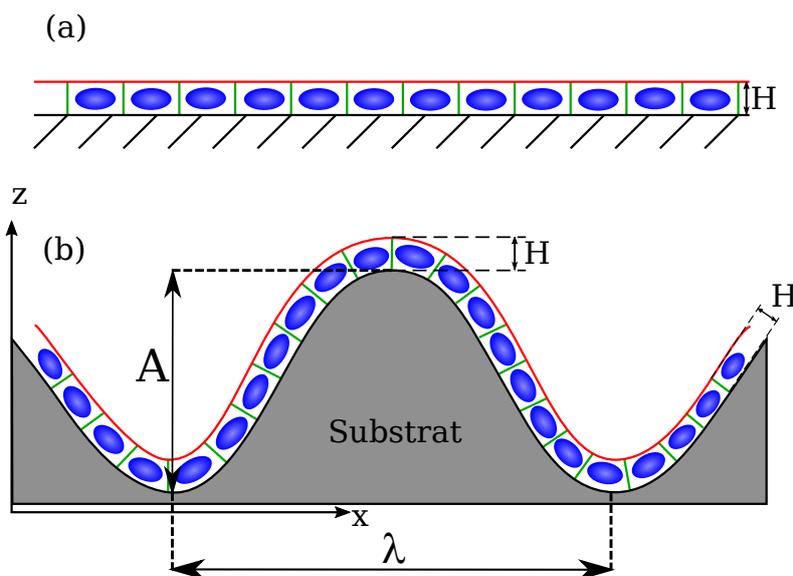


FIGURE 3.2 – Schéma de l'épithélium sur substrat plat (a) et sur substrat à profil sinusoïdal (b).

cette approximation est aussi faible. On considère également que la direction des jonctions intercellulaires est orthogonale au plan du substrat.

On suppose également que la surface apicale n'est pas courbée. En réalité la face apicale est courbée vers l'extérieur de la cellule mais cette courbure est suffisamment faible pour que les quantités de surface et de volume perdues par cette approximation soient négligeables.

On ne fait pas d'hypothèse particulière sur le nombre de côtés des surfaces apicale et basale de la cellule mais on suppose que leur forme, dans le plan médian de l'épithélium, est isotrope. Cela revient à moyenner sur l'ensemble des orientations possibles de la cellule par rapport à la direction des sillons du substrat à profil sinusoïdal. Dans toute la modélisation, les propriétés géométriques pourront être adaptées à toute autre forme, polygonale ou non, via le coefficient α .

3.1.1 Substrat plat

Lorsque les cellules sont sur un substrat plat, leur forme est invariante selon l'axe orthogonal au substrat puisque les jonctions intercellulaires sont orthogonales au substrat. Les surfaces apicales et basales sont donc égales et on a

$$S_a = S_b = S_{1/2}$$

De même,

$$S_{cc} = \alpha \sqrt{S_{1/2} H}$$

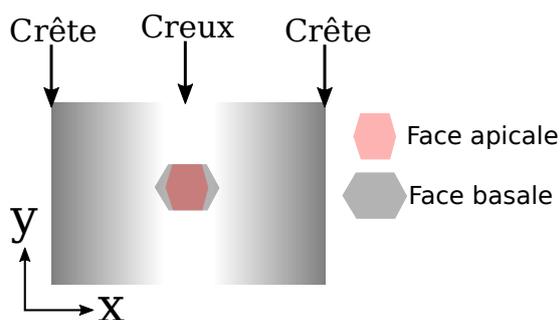
3.1.2 Substrat courbé

Le profil du substrat est donné par la relation

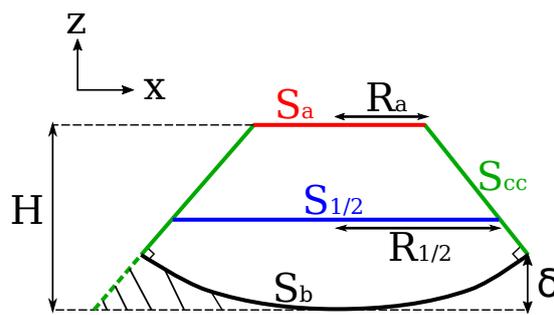
$$z(x) = \frac{A}{2} \sin\left(\frac{2\pi}{\lambda} x\right) \quad (3.1)$$

La hauteur et la surface des cellules vont maintenant dépendre de leur position dans la sinusoïde. On les notera respectivement $H(x)$ et $S_{1/2}(x)$.

Si on considère une vue de dessus, la forme d'une cellule dans un creux est représentée sur le schéma 3.3a.



(a) Vue de dessus, c'est à dire dans le plan orthogonal à l'axe z



(b) Vue en coupe selon la direction orthogonale à l'axe y .

FIGURE 3.3 – Schéma du modèle pour une cellule dans un creux.

On a considéré que les jonctions intercellulaires étaient orthogonales au plan du substrat ce qui donne la taille caractéristique de la face apicale modifiée par la courbure et dans la direction orthogonale aux sillons :

$$2R_a = 2R_{1/2}(x) + \frac{1}{2}H(x) \left[\frac{dz}{dx}(x - R_{1/2}(x)) - \frac{dz}{dx}(x + R_{1/2}(x)) \right]$$

En effet, $2R_{1/2}(x)$ est la longueur caractéristique de la cellule dans le plan médian de l'épithélium comme on le voit sur la figure 3.3b.

En considérant $R_{1/2}(x) \ll 6\frac{\lambda}{2\pi}$ on a

$$R_a = R_{1/2}(x) \left(1 - \frac{1}{2}H(x)z''(x) \right)$$

d'où la surface de la face apicale

$$S_a = S_{1/2}(x) \left(1 - \frac{1}{2} H(x) z''(x) \right)$$

Cette expression de la surface apicale S_a donne bien une dépendance explicite en la courbure du substrat. Sur les crêtes, où z'' est négatif, la surface apicale sera plus grande que la surface à mi-hauteur. À l'inverse, dans les creux, la surface apicale sera plus petite que la surface à mi-hauteur, comme on le voit sur la figure 3.3a.

La surface basale S_b est courbée puisqu'elle suit le substrat. On note $\delta(\theta)$ la différence de hauteur, dans le plan orthogonal à la direction des sillons, entre le substrat au centre de la cellule et à son bord, comme montré sur la Fig. 3.3b. Elle n'est pas la même dans toutes les directions puisqu'elle est nulle dans la direction des sillons et qu'elle est maximale dans la direction orthogonale. On note θ la direction, avec $\theta = 0$ dans la direction orthogonale aux sillons, c'est à dire la direction x , et $\theta = \frac{\pi}{2}$ dans la direction y .

En approchant la courbe du substrat par une parabole on obtient

$$S_b = \int_{-\frac{\pi}{2}}^{\frac{\pi}{2}} \left\{ R_{1/2}^2 \left[1 + \cos^2 \theta \left(\frac{H(x)}{2} - \delta(\theta) \right) \left(2 + \left(\frac{H(x)}{2} - \delta(\theta) \right) z''(x) \right) \frac{d^2 z}{dx^2}(x) \right] + \delta^2(\theta) \right\} d\theta$$

Or on a $\delta(\theta) = z(x + R_{1/2}(x) \cos \theta) - z(x) - R_{1/2}(x) \cos \theta \frac{dz}{dx}$ car on se place, pour chaque cellule, dans un repère où la pente est nulle. En supposant $R_{1/2} \ll 3 \frac{\lambda}{2\pi}$ on a $\delta(\theta) = \frac{1}{2} (R_{1/2}(x) \cos \theta)^2 \frac{d^2 z}{dx^2}$, ce qui donne

$$S_b = S_{1/2} \left[1 + \frac{1}{2} H z'' + \left(\frac{1}{8} H^2 - \frac{21}{64} R_{1/2}^2 \right) (z'')^2 - \frac{3}{16} H R_{1/2}^2 (z'')^3 + \frac{5}{64} R_{1/2}^4 (z'')^4 \right]$$

Avec $R_{1/2}(x) \ll \frac{\lambda^2}{4A}$ on a

$$S_b = S_{1/2}(x) \left(1 + \frac{1}{2} H(x) z''(x) \right)$$

Ce résultat pour la surface basale S_b est remarquable car il est le symétrique de celui obtenu pour la surface apicale S_a alors que ces deux surfaces ont des géométries très différentes : courbée pour S_b et plane pour S_a . La courbure de la face basale n'a donc pas d'influence sur son expression, au premier ordre en Rz'' .

Pour calculer S_{cc} on doit expliciter le périmètre de la cellule le long de l'axe apico-basal. A mi-hauteur on a toujours l'expression exacte $P_{1/2} = 2\pi R_{1/2}$. Aux autres positions, l'expression est différente car la surface de la cellule est déformée de façon anisotrope. Par analogie avec l'approximation du périmètre d'une ellipse par $\pi(a+b)$ avec a et b les demi grand axe et demi petit axe de l'ellipse, on approxime le périmètre de la face apicale, par exemple, par $P_a \approx \pi(R_{1/2} + R_a)$. Il faut également tenir compte de la direction θ ,

comme pour le calcul de S_b , pour ne pas comptabiliser la partie pointillée de la surface intercellulaire représentée sur la figure 3.3b. La surface de contact intercellulaire est donc donnée par

$$S_{cc} = \int_{-\frac{\pi}{2}}^{\frac{\pi}{2}} d\theta \int_{-\frac{H}{2} + \delta(\theta)}^{\frac{H}{2}} [R_{1/2}(x) + R_{1/2}(x) (1 - z z''(x))] dz$$

D'où

$$S_{cc} = \int_{-\frac{\pi}{2}}^{\frac{\pi}{2}} 2R_{1/2}(x) (H - \delta(\theta)) \left(1 - \frac{1}{2} \delta(\theta) z''(x)\right) d\theta$$

Ce qui donne

$$S_{cc} = \alpha \sqrt{S_{1/2}(x)} H(x) \left(1 - \frac{1}{4} \frac{R_{1/2}^2(x)}{H(x)} z''(x) - \frac{1}{16} R_{1/2}^2(x) (z''(x))^2 + \frac{3}{64} \frac{R_{1/2}^4(x)}{H(x)} (z''(x))^3\right)$$

En supposant toujours $R_{1/2}(x) \ll \frac{\lambda^2}{4A}$ on obtient

$$S_{cc} = \alpha \sqrt{S_{1/2}(x)} H(x) \left(1 - \frac{1}{4} \frac{R_{1/2}^2(x)}{H(x)} z''(x)\right)$$

Cette expression nous montre que la courbure du substrat a une influence sur S_{cc} . Plus précisément, c'est l'effet de la courbure sur la position du substrat selon z qui modifie la quantité de surface intercellulaire.

L'expression du volume de la cellule a également changé par rapport au cas du substrat plat. En effet, l'expression $V = HS_{1/2}(x)$ surestime le volume des cellules dans les creux car elle comptabilise aussi du volume de substrat. De même, cette expression sous-estime le volume sur les crêtes car on ne prend pas en compte les parties qui sont en-dessous de $z = 0$ c'est-à-dire la position du substrat au centre de la cellule. On écrit donc $V = HS_{1/2}(x) - \Delta V$ avec ΔV le volume hachuré sur la Fig. 3.3b. On a

$$\Delta V = \int_{-\frac{\pi}{2}}^{\frac{\pi}{2}} d\theta \int_0^{R_{1/2}(1 + (\frac{H(x)}{2} - \delta(\theta)) z''(x))} \frac{1}{2} (r \cos(\theta))^2 z''(x) r dr$$

Ce qui donne

$$\Delta V = \frac{\pi}{16} R_{1/2}^4 \left(1 + \left(\frac{H(x)}{2} - \delta(\theta)\right) z''(x)\right)^4 z''(x)$$

Ou, en considérant $R_{1/2}(x) \ll \frac{\lambda^2}{4A}$

$$\Delta V = \frac{\pi}{16} R_{1/2}^4 z''(x)$$

Ce qui donne finalement l'expression du volume :

$$V = HS_{1/2}(x) - \frac{\pi}{16} R_{1/2}^4 z''(x)$$

Maintenant que l'on a l'expression des quantités géométriques d'intérêt, on va pouvoir calculer l'énergie de la cellule selon le modèle choisi.

3.2 Modèles pour l'énergie de la cellule

Dans cette section, on calcule l'énergie de la cellule dans la géométrie du substrat sinusoïdal. On explore différents termes pour cette énergie que l'on détaille dans les sous-sections successives. On notera que toutes les minimisations d'énergie se feront à volume constant ce qui équivaut à ajouter un terme de compressibilité en volume $E_v = B(V - V_0)^2$ avec un module B très grand. On discutera quantitativement de cette approximation dans la section consacrée aux résultats expérimentaux.

Pour obtenir la forme, c'est-à-dire la hauteur et la surface à mi-hauteur, à l'équilibre, on minimise simplement l'énergie de surface de la cellule en maintenant le paramètre V constant.

3.2.1 Énergies de surface

Ici on considère uniquement des énergies de surfaces pour exprimer l'énergie de la cellule. L'énergie de surface de la face apicale γ_a est générée par la tension du gel d'actomyosine de la face apicale. L'énergie de surface de la face basale γ_b est la résultante de la compétition entre la tension du gel d'actomyosine de la face basale et l'énergie d'adhérence de la cellule avec le substrat. L'énergie de surface de l'interface cellule-cellule γ_{cc} est la résultante de la compétition entre la tension du gel d'actomyosine de l'interface cellule-cellule et l'énergie d'adhérence intercellulaire.

L'énergie de surface de la cellule est donnée par

$$E_c = \gamma_a S_a + \gamma_b S_b + \frac{\gamma_{cc}}{2} S_{cc} \quad (3.2)$$

On considère que les énergies de surfaces γ_a, γ_b et γ_{cc} sont uniformes.

Substrat plat

En utilisant les relations établies dans la partie précédente on obtient

$$E_c = \gamma_a S_{1/2} + \gamma_b S_{1/2} + \frac{\gamma_{cc}}{2} \alpha \sqrt{S_{1/2}} H$$

On a $V = HS_{1/2}(x)$ ce qui permet d'écrire l'énergie de surface en fonction de $S_{1/2}$

seulement :

$$E_c = \gamma_a S_{1/2} + \gamma_b S_{1/2} + \frac{\gamma_{cc}}{2} \alpha \frac{V}{\sqrt{S_{1/2}}}$$

Le minimum d'énergie de surface est alors obtenu pour

$$S_{1/2} = \left(V \frac{\alpha}{4} \frac{\gamma_{cc}}{\gamma_a + \gamma_b} \right)^{2/3}$$

Pour simplifier les expressions on utilisera le paramètre adimensionné γ :

$$\gamma = \frac{\gamma_a + \gamma_b}{\gamma_{cc}}$$

On a alors

$$S_{1/2} = \left(V \frac{\alpha}{4\gamma} \right)^{2/3}$$

Ce qui s'écrit de façon équivalente pour la hauteur

$$H = (V)^{1/3} \left(\frac{4}{\alpha} \gamma \right)^{2/3}$$

Grâce aux expériences, on a accès à la hauteur des cellules sur substrat plat. On utilisera donc ce résultat pour déterminer la valeur du paramètre γ à l'aide de la formule

$$\gamma = \frac{\alpha}{4} \sqrt{\frac{H^3}{V}}$$

Substrat courbé

Dans le cas d'un substrat à profil sinusoïdal, l'énergie de surface de la cellule s'écrit

$$\begin{aligned} E_c = & \gamma_a S_{1/2}(x) \left(1 - \frac{1}{2} H(x) z''(x) \right) + \gamma_b S_{1/2}(x) \left(1 + \frac{1}{2} H(x) z''(x) \right) \\ & + \frac{\gamma_{cc}}{2} \alpha \sqrt{S_{1/2}(x)} \left(H(x) - \frac{1}{4} R_{1/2}^2(x) z''(x) \right) \end{aligned}$$

Par ailleurs, on a toujours $R_{1/2}(x) = \frac{\alpha}{2\pi} \sqrt{S_{1/2}(x)}$ d'où, au premier ordre en z'' ,

$$\begin{aligned} E_c = & \gamma_a S_{1/2}(x) \left(1 - \frac{1}{2} \frac{V}{S_{1/2}(x)} z''(x) \right) + \gamma_b S_{1/2}(x) \left(1 + \frac{1}{2} \frac{V}{S_{1/2}(x)} z''(x) \right) \\ & + \frac{\gamma_{cc}}{2} \alpha \sqrt{S_{1/2}(x)} \left(\frac{V}{S_{1/2}(x)} - \left(\frac{\alpha^2}{16\pi^2} - \frac{\alpha^4}{256\pi^3} \right) S_{1/2}(x) z''(x) \right) \end{aligned}$$

L'égalité $\frac{dE_c}{dS_{1/2}} = 0$ donne l'équation polynomiale en $S_{1/2}$ suivante

$$\left(\frac{3\alpha^2}{32\pi}z''(x)\right)^2 S_{1/2}^4(x) - \left(\frac{2}{\alpha}\frac{\gamma_a + \gamma_b}{\frac{\gamma_{cc}}{2}}\right)^2 S_{1/2}^3(x) + V\frac{3\alpha^2}{16\pi}z''S_{1/2}^2(x) + V^2 = 0$$

On n'utilisera pas les solutions analytiques de cette équation, elles sont difficilement exploitables car trop compliquées, et on préférera travailler directement avec l'expression de l'énergie de la cellule.

On retire les termes de l'énergie de la cellule ne dépendant pas de $S_{1/2}(x)$ et on la divise par $\alpha\frac{\gamma_{cc}}{2}$ pour en simplifier l'expression :

$$\frac{E_c}{\alpha\frac{\gamma_{cc}}{2}} = -\frac{\alpha^2}{16\pi^2}\left(1 - \frac{\alpha^2}{16\pi}\right)z''(x)S_{1/2}^{3/2}(x) + \frac{2}{\alpha}\frac{\gamma_a + \gamma_b}{\gamma_{cc}}S_{1/2}(x) + \frac{V}{\sqrt{S_{1/2}(x)}}$$

Le maximum (en valeur absolue) de la courbure est atteint sur les bosses et dans les creux de la sinusoïde. Ce facteur est nul à la pente maximale de la sinusoïde et correspond aussi au cas plat. On minimisera numériquement l'énergie de la cellule dans ces deux cas extrêmes afin de comparer la hauteur des cellules sur les crêtes et dans les creux, quantité à laquelle on a accès grâce aux expériences. Cette comparaison sera détaillée dans le chapitre concernant les résultats expérimentaux.

3.2.2 Tension de ligne

Dans cette section, on s'intéresse à la contribution d'un *anneau d'actine* près de la face apicale en ajoutant un terme de tension de ligne [53] à l'équation 3.2 :

$$E_c = \gamma_a S_a + \gamma_b S_b + \frac{\gamma_{cc}}{2} S_{cc} + \Lambda_a P_a \quad (3.3)$$

Où P_a est le périmètre de la face apicale et Λ_a le coût énergétique par unité de longueur du périmètre de la face apicale.

Substrat plat

Dans le cas du substrat plat, l'expression du périmètre de la face apicale s'écrit simplement $P_a = 2\pi R_{1/2}$ d'où l'énergie de la cellule :

$$E_c = \gamma_a S_{1/2} + \gamma_b S_{1/2} + \frac{\gamma_{cc}}{2}\alpha H\sqrt{S_{1/2}} + \Lambda_a\alpha\sqrt{S_{1/2}}$$

On introduit une tension de ligne réduite, homogène à une longueur, Λ :

$$\Lambda = \frac{\Lambda_a}{\gamma_{cc}}$$

Comme dans le cas précédent, avec uniquement des énergies de surface, on cherche à utiliser la mesure sur substrat plat pour obtenir la valeur d'un paramètre énergétique. Ici on a deux paramètres inconnus γ et Λ , donc la mesure de la hauteur des cellules sur substrat plat donnera une relation entre les deux plutôt qu'une valeur à calculer directement. L'égalité $\frac{dE_c}{dS_{1/2}} = 0$ combinée à $R_{1/2} = \frac{\alpha}{2\pi}\sqrt{S_{1/2}}$ donne la relation entre γ et Λ :

$$\gamma = \frac{\alpha}{4} \frac{1}{\sqrt{S_{1/2}}} (H - 2\Lambda)$$

Substrat courbé

De même que dans le cas précédent, avec uniquement des énergies de surface, on approxime le périmètre de la face apicale par $P_a \approx \pi (R_{1/2} + R_a)$ d'où :

$$P \approx 2\pi R_{1/2}(x) \left(1 - \frac{1}{4}H(x)z''(x)\right)$$

L'énergie de la cellule s'écrit alors :

$$\begin{aligned} E_c = & \gamma_a S_{1/2}(x) \left(1 - \frac{1}{2}H(x)z''(x)\right) + \gamma_b S_{1/2}(x) \left(1 + \frac{1}{2}H(x)z''(x)\right) \\ & + \frac{\gamma_{cc}}{2} \alpha \sqrt{S_{1/2}(x)} \left(H(x) - \frac{1}{4}R_{1/2}^2(x)z''(x)\right) + 2\pi\Lambda_a R_{1/2}(x) \left(1 - \frac{1}{4}H(x)z''(x)\right) \end{aligned}$$

De la même manière que précédemment, on écrit l'énergie de la cellule en fonction de $S_{1/2}$ et on enlève les termes indépendants de $S_{1/2}$:

$$\begin{aligned} \frac{E_c}{\alpha\gamma_{cc}} = & -\frac{\alpha^2}{32\pi^2} \left(1 - \frac{\alpha^2}{16\pi}\right) z''(x) S_{1/2}^{3/2}(x) + \frac{1}{\alpha} \frac{\gamma_a + \gamma_b}{\gamma_{cc}} S_{1/2}(x) \\ & + \frac{V}{2\sqrt{S_{1/2}(x)}} \left(1 - \frac{1}{2} \frac{\Lambda_a}{\gamma_{cc}} z''(x)\right) + \frac{\Lambda_a}{\gamma_{cc}} \sqrt{S_{1/2}(x)} \end{aligned}$$

La minimisation de cette énergie de surface se fera cette fois avec un paramètre ajustable puisque les caractéristiques géométriques des cellules en l'absence de courbure ne fixent que la relation entre le facteur γ et le facteur Λ .

3.2.3 Confinement

Jusqu'à présent on a traité l'intérieur de la cellule comme étant un matériau homogène et infiniment déformable. Cependant, il comporte beaucoup de composés qui ont une résistance à la déformation : protéines, organites, microtubules [75], noyau. Pour tenir

compte de cette résistance à la déformation de l'intérieur de la cellule, on ajoute un terme de confinement en assimilant l'intérieur de la cellule à un sac de polymères gaussiens. L'énergie de confinement s'écrit $E_{conf} = G \left(\frac{1}{H^2} + \frac{2}{R^2} \right)$ [53] avec G un coefficient dépendant des caractéristiques du polymère.

L'énergie de la cellule devient alors

$$E_c = \underbrace{\gamma_a S_a + \gamma_b S_b + \frac{\gamma_{cc}}{2} S_{cc}}_{\text{tensions de surface}} + \underbrace{\Lambda_a P_a}_{\text{tension de ligne}} + \underbrace{G \left(\frac{1}{H^2} + \frac{2}{R_{1/2}^2} \right)}_{\text{confinement}}$$

Substrat plat

Sur substrat plat, l'énergie de la cellule s'écrit maintenant :

$$E_c = \gamma_a S_{1/2} + \gamma_b S_{1/2} + \frac{\gamma_{cc}}{2} \alpha H \sqrt{S_{1/2}} + \Lambda_a \alpha \sqrt{S_{1/2}} + G \left(\frac{1}{H^2} + \frac{2}{R_{1/2}^2} \right)$$

En minimisant l'énergie et en utilisant la relation $R_{1/2} = \frac{\alpha}{2\pi} \sqrt{S_{1/2}}$ on obtient une nouvelle relation entre γ et Λ :

$$\gamma = \frac{\alpha}{4} \frac{1}{\sqrt{S_{1/2}}} (H - 2\Lambda) + 2 \frac{G}{\gamma_{cc}} \left(\frac{4\pi^2}{\alpha^2} \frac{1}{S_{1/2}^2} - \frac{1}{HV} \right)$$

Substrat courbé

On écrit l'énergie de confinement sur substrat sinusoïdal en utilisant l'expression du volume, $V = HS_{1/2}(x) - \frac{\pi}{16} R_{1/2}^4 z''(x)$, ce qui donne

$$E_{conf} = G \left(\frac{S_{1/2}^2}{\left(V + \frac{\alpha^4}{\pi} S_{1/2}^2 z''(x) \right)^2} + \frac{8\pi^2}{\alpha^2} \frac{1}{S_{1/2}} \right)$$

Toujours en supposant $R_{1/2}(x) \ll \frac{\lambda^2}{A}$ l'énergie de confinement s'exprime :

$$E_{conf} = G \left(\frac{S_{1/2}^2}{V^2} - 2 \frac{\alpha^4}{\pi} \frac{S_{1/2}^4}{V^3} z''(x) + \frac{8\pi^2}{\alpha^2} \frac{1}{S_{1/2}} \right)$$

L'énergie de la cellule s'écrit alors :

$$\begin{aligned} \frac{E_c}{\alpha\gamma_{cc}} = & -\frac{\alpha^2}{32\pi^2} \left(1 - \frac{\alpha^2}{16\pi}\right) z''(x) S_{1/2}^{3/2}(x) + \frac{1}{\alpha} \frac{\gamma_a + \gamma_b}{\gamma_{cc}} S_{1/2}(x) \\ & + \frac{V}{2\sqrt{S_{1/2}(x)}} \left(1 - \frac{1}{2} \frac{\Lambda_a}{\gamma_{cc}} z''(x)\right) + \frac{\Lambda_a}{\gamma_{cc}} \sqrt{S_{1/2}(x)} \\ & + G \left(\frac{S_{1/2}^2}{V^2} - 2 \frac{\alpha^4}{\pi} \frac{S_{1/2}^4}{V^3} z''(x) + \frac{8\pi^2}{\alpha^2} \frac{1}{S_{1/2}} \right) \end{aligned}$$

Cette énergie sera encore minimisée numériquement et avec un seul paramètre ajustable car, même si G est un nouveau paramètre, il s'agit d'une grandeur dont la valeur est estimée par ailleurs : $G \sim 10^{24} - 10^{23} J.m^2$ [53]. Cette valeur est suggérée par des mesures de confinement de F-actine *in vitro* [76] et des mesures rhéologiques sur des extraits cytoplasmiques d'œuf de Xénope [77].

3.3 Modélisation continue

Les modélisations présentées précédemment étaient cellulaires, c'est-à-dire qu'elles donnent la forme optimale d'une cellule en contact avec les autres cellules et le substrat. Une autre approche, présentée dans cette partie, consiste à considérer l'épithélium comme un matériau continu.

On souhaite modéliser l'épithélium sur substrat sinusoïdal comme un film mince totalement mouillant [78] [79]. Ce film mince a deux énergies en compétition pour déterminer sa forme : l'énergie de surface liquide/air et une énergie dépendant de l'épaisseur du film, $P(H_0)$, comme une énergie liée aux interactions de *van der Waals* par exemple. On est dans une situation où il existe une valeur optimale H_0 de l'épaisseur du film lorsqu'il est sur un substrat plat.

Lorsque le liquide est sur un substrat rugueux, une grande énergie de surface liquide/air va faire tendre la surface du liquide vers une forme plate qui minimise la surface de l'interface liquide/air, et donc gomme les rugosités du substrat comme on le voit sur la figure 3.4b.

A l'inverse, la convexité de l'énergie en volume, $P''(H_0)$, tend à donner une épaisseur homogène au film liquide. Par exemple, dans le cas où $P(H_0)$ rend compte des interactions de van der Waals, on a $P(H_0) \propto \frac{1}{H_0^2}$ ce qui donne $P''(H_0)$ positif donc cela favorise énergétiquement les films d'épaisseur homogène.

La compétition entre ces deux effets antagonistes est quantifié par la longueur de cicatrisation du film ξ_e [79] :

$$\xi_e = \left(\frac{\gamma_a}{P''(H_0)} \right)^{1/2}$$

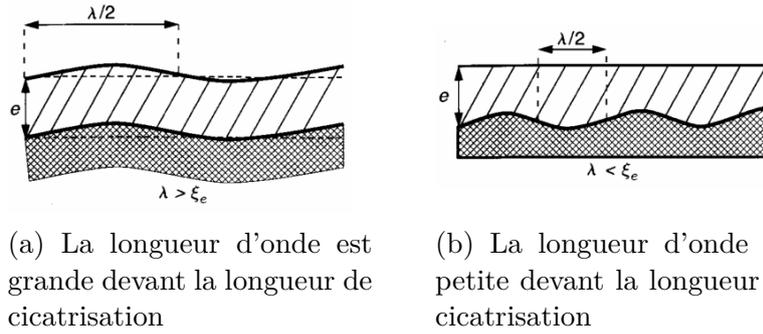


FIGURE 3.4 – Illustration d'un film mince totalement mouillant sur un substrat rugueux. Adapté de [13].

Une motivation de cette démarche est que ce formalisme devrait être adapté à un substrat à profil sinusoïdal puisqu'il n'a qu'une longueur d'onde. Autrement dit, la comparaison entre la longueur de cicatrisation du film et celle des variations caractéristiques du profil du substrat devrait être aisée car il n'y en a qu'une contrairement au cas général où le spectre en longueur d'onde du profil du substrat est étendu.

La première étape est d'écrire l'expression de $P(H_0)$ pour l'épithélium : γ_{cc} donne une contribution énergétique à l'épaisseur du film. Dans un élément de surface dS , il y a $\frac{dS}{S_{1/2}}$ cellules de périmètre $\alpha\sqrt{S_{1/2}}$ donc la contribution énergétique des interfaces cellule-cellule est

$$dE_{cc} = \gamma_{cc}\alpha\sqrt{S_{1/2}}H_0\frac{dS}{S_{1/2}} = P(H_0) dS$$

Avec $V = H_0S_{1/2}$ on a l'expression de $P(H_0)$:

$$P(H_0) = \frac{\alpha\gamma_{cc}}{\sqrt{V}}H_0^{3/2}$$

Il est important de noter ici que $P(H_0)$ est une fonction convexe ce qui donnera bien un comportement qualitativement similaire à celui du film mince totalement mouillant sur un substrat rugueux.

On peut alors exprimer la longueur de cicatrisation de l'épithélium :

$$\xi_e = \left(\frac{\gamma_a}{P''(H_0)} \right)^{1/2} = \left(\frac{4}{3} \frac{\gamma_a}{\alpha\gamma_{cc}} \sqrt{VH_0} \right)^{1/2}$$

On rappelle que, en l'absence de courbure, $H_0 = (V)^{1/3} \left(\frac{2}{\alpha} \frac{\gamma_a + \gamma_b}{\gamma_{cc}} \right)^{2/3}$ donc la longueur de cicatrisation s'écrit de façon alternative, avec uniquement les tensions de surface et le volume :

$$\xi_e = \sqrt{\frac{2^{7/3}}{3}} V^{1/3} \frac{\gamma_a^{1/2} (\gamma_a + \gamma_b)^{1/6}}{(\alpha\gamma_{cc})^{2/3}}$$

Par ailleurs, le calcul complet donne l'épaisseur du film liquide H sur un substrat à

profil sinusoidal :

$$H = H_0 + z \left(\frac{1}{1 + k^2 \xi_e^2} - 1 \right)$$

Avec $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ où λ est la longueur d'onde du profil sinusoidal du substrat et z le profil du substrat. On retrouve le comportement qu'on a montré qualitativement plus haut : si $\lambda \gg \xi_e$, on a $k^2 \xi_e^2 \ll 1$, donc $H = H_0$ quel que soit z . Cela revient à dire que l'épaisseur du film est constante, comme cela est illustré sur la figure 3.4a. À l'inverse, si $\lambda \ll \xi_e$, on a $H = H_0 - z$ ce qui revient à avoir un film liquide plat, dont l'épaisseur varie autant que les rugosités du substrat, comme on le voit sur la figure 3.4b.

On peut donc prédire la différence de hauteur de l'épithélium entre les creux et les crêtes que donne ce modèle en prenant $H_{creux} = H \left(z = -\frac{A}{2} \right)$ et $H_{criste} = H \left(z = \frac{A}{2} \right)$:

$$H_{creux} - H_{criste} = \frac{A}{1 + \left(\frac{1}{2\pi} \frac{\lambda}{\xi_e} \right)^2}$$

C'est cette différence de hauteur que l'on pourra mesurer, comme on va le voir dans le chapitre suivant. La comparaison de ce modèle continu avec les résultats expérimentaux se fera plus spécifiquement dans la section 4.3.5.

On a maintenant plusieurs modèles cellulaires et un modèle continu pour essayer d'expliquer la forme des cellules sur substrat courbé. Les prédictions quantitatives de ces modèles seront développées dans le chapitre suivant car on a besoin de données expérimentales, notamment concernant la forme des cellules en l'absence de courbure, pour calibrer les paramètres de ces modèles.

Influence de la courbure du substrat sur la forme des cellules épithéliales

We are not to tell nature what she's gotta be. She's always got better imagination than we have.

Richard Feynman

Dans le chapitre 3, des modélisations physiques ont été développées pour comprendre la forme des cellules épithéliales et, plus précisément, pour rendre compte de l'influence de la courbure du substrat sur la hauteur de ces cellules. Le système expérimental a été détaillé dans le chapitre 2 pour observer l'influence de la courbure du substrat sur la hauteur des cellules épithéliales et ainsi tester les modèles proposés.

4.1 Hauteur des cellules

4.1.1 Résultats

Hauteur des cellules en l'absence de courbure

Comme on l'a vu dans le chapitre 3, il est utile de mesurer la hauteur et la surface des cellules en l'absence de courbure pour fixer la valeur du rapport des énergies de surface $\gamma = \frac{\gamma_a + \gamma_b}{\gamma_{cc}}$ dans le modèle n'utilisant que des énergies de surface. Pour les modèles plus riches, cette mesure de la hauteur des cellules permet de fixer la relation entre la tension de ligne réduite Λ et le rapport des énergies de surface γ . Pour obtenir cette valeur de la hauteur des cellules en l'absence de courbure, plusieurs choix sont possibles.

Le premier consiste à mesurer à nouveau la hauteur des cellules sur substrat plat mais en utilisant exactement le même procédé d'analyse d'image que pour mesurer la hauteur

des cellules sur substrat sinusoïdal (présenté en section 2.3.1). On va alors décrire la présence de crêtes et de creux imaginaires sur ce substrat plat, et donc dépourvu de toute courbure, et on va mesurer la hauteur des cellules le long de ces axes imaginaires. Pour rappel, cette mesure consiste à détecter la position de chaque cellule grâce au signal du DAPI puis à en mesurer la hauteur moyenne sur une zone de $2\ \mu\text{m}$. Le résultat est présenté en figure 4.1

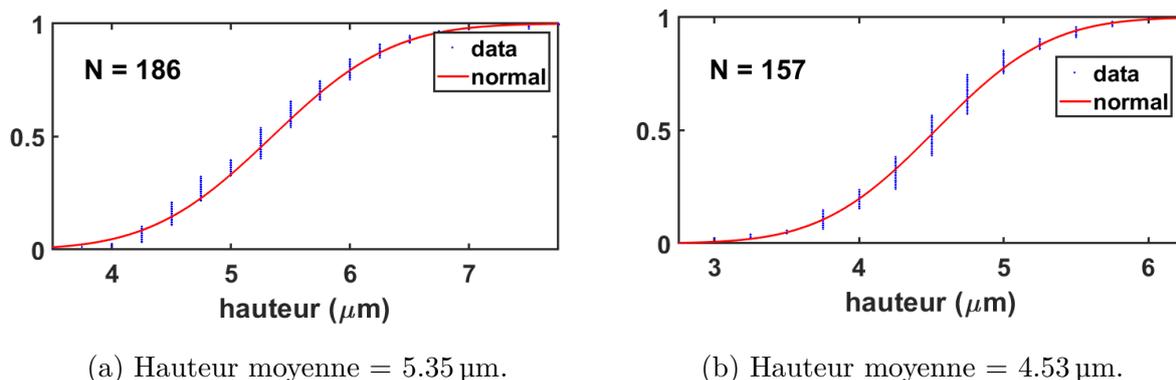


FIGURE 4.1 – Mesure de la hauteur des MDCK en l’absence de courbure sur deux échantillons distincts. la fonction de répartition expérimentales sont en bleu et l’ajustement par une fonction d’erreur est en rouge. On notera la discrétisation des mesures par pas de $0.25\ \mu\text{m}$: c’est la taille d’un pixel dans la direction apico-basale.

On a réalisé cette mesure sur deux échantillons différents donnant la mesure de la hauteur sur un total de 343 cellules (186 cellules pour l’échantillon en figure 4.1a et 157 cellules pour celui en 4.1b). La hauteur moyenne ainsi mesurée est de $4.98\ \mu\text{m}$. Il faut noter ici deux sources de variabilité dans la mesure de la hauteur.

La variabilité intra-échantillon mesurée grâce à l’écart-type ($0.8\ \mu\text{m}$ pour l’échantillon en figure 4.1a et $0.6\ \mu\text{m}$ pour l’échantillon en figure 4.1b). Cette variabilité s’observe dans des proportions similaires pour tous les échantillons et peut avoir plusieurs origines comme le fait que toutes les cellules ne sont pas au même stade de leur cycle cellulaire et ont donc des volumes et hauteurs différents.

La variabilité inter-échantillon est du même ordre que l’écart-type au sein de chaque échantillon puisque la différence des hauteurs moyennes mesurées est de $0.82\ \mu\text{m}$. Il faudrait faire cette mesure sur un plus grand nombre d’échantillons pour avoir une meilleure idée quantitative de cette variabilité inter-échantillon.

La seconde façon d’estimer la hauteur des cellules en l’absence de courbure est de prendre la moyenne des hauteurs mesurées dans les creux et sur les crêtes des substrats à profil sinusoïdal. Cette mesure est exacte si la hauteur des cellules dépend linéairement de la courbure et, même si cela n’est pas exactement le cas, c’est une approximation valide notamment pour les plus faibles courbures. En mesurant la hauteur moyenne, on a accès

à une statistique beaucoup plus importante puisqu'il suffit de reprendre les mesures de hauteur déjà effectuées par ailleurs. Un autre avantage est que l'on prend la mesure de la hauteur en l'absence de courbure sur les mêmes échantillons que pour les mesures sur les substrats courbés : on s'affranchit ainsi partiellement de la variabilité inter-échantillon. Cette mesure donne la valeur suivante :

$$H_0 = \frac{\langle H_{creux} \rangle + \langle H_{crete} \rangle}{2} = 5.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$$

où $\langle H_{creux} \rangle$ désigne la hauteur moyenne des cellules dans les creux et $\langle H_{crete} \rangle$ la hauteur moyenne des cellules sur les crêtes. Cette valeur de H_0 que l'on va utiliser pour calibrer les modèles est la moyenne sur 1873 mesures de hauteurs de cellules.

Il faut maintenant calibrer les modèles avec un autre paramètre de forme en l'absence de courbure : la surface à mi-hauteur ou le volume. Le volume est très difficile à mesurer directement. On peut l'estimer en segmentant le contour des cellules sur chaque plan comme cela a été fait pour estimer les changements de volume chez l'embryon de drosophile [80]. Cette technique s'est avérée inopérante pour nos cellules car elles sont beaucoup plus fines que les cellules colonnaires de l'embryon de drosophile. Elles ont donc moins de plans sur lesquels segmenter le contour des cellules et cela rend la mesure très sensible à quelques erreurs de segmentation. Une autre possibilité de mesure de volume que l'on a explorée est d'utiliser une segmentation par un outil d'apprentissage statistique : le plugin *Trainable Weka Segmentation*¹ d'ImageJ [81]. Encore une fois, cet outil s'est avéré trop peu fiable et notamment dans les géométries courbées que l'on utilise. Étant donné qu'il s'agit d'un outil d'apprentissage statistique, on suggère tout de même d'utiliser cet outil dès le début d'un projet afin que les résultats obtenus deviennent suffisamment pertinents au fil des images que le plugin analyse.

La mesure complémentaire choisie est celle de la surface à mi-hauteur, et celle-ci a dû être mesurée à la main et n'a donc pas la même puissance statistique que la mesure de la hauteur moyenne en l'absence de courbure H_0 . Cette procédure de mesure à la main est détaillée dans le chapitre 2.3.1. On a mesuré une surface moyenne $S_{1/2} = 80 \pm 7 \mu\text{m}^2$ sur 120 cellules réparties sur 4 échantillons distincts, l'incertitude donnée ici étant l'intervalle de confiance à 95%. On retrouve là une valeur cohérente avec d'autres mesures faites sur de plus grands ensembles de cellules MDCK [59]. On approxime ensuite le volume des cellules par $V = H_0 \cdot S_{1/2}$ car, comme on l'a expliqué dans le paragraphe précédent, la mesure directe du volume est trop imprécise.

Enfin, on doit mesurer le paramètre $\alpha = \frac{P_{1/2}}{\sqrt{S_{1/2}}}$: un facteur de forme de la surface à mi-hauteur. On le fait dans le même temps que les mesures de $S_{1/2}$ pour obtenir $\alpha = 4 \pm 0.3$.

1. Toutes les informations relatives à ce plugin peuvent être trouvées à l'adresse https://imagej.net/Trainable_Weka_Segmentation.

Maintenant que la calibration sur la forme des cellules est faite en l'absence de courbure, voyons ce que donne la hauteur des cellules sur les substrats courbés.

Hauteur des cellules sur substrat à profil sinusoïdal

Afin de mesurer l'influence de la courbure sur la forme des cellules épithéliales, on a cultivé des MDCK sur des substrats à profil sinusoïdal. Le système expérimental, les méthodes utilisées pour les acquisitions d'images et les outils d'analyse d'images utilisés dans cette partie ont été détaillés dans le chapitre 2. Telles qu'on les voit au microscope (donc en vue de dessus), les cellules sur un substrat à profil sinusoïdal donnent des images comme celle de la figure 4.2.

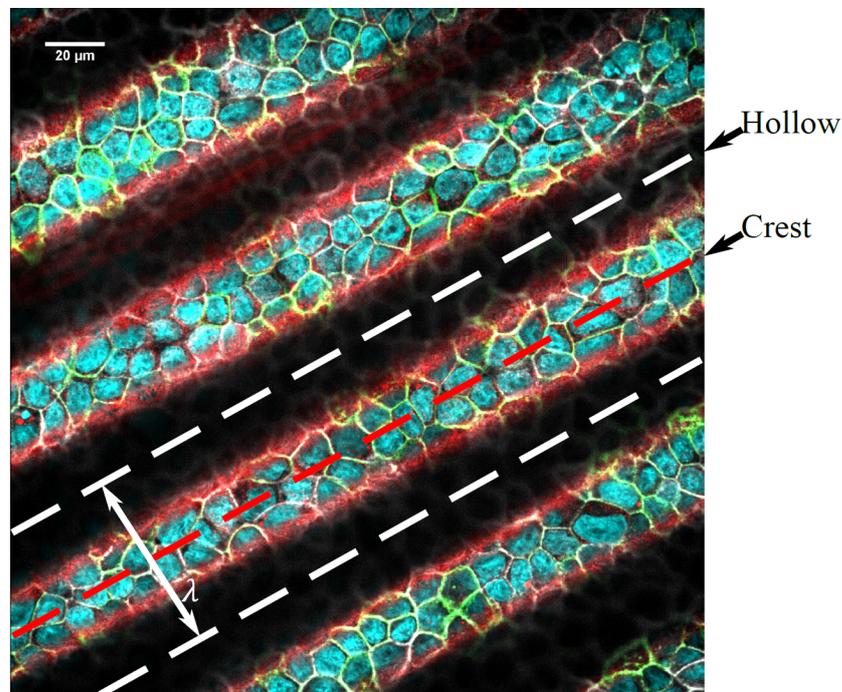


FIGURE 4.2 – MDCK cultivées sur un substrat à profil sinusoïdal. La vue de dessus au microscope confocal fait que l'on reçoit la lumière provenant uniquement des cellules situées sur les crêtes, les cellules dans les creux étant trop éloignées du plan focal. Le noyau des cellules est en cyan, la F-actine en gris, les E-cadhérines en vert et la fibronectine du substrat est en rouge.

On utilisera plutôt des vues en coupes afin de mesurer la hauteur des cellules. On peut voir en figure 4.3 deux exemples de vues en coupe obtenues lors de ces expériences.

Lorsque le substrat est de faible longueur d'onde (en haut sur la figure 4.3), les cellules dans les creux sont plus hautes que les cellules sur les crêtes. Pour le substrat de grande longueur d'onde (en bas sur la figure 4.3), au contraire, les cellules sont toutes de même hauteur : l'épithélium suit la courbure du substrat. On voit ainsi l'utilité d'utiliser des

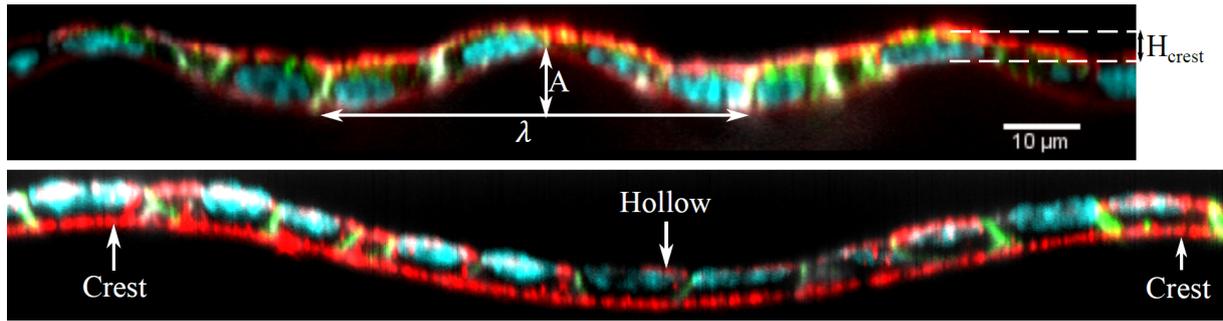


FIGURE 4.3 – Vue en coupe des MDCK cultivées sur un substrat sinusoïdal. Deux substrats de formes différentes sont montrés : en haut un substrat de petite longueur d’onde ($\lambda \simeq 56 \mu\text{m}$) et en bas un substrat de grande longueur d’onde ($\lambda \simeq 140 \mu\text{m}$). On voit que la hauteur des cellules dans les creux est plus grande que celles sur les crêtes sur le substrat de plus faible longueur d’onde. Cette différence disparaît sur le substrat de grande longueur d’onde.

substrats de courbures différentes et on rappelle dans le tableau suivant les longueurs d’ondes (λ) et les amplitudes crête à crête (A) des substrats utilisés :

$A(\mu\text{m})$	$\lambda(\mu\text{m})$	$R(\mu\text{m})$	$1/R(\mu\text{m}^{-1})$
6.7	54	22	0.045
5.6	40	14	0.069
10	49	12	0.082
11	110	56	0.018
16	96	29	0.034

Un détail à noter ici est que le substrat du haut sur la figure 4.3 n’est pas tout à fait symétrique. En effet, ses creux sont plus larges que ses crêtes. C’est un problème que l’on a déjà évoqué dans le chapitre 2. Pour s’affranchir de cette irrégularité, on a d’abord mis en œuvre une mesure de la forme du substrat prenant en compte cette asymétrie. De plus, on joue sur la statistique en faisant des mesures sur les contre-moules des substrats asymétriques. De cette façon, on a pu tester si les substrats ayant la forme exactement inverse génèrent un résultat différent. Ce n’est pas le cas comme on va le voir un peu plus loin puisque tous les résultats ont été inclus, y compris ceux obtenus sur les substrats inversés.

On va maintenant quantifier cette différence de hauteur que l’on observe qualitativement en figure 4.3.

Pour rendre compte de la différence de forme des cellules sur substrat courbé, on a choisi de présenter la différence de hauteur relative entre les cellules situées dans les creux et celles situées sur les crêtes du substrat.

Pour obtenir cette valeur, on commence par mesurer la hauteur des cellules dans les creux et sur les crêtes des substrats à profil sinusoïdal comme on l’a vu dans le chapitre

2.3.1. Pour chaque échantillon (un échantillon étant ici un champ de microscope), on obtient en moyenne 59 mesures de hauteurs dans les creux et 50 mesures de hauteurs sur les crêtes². On calcule ensuite la moyenne des hauteurs sur les crêtes de l'échantillon i : H_{creux}^i et celle sur les crêtes : $H_{crête}^i$. La différence de hauteur relative que l'on mesure pour l'échantillon i est alors :

$$\Delta h^i = 2 \frac{H_{creux}^i - H_{crête}^i}{H_{creux}^i + H_{crête}^i}$$

Δh^i est donc la différence de hauteur relative par rapport à la hauteur moyenne dans l'échantillon i .

Ce choix de variable Δh^i est fait pour s'affranchir au maximum de la variabilité inter-échantillons. En effet, si un échantillon i a des cellules qui sont toutes un peu plus hautes que celles des autres échantillons, sa valeur de Δh^i ne devrait pas être trop modifiée par rapport à un échantillon moyen. On ne capture ainsi que la différence de forme entre les cellules situées dans les creux et celles sur les crêtes.

Le résultat pour tous les échantillons est présenté sur la figure 4.4, pour laquelle on a mesuré la hauteur de 1873 cellules sur 6 expériences distinctes.

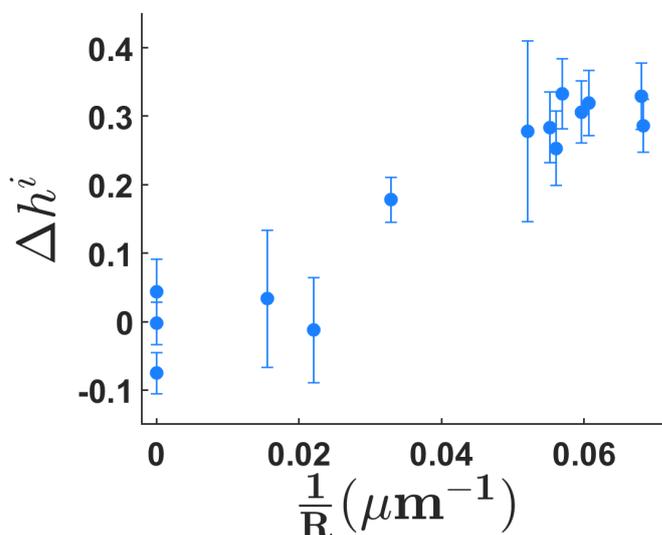


FIGURE 4.4 – Différence de hauteur relative entre les cellules sur les crêtes et les cellules dans les creux Δh^i en fonction de $\frac{1}{R}$. Chaque point représente un champ vu au microscope sur lequel a été mesurée la hauteur de 110 cellules en moyenne. Les barres d'erreur sont l'intervalle de confiance à 95%. Les points à la courbure nulle sont des mesures de contrôle sur un substrat plat.

Les courbures auxquelles ont été mesurées les différences de hauteur Δh^i ne corres-

2. On note ici une différence de population entre les crêtes et les creux, cette différence sera discutée brièvement plus tard.

pondent pas exactement aux courbures que l'on a montrées dans le tableau listant les substrats utilisés, mais sont dispersés sur plusieurs valeurs différentes pour chaque mesure. Cela est dû au fait que les caractéristiques géométriques des substrats sont inhomogènes ce qui nous amène à mesurer les caractéristiques géométriques des substrats pour chaque échantillon, comme on l'a discuté dans le chapitre 2.3.1.

On choisit de représenter la différence de hauteur relative Δh^i en fonction de la courbure $\frac{1}{R}$ du substrat car cela permet de bien prendre en compte à la fois les variations en amplitude et en longueur d'onde de ces substrats. Étant donné les résultats théoriques obtenus au chapitre 3, $\frac{1}{R}$ est le paramètre le plus adéquat en fonction duquel observer l'évolution de la différence de hauteur relative car c'est ce paramètre qui apparaît explicitement dans les équations de l'énergie de la cellule.

On voit sur ce graphique 4.4 la confirmation de l'observation qualitative faite avec la figure 4.3 : les cellules tendent à avoir une hauteur uniforme sur les substrats de faible courbure et sont plus épaisses dans les creux que sur les crêtes sur les substrats de plus grandes courbures.

On note la présence de points à une courbure exactement nulle. Il s'agit de contrôles pour lesquels on a mesuré la hauteur des cellules sur un substrat plat en positionnant aléatoirement des crêtes et des creux imaginaires, comme d'écrit au paragraphe 4.1.1 et notamment la figure 4.1. Ce contrôle est utile car il valide notre méthode de mesure : elle ne semble pas créer de différence de hauteur artificielle entre les crêtes et les creux puisque les trois valeurs sont très proches d'une différence de hauteur relative nulle. D'autre part, cela nous permet d'avoir une autre estimation de la variabilité intra-échantillon que celle mesurée par l'intervalle de confiance à 95%. On peut ici l'estimer à environ 0.05 unité pour Δh^i .

Les barres d'erreur affichées sur la la figure 4.4 sont les intervalles de confiance à 95% pour chaque mesure. Pour calculer ces intervalles de confiance, on ne peut pas simplement utiliser la formule $CI = 1.96\sigma$, avec σ l'écart-type de la série de mesure considérée. En effet, la grandeur mesurée Δh^i fait intervenir l'ajout de deux moyennes H_{creux}^i et $H_{crête}^i$ ayant chacune leurs propres fonction de répartition et écart-type. Pour avoir un écart-type statistiquement utilisable pour Δh^i , il faut utiliser la formule de l'écart-type combiné [82] :

$$\sigma_{combiné} = \sqrt{\frac{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}{2}}$$

avec σ_1 et σ_2 les écart-types respectivement de H_{creux}^i et $H_{crête}^i$ et $\sigma_{combiné}$ est l'écart-type combiné des deux. Cette formule simple qui donne ensuite l'intervalle de confiance à 95% n'est cependant strictement valable que lorsque les écart-types sont similaires pour H_{creux}^i et $H_{crête}^i$. Pour estimer l'intervalle de confiance de façon plus rigoureuse, on peut utiliser

une technique de *bootstrap* qui consiste à générer des jeux de données de Δh^i en prenant des paires de valeurs H_{creux}^i et $H_{crête}^i$ aléatoires. On a créé 10000 jeux de données de Δh^i pour quelques échantillons et on a trouvé à chaque fois des valeurs d'écart-types moyens à moins de 10% des écart-types obtenus avec la formule simple de l'écart-type combiné. On utilisera donc la formule de l'écart-type combiné pour calculer tous les intervalles de confiance à 95%, pour ce graphique et pour les suivants.

Sur cette figure 4.4, on voit que les différences de hauteurs relatives Δh^i observées ne sont pas significativement différentes de 0 pour les plus faibles courbures testées : ici autour de $\frac{1}{R} = 0.02 \mu\text{m}^{-1}$. Aux plus grandes courbures, autour de $\frac{1}{R} = 0.06 \mu\text{m}^{-1}$, toutes les mesures donnent une différence de hauteur $\Delta h^i \approx 0.3$. Enfin, on a une mesure à une courbure intermédiaire entre ces deux cas, $\frac{1}{R} = 0.033 \mu\text{m}^{-1}$, qui donne $\Delta h^i \approx 0.18 \pm 0.03$.

Ainsi, on a exploré une gamme de courbure qui nous permet de distinguer des cas qui sont suffisamment proches du substrat plat pour en être indiscernable avec la mesure de Δh^i , et des cas qui donnent une réponse significativement différente de 0 pour Δh^i . On va maintenant voir quels sont les modèles physiques, présentés au chapitre 3, qui peuvent rendre compte quantitativement d'une telle observation.

4.1.2 Comparaison avec les prédictions théoriques

Comme on l'a vu dans la section 4.1.1, on va utiliser les modèles du chapitre 3 avec les paramètres géométriques suivants :

- $H_0 = 5.1 \mu\text{m}$, H_0 étant la hauteur des cellules en l'absence de courbure.
- $S_{1/2} = 80 \mu\text{m}^2$, $S_{1/2}$ étant la surface des cellules à mi-hauteur.
- $V = H_0 \cdot S_{1/2} = 408 \mu\text{m}^3$
- $\alpha = 4$

Pour rappel, l'énergie de la cellule retenue est la suivante :

$$E_c = \underbrace{\gamma_a S_a + \gamma_b S_b + \frac{\gamma_{cc}}{2} S_{cc}}_{\text{tensions de surface}} + \underbrace{\Lambda_a P_a}_{\text{tension de ligne}} + G \underbrace{\left(\frac{1}{H^2} + \frac{2}{R_{1/2}^2} \right)}_{\text{confinement}}$$

Avec γ_a , γ_b et γ_{cc} les énergies de surface, respectivement des faces apicale, basale et intercellulaire.

On va tester quels sont les termes nécessaires pour rendre compte des données expérimentales. Pour obtenir la différence de hauteur relative prédite par les modèles, on minimise l'énergie de la cellule en utilisant les fonctions de calcul symbolique de MATLAB. Plus précisément, on crée la fonction de l'énergie de la cellule calculée dans le chapitre 3 et on cherche la surface à mi-hauteur qui minimise cette fonction. Cette minimisation

se fait avec la fonction *fminsearch* [83] de MATLAB³. Cette minimisation numérique a été faite pour plusieurs cas avec Mathematica pour s'assurer de leur non-dépendance au logiciel utilisé. Le résultat est présenté en figure 4.5.

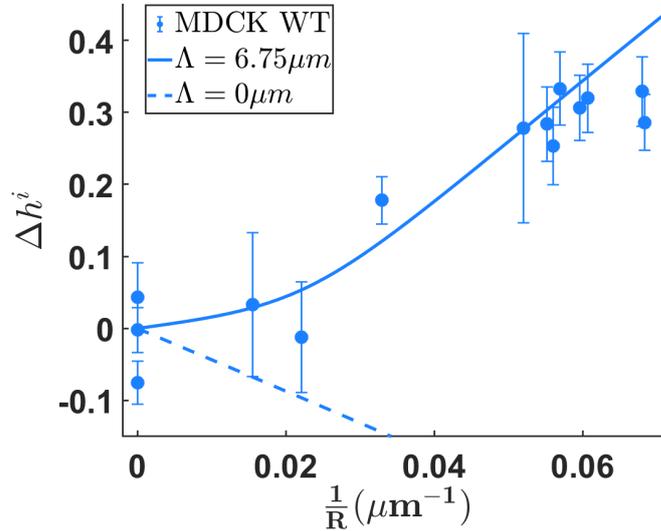


FIGURE 4.5 – Différence de hauteur relative entre les cellules sur les crêtes et les cellules dans les creux Δh^i en fonction de $\frac{1}{R}$. La courbe pointillée correspond à la minimisation du modèle ne comportant que des tensions de surface. La courbe pleine correspond au meilleur ajustement du modèle comportant des tensions de surface et la tension de ligne apicale.

On voit sur cette figure 4.5 deux courbes qui sont les prédictions des modèles.

La courbe en pointillés donne la prédiction du modèle ne comportant que les énergies de surfaces de la cellule. C'est le modèle qui dresse l'analogie la plus directe entre une cellule et une goutte liquide. Cela revient à fixer $\Lambda_a = 0$ et $G = 0$ donc à annuler respectivement les contributions de la tension de ligne apicale et de l'énergie de confinement de la cellule. On rappelle l'énergie de la cellule sur substrat à profil sinusoïdal dans ce cas :

$$\frac{E_c}{\alpha \frac{\gamma_{cc}}{2}} = -\frac{\alpha^2}{16\pi^2} \left(1 - \frac{\alpha^2}{16\pi}\right) z''(x) S_{1/2}^{3/2}(x) + \frac{2}{\alpha} \frac{\gamma_a + \gamma_b}{\gamma_{cc}} S_{1/2}(x) + \frac{V}{\sqrt{S_{1/2}(x)}}$$

On note que le modèle est sans paramètre ajustable : le seul paramètre lié aux énergies de surfaces qui intervient dans l'expression finale de l'énergie de la cellule est le paramètre adimensionné $\gamma = \frac{\gamma_a + \gamma_b}{\gamma_{cc}}$. Ce paramètre est fixé par les mesures faites en l'absence de

3. On pourra en trouver les détails dans <https://fr.mathworks.com/help/matlab/math/optimizing-nonlinear-functions.html>.

courbure puisqu'on a alors la relation :

$$\gamma = \frac{\alpha}{4} \sqrt{\frac{H^3}{V}} = 0.57$$

Cette valeur de γ est difficile à interpréter. En effet, on s'attend à $\gamma_{cc} < \gamma_a$ comme on l'a vu dans la section 1.3.1. De même, on s'attend à avoir $\gamma_b < \gamma_a$ pour les mêmes raisons : l'adhérence des cellules au substrat devrait tendre à réduire cette énergie de surface cellule-substrat. Cependant, on voit que pour avoir $\gamma < 1$ comme c'est le cas ici, on doit avoir $\gamma_a + \gamma_b < \gamma_{cc}$ or, avec $\gamma_{cc} < \gamma_a$ cela implique $\gamma_b < 0$. Une valeur négative de l'énergie de surface cellule-substrat impliquerait, si la cellule était une goutte liquide, un mouillage total. Des énergies de surface négatives entre solide et liquide ne sont généralement pas observées dans des cas classiques. Cependant, comme on l'a vu dans le chapitre 1, les énergies de surfaces des cellules ont une origine fondamentalement différente de celle des liquides. En particulier, les interfaces intercellulaires et basales mettent en jeu de l'adhérence qui diminue l'énergie de surface correspondante. Si cette adhérence a une contribution plus grande que la contractilité de l'actomyosine à l'énergie de surface, alors cette énergie peut tout à fait être négative.

L'adéquation du modèle utilisant uniquement des énergies de surface avec les mesures obtenues est très mauvaise. Qualitativement, le modèle prédit toujours que la hauteur des cellules sur les crêtes doit être plus grande que la hauteur des cellules dans les creux. Cette différence augmentant avec la courbure du substrat. On observe l'inverse et cela nous permet de conclure que pour cette observation, le modèle utilisant uniquement des énergies de surface n'est pas suffisant.

La courbe en trait plein de la figure 4.5 est la prédiction du modèle incluant un terme de tension de ligne apical dans l'énergie de la cellule, mais pas de terme de confinement. On rappelle l'énergie de la cellule sur substrat à profil sinusoïdal dans ce cas :

$$\begin{aligned} \frac{E_c}{\alpha\gamma_{cc}} = & -\frac{\alpha^2}{32\pi^2} \left(1 - \frac{\alpha^2}{16\pi}\right) z''(x) S_{1/2}^{3/2}(x) + \frac{1}{\alpha} \frac{\gamma_a + \gamma_b}{\gamma_{cc}} S_{1/2}(x) \\ & + \frac{V}{2\sqrt{S_{1/2}(x)}} \left(1 - \frac{1}{2} \frac{\Lambda_a}{\gamma_{cc}} z''(x)\right) + \frac{\Lambda_a}{\gamma_{cc}} \sqrt{S_{1/2}(x)} \end{aligned}$$

Ce modèle a un paramètre ajustable, contrairement au modèle n'utilisant que les énergies de surface. En effet, les mesures faites sur les cellules en l'absence de courbure permettent de fixer une relation entre γ et $\Lambda = \frac{\Lambda_a}{\gamma_{cc}}$ ce qui laisse un de ces deux paramètres, au choix, libre. Cette relation s'écrit

$$\gamma = \frac{\alpha}{4} \frac{1}{\sqrt{S_{1/2}}} (H - 2\Lambda)$$

La question est maintenant de savoir s'il existe une valeur de Λ qui rend compte de façon satisfaisante des mesures obtenues.

Comme on le voit sur la courbe en trait plein de la figure 4.5, on obtient une excellente adéquation entre la prédiction du modèle et les données pour $\Lambda = 6.75 \mu\text{m}$. La tension de ligne a été mesurée dans des épithéliums et notamment chez l'embryon de drosophile par ablation laser [84] pour obtenir $\Lambda_a \sim 1 - 10 \text{nN}$. Cette valeur de tension de ligne donne, en supposant une énergie de surface intercellulaire $\gamma_{cc} \sim 0.1 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, $\Lambda \sim 10 - 100 \mu\text{m}$. On prédit donc une valeur plutôt plus faible que celle-ci. Par ailleurs, il a été mesuré, toujours chez l'embryon de drosophile, une valeur de tension de ligne $\Lambda_a \sim 100 \text{ pN}$ [32]. Cette mesure a été faite par manipulation laser directe de jonctions intercellulaires et non par ablation laser. Le paramètre Λ deviendrait, avec cette valeur de tension de ligne, $\Lambda \sim 1 \mu\text{m}$. Finalement, on a une prédiction pour la valeur de Λ qui est entre ces deux mesures directes.

Pour cette valeur de Λ , on obtient $\gamma = -0.94$. Une valeur négative de γ implique soit $\gamma_{cc} < 0$ soit $\gamma_a + \gamma_b < 0$. On peut exclure la possibilité d'avoir une énergie de surface intercellulaire négative car, comme on l'a vu dans le chapitre 1.3.1, toutes les mesures de cette énergie ont donné des résultats positifs. De plus, une énergie de surface intercellulaire négative est incohérente avec les résultats que l'on présentera dans le chapitre 5. Il reste donc la possibilité de $\gamma_a + \gamma_b < 0$ qui implique $\gamma_b < 0$ puisque l'énergie de surface apicale γ_a est positive. Comme on l'a écrit pour le cas sans tension de ligne apicale, cette énergie de surface basale négative est possible pour une cellule puisqu'elle crée des adhésions avec le substrat. Il suffit que l'énergie d'adhérence soit plus grande que la contractilité de l'actomyosine à la face basale.

En utilisant le terme d'énergie de confinement de la cellule $G \left(\frac{1}{H^2} + \frac{2}{R_{1/2}^2} \right)$, on ne parvient pas à faire converger la hauteur de la cellule à l'équilibre en utilisant la valeur du facteur $G = 10^{23} \text{ J} \cdot \text{m}^2$ utilisée dans [53], suggérée par des mesures de confinement de F-actine *in vitro* [76] et des mesures rhéologiques sur des extraits cytoplasmiques d'œuf de Xénope [77]. On note que, comme pour la tension de ligne apicale, le paramètre directement apparent dans le modèle est $\frac{G}{\gamma_{cc}}$. Pour obtenir ce paramètre, on a supposé une énergie de surface intercellulaire $\gamma_{cc} \sim 0.1 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ce qui donne $\frac{G}{\gamma_{cc}} \sim 10^4 \mu\text{m}^4$. On a exploré d'autres valeurs pour G et l'influence du terme de confinement devient non significative pour des valeurs de $\frac{G}{\gamma_{cc}} < 10^3 \mu\text{m}^4$ soit $G < 10^{16} \text{ J} \cdot \text{m}^2$. Même pour des valeurs proches de cette limite, le terme de confinement rend l'adéquation entre les prédictions du modèle et les mesures moins bonne. Ainsi, cette énergie de confinement n'apporte pas de valeur explicative au modèle pour comprendre la hauteur des cellules épithéliales sur un substrat courbé.

4.2 Influence de l'expression des E-Cadhérines

Comme on l'a vu dans le chapitre 2, on a utilisé une lignée cellulaire de MDCK exprimant la protéine chimère *EcadGFP*. Cela a un intérêt pour l'imagerie puisqu'on obtient un signal fluorescent bien localisé aux jonctions intercellulaires, facilitant ainsi l'extraction de la forme des cellules à partir des images de microscopie. L'intérêt principal pour nous est en fait d'avoir une lignée cellulaire ayant une altération biologique qui devrait avoir des conséquences sur les énergies de surfaces intercellulaires, étant donné le rôle primordial des E-cadhérines dans les jonctions intercellulaires qu'on a vu au chapitre 1.

4.2.1 Résultats

D'abord, la hauteur des MDCK *EcadGFP* sur substrat plat est différente de celle des MDCK WT. On la mesure de la même façon que pour le MDCK WT, c'est-à-dire comme la moyenne des hauteurs dans les creux et sur les crêtes, et on obtient

$$H_0^{\text{EcadGFP}} = 6.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$$

Les autres paramètres à mesurer en l'absence de courbure ($S_{1/2}$ et α) ont, dans la marge d'erreur, les mêmes valeurs que pour les MDCK WT avec $S_{1/2} = 79 \pm 9 \mu\text{m}^2$. En conséquence, le volume des MDCK *EcadGFP*, calculé comme le produit de la surface à mi-hauteur par la hauteur, est plus grand que le volume des MDCK WT.

Sur substrat à profil sinusoïdal, la différence de hauteur relative Δh^i en fonction de la courbure est donnée sur la figure 4.6, pour laquelle on a mesuré la hauteur de 3183 cellules, dont 1310 *EcadGFP*, sur 6 expériences distinctes. On voit que la hauteur des MDCK *EcadGFP* est influencée significativement moins par la courbure du substrat que ne le sont les MDCK WT. Dès les courbures intermédiaires, vers $\frac{1}{R} \sim 0.03 \mu\text{m}^{-1}$, la différence de hauteur relative des MDCK *EcadGFP* est moins grande ($\Delta h^i = 0.1 \pm 0.05$) que pour les MDCK WT ($\Delta h^i = 0.18 \pm 0.03$). La différence devient statistiquement toujours significative pour tous les échantillons aux plus grandes courbures, avec Δh^i toujours inférieure à 0.2 pour les MDCK *EcadGFP*.

4.2.2 Comparaison avec les prédictions théoriques

Comme pour les MDCK WT, on a d'abord testé le modèle le plus simple, à savoir celui ne comportant que les énergies de surfaces. Ce modèle est sans paramètre ajustable et donne la courbe en pointillé sur la figure 4.6. Ce modèle donne les mêmes prédictions qu'avec les paramètres des MDCK WT : les cellules sur les crêtes devraient être plus

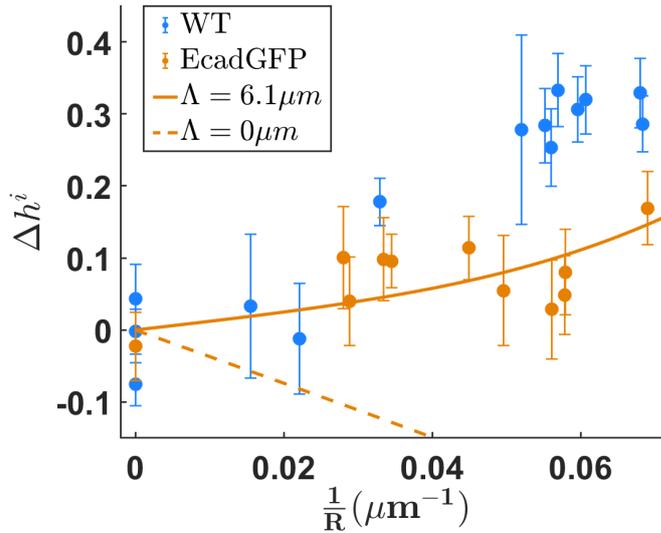


FIGURE 4.6 – Différence de hauteur relative entre les cellules sur les crêtes et les cellules dans les creux Δh^i en fonction de $\frac{1}{R}$. La courbe pointillée correspond à la minimisation du modèle ne comportant que des tensions de surface. La courbe pleine correspond au meilleur ajustement du modèle comportant des tensions de surface et la tension de ligne apicale.

épaisses que les cellules dans les creux. En utilisant ce modèle, on obtient $\gamma = 0.67$ ce qui est légèrement plus grand que pour les MDCK WT. Qualitativement, cette valeur de γ implique $\gamma_b < 0$, comme pour les MDCK WT. On en déduit que l'adhérence cellule-substrat doit contribuer plus que la contractilité de l'actomyosine sur la face basale.

Lorsqu'on ajoute de la tension de ligne apicale au modèle, on parvient à avoir une excellente adéquation aux mesures pour $\Lambda = 6.1 \mu\text{m}$. Ce paramètre $\Lambda = \frac{\Lambda_a}{\gamma_{cc}}$ est donc plus faible pour les MDCK EcadGFP que pour les MDCK WT. Cela veut dire que le modèle prédit une tension de ligne apicale plus faible pour les MDCK EcadGFP que pour les MDCK WT ou une énergie de surface intercellulaire plus grande. Les MDCK EcadGFP devraient exprimer plus de E-cadhérines que la lignée WT car elles expriment les EcadGFP en plus des E-cadhérines. On pourrait s'attendre à ce que cette surexpression donne une énergie de surface intercellulaire γ_{cc} plus faible puisque cela devrait augmenter l'adhérence intercellulaire. L'effet de la surexpression des E-cadhérines par les MDCK EcadGFP sur la tension de ligne apicale est moins évident. On note cependant que cette différence de tension de ligne apicale réduite Λ entre les MDCK WT et les MDCK EcadGFP est très faible ($\sim 10\%$) et que cette différence est probablement non significative. La comparaison faite avec les données de la littérature est donc toujours la même : $\Lambda = 6.1 \mu\text{m}$ se situe entre ce qui a été mesuré par manipulation laser directe [32] ($\Lambda \sim 1 \mu\text{m}$) et par ablation laser [84] ($\Lambda \sim 10 - 100 \mu\text{m}$), ces deux mesures étant faites sur l'embryon de drosophile.

Pour cette valeur de $\Lambda = 6.1 \mu\text{m}$, on obtient $\gamma = -0.69$. Ainsi, comme pour les MDCK

WT, on obtient une valeur négative de γ ce qui implique $\gamma_a + \gamma_b < 0$ et donc $\gamma_b < 0$. Comme on l'a écrit plus haut, cela implique que l'énergie de surface liée à l'adhérence cellule-substrat (négative) contribue plus que la contractilité de l'actomyosine (positive) à l'énergie de surface cellule-substrat. Par ailleurs on note que le facteur γ pour les MDCK EcadGFP est plus faible, en valeur absolue que pour les MDCK WT. On a, en effet, $\gamma^{EcadGFP} = -0.69$ et $\gamma^{WT} = -0.94$. Écrit autrement, cela donne la relation suivante.

$$\left| \frac{\gamma_a + \gamma_b}{\gamma_{cc}} \right|^{WT} > \left| \frac{\gamma_a + \gamma_b}{\gamma_{cc}} \right|^{EcadGFP}$$

Si on considère que les énergies de surfaces basales des deux lignées, WT et EcadGFP, ne sont pas significativement différentes, il reste deux possibilités qui satisfont cette relation. Soit l'énergie de surface intercellulaire des MDCK EcadGFP est plus grande que celle des MDCK WT, ce qui va à l'encontre de ce que l'on attendait puisque les MDCK EcadGFP sur-expriment les E-cadhérines et donc devraient avoir une adhérence intercellulaire plus grande et donc une énergie de surface intercellulaire plus faible. Soit l'énergie de surface apicale est plus faible pour les MDCK WT que pour les MDCK EcadGFP. Ceci est possible d'autant que l'on sait que les adhésions intercellulaires influence de manière significative l'énergie de surface apicale [85]. La sur-expression des E-cadhérines par les MDCK EcadGFP irait ici dans le sens attendu, c'est-à-dire vers une augmentation plus grande de l'énergie de surface apicale ce qui vient renforcer indirectement l'adhérence intercellulaire.

Enfin, comme pour les MDCK WT, le modèle incluant le terme de confinement n'a pas pu converger pour la valeur de $G = 10^{23} \text{ J} \cdot \text{m}^2$ suggérée par la littérature [53] [76] [77]. Les conclusions faites concernant le terme de confinement pour les MDCK WT restent vraies pour les MDCK EcadGFP.

4.3 Influence de l'activité des myosines

Une autre altération biologique que l'on a réalisée concerne l'activité des myosines-II. On a vu dans le chapitre 1 que l'activité des myosines-II est essentielle à la contractilité du cortex qui tapisse l'intérieur des cellules épithéliales. De plus, cette activité a un rôle important dans la tension exercée par la ceinture d'actine qui connecte les jonctions adhérentes. La tension du cortex d'actomyosine est également d'autant plus grandes que l'activité des myosines-II est importante.

4.3.1 Résultats

Comme on l'a vu dans le chapitre 1, on peut inhiber l'activité des myosines-II avec de la blebbistatine. On souhaite avoir une diminution maximale de l'activité des myosines-II par la blebbistatine mais aussi une diminution intermédiaire. Pour cela on utilise la concentration de 50 μM qui sature la diminution de la contractilité des myosines-II et la concentration de 5 μM qui donne un effet intermédiaire [62].

On mesure d'abord les paramètres géométriques des cellules en l'absence de courbure, comme on l'a fait pour les échantillons sans blebbistatine. Les MDCK WT ont une hauteur en l'absence de courbure plus grande après ajout de blebbistatine que sur les échantillons qui n'y ont pas été exposés : $H_0^{5\mu\text{Mbleb}} = 5.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$. La surface mesurée est encore une fois dans la marge d'erreur des cas précédents avec $S_{1/2}^{5\mu\text{Mbleb}} = 81 \pm 8 \mu\text{m}^2$.

A contrario, la hauteur des MDCK EcadGFP en l'absence de courbure est plus faible après l'ajout de blebbistatine. On mesure la même hauteur que pour les MDCK WT $H_0^{5\mu\text{Mbleb}} = 5.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$. La surface à mi-hauteur en l'absence de courbure est encore une fois légèrement plus petite que pour les MDCK WT mais reste dans la marge d'erreur de cette mesure : $S_{1/2}^{5\mu\text{Mbleb}} = 77 \pm 10 \mu\text{m}^2$.

On mesure l'influence de la concentration en blebbistatine pour les MDCK WT et pour les MDCK EcadGFP séparément en figure 4.7 pour laquelle on a mesuré la hauteur de 8454 cellules sur 6 expériences distinctes, dont 3 expériences comportant des échantillons traités à la blebbistatine. L'ajout de blebbistatine à la concentration intermédiaire de 5 μM a plutôt tendance à augmenter la différence de hauteur relative des cellules, mais ces résultats sont très dispersés. Pour les MDCK EcadGFP, on voit que la différence de hauteur relative Δh^i est la même en l'absence ou en présence de blebbistatine pour les courbures intermédiaires. Aux plus grandes courbures, l'ajout de blebbistatine à 5 μM semble donner une plus grande différence de hauteur relative aux MDCK EcadGFP, sans que cela soit significatif pour tous les échantillons mesurés.

Pour les MDCK WT, l'effet semble modifier la dépendance de Δh^i à la courbure. En effet, on voit que pour les courbures faibles et intermédiaires, la différence de hauteur relative est plus importante avec l'ajout de blebbistatine. Au contraire, pour les plus grandes courbures on voit plutôt une plus faible différence de hauteur relative après l'ajout de blebbistatine. Cela donne alors une courbe de tendance avec une augmentation rapide de Δh^i avec la courbure, puis une différence de hauteur relative qui est constante autour de $\Delta h^i = 0.25$.

On voit qu'il y a très peu d'échantillons mesurés à la concentration de 50 μM en blebbistatine : 2 pour les MDCK EcadGFP et 1 pour les MDCK WT. Cela est dû au fait que dans la plupart des échantillons ayant subi ce niveau de concentration en blebbistatine l'épithélium s'est partiellement décollé du substrat, ceci sera décrit au paragraphe 4.3.6.

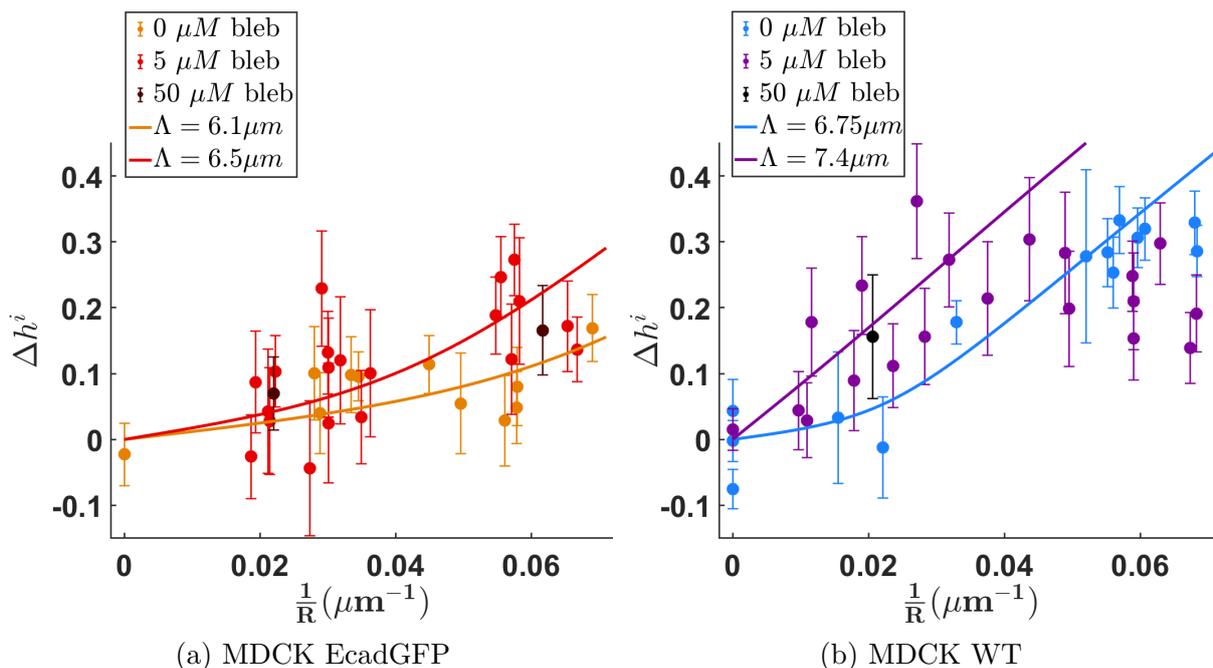


FIGURE 4.7 – Différence de hauteur relative entre les cellules sur les crêtes et les cellules dans les creux Δh^i en fonction de $\frac{1}{R}$. La courbe pleine correspond au meilleur ajustement du modèle comportant des tensions de surface et la tension de ligne apicale.

4.3.2 Comparaison avec les prédictions théoriques

On s'attend à ce que l'altération de l'activité des myosines-II ait une influence sur les paramètres du modèle γ et Λ . En effet, en diminuant l'activité des myosines-II par l'ajout de blebbistatine, on diminue la contractilité du cortex d'actomyosine. Cela peut se traduire par une diminution de toutes les énergies de surfaces mises en jeu dans le modèle. L'activité des myosines-II influe sur l'adhésion cellule-substrat et l'adhésion cellule-cellule, ce qui peut augmenter les valeurs de γ_b et γ_{cc} par diminution des énergies d'adhésion. Ainsi, la blebbistatine devrait diminuer principalement la tension de surface apicale γ_a par rapports aux autres tensions de surface. L'activité des myosines-II influe aussi sur la contractilité de la ceinture d'actine qui relie les jonctions adhérentes, ce qui peut diminuer la tension de ligne apicale Λ_a .

Comme pour les cas sans blebbistatine, le modèle n'utilisant que des énergies de surface ne permet pas du tout de rendre compte des mesures de Δh^i . On ne l'a pas représenté sur la figure 4.7. De même, le modèle incluant un terme de confinement n'a pas donné de résultat comme dans les cas précédents.

Le modèle utilisant les énergies de surface et la tension de ligne apicale permet le mieux de rendre compte des mesures de Δh^i . Pour les MDCK EcadGFP, l'ajout de blebbistatine à 5 μM donne une tension de ligne apicale réduite $\Lambda = 6.5 \mu\text{m}$ soit 6% de plus que sans ajout de blebbistatine. Cet ajustement est donné par la courbe rouge de la figure 4.7a et donne

$\gamma = -0.83$. L'influence de la blebbistatine sur le paramètre Λ semble peu significative. Cela peut s'expliquer par le fait que l'ajout de blebbistatine à cette concentration n'influe que très peu sur l'activité des myosines-II pour les MDCK. Ce choix de concentration a été fait car il a été mesuré que, pour les myoblastes, l'ajout de blebbistatine à $5\ \mu\text{M}$ diminue de 50% la contractilité [62]. Il est donc possible que cette mesure ne soit pas valide pour les MDCK. Cela est cependant peu probable car l'activité des myosines-II a été mesurée in-vitro à différentes concentrations en blebbistatine et la demi-activité est atteinte pour une concentration entre $1\ \mu\text{M}$ et $2\ \mu\text{M}$ [86]. Une autre explication possible est que l'ajout de blebbistatine a modifié les énergies de surfaces et la tension de ligne apicale en conservant les rapports $\gamma = \frac{\gamma_a + \gamma_b}{\gamma_{cc}}$ et $\Lambda = \frac{\Lambda_a}{\gamma_{cc}}$ proches de leurs valeurs sans ajout de blebbistatine.

L'ajout de blebbistatine sur les MDCK WT a modifié la dépendance de Δh^i avec la courbure du substrat de telle sorte qu'il n'est plus possible de reproduire très fidèlement cette tendance à l'aide du modèle comportant une tension de ligne apicale. Le meilleur ajustement, plus grossier cette fois, est avec $\Lambda = 6.75\ \mu\text{m}$, la même valeur que dans le cas sans ajout de blebbistatine.

On peut cependant ajuster les points expérimentaux par le modèle pour les plus faibles courbures $\frac{1}{R} < 0.04\ \mu\text{m}^{-1}$. On obtient alors la courbe violette de la figure 4.7b et une tension de ligne réduite $\Lambda = 7.4\ \mu\text{m}$. Il s'agit alors d'un ajustement qui ne rend pas compte de la saturation de la différence de hauteur relative avec la courbure.

Cette saturation peut s'expliquer par le fait que, à partir d'une certaine courbure, les cellules peuvent être tellement déformées que le noyau contribue significativement à la forme de la cellule. Cet effet du noyau dépend a priori de la taille du noyau dans la cellule, c'est-à-dire que si le noyau occupe une part importante du volume cellulaire, une petite déformation de la cellule suffira à déformer le noyau, tandis que si le noyau prend peu de place, la cellule peut se déformer sans déformer son noyau. Dans le cas des MDCK, le noyau semble prendre une part importante du volume cellulaire, comme on le voit sur les images de microscopie des figures 4.2 et 4.3. De plus, le rapport d'aspect des cellules doit jouer un rôle dans cette contribution du noyau puisque si les cellules sont colonnaires (plus hautes que larges), elles pourront se comprimer le long de leur axe apico-basal sans déformer le noyau. A l'inverse, si une cellule est pavimenteuse (plus large que haute), elle pourra se comprimer dans le plan de l'épithélium sans déformer son noyau. Les MDCK que l'on observe sont plutôt cuboïdales, mais légèrement plus larges que hautes. Cela indique donc qu'une compression dans l'axe apico-basal a plus de chance de faire déformer le noyau qu'une compression dans le plan de l'épithélium. Ainsi, on peut supposer que les cellules sur les crêtes, qui sont aplaties par la courbure négative de la crête, voient la compressibilité du noyau entrer en jeu à partir d'une certaine courbure. Il serait donc très

profitable de dériver un modèle cellulaire comportant, en plus des tensions de surface et de la tension de ligne apicale, une contribution de la déformation du noyau. Ajouter une hétérogénéité (le noyau) à l'intérieur de la cellule dans le modèle peut être compliqué et fait de plusieurs manières différentes, selon les conditions aux limites que l'on impose entre le noyau et le reste de la cellule, mais serait une future direction intéressante. Par ailleurs, on verra dans le paragraphe 4.3.4 que cette hypothèse de la déformation des noyaux sur les crêtes à grande courbure est cohérente avec une autre observation : celle de l'évitement des crêtes par les cellules.

Il est aussi possible que, même si le modèle a les bons ingrédients physiques, il ne puisse pas prédire la saturation de la différence de hauteur relative en fonction de la courbure car le rayon de courbure du substrat devient du même ordre de grandeur que la taille des cellules. Or on a fait l'hypothèse de calcul opposée, à savoir que la taille des cellules était petite devant le rayon de courbure du substrat. Il s'agirait alors simplement d'étendre le modèle aux courbures plus grandes. On discutera plus en détail des limites du modèle par rapport aux plus grandes courbures dans le paragraphe 4.3.3.

Sur le tableau ci-dessous on voit, en résumé, les paramètres mesurés en l'absence de courbure (H_0 et $S_{1/2}$) pour chaque condition. On a reporté également les valeurs des paramètres obtenus suite à l'ajustement des points expérimentaux par le modèle comportant une tension de ligne apicale et des énergies de surfaces apicale, basale et intercellulaire.

	WT - 0 μM	WT - 5 μM	EcadGFP - 0 μM	EcadGFP - 5 μM
$H_0(\mu\text{m})$	5.1	5.6	6.0	5.6
$S_{1/2}(\mu\text{m}^2)$	80	81	79	77
$\Lambda(\mu\text{m})$	6.75	7.4	6.1	6.5
γ	-0.94	-1.03	-0.69	-0.83

On voit que le facteur γ prédit par le modèle est toujours négatif et compris entre -1.5 et -0.5. Cela indique, comme on l'a écrit précédemment, que γ_b est négatif mais aussi que, à chaque fois, le modèle prédit des énergies de surfaces qui sont toutes du même ordre de grandeur. L'ajustement des données expérimentales par le modèle ne permet pas de conclure que l'une des énergies de surface est négligeable, il faut donc toutes les prendre en compte a priori.

On note également que les tensions de ligne sont toutes autour de la même valeur $\Lambda \sim 6.5 \mu\text{m}$, quelle que soit la lignée cellulaire ou l'ajout de blebbistatine. Cela peut suggérer une régulation forte de ce paramètre par les MDCK. La comparaison faite dans les paragraphes précédents vaut donc pour toutes ces conditions : $\Lambda \sim 6.5 \mu\text{m}$ se situe entre ce qui a été mesuré par manipulation laser directe [32] ($\Lambda \sim 1 \mu\text{m}$) et par ablation laser [84] ($\Lambda \sim 10 - 100 \mu\text{m}$), ces deux mesures étant faites sur l'embryon de drosophile. L'interprétation du paramètre Λ nécessite d'avoir un modèle faisant le lien entre la tension

de ligne apicale Λ_a et la tension de surface intercellulaire γ_{cc} . On exposera plus en détail un tel modèle dans le chapitre suivant, notamment au paragraphe 5.2.2. En bref, il s'agit de faire une équivalence entre la tension de ligne apicale Λ_a et une tension de surface qui serait anisotrope au niveau des jonctions adhérentes de la cellule. On peut ainsi avoir la relation suivante, en supposant que la ceinture d'actine qui relie les jonctions adhérentes a une épaisseur de l'ordre de $e = 1 \mu\text{m}$,

$$\Lambda = e \frac{\gamma_{cc}^{xy} - \gamma_{cc}^z}{\gamma_{cc}^z}$$

où γ_{cc}^{xy} est la tension de surface intercellulaire, au niveau de la ceinture d'actine apicale, dans le plan de l'épithélium et γ_{cc}^z est la tension de surface intercellulaire dans la direction apico-basale. On obtient alors une estimation du degré d'anisotropie de la tension de surface intercellulaire au niveau de la ceinture d'actine.

$$\frac{\Lambda}{e} = \frac{\gamma_{cc}^{xy} - \gamma_{cc}^z}{\gamma_{cc}^z} \sim 6.5$$

On discutera de cette estimation, obtenue par ailleurs par inférence de force, dans le chapitre 5.2.2.

4.3.3 Le profil d'énergie

Pour obtenir la forme des cellules prédite par les modèles que l'on a testés ici, on minimise l'énergie des cellules en fonction d'un paramètre de forme qui peut être indifféremment la hauteur ou la surface à mi-hauteur. On minimise ici l'énergie de la cellule en fonction de sa surface à mi-hauteur mais le résultat est exactement le même avec la hauteur des cellules, étant donné notre hypothèse donnant $H = \frac{V_0}{S_{1/2}}$. On a tracé l'énergie de la cellule, ou plutôt $\frac{E_c}{\gamma_{cc}}$ qui est la quantité que l'on minimise en pratique, en fonction de $S_{1/2}$, la surface à mi-hauteur, pour différentes courbures. Pour cela, on a utilisé l'expression de l'énergie que l'on a obtenue avec le modèle comportant des tensions de surface et une tension de ligne apicale soit :

$$\frac{E_c}{\alpha\gamma_{cc}} = -\frac{\alpha^2}{32\pi^2} \left(1 - \frac{\alpha^2}{16\pi}\right) z'' S_{1/2}^{3/2} + \frac{1}{\alpha} \frac{\gamma_a + \gamma_b}{\gamma_{cc}} S_{1/2} + \frac{V}{2\sqrt{S_{1/2}}} \left(1 - \frac{1}{2} \frac{\Lambda_a}{\gamma_{cc}} z''\right) + \frac{\Lambda_a}{\gamma_{cc}} \sqrt{S_{1/2}}$$

On trace en figure 4.8 le profil de l'énergie utilisant les paramètres correspondant aux MDCK EcadGFP, les autres jeux de paramètres donnant les mêmes tendances. Les minimums locaux d'énergie que l'on voit sur ces courbes correspondent bien aux résultats que l'on a présentés jusqu'à présent. En effet, on voit qualitativement que le minimum d'énergie est atteint pour des valeurs de $S_{1/2}$ plus grandes pour les cellules sur des crêtes

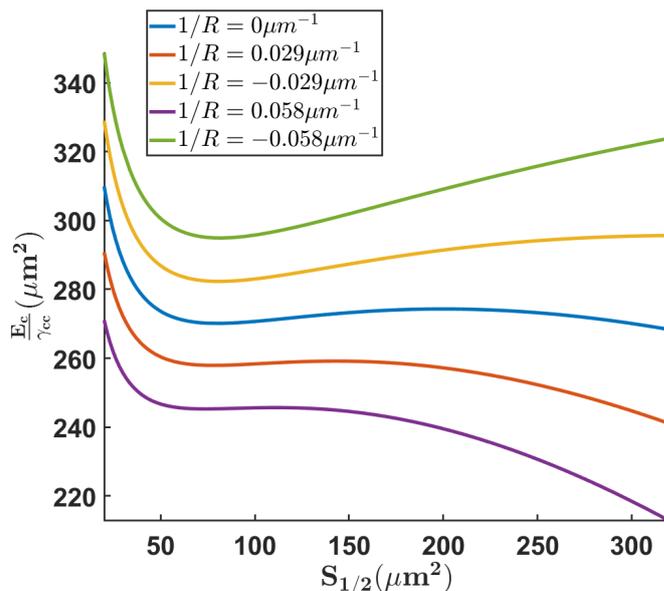


FIGURE 4.8 – Profil de l'énergie de la cellule que l'on minimise : $\frac{E_c}{\gamma_{cc}}$ en fonction de $S_{1/2}$ pour les MDCK EcadGFP et à différentes courbures $1/R$. Les courbures négatives correspondent aux cellules sur les crêtes tandis que les courbures positives correspondent aux cellules dans les creux. La seule courbe qui ne tend pas vers $-\infty$ pour $S_{1/2} \rightarrow +\infty$ est la courbe verte, soit le cas d'une cellule sur une crête très courbée.

($1/R < 0$) que sur des creux ($1/R > 0$).

Une observation importante est que, dans la plupart des cas, le minimum d'énergie est un minimum local et non global. En effet, seule l'énergie de la cellule à la courbure $1/R = 0.058 \mu\text{m}^{-1}$, la courbe verte sur la figure 4.8, tend vers $+\infty$ quand $S_{1/2} \rightarrow +\infty$. Pour les autres courbures, on a $\lim_{S_{1/2} \rightarrow +\infty} \frac{E_c}{\gamma_{cc}} = -\infty$. On rappelle que $S_{1/2} \rightarrow +\infty$ correspond à une cellule totalement plate, de hauteur nulle.

Comme on l'a écrit dans le chapitre 3, le modèle cellulaire que l'on utilise ici se place dans l'approximation de cellules petites devant le rayon de courbure du substrat. Plus précisément, on a supposé $\frac{\alpha}{2\pi} \sqrt{S_{1/2}} \ll \frac{2\pi^2}{4} R$. Le modèle n'est donc pas censé pouvoir calculer correctement l'énergie de la cellule pour les grandes valeurs de $S_{1/2}$. Ainsi, le minimum global donné par le modèle pour $S_{1/2} \rightarrow +\infty$ n'invalide pas le modèle puisque les grandes valeurs de $S_{1/2}$ sont en dehors de son domaine de validité. Il serait cependant intéressant d'évaluer la forme de l'énergie prédite si on prend en compte les termes non-linéaires en $\sqrt{S_{1/2}} \frac{A}{\lambda^2}$ pour s'assurer qu'elle ne donne pas un équilibre pour des cellules de hauteur nulle.

Une autre observation que l'on peut faire concerne la stabilité des solutions obtenues. En effet, dans certains cas on peut voir que le minimum local d'énergie qui nous permet de prédire la forme de la cellule à l'équilibre n'est pas profond, c'est-à-dire que la différence d'énergie entre le minimum d'énergie et le maximum le plus proche n'est pas très grande.

Cela est notamment vrai pour les cellules qui sont dans des creux très courbés (courbe violette sur la figure 4.8). On a tracé en figure 4.9 un zoom sur le profil de l'énergie de cette courbe, obtenue pour $1/R = 0.058 \mu\text{m}^{-1}$. On voit que, dans ce cas, le niveau d'énergie du

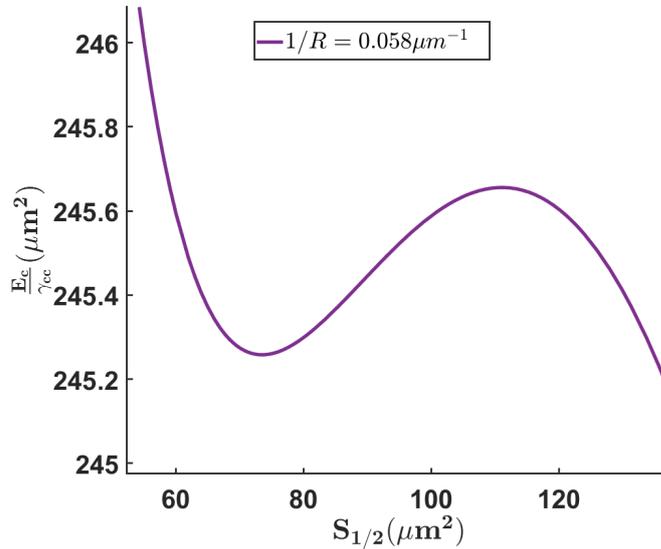


FIGURE 4.9 – Profil de l'énergie de la cellule que l'on minimise : $\frac{E_c}{\gamma_{cc}}$ en fonction de $S_{1/2}$ pour les MDCK EcadGFP dans un creux et à une grande courbure : $1/R = 0.058 \mu\text{m}^{-1}$. Il s'agit d'un zoom autour du minimum d'énergie de la courbe violette de la figure 4.8.

point stable est très proche de celui du maximum d'énergie le plus proche. L'écart entre les deux est de $\Delta \frac{E_c}{\gamma_{cc}} = 0.5 \mu\text{m}^2$ ce qui est beaucoup plus faible que pour les cellules qui sont à des courbures moins importantes. Le point qui fragilise le plus ce modèle comportant des énergies de surface et une tension de ligne apicale est que la surface à mi-hauteur $S_{1/2}$ du maximum d'énergie n'est pas aussi grande que pour les autres courbures. Notre modèle devrait pouvoir rendre compte correctement du profil de l'énergie jusqu'à cette valeur $S_{1/2} \sim 120 \mu\text{m}^2$. L'argument, exposé au paragraphe précédent, selon lequel les grandes valeurs de $S_{1/2}$ ne sont plus dans le domaine de validité du modèle et ne doivent donc pas être pris en compte, n'est plus vraiment acceptable ici. De plus, à partir d'une certaine courbure, il n'y a même plus de minimum local de l'énergie et le modèle ne converge plus. Cela arrive dès $\frac{1}{R} = 0.1 \mu\text{m}$ soit à une valeur pas très éloignée du domaine dans lequel on obtient des résultats expérimentaux ($\frac{1}{R} < 0.07 \mu\text{m}$).

Ces considérations à propos du profil de l'énergie de la cellule n'invalident pas le modèle mais sont de nature à en fixer les limites. Et ici on voit que les limites de ce modèle sont très proches du domaine que l'on explore par nos expériences. Il serait donc intéressant d'étudier l'influence des approximations faites dans ce modèle cellulaire en les relaxant et ainsi voir si ses prédictions sont toujours les mêmes.

4.3.4 Répartition des noyaux cellulaires

Dans la section précédente, on a analysé la forme de l'énergie de la cellule en fonction de la surface à mi-hauteur $S_{1/2}$ afin de montrer certaines limites au modèle cellulaire d'énergies de surfaces et tension de ligne apicale. On peut aussi s'intéresser à l'évolution de l'énergie de la cellule, cette fois en fonction de la courbure du substrat. On en a déjà eu un aperçu en regardant les différentes courbes tracées en figure 4.8 : l'énergie diminue globalement lorsque la courbure augmente, c'est à dire que les cellules ont un avantage énergétique net à être positionné dans un creux plutôt que sur une crête. Pour avoir une meilleure idée de cette évolution, on trace en figure 4.10 le niveau d'énergie du minimum de la cellule en fonction de la courbure. Cette courbe est obtenue avec les paramètres du

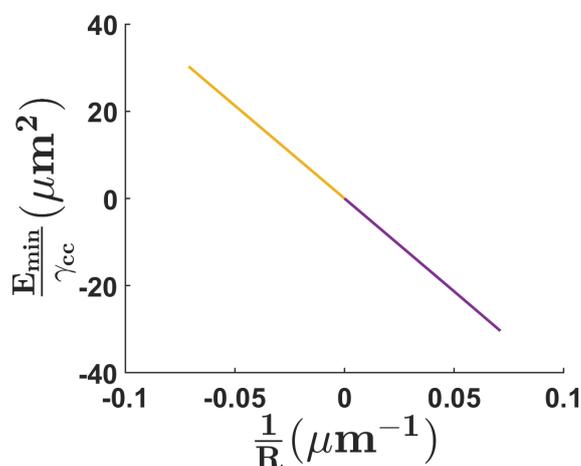


FIGURE 4.10 – Énergie de la cellule à l'équilibre $\frac{E_{min}}{\gamma_{cc}}$ en fonction de la courbure $\frac{1}{R}$ du substrat. La partie jaune de la courbe correspond aux courbures négatives soit les cellules sur les crêtes tandis que la partie violette de la courbe correspond au cas des cellules dans les creux.

modèle qui correspondent aux MDCK EcadGFP mais les mêmes conclusions pourront être tirées avec les autres jeux de paramètres utilisés.

L'énergie de la cellule à l'équilibre, c'est-à-dire à la forme qui minimise l'énergie, décroît linéairement avec la courbure. Pour les courbures les plus importantes ($\frac{1}{R} = 0.07 \mu\text{m}^{-1}$), on mesure une différence d'énergie entre crête et creux de l'ordre de $\Delta \frac{E_{min}}{\gamma_{cc}} = 60 \mu\text{m}^2$. On avait évoqué dans le paragraphe 4.1.1 le fait qu'on a mesuré la hauteur de plus de cellules dans des creux que sur des crêtes, avec 50 noyaux qui sont au milieu d'une crête et 59 noyaux qui sont dans un creux sur un champ complet de microscopie en moyenne. Il nous manque quelques données pour avoir une mesure plus fine de ce phénomène aux différentes courbures et on se contentera ici d'une estimation moyenne.

Cette différence de répartition peut s'expliquer en partie par le fait que les cellules dans les creux sont en moyenne plus hautes et donc moins larges. Ainsi, sur une longueur

donnée le long d'un creux, il y aura plus de cellules que le long d'une crête. Cette différence de forme des cellules entre creux et crête est indépendante du fait qu'il est plus favorable énergétiquement pour les cellules d'être dans un creux, mais dépend plutôt du fait qu'il est plus favorable énergétiquement pour une cellule dans un creux d'être plus haute qu'une cellule sur une crête.

Du point de vue de l'observation, la différence d'énergie entre creux et crête que l'on met en évidence sur la figure 4.10 se manifeste par l'agencement des cellules aux voisinages de ces zones de courbures maximales. En effet, les cellules sur les crêtes vont avoir tendance à se positionner de façon à avoir leur jonction intercellulaire au sommet de la crête et ainsi avoir le milieu de la cellule à une position légèrement décalée et donc à une courbure plus faible (en valeur absolue). On voit un exemple caractéristique de ce positionnement sur la figure 4.11. Il ne s'agit ici que d'un exemple mais ce phénomène est très marqué sur tous

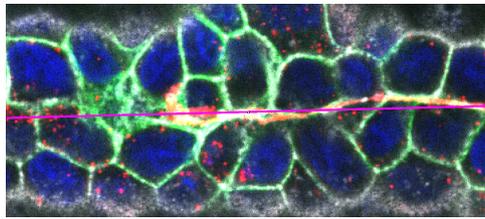


FIGURE 4.11 – Évitement des crêtes par les cellules. La ligne magenta correspond à la position d'une crête. On voit que les jonctions intercellulaires (en vert) sont positionnées le long de la ligne de crête du substrat.

les substrats ayant une forte courbure. Cet évitement des crêtes par les cellules s'explique donc qualitativement bien par le modèle cellulaire que l'on a présenté.

Il serait donc intéressant d'avoir une quantification précise de la répartition des cellules sur les crêtes ou dans les creux en fonction de la courbure, et analyser ensuite la part qui est expliquée par la forme des cellules et la part qui est expliquée par le positionnement des cellules au voisinage des crêtes et des creux.

Comme on l'a discuté au paragraphe 4.3.2, la déformation des noyaux aux fortes courbures pourraient également être importante. Cette contribution aurait aussi comme effet attendu de faire décaler le noyau des cellules sur les crêtes comme on le voit sur la figure 4.11. Après raffinement du modèle pour prendre en compte la déformation des noyaux, on pourrait aussi analyser l'évitement des crêtes par les noyaux par cette contribution.

4.3.5 Test de la modélisation continue

La modélisation que l'on a testée jusqu'à présent était une modélisation cellulaire de la forme des cellules, c'est à dire qu'elle cherche la forme optimale d'une cellule donnée sur un substrat d'une courbure donnée. On peut aussi obtenir la forme de l'épithélium via

une modélisation continue qui nous donnera accès aussi à l'épaisseur de l'épithélium dans les creux et sur les crêtes du substrat. On a développé une telle modélisation continue, assimilant l'épithélium à un film liquide mince, dans le chapitre 3.3. Lorsqu'un film mince liquide est posé sur un substrat rugueux, sa surface libre adopte une forme intermédiaire entre la forme du substrat et une forme plane. Pour ce calcul, la tension de surface du liquide tend à l'aplanir et les interactions de van der Waals tendent à conserver une épaisseur de film homogène, soit une forme qui suit le substrat [78] [79]. La forme du film liquide dépend alors des longueurs d'ondes des rugosités. Dans notre cas, le substrat est à profil sinusoïdal donc il n'a qu'une longueur d'onde ce qui rend le calcul plus commode. On peut alors comparer la longueur d'onde du substrat à une longueur caractéristique, appelée longueur de cicatrisation et notée ξ_e .

On a adapté ce calcul au cas d'un épithélium, où la tension de surface du liquide est remplacée par la tension de surface apicale des cellules tandis que les interactions de van der Waals sont remplacées par la contribution des énergies de surfaces intercellulaires, ce dont on discute plus en détail dans le chapitre 3.3. On obtient alors la longueur de cicatrisation en fonction des caractéristiques de l'épithélium :

$$\xi_e = \left(\frac{4}{3} \frac{\gamma_a}{\alpha \gamma_{cc}} \sqrt{V H_0} \right)^{1/2}$$

où H_0 est l'épaisseur de l'épithélium en l'absence de courbure.

On peut ainsi estimer la longueur de cicatrisation car on connaît le volume des cellules V et H_0 , mais on n'a pas accès directement à $\frac{\gamma_a}{\gamma_{cc}}$. On devra donc se contenter ici d'une estimation en ordre de grandeur pour laquelle on suppose que $\gamma_a > \gamma_{cc}$ mais que ces deux énergies de surface sont du même ordre de grandeur. On va prendre $\frac{\gamma_a}{\gamma_{cc}} \sim 2$ qui doit être vrai en ordre de grandeur. On prend ensuite des valeurs moyennes pour les autres paramètres, $\alpha = 4$, $H_0 = 5.5 \mu\text{m}$ et $V = 440 \mu\text{m}^3$, et on obtient la longueur de cicatrisation de l'épithélium :

$$\xi_e \sim 5.7 \mu\text{m}$$

Cette longueur est très petite devant les longueurs d'onde utilisées. Le modèle prédit donc que, qualitativement, on devrait obtenir un épithélium plat qui est très épais dans les creux et très fin sur les crêtes. Ce n'est pas ce que l'on observe.

On peut aller plus loin et faire des prédictions plus quantitatives grâce à la relation obtenue au paragraphe 3.3 :

$$H_{creux} - H_{crête} = \frac{A}{1 + \left(\frac{1}{2\pi} \frac{\lambda}{\xi_e} \right)^2}$$

où H_{creux} et $H_{crête}$ sont les hauteurs de l'épithélium respectivement dans un creux et sur les crêtes.

On trace en figure 4.12

$$\frac{A}{H_{creux} - H_{crête}} - 1 = f\left(\left(\frac{\lambda}{2\pi}\right)^2\right)$$

qui devrait donner une droite de pente $1/\xi_e^2$. Il y a beaucoup de points ayant des valeurs

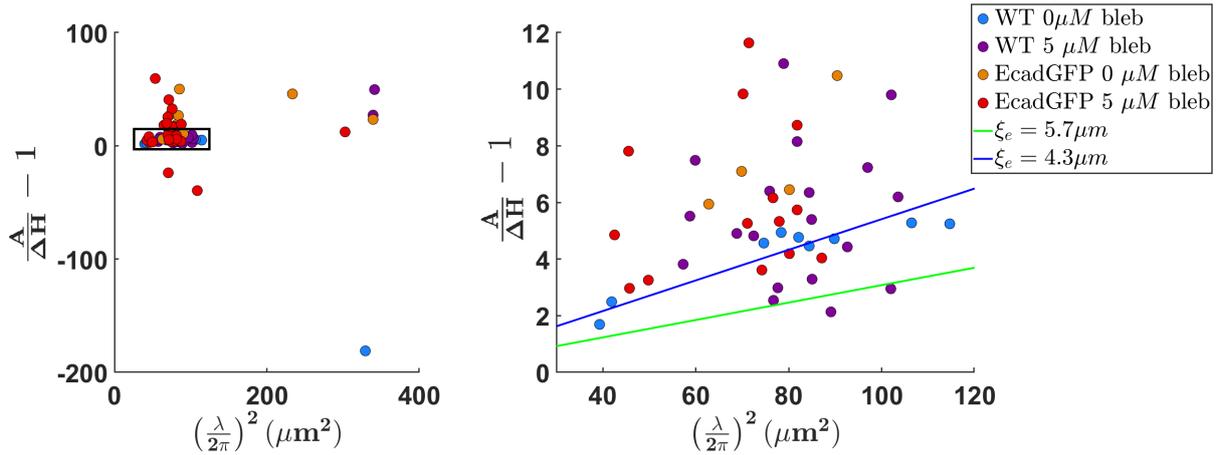


FIGURE 4.12 – Test du modèle continu assimilant l'épithélium à un film liquide mince. A gauche, on voit l'ensemble des points expérimentaux issus des mêmes expériences que ceux avec lesquels le modèle cellulaire a été testé. A droite, on prend uniquement la zone encadrée en noir du graphique de gauche. Les courbes en vert et bleu sont les prédictions du modèle.

extrêmes ce qui rend ces mesures difficiles à lire comme on le voit sur le graphique de gauche de la figure 4.12. On ne souhaite pas utiliser d'échelle logarithmique pour avoir une meilleure idée de la répartition de ces mesures car on veut pouvoir tester visuellement leur répartition selon une droite, étant donné qu'il s'agit de la prédiction du modèle. On a une meilleure vision des mesures obtenues sur le graphe de droite de la figure 4.12 en ne prenant que la zone encadrée en noir du graphe de gauche. Les points y sont toujours très dispersés et ne sont pas répartis sur la droite correspondant à $\xi_e \sim 5.7 \mu\text{m}$ (en vert sur la figure 4.12). Même si l'on voulait trouver une autre valeur pour ξ_e qui ajuste bien les données expérimentales, ça ne serait pas possible pour toutes les conditions explorées. On note cependant un accord relativement bon entre la prédiction du modèle à $\xi_e \sim 4.3 \mu\text{m}$ et les mesures effectuées sur les MDCK WT sans ajout de blebbistatine (points en bleu et droite bleue sur la figure 4.12). Cependant, on ne peut pas considérer cela comme satisfaisant car les autres jeux de données ne sont pas du tout répartis sur une droite. De plus, on a dû exclure certaines données pour obtenir cet accord sans que l'on ait de raison objective de le faire, ce qui n'a pas été le cas lorsque l'on a testé le modèle cellulaire dans

les paragraphes précédents de ce chapitre.

Ainsi, cette approche continue de modélisation d'un épithélium ne semble pas fructueuse. Cela pourrait venir des ingrédients physiques utilisés dans le modèle, qui sont moins nombreux que dans le modèle cellulaire que l'on a utilisé dans le reste de ce chapitre. Il ne comporte en effet pas de tension de ligne apicale par exemple.

On a également essayé de rendre compte des données expérimentales sur substrat courbé en utilisant une approche continue qui assimile cette fois l'épithélium à un solide élastique avec une tension de surface. Cette approche n'a pas semblé fructueuse non plus et cela indique que le problème vient plutôt du fait d'avoir une modélisation continue plutôt que cellulaire pour décrire la forme des cellules.

4.3.6 Ponts épithéliaux

Comme mentionné plus haut dans le paragraphe 4.3.1, on voit qu'il y a très peu d'échantillons mesurés pour la concentration de 50 μM en blebbistatine : 2 pour les MDCK EcadGFP et 1 pour les MDCK WT. Cela est dû au fait que dans la plupart des échantillons ayant subi ce niveau de concentration en blebbistatine l'épithélium s'est partiellement décollé, formant des dômes sur substrats plats et des ponts sur substrats courbés comme on le voit sur la figure 4.13. Ces dômes de cellules épithéliales semblent être issus du pompage de fluide à travers l'épithélium et ont fait l'objet de plusieurs études à la fin des années 1970 [87] [88] [89]. Plus récemment, des dômes de taille contrôlée ont pu être réalisés en créant des zones circulaires peu adhérentes pour les cellules [90]. Sur les substrats à profil sinusoïdal, ces décollements se sont produits dans les creux comme on le voit dans la figure 4.13. Il semble donc que la courbure du substrat peut être utile pour former des

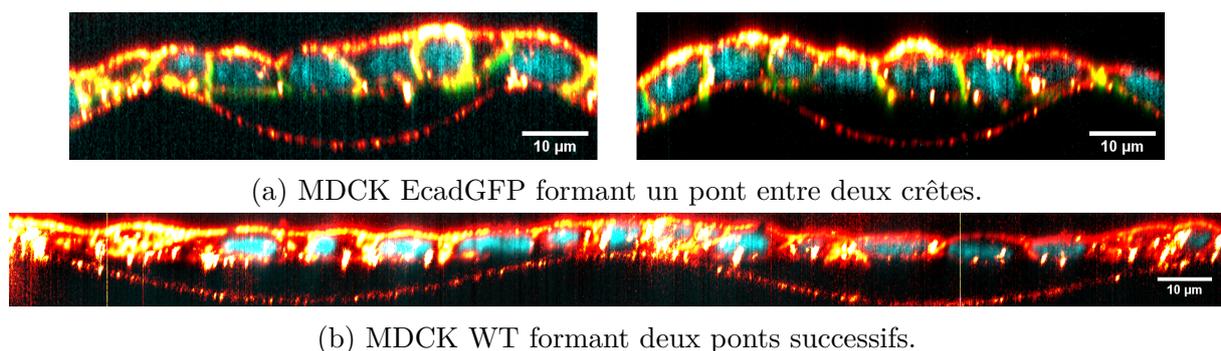


FIGURE 4.13 – Ponts formés entre des crêtes par les MDCK après traitements à la blebbistatine à 50 μM . On voit le noyau en cyan, la F-actin en nuance de rouge-jaune et la fibronectine du substrat en nuance de rouge-jaune également.

décollements de façon contrôlée.

En raisonnant avec les éléments du modèle que l'on utilise ici, on voit que la formation

d'un pont entre deux crêtes peut être favorable du point de vue énergétique, sans nécessité d'un pompage de fluide, puisque cela diminue la surface de toutes les interfaces et ainsi diminue les énergies de surface de l'ensemble. Le fait que ce décollement soit favorable énergétiquement nécessite toutefois d'avoir $\gamma_a + \gamma_b > 0$, ce qui n'a pas été le cas sur nos échantillons sans blebbistatine ou à $5 \mu\text{M}$ de blebbistatine. De plus, il ne semble pas y avoir de surpression du fluide sous les ponts épithéliaux puisqu'ils ne sont pas courbés, contrairement aux dômes observés sur substrats plats [90].

On peut analyser de façon plus quantitative les ponts formés, par exemple ceux en figure 4.13a. On mesure que la longueur de l'arc de substrat duquel s'est détaché l'épithélium est environ 12% plus grande que la longueur du pont formé. Ainsi, pour que le décollement de l'épithélium soit favorable énergétiquement en ne considérant que les énergies de surfaces apicale et basale (soit en supposant que la quantité de surface intercellulaire et la longueur totale de périmètre de faces apicales ne changent pas avec le décollement), il faut que

$$\frac{l_s}{l_p}(\gamma_b + \gamma_a) > \gamma_a + \gamma_b^{libre}$$

en notant γ_b^{libre} l'énergie de surface basale des cellules qui sont décollées et qui n'ont donc plus d'adhésion au substrat, l_s et l_p les longueurs respectives du substrat et du pont. On a ici mesuré $\frac{l_s}{l_p} = 1.12$ pour les ponts en figure 4.13a. En supposant que $\gamma_b = \gamma_b^{libre} - \alpha_b$, où α_b est une énergie d'adhérence cellule-substrat, définie positive, on a

$$\gamma_b + \gamma_a > 8\alpha_b$$

ce qui permet de comparer l'énergie d'adhérence cellule-substrat avec les énergies de surfaces apicale et basale. On a vu plus haut que le modèle prédit $\gamma_a + \gamma_b < 0$ pour les échantillons sans ajout ou à $5 \mu\text{M}$ de blebbistatine, ce qui rend la formation de dôme défavorable énergétiquement. Ainsi, l'absence de ponts pour les cas sans blebbistatine est cohérente avec cette prédiction du modèle. La grande concentration en blebbistatine de $50 \mu\text{M}$ change donc probablement les énergies de surface de façon à revenir à $\gamma_a + \gamma_b > 0$. Cela est également cohérent avec l'effet connu de la blebbistatine sur les adhésions focales qui a tendance à diminuer l'adhérence α_b et donc favoriser le décollement de l'épithélium.

Il serait intéressant de faire cette analyse sur un plus grand nombre de ponts épithéliaux formés ainsi, mais cela nécessite de les former de façon plus contrôlée. Il faudrait également pouvoir mesurer, de façon dynamique, si la formation de ces ponts change la taille des cellules ou si elles se réarrangent pour finalement garder la même taille (ce que l'on a supposé dans cette analyse préliminaire).

Inférence de force en 3D

*An expert is a person who has made
all the mistakes that can be made in a
very narrow field.*

Niels Bohr

Dans le chapitre précédent, on a étudié quelle pourrait être une expression satisfaisante de l'énergie de la cellule qui rend compte de sa forme sur un substrat plat ou courbé. Dans ce chapitre, on se propose de raisonner sur les forces mises en jeu plutôt que sur les énergies. Cette approche complémentaire nous permettra notamment de tester le modèle utilisant des tensions de surface.

Pour y parvenir, on a développé un algorithme d'inférence de force en 3D qui permet d'évaluer la cohérence interne d'une explication par des tensions de surface de la forme des cellules épithéliales. L'inférence de force telle qu'on l'a développée ici consiste à calculer l'équilibre mécanique à chaque point impliquant plus de deux interfaces dans l'épithélium.

L'idée d'utiliser l'inférence de force pour calculer les tensions de surfaces dans les épithéliums a été proposé dès 1982 [91]. Cette technique est devenue récemment plus opérante grâce aux progrès des techniques numériques d'analyse d'image notamment [92].

5.1 Mise en œuvre

Avant de présenter les résultats que l'on a obtenus grâce à cette technique, on va en détailler ici le principe algorithmique puis les techniques d'analyse d'image utilisées pour la mettre en œuvre.

5.1.1 Dans le plan de l'épithélium

On commence par le cas de l'inférence de force telle qu'elle est décrite dans [92], c'est-à-dire dans le plan de l'épithélium.

L'algorithme d'inférence de force

Pour expliquer l'algorithme d'inférence de force que l'on a développé, on va partir de l'exemple le plus réduit possible, c'est-à-dire un vertex tricellulaire, présenté en figure 5.1. On voit, à gauche sur la figure 5.1, un champ complet de MDCK vues au microscope

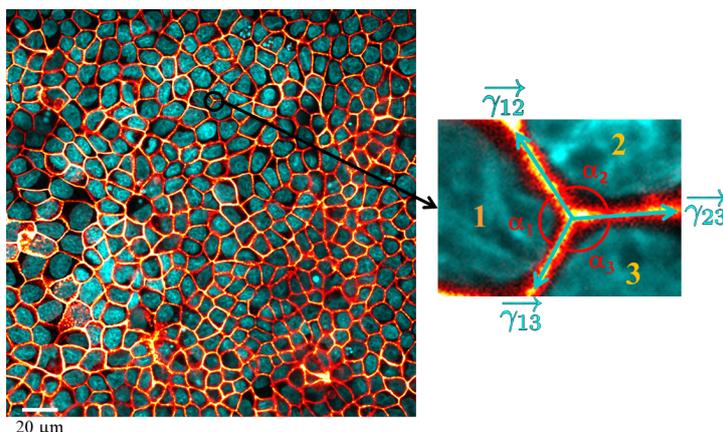


FIGURE 5.1 – À gauche, champ de vue de MDCK au microscope confocal sur substrat plat. À droite, zoom sur une jonction tricellulaire. L'inférence de force consiste ici à calculer l'équilibre mécanique au point de jonction entre les trois cellules.

confocal avec les noyaux en cyan et la F-actine en nuances de jaune-rouge. Sur la droite de la figure, on voit un zoom sur une jonction tricellulaire. Suivant le modèle qui considère que la forme de la cellule épithéliale est régie par les tensions de surface, on assigne une tension à chaque segment intercellulaire : $\vec{\gamma}_{12}$ entre la cellule n°1 et la cellule n°2, $\vec{\gamma}_{23}$ entre la cellule n°2 et la cellule n°3 et enfin $\vec{\gamma}_{13}$ entre la cellule n°1 et la cellule n°3. L'équilibre mécanique s'écrit alors $\vec{\gamma}_{12} + \vec{\gamma}_{13} + \vec{\gamma}_{23} = \vec{0}$ ou, de façon équivalente en prenant les grandeurs scalaires,

$$\begin{cases} \gamma_{12} \sin \alpha_1 = \gamma_{23} \sin \alpha_3 \\ \gamma_{13} \sin \alpha_1 = \gamma_{23} \sin \alpha_2 \end{cases}$$

où α_1 est l'angle mesuré entre les deux segments qui sont communs à la cellule n°1, c'est-à-dire l'angle entre $\vec{\gamma}_{12}$ et $\vec{\gamma}_{13}$, de même pour α_2 et α_3 avec, respectivement, les cellules n°2 et n°3.

On voit que ce système d'équations simple ne permet pas de calculer les tensions γ_{12} , γ_{13} et γ_{23} car il n'y a que 2 équations indépendantes pour 3 inconnues : le système est sous-déterminé.

Une hypothèse supplémentaire est donc nécessaire : la tension dans chaque segment est la même aux deux extrémités de ce segment. Ainsi, on pourra avoir des tensions qui apparaissent dans les systèmes d'équations de plusieurs vertex comme on l'illustre sur la figure 5.2. Dans ce cas à deux vertex, 4 cellules sont impliquées. Il y a 5 tensions

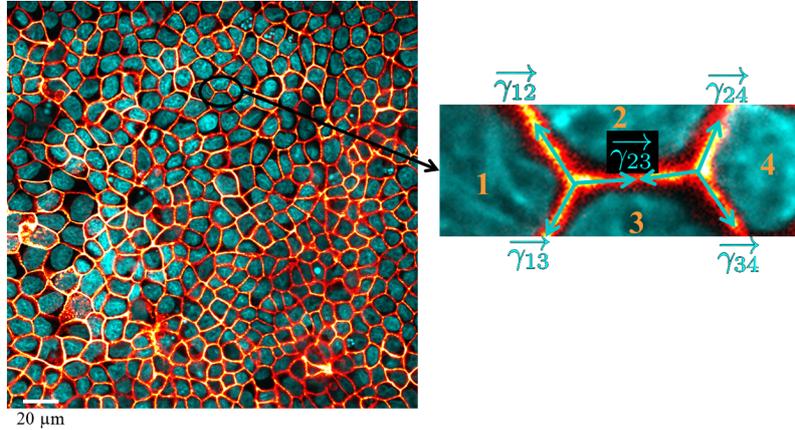


FIGURE 5.2 – À gauche, champ de vue de MDCK au microscope confocal sur substrat plat. À droite, zoom sur deux jonctions tricellulaires adjacentes.

inconnues : γ_{12} , γ_{13} , γ_{23} , γ_{24} et γ_{34} et l'équilibre mécanique pour les deux vertex s'écrit

$$\begin{cases} \vec{\gamma}_{12} + \vec{\gamma}_{13} + \vec{\gamma}_{23} = \vec{0} \\ \vec{\gamma}_{23} + \vec{\gamma}_{24} + \vec{\gamma}_{34} = \vec{0} \end{cases}$$

en employant les mêmes conventions d'écriture que dans le cas précédent à 1 vertex. On a alors 4 équations scalaires pour 5 inconnues. Le système est toujours sous-déterminé mais le rapport du nombre d'inconnues sur le nombre d'équations a augmenté : $2/3$ dans le cas à un vertex et $5/6$ dans ce cas à 2 vertex. Cela est dû au fait que la tension γ_{23} apparaît alors dans les équations vectorielles des deux vertex. En extrapolant à une infinité de vertex, on voit que chaque segment est entre deux jonctions tricellulaires et donc chaque tension se retrouve dans les systèmes d'équations de deux vertex distincts. Il faut donc compter les 3 tensions qui partent d'un vertex comme $3/2$ inconnues, sinon elles sont dénombrées deux fois. Ainsi, on a, pour une infinité de vertex, un système surdéterminé avec un rapport de 4 équations indépendantes pour 3 inconnues.

En pratique, on aura une surdétermination moins forte car la zone observée n'est pas infinie et donc certains segments aux bords ne seront concernés que par un seul vertex. Les vertex étant à la jonction de plus de 3 segments sont une autre source de réduction de la surdétermination du système. En effet, si par exemple 5 segments se rejoignent en un vertex, celui-ci ne donnera que 2 équations indépendantes pour $5/2$ inconnues (chaque segment donne $1/2$ inconnue car chaque inconnue est partagée entre deux vertex). Cette

sous-détermination devra être compensée par des vertex tricellulaires par ailleurs pour obtenir un système d'équations surdéterminé.

Pour le champ de microscope complet que l'on voit en figure 5.2, le système complet a 1364 équations indépendantes pour 1085 inconnues. Ce système est surdéterminé et on peut donc obtenir une valeur pour chaque tension de surface intercellulaire.

Ce système d'équations est linéaire et homogène car il n'y a pas de termes constants dans les équations, uniquement des termes linéaires en γ_{ij} . Ainsi, il existe une solution exacte à ce système qui est la solution triviale donnant la valeur nulle à toutes les tensions. Cette solution n'est pas intéressante et on va chercher une solution qui impose des valeurs non-nulles pour les tensions. Pour cela, il faut ajouter une équation de normalisation au système, qui fixe une valeur arbitraire à la moyenne des tensions. On peut choisir de fixer la moyenne arithmétique à 1 et alors cette équation sera tout simplement :

$$\sum \gamma_{ij} = N$$

avec N le nombre de tensions intercellulaires soit $N = 1085$ dans l'exemple que l'on prend en figure 5.2.

On peut aussi choisir de fixer la moyenne géométrique des tensions à 1 et alors cette équation de normalisation devient :

$$\prod \gamma_{ij} = 1$$

mais cette équation n'est pas commode à résoudre car elle n'est pas linéaire. Pour conserver la linéarité du système d'équations, on considère les log des tensions comme nouvelles variables et on a alors une équation de normalisation qui s'écrit

$$\sum \log \gamma_{ij} = 0$$

et les équations scalaires pour un vertex donnent :

$$\begin{cases} \log \gamma_{12} - \log \gamma_{23} = \log(\sin \alpha_3) - \log(\sin \alpha_1) \\ \log \gamma_{13} - \log \gamma_{23} = \log(\sin \alpha_2) - \log(\sin \alpha_1) \end{cases}$$

qui sont bien linéaires en $\log \gamma_{ij}$. Ce choix de normalisation de la moyenne géométrique des tensions n'est pas sans conséquences. Par rapport au cas normalisant la moyenne arithmétique, il a le désavantage de ne pas pouvoir traiter les vertex à plus de 3 segments car l'équation qui en est issue ne sera plus linéaire en $\log \gamma_{ij}$. Cependant, cette normalisation a l'avantage de défavoriser les solutions comportant des valeurs extrêmes de tensions ce qui rend la résolution globalement plus stable. Un autre effet de cette normalisation de la

moyenne géométrique est que les valeurs négatives de tensions deviennent interdites. Cela est plutôt un mauvais point car on pourrait ainsi passer à côté d'une tension qui serait effectivement négative, même si ça n'est pas généralement ce que l'on attend.

En pratique, on a testé les deux méthodes de normalisation, y compris en implémentant les cas de vertex à plus de 3 segments pour le système normalisant la moyenne arithmétique des tensions. Les résultats obtenus sont qualitativement les mêmes mais on peut observer des écarts assez importants entre les deux méthodes de normalisation dès qu'il y a beaucoup de vertex à plus de 3 segments, car ils ne peuvent pas être pris en compte si on normalise la moyenne géométrique des tensions, comme on le voit sur la figure 5.3. Finalement, on garde la normalisation de la moyenne arithmétique des tensions car la possibilité de gérer les vertex à plus de 3 segments peut avoir un assez grand impact.

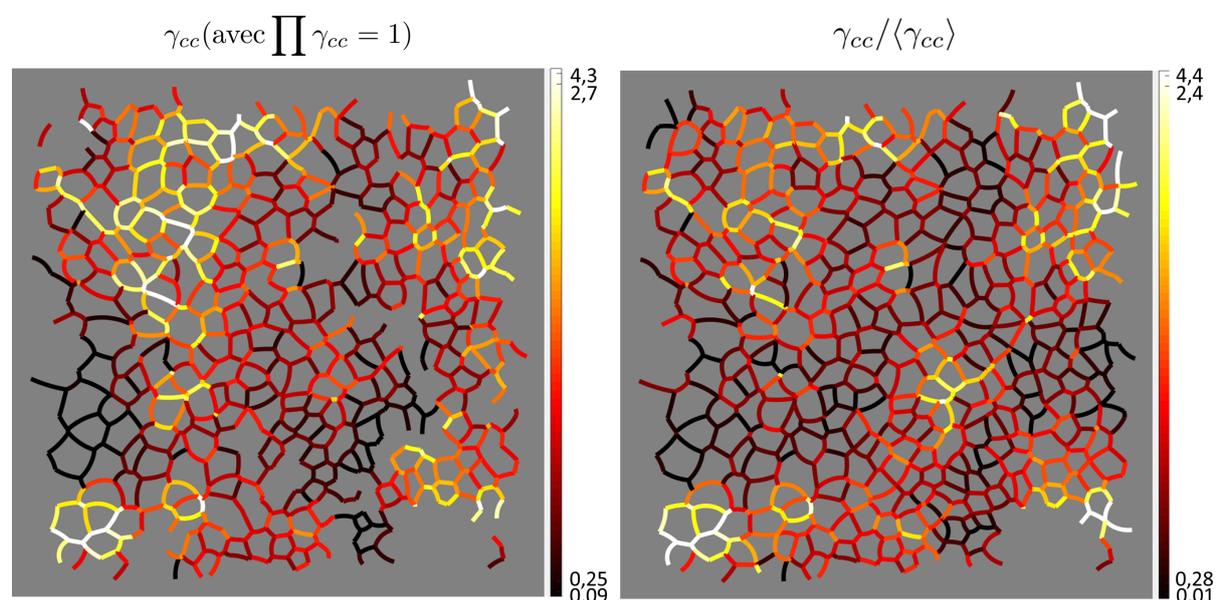


FIGURE 5.3 – Comparaison des deux méthodes de normalisation. À gauche, la carte des tensions intercellulaires obtenues par l'inférence de force qui normalise la moyenne géométrique des tensions. À droite, la méthode normalise la moyenne arithmétique des tensions. On voit que la normalisation de la moyenne géométrique laisse des trous dans l'image : il s'agit de segments dont la tension n'a pas pu être calculée car ils étaient mis en jeu dans des jonctions à plus de 3 segments.

Une fois que le système d'équations est écrit, il faut le résoudre. Étant donné qu'il s'agit d'un système linéaire, on peut le résoudre très simplement en inversant la matrice du système. Cette opération s'effectue directement avec la fonction *mldivide* de Matlab¹. La résolution de ce système ne peut pas être exacte cependant à cause de l'imprécision des mesures. Si les angles aux intersections étaient connus exactement, les équations

1. On trouvera la documentation pour cette fonction ici : <https://mathworks.com/help/matlab/ref/mldivide.html>

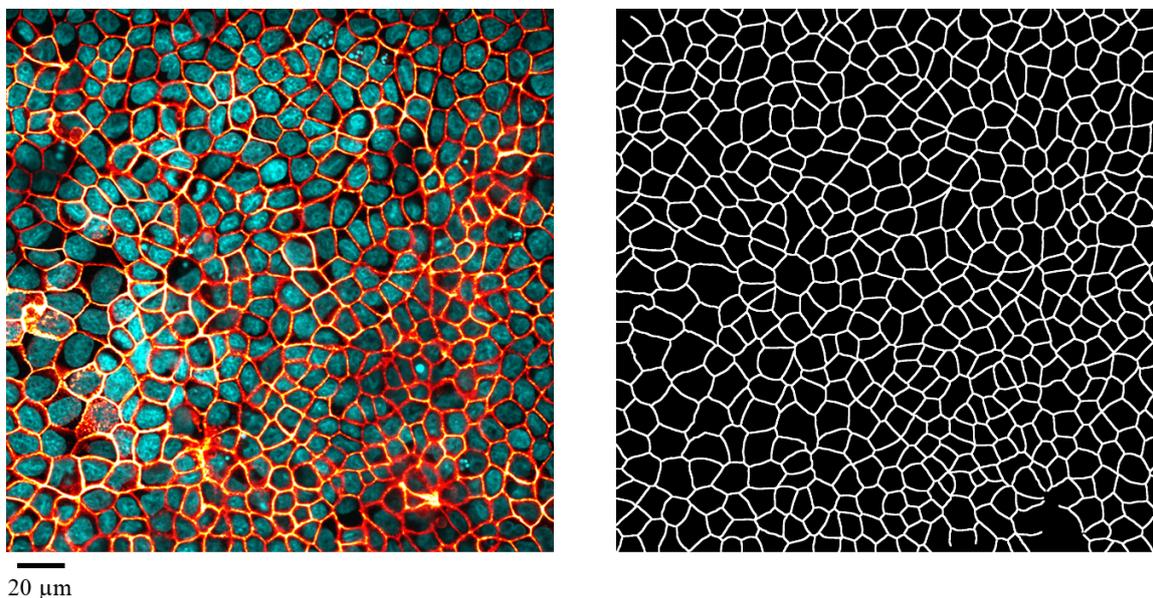
du système ne seraient pas indépendantes et on aurait une solution exacte. Pour trouver la meilleure solution, l'algorithme de résolution du système adopte une méthode des moindres carrés. Elle consiste à calculer l'ensemble des valeurs de γ_{ij} qui minimise la somme du carré des écarts aux solutions de chaque équation du système.

Maintenant qu'on a vu le principe de l'inférence de force et sa méthode de résolution, il faut pouvoir construire la matrice du système d'équations. Pour cela, on doit pouvoir associer correctement tous les éléments identifiés sur le champ de microscope de la figure 5.2 : les cellules, les segments intercellulaires et les vertex. Il faut aussi mesurer l'ensemble des angles α_i qui sont des paramètres de chaque équation du système, ce que l'on va voir maintenant.

L'analyse d'image associée

Pour mesurer correctement la forme des cellules, il faut d'abord segmenter leurs contours à partir des images obtenues au microscope. On a présenté en détail la procédure qu'on a utilisée pour y parvenir au paragraphe 2.3.2. En bref, on a segmenté les images des contours cellulaires obtenues au microscope de façon semi-automatique en utilisant principalement les outils de base de segmentation d'ImageJ.

On garde l'exemple donné en figure 5.1 pour présenter la segmentation obtenue sur la figure 5.4. La première condition pour réussir la segmentation est d'avoir des images de



(a) MDCK vue au microscope confocal.

(b) Segmentation du contour des cellules.

FIGURE 5.4 – En partant du signal pertinent pour délimiter le contour des cellules (ici la F-actine et la E-cadhérine) on obtient l'image segmentée de droite. On note qu'une petite zone en bas à droite de l'image segmentée est absente car le signal y est trop incertain.

microscopie de bonne qualité. Ici on obtient un signal pour le contour des cellules qui est très bon en combinant les images de la F-actine et de la E-cadhérine. Les canaux que l'on a utilisés pour la microscopie sont détaillés au paragraphe 2.1.2.

Les images obtenues au microscope confocal sont en 3D et cela donne le choix du plan sur lequel on réalisera la segmentation. En effet, tous les plans qui sont entre la face basale et la face apicale des cellules donnent une image de leurs contours. On choisit de ne prendre que les plans plus proches de la face apicale car les contours des cellules y sont mieux définis. Vers la face basale, les contours des cellules ne sont pas réguliers mais ont plutôt une forme ondulée et plus étalée, ce qui rend la segmentation très difficile comme on le voit sur la figure 5.5. De plus, on sait que la description par des tensions de surface

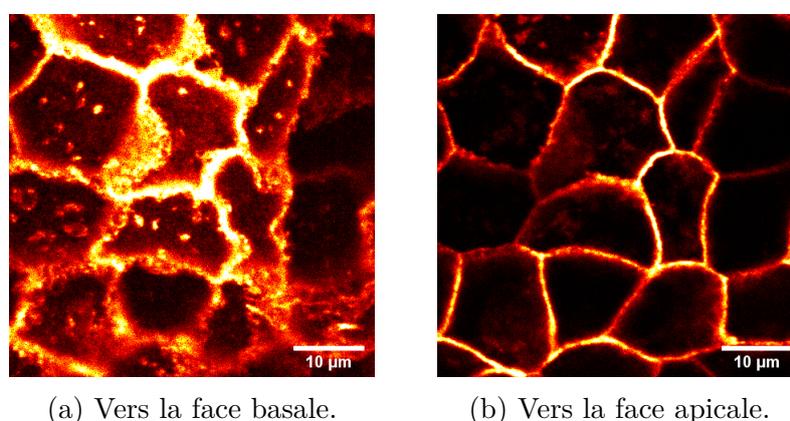


FIGURE 5.5 – Zoom sur une partie de l'échantillon de la figure 5.4, signal de E-cadhérine des MDCK sur substrat plat. Les deux images correspondent à la même zone, mais à des positions différentes le long de l'axe apico-basal. Proche de la face basale (à gauche), les jonctions intercellulaires sont moins bien définies que proche de la face apicale (à droite). On observe également des jonctions ondulées proches de la face basale.

de la forme de ces contours ne peut donner que des jonctions intercellulaires qui ont des courbures constantes. La forme des contours des cellules vers la face basale invalide ainsi cette description. Une autre raison pour laquelle il est nécessaire de restreindre l'analyse à une zone en particulier le long de l'axe apico-basal est que la forme des cellules change le long de cet axe. Cette forme ne change pas radicalement la forme globale de la cellule mais il peut y avoir des changements importants aux voisinages des jonctions tricellulaires. Étant donné que c'est la zone que l'on va analyser le plus en détail ici, il faut faire en sorte de mesurer la forme des cellules uniquement sur une zone restreinte vers leurs faces apicales. On précise que ces changements le long de l'axe apico-basal peuvent être si grands que les cellules n'ont pas les mêmes voisines dans les plans proches de leur face basale que dans les plans proches de leur face apicale. Ces changements de voisins le long de l'axe apico-basal ont fait l'objet d'une étude récente qui les analyse comme une façon pour un tissu épithélial de s'accommoder des environnements courbés dans lesquels il peut être

placé [93]. Ici on observe de nombreux changements de voisins le long de l'axe apico-basal alors que les épithéliums sont sur un substrat plat. Cette observation qualitative appelle une quantification de ces transitions topologiques le long de l'axe apico-basal, que ce soit sur les substrats plats ou sur les substrats courbés que l'on a utilisés pour le chapitre 4. On pourrait ainsi apporter un éclairage supplémentaire aux conclusions de [93] mais cela sera envisagé dans un travail futur.

Finalement, pour analyser le contour des cellules uniquement au niveau de la face apicale, on prend la moyenne du signal obtenu pour la E-cadhérine et la F-actine sur une épaisseur de 1 μm .

Cette segmentation est difficile car, pour faire de l'inférence de force, il faut éviter d'avoir des erreurs à cette étape. Parmi les erreurs de segmentation les plus courantes qu'il faut corriger, on peut citer les cellules coupées en deux par un segment imaginaire ou, au contraire, deux cellules qui fusionnent suite à la disparition d'un segment. Pour l'inférence de force, on a besoin d'avoir en plus des segments précisément obtenus au voisinage des jonctions tricellulaires. Il s'agit de s'assurer qu'une cellule n'a pas changé de voisin suite à l'étape de segmentation ou encore que les jonctions à plus de 3 cellules sont bien respectées car, dans ces cas-là, la segmentation donne souvent un segment de 1 ou 2 pixels de long qui s'intercale entre deux jonctions tricellulaires. Dans tous les cas où, sur l'image de microscopie, une intersection à 4 cellules est indiscernable de 2 intersections à 3 cellules adjacentes, on préférera avoir une segmentation qui donne une intersection à 4 cellules car la mesure précise de l'orientation d'un segment de 1 ou 2 pixel de long est impossible. Toutes ces vérifications doivent être faites visuellement, le plus rapide étant de superposer l'image d'origine avec l'image segmentée. On corrige alors à la main les imperfections de la segmentation.

Une fois cette segmentation effectuée, on peut réaliser tout le reste de façon automatique. Tout le traitement qu'on va dérouler ici est fait dans un programme MATLAB et comporte quelques outils d'ImageJ également. Il ne s'agira pas de détailler tous les éléments mais plutôt d'en expliciter les grandes étapes. D'abord il faut identifier les éléments d'intérêt de l'image segmentée : cellules, segments et intersections de segments. Une fois que tous ces éléments sont correctement répertoriés dans une liste, il faut les associer entre eux, c'est-à-dire qu'il faut avoir une liste identifiant l'ensemble des segments et intersections qui délimitent une cellule donnée.

La seconde étape d'analyse d'image consiste à mesurer tous les angles α_i aux intersections. Pour cette mesure, on a besoin d'une méthode qui dépend le moins possible de la pixellisation de l'image puisqu'il s'agit d'une des plus grandes sources d'erreurs une fois la segmentation effectuée. Pour cela, on réalise un ajustement de tous les segments intercellulaires par une portion de cercle. Cette méthode donne des résultats satisfaisants

dès lors que la courbure des segments intercellulaires ne varie pas trop le long d'un segment donné. Cette condition est, le plus souvent, très bien satisfaite comme on le voit sur l'exemple de la figure 5.6. Le plus important ici est que l'ajustement circulaire conserve

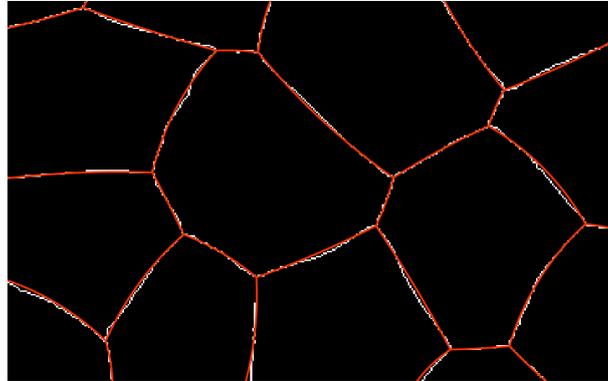


FIGURE 5.6 – Ajustement circulaire des contours des cellules par des portions de cercle. L'image segmentée est en blanc et est pixélisée. Les arcs de cercle rouges sont les ajustements de ces segments.

bien l'orientation de chaque segment au voisinage des intersections.

Le résultat final est donné en figure 5.7 pour l'échantillon complet. On voit que les

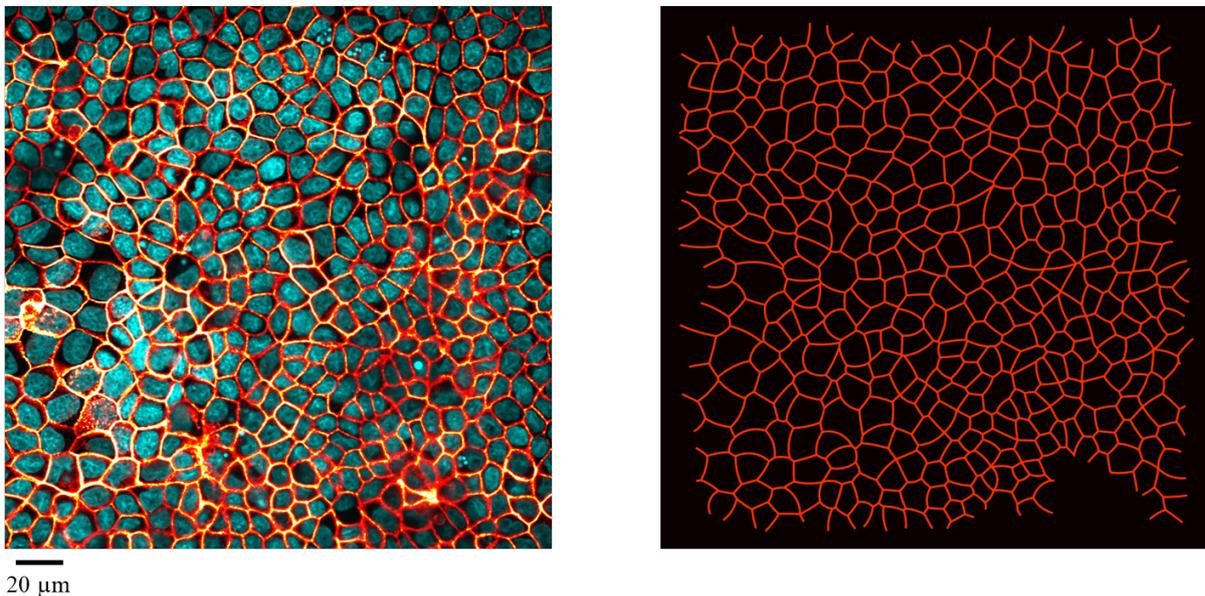


FIGURE 5.7 – Ajustement circulaire (à droite) de tous les segments intercellulaires d'un champ au microscope (à gauche).

jonctions intercellulaires qui sont vers les bords de l'image ne sont pas représentées par des ajustements circulaires. Plus précisément, on ne s'occupe plus à partir de cette étape des segments qui concernent des cellules qui ne sont pas fermées sur l'image, c'est-à-dire des cellules qui ont au moins une portion de leur contour qui est en dehors du champ observé.

Cela permet de ne garder que les parties de l'image dont on peut mesurer toutes les caractéristiques. De plus, si cette précaution n'est pas prise, il peut y avoir des segments isolés sur les bords de l'image ou encore des portions de segments trop petites pour en évaluer l'orientation correctement.

Une fois que les ajustements circulaires de tous les segments intercellulaires sont obtenus, on peut mesurer les angles α_i à toutes les intersections entre segments. Cette mesure est faite directement à partir de l'équation algébrique des ajustements circulaires qu'on a obtenus. L'image que l'on voit en figure 5.7 comporte 404 cellules, 1270 segments, 957 intersections et on y mesure 2540 angles α_i .

Une fois que tous les angles sont mesurés, on peut remplir la matrice du système d'équations qu'on a présenté dans la section précédente, puis résoudre numériquement ce système d'équations pour obtenir les valeurs des tensions γ_{ij} .

La microscopie confocale nous permet de travailler dans le plan de l'épithélium tout comme sur ses vues en coupes. On va exploiter cette possibilité ensuite en transposant la démarche que l'on vient d'exposer aux jonctions entre faces apicales et intercellulaires.

5.1.2 Dans la direction apico-basale

Si on reprend la vision originale de D'Arcy Thompson qu'on a exposée dans le chapitre 1.3 et notamment la figure 1.27, on voit que le calcul des tensions de surfaces des cellules en mesurant des angles était envisagé sur la vue en coupe des cellules plutôt que dans le plan de l'épithélium. Cette approche va nous permettre de faire une évaluation globale et locale de la tension de surface intercellulaire comparée à la tension de surface apicale mais aussi de mettre en œuvre une méthode d'inférence de force adaptée à cette configuration.

L'algorithme d'inférence de force

Les considérations générales que l'on a développées dans le paragraphe 5.1.1 restent vraies ici et on se contentera d'exposer les particularités de la vue en coupe pour l'inférence de force.

Sur la vue en coupe d'une jonction intercellulaire, les tensions de surfaces sont schématisées sur la figure 5.8.

Contrairement à l'inférence de force dans le plan de l'épithélium, on ne va pas traiter uniquement des tensions intercellulaires, les tensions de surfaces des faces apicales vont également être mises en jeu. Sur la figure 5.8, les tensions de surface apicales des cellules n°1 et n°2 sont respectivement notées γ_1 et γ_2 tandis que la tension de surface intercellulaire entre les cellules n°1 et n°2 est notée γ_{12} . En supposant l'équilibre mécanique, on a

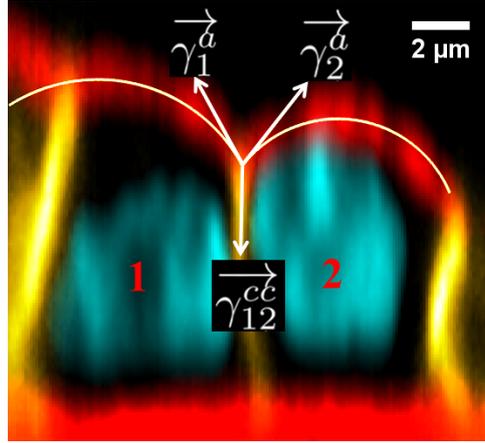


FIGURE 5.8 – Vue en coupe des MDCK EcadGFP. Les noyaux sont en cyan, la membrane apicale et la fibronectine du substrat en rouge et la EcadGFP en jaune.

l'équation vectorielle

$$\vec{\gamma}_{12} + \vec{\gamma}_1 + \vec{\gamma}_2 = \vec{0}$$

ce qui donne deux équations scalaires de la même façon que dans le cas précédent de la vue dans le plan de l'épithélium.

Ce système de 2 équations est toujours sous-déterminé puisqu'il a 2 équations indépendantes pour 3 inconnues. Cette fois, pour obtenir un système surdéterminé, on va devoir faire l'hypothèse que la tension de surface apicale d'une cellule est homogène sur sa face apicale, et plus spécifiquement sur le contour de sa face apicale. On aura ainsi la même tension de surface apicale d'une cellule donnée qui sera mise en jeu dans les systèmes d'équations qui concernent cette cellule. Ici chaque segment intercellulaire donne deux équations scalaires indépendantes. Pour chaque segment, il y a une tension de surface intercellulaire γ_{ij} associée (une inconnue) et deux tensions de surfaces apicales associées aux cellules adjacentes à ce segment. Les cellules ont en moyenne 6 côtés dans le plan de l'épithélium. Ainsi, la tension de surface apicale d'une cellule donnée se retrouve dans les systèmes d'équations de 6 segments en moyenne. On comptera chaque tension de surface apicale comme 1/6 d'inconnue. En extrapolant à une infinité de segments intercellulaires, on obtient 2 inconnues pour 3 équations ce qui est légèrement plus favorable que dans le plan de l'épithélium. En pratique on a, pour l'exemple donné en figure 5.7, 2140 équations pour 1474 inconnues. Le système est donc bien surdéterminé. Comme pour l'inférence de force dans le plan de l'épithélium, l'existence de cellules sur les bords de l'image réduit la surdétermination. Cependant, l'inférence de force sur la vue en coupe des cellules n'est pas sujette à la perte de surdétermination à cause d'un vertex à plus de 3 branches puisqu'ici toutes les intersections de branches concernent deux faces apicales et une face intercellulaire, sans exception.

Comme pour l'inférence de force dans le plan de l'épithélium, le système d'équations obtenu est linéaire et homogène ce qui implique qu'une solution évidente est la solution avec toutes les tensions de surface nulles. Pour obtenir une solution d'intérêt, on ajoute une équation de normalisation pour ensuite résoudre le système numériquement.

Pour construire le système d'équations, il faut mesurer tous les angles α_i auxquels se croisent les faces apicales des cellules entre elles mais aussi les orientations des jonctions intercellulaires dans la direction apico-basale.

L'analyse d'image associée

Pour mesurer les angles dont on a besoin pour l'inférence de force sur les vues en coupe, on va utiliser ce qu'on a déjà fait dans le plan de l'épithélium : l'image segmentée. Plus précisément, on va s'en servir pour déterminer la position et l'orientation de tous les segments intercellulaires. Cette position et cette orientation sont directement déduites de l'équation algébrique des portions de cercle qui décrivent ces segments et que l'on voit sur la figure 5.7.

On réalise ensuite une vue en coupe telle qu'on le voit sur la figure 5.9. Cette vue est

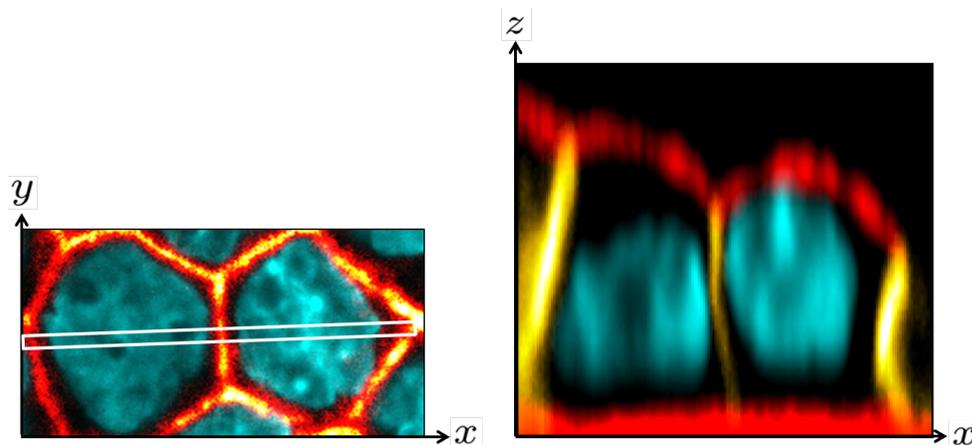


FIGURE 5.9 – À gauche, la vue dans le plan de l'épithélium. À droite, la vue en coupe. L'axe z est dans la direction apico-basale tandis que les axes x et y sont dans le plan de l'épithélium. La coupe de droite est faite dans le cadre blanc dessiné sur l'image de gauche.

paramétrée de façon à être positionnée au milieu d'un segment intercellulaire et perpendiculaire à celui-ci. On choisit de faire plusieurs coupes parallèles sur une épaisseur totale de $2\mu\text{m}$ symbolisées par l'épaisseur de l'encadré blanc sur la vue dans le plan de l'épithélium de la figure 5.9. La coupe sur laquelle on travaille finalement est celle de l'image de droite de la figure 5.9 et est l'image moyenne de toutes ces coupes. Le fait de prendre l'image moyenne a l'avantage de donner un meilleur rapport signal/bruit pour l'analyse d'image que l'on fait ensuite. Cela permet aussi d'éviter de tomber sur une coupe ayant

un défaut particulier qui entraverait l'analyse d'image, comme le fait d'avoir une ligne de pixels complètement saturés le long de l'axe apico-basal comme c'est parfois le cas avec notre dispositif expérimental (il s'agit alors d'un défaut de la caméra), ou le fait que, très localement, le signal est de moins bonne qualité en général.

Une fois que la vue en coupe est réalisée, on doit mesurer les trois angles qui sont à l'intersection des faces apicales et de la face intercellulaire. On ne va pas refaire de segmentation pour chacune des coupes mais plutôt exploiter le fait que les orientations des différentes faces est presque toujours la même : dans la direction apico-basale pour la face intercellulaire et dans le plan de l'épithélium pour la face apicale.

L'analyse d'image est ici semi-automatique. On va d'abord positionner à la main l'intersection des trois faces le long de l'axe x tel qu'il est représenté sur la figure 5.9. On va ensuite considérer que tout ce qui est à gauche de l'intersection appartient à la cellule n°1 et tout ce qui est à droite de l'intersection appartient à la cellule n°2. Pour la face apicale de la cellule n°1, on va réaliser un ajustement circulaire de l'ensemble du signal de la face apicale (gp135) jusqu'à la moitié de la largeur de la cellule environ. Il est en de même pour la cellule n°2 et ces arcs de cercles sont représentés sur la figure 5.8. On repère la position en x de la face intercellulaire, grâce au signal EcadGFP, en partant de l'intersection puis en descendant, ligne après ligne, le long de l'axe z . Cela permet d'obtenir directement l'orientation de la face intercellulaire.

Parfois la qualité du signal ne permet pas de faire ces mesures d'angles correctement de façon automatique, c'est pourquoi un contrôle visuel est fait pour chacune de ces mesures. On choisit alors de faire une mesure à la main, c'est-à-dire en pointant directement à la souris l'orientation des faces apicales et/ou intercellulaires mais dans certains cas la mesure n'est pas possible et on ne la fait tout simplement pas. Tant que le système d'équations est surdéterminé cela ne pose pas de problème de résolution d'abandonner quelques mesures.

5.2 Résultats

Maintenant que l'on a vu comment on a implémenté un algorithme d'inférence de force, à la fois dans le plan de l'épithélium et sur les vues en coupes, on va voir quels résultats on peut en obtenir.

5.2.1 Cartes de tensions dans le plan de l'épithélium

Validation

Comme on l'a dit précédemment, la méthode d'inférence de force dans le plan de l'épithélium a fait l'objet de développements récents [92], et on va en profiter pour valider

la méthode que l'on a implémentée sur les échantillons synthétiques utilisés dans ces études. Un échantillon synthétique dans le cas de l'inférence de force consiste à créer numériquement une image artificielle de contours de cellules mais pour laquelle on a fixé les tensions de surfaces de segments intercellulaires à l'avance. Cette image synthétique utilisée dans [92] est donnée en figure 5.10. On note un très bon accord global entre les

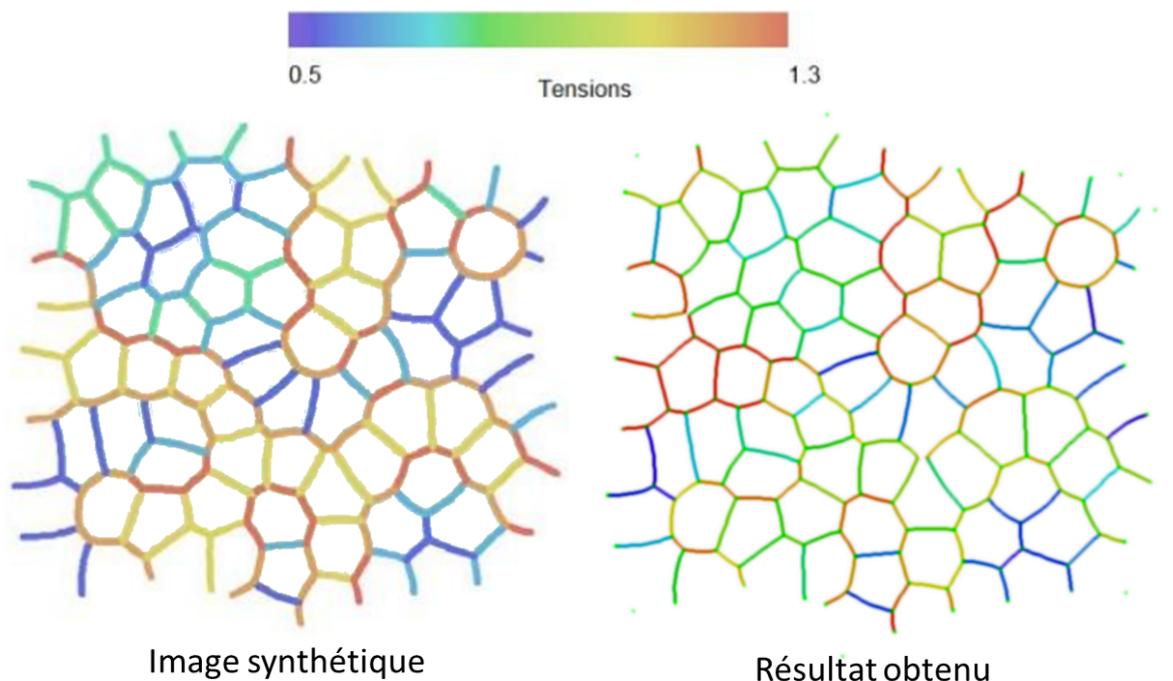


FIGURE 5.10 – L'image synthétique de gauche, tirée de [92], représente des segments intercellulaires ayant une tension parfaitement définie. Après passage de cette image synthétique dans l'algorithme d'inférence de force que l'on a développé, on obtient l'image de droite.

tensions dans l'image synthétique et celles obtenues par l'inférence de force que l'on a implémenté. Il y a quelques écarts qui sont minimes pour la plupart des tensions mais qui peuvent être plus importants pour quelques segments, notamment sur les bords de l'image. Les écarts qui existent sont probablement dus à la faible qualité de l'image d'entrée qui avait une résolution assez faible, ce qui a tendance à augmenter la dispersion des mesures d'angles.

Sur les MDCK

Lorsque l'on applique l'inférence de force sur l'image que l'on a donnée en exemple dans les paragraphes précédents, on obtient une carte des tensions intercellulaires comme on le voit sur la figure 5.11. On présente également le résultat obtenu sur un échantillon différent en figure 5.12. Pour améliorer la visualisation, on a choisi de faire saturer l'échelle

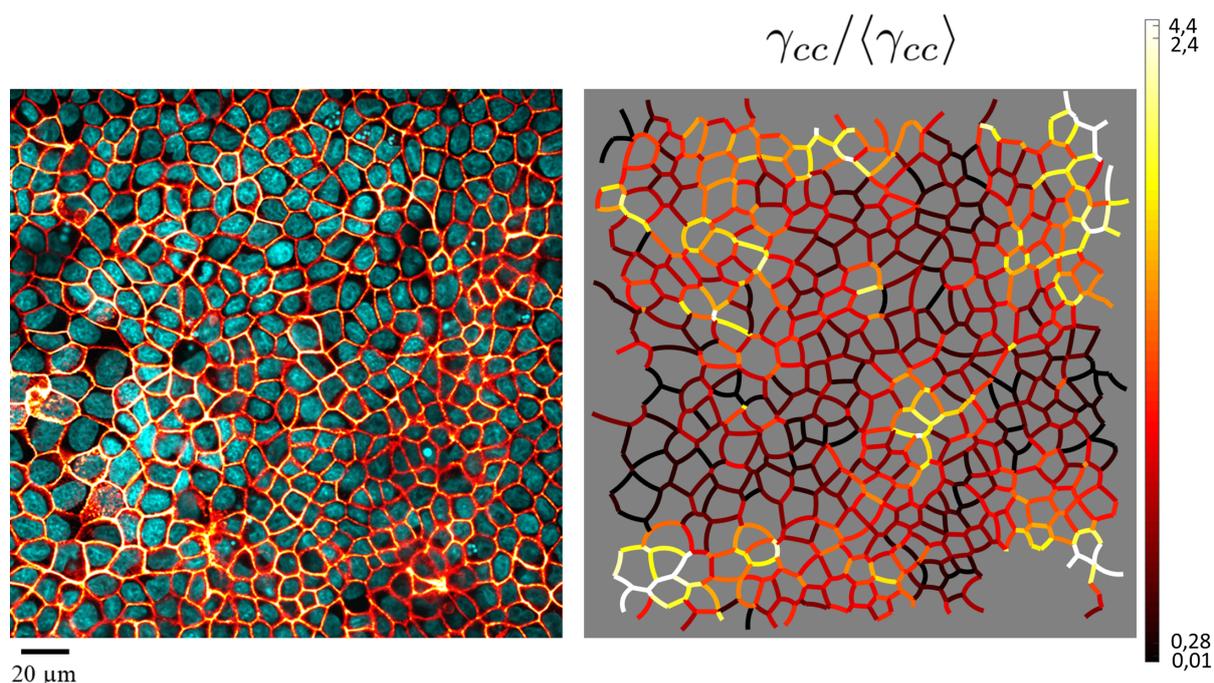


FIGURE 5.11 – Image de microscopie confocale des MDCK (à gauche) et carte des tensions de surfaces intercellulaires obtenues grâce à l’inférence de force (à droite). La plus grande valeur obtenue est à 4.4. La valeur haute à laquelle on fait saturer l’échelle de couleur est à 2.4. Elle correspond à une saturation de 2.5% des plus grandes valeurs. De même pour les petites valeurs : le minimum est à 0.01 et la valeur de saturation basse est à 0.28.

de couleur sur les 2.5% plus grandes valeurs et les 2.5% plus faibles valeurs. Sur la figure 5.12 par exemple, on a calculé 980 tensions ce qui implique que l’on a fait saturer les 24 valeurs les plus basses et les 24 valeurs les plus hautes de tension. Les valeurs maximales et minimales obtenues sont celles affichées aux extrémités de l’échelle de couleur.

On voit que, sur la figure 5.12, la valeur minimale de tension obtenue est négative. Il s’agit en fait de la seule valeur négative parmi les 980 tensions qui sont calculées et on ne va donc pas interpréter cette valeur comme étant significative. Elle est pointée par une flèche verte, sur le bord de gauche de la carte des tensions sur la figure 5.12

Si on exclut les tensions ayant des valeurs parmi les 2.5% les plus grandes ou les 2.5% les plus petites, on voit que l’étendue de valeurs sur laquelle les tensions se répartissent est presque la même pour le cas 5.11 (de 0.28 à 2.4) et le cas 5.12 (de 0.38 à 2.3). Leurs écart-types sont respectivement $\sigma = 0.525$ et $\sigma = 0.571$. Les distributions complètes des tensions obtenues pour ces deux échantillons sont données en annexe (figure A.1).

On ne peut cependant pas extraire beaucoup d’informations de ces cartes seules, sans avoir d’autres informations, notamment à cause de la normalisation indispensable à la résolution du système d’équations. En effet, cette normalisation nous empêche d’accéder à une valeur absolue des tensions intercellulaires et ne permet donc pas de comparer des

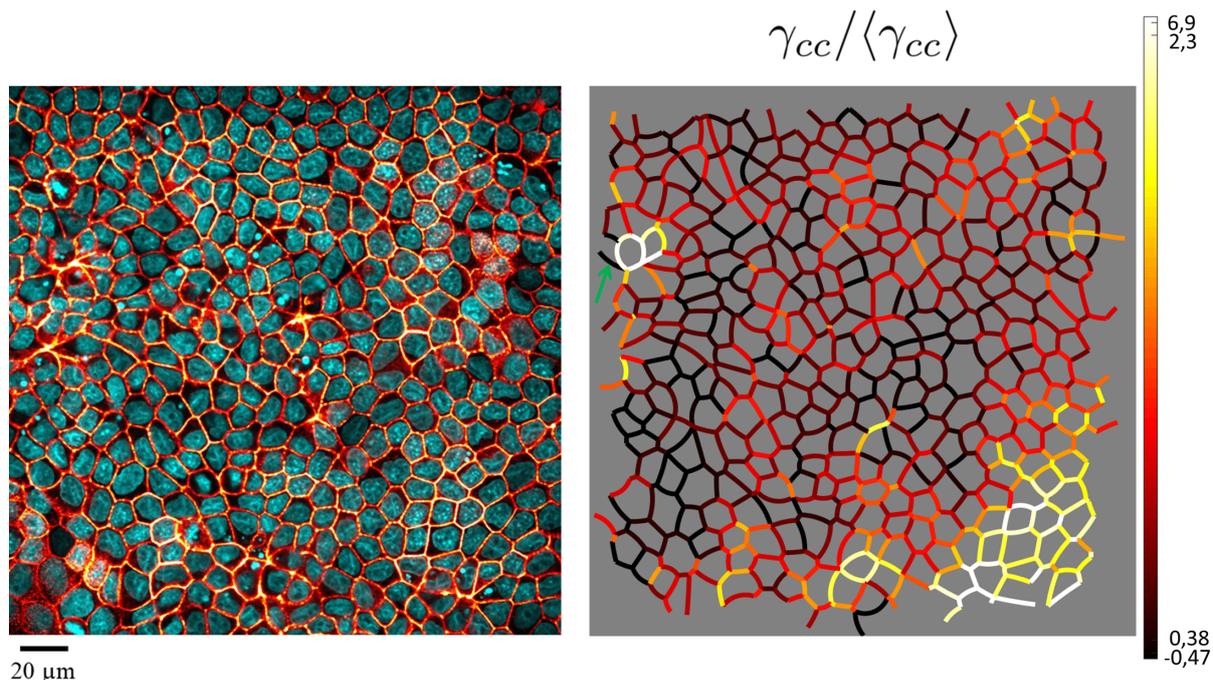


FIGURE 5.12 – Image de microscopie confocale des MDCK (à gauche) et carte des tensions de surfaces intercellulaires obtenues grâce à l’inférence de force (à droite). La plus grande valeur obtenue est à 6.9. La valeur haute à laquelle on fait saturer l’échelle de couleur est à 2.3. Elle correspond à une saturation de 2.5% des plus grandes valeurs. De même pour les petites valeurs : le minimum est à -0.47 (indiqué par la flèche verte) et la valeur de saturation basse est à 0.38.

échantillons entre eux par exemple. On peut cependant comparer les zones de chaque échantillon entre elles, par exemple en évaluant le niveau d’intensité du signal de la F-actine sur chaque segment intercellulaire pour le comparer aux valeurs de tensions prédites par l’inférence de force. Cette mesure nécessite de construire une méthode d’analyse d’image assez développée pour pouvoir faire cette comparaison sur l’ensemble de l’échantillon et avoir des mesures non biaisées. Elle sera l’objet de développements futurs pour ce travail.

5.2.2 Dans la direction apico-basale

L’inférence de force sur les vues en coupe permet d’accéder à toutes les tensions de surface intercellulaires (comme pour l’inférence de force dans le plan de l’épithélium) mais aussi aux tensions de surface de la face apicale de chaque cellule. On va d’abord donner les résultats intéressants que l’on obtient grâce à cette méthode, puis on discutera de la cohérence des résultats obtenus par cette méthode avec ceux obtenus en utilisant l’inférence de force dans le plan de l’épithélium.

Tensions de surfaces apicales et intercellulaires

On présente en figure 5.13 les cartes de tensions intercellulaires (à gauche) et apicales (à droite) pour l'échantillon que l'on a déjà présenté en figure 5.11. On a également utilisé

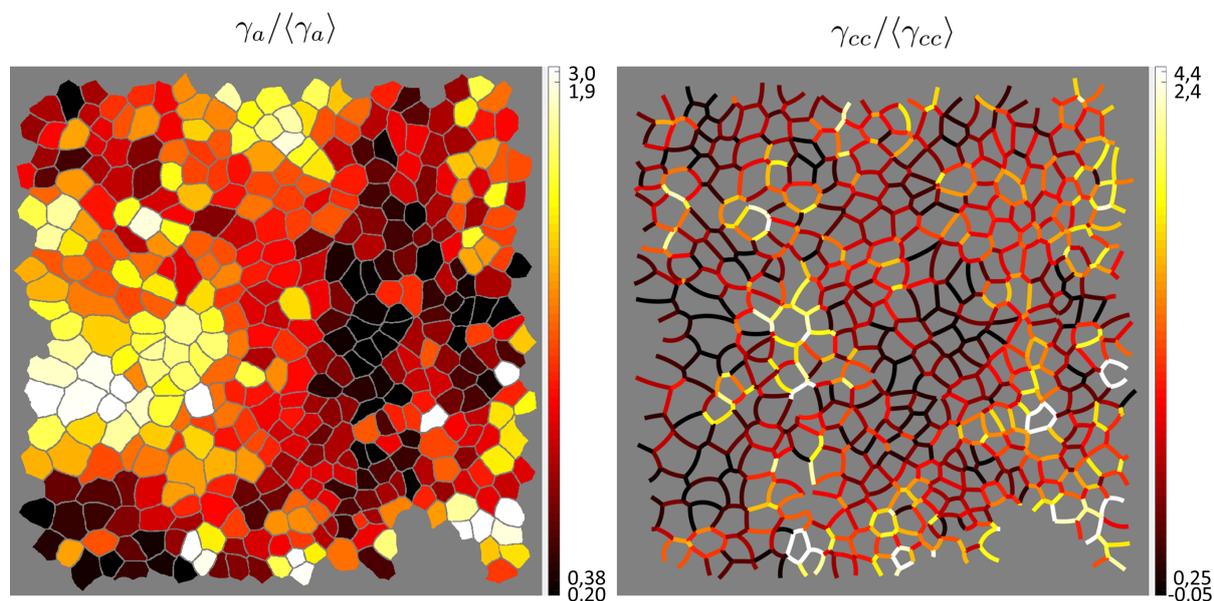


FIGURE 5.13 – Résultat de l'inférence de force sur les vues en coupe de l'épithélium. À gauche, la carte des tensions apicales, à droite la carte des tensions intercellulaires.

l'inférence de force sur les vues en coupe pour le deuxième échantillon que l'on présente en figure 5.14.

De même que pour les tensions dans le plan de l'épithélium, les valeurs sur lesquelles se répartissent les tensions intercellulaires et apicales (après saturation des 2.5% plus grandes et plus petites valeurs) sont assez similaires entre les deux échantillons.

En comparant les tensions apicales et intercellulaires, on voit que les tensions apicales ont des valeurs relatives moins extrêmes, plus proches de 1. Cela peut être quantifié par l'écart-type de chacune des tensions : pour les deux échantillons, l'écart-type est environ 40% plus grand pour les tensions intercellulaires que pour les tensions apicales. Les distributions complètes des tensions obtenues pour ces deux échantillons sont données en annexe, (figure A.2 pour les tensions intercellulaires et figure A.3 pour les tensions apicales).

Grâce à cette technique d'inférence de force, on peut comparer globalement les valeurs des tensions apicales et intercellulaires si on change la normalisation utilisée. Jusqu'à maintenant on normalisait les tensions intercellulaires et les tensions apicales en fixant chacune de leur moyenne à 1. Si on choisit de ne normaliser que les tensions de surfaces intercellulaires à 1 par exemple, on aura une estimation moyenne de la valeur relative de la tension apicale par rapport à la tension intercellulaire. Cela revient à calculer chaque

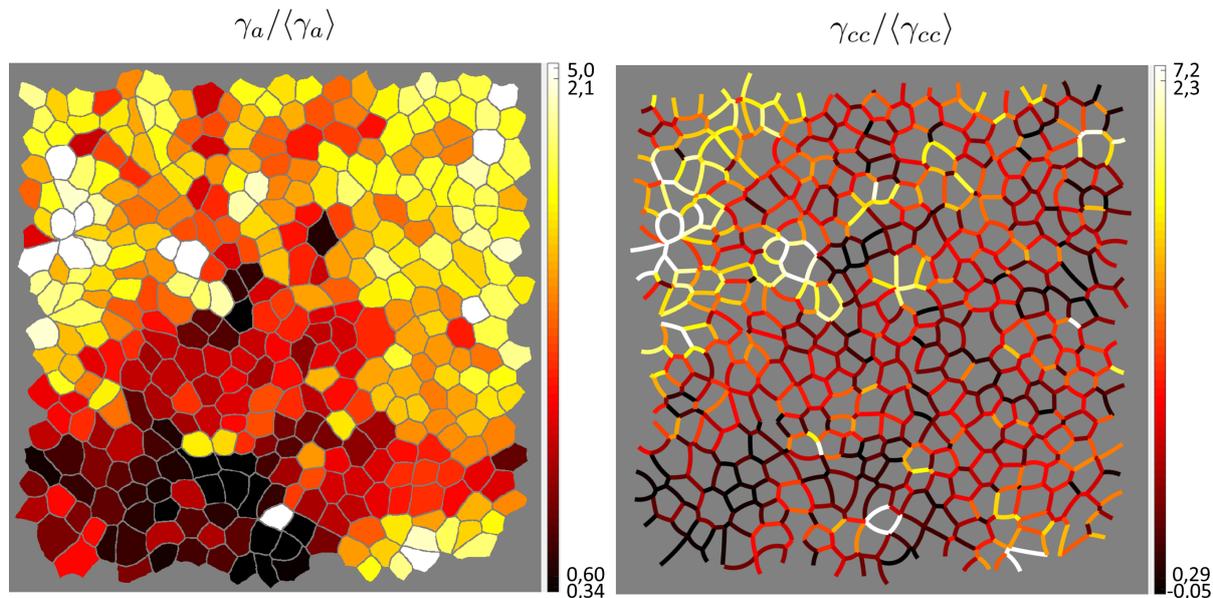


FIGURE 5.14 – Résultat de l’inférence de force sur les vues en coupe de l’épithélium. À gauche, la carte des tensions apicales, à droite la carte des tensions intercellulaires.

tension de surface apicale comme $\frac{\gamma_a}{\langle \gamma_{cc} \rangle}$. On obtient ici des valeurs différentes selon l’échantillon. Pour l’échantillon en 5.14, on a

$$\frac{\langle \gamma_a \rangle}{\langle \gamma_{cc} \rangle} = 1.34$$

tandis que pour l’échantillon en 5.13, on a

$$\frac{\langle \gamma_a \rangle}{\langle \gamma_{cc} \rangle} = 0.96$$

ce qui indique que, dans l’échantillon en 5.13, la tension apicale est légèrement plus faible en moyenne que la tension intercellulaire. Cela va à l’encontre de ce que l’on connaît dans la littérature, comme on l’a vu dans le chapitre 1.3.1, qui indique que la tension de surface intercellulaire est plus faible que la tension de surface apicale. C’est d’ailleurs bien ce qu’on observe avec l’échantillon en 5.14.

Pour vérifier rapidement cette mesure, on peut revenir aux valeurs des angles mesurés sur les vues en coupe. En effet, l’angle entre les deux surfaces apicales de deux cellules voisines donne directement un rapport entre tension de surface apicale et tension de surface intercellulaire si on considère les deux tensions de surface apicales comme ayant la même valeur. Plus précisément, on a, dans le cas symétrique de deux cellules voisines identiques, $\frac{\gamma_a}{\gamma_{cc}} = \frac{1}{2 \cos \frac{\alpha_a}{2}}$ (avec α_a l’angle entre les deux faces apicales voisines) ce qui nous permet d’obtenir une autre estimation du rapport entre la tension apicale et la tension

intercellulaire pour chaque échantillon. La valeur $\alpha_a = 120^\circ$ correspondant à $\gamma_a = \gamma_{cc}$, ce qui est l'angle que l'on retrouve aux jonctions tricellulaires entre les bulles dans une mousse de savon puisque les tensions de surfaces y sont partout les mêmes.

Pour l'échantillon en 5.13 on a $\langle \alpha_a \rangle = 112.5^\circ$ d'où $\langle \frac{\gamma_a}{\gamma_{cc}} \rangle = 0.90$. Cela est bien cohérent avec le résultat de l'inférence de force. L'écart entre les deux valeurs s'explique par le fait que la plupart des cas ne sont pas symétriques et que le nombre de côtés par cellule n'est pas le même pour toutes les cellules. Ces deux paramètres sont pris en compte dans le résultat de l'inférence de force.

Pour l'échantillon en 5.14 on a $\langle \alpha_a \rangle = 136.5^\circ$ d'où $\langle \frac{\gamma_a}{\gamma_{cc}} \rangle = 1.35$, donc on retrouve la valeur obtenue grâce à l'inférence de force.

On a reporté la distribution complète des angles apicaux pour les deux échantillons en annexe, sur la figure A.4. On précise également que ces calculs faits avec l'angle apical ne sont pas exacts car on compare des moyennes de rapport au rapport des moyennes. On suppose cependant que ces deux valeurs ne doivent pas être trop différentes pour que cette analyse soit un outil de vérification adéquat.

Comme on l'a dit concernant l'inférence de force dans le plan de l'épithélium, ces cartes sont difficiles à exploiter en elles-mêmes à cause de la normalisation qui empêche de comparer les échantillons entre eux. Afin de les exploiter au mieux, il serait très avantageux de se doter d'une technique de mesure de la tension (apicale ou intercellulaire) directe pour obtenir une valeur absolue de tension dans l'échantillon et ainsi éviter de devoir faire la normalisation.

Les tensions de surface intercellulaires sont-elles isotropes ?

Grâce à l'inférence de force sur les vues en coupe, on a pu calculer localement les valeurs des tensions intercellulaires de deux façons. Si on considère le modèle assimilant l'épithélium à une mousse liquide 2D, c'est-à-dire avec uniquement des tensions de surfaces, on devrait avoir les mêmes valeurs de tensions intercellulaires avec l'inférence de force dans le plan de l'épithélium qu'avec l'inférence de force sur les vues en coupe. On peut comparer visuellement les figures 5.13 et 5.11 d'une part et comparer les figures 5.14 et 5.12 d'autre part pour voir que ce n'est généralement pas le cas. On peut visualiser plus facilement cette correspondance sur la figure 5.15. Pour cette analyse on notera γ_{cc}^{xy} la tension intercellulaire obtenue à partir de l'inférence de force dans le plan de l'épithélium, où xy correspond au plan de l'épithélium. De même, on note γ_{cc}^z la tension intercellulaire obtenue à partir de l'inférence de force sur les vues en coupe.

On voit sur ce graphe 5.15 la confirmation de ce que l'on pouvait voir sur les cartes de tensions, à savoir qu'il n'y a pas de corrélation évidente entre γ_{cc}^{xy} et γ_{cc}^z . Si le modèle décrivant la forme des cellules avec uniquement des tensions de surface isotropes était

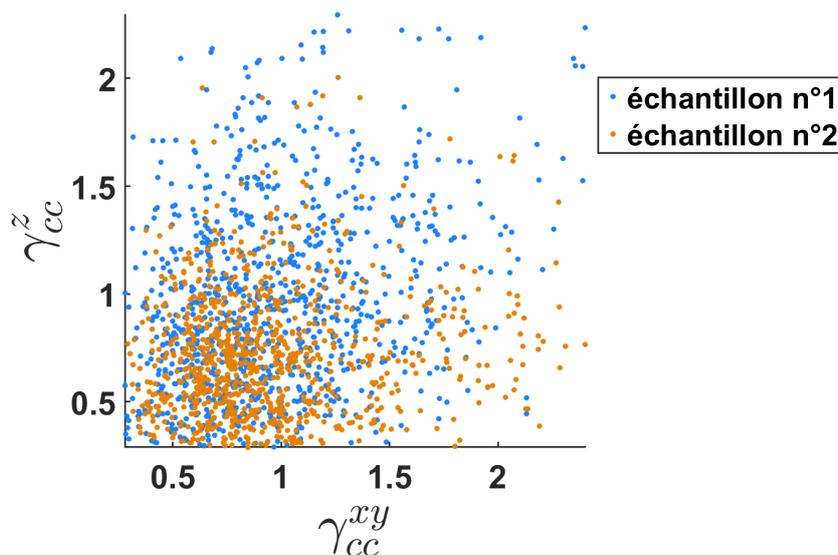


FIGURE 5.15 – Correspondance entre les tensions intercellulaires obtenues avec l’inférence de force dans le plan de l’épithélium (γ_{cc}^{xy}) et celles obtenues avec l’inférence de force sur les vues en coupe (γ_{cc}^z). L’échantillon n°1, en bleu, correspond à celui présenté sur la figure 5.11 et l’échantillon n°2, en orange, est celui de la figure 5.12.

satisfaisant, on aurait un regroupement des points autour de la droite $\gamma_{cc}^z = \gamma_{cc}^{xy}$. Il s’agit là d’une confirmation supplémentaire de la conclusion que l’on avait dressée grâce au travail présenté dans le chapitre 4. Cela est d’autant plus intéressant que ces deux tests de ce modèle concernent des échelles de longueurs différentes : dans le chapitre 4 on examinait la hauteur d’une cellule tandis qu’ici on mesure les angles de raccordement des différentes interfaces dans l’épithélium.

On peut aller plus loin dans l’analyse pour tester le modèle que l’on a considéré comme étant le plus pertinent dans le chapitre 4 : en ajoutant une tension de ligne apicale aux forces mises en jeu. Cette tension de ligne apicale vient structurellement des câbles d’actomyosine qui lient les jonctions adhérentes des cellules épithéliales entre elles. La tension de ligne apicale a deux caractéristiques importantes ici : elle est localisée vers la face apicale des cellules et elle est dirigée dans le plan épithélial, c’est à dire le plan xy en reprenant les notations de la figure 5.9. Cependant le câble d’actomyosine, qui génère cette tension, n’est pas d’épaisseur nulle. On peut donc, dans une description plus fine, considérer que cette tension de ligne apicale est plutôt une tension de surface supplémentaire localisée du côté de la face apicale et anisotrope dans la direction orthogonale à l’axe apico-basal. Notre modèle est représenté sur la figure 5.16. Pour ce modèle simple, on considère que la tension de surface est inhomogène et anisotrope. Vers la face basale, la tension de surface intercellulaire est supposée isotrope, ce que l’on note $\gamma_{cc}^z = \gamma_{cc}^{xy}$. Vers la face apicale, les câbles d’actomyosine génèrent une tension de surface uniquement dirigée dans le plan de

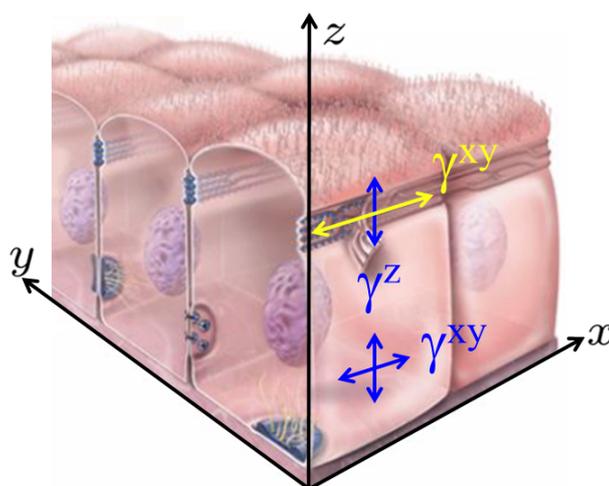


FIGURE 5.16 – Schéma du modèle qui fait la correspondance entre une tension de ligne apicale et une tension de surface anisotrope et inhomogène. Les câbles d'actomyosine des jonctions adhérentes peuvent générer localement une tension de surface anisotrope qui, intégrée sur l'épaisseur de ce câble, devient une tension de ligne. Adapté d'une image de Lynette Watts.

l'épithélium et qui rend la tension de surface localement anisotrope, ce qui s'écrit, pour cette zone, $\gamma_{cc}^z < \gamma_{cc}^{xy}$. La tension de ligne apicale est donc l'anisotropie de la tension de surface intercellulaire intégrée sur l'épaisseur de la cellule ou, écrit autrement,

$$\Lambda_a = \int_0^H (\gamma_{cc}^{xy}(z) - \gamma_{cc}^z) dz$$

avec Λ_a la tension de ligne apicale. Si on considère que l'anisotropie de tension de surface est localisée sur 1/5 de la hauteur de la cellule (l'épaisseur de l'anneau d'actomyosine est d'environ 1 μm) et qu'elle est constante sur ce morceau, on a

$$\Lambda_a \sim \frac{H}{5} (\gamma_{cc}^{xy|apical} - \gamma_{cc}^z)$$

avec $\gamma_{cc}^{xy|apical}$ la tension de surface intercellulaire dans le plan de l'épithélium proche de la face apicale. On rappelle que l'inférence de force dans le plan de l'épithélium a été faite à partir des contours des cellules proches de la face apicale. La quantité que l'on veut estimer est en fait $\Lambda = \frac{\Lambda_a}{\gamma_{cc}^z}$, c'est à dire la tension de ligne réduite utilisée au chapitre 4.

Après avoir mesuré la hauteur de toutes les cellules sur chaque échantillon, on obtient une valeur moyenne pour Λ pour l'échantillon n°1 :

$$\langle \Lambda \rangle = 0.55 \mu\text{m}$$

et pour l'échantillon n°2 :

$$\langle \Lambda \rangle = 1.55 \mu\text{m}$$

soit des valeurs de l'ordre du μm .

Ces valeurs sont du le même ordre de grandeur que les valeurs obtenues pour Λ au chapitre 4, qui étaient d'environ $6 \mu\text{m}$, sans toutefois que l'accord soit bon.

Ces valeurs ont un très bon accord avec les mesures de tensions obtenues par manipulation laser des jonctions intercellulaire dans l'embryon de drosophile [32]. Les auteurs mesurent une tension de ligne $\Lambda_a \sim 100 \text{ pN}$ ce qui donne une estimation en ordre de grandeur de $\Lambda \sim 1 \mu\text{m}$, en supposant que $\gamma_{cc} \sim 0.1 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$.

L'accord est moins bon, en ordre de grandeur, avec les valeurs obtenues par des mesures d'ablation laser [84]. Cette étude est aussi faite sur l'embryon de drosophile et donne une tension de ligne $\Lambda_a \sim 1 - 10 \text{ nN}$ ce qui donne, en supposant le même ordre de grandeur pour la tension de surface intercellulaire $\gamma_{cc} \sim 0.1 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, $\Lambda \sim 10 - 100 \mu\text{m}$.

Cependant, il y a ici plusieurs problèmes qui nous empêchent de présenter ce résultat comme une confirmation du modèle incluant la tension de ligne apicale. D'abord on a complètement enlevé les normalisations faites par l'inférence de force dans ce calcul. Cela revient à considérer que $\langle \gamma_{cc}^{xy|apical} \rangle = \langle \gamma_{cc}^z \rangle$. Rien n'indique que ces deux valeurs sont égales, même si en pratique elle devraient être dans le même ordre de grandeur. Mais si $\langle \gamma_{cc}^{xy|apical} \rangle = \langle \gamma_{cc}^z \rangle$ il ne devrait pas y avoir d'anisotropie et donc la tension de ligne devrait être nulle! Eh bien non, car chaque valeur de tension de ligne réduite Λ , lorsqu'elle est calculée, a la hauteur de la jonction intercellulaire comme facteur. En effet, l'obtention d'une valeur positive pour Λ provient probablement du fait que les jonctions qui ont une grande anisotropie de tensions sont hautes tandis que les jonctions pour lesquelles l'anisotropie est négative, c'est-à-dire donnent $\Lambda < 0$, sont plus petites. Cet effet est possiblement très artificiel car rien n'indique que l'épaisseur du câble d'actomyosine soit corrélée à la hauteur de la face intercellulaire. De plus, le calcul de Λ est fortement influencé par certaines valeurs très grandes de $\frac{\gamma_{cc}^{xy}}{\gamma_{cc}^z}$ pour lesquelles on n'a aucun critère objectif de tri. Enfin, le contour des cellules est mesuré dans un plan qui n'est pas nécessairement une zone où se manifeste la tension de ligne apicale. En pratique on a fait en sorte de prendre le contour des cellules dans leur moitié haute, certains étant effectivement proches de la face apicale tandis que d'autres sont plutôt un peu au-dessus de la mi-hauteur. Il y a donc probablement beaucoup de cellules pour lesquelles le contour a été mesuré plus bas que la ceinture d'actine qui est à l'origine de la tension de ligne apicale. Aussi, les échantillons sur lesquels on a réalisé cette inférence ont des caractéristiques assez extrêmes si on les compare aux échantillons qu'on a utilisés pour les mesures de hauteur de cellules sur substrat courbé. On pourra retrouver la distribution de plusieurs paramètres morphologiques des cellules sur lesquelles on a réalisé l'inférence de force dans

l'annexe dédiée, notamment sur les figures A.5 à A.10. On y voit notamment que la hauteur moyenne des cellules y est très élevée (10-12 μm) ce qui laisse penser que les propriétés moyennes des cellules sur ces échantillons sont différentes de celles qu'on a observées sur substrat courbé. La raison pour laquelle ces cellules sont beaucoup plus hautes est un pur effet de sélection : on a sélectionné des cellules qui avaient une forme rendant plus aisée l'inférence de force, car le but de ce chapitre est avant tout de mettre en œuvre cette technique et de la rendre fonctionnelle, or ce sont des cellules très hautes qui avaient les contours les mieux définis. Ces échantillons ont, par ailleurs, été préparés de la même façon que tous les autres.

Ainsi, cette analyse de la tension de ligne apicale comme une anisotropie de la tension de surface intercellulaire est peut-être prometteuse mais on ne peut tirer aucune conclusion qui soit raisonnable ici avant d'avoir accès à des valeurs absolues pour les tensions. Comme on l'a dit dans les parties précédentes, coupler une mesure absolue de tension avec l'inférence de force pourrait être un outil puissant pour analyser les tensions mises en jeu dans un épithélium de façon très locale tout en nécessitant peu de mesures.

5.2.3 Carte des pressions

La loi de Laplace donne le saut de pression ΔP à travers une surface ayant une tension de surface γ et courbée, de rayons de courbures principales R_1 et R_2 :

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$$

que l'on peut appliquer aux cellules épithéliales grâce à l'inférence de force.

Ce saut de pression peut se manifester aussi bien aux interfaces intercellulaires qu'aux faces apicales des cellules. Dans le premier cas, il s'agit d'une différence de pression entre deux cellules et dans le second cas, il s'agit de la différence de pression entre une cellule et le milieu liquide surjacent. On va examiner ces deux situations.

Si on reprend l'image de la figure 5.8 et qu'on note P_1 la pression de la cellule n°1 et P_0 la pression dans le milieu surjacent, le saut de pression à travers la face apicale de la cellule n°1 est alors

$$P_1 - P_0 = \gamma_a \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$$

avec γ_a la tension de surface apicale de la cellule n°1.

Grâce à l'inférence de force sur les vues en coupe, on a accès aux tensions de surface apicales de toutes les cellules, comme on le voit sur la carte de gauche des figures 5.13 et 5.14. Il reste donc à déterminer les rayons de courbure R_1 et R_2 de la face apicale de chaque cellule. L'analyse de la forme complète des faces apicales des cellules est assez

difficile car le signal de fluorescence de cette membrane (on marque un anti-gp135) est rarement de bonne qualité sur l'ensemble de la cellule. Pour contourner ce problème, on applique un filtre passe-bas (filtre gaussien sur ImageJ) sur le signal de la face apicale. On obtient ensuite la position de la face apicale en chaque point de l'image en ajustant le signal le long de l'axe z (axe apico-basal) par une gaussienne. La position du maximum de la gaussienne donne alors la position de la membrane apicale. Cet ensemble de positions qui décrit la membrane apicale est alors encore très bruité donc on réapplique un filtre passe-bas pour en lisser les grandes variations sur de petites distances. Pour mesurer la courbure de la face apicale des cellules, on procède ensuite à un ajustement de l'ensemble des positions obtenues par une surface. En essayant d'ajuster la forme des faces apicales des cellules par des portions de sphères, on s'est aperçu que la courbure des faces apicales n'est pas homogène. Les variations spatiales de courbure de la face apicale ne sont pas très grandes : on ne retrouve jamais des zones de courbures opposées sur la même face apicale par exemple. Cependant, on note que si la forme de la face apicale des cellules épithéliales était uniquement donnée par sa tension superficielle et une différence de pression, elle aurait une courbure homogène. Pour mesurer la courbure des faces apicales des cellules on ajuste leur forme par une surface quadratique. Cet ajustement est généralement assez satisfaisant et on calcule ensuite la courbure moyenne de la surface.

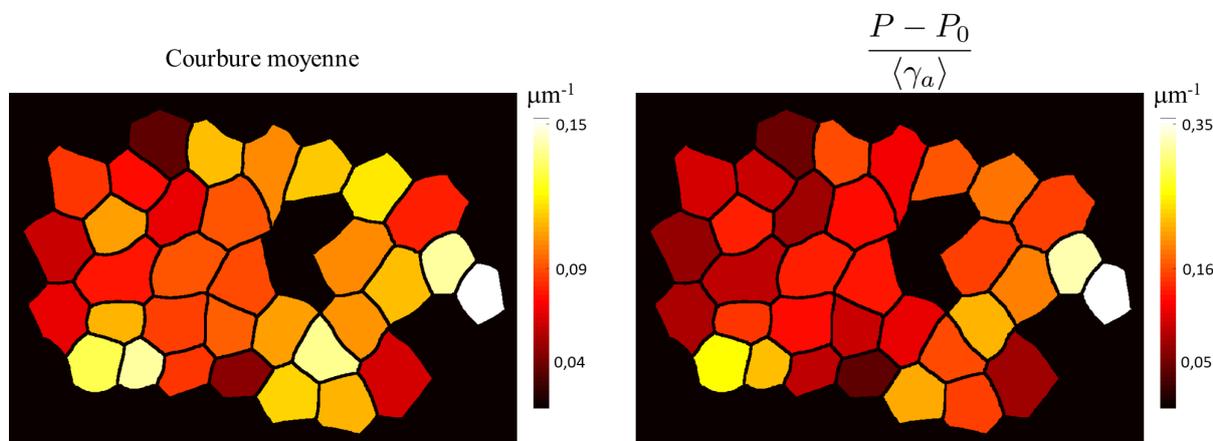


FIGURE 5.17 – À gauche, la carte des courbures pour un ensemble de cellules. On voit que 3 cellules n'ont pas de données car on n'a pas pu ajuster leur surface apicale avec une précision satisfaisante. À droite, la carte des pressions normalisées par la moyenne des tensions des faces apicales.

Une fois que la courbure moyenne de la face apicale est obtenue on peut calculer le saut de pression qu'on approxime par

$$P_1 - P_0 = \gamma_a \frac{2}{R}$$

car on n'a pas le niveau de précision suffisant pour que le fait de considérer les deux rayons

de courbure séparément ait de l'importance.

En réalisant cette mesure pour plusieurs cellules, on obtient une carte des courbures des faces apicales que l'on voit en figure 5.17. On peut ensuite avoir une carte des sauts de pression grâce à la carte des tensions de surfaces apicales obtenues à l'aide de l'inférence de force sur les vues en coupe. Cependant il ne s'agit que de sauts de pression relatifs à la moyenne des tensions de surface apicale puisque l'inférence de force ne donne pas de valeurs absolues pour les tensions. On peut quand même obtenir un ordre de grandeur de la différence de pression entre la cellule et le milieu surjacent en supposant que $\langle \gamma_a \rangle \sim 0.2 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$. On a alors une surpression moyenne dans les cellules de

$$\Delta P \sim 40 \text{ Pa}$$

On voit sur la figure 5.17 que le nombre de cellules que l'on a pu analyser est beaucoup plus faible que pour l'inférence de force. Cela est dû au fait que le traitement d'image que l'on a utilisé est assez long à s'exécuter et les ajustements des faces apicales par une surface quadratique sont trop souvent insatisfaisants. On a donc conservé ici une zone de bonne qualité mais cette analyse a encore besoin d'être améliorée pour donner des résultats fiables et sur un grand nombre de cellules.

On peut également analyser le saut de pression à travers une face intercellulaire, c'est-à-dire la différence de pression entre deux cellules voisines. On peut alors mesurer la courbure de la face intercellulaire dans le plan de l'épithélium et en déduire la différence de pression entre ces deux cellules voisines. On a représenté cette situation en figure 5.18. Cependant, dans ce cas-là, on doit tenir compte de la courbure de la face intercellulaire

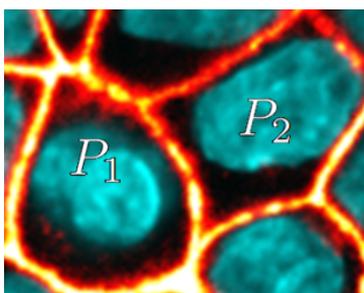


FIGURE 5.18 – Deux cellules voisines pour lesquelles on veut connaître la différence de pression $P_2 - P_1$. Il faut alors mesurer la courbure de leur jonction intercellulaire commune.

dans la direction apico-basale également. Celle-ci peut être assez importante comme on le voit sur la figure 5.8, où la jonction intercellulaire de droite est très courbée. Elle est cependant très difficile à mesurer car la plupart du temps elle n'est pas aussi bien définie sur toute l'épaisseur de la cellule. Les faces intercellulaires ont souvent une courbure qui n'est pas constante le long de l'axe apico-basal, ce qui est compatible avec notre description

d'une tension de ligne apicale, mais qui rend la mesure de cette courbure d'autant plus difficile.

De plus, on a vu que la tension de la face intercellulaire est anisotrope, ce qui complexifie la situation. Avec un modèle simple d'une anisotropie à 2 axes principaux, en faisant une interpolation de la tension entre ces deux axes, le saut de pression s'écrit :

$$P_2 - P_1 = \gamma_0 \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) + \Delta\gamma \left(\frac{1}{R_1} \cos 2\phi - \frac{1}{R_2} \cos 2\phi \right)$$

où la tension de surface au point considéré de l'interface vaut $\gamma_0 + \Delta\gamma$ dans la direction d'un des axes principaux de l'anisotropie, et $\gamma_0 - \Delta\gamma$ dans la direction orthogonale. L'angle entre cette direction et les directions principales de courbure de l'interface est noté ϕ . Le calcul du saut de pression nécessite donc de connaître l'angle entre les directions principales des courbures et les directions principales de l'anisotropie

Certains de ces paramètres sont encore inaccessibles, notamment l'angle ϕ et le rayon de courbure de l'interface dans la direction apico-basale. De plus, une fois ces paramètres mesurés, il faudra prendre en compte l'inhomogénéité de l'anisotropie de la tension de surface intercellulaire, puisque cette anisotropie est a priori forte seulement près de la face apicale.

Comme on l'a vu, l'inférence de force sur les vues en coupe, combinée à la mesure de la courbure de la face apicale de chaque cellule, nous permet d'accéder à une carte de la différence de pression entre chaque cellule de l'épithélium et le milieu surjacent. Cela permet donc d'accéder indirectement à la différence de pression entre les cellules. L'inférence de force dans le plan de l'épithélium combinée à des mesures locales des courbures des faces intercellulaires peut nous donner ces mêmes différences de pression. On pourrait ainsi tester, cellule par cellule, la cohérence interne du modèle proposé en comparant les différences de pressions entre les cellules obtenues par ces deux mesures indépendantes. On a eu la même démarche lorsque l'on a comparé les tensions γ_{cc}^{xy} et γ_{cc}^z sur la figure 5.15, suggérant l'invalidation du modèle de tensions de surfaces isotropes. Il nous manque donc une façon de mesurer localement les courbures des faces intercellulaires pour faire cette comparaison des différences de pression. On note cependant que, dans ce cas, on ne peut pas s'affranchir d'un facteur de normalisation, inconnu a priori, puisque l'on ne peut pas avoir de facteur de normalisation commun entre les inférences de force dans le plan de l'épithélium et sur les vues en coupe. Pour accéder réellement aux différences de pression et comparer les résultats obtenus selon que l'on mesure la forme des faces apicales ou intercellulaires, il faudra coupler l'inférence de force avec des mesures directes de tensions de surfaces apicales et intercellulaires.

5.2.4 In-vivo

Il s'agit ici d'un travail préliminaire en collaboration avec Adrien Hallou, post-doctorant au laboratoire du professeur Benjamin Simons à l'université de Cambridge, pour lequel on a pu obtenir des résultats d'inférence de force sur des images de tissus épithéliaux *in-vivo*. On voit, sur la figure 5.19, les images de cellules de l'œsophage de souris obtenues par ces collaborateurs. Comme on l'a vu au chapitre 1, l'épithélium de l'œsophage est un épithélium stratifié et ses cellules sont pavimenteuses, c'est-à-dire qu'elles sont plus larges que hautes. La carte des tensions obtenues par inférence de force dans le plan de l'épithélium

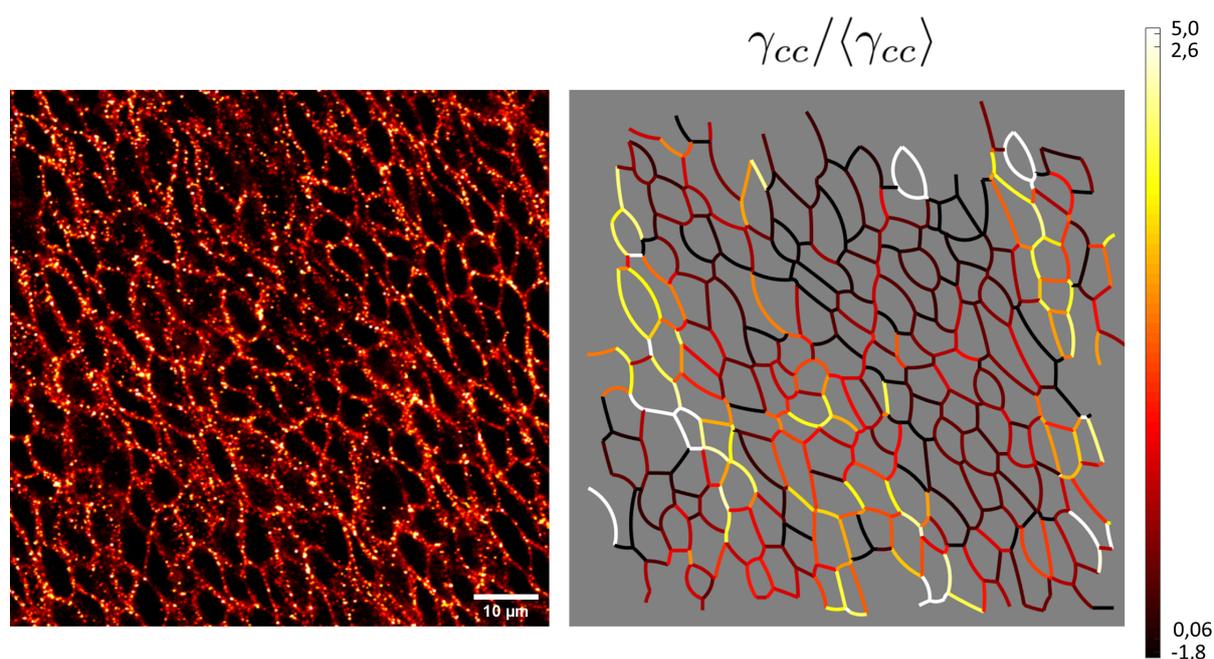


FIGURE 5.19 – À gauche, les contours des cellules des cellules épithéliales d'œsophage de souris obtenue par marquage de la β -caténine. À droite, l'inférence de force dans le plan de l'épithélium de cet échantillon.

donne une étendue sur laquelle se répartissent les tensions assez similaire à ce qu'on a obtenu pour les MDCK. On retrouve cependant une plus grande dispersion des valeurs de tensions avec un écart-type $\sigma = 0.84$ alors qu'il était plutôt de $\sigma = 0.50$ et $\sigma = 0.57$ pour les deux échantillons de MDCK qu'on a présentés. On note également un grand nombre de valeurs négatives pour les tensions intercellulaires : 20 ici alors qu'on avait obtenu 1 tension négative sur un échantillon de MDCK et aucune sur l'autre. Même si on a beaucoup plus de tensions négatives ici que sur les MDCK, au sein de cet échantillon d'œsophage de souris il ne s'agit que de 3.8% des valeurs.

L'échantillon analysé ici est celui d'un œsophage de souris âgée de 7 jours. L'équipe qui produit ces images dispose également d'échantillons extraits de souris plus âgées (28 jours et 84 jours). Il serait intéressant de poursuivre ce travail préliminaire en analysant

les tensions dans les épithéliums d'œsophage de ces souris plus âgées.

Les cellules de ces tissus prolifèrent rapidement ce qui a probablement une incidence sur les tensions au sein du tissu. En effet, les cellules sont en compression dans la direction orthogonale à l'axe du tube du fait de la condition aux limites périodique imposée dans cette direction par la géométrie du tube. On voit déjà, sur la figure 5.19, que les cellules ont leur forme orientée dans une même direction, et l'équipe qui produit ces images souhaiterait connaître l'évolution des tensions, notamment leur anisotropie, au fur et à mesure du vieillissement des souriceaux. On s'attend ainsi à mesurer une anisotropie des tensions à l'échelle du tissu, avec des tensions plus grandes dans la direction de l'axe du tube, qui augmente avec l'âge de la souris.

Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail de thèse on a exploré les qualités, les limites et les améliorations possibles d'un modèle faisant l'analogie entre tissu épithélial et mousse liquide pour comprendre la forme des cellules épithéliales, par une approche théorique, expérimentale et numérique.

On a mis en place un système expérimental original pour mesurer la forme des cellules épithéliales sur un substrat courbé. Les résultats ont mis en évidence que les cellules qui sont positionnées dans des creux du substrat sont plus épaisses que les cellules qui sont situées sur les crêtes. De plus, cette différence de hauteur tend à augmenter avec la courbure à laquelle les cellules sont exposées et on a quantifié précisément cette dépendance. On a ensuite développé un modèle cellulaire pour rendre compte de ces résultats expérimentaux. On a montré que, si le modèle ne comporte que des énergies de surfaces, il ne peut pas expliquer les données obtenues. Ce n'est qu'en ajoutant un terme de tension de ligne apicale qu'il rend compte correctement des données expérimentales. On a aussi testé ce modèle sur des échantillons ayant subi des altérations biologiques. D'une part sur une lignée cellulaire qui surexprime les E-cadhérines, le modèle explique toujours les données expérimentales obtenues avec des paramètres physiques légèrement modifiés. D'autre part on a inhibé l'activité des myosines-II et donc la contractilité du cortex cellulaire et, cette fois, le modèle n'a pu rendre compte des données expérimentales de façon satisfaisante que pour la lignée qui, par ailleurs, surexprime les E-cadhérines. Pour la lignée cellulaire sauvage, les prédictions du modèle ne sont pas incompatibles avec les résultats obtenus, mais elles expliquent mal la tendance observée d'une saturation de la différence de hauteur des cellules entre les creux et les crêtes en fonction de la courbure. On a aussi pu invalider un modèle continu assimilant l'épithélium à un film liquide mince totalement mouillant sur un substrat courbé.

Les perspectives pour développer cette partie sont nombreuses. Le modèle mérite d'être raffiné pour comprendre la saturation de la différence de hauteur des cellules entre crête et creux. On suggère qu'il faudrait ajouter une contribution liée à la déformation du

noyau car, aux plus grandes courbures, le noyau est d'autant plus écrasé notamment pour les cellules situées sur les crêtes. Ceci est d'ailleurs cohérent avec l'observation de la tendance des noyaux à fuir les crêtes quand la courbure est grande. Le modèle mérite aussi d'être solidifié en relaxant certaines hypothèses qui ont été faites comme le rayon de courbure faible devant la taille des cellules. Expérimentalement, il serait très utile de pouvoir mesurer précisément le volume des cellules en fonction de la courbure, car le cadre théorique dans lequel on se place permet déjà de prendre en compte la compressibilité des cellules, mais cette contribution nécessite d'être calibrée par des données expérimentales. Une segmentation complète, en 3D, de la forme des cellules sur substrat courbé, serait un grand pas en avant car, en plus du volume, on aurait accès à des mesures plus précises de la surface à mi-hauteur des cellules qui est aussi un paramètre très important pour calibrer le modèle. Une meilleure calibration des concentrations en blebbistatine utilisées, d'une part, et une utilisation plus large de drogues affectant la contractilité cellulaire ou ses adhésions, d'autre part, permettrait aussi de mettre plus facilement en évidence les contributions des différents constituants cellulaires.

Citons également les observations de ponts épithéliaux entre deux crêtes du substrat, c'est-à-dire des décollements de l'épithélium dans un creux. Ces expériences pourraient apporter de nouvelles informations sur les énergies de surface mises en jeu dans l'épithélium mais ont besoin d'être beaucoup mieux contrôlées.

On a aussi développé un algorithme d'inférence de force qui permet d'obtenir localement les tensions en jeu dans l'épithélium. L'apport principal de cette partie a été de le développer aussi sur les vues en coupe de l'épithélium et pas seulement dans le plan de l'épithélium. Cela est très utile car on peut alors avoir une comparaison locale entre les tensions de surface intercellulaire et apicales. On a pu tester aussi la cohérence interne d'une description de la forme des cellules avec des tensions de surface, et on a conclu qu'une anisotropie de la tension de surface intercellulaire était nécessaire pour avoir cette cohérence. Cette tension de surface intercellulaire anisotrope est compatible avec la tension de ligne apicale, nécessaire à la compréhension des mesures faites sur substrat courbé, mais l'accord quantitatif reste à confirmer. On a aussi pu montrer que l'inférence de force sur les vues en coupe de l'épithélium permet de calculer la différence de pression dans chaque cellule par rapport au milieu environnant.

Une grande faiblesse de cette méthode réside dans le fait qu'elle ne donne que des valeurs relatives de tensions et de pression. On ne peut pas l'utiliser seule pour en déduire des grandeurs absolues et donc comparer des échantillons entre eux. Il serait donc idéal de coupler cette technique avec des méthodes de mesure directe des tensions. Ainsi, avec une seule mesure directe de tension dans un tissu, l'inférence de force permettrait d'obtenir la tension localement dans tout le tissu. C'est donc une direction intéressante à prendre pour

développer ce travail.

L'inférence de force que l'on a développée donnera les résultats les plus intéressants si on l'applique à des échantillons *in vivo*. Il sera alors possible d'obtenir toutes les tensions localement et les relier à des processus morphogénétiques par exemple.

Données complémentaires pour l'inférence de force

Les échantillons analysés par inférence de force dans le chapitre 5 ont fait l'objet d'une analyse d'image détaillée. On a jugé qu'il peut donc être utile au lecteur de se reporter à ces analyses s'il a une question particulière en tête, elles sont donc données ici de façon exhaustive. Dans toute cette annexe, l'échantillon n°1 se réfère à l'échantillon présenté en figure 5.11 tandis que l'échantillon n°2 est celui de la figure 5.12. Tous les graphes qui vont suivre comportent une fonction de répartition expérimentale (en bleu) qui est ajustée par une fonction d'erreur (en rouge), *erf* qui est la fonction de répartition associée à la loi normale. L'ajustement est simpliste puisque l'on prend juste la loi qui a la même moyenne et le même écart-type que l'ensemble de données traité. La distribution donnée en dessous de chaque fonction de répartition est la dérivée de la fonction de répartition expérimentale qu'on a rendue continue par interpolation simple entre chaque point. Un filtre passe-bas est ensuite appliqué pour que la distribution expérimentale (en bleu) ne soit pas dominée par les variations de courtes longueurs d'onde. L'ajustement de la distribution est ensuite le même que pour la fonction de répartition : la loi normale qui a la même moyenne et le même écart-type que l'ensemble de données traité.

Lorsque l'ajustement par une loi normale n'est pas très bon, on applique la même chose mais en ajustant par une loi log-normale. En plus de la moyenne et de l'écart-type de l'ensemble de données traité, on calcule le paramètre d'asymétrie de la distribution expérimentale pour ensuite obtenir la loi log-normale qui ajuste les données.

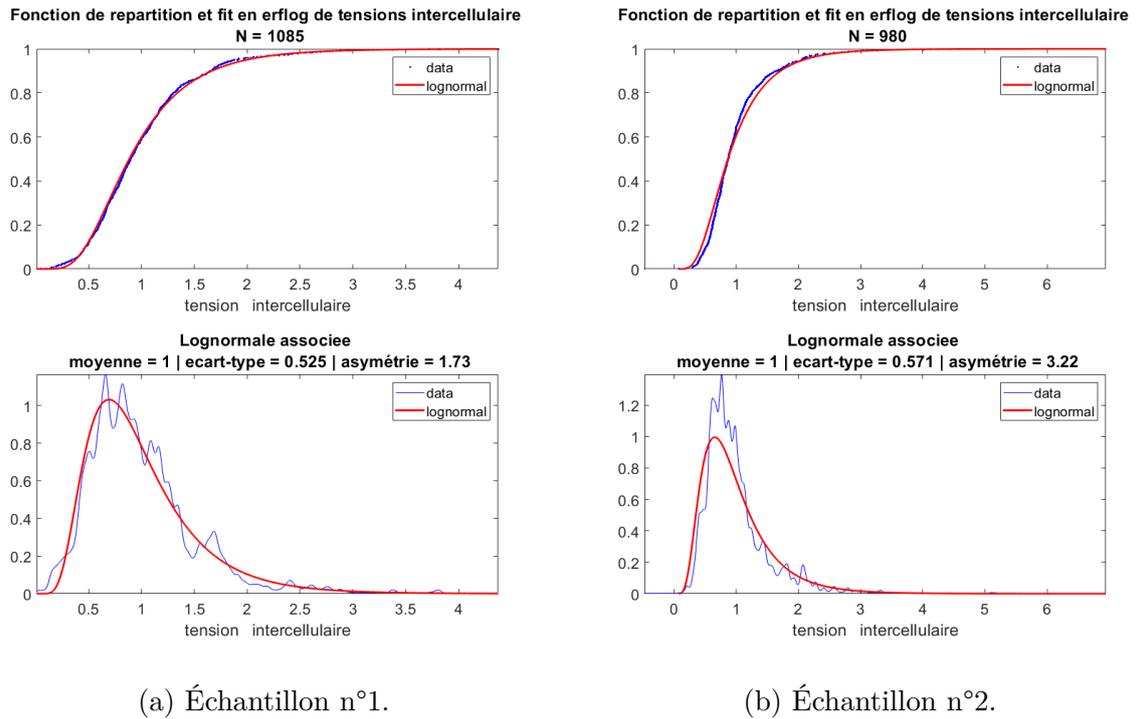


FIGURE A.1 – Distribution des tensions de surface intercellulaires normalisées obtenues grâce à l'inférence de force dans le plan de l'épithélium.

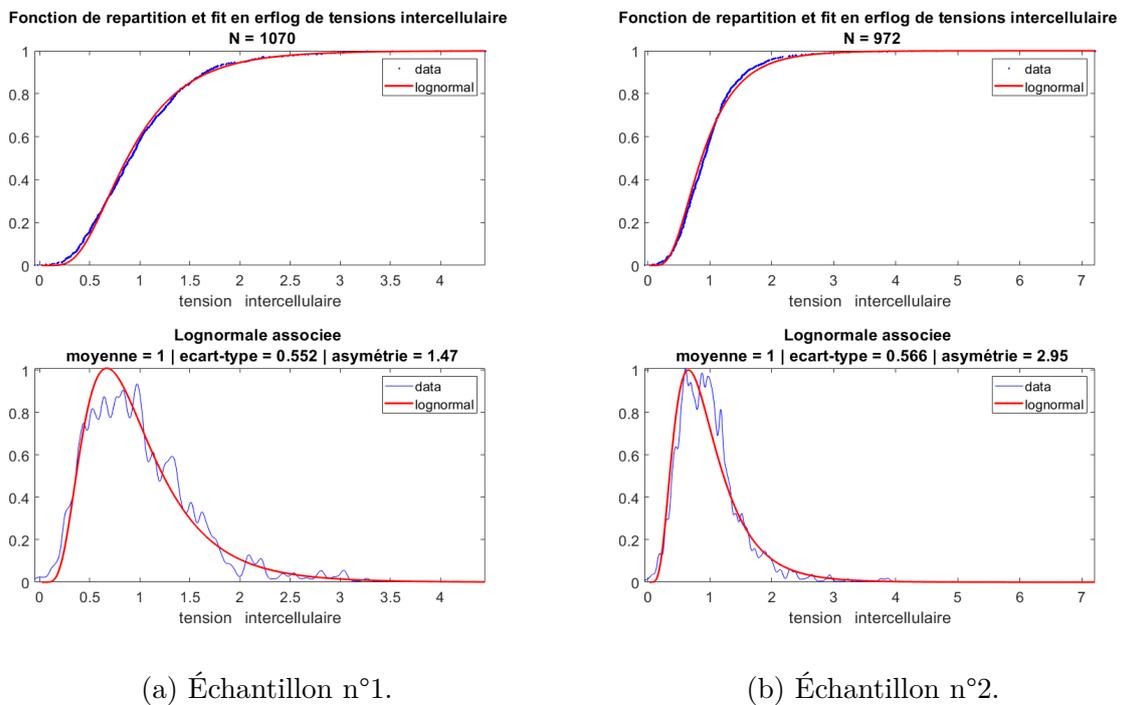
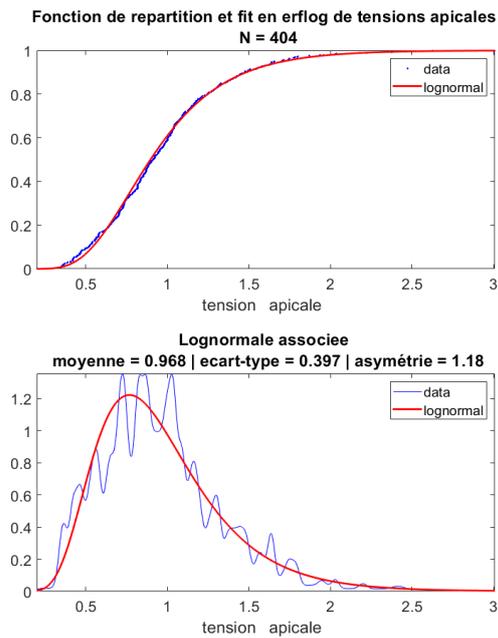
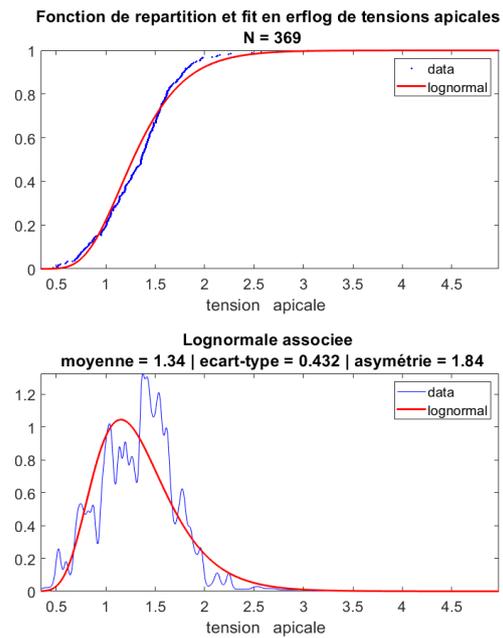


FIGURE A.2 – Distribution des tensions de surface intercellulaires normalisées obtenues grâce à l'inférence de force sur les vues en coupe.

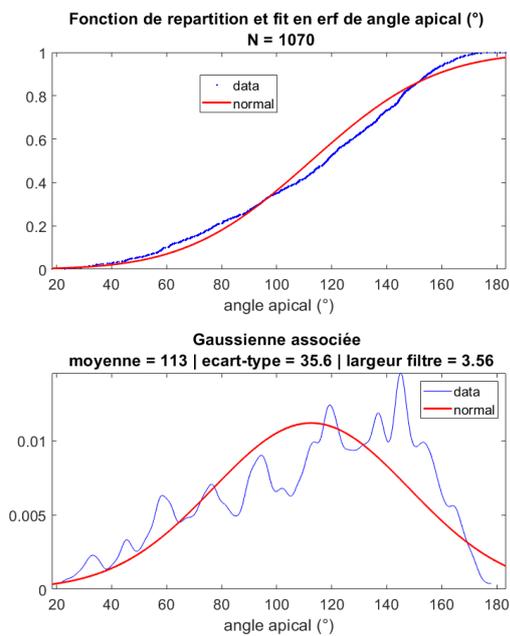


(a) Échantillon n°1.

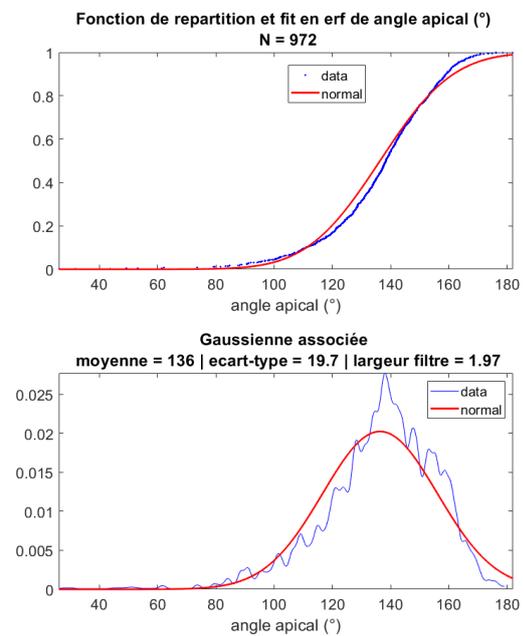


(b) Échantillon n°2.

FIGURE A.3 – Distribution des tensions de surface apicales normalisées obtenues grâce à l'inférence de force sur les vues en coupe. La moyenne n'est pas égale à 1 car c'est la moyenne des tensions de surfaces intercellulaires qui a été normalisée à 1.



(a) Échantillon n°1.



(b) Échantillon n°2.

FIGURE A.4 – Distribution de l'angle entre les deux faces apicales de cellules voisines.

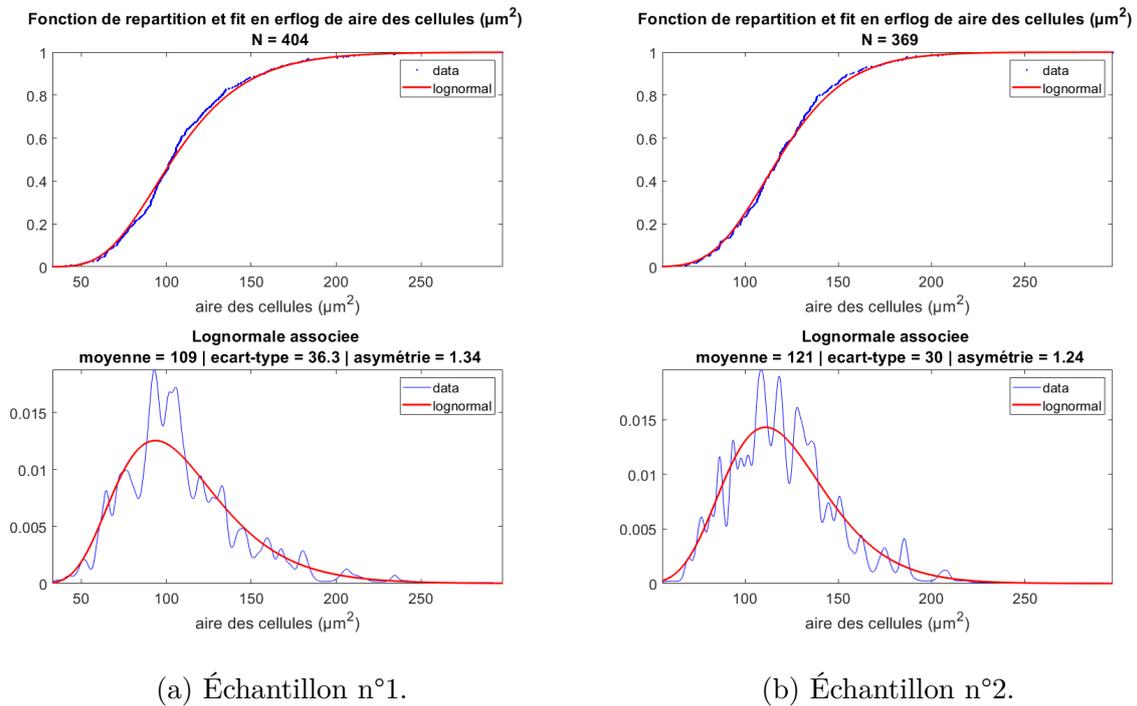


FIGURE A.5 – Distribution de l'aire des cellules dans le plan de l'épithélium.

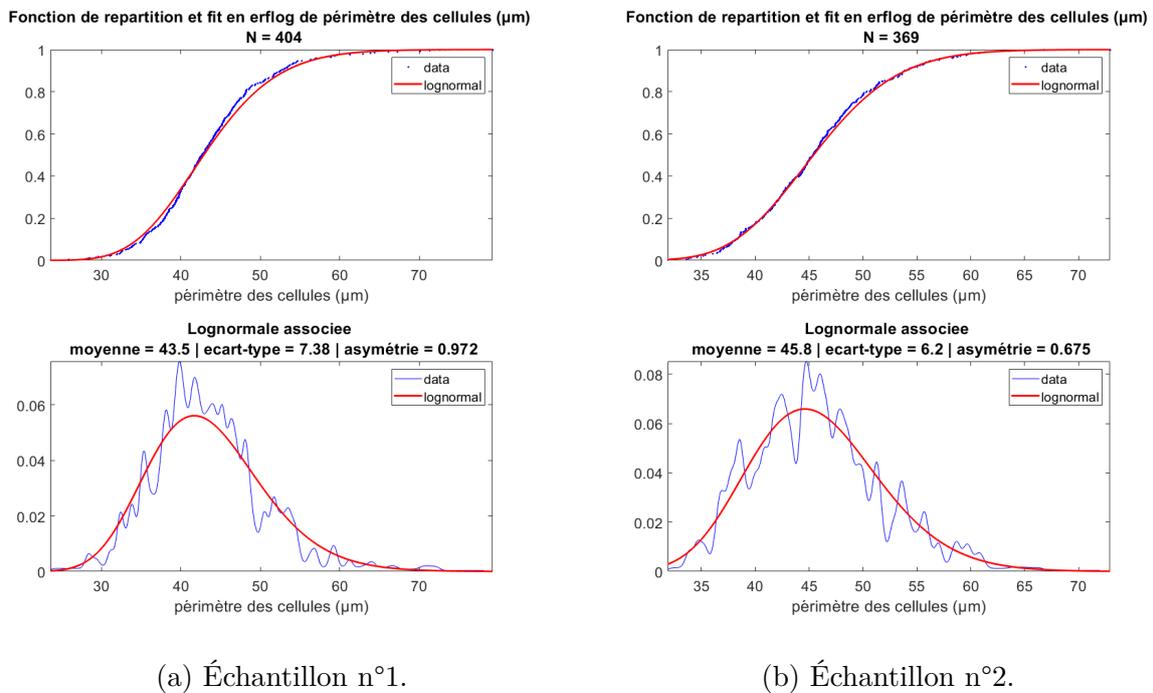
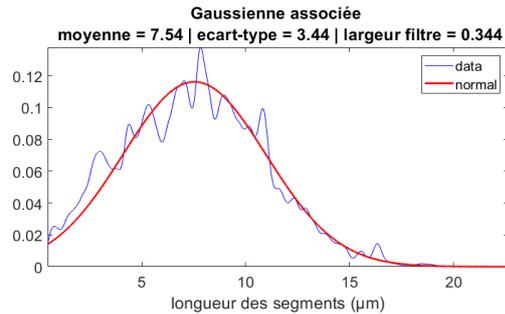
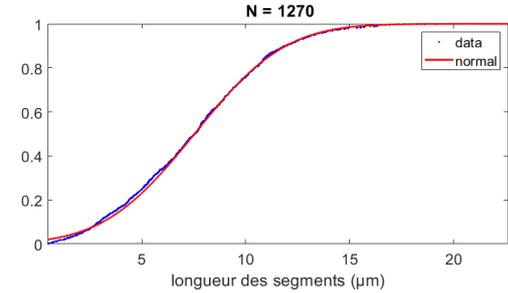


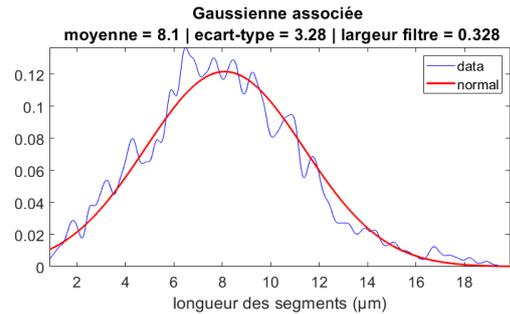
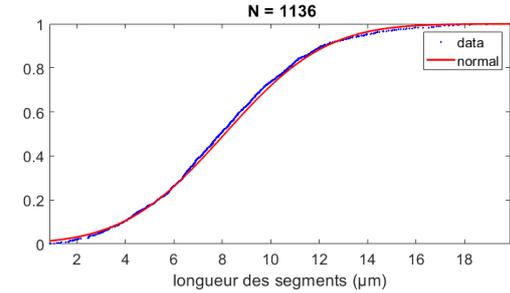
FIGURE A.6 – Distribution du périmètre des cellules dans le plan de l'épithélium.

Fonction de repartition et fit en erf de longueur des segments (μm)



(a) Échantillon n°1.

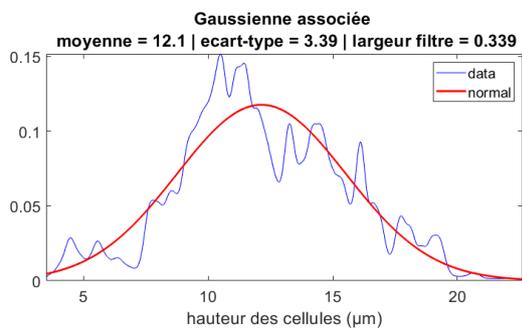
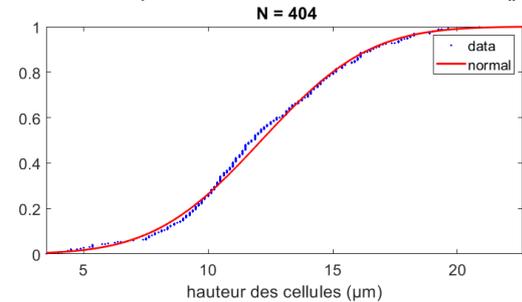
Fonction de repartition et fit en erf de longueur des segments (μm)



(b) Échantillon n°2.

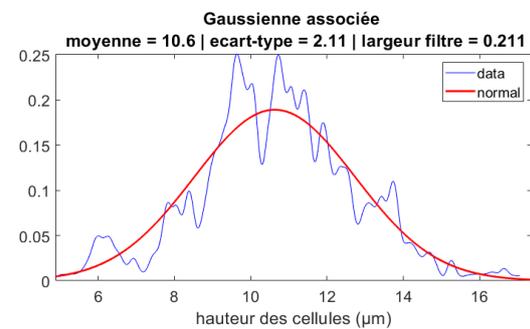
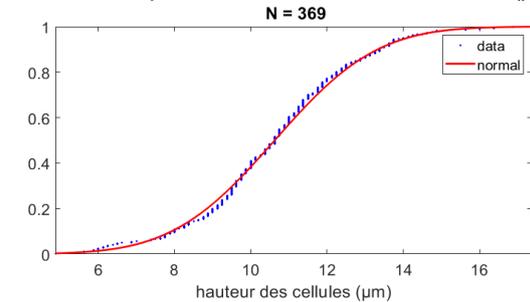
FIGURE A.7 – Distribution de la longueur des segments intercellulaires dans le plan de l'épithélium.

Fonction de repartition et fit en erf de hauteur des cellules (μm)



(a) Échantillon n°1.

Fonction de repartition et fit en erf de hauteur des cellules (μm)



(b) Échantillon n°2.

FIGURE A.8 – Distribution de la hauteur des cellules.

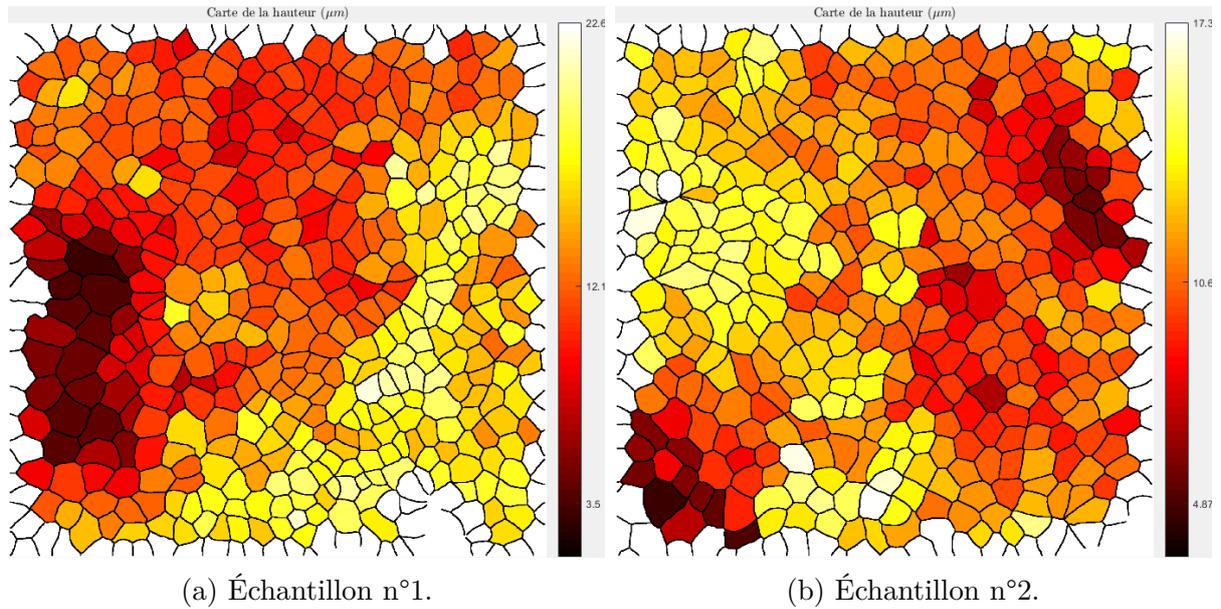


FIGURE A.9 – Carte de la hauteur des cellules.

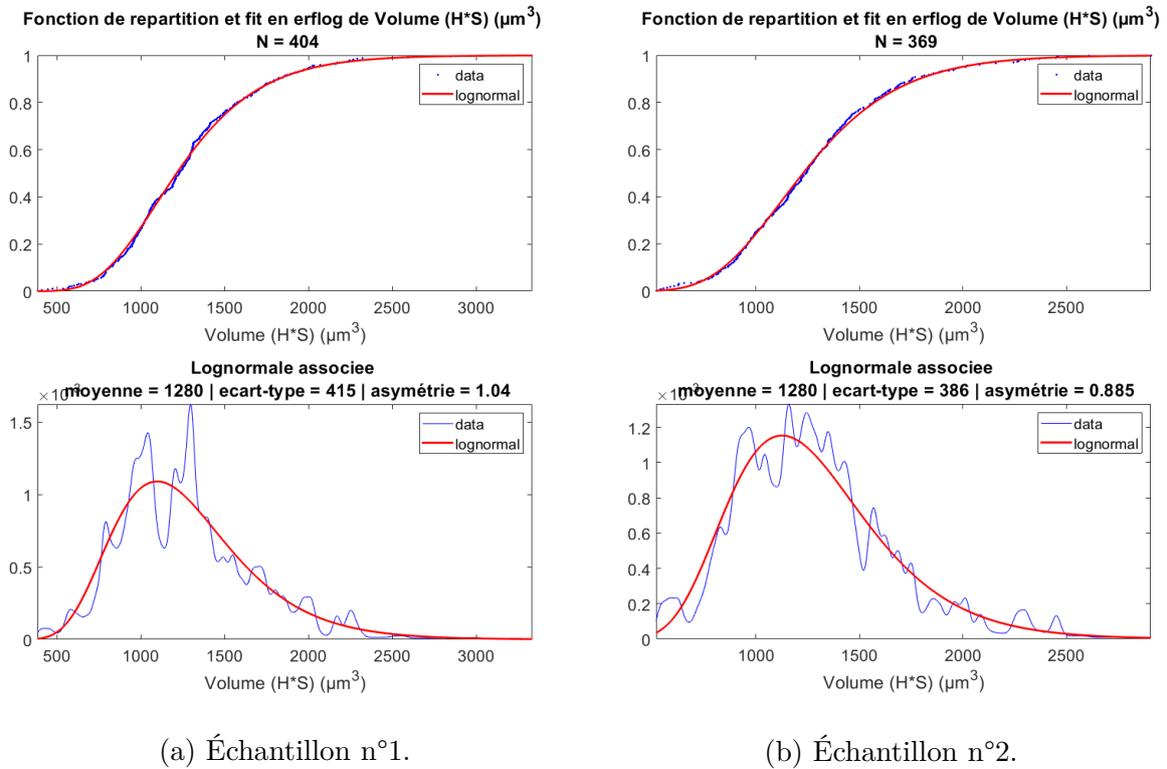


FIGURE A.10 – Distribution du volume des cellules.

Bibliographie

- [1] D. W. Thompson, *On Growth and Form*. 1945.
- [2] P. Alberts, Bruce and Johnson, Alexander and Lewis, Julian and Raff, Martin and Roberts, Keith and Walter, *Molecular Biology of the Cell*. 2014.
- [3] H. Gray, *Anatomy of the Human Body*. Lea & Febiger, 1918.
- [4] A. M. Leroi, *The Lagoon : How Aristotle Invented Science*. Viking, 2014.
- [5] N. Hartsoeker, *Essay de dioptrique*. J. Anisson, 1694.
- [6] W. Harvey, *Exercitationes de generatione animalium*. Apud Ioanem Ravesteynium. A° 1651., 1651.
- [7] K. E. von Baer, *De ovi mammalium et hominis genesi*. Vossil, 1827.
- [8] J. Needham, *A History of Embryology*. Abelard-Schuman, 1959.
- [9] M. C. Ledbetter and K. R. Porter, “A "Microtubule" in Plant Cell Fine Structure,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 19, pp. 239–250, Oct. 1963.
- [10] M. Chalfie and J. N. Thomson, “Organization of neuronal microtubules in the nematode *Caenorhabditis elegans*,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 82, pp. 278–289, July 1979.
- [11] M. Murrell, P. W. Oakes, M. Lenz, and M. L. Gardel, “Forcing cells into shape : The mechanics of actomyosin contractility,” *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 16, no. 8, pp. 486–498, 2015.
- [12] A. C. Martin and B. Goldstein, “Apical constriction : Themes and variations on a cellular mechanism driving morphogenesis,” *Development*, vol. 141, pp. 1987–1998, May 2014.
- [13] P. G. de Gennes, F. Brochard-Wyart, and D. Quere, *Capillarity and Wetting Phenomena : Drops, Bubbles, Pearls, Waves*. Springer, 2004.
- [14] T. Hayashi and R. W. Carthew, “Surface mechanics mediate pattern formation in the developing retina,” *Nature*, vol. 431, pp. 647–652, Oct. 2004.

- [15] M. S. Steinberg, “Reconstruction of Tissues by Dissociated Cells,” *Science*, vol. 141, pp. 401–408, Aug. 1963.
- [16] T. Lecuit and P.-F. Lenne, “Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis.,” *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 8, no. 8, pp. 633–644, 2007.
- [17] T. Betz, M. Lenz, J.-F. Joanny, and C. Sykes, “ATP-dependent mechanics of red blood cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, pp. 15320–15325, Sept. 2009.
- [18] Y. Z. Yoon, J. Kotar, A. T. Brown, and P. Cicuta, “Red blood cell dynamics : From spontaneous fluctuations to non-linear response,” *Soft Matter*, vol. 7, pp. 2042–2051, Feb. 2011.
- [19] J. M. Mitchison and M. M. Swann, “The Mechanical Properties of the Cell Surface : I. The Cell Elastimeter,” *Journal of Experimental Biology*, vol. 31, pp. 443–460, Sept. 1954.
- [20] G. Salbreux, G. Charras, and E. Paluch, “Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis,” *Trends in Cell Biology*, vol. 22, pp. 536–545, Oct. 2012.
- [21] X. Liu, Y. Wang, and Y. Sun, “Real-Time High-Accuracy Micropipette Aspiration for Characterizing Mechanical Properties of Biological Cells,” in *Proceedings 2007 IEEE International Conference on Robotics and Automation*, pp. 1930–1935, Apr. 2007.
- [22] E. Evans and A. Yeung, “Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration,” *Biophysical Journal*, vol. 56, pp. 151–160, July 1989.
- [23] J. Dai, H. Ping Ting-Beall, R. M. Hochmuth, M. P. Sheetz, and M. A. Titus, “Myosin I Contributes to the Generation of Resting Cortical Tension,” *Biophysical Journal*, vol. 77, pp. 1168–1176, Aug. 1999.
- [24] E. C. Schwarz, E. M. Neuhaus, C. Kistler, A. W. Henkel, and T. Soldati, “Dictyostelium myosin IK is involved in the maintenance of cortical tension and affects motility and phagocytosis,” *Journal of Cell Science*, vol. 113, pp. 621–633, Feb. 2000.
- [25] J.-Y. Tinevez, U. Schulze, G. Salbreux, J. Roensch, J.-F. Joanny, and E. Paluch, “Role of cortical tension in bleb growth,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, pp. 18581–18586, Nov. 2009.
- [26] A. X. Cartagena-Rivera, C. M. Van Itallie, J. M. Anderson, and R. S. Chadwick, “Apical surface supracellular mechanical properties in polarized epithelium using noninvasive acoustic force spectroscopy,” *Nature Communications*, vol. 8, p. 1030, Dec. 2017.

-
- [27] B. R. Brückner, “Elastic properties of epithelial cells probed by atomic force microscopy,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1853, pp. 3075–3082, Nov. 2015.
- [28] E. B. Lomakina, C. M. Spillmann, M. R. King, and R. E. Waugh, “Rheological Analysis and Measurement of Neutrophil Indentation,” *Biophysical Journal*, vol. 87, pp. 4246–4258, Dec. 2004.
- [29] C. Pasternak, J. A. Spudich, and E. L. Elson, “Capping of surface receptors and concomitant cortical tension are generated by conventional myosin,” *Nature*, vol. 341, pp. 549–551, Oct. 1989.
- [30] J.-L. Maître, H. Berthoumieux, S. F. G. Krens, G. Salbreux, F. Jülicher, E. Paluch, and C.-P. Heisenberg, “Adhesion Functions in Cell Sorting by Mechanically Coupling the Cortices of Adhering Cells,” *Science*, vol. 338, pp. 253–256, Oct. 2012.
- [31] T. V. Stirbat, A. Mgharbel, S. Bodenec, K. Ferri, H. C. Mertani, J.-P. Rieu, and H. Delanoë-Ayari, “Fine Tuning of Tissues’ Viscosity and Surface Tension through Contractility Suggests a New Role for α -Catenin,” *PLOS ONE*, vol. 8, p. e52554, Feb. 2013.
- [32] K. Bambardekar, R. Clément, O. Blanc, C. Chardès, and P.-F. Lenne, “Direct laser manipulation reveals the mechanics of cell contacts in vivo.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 112, pp. 1416–21, Feb. 2015.
- [33] A. R. Harris, L. Peter, J. Bellis, B. Baum, A. J. Kabla, and G. T. Charras, “Characterizing the mechanics of cultured cell monolayers,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, pp. 16449–16454, Oct. 2012.
- [34] A. G. Fletcher, M. Osterfield, R. E. Baker, and S. Y. Shvartsman, “Vertex Models of Epithelial Morphogenesis,” *Biophysical Journal*, vol. 106, pp. 2291–2304, June 2014.
- [35] F. Graner, Y. Jiang, E. Janiaud, and C. Flament, “Equilibrium states and ground state of two-dimensional fluid foams,” *Physical Review E*, vol. 63, p. 011402, Dec. 2000.
- [36] R. Farhadifar, J.-C. Röper, B. Aigouy, S. Eaton, and F. Jülicher, “The influence of cell mechanics, cell-cell interactions, and proliferation on epithelial packing,” *Current biology : CB*, vol. 17, pp. 2095–2104, Dec. 2007.
- [37] K. P. Landsberg, R. Farhadifar, J. Ranft, D. Umetsu, T. J. Widmann, T. Bittig, A. Said, F. Jülicher, and C. Dahmann, “Increased Cell Bond Tension Governs Cell Sorting at the Drosophila Anteroposterior Compartment Boundary,” *Current Biology*, vol. 19, pp. 1950–1955, Dec. 2009.

- [38] T. Aegerter-Wilmsen, M. B. Heimlicher, A. C. Smith, P. B. de Reuille, R. S. Smith, C. M. Aegerter, and K. Basler, “Integrating force-sensing and signaling pathways in a model for the regulation of wing imaginal disc size,” *Development*, vol. 139, pp. 3221–3231, Sept. 2012.
- [39] C. Bielmeier, S. Alt, V. Weichselberger, M. La Fortezza, H. Harz, F. Jülicher, G. Salbreux, and A.-K. Classen, “Interface Contractility between Differently Fated Cells Drives Cell Elimination and Cyst Formation,” *Current Biology*, vol. 26, pp. 563–574, Mar. 2016.
- [40] D. Bi, X. Yang, M. C. Marchetti, and M. L. Manning, “Motility-Driven Glass and Jamming Transitions in Biological Tissues,” *Physical Review X*, vol. 6, Apr. 2016.
- [41] T. Aegerter-Wilmsen, C. M. Aegerter, E. Hafen, and K. Basler, “Model for the regulation of size in the wing imaginal disc of *Drosophila*,” *Mechanisms of Development*, vol. 124, pp. 318–326, Apr. 2007.
- [42] A. Hočevar Brezavšček, M. Rauzi, M. Leptin, and P. Ziherl, “A Model of Epithelial Invagination Driven by Collective Mechanics of Identical Cells,” *Biophysical Journal*, vol. 103, pp. 1069–1077, Sept. 2012.
- [43] M. Misra, B. Audoly, I. G. Kevrekidis, and S. Y. Shvartsman, “Shape Transformations of Epithelial Shells,” *Biophysical Journal*, vol. 110, pp. 1670–1678, Apr. 2016.
- [44] T. Nagai and H. Honda, “A dynamic cell model for the formation of epithelial tissues,” *Philosophical Magazine B*, vol. 81, pp. 699–719, July 2001.
- [45] F. L. Wen, Y. C. Wang, and T. Shibata, “Epithelial Folding Driven by Apical or Basal-Lateral Modulation : Geometric Features, Mechanical Inference, and Boundary Effects,” *Biophysical Journal*, vol. 112, no. 12, pp. 2683–2695, 2017.
- [46] O. Polyakov, B. He, M. Swan, J. W. Shaevitz, M. Kaschube, and E. Wieschaus, “Passive Mechanical Forces Control Cell-Shape Change during *Drosophila* Ventral Furrow Formation,” *Biophysical Journal*, vol. 107, pp. 998–1010, Aug. 2014.
- [47] N. Štorgel, M. Krajnc, P. Mrak, J. Štrus, and P. Ziherl, “Quantitative Morphology of Epithelial Folds,” *Biophysical Journal*, vol. 110, pp. 269–277, Jan. 2016.
- [48] G. Trichas, A. M. Smith, N. White, V. Wilkins, T. Watanabe, A. Moore, B. Joyce, J. Sugnaseelan, T. A. Rodriguez, D. Kay, R. E. Baker, P. K. Maini, and S. Srinivas, “Multi-Cellular Rosettes in the Mouse Visceral Endoderm Facilitate the Ordered Migration of Anterior Visceral Endoderm Cells,” *PLOS Biology*, vol. 10, p. e1001256, Feb. 2012.
- [49] M. Osterfield, X. Du, T. Schüpbach, E. Wieschaus, and S. Y. Shvartsman, “Three-Dimensional Epithelial Morphogenesis in the Developing *Drosophila* Egg,” *Developmental Cell*, vol. 24, pp. 400–410, Feb. 2013.

-
- [50] N. Murisic, V. Hakim, I. G. Kevrekidis, S. Y. Shvartsman, and B. Audoly, “From Discrete to Continuum Models of Three-Dimensional Deformations in Epithelial Sheets,” *Biophysical Journal*, vol. 109, pp. 154–163, July 2015.
- [51] H. Honda, M. Tanemura, and T. Nagai, “A three-dimensional vertex dynamics cell model of space-filling polyhedra simulating cell behavior in a cell aggregate,” *Journal of Theoretical Biology*, vol. 226, pp. 439–453, Feb. 2004.
- [52] S. Okuda, Y. Inoue, M. Eiraku, Y. Sasai, and T. Adachi, “Apical contractility in growing epithelium supports robust maintenance of smooth curvatures against cell-division-induced mechanical disturbance,” *Journal of Biomechanics*, vol. 46, pp. 1705–1713, June 2013.
- [53] E. Hannezo, J. Prost, and J.-F. Joanny, “Theory of epithelial sheet morphology in three dimensions.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 1, pp. 27–32, 2014.
- [54] R. Etournay, M. Popović, M. Merkel, A. Nandi, C. Blasse, B. Aigouy, H. Brandl, G. Myers, G. Salbreux, F. Jülicher, and S. Eaton, “Interplay of cell dynamics and epithelial tension during morphogenesis of the *Drosophila* pupal wing,” *eLife*, vol. 4, p. e07090, June 2015.
- [55] S. H. Madin and N. B. Darby, “Established Kidney Cell Lines of Normal Adult Bovine and Ovine Origin.,” *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 98, pp. 574–576, July 1958.
- [56] J. D. Dukes, P. Whitley, and A. D. Chalmers, “The MDCK variety pack : Choosing the right strain,” *BMC Cell Biology*, vol. 12, no. 1, p. 43, 2011.
- [57] C. L. Adams, Y.-T. Chen, S. J. Smith, and W. James Nelson, “Mechanisms of Epithelial Cell–Cell Adhesion and Cell Compaction Revealed by High-resolution Tracking of E-Cadherin–Green Fluorescent Protein,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 142, pp. 1105–1119, Aug. 1998.
- [58] Z. Wang, A. A. Volinsky, and N. D. Gallant, “Crosslinking effect on polydimethylsiloxane elastic modulus measured by custom-built compression instrument,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 131, no. 22, 2014.
- [59] A. Puliafito, L. Hufnagel, P. Neveu, S. Streichan, A. Sigal, D. K. Fygenson, and B. I. Shraiman, “Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, pp. 739–744, Jan. 2012.
- [60] M. Taub, L. Chuman, M. H. Saier, and G. Sato, “Growth of Madin-Darby canine kidney epithelial cell (MDCK) line in hormone-supplemented, serum-free medium,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 76, pp. 3338–3342, July 1979.

- [61] A. F. Straight, A. Cheung, J. Limouze, I. Chen, N. J. Westwood, J. R. Sellers, and T. J. Mitchison, “Dissecting Temporal and Spatial Control of Cytokinesis with a Myosin II Inhibitor,” *Science*, vol. 299, pp. 1743–1747, Mar. 2003.
- [62] D. Mitrossilis, J. Fouchard, A. Guiroy, N. Desprat, N. Rodriguez, B. Fabry, and A. Asnacios, “Single-cell response to stiffness exhibits muscle-like behavior,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, pp. 18243–18248, Oct. 2009.
- [63] T. P. J. Wyatt, J. Fouchard, A. Lisica, N. Khalilgharibi, B. Baum, P. Recho, A. J. Kabla, and G. T. Charras, “Actomyosin controls planarity and folding of epithelia in response to compression,” *Nature Materials*, pp. 1–9, Aug. 2019.
- [64] M. Marvin, “Microscopy apparatus,” Dec. 1961.
- [65] J. Kapuscinski, “DAPI : A DNA-Specific Fluorescent Probe,” *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 70, pp. 220–233, Jan. 1995.
- [66] S. Inouye and F. I. Tsuji, “Aequorea green fluorescent protein,” *FEBS Letters*, vol. 341, no. 2-3, pp. 277–280, 1994.
- [67] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher, “Green fluorescent protein as a marker for gene expression,” *Science*, vol. 263, pp. 802–805, Feb. 1994.
- [68] O. Shimomura, F. H. Johnson, and Y. Saiga, “Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea,” *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, vol. 59, no. 3, pp. 223–239, 1962.
- [69] “SiR-actin - Live cell actin probe - spirochrome.”
<https://spirochrome.com/product/sir-actin-50-nmol/>.
- [70] D. A. Herzlinger, T. G. Easton, and G. K. Ojakian, “The MDCK epithelial cell line expresses a cell surface antigen of the kidney distal tubule,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 93, pp. 269–277, May 1982.
- [71] N. Bowden, S. Brittain, A. G. Evans, J. W. Hutchinson, and G. M. Whitesides, “Spontaneous formation of ordered structures in thin films of metals supported on an elastomeric polymer,” *Nature*, vol. 393, pp. 146–149, May 1998.
- [72] F. Brau, H. Vandeparre, A. Sabbah, C. Poulard, A. Boudaoud, and P. Damman, “Multiple-length-scale elastic instability mimics parametric resonance of nonlinear oscillators,” *Nature Physics*, vol. 7, pp. 56–60, Jan. 2011.
- [73] D. Sage, D. Prodanov, J.-Y. Tinevez, and J. Schindelin, “MIJ : Making Interoperability Between ImageJ and Matlab Possible,” p. 1, 2012.
- [74] B. Aigouy, D. Umetsu, and S. Eaton, “Segmentation and Quantitative Analysis of Epithelial Tissues,” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1478, pp. 227–239, 2016.

-
- [75] P. A. Coulombe and P. Wong, “Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds,” *Nature Cell Biology*, vol. 6, pp. 699–706, Aug. 2004.
- [76] M. M. a. E. Claessens, R. Tharmann, K. Kroy, and A. R. Bausch, “Microstructure and viscoelasticity of confined semiflexible polymer networks,” *Nature Physics*, vol. 2, pp. 186–189, Mar. 2006.
- [77] M. T. Valentine, Z. E. Perlman, T. J. Mitchison, and D. A. Weitz, “Mechanical Properties of *Xenopus* Egg Cytoplasmic Extracts,” *Biophysical Journal*, vol. 88, pp. 680–689, Jan. 2005.
- [78] M. O. Robbins, D. Andelman, and J. F. Joanny, “Thin liquid films on rough or heterogeneous solids,” *Physical Review A*, vol. 43, no. 8, pp. 4344–4354, 1991.
- [79] D. Andelman, J.-F. Joanny, and M. O. Robbins, “Complete Wetting on Rough Surfaces : Statics,” *Europhysics Letters (EPL)*, vol. 7, no. 8, pp. 731–736, 1988.
- [80] M. A. Gelbart, B. He, A. C. Martin, S. Y. Thiberge, E. F. Wieschaus, M. Kaschube, and K. Matthias, “Volume conservation principle involved in cell lengthening and nucleus movement during tissue morphogenesis.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, pp. 19298–303, Nov. 2012.
- [81] I. Arganda-Carreras, V. Kaynig, C. Rueden, K. W. Eliceiri, J. Schindelin, A. Cardona, and H. Sebastian Seung, “Trainable Weka Segmentation : A machine learning tool for microscopy pixel classification,” *Bioinformatics*, vol. 33, pp. 2424–2426, Aug. 2017.
- [82] J. Cohen, *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Hillsdale, N.J. : L. Erlbaum Associates, 1988. OCLC : 17877467.
- [83] J. Lagarias, J. Reeds, M. Wright, and P. Wright, “Convergence Properties of the Nelder–Mead Simplex Method in Low Dimensions,” *SIAM Journal on Optimization*, vol. 9, pp. 112–147, Jan. 1998.
- [84] J. Solon, A. Kaya-Çopur, J. Colombelli, and D. Brunner, “Pulsed Forces Timed by a Ratchet-like Mechanism Drive Directed Tissue Movement during Dorsal Closure,” *Cell*, vol. 137, pp. 1331–1342, June 2009.
- [85] J. L. Maitre, H. Berthoumieux, S. F. G. Krens, G. Salbreux, F. Julicher, E. Paluch, and C. P. Heisenberg, “Adhesion Functions in Cell Sorting by Mechanically Coupling the Cortices of Adhering Cells,” *Science*, vol. 338, pp. 253–256, Oct. 2012.
- [86] M. Kovács, J. Tóth, C. Hetényi, A. Málnási-Csizmadia, and J. R. Sellers, “Mechanism of Blebbistatin Inhibition of Myosin II,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, pp. 35557–35563, Aug. 2004.
- [87] J. Valentich, “Hemicyst formation stimulated by cyclic AMP in dog kidney cell line MDCK,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 100, pp. 291–304, Aug. 1979.

- [88] C. A. Rabito, R. Tchao, J. Valentich, and J. Leighton, “Effect of cell-substratum interaction on hemicyst formation by MDCK cells,” *In Vitro*, vol. 16, no. 6, pp. 461–468, 1980.
- [89] J. E. Lever, “Regulation of dome formation in differentiated epithelial cell cultures.,” *Journal of supramolecular structure*, vol. 12, pp. 259–272, 1979.
- [90] E. Latorre, S. Kale, L. Casares, M. Gómez-González, M. Uroz, L. Valon, R. V. Nair, E. Garreta, N. Montserrat, A. del Campo, B. Ladoux, M. Arroyo, and X. Trepát, “Active superelasticity in three-dimensional epithelia of controlled shape,” *Nature*, vol. 563, pp. 203–208, Nov. 2018.
- [91] M. B. Stein and R. Gordon, “Epithelia as bubble rafts : A new method for analysis of cell shape and intercellular adhesion in embryonic and other epithelia,” *Journal of Theoretical Biology*, vol. 97, no. 4, pp. 625–639, 1982.
- [92] G. W. Brodland, J. H. Veldhuis, S. Kim, M. Perrone, D. Mashburn, and M. S. Hutson, “CellFIT : A cellular force-inference toolkit using curvilinear cell boundaries,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 6, 2014.
- [93] P. Gómez-Gálvez, P. Vicente-Munuera, A. Tagua, C. Forja, A. M. Castro, M. Letrán, A. Valencia-Expósito, C. Grima, M. Bermúdez-Gallardo, Ó. Serrano-Pérez-Higueras, F. Cavodeassi, S. Sotillos, M. D. Martín-Bermudo, A. Márquez, J. Buceta, and L. M. Escudero, “Scutoids are a geometrical solution to three-dimensional packing of epithelia,” *Nature Communications*, vol. 9, Dec. 2018.

Abstract :

Building a physical framework to account for the shape of cells in epithelia is an important challenge to understand various biological processes, such as embryogenesis. The work presented in this thesis aims to understand how surface tensions and line tensions shape epithelial cells, using microstructured substrates, confocal fluorescence microscopy, force inference and theory.

We cultured epithelial cells on either flat or curved substrates and we explored the influence of the curvature of the substrate on the shape of these cells, especially the resulting thickness of the epithelial sheet. The model we propose to account for our measurements aims at computing the shape of individual cells within an epithelium using differentiated surface tensions for the different interfaces (cell-cell, cell-substrate and apical surface tensions) and an apical line tension.

We combined these measurements with force inference within the tissue using both the shape of cells in the epithelial sheet plane and the shape of the intercellular junctions within the thickness of the epithelium. We thus can infer which parameters determine the three dimensional shape of the cells and we can evaluate values for the different interfacial tensions by comparing the three-dimensional cell shape measurements with the predictions of the model and the predictions of force inference.

Résumé :

La compréhension physique de la forme des cellules épithéliales est un défi important pour comprendre divers processus biologiques, comme l'embryogenèse. Le travail présenté dans cette thèse vise à comprendre comment des ingrédients physiques comme les tensions de surfaces peuvent expliquer la forme des cellules épithéliales, par des expériences sur substrats microstructurés, de l'analyse d'images et de la théorie.

On a cultivé des cellules épithéliales sur des substrats plats ou courbés et on a exploré l'influence de la courbure du substrat sur la forme de ces cellules, particulièrement l'épaisseur de l'épithélium qui en résulte. Le modèle que l'on propose pour rendre compte de ces mesures d'épaisseur vise à calculer la forme des cellules individuelles au sein d'un épithélium en utilisant des tensions de surface différentes pour les différentes interfaces (tensions de surface cellule-cellule, cellule-substrat et apicale), et une tension de ligne apicale.

On a combiné ces mesures avec l'inférence de force dans le tissu en utilisant à la fois la forme des cellules dans le plan de l'épithélium et la forme des jonctions intercellulaires dans l'épaisseur de l'épithélium. On peut alors déduire quels paramètres déterminent la forme tridimensionnelle des cellules et évaluer les valeurs des différentes tensions mises en jeu, en comparant les mesures tridimensionnelles de la forme des cellules avec les prédictions du modèle et les prédictions de l'inférence de force.