



HAL
open science

Migration cellulaire par forçage d'hétérogénéité

Mélina Durande

► **To cite this version:**

Mélina Durande. Migration cellulaire par forçage d'hétérogénéité. Physique [physics]. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP7059 . tel-03205898

HAL Id: tel-03205898

<https://theses.hal.science/tel-03205898>

Submitted on 22 Apr 2021

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

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

Thèse de doctorat
de l'Université de Paris

École doctorale n° 564 : Physique en Île-de-France

Matière et Systèmes Complexes (Paris)
et Institut Lumière Matière (Lyon)

Migration cellulaire par forçage d'hétérogénéité

Par Méлина Durande

Thèse de doctorat de Physique

dirigée par François Graner
et Hélène Delanoë-Ayari

Présentation publique à Paris le 28 Août 2020

M. Clément, Raphaël,	Examineur
Mme Delanoë-Ayari, Hélène,	Directrice de thèse
M. Graner, François,	Directeur de thèse
Mme Massiera, Gladys,	Rapporteure
M. Mège, René-Marc,	Examineur
M. Ott, Albrecht,	Rapporteur



Table des matières

Table des matières	iii
I Introduction	3
1 Aspects biologiques	4
1.1 Motivations	4
1.2 Acteurs principaux	6
1.2.a Cytosquelette	6
1.2.b Moteurs moléculaires	10
1.2.c Adhésions cellulaires	11
2 Aspects biophysiques	12
2.1 Motivations physiques	12
2.2 État de l’art	14
2.2.a Différentes approches en mécanique des tissus cellulaires	15
2.2.b Monocouches en migration in vitro	17
3 Écoulement hétérogène	22
3.1 État de l’art	22
3.2 Approche de cette thèse	25
II Méthodes	27
1 Expérimentales	27
1.1 Préparation des substrats avec motifs	27
1.1.a Préparation de substrat dur	27
1.1.b Substrat pour microscopie de force de traction	28
1.1.c Impression de motifs protéiques	30
1.2 Dépôt des cellules sur les motifs protéiques	33
1.2.a Motifs en bandes	33
1.2.b Motif en hippodrome	34
1.2.c Protocoles d’utilisation de drogues	34
1.3 Acquisition d’images	35
1.3.a Imagerie vivante	36
1.3.b Imagerie fixée	37
2 Analyse d’images	38
2.1 Système de représentation canonique	38
2.2 Analyse des images de phase	39
2.2.a Vitesse et dérivées	40
2.2.b Forme cellulaire	43
2.2.c Densité	44
2.3 Analyse d’images fixées	47
2.4 Analyse couplée imagerie vivante et fixée	47
2.5 Analyse des images de fluorescence pour la force	51

III Migration en bandes	57
1 Cinématique de la migration	57
1.1 Vitesse	57
1.2 Déformation cellulaire eulérienne	60
2 Asymétrie et organisation cellulaire et protéique	63
2.1 Densité	63
2.2 Actine	64
2.3 Kératine	66
2.4 Vimentine	67
3 Cinématique, densité cellulaire et protéique	72
4 Polarisation	76
4.1 Définition de la polarisation	76
4.2 Polarisation et vitesse	76
IV Perturber les acteurs de la migration	79
1 Réseaux d'actine branchés : CK666	79
2 Moteurs moléculaires : blebbistatine	83
3 Filaments intermédiaires : simvastatine	85
4 Microtubules : nocodazole	89
V Migration en hippodrome sur substrat dur	93
1 Cinématique	93
1.1 Étude grande échelle	93
1.1.a Longueur de cohérence	93
1.1.b Influence des caractéristiques géométriques	95
1.2 En représentation identique au bord libre	95
1.2.a Vitesse	96
1.2.b Déformation	98
2 Etude protéique	103
3 Cinématique, densité cellulaire et protéique	105
VI Migration en hippodrome sur substrat mou	109
1 Cinématique de la migration	109
1.1 Vitesse	109
1.2 Déformation	112
2 Forces	113
2.1 Hippodrome entier	113
2.2 Autour de l'obstacle	114
2.3 Corrélation force-vitesse	116
2.4 Résumé et Discussion	120
VII Comparaison des différentes expériences	121
1 Comparaison cinématique	121
1.1 Hippodrome dur vs mou	121
1.2 Hippodrome dur vs bande dure	123
2 Effet du front libre	125

VII Conclusion	127
1 Génération de flots à grande échelle	127
2 Influence de différents acteurs biologiques	128
3 Forces	129
A Détails des méthodes	131
1 Préparation des tampons pour impression	131
2 Culture cellulaire	132
3 Préparation de produits	133
4 Étude rhéologique du substrat	133
5 Effet de la mitomycine C	135
5.1 Évolution de la densité	135
5.2 Évolution de la vitesse	135

Résumé

La migration cellulaire est essentielle dans divers processus biologiques tels que l'embryogenèse, la cicatrisation ou les invasions métastatiques. L'objectif de cette thèse était d'identifier et d'extraire les paramètres utiles à l'établissement de modèles physiques ainsi qu'à la compréhension biologique de la migration collective. Pour cela, nous étudions la migration cellulaire autour d'un obstacle. Cela induit des hétérogénéités qui sont discriminantes pour l'établissement de modèles. Nous voulions mesurer dans cette géométrie les champs de vitesses, de déformations et de forces exercées par les cellules sur le substrat.

La géométrie initiale du motif protéique sur lequel nos cellules sont déposées est celle d'une bande avec un obstacle sur laquelle des cellules sont confinées par un bloc qui, une fois retiré, permet au tissu d'envahir l'espace libre. La première partie de cette thèse étudie cette configuration, d'un point de vue cinématique et protéique. On retient en particulier l'obtention de courbes maîtresses en vitesse et déformation, la corrélation entre vitesse et densité, et l'enrichissement de la vimentine en bord de motif confiné et en front de migration. Un ensemble de relations entre niveaux d'actine, de vimentine, densité, déformation, et vitesse est également trouvé. Enfin, on montre que la direction de la polarisation définie par le vecteur centre de masse du noyau à centre de masse de la cellule est en moyenne orthogonale à la direction de la vitesse.

La géométrie en bande à l'avantage de forcer l'écoulement et d'être très contrôlée mais a le désavantage de nécessiter la pose d'un bloc qui n'est pas possible sur un substrat de faible rigidité pour l'étude des forces. Pour contourner ce problème nous avons fermé les conditions aux limites et travaillé sur une géométrie en hippodrome qui possède deux obstacles aux milieux de chacun des bras. Nous avons parié sur la génération spontanée d'un écoulement à grande échelle, ce qui s'est révélé exact. La troisième partie des résultats étudie les hippodromes sur un substrat dur (en opposition au substrat mou pour les forces). On retient la possibilité de générer un flot de longue portée et la présence de vimentine en bord de motif. On retient également que la relation vitesse densité n'est plus valable dans cette géométrie, ce qui atteste que lorsqu'elle existe, elle est en fait une conséquence de la dynamique d'étalement du tissu et non de la dynamique de migration en tant que tel. On trouve également une relation entre actine et vimentine qui met en évidence trois états cellulaires possibles. Le premier correspond aux cellules très déformées et riches en vimentine, le second aux cellules très denses et riches en actine, le troisième aux états intermédiaires de déformation et densité où les cellules bougent et où actine et vimentine varient ensemble.

La dernière partie de cette thèse consiste à étudier les forces (substrat mou) par microscopie de force de traction. Ces expériences confirment qu'une monocouche en migration est contractile et nous montrons qu'il est équivalent de mesurer le déplacement des billes dans le substrat ou le déplacement des cellules à petite échelle sur des images de phase. En d'autre terme, la vitesse instantanée (celle utilisée par les théoriciens mais non mesurable expérimentalement) est égale à la dérivée des positions des billes. Nous concluons qu'il y a continuité du déplacement entre le substrat et la cellule.

À partir d'un objectif initial qui était d'étudier la migration autour d'un obstacle, le développement d'un système à grande échelle sur des hippodromes permet de mieux comprendre les ingrédients sous-jacents de la migration, tout en développant le cadre expérimental qui permet de faire des comparaisons quantitatives entre systèmes.

Abstract

Cell migration is essential in various biological processes such as embryogenesis, wound healing, metastatic invasions or immune response. The objective of this thesis was to identify and extract parameters useful for the establishment of physical models and the biological understanding of collective migration. To do this, we study cell migration around an obstacle. Indeed, the presence of an obstacle in a flow induces heterogeneities which are discriminating for the establishment of models and we wanted to add to the information of velocities and deformations those of the forces exerted by the cells on the substrate.

Initially, the protein pattern geometry on which our cells are deposited is that of a band with an obstacle. Cells are confined by a block which, once removed, allows the tissue to invade free space and flow around the obstacle. The first part of this thesis studies this configuration, from a kinematic and proteomic levels point of view. In particular, we obtain master curves in velocity and deformation, a correlation between velocity and density, and an enrichment of the vimentin at the edge of the confined pattern and at the migration front. A set of relationships between actin, vimentin levels, density, deformation, and velocity is also found. Finally, it is shown that the direction of polarization defined by the core to center of mass vector of the cell is on average orthogonal to the direction of velocity.

The strip geometry has the advantage of forcing the flow and being very controlled but has the disadvantage of requiring the installation of a block. It is not possible to lay the block on a substrate of low rigidity for force measurements, and to get around this problem we closed the boundary conditions and worked on a racetrack geometry that has two obstacles in the middle of each arm. We wagered on spontaneous generation of large-scale flow, which proved to be correct. The third part of the results studies the racetracks on a hard substrate (as opposed to a soft substrate for forces). The possibility of generating a long-range flow and the presence of vimentin at the edge of the pattern are retained. We also note that the velocity- density relationship is no longer valid in this geometry, which attests that when it exists, it is in fact a consequence of the spreading dynamics of the monolayer and not of the migration dynamics as such. There is also a relationship between actin and vimentin which illustrates three possible cell states. The first corresponds to very deformed and vimentin-rich cells, the second to very dense and actin-rich cells, and the third to intermediate states of deformation and density where the cells move and where actin and vimentin vary together.

The last part of this thesis consists in studying the forces (soft substrate) by traction force microscopy. These experiments confirm that a migrating monolayer is contractile and we show that it is equivalent to measure the displacement of beads in the substrate or the displacement of cells at small scale on phase images. In other words, the instantaneous velocity (the one used by the theoreticians but not experimentally measurable) is equal to the bead position derivative. We conclude that there is continuity of motion between the substrate and the cell. Keeping in mind our first goal to study the migration around an obstacle, the development of a large-scale system on racetracks allows us to better understand the underlying ingredients of migration while developing the experimental framework that allows quantitative comparisons between systems.

Chapitre I

Introduction

La migration cellulaire est essentielle dans divers processus biologiques tels que l'embryogenèse, la cicatrisation, les invasions métastatiques ou la réponse immunitaire [1] [2]. De nombreuses études se sont intéressées au déplacement d'une cellule unique (pour plus d'informations voir la revue [3]), autant d'un point de vue biologique que d'un point de vue physique. Mais la plupart des processus biologiques pour lesquels des déplacements cellulaires sont observables se font à l'échelle de l'assemblée de cellules [1], [4] et non de la cellule unique. C'est à cette échelle que cette thèse se situe.

La migration collective de cellules peut se définir comme la corrélation au sens large du mouvement cellulaire avec le mouvement global de l'ensemble. Non seulement les cellules bougent avec des mouvements corrélés, mais cela est en partie dû aux interactions cellulaires, et non pas à différents acteurs indépendants qui iraient tous à la même vitesse sans être affectés les uns par les autres. On différencie par ailleurs un processus de migration d'un processus de croissance lié à la division cellulaire, bien que cette dernière puisse aussi générer un déplacement net.

Des cellules isolées en culture sur un substrat se déplacent [5] et pour ce faire elles se déforment et génèrent des protrusions qui leur permettent d'exercer des forces [6], [7] sur le substrat. Au niveau tissulaire, la déformation d'un tissu peut être due à des déformations cellulaires mais aussi à des changements de voisins qui nécessitent de remodeler les liens intercellulaires [8]. Derrière le terme de migration collective de cellules se cache donc le terme d'activité cellulaire, qui regroupe l'ensemble des processus consommateurs d'énergie.

De nombreuses approches existent pour étudier la migration collective de cellules. La première regroupe l'ensemble des études dites *in vivo* (au sein d'un organisme vivant), comme par exemple dans la mouche (*Drosophila Melanogaster*) [9], le crapaud (*Xenopus Laevis*) [10] ou encore le poisson-zèbre (*Danio Rerio*) [11]. Ces études sont physiologiquement pertinentes, et de plus en plus d'outils génétiques existent aujourd'hui pour perturber ces systèmes afin de mieux en comprendre leur fonctionnement. Mais leur limitation principale réside dans leur avantage. En effet, perturber des propriétés fondamentales d'un organisme implique bien souvent sa létalité. Enfin, il a été démontré que la génétique seule ne fait pas tout, et que les propriétés mécaniques du tissu (forces exercées par les cellules, contraintes géométriques) sont indispensables à sa compréhension globale [12], [13], [9]. Or, perturber mécaniquement un organisme est une chose complexe, et le faire de façon contrôlée tout en mesurant la réponse de cet organisme ajoute encore un niveau de complexité supplémentaire. En comparai-

son, une approche *in vitro* (expériences créées artificiellement), bien que moins physiologique, a de nombreux avantages aux yeux du physicien. En effet, elle permet : de poser des questions de physique, de décorréler les aspects génétiques d'aspects physiques, de contrôler la géométrie et l'environnement des expériences, de faciliter les comparaisons avec les modélisations (analytiques ou numériques), de choisir les échelles de travail de temps et d'espace, d'avoir une grande répétabilité, et enfin d'éviter l'expérimentation animale.

Cette thèse s'intéresse donc à la migration collective *in vitro*. Plus précisément nous travaillons sur des cellules dites épithéliales, c'est à dire issues d'un tissu de revêtement qui recouvre les surfaces internes et externes du corps, des cavités organiques et des conduits et canaux. Les cellules choisies sont des cellules épithéliales de rein de chien polarisées (Madin-Darby canine kidney cells, MDCK II) qui sont parmi les plus utilisées dans la communauté scientifique. Elles ont l'avantage d'être faciles à manipuler et à garder en culture, et surtout d'être cohésives[14],[15] ce qui est une propriété nécessaire à l'étude des mouvements collectifs. Les prochaines pages développent les motivations et acteurs biologiques principaux, ainsi que les questions physiques qui ont motivé la réalisation de ce travail. Un état de l'art situe ensuite précisément le travail réalisé dans cette thèse et permet de détailler l'approche retenue.

1 Aspects biologiques

1.1 Motivations

Cette partie présente les trois phénomènes principaux à l'échelle du tissu cellulaire dans lesquels la migration collective est primordiale. Il s'agit de l'embryogenèse (le processus de formation d'un organisme pluricellulaire), de la cicatrisation (processus de régénération), et des processus métastatiques (invasion tumorale à distance).

Embryogenèse Au cours de l'embryogenèse, un organisme passe d'une cellule œuf unique à un organisme constitué de toute une assemblée de cellules différenciées au travers de nombreuses étapes distinctes. Ce processus commence par une étape de prolifération cellulaire (ou encore segmentation) suivie de la gastrulation au cours de laquelle de larges mouvements cellulaires sont observés. Les cellules s'y déplacent à des vitesses qui peuvent atteindre jusqu'à $15 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ dans le dos de la drosophile [16], soit plus d'une taille cellulaire en une heure. Non seulement les cellules se déplacent, mais elles se déforment aussi significativement [17],[18]. Il y a une réorganisation complète du tissu à ce stade de l'embryogenèse, comme le montre la figure I.1. La gastrulation permet le façonnement de la monocouche initiale en plusieurs feuilletts fondamentaux qui se déplacent les uns par rapport aux autres pour former des organes entiers (organogenèse).

La cicatrisation Lorsqu'une blessure est infligée à un tissu épithélial, il cicatrise ; un nouveau tissu vient recouvrir la plaie. Cette cicatrisation se fait par une combinaison de prolifération et de migration cellulaire [19]. Comprendre les processus de migration cellulaire pourrait permettre d'une part d'imaginer des solutions aux retards de cicatrisation associés à de nombreuses pathologies, et d'autre part de contrôler ou de réduire certaines cicatrisations imparfaites à l'origine de processus tumoraux.

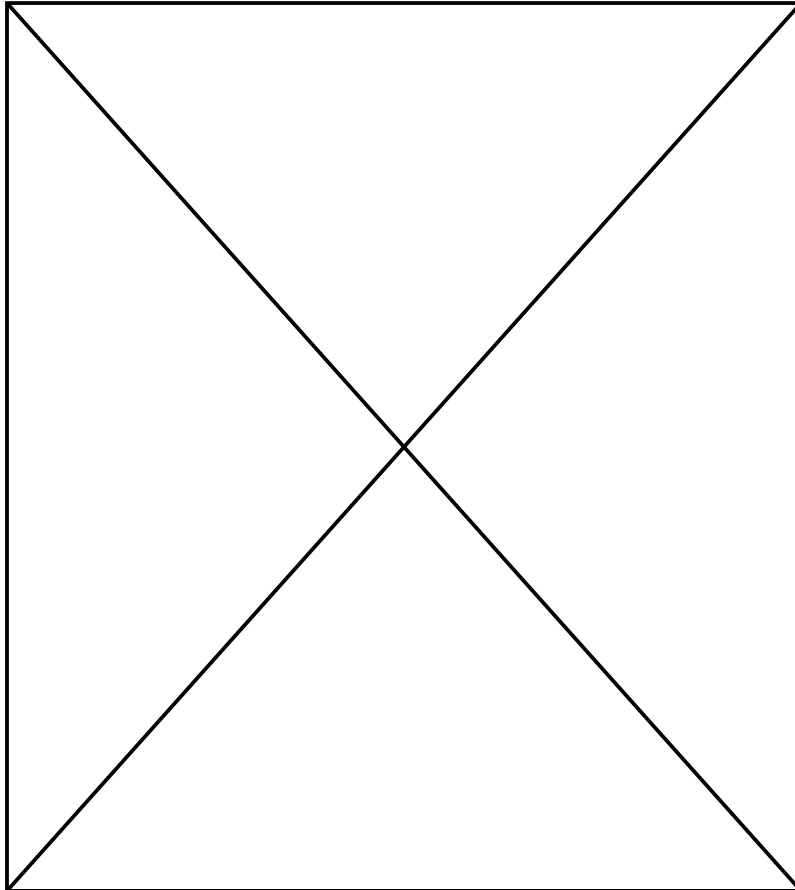


FIGURE I.1 – La gastrulation dans l’embryon de drosophile. L’état initial de l’embryon en haut, puis environ 15 minutes après l’état initial, au milieu, et environ 25 minutes après l’état initial, en bas. Les cellules subissent des changements de forme importants et rapides et créent les plis nécessaires à l’invagination. Extrait de la vidéo du Laboratory for the Physics of Life à Princeton University.

Les processus métastatiques Une métastase se définit par la présence d'un foyer tumoral éloigné de la tumeur primaire. Cela implique que des cellules de la tumeur primaire ont pu la quitter, atteindre le système sanguin et s'implanter ailleurs avant de se remultiplier. La majorité des études considère que cette migration est réalisée par le changement phénotypique de cellules en bordure de tumeurs qui subissent une transition dite épithélio-mésenchymateuse (EMT). Cette transition leur confère des caractéristiques de cellules mésenchymes, c'est-à-dire que leur motilité est accrue [20], et qu'elles se désolidarisent du reste de la tumeur. Il existe aussi des preuves d'invasions tumorales par des assemblées de cellules ayant subi une transition EMT partielle [21],[22]. Les invasions tumorales par transition EMT sont aujourd'hui encore un sujet actif de recherches [23], [24]. Mieux comprendre un des phénomènes clés des processus métastatiques est une porte ouverte à de multiples pistes thérapeutiques, notamment pour les cancers les plus invasifs, et s'inscrit dans une politique de santé publique, le cancer étant la première cause de mortalité en France aujourd'hui.

1.2 Acteurs principaux

Un tissu cellulaire est composé d'un ensemble de cellules liées par des adhésions. Dans cette section, nous rappelons brièvement les différents composants d'une cellule, et d'autre part l'organisation qui permet aux cellules de former un tissu.

Une cellule peut être décrite de façon simplifiée comme étant l'association d'une membrane et d'un cytoplasme dans lequel se trouve un noyau (porteur de l'information génétique), des organelles, et des filaments. De nombreux manuels existent à ce sujet [25] et seuls les composants indispensables à la bonne compréhension de cette thèse sont détaillés ici. En particulier, nous parlerons du cytosquelette et des moteurs moléculaires, avant de parler des adhésions cellulaires qui sont indispensables à la formation d'un tissu.

1.2.a Cytosquelette

Le cytosquelette (Fig.I.2) d'une cellule est l'ensemble organisé des polymères biologiques qui lui confèrent l'essentiel de ses propriétés architecturales et mécaniques. Ces polymères sont appelés des filaments et il en existe trois grandes classes : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Tous sont issus de l'auto-association de protéines nanométriques distinctes qui leur confèrent différentes propriétés. Par ailleurs, contrairement à des macromolécules telles que l'ADN, les filaments qui composent le cytosquelette n'ont pas de liaisons covalentes entre leurs sous-unités protéiques mais seulement des liaisons faibles, ce qui les rend très dynamiques.

Actine Les filaments d'actine (Actine F pour filamenteuse) sont formés par l'assemblage de monomères d'actine dite globulaire (Actine G) qui diffusent dans le cytosol. Ces filaments sont polarisés et suivent un cycle de polymérisation et dépolymérisation défini par une concentration critique en actine globulaire cytosolique. Ils sont les plus petits filaments avec un diamètre de 7 nm.

En plus des monomères d'actine G, les filaments d'actine sont composés de protéines associées qui varient en fonction de la structure finale à adopter par le filament et de ses propriétés mécaniques. Au sein d'une cellule, quatre structures ayant des fonctions

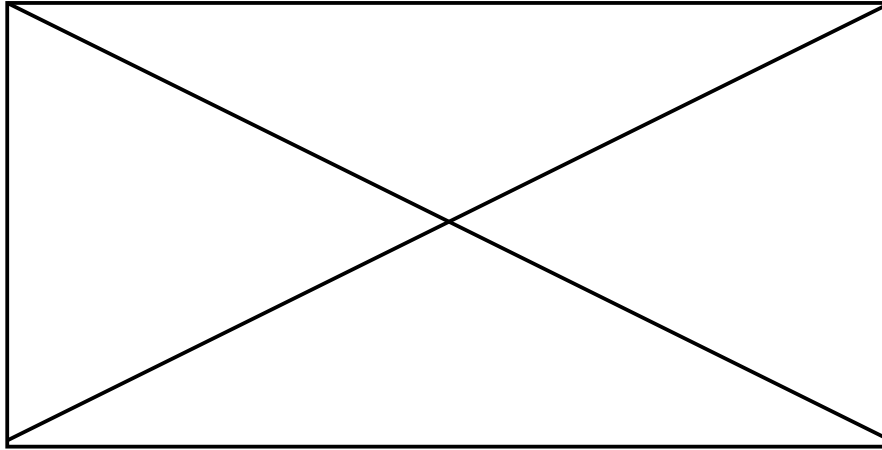


FIGURE I.2 – Représentation schématique du cytosquelette. Schéma issu de [26].

variées sont observables : des réseaux d'actine ramifiés, des maillages réticulés, des faisceaux d'actine parallèles et des faisceaux d'actine antiparallèles. Chacune de ces structures confère à la cellule des fonctions différentes :

- Les maillages réticulés s'observent en majorité au niveau du cortex cellulaire et servent à maintenir la forme et l'intégrité mécanique de la cellule [27],[28]. Les myosines provoquent la contraction de ce réseau et le mettent sous tension.
- Les faisceaux d'actine parallèles, qu'on retrouve dans de nombreuses configurations dans les filopodes ou les microvili [29],[30].
- Les faisceaux d'actine antiparallèles, nécessaires à tous les phénomènes qui induisent une contraction d'acto-myosine [31],[32].
- Le réseau ramifié d'actine, impliqué dans le mouvement, le changement de forme cellulaire et la génération de forces [33], [34], [7]. Ce réseau se situe dans la cellule au niveau des lamellipodes qui sont les protrusions qui permettent aux cellules d'avancer sur un substrat [35],[34]. Ce réseau est piloté par le complexe protéique Arp2/3 qui permet de créer des embranchements à 60 degrés nécessaires à la formation de ramifications. Dans la suite il sera perturbé grâce à une molécule qui inhibe Arp2/3 (CK666) [36].

L'image en Fig. I.3 est une image d'actine dans des cellules épithéliales (MDCK II) générée grâce à une technique dite de fluctuations radiales en super résolution (SRRF) [37]. Elle illustre la complexité du réseau d'actine dans une monocouche en migration : les bords cellulaires ne sont pas toujours apparents, de longs filaments s'étirent de part en part d'une cellule.

Filaments intermédiaires Les filaments dits intermédiaires ont une taille d'environ 10 nm qui se situe entre celle des filaments d'actine et celle des microtubules (25 nm) [38]. Cette famille de filaments est très vaste, assez peu documentée en regard des deux autres et plus spécifique que les deux autres, ce qui rend leur énumération délicate. Contrairement à l'actine et aux microtubules, les filaments intermédiaires :

- ne nécessitent pas de protéines chaperonnes ni de source énergétique pour s'auto-assembler ;
- ne sont pas polarisés ;

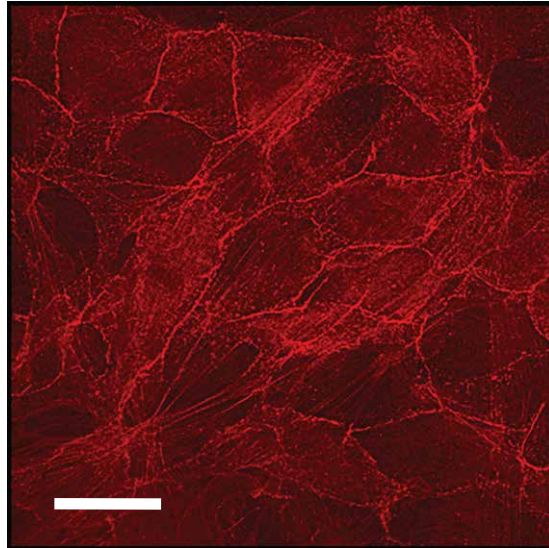


FIGURE I.3 – Images de MDCK (II) en monocouche au cours d’une expérience de migration. Technique d’imagerie dite de fluctuations radiales en super résolution (SRRF), qui consiste à imager un plan à très faible exposition, un grand nombre de fois et le plus rapidement possible [37]. Objectif 60X, 100 images à 10 ms d’intervalles, barre d’échelle 10 μ m.

— sont stables dans le temps.

Deux d’entre eux ont particulièrement attiré notre attention au cours de cette thèse et sont présentés ici.

Kératine Les kératines (voir figure Fig. I.4) représentent une famille de filaments intermédiaires particulièrement importante pour les cellules épithéliales (filaments intermédiaires de type I) [39]. Chez l’humain, ces kératines sont présentes dans 30 types cellulaires différents, dont une dizaine sert 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 [40], [41]. Dans le cytosquelette des cellules épithéliales, les kératines se lient à des points de contacts cellulaires nommés desmosomes, qui sont l’équivalent pour les filaments intermédiaires, des jonctions adhérentes d’actine [42].

Vimentine La vimentine (Fig.I.5) est le plus abondant des filaments intermédiaires et fait partie des filaments intermédiaires de type III. Elle est traditionnellement associée aux cellules mésenchymateuses qui l’expriment abondamment [43] et est connue pour être un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse [44][24],[45]. C’est pourquoi elle est souvent recherchée comme marqueur dans de nombreux types de cancers métastatiques.

Il est aujourd’hui admis que la vimentine est liée au noyau, au réticulum endoplasmique et aux mitochondries, ce qui en fait un acteur important dans le maintien de la position des organites dans le cytoplasme [46],[47].

Microtubules La dernière famille de filaments est celle des microtubules qui sont formés de l’arrangement de nombreux hétérodimères d’ α et β tubuline. Ils s’assemblent en filaments creux de 25 nm de diamètre externe et de 13 nm de diamètre interne. La

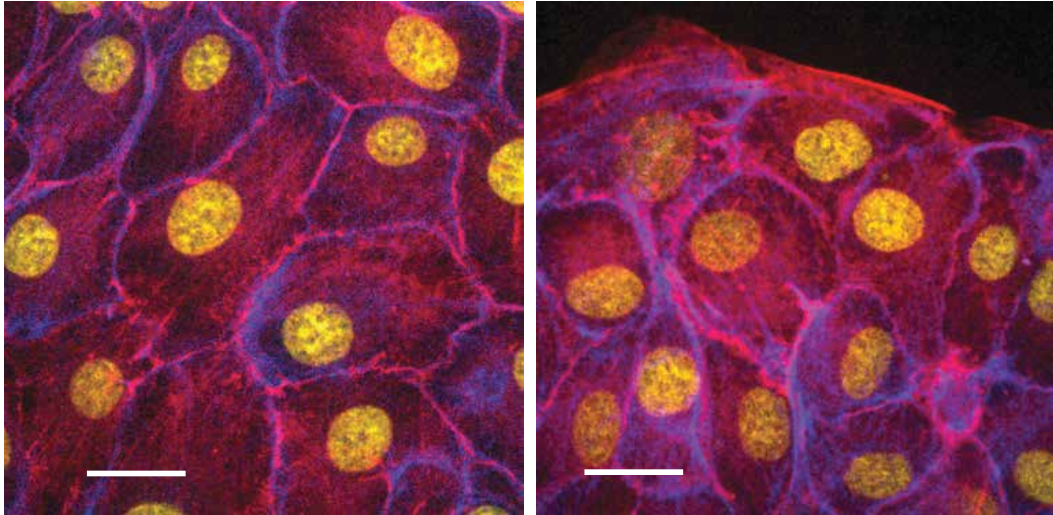


FIGURE I.4 – Deux images de cellules épithéliales MDCK II transfectées kératine 18, en migration. Jaune : noyau. Rouge : actine. Bleu : kératine 18. Observation au 60X. Barre d'échelle 10 μm .

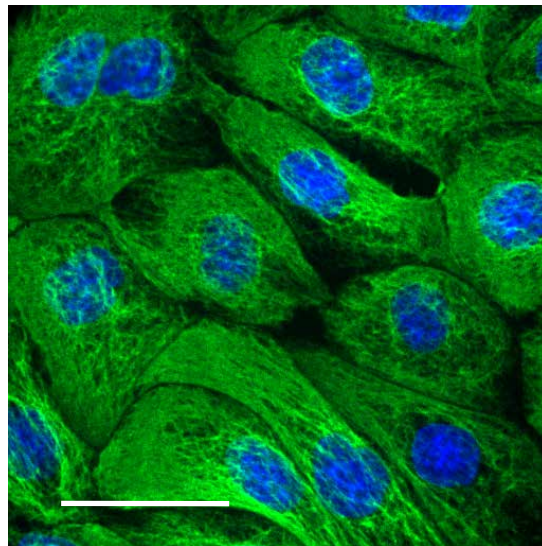


FIGURE I.5 – Image au 60X de cellules de MDCK II. Vert : vimentine. Bleu : noyau. Barre d'échelle 20 μm .

longueur de persistance d'un microtubule est de plusieurs millimètres, ce qui fait de ces filaments les plus résistants à la courbure. En particulier, leur rôle est primordial dans la forme cellulaire et dans son maintien [48]. Ces filaments, comme ceux de l'actine, sont polaires, avec une extrémité positive qui polymérise et une extrémité négative qui dépolymérise. Le processus de polymérisation et dépolymérisation est régulé par la concentration en sous-unités de tubulines. Il peut être utilisé 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. Nous utiliserons en particulier le nocodazole, une drogue classiquement utilisée pour perturber ce réseau. Cette molécule dépolymérise les microtubules, mais est aussi réputée pour augmenter la contractilité cellulaire [49].

Nous avons ainsi une vue d'ensemble des trois différents types de filaments rencontrés dans la suite de cette thèse. Mais ces filaments n'agissent pas seuls. De nombreuses protéines gravitent autour d'eux et régulent leur dynamique d'assemblage et désassemblage. Ils constitueront une cible de régulation dans la suite.

Les moteurs moléculaires sont un exemple important de ces protéines car ils permettent la génération de forces mécaniques. Une fois attachés aux filaments, et en consommant de l'adénosine triphosphate (ATP) qui est une ressource en énergie utilisable par les protéines de la cellule, ils peuvent tirer sur les filaments. Ces moteurs moléculaires et les autres protéines qui régulent les propriétés des filaments sont, la plupart du temps, spécifiques à chaque type de filament. On présente ici les myosines car elles seront étudiées dans la suite de cette thèse.

1.2.b Moteurs moléculaires

Myosines Les myosines sont des protéines qui jouent un rôle fondamental dans les mécanismes actifs de la cellule. Parfois nommées moteurs moléculaires, elles ont la capacité de transformer de l'énergie chimique en énergie mécanique. Chaque type exerce une fonction différente, avec des spécificités telles que la myosine V qui déplace des charges vésiculaires le long des filaments d'actine, ou la myosine II qui génère de la contraction des filaments. C'est pour cette capacité contractile que l'on s'intéresse plus particulièrement à cette famille de myosines [50],[48].

Elle se fixe sur les filaments d'actine et permet leur mouvement grâce à un processus cyclique qui est le suivant :

- Les têtes de myosine catalysent et hydrolysent l'ATP (voir Fig.I.6).
- Cela active le changement de conformation de la tête, qui se lie à l'actine.
- Le complexe actine-myosine libère les produits de l'hydrolyse de l'ATP.
- Une nouvelle molécule d'ATP peut se fixer sur les têtes de myosines.
- La tête de myosine revient à sa position de repos ; il y a alors génération de mouvement.

En plus de provoquer la contraction des faisceaux d'actine, la myosine II joue un rôle de réticulant en liant les filaments d'actine ensemble, en particulier au niveau des faisceaux d'actine antiparallèles.

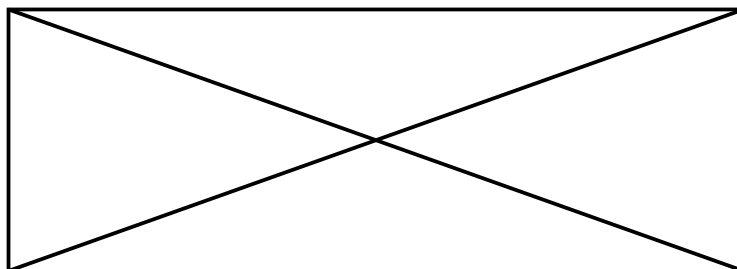


FIGURE I.6 – Myosine-II. On voit une myosine-II dont les deux têtes possèdent un site de liaison avec l'actine et un site de liaison et d'hydrolyse de l'ATP. La queue se lie à d'autres myosines pour former les filaments épais du muscle, ou mini-filaments dans les autres types cellulaires. Tiré de Thomson Higher Education 2007.

1.2.c Adhésions cellulaires

La capacité des cellules à adhérer entre elles et sur un substrat est une condition nécessaire à l'existence d'organismes pluricellulaires. Les adhésions intercellulaires relient deux cellules voisines, tandis que les adhésions cellules-substrat lient aussi les cellules entre elles par l'intermédiaire du substrat. En plus de la cohésion mécanique, ces adhésions permettent la régulation de signaux chimiques. Nous résumons les différents types d'adhésion intercellulaires et cellules-substrats (Fig.I.8).

Les adhésions intercellulaires Les adhésions intercellulaires sont principalement de 4 types (voir Fig.I.7). La première dite jonction serrée, permet l'étanchéité du tissu et contribue à la polarité apico-basale des cellules. La seconde dite jonction communicante sur la face basale des cellules, relie directement les cytoplasmes cellulaires entre eux et filtre les composants. Les deux autres jonctions principales sont les jonctions adhérentes et les desmosomes, celles qui ont un rôle important dans la mécanique cellulaire. Elles relient les cellules entre elles respectivement par l'actine et la kératine. Entre ces jonctions, il y a des cadhérines qui sont des protéines transmembranaires. Enfin, dans une cellule et entre chaque jonction adhérente, les filaments d'actine se relient sur tout le contour, créant ainsi une ceinture d'actine. Cela a des conséquences importantes sur les forces et énergies mises en jeu.

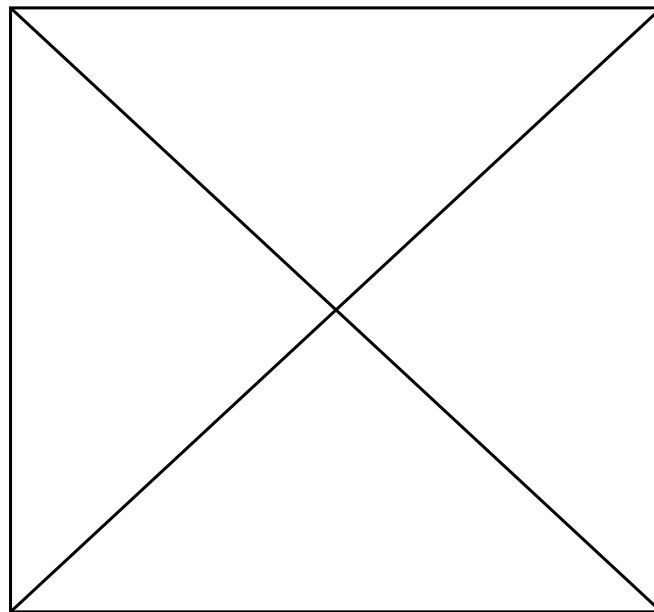


FIGURE I.7 – Schéma représentant les jonctions adhérentes dans un épithélium. Les jonctions adhérentes sont visibles et reliées entre elles par des ceintures d'adhésion faites de filaments d'actine qui font le tour de la cellule. Les cellules représentées ici sont des cellules d'intestin qui ont la particularité d'avoir des microvilli afin d'augmenter leur surface d'échange avec la lumière. Adapté de [25].

Les adhésions cellule-substrat Les cellules épithéliales d'un tissu sont aussi connectées entre elles par l'intermédiaire du substrat que l'on nomme lame basale. Celle-ci est constituée de matrice extracellulaire 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 (fibroblastes du tissu conjonctif sous-jacent). Généralement, elle

est composée de glycoprotéines, dont les fibronectines que nous utilisons dans nos expériences comme protéines d'adhésion.

Les protéines transmembranaires qui permettent les adhésions cellules-substrat sont principalement des intégrines, qui se lient d'un côté au substrat et de l'autre aux adhésions focales (elles-mêmes liées à l'actine) ou aux hémidesmosomes (eux-mêmes liés aux filaments intermédiaires) comme indiqué sur le schéma Fig.I.8.

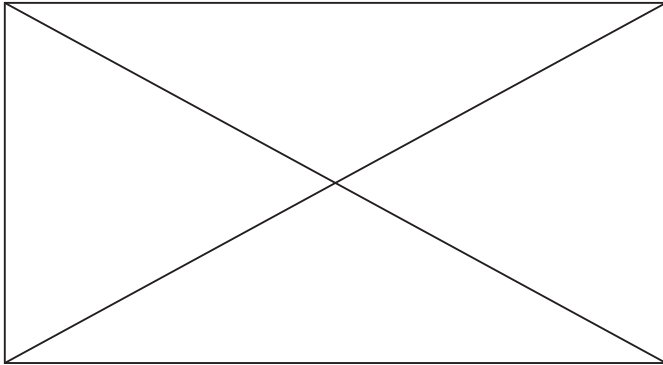


FIGURE I.8 – Les jonctions cellulaires trouvées dans les cellules épithéliales. Dessin de Qianhe Lu.

2 Aspects biophysiques

Chaque question posée peut être abordée par une voie physique ou une approche biologique. Prenons l'exemple de la génération de forces en migration cellulaire. La biologie vise à prendre en compte tous les ingrédients mis en jeu en les étudiant précisément. Par l'intermédiaire de mutants par exemple, qui permettent de modifier les niveaux d'expression d'un gène ou de le supprimer [51], par l'intermédiaire de drogues qui permettent de modifier la réponse d'un composant protéique, par l'intermédiaire d'ARN interférents [52] qui empêchent la production de protéines.

En physique, l'approche est tout à fait différente car les observables - le plus souvent, la force, la vitesse ou les déformations - sont fixées par l'opérateur. À partir de ces observations, des équations minimales sont recherchées pour relier les observables et prédire leur évolution. Cette approche s'est déjà révélée fructueuse par le passé, et il y a déjà cent ans, D'Arcy Thompson [13] dressait une analogie fondée sur la ressemblance morphologique entre les tissus épithéliaux et un système physique beaucoup plus simple : les mousses liquides (voir Fig.I.9).

Cette démarche réductionniste génère des paramètres qui dépendent de la nature du système étudié. C'est dans l'établissement du lien entre paramètres physiques et réalités biologiques [9] que le travail du biophysicien réside. Non seulement les approches issues de la biologie et celles issues de la physique sont complémentaires pour étudier un même problème, mais elles s'enrichissent mutuellement. Cette section présente un ensemble de questions physiques sous-jacentes à la compréhension globale de la migration cellulaire.

2.1 Motivations physiques

À partir de la simple observation d'expériences de migration cellulaire collective menées en biologie, au moins 4 grands types de questions physiques nous motivent,

bien que nous ne nous concentrons pas sur toutes au cours de cette thèse.

De l'échelle cellulaire à tissulaire Alors qu'un tissu est une assemblée de cellules, un tissu et une cellule ont des caractéristiques et des fonctions très différentes. La caractérisation de la transition d'une échelle à l'autre est une question fondamentale. Comment les propriétés individuelles des cellules influent-elles sur les propriétés du tissu qu'elles forment? Comment expliquer qu'une cellule, qui se déplace sans suivre de motif précis lorsqu'elle est isolée, arrive à s'organiser lorsqu'elle est en collectivité? Comment s'organise la directionnalité de la cellule avec celle de ses voisins?

A l'échelle du tissu, les champs observés sont lisses et varient à l'échelle du groupe cellulaire. Cela justifie l'utilisation d'une modélisation de type « mécanique des milieux continus » et il est dès lors possible d'attribuer des propriétés mécaniques (coefficient de viscosité, module d'Young) au tissu. Comment relier ces observables définies à grande échelle aux propriétés cellulaires?

Équation d'évolution L'objectif du physicien est d'être capable d'avoir une équation constitutive du système étudié. Cela nécessite d'avoir tous les ingrédients nécessaires et suffisants pour expliquer et prédire l'évolution du système grâce à des équations physiques adaptées.

En milieux continus, il faut déjà pouvoir caractériser la réaction du système face à des contraintes. Un tissu sous contrainte s'écoule-t-il, se déforme-t-il, dans quelle mesure? Cette caractérisation se fait par l'intermédiaire de systèmes d'équations constitués d'une part de lois de conservation (pour la masse et les moments) d'autre part d'équations constitutives du matériau.

Les deux lois de conservation s'écrivent, pour la masse :

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla(\rho \vec{v}) = s \quad (\text{I.1})$$

avec ρ la densité massique, \vec{v} la vitesse et s un terme source ou puits de masse, qui dans le cas d'un tissu cellulaire, est lié aux divisions et morts cellulaires. Pour la conservation du moment :

$$\frac{D\rho \vec{v}}{Dt} = \nabla \sigma + \vec{f} \quad (\text{I.2})$$

Avec σ le tenseur de contrainte interne, \vec{f} les forces externes. Dans le cas d'un tissu cellulaire, le terme inertiel est en général négligeable ($\nabla \sigma \gg \frac{D\rho \vec{v}}{Dt}$) ce qui permet d'écrire :

$$\nabla \sigma + \vec{f} = 0 \quad (\text{I.3})$$

Une autre relation très utile est celle entre le taux de déformation total du tissu et le gradient de vitesse qui s'écrit :

$$\dot{\epsilon} = \frac{\nabla \vec{v} + \nabla \vec{v}^T}{2} \quad (\text{I.4})$$

Les équations constitutives du matériau donnent ensuite des nouveaux liens entre la contrainte σ et la partie symétrique du gradient de la vitesse, plus les éventuels réarrangements (changements de voisins), ce qui ferme le système d'équations et permet d'étudier l'évolution du tissu. La détermination des équations d'évolution nécessite donc un certain nombre d'ingrédients. Les plus classiquement utilisés sont la vitesse, la déformation, les forces et les contraintes. Mais dans les cas cellulaires, il y a une caractéristique qui rend la tâche particulièrement ardue : l'activité cellulaire.

Qualification de l'activité cellulaire En effet, une cellule consomme à chaque instant de l'énergie et est donc par définition un système complexe hors équilibre. L'énergie qu'elle consomme peut être utilisée par la cellule pour se remodeler, produire des protéines en nombre, ingérer des substances, moduler ses adhésions aux autres cellules ou exercer des forces sur le substrat. Les adhésions cellule-cellule modulent les réarrangements cellulaires et participent de fait à la mécanique du tissu. Bien qu'elles soient un aspect essentiel de l'intégrité tissulaire, nous ne nous y intéressons pas dans la suite par choix expérimental : les lignées cadhérines GFP testées forment des dômes trop rapidement lorsqu'elles sont à confluence, ce qui rend l'étude et les analyses en migration ardues.

Les forces extérieures \vec{f} de l'équation I.3 sont importantes dans la modélisation de la migration cellulaire ; elles sont le plus souvent décomposées comme la somme d'une force de traction, qui permet aux cellules de tirer sur le substrat pour avancer, et d'une force de friction, qui freine la cellule [53], [54]. Pourtant, expérimentalement, seule la somme des deux est accessible.

Liens entre systèmes Enfin, il existe tout un ensemble de questions de physique autour des comparaisons et des liens entre systèmes utilisés.

Vivant et non vivant Dans le cas d'un tissu épithélial, le matériau non vivant le plus proche morphologiquement parlant est la mousse (voir Fig. I.9, A, B). Cela permet de transposer des méthodes d'études de la physique vers la biologie [53]. Et il reste à comprendre les différences et similarités précises entre ces systèmes.

In vivo et in vitro Tandis qu'un système *in vitro* a l'avantage d'être mieux contrôlé en terme de paramètres physiques, il est nécessairement limité en terme de complexité par rapport à son pendant *in vivo*. À l'inverse, un système *in vivo* fait preuve d'une capacité de régulation des phénomènes que l'on trouve difficilement *in vitro*, tout en étant limité dans les gammes d'applications de perturbation. Les résultats trouvés pour des expériences *in vitro* sont ils applicables *in vivo*? Dans l'objectif de répondre un jour à cette question, une collaboration avec Aurélien Villedieu et Yohanns Bellaïche de l'Institut Curie a été initiée. Ils réalisent une expérience de migration dans le dos de la Drosophile au cours de l'embryogenèse (Fig. I.9, B), similaire à nos expériences *in vitro* (Fig. I.9, C).

2.2 État de l'art

Au cours de cette thèse, nous nous intéressons plus particulièrement à la compréhension et à l'addition de différents ingrédients pour l'étude de la rhéologie d'un tissu en migration. Nous essayons notamment d'établir des liens entre les ingrédients physiques nécessaires pour la modélisation d'un tissu et les ingrédients biologiques habituellement mis en jeu. Dans la suite, nous présentons un état de l'art de l'étude de la rhéologie des tissus, avant de nous concentrer plus précisément sur les approches actuelles pour étudier la rhéologie d'un tissu en migration *in vitro*. Enfin, nous présentons les liens entre quantités physiques et quantités biologiques.

Avec l'objectif de pouvoir à terme trouver des équations qui décrivent le déplacement cellulaire, il nous faut étudier sa réponse à différentes contraintes. La première

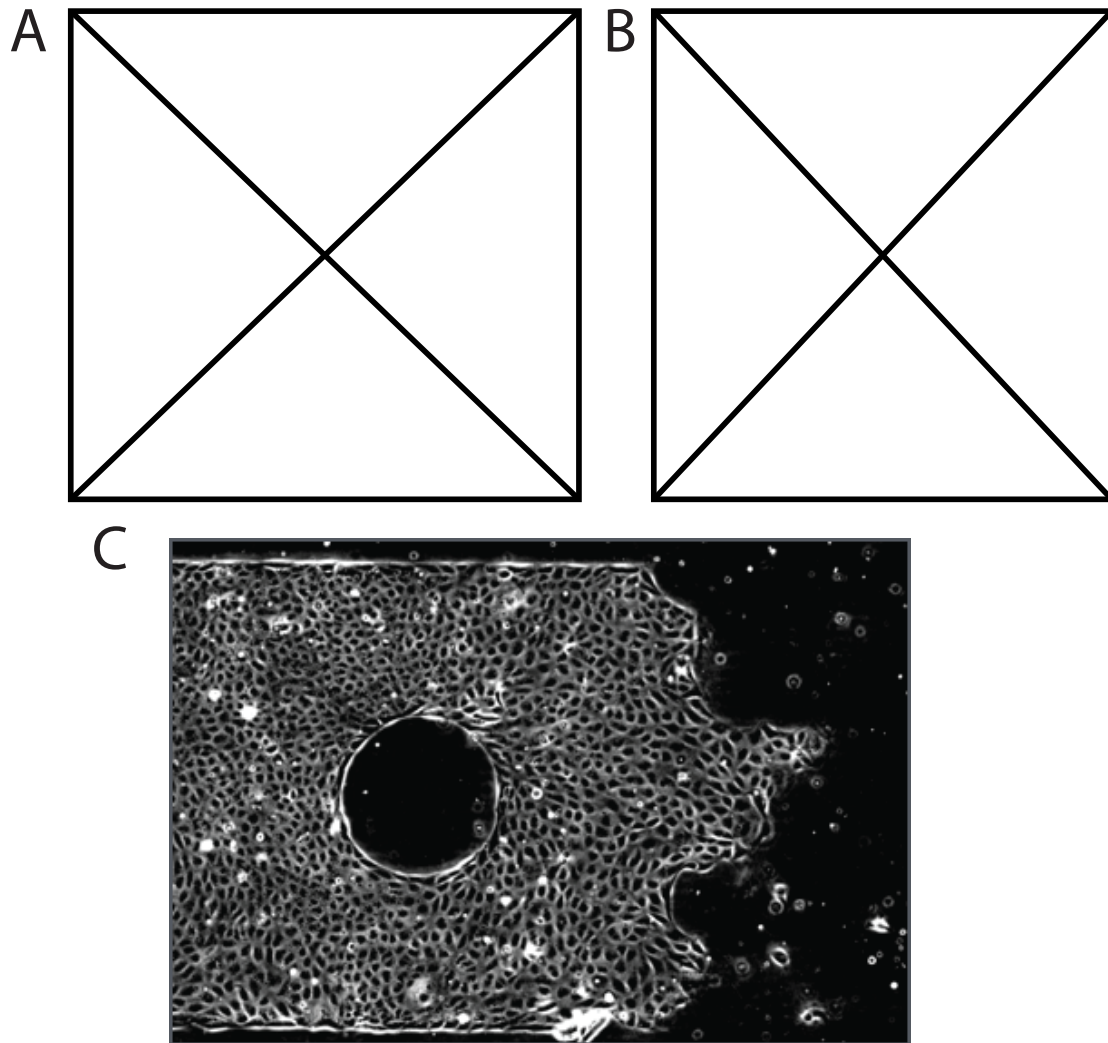


FIGURE I.9 – Trois écoulements de matériau cellulaire autour d'un obstacle. (A) Image d'une mousse qui s'écoule autour d'un obstacle, issue de [55]. (B) Migration de cellules (au cours de la métamorphose du dos de la drosophile) autour d'un obstacle de $30\ \mu\text{m}$ de diamètre, par Aurélien Villedieu et Yohanns Bellaïche de l'Institut Curie. (C) Ecoulement de cellules épithéliales (MDCK II) autour d'un obstacle de $300\ \mu\text{m}$.

partie de cette section passe très brièvement en revue les deux types d'approches majoritaires : agrégats et monocouches. On se concentrera ensuite sur la description générale des protocoles expérimentaux utilisés dans le cas des monocouches.

Ensuite nous présentons quelques-uns des résultats obtenus en ce qui concerne les ingrédients les plus utilisés dans la mécanique des tissus, à savoir la vitesse et ses dérivées, la forme cellulaire, la densité, la force et la contrainte ; les modèles peuvent nécessiter l'ajout de paramètres supplémentaires tels qu'une polarité ou une force active. Enfin, nous passons en revue les pendants biologiques associés aux notions rhéologiques développées.

2.2.a Différentes approches en mécanique des tissus cellulaires

Dans cette thèse, nous nous concentrons sur les approches dites *in vitro* qui ont une grande place dans la communauté scientifique actuelle, et qui s'avèrent particulièrement adaptées à nos questions. En particulier, elles permettent de séparer les ques-

tions de mécanique et de génétique. Il existe en particulier deux approches principales que nous introduisons ici : les agrégats, et les monocouches.

Agrégats D'un point de vue biologique, un agrégat est une assemblée de cellules adhésives qui mime des organismes entiers homogènes en cellules, ou le principe d'une tumeur [56]. Ils ont l'avantage d'être faciles à manipuler, et pratiques car ils permettent de s'affranchir du contact avec les substrats [57]. De nombreuses études ont déjà été réalisées sur ces systèmes, en prenant notamment en compte un paramètre d'étude qui a beaucoup d'influence : le temps. Selon que l'on observe la réponse d'un agrégat à l'échelle de la seconde, de la minute ou de l'heure, on ne trouve pas les mêmes résultats. Ainsi, à l'échelle de la seconde un agrégat se comporte comme un solide élastique [58],[59], ce qui signifie qu'après avoir relâché la contrainte qui s'exerce sur celui-ci, il revient à sa forme initiale. Mais à l'échelle de la dizaine de minutes (heure), on observe un comportement plutôt visco-élastique [60], et même visco-élasto-plastique [61], qui démontre que les réarrangements topologiques sont nécessaires à la compréhension des phénomènes. Enfin, à l'échelle de plusieurs heures ou jours, les divisions et morts cellulaires peuvent aussi contribuer à la fluidification du système [62].

Monocouches Une autre approche répandue pour étudier les propriétés du tissu est l'utilisation de monocouches cellulaires. Ce sont des assemblées bidimensionnelles de cellules liées par des jonctions adhérentes. Leur utilisation offre plusieurs avantages et permet de sonder d'autres propriétés que celles accessibles dans le cas des agrégats. Les expériences y sont aussi relativement aisées, l'imagerie 2D plus facile à acquérir que l'imagerie 3D, le traitement de données 2D plus léger qu'en 3D. La nature bidimensionnelle de la monocouche facilite aussi grandement les comparaisons entre différentes approches, qu'elles soient expérimentales, analytiques ou numériques [63],[54],[64],[65],[66].

Parmi les expériences en monocouches, on peut encore différencier deux grands sous-groupes d'expériences :

- Les expériences où les cellules sont suspendues : pas d'interaction cellule-substrat.
- Les expériences où les cellules sont accrochées à un substrat.

Monocouches suspendues Lorsqu'une monocouche de cellules croît et se développe, elle est naturellement en contact avec un substrat. Cela implique que dans le cas d'une expérience au cours de laquelle on étire une monocouche, celle-ci contribue à déformer à la fois la monocouche et le substrat, dans lequel a lieu une dissipation. La mesure de la déformation du tissu ne permet alors pas d'interpréter de façon claire les relations déformation-contrainte (qui sont à la base des études rhéologiques). Pour pallier à cela, l'équipe de Guillaume Charras a développé des études avec des monocouches dites suspendues [64],[67]. Une monocouche est cultivée sur un substrat de collagène tendu entre deux tiges, l'une fixe et l'autre flexible, puis le substrat est dissous. Les tiges sont ensuite soumises à un déplacement, ce qui étire la monocouche qui, en résistant, induit une déflexion de la tige flexible. La mesure de la déflexion permet ensuite de remonter à la contrainte appliquée. Ce protocole expérimental découple les ingrédients initialement présents afin de ne regarder que la monocouche. Elle double sa longueur initiale avant de se fracturer. Cette étude descend jusqu'au niveau cellulaire pour estimer la force nécessaire à la séparation d'une paire de cellules

incluse dans une monocouche.

Tout en gardant bien en tête que ces techniques découplent les effets du substrat et ceux de la monocouche, cette approche n'est pas adaptée lorsqu'on veut étudier la migration cellulaire pour une raison évidente : sans substrat, une monocouche ne peut pas avancer. On se concentre donc dans la suite sur les monocouches en migration sur un substrat, qui est le cœur de cette thèse et dont nous développons l'état de l'art dans la section suivante.

2.2.b Monocouches en migration *in vitro*

À ce stade de l'introduction, nous avons nos motivations biologiques : la migration dans les différents processus tels que l'embryogenèse, la cicatrisation et les métastases, et nos motivations physiques : s'approcher d'une équation constitutive pour un tissu. Nous avons vu qu'il existe différentes approches pour espérer obtenir des informations quant à ces quantités, avec en particulier deux grands types expérimentaux *in vitro* d'agrégats et de monocouches. La première technique n'est pas adaptée à l'étude de la migration. C'est pourquoi nous nous concentrons sur la seconde approche dans cette section.

Différentes approches Expérimentalement, la migration cellulaire peut être abordée de plusieurs façons illustrées schématiquement en Fig. I.10 et détaillées ci-après.

La technique la plus naturelle pour l'étude de la migration est celle qui mime un processus de cicatrisation. C'est une technique dite de lésion ("scratch assay") (Fig. I.10, A, B, C). La surface d'une monocouche mature est lésée, le plus souvent avec un grattoir [68] ou un laser [19], et la ré-épithélisation de la surface est étudiée. Ces modèles ont permis de fournir des résultats importants parmi lesquels on peut citer l'existence de lamellipodes cryptiques [68], la réversibilité d'un phénotype de cellule de front à une cellule de l'intérieur de la couche une fois que la plaie est refermée, ou encore l'existence de câbles d'actine qui s'étendent sur plusieurs cellules [19]. Cette approche a l'avantage d'être un modèle de cicatrisation facile à mettre en place mais a l'inconvénient de laisser des doutes quand aux interprétations de certaines observations, car plusieurs phénomènes sont couplés :

- Léser une monocouche implique de laisser des débris cellulaires là où les cellules ont été arrachées ou brûlées : les déplacements cellulaires pourraient être sensibles à cela.
- Les cellules qui étaient là avant qu'on lèse la surface ont eu le temps de sécréter de la matrice extracellulaire, rendant incontrôlable et difficilement interprétable l'interaction cellule-substrat au niveau de la cicatrice.
- Au moment de la formation de la plaie, un temps de latence est attendu pour permettre aux cellules de passer d'un phénotype de l'intérieur de la couche à un phénotype de front de migration. L'émergence du front est-elle liée à la présence d'espace libre, ou de cellules lésées?

Des études se sont alors attelées à pallier ces problèmes en utilisant plutôt une technique de relâchement de contrainte physique [54] comme c'est le cas dans Cochet-Escartin *et al.* [66]; ici les auteurs font croître une monocouche de cellules épithéliales autour de plots qui peuvent être enlevés une fois que la monocouche est à confluence

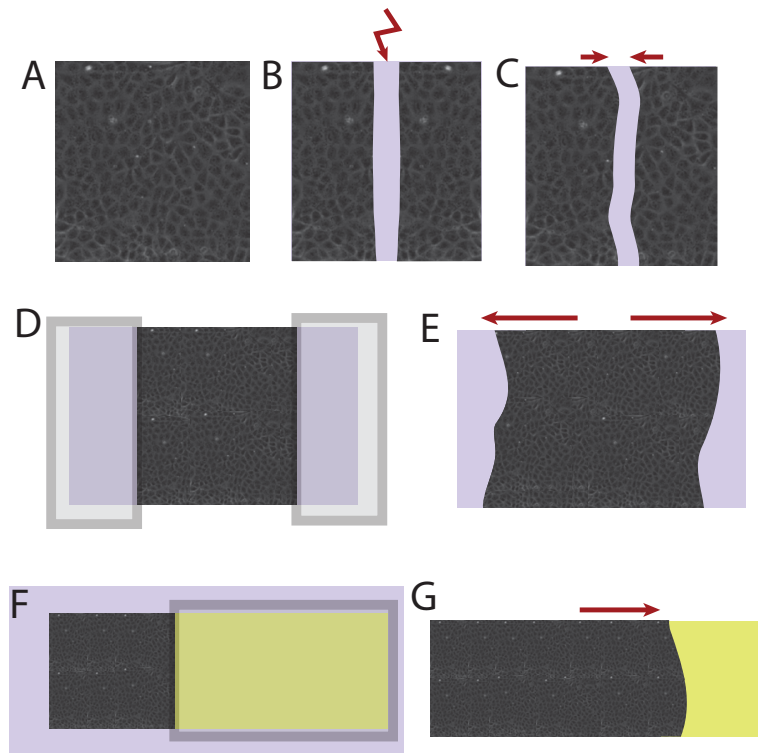


FIGURE I.10 – Principales techniques *in vitro* pour étudier la migration cellulaire dans un tissu épithélial. (A, B, C) Blessure et cicatrisation : à partir du tissu (A), une plaie est infligée (B); les cellules migrent pour la refermer (C). (D,E) Expansion libre : le tissu est contenu entre deux blocs non adhésifs (D); l'enlèvement de ces blocs provoque la migration du tissu (E). (F,G) Expansion en canal : le tissu est déposé sur un motif de protéines d'adhésion, tandis qu'un bloc rend inaccessible une partie de ce motif (F); une fois le bloc enlevé, les cellules migrent (G).

(Fig. I.10, D, E). Cela évite les problèmes de signalisation liés à la présence de mort cellulaire.

Cela nous amène à l'autre forme courante d'expériences, qui sont utilisées dans cette thèse : elles reposent sur l'impression de motifs protéiques sur un substrat, pour contrôler la géométrie du substrat sur lequel les cellules sont déposées (Fig. I.10, F, G) [69] ainsi que la condition initiale. Par exemple, Doxzen *et al.* impriment des disques de protéine d'adhésion sur lesquelles des cellules sont déposées et observent que, dans une certaine gamme de densité, les cellules se déplacent en bloc et effectuent des mouvements de rotation [65].

On mentionne enfin l'émergence de modèles de migration épithéliale en 3D, qui permettent d'étudier par exemple la formation de lumières biologiques [70], ou de boursoflures ("blebs") et de dômes [71].

Chacun de ces protocoles expérimentaux permet d'acquérir des images de cellules qui se déplacent au cours du temps. Par analyse d'images un certain nombre d'informations peuvent ensuite en être extraites, les plus courantes d'entre elles étant la vitesse et ses dérivées (gradient de vitesse, rotationnel, divergence), parfois la densité cellulaire ou les formes.

Parmi les principaux résultats, des ondes de vitesse et de densité se propagent du

front vers l'arrière de la monocouche lorsqu'une monocouche migre par relâchement de contrainte dans une direction privilégiée [54],[53],[72] mais aussi quand elle est construite sur un motif plus petit que la longueur de corrélation du tissu [73].

La densité s'est avérée être essentielle à la compréhension du phénomène, avec une relation directe entre la vitesse des cellules et la densité [72],[74], [53]. Enfin, différentes expériences se sont aussi attelées à étudier l'influence du confinement, et montrent que celui-ci a une grande importance. Vedula *et al.* [69] étudient la vitesse du front de déplacement en fonction de la largeur (1 à 10 tailles cellulaires) du canal que les cellules peuvent emprunter, et montrent que les cellules vont plus vite dans des petits canaux. Le confinement est aussi étudié par Doxzen *et al.* [65] pour l'étude du mouvement cellulaire sur des disques de différentes tailles, et enfin Peyret *et al.* [73] étudient le mouvement cellulaire sur des carrés de différentes tailles. Chacune de ces études montre que la taille du confinement a son importance, et cela est le plus souvent relié à une longueur de corrélation du tissu. Si la taille du confinement est plus petite que la longueur de corrélation, le mouvement est très cohérent. Pour une description complète des résultats sur les monocouches cellulaires nous prenons pour référence [75],[76] ainsi que [77] pour les différents modèles existants.

Malgré la richesse des observations, il manque des informations pour comprendre la dynamique d'une monocouche en migration. En particulier, pour que les cellules migrent, celles-ci ont besoin d'exercer des forces sur le substrat sur lequel elles se déplacent (voir Fig.I.11) (\vec{f} dans l'équation I.3) : l'acquisition de ces forces est dès lors primordiale pour avancer dans la compréhension des phénomènes.

Microscopie de force de traction Un tissu en migration exerce des forces sur le substrat. Biologiquement, elles semblent corrélées à la taille des adhésions focales [78],[79],[80]. Des expériences de fermeture de plaies épithéliales *in vitro* [66],[19] indiquent l'existence de forces de contraction dues aux câbles d'actomyosine ainsi que des forces de pression dues aux lamellipodes. Si l'actine accompagnée de ses myosines est un acteur indéniable de la génération de forces, elle n'est pas la seule. Récemment, des études ont par exemple montré que les filaments intermédiaires ont un rôle fondamental dans la migration de cellules mésenchymales [81] car ils influencent la dynamique et la localisation des adhésions focales et limitent leur couplage mécanique au réseau d'actomyosine.

Dans la littérature, les forces sont souvent décomposées en une somme de forces de tractions, liées au cortex d'actomyosine et aux adhésions focales [64],[82], et de forces de friction [83], [84]. Expérimentalement pourtant, seule la résultante de ces deux composantes est accessible.

Il existe de nombreuses techniques différentes pour mesurer ces forces, elles sont représentées en figure Fig.I.11, issue de [85].

- Certaines reposent sur le flambage d'un film fin, ce qui rend difficile les évaluations quantitatives (Fig.I.11, A).
- La technique standard repose sur l'inclusion de billes fluorescentes dans des substrat élastiques (Fig.I.11, B). En observant le déplacement des billes le champ de déformation du substrat est déduit et, connaissant sa rigidité, on peut remonter aux forces exercées par les cellules sur le substrat. Le principe est le même que dans le cas d'un ressort. En mesurant sa déformation δU et en utilisant son module élastique (module d'Young) E , il est possible de remonter à la contrainte

F exercée par la cellule sur le substrat (dimensionnellement, $F = E\delta U$, loi de Hooke).

- D'autres reposent sur la création de substrats faits de micropiliers. Chaque micropilier étant de rigidité connue, leurs déflexions permet de remonter aux forces exercées. La limitation de cette technique est que les micro-piliers sont par essence un motif topographique et biochimique qui peut avoir une influence sur les cellules (Fig.I.11, C).
- On mentionne également les techniques dites de FRET (Förster resonance energy transfer) qui reposent sur le mouvement relatif de deux domaines moléculaires connectés par un lien élastique calibré pour produire un signal fluorescent (Fig. I.11, D). Leur mise en place est très délicate et est plus appropriée pour des questions qui se jouent à l'échelle de la cellule.

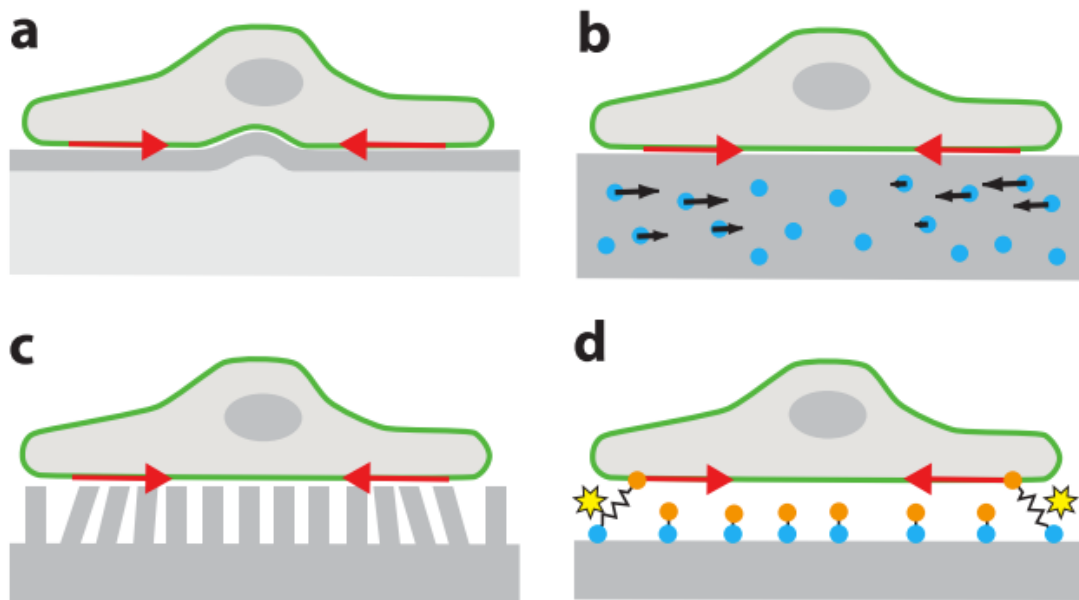


FIGURE I.11 – Représentation schématique des différents types de microscopie de force de traction : (a) flambage, (b) billes, (c) micro-piliers, (4) FRET. Voir texte pour les explications. Issu de [85].

Ces différentes techniques ont permis de démontrer un ensemble de résultats au cours de la dernière décennie. On observe par exemple, au cours de l'expansion d'une monocouche cellulaire de cellules épithéliales, que c'est au front que les forces ont la norme la plus grande [79],[54], ainsi qu'une grande hétérogénéité des forces dans la monocouche [79],[54] [73],[86] où les forces sont non nulles. Les forces exercées par la cellule sur le substrat au bord de la monocouche sont toujours centripètes [86],[54], c'est-à-dire orientées vers le centre de la monocouche.

Pour fermer le système d'équations, nous devons faire une hypothèse sur la forme de \vec{f} . Par simplicité, l'hypothèse courante est que les forces exercées par les cellules sur le substrat sont dominées par des forces de friction de type $\vec{f} = -\zeta\vec{v}$, mais cela n'est pas observé expérimentalement [86],[79]. En revanche, deux équipes mentionnent un décalage temporel entre la vitesse et la force [87],[73].

Comme indiqué en section 2.1, la contrainte est une autre quantité importante à regarder, qui concerne le lien entre cellules. La mesure de la contrainte est encore à ce jour un domaine de recherche actif soumis à de nombreuses difficultés. Expérimentalement, il n'existe pour le moment pas de méthode directe qui permette de mesurer la contrainte dans une monocouche en migration, ce qui est pour le moment pallié grâce à trois approches majoritaires. La première, développée par Trepap *et al.*, dite de microscopie de contrainte de monocouche ("monolayer stress microscopy", MSM) [79], repose sur une hypothèse de continuité de la contrainte à l'interface substrat-cellule ainsi que sur une hypothèse de couche mince élastique. La deuxième, développée par Moussus *et al.* [88], dite de microscopie de contrainte par inférence ("inference stress microscopy", ISM) repose sur une continuité du déplacement à l'interface substrat-monocouche ainsi que sur une hypothèse de monocouche élastique. La troisième, développée par Nier *et al.* [89], se base sur une méthode d'inférence bayésienne de la contrainte ("bayesian inference stress microscopy", BISM) : elle dépend des conditions aux limites mais ne fait pas d'hypothèse préalable sur la rhéologie du tissu, et à ce titre c'est la seule qui pourrait permettre de remonter à ladite rhéologie.

Le résultat principal et unanime à ce sujet est qu'une monocouche est en tension [54], [79], [73]. Il a aussi été démontré que dans le cas d'un substrat mou de quelques kPa de rigidité, il existe une transmission de contrainte entre cellules par l'intermédiaire du substrat [87].

Polarisation Il reste une notion importante à développer qui est celle de la polarisation. Cette notion décrit une asymétrie cellulaire qui agit sur le mouvement et il en existe de nombreuses définitions possibles.

En biologie une polarisation peut-être définie dès lors qu'une anisotropie de marqueur ou de forme à l'échelle cellulaire est visible. Les lamellipodes qui s'étendent d'un côté de la cellule, aussi bien en front de migration qu'en arrière de front [63],[76],[90],[66],[68], définissent une polarisation avant-arrière.

Les microtubules aussi ont un rôle clé dans la migration non seulement pour leur persistance [91] mais aussi pour leur rôle dans la localisation des organelles et la formation des lamellipodes [92]. Leur structure est elle-même polarisée [93], voir schéma I.12, grâce à leur nucléation par le centrosome [94],[95] qui est lui-même asymétriquement polarisé dans la cellule. Cela aurait pour conséquence d'orienter la cellule, c'est-à-dire de la polariser.

Enfin, un lien a été démontré entre filaments intermédiaires, microtubules et polarisation dans des cellules mésenchymales. Le réseau de vimentine est associé, et est fonctionnellement dépendant des microtubules et des moteurs associés aux microtubules [96],[97],[98]. Mais cette dépendance ne semble pas unilatérale. En effet, Gan *et al.* [99] étudient la dynamique d'assemblage de vimentine et observent que le désassemblage des monomères de vimentine est partiel même au cours de phénomènes de catastrophes de microtubules. Lorsque les microtubules sont dépolymérisés à un instant t , la vimentine ne dépolymérise pas complètement et à l'instant $t + dt$ il reste l'information de la direction à l'instant précédent. Ils proposent un mécanisme de persistance de la génération des microtubules par le biais de la vimentine qui agirait comme guide à la nouvelle formation de microtubules. Cette hypothèse a été validée dans les années qui suivent [100]. La vimentine est ainsi un autre potentiel marqueur de polarisation cellulaire.

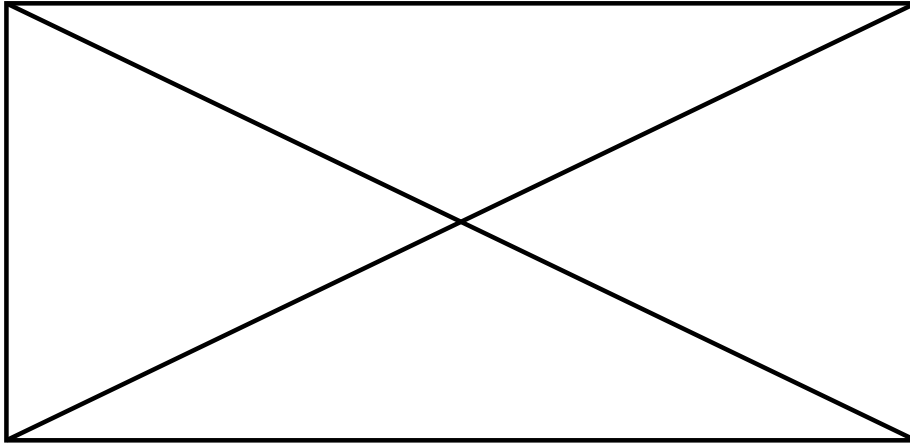


FIGURE I.12 – Exemple de l’anisotropie dans la disposition de l’actine et des microtubules qui permet de définir une polarisation [90].

Enfin, la position du noyau est cruciale dans nombre de phénomènes biologiques [101], [102] et en particulier dans la migration où une asymétrie de positionnement est régulièrement observée [103].

En physique ces observations peuvent se traduire par plusieurs définitions, basées par exemple sur la construction de vecteurs du barycentre de la cellule vers le barycentre du lamellipode [73], du barycentre de la cellule vers le noyau, du barycentre de la cellule dénuée du noyau vers le lamellipode, ou du barycentre de la cellule vers le barycentre de la vimentine ou des microtubules.

3 Écoulement hétérogène

Comme indiqué précédemment, nous souhaitons à terme pouvoir écrire une équation d’évolution d’un matériau cellulaire. Les travaux en une dimension, qui ont l’avantage d’être plus simples en terme d’analyse d’image et de modélisation, ne permettent pas de capturer la dynamique bidimensionnelle du flot. Pour cela, il est utile d’imposer des hétérogénéités qui forcent un écoulement en deux dimensions.

3.1 État de l’art

Imposer des hétérogénéités dans un écoulement s’est déjà révélé efficace dans d’autres domaines de la physique. En particulier l’écoulement d’un liquide autour d’un obstacle circulaire (2D ou 3D) est une expérience classique introduite par Stokes en 1850 [104]. Elle permet de mesurer une viscosité et/ou de sonder les propriétés mécaniques de matériaux viscoélastiques ou viscoplastiques [105]. Dans une mousse, les bulles en amont sont allongées tangentiellement à l’obstacle tandis que les bulles en aval sont allongées radialement; c’est avec ce type d’écoulement qu’un modèle de type élasto-visco-plastique a été démontré comme étant le seul pouvant satisfaire les observations obtenues expérimentalement [106]. Par la suite, le flot de Stokes a été utilisé avec succès dans des contextes aussi différents que les matériaux granulaires [107] ou les matériaux actifs avec l’étude de la formation de bouchon de hordes d’animaux [108].

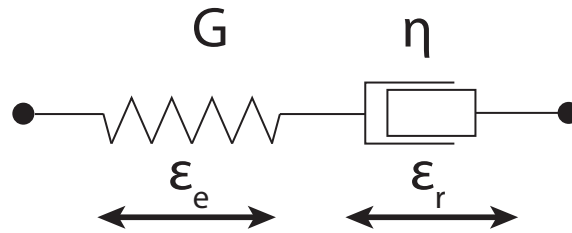


FIGURE I.13 – Représentation phénoménologique du diagramme rhéologique d'un liquide de Maxwell.

Sham Tlili, au cours de sa thèse [109], et inspirée par les mousses, développe une approche dans laquelle une monocouche migre autour d'un obstacle. Dans celle-ci, des MDCK II sont déposées sur un substrat sur lequel est imprimé un motif de protéines d'adhésion qui consiste en une bande, avec un trou au milieu (Fig. I.14). Typiquement, une bande fait 4 mm de long sur 1 mm de large pour un obstacle de rayon 200 μm . Avant le dépôt des cellules, toute une zone du motif est rendue inaccessible par un bloc. Une fois les cellules déposées et arrivées à confluence, une drogue, la mitomycine, est ajoutée au milieu cellulaire pour inhiber les divisions cellulaires (cela permet de rendre négligeable le terme s de l'équation Eq.I.1). La contrainte créée par le bloc est ensuite relâchée et les cellules migrent autour de l'obstacle, qui est formé par l'absence de protéines d'adhésion à cet endroit. Cette expérience constitue notre base de travail et avant de passer aux spécificités liées à cette thèse nous décrivons explicitement ce qui a déjà été obtenu jusqu'alors.

À partir d'expériences de Stokes pour les cellules, Tlili *et al.* [110] s'intéressent à l'équation constitutive du matériau cellulaire. Un matériau cellulaire est parfois décrit comme une association de ressorts (pour l'élasticité cellulaire) et de pistons (pour la dissipation). Les deux modèles les plus simples à ce propos sont les modèles dits de Maxwell (piston en série avec le ressort) et de Kelvin-Voigt (piston en parallèle avec le ressort). L'expérience de Stokes les discrimine : elle montre que les observations expérimentales (très forte corrélation entre déformation cellulaire et taux de déformation), sont compatibles avec un modèle de liquide visco-élastique de Maxwell, et pas de solide visco-élastique de Kelvin Voigt.

Dans le cas d'un liquide de Maxwell (voir Fig.I.13) où un ressort (module d'Young G) est en série avec un piston (coefficient de viscosité η), la déformation (ϵ) totale est donnée par la somme des deux contributions soit : $\epsilon_{tot} = \epsilon_e + \epsilon_r$, tandis que la contrainte totale est $\sigma_{tot} = \sigma_e = \sigma_r$.

On utilise ensuite les expressions pour σ_e et σ_r et il vient :

$$\begin{aligned} G\epsilon_e &= \eta\dot{\epsilon}_r \\ \epsilon_e &= \tau\dot{\epsilon}_r \end{aligned} \tag{I.5}$$

En traçant la déformation cellulaire en fonction du taux de réarrangement, on trouve une corrélation, ce qui est compatible avec un liquide de Maxwell et la pente indique le temps visco-élastique. La principale difficulté consiste à déterminer ϵ_e et $\dot{\epsilon}_r$; les détails sont dans l'article [110]. La figure Fig.I.14 montre les résultats obtenus. Il est à retenir que pour extraire des quantités fiables, il faut un bon rapport signal sur bruit, qui est obtenu par la longue durée et la grande taille de ces expériences.

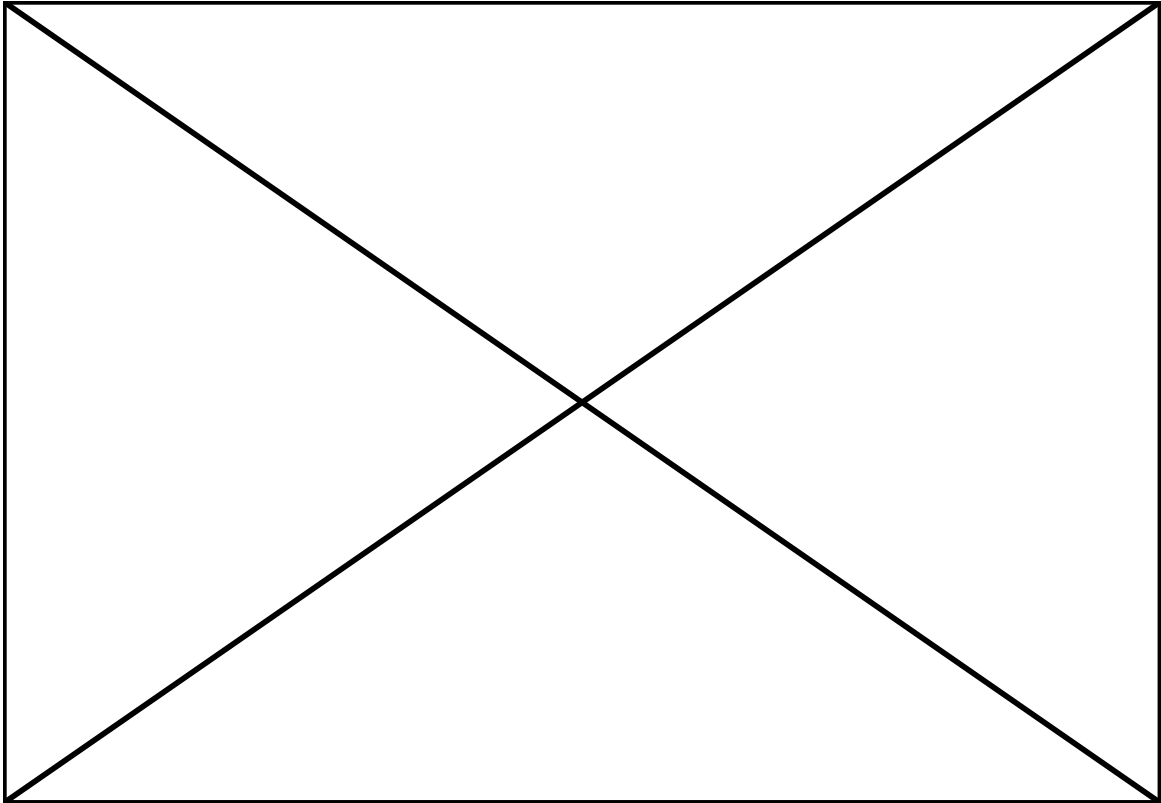


FIGURE I.14 – Ecoulement de Stokes avec des cellules épithéliales en migration. (a, b) Images en contraste de phase de cellules en migration de la gauche vers la droite, pour un obstacle de $200\ \mu\text{m}$ de diamètre : (a) temps initial, (b) 12 heures après. Largeur de bande $1000\ \mu\text{m}$. Longueur de $4\ \text{mm}$. Echelle $500\ \mu\text{m}$. (c) Schéma de la déformation cellulaire et des réarrangements induits par le gradient de vitesse du tissu. (1) les cellules se déforiment et la jonction cellulaire se raccourcit; (2) la jonction cellule-cellule se raccourcit et un vertex à 4 cellules se forme; (3) une nouvelle paire de voisins se crée; (4) la jonction se rallonge, les cellule se déforiment à nouveau pendant la relaxation de forme. (d) Quatre zones, indiquées par les zones de couleur, sont suivies aux temps $t = 0, 4, 8, 12\ \text{h}$, avec le même code couleur afin de mettre en évidence quelques réarrangements cellule-cellule. (e) Test d'un modèle de Maxwell, la déformation cellulaire (en couleur) est comparée avec les réarrangements multipliés par le temps viscoélastique τ (en noir). Le code couleur indique l'alignement entre les tenseurs, vert quand ils sont parallèles, et bleu quand ils sont orthogonaux. (f) Détermination du temps viscoélastique. La déformation cellulaire est tracée en fonction du taux de réarrangement et la pente correspond au temps caractéristique. (g) Le temps τ ne dépend pas du diamètre de l'obstacle. Le losange gris est un cas avec mitomycine, et ne se différencie pas des cas sans mitomycine. Le carré est un cas avec blebbistatine, qui augmente τ .

Le temps visco-élastique mesuré est de 70 min environ, et est indépendant de la taille de l'obstacle ainsi que du taux de division. La première observation confirme que ce temps est bien un temps représentatif des propriétés de la monocouche, tandis que la seconde observation indique que les divisions ne contribuent que peu à la fluidification de l'écoulement.

Ce temps viscoélastique peut être comparé au gradient de vitesse : leur produit est un nombre sans dimension, le nombre de Weissenberg, qui caractérise comment l'élasticité affecte l'écoulement et réciproquement comment l'écoulement affecte les formes des cellules. Ce nombre est maximum près de l'obstacle, où il atteint une valeur de l'ordre de 1. Cela indique que l'élasticité et la viscosité de la monocouche contribuent dans des proportions comparables au processus de migration.

3.2 Approche de cette thèse

Alors que la migration d'une monocouche épithéliale est extrêmement riche et complexe, un modèle très simple constitué d'un ressort en série avec un piston permet de décrire correctement les propriétés d'une monocouche en migration. Il reste à comprendre les origines biophysiques de ce modèle, le lien avec les différentes quantités biologiques propres au tissu cellulaire et en particulier avec les forces. C'est ce qui a motivé mon travail de thèse.

Cette thèse s'inscrit également dans une approche interdisciplinaire de l'étude de la migration. Pour répondre aux questions tant biologiques que physiques, un grand nombre d'approches complémentaires peuvent être mises en jeu : expériences *in vitro* ou *in vivo*, modélisation numérique ou analytique et la comparaison de ces approches est grandement facilitée par l'existence d'un socle d'analyse et d'outils communs.

De nombreuses collaborations se sont mises en place au cours de ma thèse. Des biologistes de l'Institut Curie (Aurélien Villedieu, Yohanns Bellaïche) ont transposé avec succès l'expérience de l'écoulement de Stokes dans le dos de la Drosophile (Fig. I.9, C). Au cours de sa métamorphose (passage de la larve à l'état adulte), un flot s'établit et une surexpression d'un facteur génétique qu'est Stripe permet de générer un obstacle [16]. Au niveau de l'obstacle, les cellules sont fortement accrochées à la cuticule rigide qui entoure l'insecte, les cellules s'écoulent autour.

La collaboration avec des numériciens de l'institut de Physique de Porto Alegre (Leonardo Brunet, Rita MC de Almeida, Gabriel Perrone, Gilberto Thomas, ainsi que Carine Beatrice qui est venue en post-doctorat au laboratoire) a pour but de simuler le flot de Stokes cellulaire avec différents modèles utilisés pour les matériaux cellulaires : Particule, Voronoi actifs, Vertex actifs, Potts cellulaire, Superboids. Cela a pour objectif de trouver ceux qui correspondent le mieux aux expériences, mais aussi de les comparer entre eux et de comprendre leurs limites. Ils travaillent également sur la comparaison de nombreuses définitions de la polarité.

Enfin, une collaboration est en cours avec des mathématiciens de l'université de Grenoble (Pierre Saramito, Ibrahim Cheddadi, Nathan Shourick) qui s'attellent à écrire et résoudre le plus précisément possible les équations de la mécanique des milieux continus.

Ma thèse a contribué à établir les outils permettant que chaque aspect de ces différentes branches puisse être analysé sur une base commune.

Plus précisément, j'ai repris les expériences de migration de cellules autour d'un obstacle par relâchement de contrainte en ayant un objectif double. D'une part, nous souhaitons mesurer de façon systématique les quantités cinématiques, en y ajoutant des informations sur les forces exercées par les cellules sur le substrat. D'autre part, nous voulons obtenir des informations relatives aux différents acteurs biologiques. Ces deux types d'informations seront ensuite synthétisées en examinant les corrélations croisées entre les quantités mesurées.

Pour avoir accès aux acteurs biologiques nous réalisons des expériences de migration autour d'un obstacle par relâchement de contrainte puis, lorsque la migration est bien établie, nous figeons les cellules par fixation. Cela permet de réaliser différents marquages biologiques que nous relient aux observations cinématiques obtenues juste avant fixation. Nous réalisons aussi des expériences pour lesquelles une fois le flot établi, nous ajoutons une drogue qui inhibe ou modifie la réponse de différents acteurs biologiques.

Pour avoir accès aux forces il est nécessaire de travailler sur un substrat de rigidité de l'ordre du kPa, ce qui est mille fois inférieur à la rigidité des substrats utilisés jusqu'alors. En pratique, les expériences par relâchement de contrainte sont difficiles voir impossibles, car nous sommes systématiquement confrontés à l'arrachement des protéines d'adhésion situées sous le bloc qu'on soulève. Pour contourner ce problème, nous avons développé une autre approche dans laquelle le motif sur lequel les cellules sont déposées n'est plus une bande avec un obstacle, mais un hippodrome avec un obstacle sur chaque bras de l'hippodrome. Il n'y a plus besoin de contrainte à relâcher ni de bloc à soulever. La migration coordonnée et spontanée des cellules permet ensuite d'étudier les forces.

Afin de pouvoir comparer avec les résultats sur bande en substrat dur, et les résultats sur hippodrome en substrat mou, en ne changeant qu'un paramètre à la fois, nous avons également réalisé des expériences d'hippodrome sur substrat dur.

Le prochain chapitre (II) s'attelle à expliciter les méthodes utilisées et mises en place. Nous présentons ensuite les résultats obtenus en ce qui concerne la migration en bande (chapitre III) et la perturbation des acteurs biologiques dans le cas des bandes (chapitre IV), ces expériences se font sur substrat dur. Nous présentons ensuite les expériences réalisées sur substrat dur en hippodrome (chapitre V), ce qui permet de faire la transition avec les expériences réalisées en hippodrome sur un substrat mou pour l'étude des forces (chapitre VI). Ces différents chapitres intègrent la discussion au fur et à mesure de la présentation des résultats. Ils sont suivis d'une discussion transverse (chapitre VII), puis d'une conclusion (VIII) qui ouvre vers des perspectives.

Chapitre II

Méthodes

1 Expérimentales

Une expérience se déroule en trois étapes détaillées dans cette section. La première consiste à imprimer des protéines d'adhésion avec un motif donné sur la surface de notre choix (substrat dur, ou bien mou pour l'étude des forces); la seconde, à déposer des cellules sur ces motifs; et la troisième, à acquérir des images pendant la migration.

1.1 Préparation des substrats avec motifs

Toutes les expériences nécessitent la préparation de substrats (durs ou mous). Ils sont en polydiméthylsiloxane (PDMS) qui est un polymère viscoélastique biocompatible. Celui-ci est liquide et réticule à la chaleur en présence de son réticulant. Il devient alors solide élastique, de rigidité modulable. La rigidité dépend de la longueur des chaînes qui le composent ainsi que de la proportion de réticulant par rapport au PDMS.

1.1.a Préparation de substrat dur

La grande majorité des expériences (chapitres [III](#), [IV](#), [V](#)) sont réalisées sur un substrat dit "dur" car il ne peut être déformé par les cellules. Il s'agit de PDMS de rigidité de l'ordre du MPa une fois réticulé. Un mélange de PDMS est préparé comme indiqué en annexe [1](#) et est étalé sur une surface à fond en verre. Cette surface est soit une boîte de Pétri commerciale à fond en verre lorsqu'un contrôle strict de la planéité (tolérance inférieure à la dizaine de microns) est nécessaire, pour les expériences de microscopie de force de traction de haute résolution; soit un dispositif maison qui permet de reproduire une boîte de Pétri à fond en verre. Ce dernier dispositif a majoritairement été utilisé car il est peu coûteux et permet de faire de nombreux tests.

Boîtes de Pétri à fond en verre "maison" Du PDMS 1 :10 est étalé par centrifugation sur une lamelle de verre Menzel Gläser d'épaisseur dite zéro (données constructeur entre 0.13 et 0.16 mm d'épaisseur) et de diamètre 30 mm. Les temps de centrifugation sont de 10 s à 500 rpm puis de 30 s à 1000 rpm. Cela donne une épaisseur de travail d'environ 200 μm . La réticulation se fait pendant une nuit à 65°C puis nous collons cette lamelle à un contour en plastique découpé par l'atelier (Fig. [II.1](#)). Pour cela, un joint biocompatible (Loctite Si 5398) est utilisé (1 h de temps de repos).

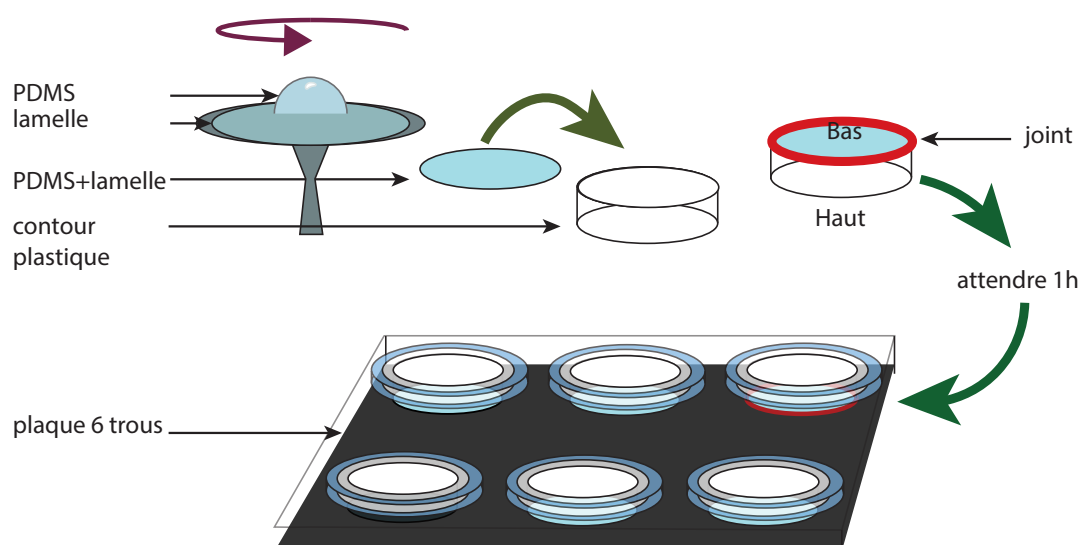


FIGURE II.1 – Schéma de principe de la création de boîtes de Pétri à fond en verre maison (haut). Une goutte de PDMS est étalée par centrifugation sur une lamelle de verre. La lamelle est collée à un contour et sèche une heure. Plus de détails dans le texte. En bas, représentation schématique de l'ensemble plaque 6 trous + boîtes de Pétri amovibles.

Boîtes de Pétri à fond en verre commerciales Lorsque des boîtes de Pétri commerciales à fond en verre (Nunc 27 mm) sont utilisées, la centrifugation est rendue difficile par la présence des bords. On préfère alors déposer entre 0.1 et 0.2 g de PDMS dans les puits puis laisser le PDMS couler par viscosité (une heure environ) avant de le faire réticuler. L'épaisseur de travail du PDMS est alors de 100 μm .

Portoirs Afin d'augmenter le rendement expérimental, deux portoirs sont réalisés pour accueillir les boîtes de Pétri. Le premier contient 6 trous (Fig. II.1) et permet d'imager en parallèle 6 expériences sur un microscope à épifluorescence pendant de nombreuses heures. Le second est adapté à la platine d'un microscope confocal et ne peut recevoir qu'un seul échantillon. Ces petits accessoires économisent beaucoup de temps expérimental et permettent d'imager de nombreuses expériences en parallèles, de les fixer, de les mettre de côté puis dans un second temps de les regarder au confocal quand nous en avons le temps.

1.1.b Substrat pour microscopie de force de traction

La seconde partie expérimentale de ma thèse (voir chapitre VI) est réalisée sur substrat mou dans l'objectif de faire de la microscopie de force de traction. Comme détaillé précédemment, le principe de la microscopie de force de traction est de mesurer le déplacement de billes par rapport à leur état de référence sans cellules (voir section 2.2.b).

Pour avoir accès à l'état de référence et ainsi remonter aux déplacements, deux voies sont possibles selon le grossissement utilisé (Fig.II.2). Avec un faible grossissement le champ est suffisamment large pour imager à la fois la zone avec les cellules (fond rose sur Fig.II.2, A) et une zone dénuée de cellules (non coloriée sur Fig.II.2, A). Lorsque les cellules sont décollées (Fig.II.2, B) les billes se déplacent. L'existence d'une zone (cadre

rouge sur Fig.II.2, C) où le décollement des cellules n'a pas pu avoir d'influence permet de recalcr l'ensemble des images : les billes avant (bleu) et après (vert) trypsinisation sont superposées.

Le cas d'un fort grossissement (Fig.II.2, D-F) nécessite l'existence d'une deuxième épaisseur de billes au niveau du verre (Fig.II.2, D, points jaunes. E, points oranges). La comparaison des images au niveau du verre avant et après trypsinisation permet de repositionner les points fixes (Fig. II.2,F les points jaunes et oranges sont superposés).

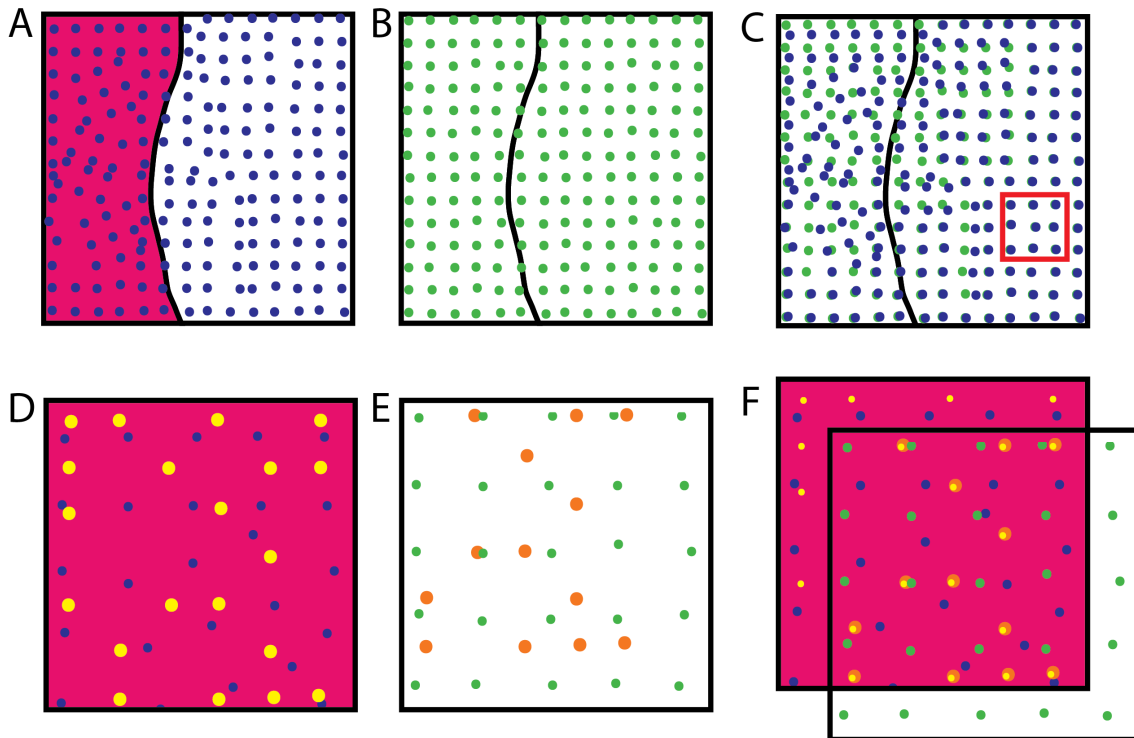


FIGURE II.2 – Représentation des deux façons de recalcr des images de microscopie de force de traction : (A-C) cas d'un faible grossissement, (D-F) cas d'un fort grossissement. Les zones roses représentent des zones avec cellules. Les images centrales représentent des champs sans cellules après trypsinisation. Les points bleus donnent la position des billes avec les cellules, ceux verts une fois trypsinés. Les points jaunes et oranges sont les positions de référence sur le verre.

La mise en place expérimentale de la force de traction nécessite donc un certain nombre d'ajustements que nous détaillons ci-après.

Préparation des substrats La première étape consiste à préparer les substrats et les boîtes de Pétri à fond en verre de façon analogue à ce qui est détaillé en section 1.1.a. Bien que le principe reste le même (étalement de PDMS par centrifugation sur une lamelle de verre et montage avec un contour en plastique), de nombreuses étapes sont adaptées pour l'inclusion de billes :

1. Pour les expériences à très fort grossissement (60X), la première étape consiste à faire adsorber quelques billes sur la surface de verre. Pour cela, avant le dépôt du PDMS, une goutte de solution de billes (1/500) est déposée et laissée 10 min à température ambiante. Cela permet de mieux repositionner les images une fois

l'expérience terminée. La solution de billes est préparée tel que détaillé en annexe 3.

2. Placer une goutte de PDMS sur le verre et attendre qu'elle s'étale.
3. Cuire à 65°C pendant 17 min.
4. Silaniser la surface en phase liquide (Sigma, 440140) à 5% dans l'éthanol absolu. Cela rend la surface active pour que les billes créent des ponts covalents avec la surface.
5. Rincer trois fois à l'éthanol à 95% en s'assurant que le démouillage se fait de façon homogène sans laisser de gouttelettes.
6. Sécher dans un four pendant 30 min à 60°C.
7. Incuber la solution de billes (1/250) pendant 5 min à température ambiante. L'annexe 3 détaille la préparation de cette solution.
8. Rincer trois fois à l'eau distillée.
9. Passiver les billes avec une solution de Tris pendant 20 min à température ambiante. Cela rend les billes moins collantes.
10. Sécher 15 min à 60°C.

L'annexe 4 présente l'analyse rhéologique du gel et donne la valeur de son module d'Young qui vaut ≈ 3 kPa.

1.1.c Impression de motifs protéiques

Une fois les surfaces préparées il faut fonctionnaliser les surfaces en imprimant les motifs protéiques d'intérêt. Cela se fait par l'intermédiaire d'un tampon qui a la forme des motifs voulus. La création de ces tampons est détaillée en annexe 1 (Fig.II.3, A). On retient qu'ils sont en PDMS dur, et légèrement surélevés sur les zones qui doivent être transférées. Une goutte de 60 μ L de fibronectine à 50 μ g/mL (Fig.II.3, A) est déposée sur un tampon. Dans le cas des motifs très grands, l'étalement est favorisé grâce à un petit morceau de parafilm délicatement déposé au-dessus de la goutte (Fig.II.3, B). Cela permet par ailleurs un étalement bien homogène. L'incubation de la fibronectine se fait à température ambiante pendant une heure.

Les étapes qui suivent sont dépendantes de la rigidité de la surface. Sur une surface rigide l'impression peut-être directe, c'est à dire que le tampon est directement retourné sur la surface, mais sur une surface de faible rigidité c'est impossible car la surface est déformée par le contact : le tampon adhère à un PDMS mou. On utilise donc une méthode d'impression indirecte par l'intermédiaire d'un film de polyvinylalcool (PVA) qui se dissout.

Impression directe de motifs protéiques En parallèle de l'incubation de la fibronectine, la surface (verre+PDMS) est activée à l'UV-ozone pendant 20 min. En arrachant une première couche d'électrons de la surface du PDMS qui devient alors hydrophile, l'accroche de la fibronectine est favorisée. L'UV-ozone est indispensable à la fabrication efficace et durable de motifs, qui ont pour cahier des charges de devoir tenir 3 à 4 jours et de supporter un grand nombre de cellules. Si la fibronectine n'est pas assez dense et bien accrochée, les cellules l'internalisent. Par ailleurs l'UV-ozone stérilise bien les surfaces.

Une fois l'activation faite, le tampon de fibronectine est trempé pendant une fraction de seconde dans l'eau déionisée (Fig.II.3, C) avant d'être séché à l'air comprimé (Fig.II.3, D). Il est ensuite retourné sur la surface (Fig.II.3, E). L'impression est quasiment immédiate et le tampon peut être décollé de la surface.

Impression indirecte de motifs protéiques Pour l'impression indirecte sur substrat mou les étapes sont les suivantes (Fig.II.3) :

1. Préparer la membrane de PVA comme il est expliqué en annexe 3.
2. Incuber 45 min le tampon de PDMS (voir 1) avec de la fibronectine (Fig.II.3, A, B).
3. Le passer dans l'eau déionisée puis le sécher à l'air comprimé (Fig.II.3, C, D).
4. Déposer le tampon sur la membrane de PVA pour 5 min environ (Fig.II.3, F). Les protéines d'adhésion s'adsorbent à la surface du PVA (Fig.II.3, G).
5. Découper très délicatement la membrane autour des tampons puis décoller les tampons de la membrane (Fig.II.3, H).
6. Placer très délicatement la membrane face contre le PDMS (Fig.II.3, I) pour que les protéines s'adsorbent sur le PDMS plutôt que sur le PVA.
7. Dissoudre le PVA tout en passivant la surface avec une solution de Pluronic à 2% pendant 2 h (Fig.II.3, J).
8. Rincer 6 à 7 fois au PBS, en faisant bien attention à ne jamais sécher la surface.

Contrôle de la qualité de l'impression Nous contrôlons régulièrement la qualité des impressions par observation au microscope (Fig.II.4). Cette vérification se fait grâce à l'incubation d'un mélange 50/50 de fibronectine fluorescente (25 µg/mL) et de fibronectine non fluorescente (50 µg/mL) sur le tampon.

Remarque Dans le cas des bandes, il faudra par la suite placer correctement au niveau de l'obstacle le bloc qui délimitera la zone où sont déposées les cellules. En prévision de cette étape, la position des obstacles est marquée au feutre sous la surface de verre, quand le tampon n'est pas encore décollé.

Passivation de la surface A ce stade, nous avons une surface de verre avec du PDMS sur laquelle est imprimée le motif. La dernière étape avant le dépôt des cellules consiste à passiver cette surface afin que les cellules n'aillent pas là où il n'y a pas de protéines d'adhésion. Pour cela, l'utilisation du Pluronic est privilégiée ; ce tensioactif hydrophile se fixe sur les zones vierges de fibronectine et empêche l'accès des cellules à ces régions. Nous l'incubons à 2% dans du PBS pendant 2 h avant de le rincer 6 ou 7 fois au PBS car il est cytotoxique.

Bloc de PDMS pour les bandes Dans le cas des motifs en bandes, afin d'empêcher aux cellules l'accès à la moitié du motif, des blocs de PDMS sont déposés sur les motifs protéiques. Pour créer ces blocs, les étapes sont les suivantes :

1. Préparer un mélange de PDMS 1 :10, dégazer une heure.
2. Couler le PDMS dans une boîte de Pétri. Il faut que l'épaisseur soit de l'ordre de 8 mm.

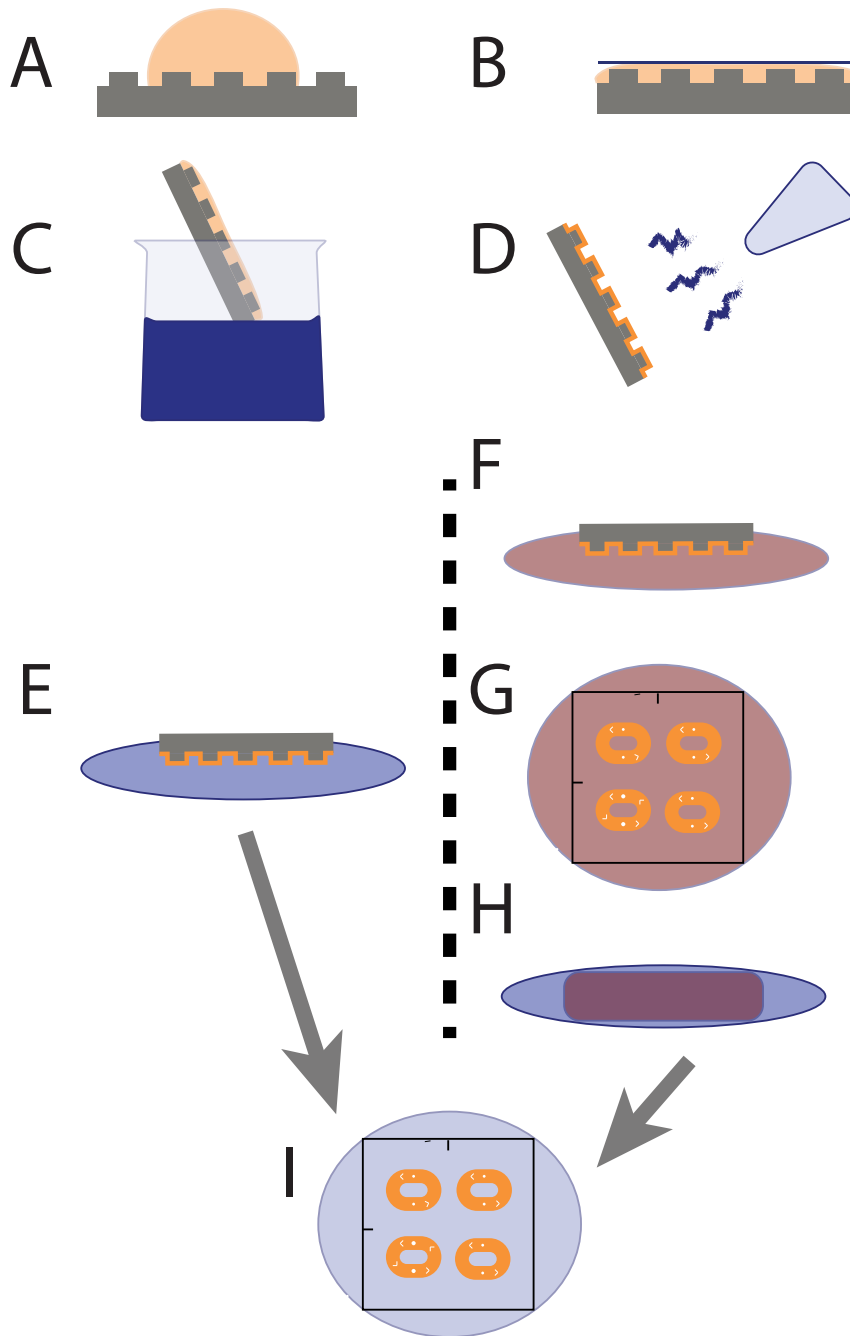


FIGURE II.3 – Représentation des différentes étapes nécessaires à l'impression de protéines sur un substrat dur ou mou. (A) Des protéines d'adhésion sont déposées sur un tampon de PDMS de forme voulue. (B) Incubation 1 h avec un film de parafilm pour étaler le dépôt. (C) Rinçage à l'eau. (D) Séchage à l'air comprimé. (E) est spécifique à l'impression directe sur substrat dur et (F,G,H) à l'impression indirecte sur substrat mou. Plus de détails sont disponibles dans le texte aux paragraphes en section [1.1.c](#)

3. Cuire pendant une nuit au moins à 65°C.
4. Découper des petits parallélépipèdes (environ 2 mm de large, 8 de long et 8 de haut).
5. Les passiver au Pluronic à 2% pendant 2 h. Cela permet que les cellules ne collent pas trop dessus une fois déposées.
6. Rincer 6 ou 7 fois au PBS.

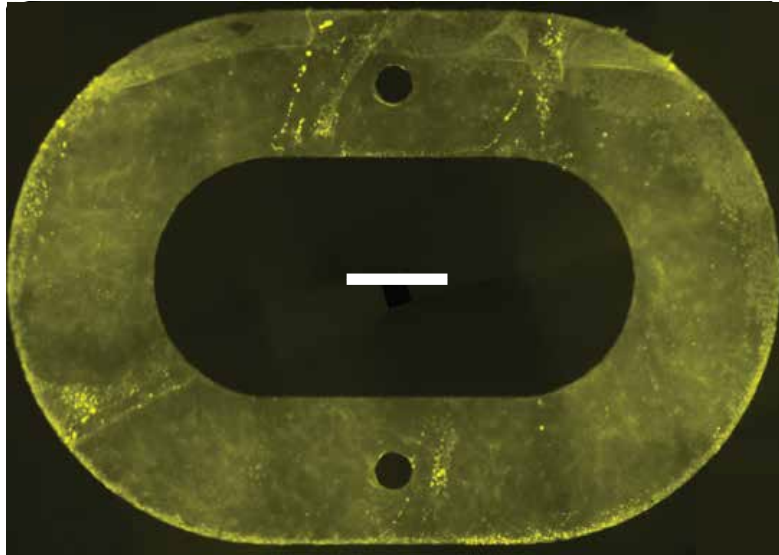


FIGURE II.4 – Fibronectine marquée après impression des protéines par méthode directe. La barre blanche indique 500 microns.

Ces blocs sont ensuite déposés sur les motifs protéiques, au niveau de l'obstacle. Ils doivent être délicatement posés sur la surface et ne plus bouger lorsqu'ils sont immergés dans du liquide.

1.2 Dépôt des cellules sur les motifs protéiques

À ce stade, nous disposons d'un substrat avec un motif de protéines d'adhésion dessus. Comme expliqué en introduction 3.2, deux types de motifs sont utilisés dans la suite. Le premier en bande, sur lequel est déposé un bloc pour empêcher l'accès aux cellules à la moitié du motif environ; le second en hippodrome, sur lequel aucun bloc n'est déposé.

Pour déposer les cellules sur le substrat, les cellules en culture sont trypsinées (voir l'annexe 2 pour l'entretien des cellules au quotidien), comptées et centrifugées 5 min à 1200 rpm. Dans le cas des bandes le repiquage se fait à une concentration d'environ 10^5 cellules/cm², et dans le cas des hippodromes à environ $5 \cdot 10^4$ cellules/cm². Après 45 min, nous rinçons délicatement pour enlever les cellules qui ne se seraient pas déposées.

1.2.a Motifs en bandes

Dans le cas des motifs en bandes nous attendons que les cellules envahissent tout l'espace disponible, ce qui peut prendre entre 1 et 2 jours. Ensuite, les divisions sont bloquées par ajout de mitomycine C (Sigma M4287) à une concentration de 8 µg/mL pendant une heure. Au moment de rincer la mitomycine, le bloc est enlevé pour rendre accessible tout le motif protéique. La Fig. II.5 représente schématiquement ces différentes étapes.

Remarque sur la mitomycine Cette drogue est un réticulant de l'ADN. Les cellules stoppent leur division en fin de G2 juste avant la mitose car les brins ne peuvent se

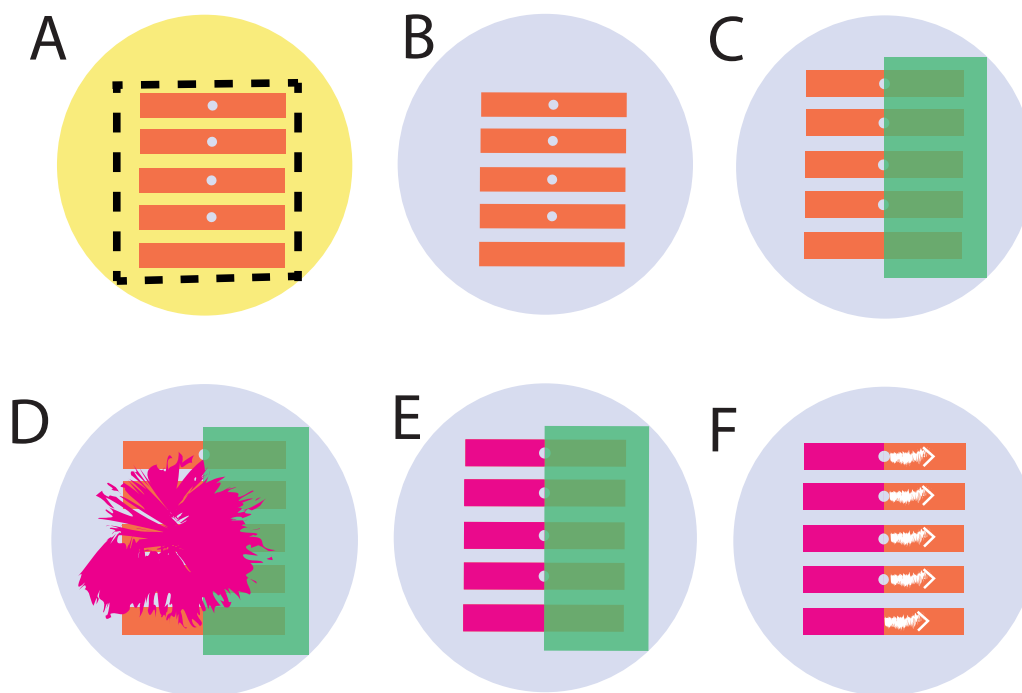


FIGURE II.5 – Dessin représentatif d’une expérience sur substrat dur en bande. À partir de la surface de PDMS préalablement préparée (A), tamponnage de la fibronectine (B) selon la méthode d’impression directe. Passivation de la surface et du bloc (C) et dépôt du bloc pour empêcher l’accès aux cellules à une moitié de bande (D). Dépôt des cellules (E). Rinçage et attente entre 1 et 2 jours pour que toutes les cellules envahissent la bande (F). Incubation avec de la mitomycine pour empêcher les divisions et retrait du bloc. La migration est lancée.

séparer. Pour autant, leur vitesse de migration n’est que très peu affectée [72]. Cela évite que la densité de cellules augmente et que cela ralentisse les cellules. L’objectif de cette manipulation est de rester dans une gamme de densité adaptée pour l’observation de la migration pendant une longue durée.

1.2.b Motif en hippodrome

Dans le cas des hippodromes (Fig. II.7), à partir du motif imprimé (Fig. II.7, A), nous repiquons les cellules (Fig. II.7, B), attendons entre 15 et 30 heures que les cellules se divisent et incubons avec de la mitomycine C comme pour les bandes (Fig. II.7, C). Les cellules ne sont pas à confluence car le dépôt se fait à une densité environ 5 fois plus faible que sur les bandes (voir Fig. II.6).

Après avoir rincé la mitomycine, les cellules grossissent (changent de taille) progressivement et, une fois que tout l’espace est envahi, elles se mettent à migrer (Fig. II.7, D).

1.2.c Protocoles d’utilisation de drogues

Plusieurs expériences sont réalisées avec l’ajout d’une drogue en plus de la mitomycine. Cet ajout se fait systématiquement une fois que la migration est déjà bien commencée. La drogue est ensuite ajoutée au milieu cellulaire. L’incubation se fait à 37°C pendant 1 h, et est suivie de multiple rinçages.

Pour perturber le réseau de microtubules (chapitre I, sec. 1.2.a), nous utilisons du no-

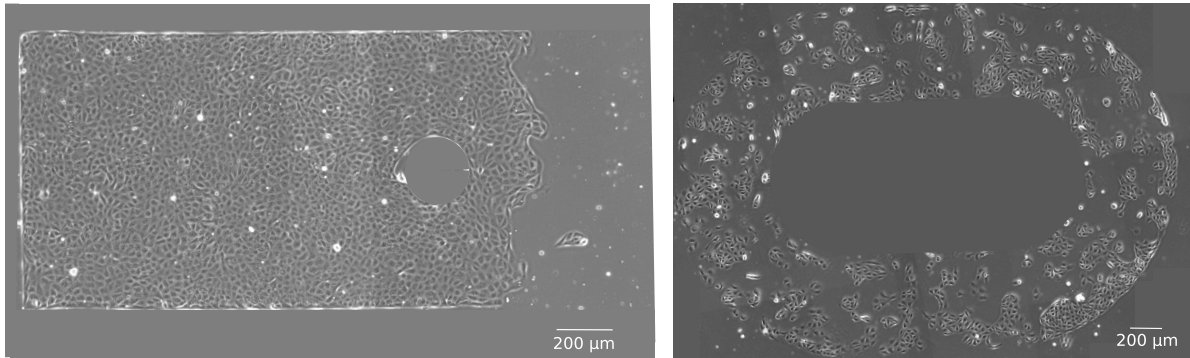


FIGURE II.6 – Images en contraste de phase prises au 10X de la densité juste après rinçage de la mitomycine dans le cas d’une bande (A) et d’un hippodrome (B).

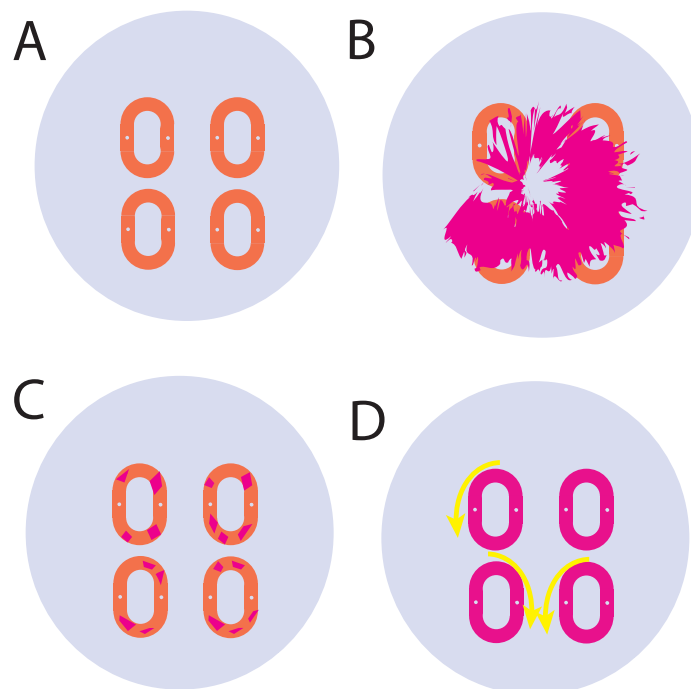


FIGURE II.7 – Dessin représentatif d’une expérience en hippodrome. Voir détails dans le texte.

codazole (Sigma : M1404) à 0.5 µg/mL. Pour agir sur le réseau d’actine branchée (chapitre I, sec. 1.2.a) nous utilisons du CK666 (Sigma : SML0006) à 100 µM ([111],[112]). Pour perturber le réseau de vimentine (chapitre I, sec. 1.2.a) de la simvastatine (Tocris : 1965/50) à 10 µM [113] est utilisée. Cette drogue fait s’effondrer le réseau de vimentine près du noyau, sans agir sur les microtubules ou l’actine, et sans dépolymériser la vimentine (Fig.II.8). Enfin, pour agir sur les myosines et l’activité cellulaire, la para-amino-blebbistatine (Axol ax494682) à 50 µM est utilisée. Elle a l’avantage d’être beaucoup plus stable et moins photo-toxique [114] que la blebbistatine traditionnelle.

1.3 Acquisition d’images

Une fois la migration commencée, nous lançons l’acquisition d’images. Sur substrat dur, c’est de l’imagerie vivante suivie la plupart du temps par une fixation, des marquages et de l’imagerie fixée. Tandis que sur un substrat mou il faut imager les billes fluorescentes pour faire de la microscopie de force de traction, puis décoller les

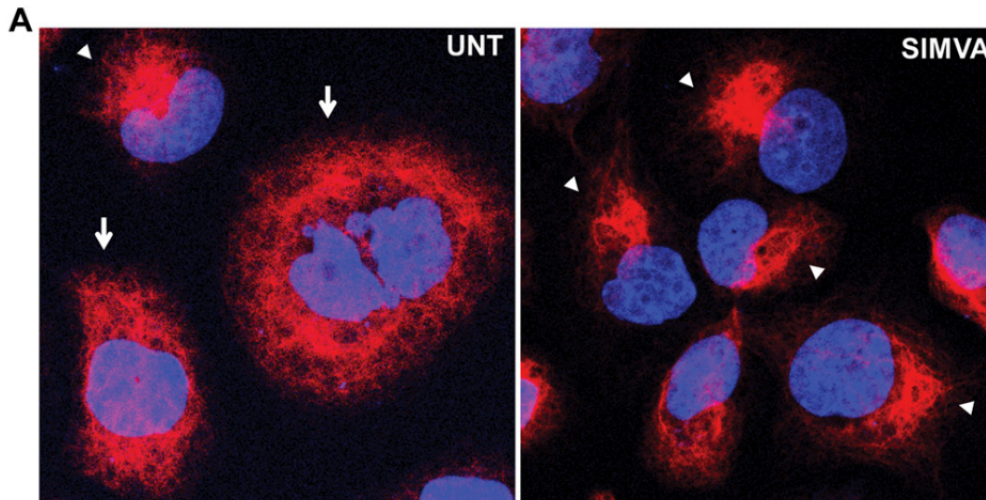


FIGURE II.8 – Effet de l'ajout de simvastatine sur l'organisation du réseau de vimentine. Le noyau est marqué en bleu et la vimentine en rouge. A gauche avant ajout de simvastatine, à droite après. Tiré de [113].

cellules pour avoir un état de référence. De par la construction même de ces expériences, il est impossible d'avoir accès aux protéines d'intérêt par marquage. Des expériences de TFM avec des cellules transfectées en vimentine GFP, ainsi que des cellules transfectées Actine Ruby, ont été réalisées pour essayer de faire un lien direct entre ces protéines et les forces, mais elles ne sont pas présentées dans ce manuscrit. Ces cellules transfectées sont un don de l'équipe de Guillaume Charras, professeur à l'UCL.

Dans cette section, nous détaillons d'une part ce qui permet de faire de l'imagerie vivante et d'autre part ce qui permet de faire de l'imagerie fixée.

1.3.a Imagerie vivante

Lorsque nous imageons aux temps longs, nous utilisons de la microscopie par contraste de phase au 10X. En prenant l'hypothèse la plus optimiste possible, 6 échantillons contenant chacun 4 bandes ou 4 hippodromes peuvent être obtenus en parallèle, cela fait donc 24 expériences en une acquisition. En pratique, deux limitations expérimentales existent. La première est qu'il est rare d'obtenir 6 expériences parfaitement synchrones et bien réalisées. La seconde est donnée par le temps d'imagerie de tous ces échantillons qui doivent être parcourus en moins de 5 minutes afin de suivre correctement la dynamique de déplacement cellulaire et pour pouvoir moyennner les résultats dans le temps.

Pour parcourir une bande il faut 3 champs de microscope de 2048×2048 pixels, pour parcourir un hippodrome il faut entre 10 et 20 champs. Les positions de chaque champ sont marquées à la main en faisant bien attention à ce qu'il y ait un recouvrement suffisant entre les images puis, à l'aide d'un script micromanager fait maison (qui permet d'assurer la stabilité du logiciel) les champs sont parcourus à intervalle régulier. Ainsi, un échantillon contient entre 12 champs (s'il n'y a que des bandes) et 80 champs (s'il y a des hippodromes).

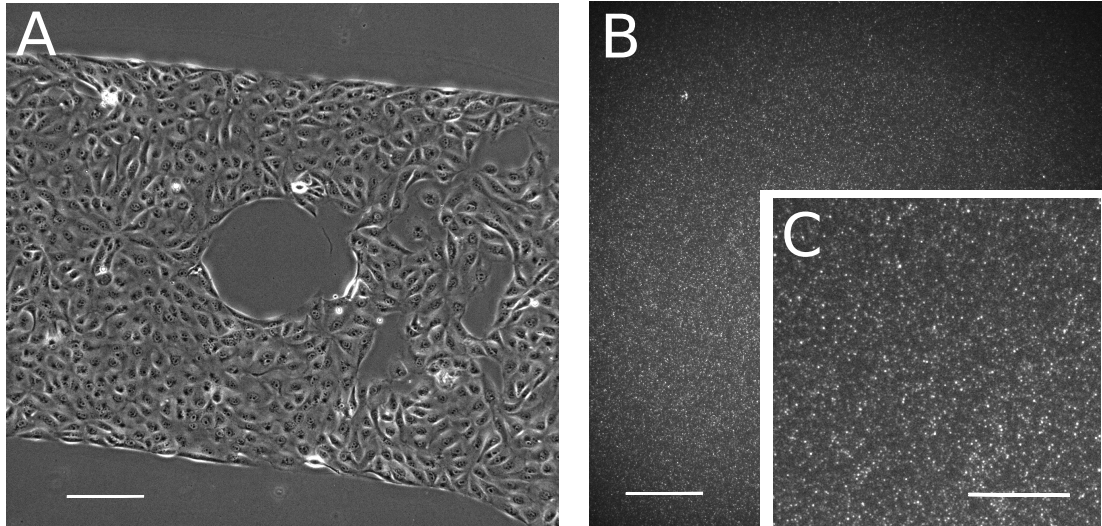


FIGURE II.9 – Expérience sur substrat mou. (A) Image en phase des cellules, après ajout de mitomycine et peu de temps avant le début de la migration. (B) Image des billes fluorescentes situées sous ces cellules. (C) Zoom de B. Pour A et B la barre d'échelle est de 200 μm , pour C elle est de 100 μm . Le film associé à ces images est disponible dans le dossier 'Hippodrome Mou'.

Spécificité de la microscopie de force de traction Lors d'une expérience de microscopie de force de traction, le principe est le même, à la différence près qu'il faut également enregistrer les images des billes sous les cellules. Comme les échantillons sont très grands, les défauts de hauteur d'un champ à l'autre peuvent être visibles. Nous choisissons donc de marquer manuellement, pour chaque champ, la position en z des billes sous les cellules (Fig.II.9 A, B), et des billes sous les cellules au niveau du verre lorsque cela est nécessaire (expérience à fort grossissement, voir 1.1.b). En pratique cela fait donc entre deux et trois fois plus de positions à marquer, ce qui rend la mise en place laborieuse. Pour autant, cela permet d'économiser du temps d'exposition par rapport à un réglage effectué à chaque passage en autofocus par exemple (ce qui est mieux pour les cellules), et de s'assurer également que les images sont bien nettes sur chaque plan pour éviter de mauvaises surprises après coup. Le script micromanager fait maison permet de gérer les filtres de fluorescence et les différents obturateurs (de la fluorescence ou de la lampe), ainsi que les temps d'exposition nécessaires à l'acquisition des billes et des cellules en optimisant les temps de réponse des différents composants.

Enfin, comme expliqué précédemment, il est primordial d'avoir l'état de référence des billes lorsqu'aucune force n'est appliquée. Pour cela, nous devons décoller les cellules en fin d'expérience grâce à de la trypsine, en faisant bien attention à ne pas trop décaler l'échantillon.

1.3.b Imagerie fixée

Dans le cas des expériences sur substrat dur, nous fixons en pleine migration les cellules par paraformaldéhyde, puis nous marquons grâce à des immuno-marqueurs ou des sondes pour voir les différentes structures protéiques de notre tissu. Cela est réalisé soit sur un microscope à épifluorescence classique, soit sur un spinning disk.

Fixation Au bout d'environ 24 h d'acquisition, nous fixons et marquons les échantillons afin de visualiser différents composants cellulaires. Le protocole de fixation utilisé consiste à :

1. Rincer rapidement au PBS les échantillons.
2. Fixer au PFA à 4% pendant 20 min.
3. Rincer 3 fois au PBS pendant 5 min, tout en perméabilisant la membrane au Triton X-100 à 0.1%.
4. Rincer 3 fois au PBS pendant 5 min.

Cette étape de fixation crée des liaisons covalentes entre les protéines. Cela fige la préparation à la manière d'une photographie et il reste alors à marquer les différentes protéines d'intérêt.

Pour le marquage de l'actine filamenteuse, de la siractine à 100 nM est utilisée pendant une nuit. Des tests de marquages en phalloïdine ont aussi été réalisés pour vérifier les marquages, les résultats étaient les mêmes. Pour le marquage du noyau, nous utilisons du DAPI à 1 µg/mL pendant 20 min. Pour la vimentine et les microtubules, un marquage par anticorps primaire issu du lapin (concentration 1/250) pendant une nuit suivi de l'anticorps secondaire anti-lapin de chèvre (concentration 1/500) pendant 1 h. Les marquages sont réalisés à 4°C quand ils se font pendant une nuit, et à température ambiante sinon. Enfin, les échantillons sont stockés au frais pendant plusieurs mois en s'assurant qu'ils ne sont pas séchés.

SRRF Parfois, des images sont acquises avec une technique dite SRRF (Fig. I.3, chap. I sec. 1.2.a) [37]. Les paramètres utilisés sont alors de 100 images par plan prise à 10 ms d'intervalle.

2 Analyse d'images

Une fois que les expériences sont réalisées, pour les analyser nous avons développé (en Matlab) des codes en vue de traiter la quantité considérable d'images et de données. En particulier, il s'agit de pouvoir extraire un maximum d'informations des images de phase obtenues, de celles de fluorescence, ainsi que de celles de microscopie de force de traction. C'est devenu un point central de cette thèse.

Pour avoir une idée plus précise de ce que cela représente, prenons l'exemple d'une journée type au cours de laquelle les données relatives à 4 hippodromes et 4 bandes sont enregistrées. Il faut en moyenne 15 champs pour un hippodrome et 3 pour une bande, donc 72 images par pas de temps. Nous enregistrons le déplacement pendant une trentaine d'heures à raison d'une image toutes les 5 minutes, soit 360 temps. Ainsi en une journée cela représente 25 920 images. Si on fait de la microscopie de force de traction, c'est entre deux et trois fois plus.

2.1 Système de représentation canonique

Aussi systématiquement que possible, nous nous attacherons à mettre en parallèle d'une part des cartes, qui donnent une information globale et qualitative de ce qui est observé, et d'autre part des graphiques qui ont le mérite de présenter des résultats quantitatifs ciblés en fonction de la question posée.

Nous utilisons en particulier une représentation que l'on nomme canonique en ce sens qu'elle permet de comparer un grand nombre de systèmes. Avec celle-ci, il est possible de comparer des expériences en bandes avec des expériences en hippodrome, mais également avec des expériences *in vivo* dans le dos de la drosophile, des simulations numériques, ou même des résolutions d'équations analytiques. Bien que ces comparaisons soient encore au stade préliminaires pour la plupart, le cadre est déjà posé et permettra de brasser et croiser les résultats futurs.

Cartes Pour chaque expérience :

1. Définir le centre de l'obstacle (ou d'un des deux obstacles, dans le cas de l'hippodrome) comme origine spatiale du repère cartésien (x, y) .
2. Définir la largeur L de la bande.
3. Définir une boîte rectangulaire de longueur $1.5 L$ et de largeur L .
4. Toutes les quantités sont alors représentées dans ce même système (Fig.II.10,A).

Graphiques Pour tracer des graphiques, la même convention que celle détaillée dans [106] est utilisée, à ceci près qu'aucune symétrie par rapport à l'axe x n'est présupposée. Cela amène à considérer 6 axes (Fig.II.10) et non plus 5. La variation de chaque quantité peut-être tracée le long de chacun de ces axes, qui correspondent aux deux axes de symétrie (axes 1 et 3), aux deux côtés (2_a et 2_b), à l'amont (axe 4) et à l'aval (axe 5). Les axes sont positionnés à une distance de 1.66 fois le rayon de l'obstacle. Pour synthétiser les principales courbes en les rendant plus lisibles, nous utilisons aussi une représentation simplifiée, sans barres d'erreur, où les axes 2_a et 2_b sont moyennés entre eux, les axes 4 et 5 moyennés entre eux et les axes 1 et 3 laissés tels quels.

Remarque sur les erreurs Les résultats que nous détaillons dans le chapitre suivant sont accompagnés de barres d'erreurs. Leur largeur est donnée soit par l'écart type σ des distributions étudiées, ce qui quantifie la largeur de la distribution, soit par l'intervalle de confiance à 95% de n échantillons, E_{mean} , définie par :

$$E_{mean} = \sigma \frac{Stud(0.95, n - 1)}{\sqrt{n - 1}} \quad (\text{II.1})$$

où *Stud* représente le coefficient de Student à 95% pour n échantillons.

La représentation canonique et les précisions apportées dans cette section sont utilisées dans la suite de cette thèse, aussi bien pour des représentations cinématiques que pour la représentation des marqueurs protéiques.

2.2 Analyse des images de phase

Le premier ensemble de codes vise à obtenir un maximum d'informations à partir des images de phase des cellules. Une expérience nécessite la prise de vue de nombreux champs (sec. 1.3.a). La première étape des analyses consiste le plus souvent à recoller les différents champs. Ensuite les informations liées à la vitesse, à la forme cellulaire ou encore aux différents marquages obtenus sont extraites.

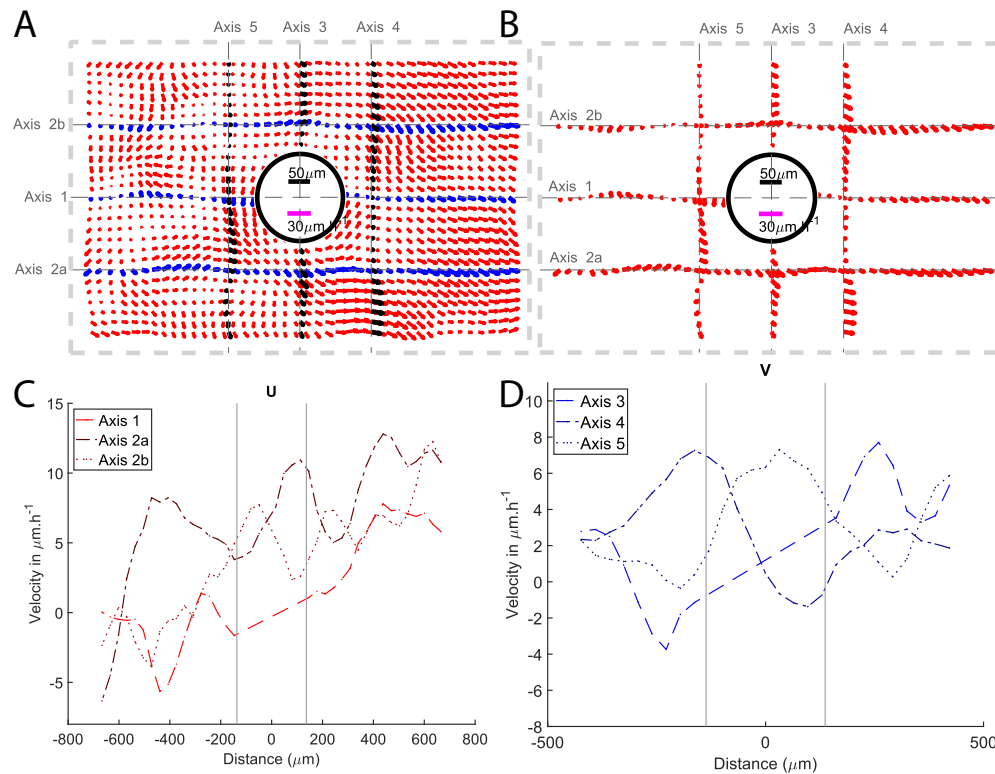


FIGURE II.10 – Représentations. (A) carte d'un champ de vitesse en rouge avec la position des différents axes. Les vecteurs bleus représentent ceux qui sont sélectionnés pour les axes 1, 2_a, 2_b. En noir, les vecteurs correspondent aux vecteurs sélectionnés pour les axes 3, 4, 5. Les vecteurs noirs sont issus de la moyenne entre les deux boîtes adjacentes à l'axe. (B) Extraction uniquement des vecteurs qui sont représentés sur chaque axe. (C) Exemple de graphe : composante x de la vitesse en fonction de la distance pour les axes 1, 2_a, 2_b. On représente l'obstacle par des barres verticales grises. (D) De même, la composante y de la vitesse sur les axes 3, 4, 5. Les axes sont positionnés à une distance de 1.66 fois le rayon de l'obstacle.

Recollement des champs Pour recoller les différents champs, on entre l'ordre de parcours des images au moment de l'enregistrement. Des corrélations d'images successives sont réalisées avec comme principe de boucle :

1. Corrélation de l'image $i + 1$ à l'image i et enregistrement du déplacement de $i + 1$ par rapport à i .
2. Corrélation de $i + 2$ à $i + 1$ et, en additionnant avec le déplacement précédent, enregistrement du déplacement de $i + 2$ par rapport à i .

Cela permet de corréliser chaque champ à un seul autre champ à la fois, et non pas à une image 10 ou 15 fois plus grande.

2.2.a Vitesse et dérivées

Vitesse Pour extraire la vitesse de nos cellules, l'algorithme dit de Kanade-Lucas-Tomasi (KLT) [115],[116] est utilisé. C'est un suivi d'objets qui consiste à rechercher les points d'intensité locale élevée. On définit une fenêtre de travail de taille fixée de 64 pixels. On cherche la correspondance des points dans cette fenêtre d'intérêt avec l'image au temps suivant. Cet algorithme est pyramidal : la reconnaissance est effectuée sur des images de résolutions successives différentes avec des tailles de fenêtre identiques. En commençant par la plus faible résolution, les mouvements à grande

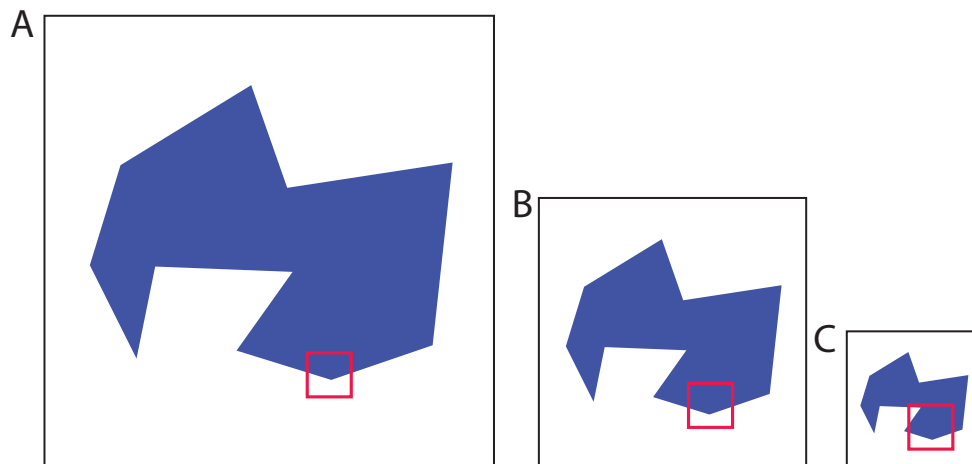


FIGURE II.11 – Schéma de principe de l'algorithme pyramidal du KLT. À partir d'une image très haute résolution (A) on crée des images moins résolues à chaque fois d'un facteur 2 (B,C). Le suivi des particules dans l'image est d'abord réalisé sur l'image la moins résolue (C) pour obtenir l'information des grands déplacements. Ensuite, les résultats sont affinés en déterminant le déplacement dans des images plus résolues (B puis A).

échelle sont retracés, et en augmentant la résolution la mesure des déplacements (Fig.II.11) est affinée.

En pratique les étapes sont les suivantes :

1. Recoller tous les champs de microscopie d'un temps donné pour créer une grande image.
2. Définir dans ces grandes images les points sur lesquels le KLT est calculé, en cherchant les maxima locaux de la dernière image (Fig.II.12, A, B). Le KLT est utilisé comme un suivi de particules rétroactifs (de la fin vers le début). Nous prenons 50 000 points, qui correspondent majoritairement aux bords des cellules, et excluons ceux qui sont trop proches entre eux (moins de 15 pixels de distance).
3. Une fois que tous les points sont définis sur la dernière image, pour calculer le KLT nous revenons dans les champs initiaux, car c'est numériquement plus léger et plus rapide (Fig.II.12, C).
4. Moyenner les vitesses des points qui figurent dans au moins deux champs.
5. Déterminer ainsi le champ de vitesse global (Fig.II.12, D).
6. Déplacer les points selon le vecteur vitesse trouvé et recommencer les étapes de calcul de KLT. Les maxima locaux ne sont calculés qu'une seule fois, au premier passage de l'algorithme.

NB : Travailler d'abord sur la grande image permet de définir une fois pour toutes les points d'intérêts, et pour la suite de faciliter les questions de moyennage. Si on inversait la façon de faire en travaillant sur chaque champ d'abord puis qu'on recollait par la suite les champs de vitesse, il y aurait plus de points aberrants au niveau des recouvrements (bord d'image); or moyenner cela demande plus de travail, car le nombre de points n'est pas constant d'une image à l'autre.

La deuxième remarque importante est que cette méthode permet de faire du suivi cellulaire, c'est-à-dire d'avoir une approche Lagrangienne des déplacements. Le passage

en eulérien est possible en interpolant ou en moyennant les résultats sur une grille fixe.

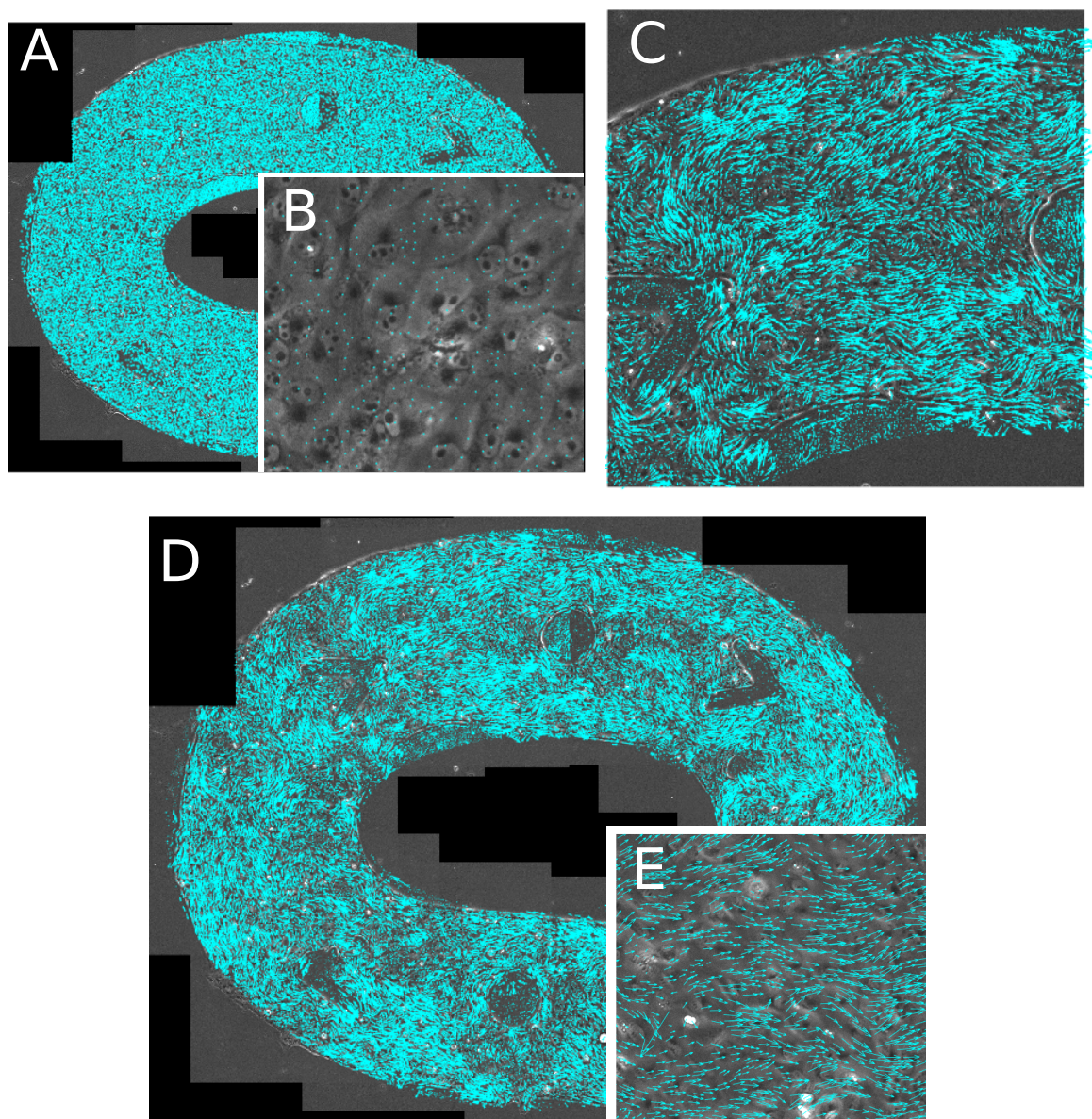


FIGURE II.12 – Représentation des différentes étapes de l'algorithme de KLT. À partir d'une image d'hippodrome entièrement recollée, les maxima locaux définissent les points du KLT (A, B). Ensuite, ces points sont repositionnés dans chaque champ initial, afin de ne pas trop ralentir le code. Sur ces champs le déplacement est calculé (C). Enfin, à partir de chaque champ, on revient dans l'image totale en recollant les champs, et en moyennant les vitesses des points qui sont retrouvés dans au moins deux sous-images (D,E).

Moyennes par boîtes À partir des champs de vecteurs très résolus, des moyennes spatiales par boîtes glissantes de 200×200 pixels sont effectuées, avec un recouvrement entre boîtes de 75%.

Quantités dérivées de la vitesse Enfin, à partir du champ de vitesse sur une grille, il est possible de remonter au gradient de vitesse, à la divergence ou au rotationnel, qui sont des informations utiles en modélisation.

2.2.b Forme cellulaire

La seconde analyse systématiquement réalisée sur nos images est une analyse de déformation cellulaire à partir de la transformée de Fourier. Cette méthode originale développée pendant mon stage de master a fait l'objet d'une publication [117].

Principe La transformée de Fourier d'une image périodique présente des pics dont l'intensité et la période informent sur l'orientation et la période spatiale (Fig. II.13, A, B, C). En présence d'un signal plus bruité mais visiblement anisotrope, comme dans le cas de fibres par exemple, la largeur du spectre renseigne sur la gamme de longueurs présentes dans l'image, et l'anisotropie du spectre renseigne sur l'anisotropie des fibres (Fig. II.13, D, E, F).

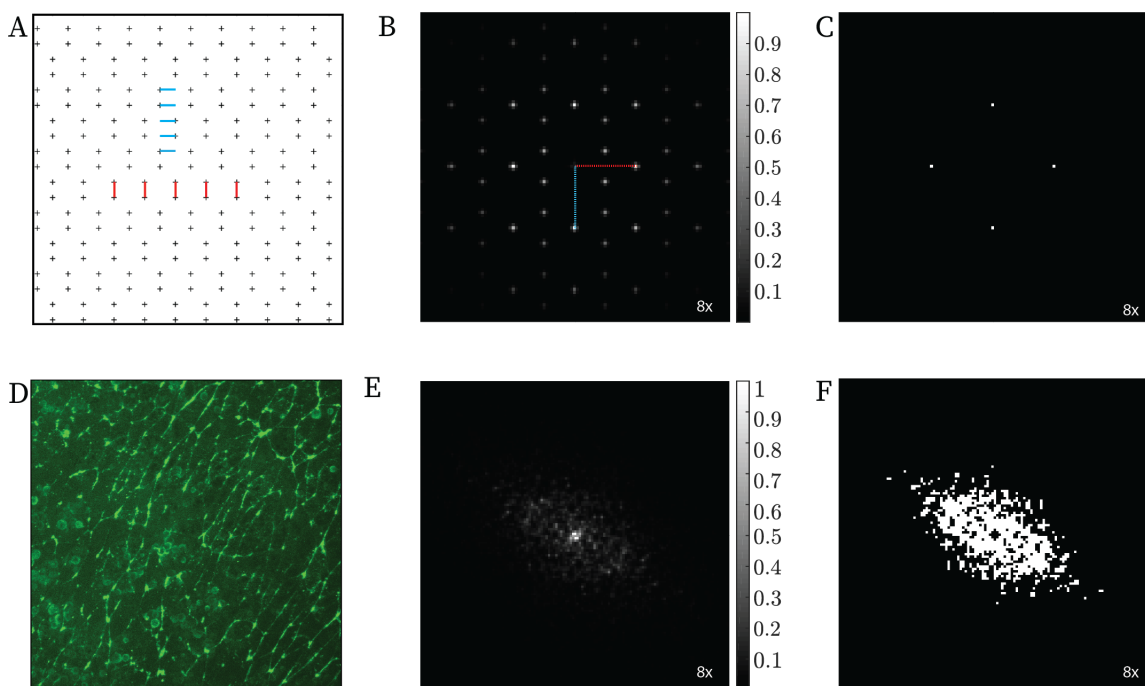


FIGURE II.13 – Exemples de transformée de Fourier. (A) Points disposés sur un réseau périodique. (B) Spectre de la transformée de Fourier de A avec un flou Gaussien de variance 0.6. (C) Même chose que B après sélection de $7 \cdot 10^{-4}\%$ points parmi les plus brillants. Les deux directions principales sont visibles. (D) Distribution de myosine anisotrope dans l'embryon de poulet. Image aimablement fournie par K. Weijer. (E) Spectre de Fourier de D avec un flou gaussien de variance 0.6. (F) Comme E après sélection de 0.1 % des points parmi les plus brillants. La mention 8x signifie que les spectres sont zoomés 8 fois.

Algorithme Pour adapter ce principe à de larges images de cellules (Fig. II.14), une image est découpée en plusieurs sous-images de 200 pixels qui se recouvrent de 75 %. La transformée de Fourier est appliquée sur chaque sous-image; la mesure du spectre caractérise en moyenne les cellules présentes dans cette sous-image. Cette méthode, qui ne nécessite pas de segmenter les cellules, a l'avantage d'être rapide pour le niveau d'exigence souhaité (environ une minute de calcul pour 10 000 cellules). Deux variantes existent, l'une qui nécessite une bonne qualité d'image mesure l'anisotropie et la taille des cellules (Fig. II.14, F, G), l'autre qui ne mesure que l'anisotropie et

qui est plus robuste au bruit (Fig.II.14, H,I). Pour plus d'informations, de validations et d'exemples, voir l'article [117].

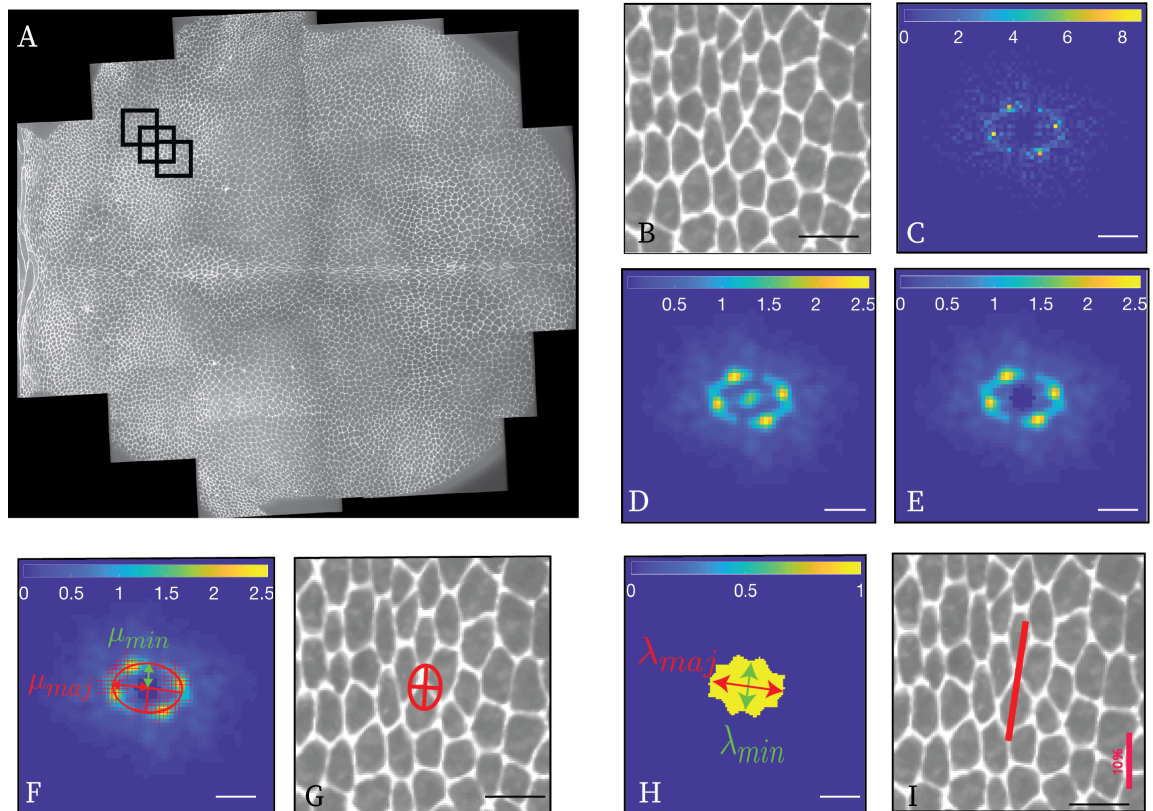


FIGURE II.14 – Étapes de la méthode par transformée de Fourier. (A) Une image entière segmentée issue du dos de la Drosophile. Les boîtes sont un exemple de sous-images avec leur recouvrement. (B) Image dans une boîte. (C) Densité spectrale de B. (D) Après un flou gaussien de variance 1.2. (E) Après suppression des basses fréquences (zones noires au centre). (F) Une ellipse est ajustée sur le tour. Les orientations et longueurs de ses axes (μ_{min}, μ_{maj}) dans l'espace de Fourier définissent une ellipse de même orientation mais avec les axes inversés en longueur dans l'espace réel (G). La taille de l'ellipse correspond à la taille moyenne de la cellule. (H) Remplir l'ellipse et mesurer sa matrice d'inertie améliore la détermination du motif d'anisotropie, quantifié par le rapport des axes des ellipses $\lambda_{min}/\lambda_{maj}$ dans l'espace de Fourier et la direction θ des axes de l'ellipse, mais aux dépens de la détermination absolue de la taille des axes. De retour dans l'espace réel (I), l'anisotropie du motif est déterminée (son amplitude est représentée par la taille de la barre et sa direction par la direction de la barre) mais pas la taille cellulaire. Pour (C, D, E, F, H) l'échelle est $0.1 \mu\text{m}^{-1}$. Pour (B, G, I) l'échelle est $10 \mu\text{m}$, pour (I) l'échelle rose représente 10 % d'élongation.

2.2.c Densité

Après la vitesse et la déformation cellulaire, un des ingrédients qui nous importe est celui de la densité. Trois méthodes sont utilisées au cours de cette thèse pour cela. La première repose sur un comptage manuel, la seconde sur des marquages de noyaux.

Vérifications manuelles Pour valider les deux méthodes suivantes, un comptage manuel est effectué sur deux images entières de densités différentes, ce qui correspond à compter environ 6000 cellules.

Densité finale par marquage En utilisant des cellules marquées DAPI, fixées à la fin de l'expérience, nous mesurons la densité finale. L'algorithme consiste en une série de traitements pour homogénéiser le marquage à l'intérieur de chaque noyau. De cette manière, la position des noyaux est extraite. Ensuite, un bassin versant (watershed) est appliqué pour différencier les noyaux très proches. Un exemple de ces étapes est illustré en Fig. II.15. En comparant avec le comptage manuel, on trouve peu d'erreurs (autour de 1%), avec une qualité proche de celle de l'œil. Les défauts trouvés concernent par exemple des noyaux très allongés, petits, peu contrastés, ou fusionnés.

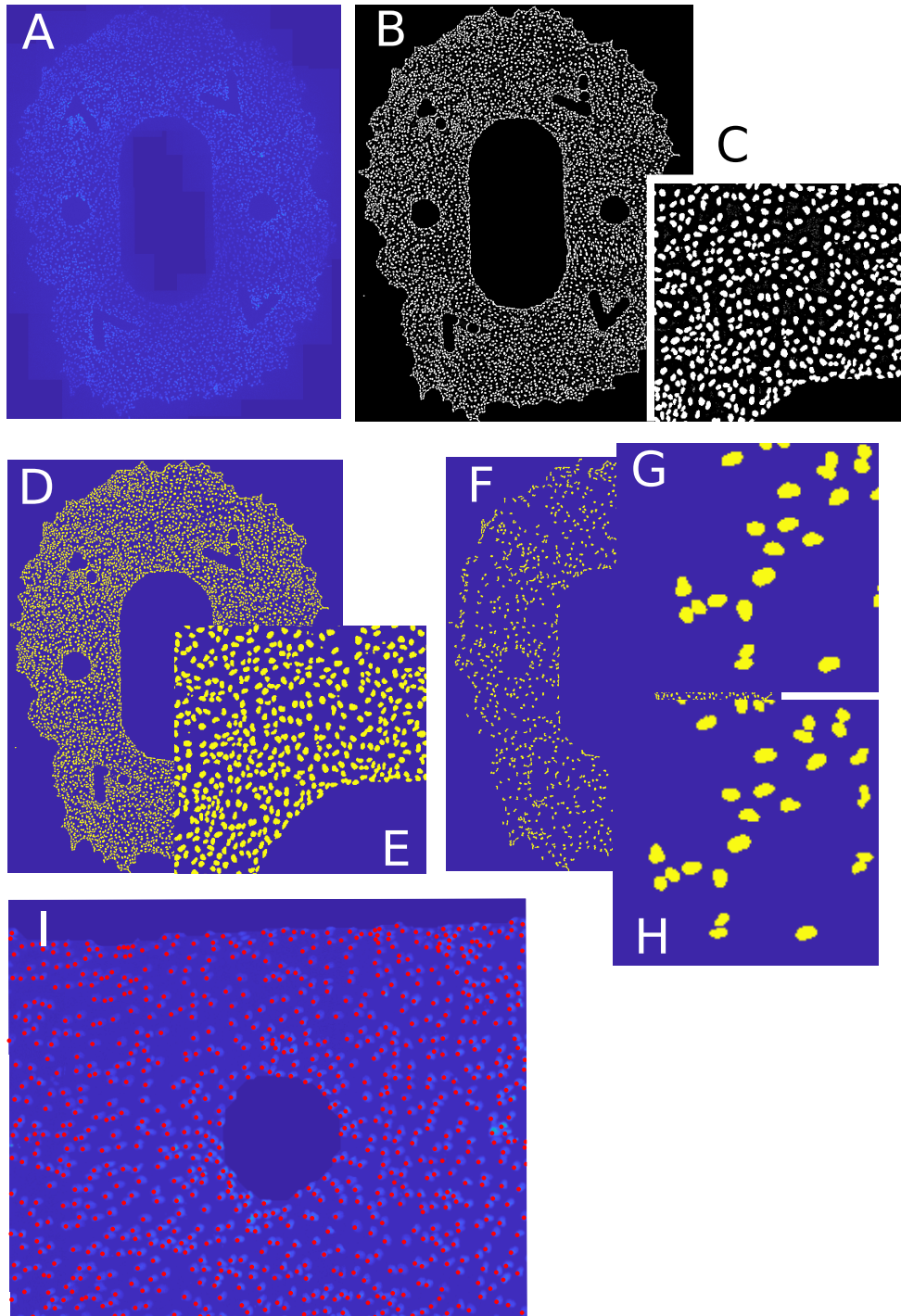


FIGURE II.15 – Étapes pour la détection de noyaux sur images marquées. (A) Image d'un hipodrome en DAPI. (B) Seuillage brut. (C) Zoom de B après seuillage. (D) Nettoyage de B pour enlever les points de trop petite taille. (E) Zoom de D. (F) Filtre pour ne garder que les zones qui sont plus grosses que deux fois la taille moyenne des cellules. (G) Zoom de (F). (H) après utilisation d'un bassin versant (watershed) qui permet de différencier les noyaux trop proches. (I) Résultat final et zoomé des points détectés superposés à une image en DAPI. Pour cet exemple on montre une expérience où les cellules débordent du motif, bien que dans la suite de telles expériences soient exclues des analyses de marquage.

Les méthodes développées dans cette section permettent donc, sur des images de phase, de recoller de multiples champs et d'extraire la vitesse, les opérateurs différen-

tiels dérivés de la vitesse, la densité ainsi que la forme cellulaire.

2.3 Analyse d'images fixées

Tout comme pour les images de phase, la première étape de l'analyse des images fixées est de recoller les différents champs obtenus. Pour donner un ordre de grandeur, imager une bande en épifluorescence demande l'acquisition de 3 champs de 2048×2048 pixels au 10X; et de 6 champs au 20X. Un hippodrome demande une quinzaine de champs au 10X, et donc une trentaine de champs au 20X.

Ensuite, pour extraire des informations de toutes les images d'immuno-fluorescence, un grand nombre d'analyses peuvent être réalisées. Nous nous intéressons surtout à des analyses scalaires, relatives à l'intensité d'un marqueur en une région donnée.

Dans le cas des bandes, les analyses sont surtout réalisées selon les deux axes principaux des bandes : l'intensité moyenne en fonction de la distance par rapport au front ou aux bords du motif.

Dans le cas des hippodromes des informations quant à la distance par rapport au centre des motifs, ainsi que selon l'abscisse curviligne définie par le rayon moyen de l'hippodrome sont aussi extraites. La Fig. II.16 schématise ces deux types d'analyses dans laquelle des cas simplifiés utiles à la compréhension des méthodes sont détaillés.

Orthoradiale, le long de l'hippodrome La première est une analyse orthoradiale le long de l'hippodrome (Fig.II.16, A). Pour cela, une zone centrale (zone hachurée) est manuellement définie avant d'être agrandie pour qu'elle arrive au milieu de l'hippodrome (ligne brisée allant de 0 à L). Des points équidistants sur cette abscisse curviligne sont définis et permettent d'étudier la variation de l'intensité le long de l'abscisse curviligne (Fig.II.16, B). La seconde possibilité est de moyennner sur toute la largeur de l'hippodrome en suivant l'abscisse curviligne.

Radiale, perpendiculairement à l'hippodrome La seconde analyse est radiale, selon la perpendiculaire à l'hippodrome. Une zone centrale (zone hachurée, r_1) est manuellement définie puis agrandie pour obtenir une distance fixe r entre la zone 1 et la zone 2. La moyenne dans cet anneau d'épaisseur r est calculée. Ce processus est répété entre r_2 et r_3 , et ainsi de suite. En moyennnant sur des anneaux d'épaisseurs r , le rapport signal sur bruit peut être amélioré afin de mettre en évidence un motif le long de la perpendiculaire à l'hippodrome, si il y en a. Dans la Fig.II.16, C et D, 3 anneaux d'intensité moyenne différentes sont visibles.

2.4 Analyse couplée imagerie vivante et fixée

Après avoir analysé d'une part les résultats issus des images de phase et d'autre part les résultats issus des images fixées, nous développons un ensemble de protocoles d'analyse pour lier les deux parties entre elles.

Principe de correspondance Pour pouvoir faire des comparaisons quantitatives entre les données cinématiques (vitesse, forme cellulaire) et les données protéiques (distributions spatiales) il faut pouvoir mettre les différentes images en correspondance. En effet, l'acquisition des images de phase au 10X (Fig.II.17, A) ou de fluorescence

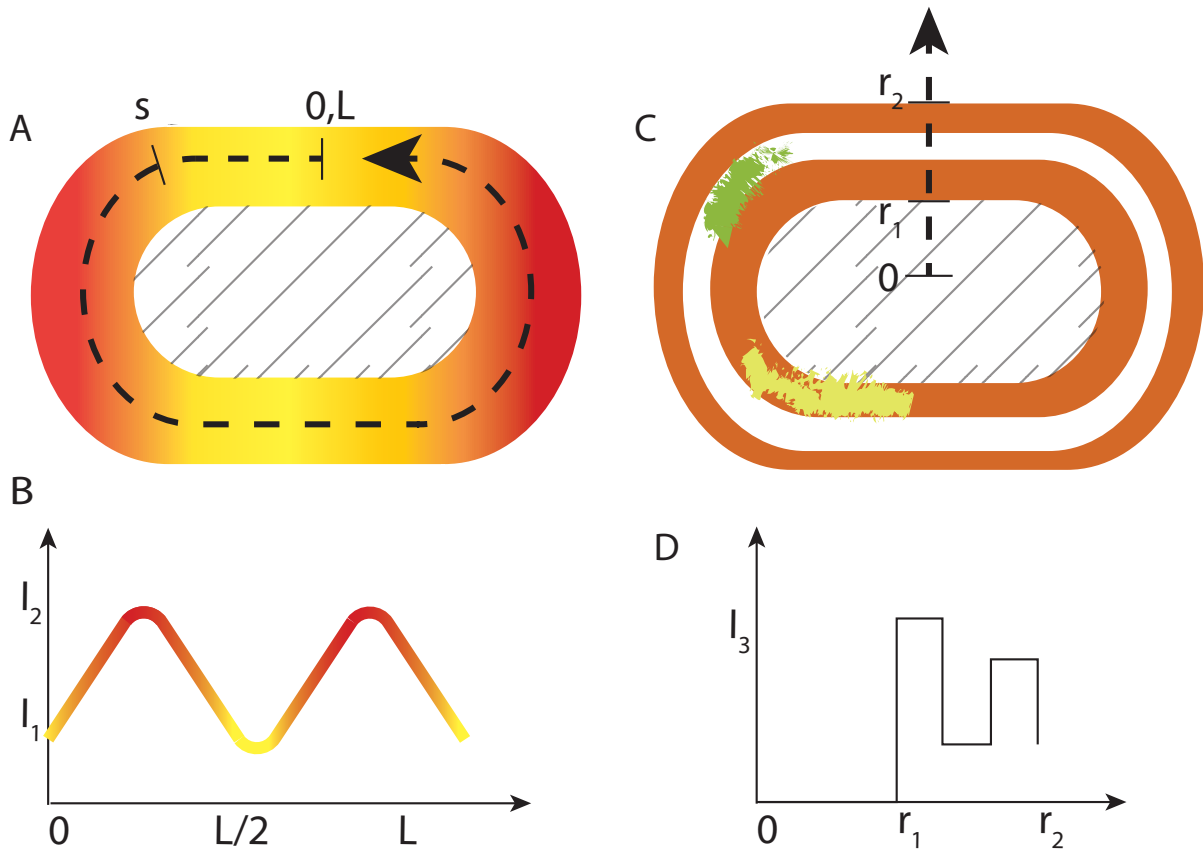


FIGURE II.16 – Schéma représentatif des deux analyses de base sur l'hippodrome : (A,B) orthoradiale, en fonction de l'abscisse curviligne le long du rayon médian; (C,D) radiale.

(Fig.II.17, B) ne se faisant pas le même jour, la position d'un échantillon au moment de l'enregistrement de la phase n'est pas du tout la même qu'au moment de l'enregistrement des images de fluorescence. Il faut donc trouver la transformation affine (translation et rotation) pour passer d'une image à l'autre. Anthony Baptista, stagiaire que j'ai encadré, a rédigé des programmes, qui ont ensuite été largement retravaillés. En notant I_{phase} l'image de phase et I_{fluo} l'image en fluorescence, la transformation T_r les lie par l'équation matricielle suivante :

$$I_{phase} = T_r I_{fluo} \quad (II.2)$$

où :

$$T_r = \begin{pmatrix} s_x \cos \theta & s_y \sin \theta & 0 \\ -s_x \sin \theta & s_y \cos \theta & 0 \\ t_x & t_y & 1 \end{pmatrix} \quad (II.3)$$

Le paramètre θ est l'angle de rotation. Le paramètre s est le facteur de proportionnalité entre les images (s_x et s_y sont égaux car les capteurs utilisés sont toujours carrés) : il vaut 1 pour deux images de même grossissement, 2 pour positionner une image deux fois plus grosse sur l'originale. Enfin, (t_x, t_y) est le vecteur de translation.

Algorithme Pour arriver à extraire cette transformation de la façon la plus générale possible, c'est-à-dire pour pouvoir l'utiliser aussi bien sur des expériences en hippodrome que sur des bandes, sur des images de phase ou de vimentine, le dénominateur

commun à toutes les expériences est utilisé : l'existence d'obstacles et de bords qui permettent de choisir des points de référence sur chaque image.

Considérons pour l'exemple que nous essayons de repositionner et de faire la correspondance entre une image de 20X en fluorescence (Fig.II.17, B), et une image de 10X en phase (Fig.II.17, A). Nous choisissons comme points de références le centre de l'obstacle (Fig.II.17 points cyan) et les droites de bords (Fig.II.17 points jaunes et verts). Les différentes étapes de l'algorithme sont les suivantes (illustrées en Fig.II.17).

1. Nous recollons toutes les images prises afin d'avoir des images reconstituées au 10X et au 20X.
2. Nous déterminons pour chaque grossissement le disque qui correspond à l'obstacle afin d'avoir une localisation précise du centre de celui-ci (Fig.II.17 A, B points cyan).
3. Pour chaque grossissement, nous choisissons ensuite arbitrairement 2×2 points pour définir les droites qui font les bords des motifs (Fig.II.17 carrés blancs). Nous faisons attention à garder le même ordre de sélection des points d'une image à l'autre afin que l'on puisse facilement identifier les deux droites dans chaque cas (Fig.II.17 A, B carrés blancs numérotés).
4. Une fois le centre des obstacles trouvés et les deux droites définies, on projette orthogonalement le centre du cercle sur les droites (Fig.II.17 A, B points rouges) et 2×2 points supplémentaires (Fig.II.17 A, B triangles jaunes et points verts) à une distance fixée du premier.
5. Ainsi, une image est définie par 6 points de référence (étoiles sur Fig.II.17) qui permettent d'estimer la transformation affine T_r .

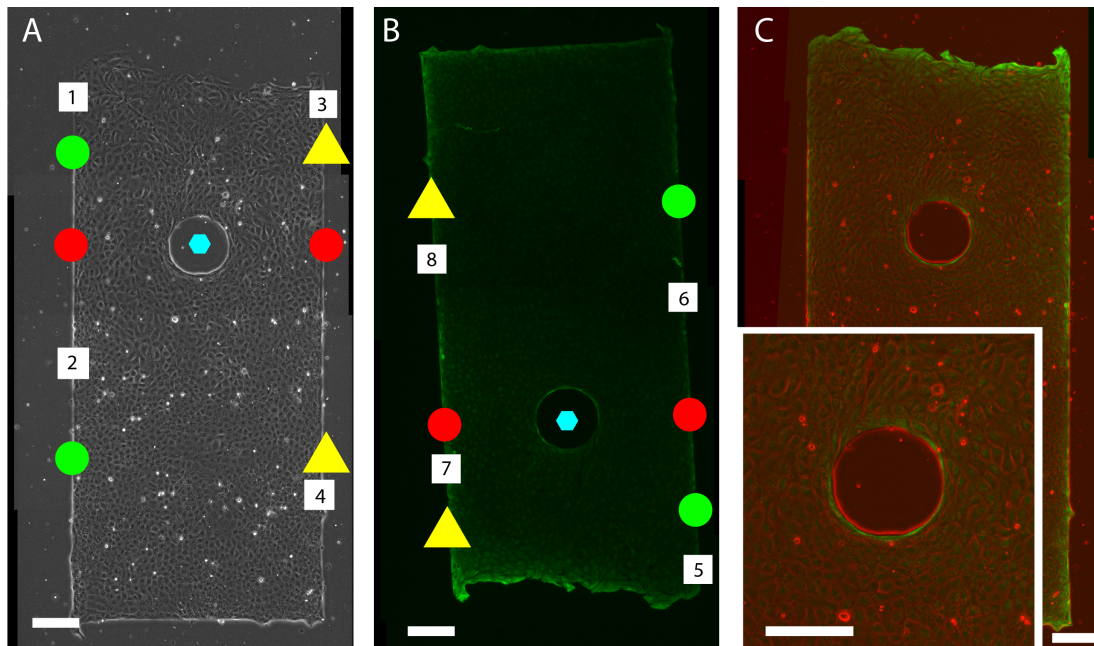


FIGURE II.17 – Correspondance entre images de phase et marquages. (A) Image de phase au 20X. (B) Image de marquage de vimentine au 20X. (C) Superposition des images de phase et de marquage, une fois la transformation trouvée. Pour A et B les carrés blancs numérotés représentent les points sélectionnés manuellement et leur ordre. En cyan, le centre de l'obstacle. En rouge les projections orthogonales du cercle sur les droites définies par les bords. En vert et en jaune les points de référence supplémentaire calculés. Pour plus de détails, voir texte. Les barres d'échelle représentent 200 μm .

2.5 Analyse des images de fluorescence pour la force

La technique utilisée pour mesurer les forces grâce aux déplacements des billes repose sur la théorie de l'élasticité qui décrit le déplacement du substrat comme une conséquence des forces exercées à son interface [118]. La connaissance de l'état de référence est essentielle pour calculer la déformation du substrat comme indiqué en section 1.1.b.

Déplacement des billes À la fin d'une expérience les cellules sont décollées pour avoir l'état de référence du substrat. Cela demande une intervention manuelle sur l'échantillon qui, même réalisée avec précaution, peut légèrement décaler sa position sur la platine d'enregistrement. Si les images ne sont pas repositionnées correctement pour corriger cette inversion, l'estimation des forces de traction est faussée. La première étape de l'analyse des forces est donc de repositionner les images à chaque temps par rapport à l'image de référence où aucune force ne s'exerce sur le substrat. Les deux méthodes expérimentales (Fig.II.2) ont chacune leur méthode d'analyse, dont le principe est le même.

Dans le cas où il n'y a pas de billes au niveau du verre et que le champ est assez grand :

- Après décollement des cellules, une zone où il n'y a jamais eu de cellules est sélectionnée.
- Cette zone est corrélée aux images des billes à chaque temps t .
- Les images correctement repositionnées sont enregistrées.
- Le KLT des billes entre l'image au temps t et l'image après décollement des cellules est calculé pour chaque temps t .

Dans le cas des expériences où les billes au niveau du verre sont enregistrées :

- L'image des billes au niveau du verre après décollement des cellules est corrélée avec l'image des billes au niveau du verre pour chaque temps t .
- Le déplacement est enregistré.
- Le déplacement est appliqué aux images des billes à l'interface cellules-substrat.
- Les images correctement repositionnées sont enregistrées.
- Le KLT des billes entre l'image au temps t et l'image après décollement des cellules, pour chaque temps t est calculé.

Principe de l'inversion À partir des déplacements cellulaires, les forces sont calculées par l'intermédiaire de la fonction de Green. En notant \vec{U} le déplacement cellulaire, \vec{G} la fonction de Green du matériau élastique (ici le substrat) et \vec{F} la force exercée par les cellules sur le substrat :

$$\vec{U}(\vec{r}) = \int_{-\infty}^{\infty} \vec{G}(\vec{r} - \vec{r}') \vec{F}(\vec{r}') d\vec{r}' \quad (\text{II.4})$$

Cela signifie que le déplacement au point \vec{r} est déterminé par la somme des influences des forces aux points \vec{r}' . Formellement, l'équation Eq. II.4 se réécrit sous forme matricielle par un produit de convolution :

$$U = G * F \quad (\text{II.5})$$

et nécessite, pour trouver F , d'être inversée. La technique de résolution effectuée est dite cytométrie de traction par transformée de Fourier (FTTC) [119]; elle a l'avantage d'être bien plus rapide que la résolution dans l'espace direct. Dans l'espace de Fourier, l'équation II.5 devient :

$$\tilde{U}(k) = \tilde{G}(k)\tilde{F}(k) \quad (\text{II.6})$$

Dans l'hypothèse d'un substrat issu d'un milieu élastique semi-infini ([118]), \tilde{G} vaut :

$$\tilde{G}(k) = \frac{2(1+\nu)}{Ek^3} \begin{pmatrix} (1-\nu)k^2 + \nu k_y^2 & -\nu k_x k_y \\ -\nu k_x k_y & (1-\nu)k^2 + \nu k_x^2 \end{pmatrix} \quad (\text{II.7})$$

$\tilde{G}(k)$ est inversible ($\det \tilde{G}(k) \neq 0$) partout sauf en $k_x = 0, k_y = 0$ qui n'est pas une solution qui nous intéresse ici. Ainsi :

$$\tilde{F}(k) = \tilde{G}(k)^{-1}\tilde{U}(k) \quad (\text{II.8})$$

où l'inverse de $\tilde{G}(k)$ est :

$$\tilde{G}(k)^{-1} = \frac{2(1+\nu)}{Ek^3} \frac{1}{k^2} \begin{pmatrix} (1-\nu)k^2 + \nu k_x^2 & \nu k_x k_y \\ \nu k_x k_y & (1-\nu)k^2 + \nu k_y^2 \end{pmatrix} \quad (\text{II.9})$$

Expérimentalement, ce qui est accessible est le déplacement des billes, $U(r)$. Pour passer dans l'espace de Fourier et utiliser la formule donnée par II.8, les déplacements sont interpolés sur une grille de pas régulier. Celui-ci à son importance : plus le nombre de points est petit et plus le résultat du déplacement est lissé (Fig.II.18, A, B) ce qui a pour conséquence une perte d'information. L'évolution de la moyenne de la norme des forces en unités arbitraires est représentée (Fig.II.18, C) : on voit qu'elle diminue d'un facteur 1.5 quand le nombre de points est diminué d'un facteur 2. Dans la suite, le plus petit pas possible est choisi, ce qui correspond à la taille moyenne entre les billes soit $N = 400$ points (≈ 5 pixels) dans chaque direction (Fig.II.18, B).

L'étude rhéologique (voir annexe 4) renseigne par ailleurs sur le module d'Young du gel (≈ 3 kPa). Cela permet de calculer la fonction de Green directement dans l'espace de Fourier en supposant un milieu incompressible, de coefficient de Poisson $\nu = 0.5$. À ce stade, nous avons tous les ingrédients nécessaires pour résoudre le système décrit dans l'Eq. II.8. Il reste ensuite à revenir dans l'espace réel par transformée inverse pour avoir $F(r)$ et terminer la résolution.

Régularisation Cette résolution directe par le biais de l'inversion de la matrice G donne la solution non régularisée de l'équation. Mais bien souvent le bruit expérimental rend l'inversion difficile car les solutions ne sont plus uniques : le problème est dit mal posé, et les bruits de mesure sont perceptibles (Fig.II.19, A).

Pour pallier cela, des techniques de régularisation existent, on parle alors de reg-TFM [120] [121]. Elles permettent de lisser la solution sans trop la dénaturer.

Nous utilisons dans la suite une régularisation dite par troncature de la décomposition en valeurs singulières (tSVD pour truncated singular value decomposition) [122]. On rappelle que la solution exacte de G (échantillonnage sur N points, dans notre cas $N = 400$) est donnée par :

$$\tilde{G} = \sum_{k=1}^{k=n} \tilde{G}(k) \quad (\text{II.10})$$

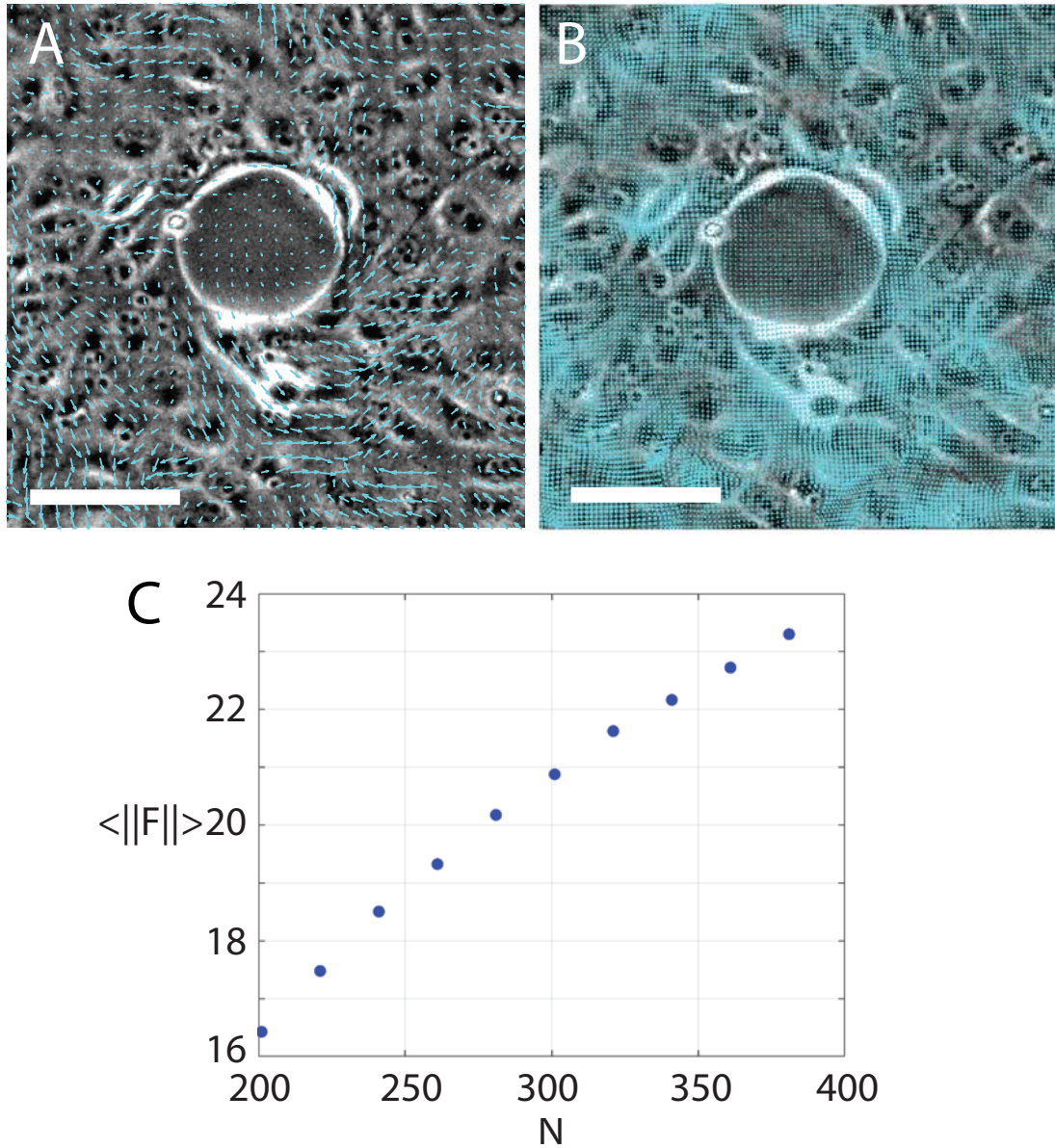


FIGURE II.18 – Influence du pas de la grille d’interpolation sur le champ de déplacement. Interpolation de champs de déplacements des billes : (A) $N = 128$; (B) $N = 400$. (C) Moyenne de la norme des forces (unités arbitraires) en fonction du nombre de points dans chaque direction.

La troncature de valeurs singulières consiste à ordonner les valeurs propres Λ_i de \tilde{G} , puis à ne prendre que les plus grandes. La courbe des Λ_i , ordonnées par valeurs décroissantes, en fonction de i a toujours une forme de “L” (voir Fig.II.19, C). C’est pourquoi il est d’usage de calculer la position k_{trunc} du maximum de dérivée seconde pour déterminer la troncature. On obtient ainsi la fonction de Green tronquée :

$$\tilde{G}_{trunc} = \sum_{k=1}^{k=k_{trunc}} \tilde{G}(k) \quad (\text{II.11})$$

À partir de là, les étapes sont les mêmes que dans le cas sans régularisation : inversion pour trouver \tilde{G}_{trunc}^{-1} qui permet de calculer $\tilde{F}(k)$ puis par transformée de Fourier inverse $F(r)$. On remarque par ailleurs que couper les petites valeurs propres revient en fait à couper les hautes fréquences, donc à lisser le bruit. Le champ obtenu a une

allure similaire à celle sans régularisation (Fig.II.19, B) mais est plus lisse (Fig.II.19, D).

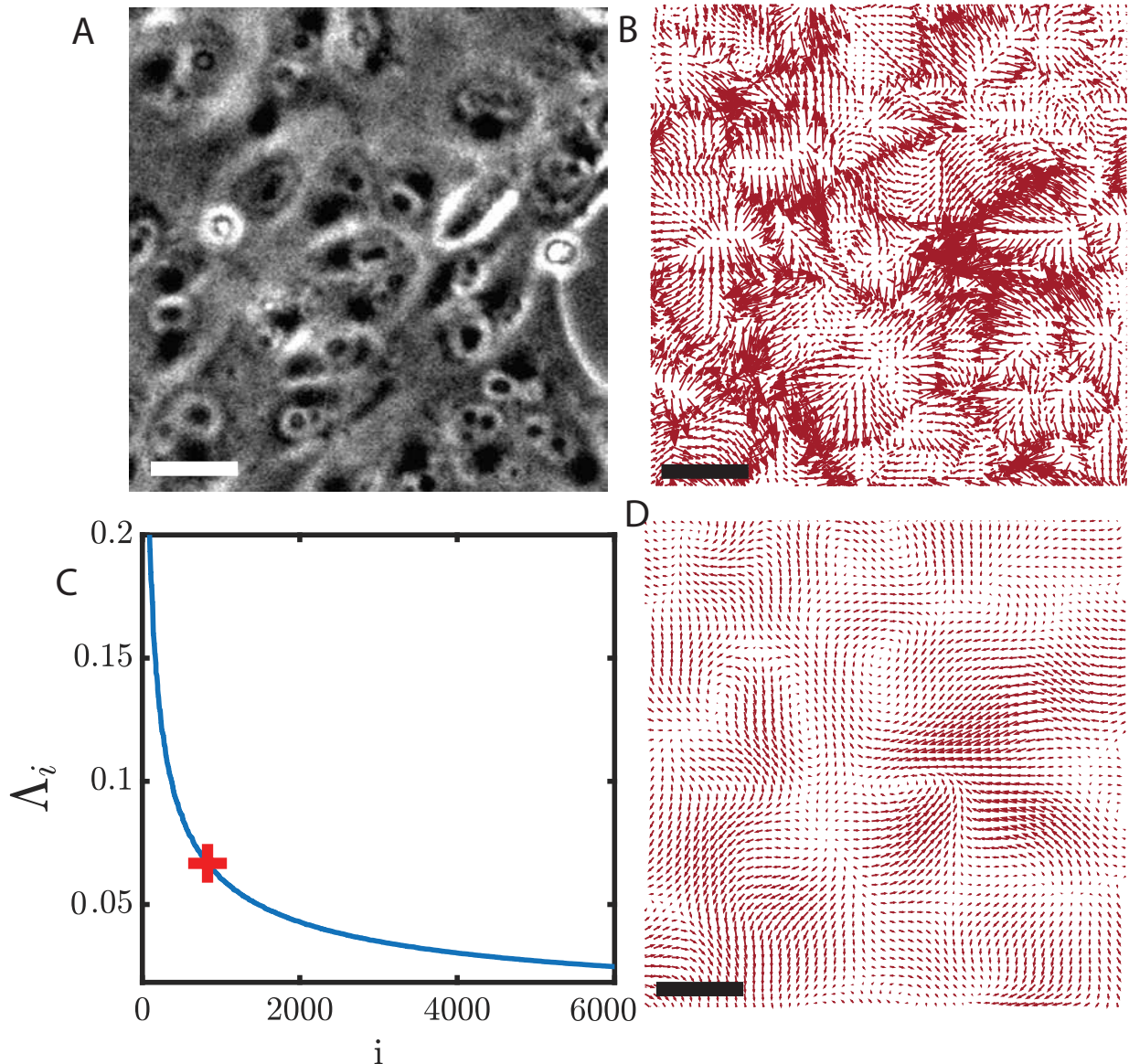


FIGURE II.19 – Régularisation de la TFM. (A) Champ de force sans régularisation, $N = 400$ points. (B) Champ de force régularisé, $N = 400$, même zone que A. (C) Image de phase des cellules en regard de (A) et (B). Barres d'échelles : $30 \mu\text{m}$. (D) Courbe en "L" de régularisation. Les valeurs propres sont ordonnées. On garde celles jusqu'à la croix rouge qui indique le maximum de la dérivée seconde.

Résumé Ce chapitre a permis de passer en revue les différentes techniques expérimentales et d'analyses développées au cours de cette thèse. En particulier, nous travaillons sur deux motifs principaux qui sont les bandes et les hippodromes, ces derniers sur des substrats de différentes rigidités. Les tailles des obstacles et les largeurs de bandes sont aussi variables et l'existence ou non de marquages est un paramètre supplémentaire. Le tableau II.1 récapitule le nombre d'expériences analysées pour chaque condition, en sachant que plus d'expériences ont été réalisées. Chacune de ces conditions mène au développement de techniques d'analyses appropriées.

D	L	Bande dur	Hippodrome dur	Hippodrome mou
150	750	X	8	X
225	750	X	7	1
200	1000	X	6	1
300	1000	16	5	X

TABLEAU II.1 – Tableau récapitulatif du nombre d'expériences analysées dans chaque condition. Les tailles sont données en μm et indiquent le diamètre D de l'obstacle et la largeur L des bras des hippodromes. Un hippodrome correspond à 2 obstacles. X signifie qu'il n'y a pas d'expériences à ces tailles qui soit analysée.

Chapitre III

Migration en bandes

Ce chapitre décrit les expériences de migration de cellules épithéliales autour d'un obstacle dans une bande qui constituent la base de travail de cette thèse. Ces expériences sont réalisées après incubation avec une drogue (mitomycine C) qui inhibe la division cellulaire et permet de s'en affranchir. L'étude qui compare les effets avec et sans mitomycine est disponible en annexe 5. On retiendra que l'évolution de la densité cellulaire est diminuée d'un facteur deux, et que la vitesse varie dans le temps. Pour plus de précisions sur le rôle des divisions sur la migration cellulaire, l'étude de Gauguelin *et al.* [72] est effectuée dans des conditions similaires.

Chacune des expériences présentées dans cette thèse a été traitée à la mitomycine, à moins d'une mention contraire. Pour caractériser la migration autour de l'obstacle l'aspect cinématique, l'aspect protéique, et les interactions entre les différents acteurs sont explorés dans ce chapitre.

1 Cinématique de la migration

Pour étudier la cinématique deux quantités sont analysées : la vitesse (voir sec 2.2.a) et la déformation (voir sec : 2.2.b). Une étude des variations temporelles et spatiales de ces quantités est systématiquement réalisée.

1.1 Vitesse

Évolution temporelle Les résultats sont présentés en Fig. III.1 et s'appuient sur la représentation canonique présentée dans les méthodes 2.1. Les cartes de vitesses au temps initial et final (Fig.III.1, A-B) montrent une augmentation de la vitesse dans toute la monocouche. Cette augmentation est confirmée par la représentation de l'évolution de la norme de la vitesse au cours du temps (Fig.III.1, C-D) sur chaque axe. Chacune des courbes représentées est issue de la moyenne de 16 expériences.

Pour chacun de ces axes, l'accélération est déterminée comme la pente des ajustements linéaires; la moyenne de ces accélérations est $0.48 \pm 0.04 \mu\text{m.h}^{-2}$. Selon y , la symétrie est respectée : l'axe 2_a est similaire à l'axe 2_b (Fig.III.1,B). Selon x , l'amont (axe 5, jaune) a une accélération 1.6 fois plus faible que l'aval.

Variation spatiale Les variations spatiales de la vitesse sur les différents axes apportent des informations supplémentaires. En Fig. III.2 la variation de la vitesse sur

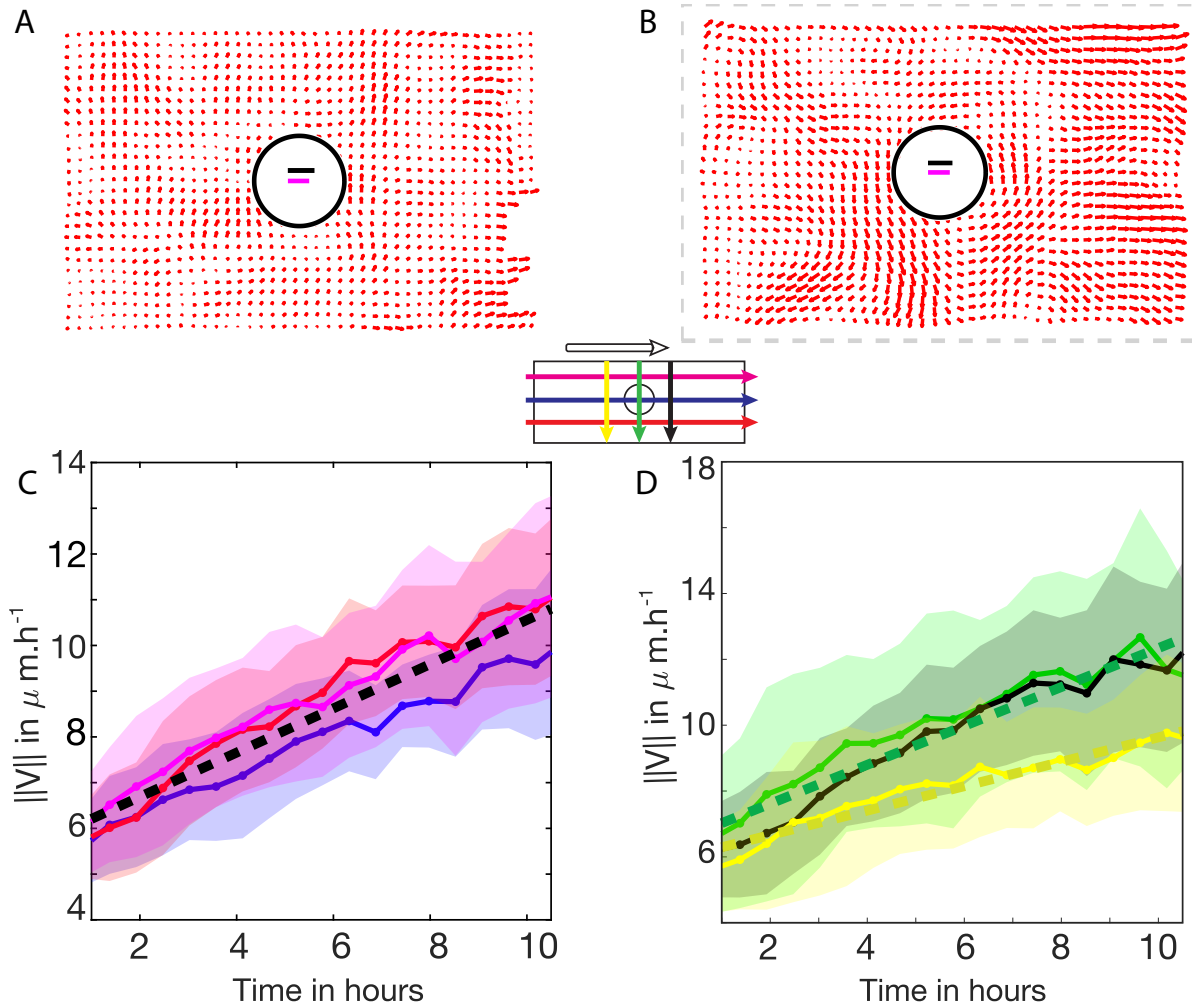


FIGURE III.1 – Norme de la vitesse en fonction du temps. (A) Carte représentative de la vitesse au temps initial d'une expérience. (B) Carte représentative au temps final d'une expérience. (C) Vitesse en fonction du temps pour les axes 1 (bleu), 2_a (rouge), 2_b (magenta). Le trait fin pointillé est un ajustement linéaire sur la moyenne des trois courbes en fonction de t (pente : $0.48 \pm 0.03 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-2}$, ordonnée à l'origine : $5.7 \pm 0.2 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$). (D) Norme de la vitesse en fonction du temps pour les axes 3 (vert), 4 (noir), 5 (jaune). Les traits fins pointillés représentent des ajustements linéaires de l'évolution de la vitesse en fonction de t sur la moyenne des axes noirs et verts (pente : $0.59 \pm 0.04 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-2}$, ordonnée à l'origine : $6.4 \pm 0.3 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$) et sur l'axe jaune (pente : $0.37 \pm 0.04 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-2}$, ordonnée à l'origine : $6.0 \pm 0.3 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$). La barre d'échelle magenta représente $30 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$, la barre d'échelle noire représente $50 \mu\text{m}$. Pour C et D, les contours représentent l'intervalle de confiance calculé sur 16 expériences.

l'axe 2 en fonction de la position et du temps (les autres axes ne sont pas montrés mais sont similaires) montre des oscillations ou des ondes de vitesses compatibles avec les résultats de [54], [123],[72] qu'il serait intéressant de quantifier à l'avenir. On montre également un décalage vers les vitesses plus élevées, avec l'apparition progressive d'un gradient de vitesse qui rend les moyennes temporelles délicates.

On réalise alors l'étude des variations spatiales en fin d'expérience, en moyennant sur 1 h et 16 expériences (Fig. III.3). Sur chacune de ces courbes l'intervalle de confiance sur le nombre d'expériences est représenté en contours tandis que l'intervalle de confiance sur la moyenne temporelle est représenté en barres. On voit que l'intervalle de confiance temporel est faible : les variations de vitesses au cours d'une expérience sont négligeables devant les variations entre expériences.

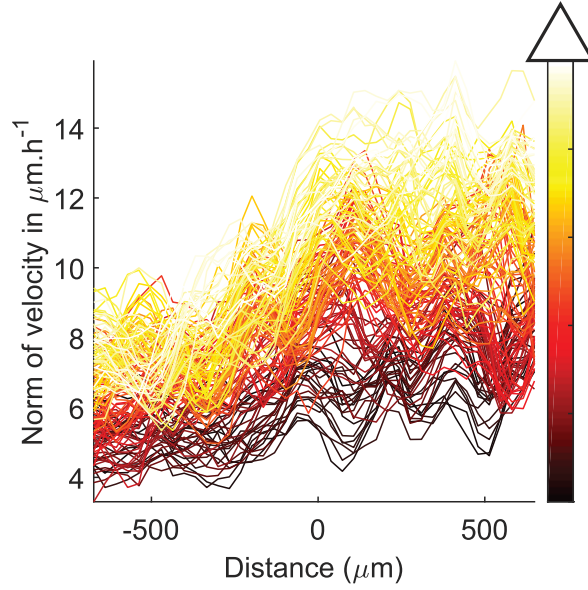


FIGURE III.2 – Norme de la vitesse en fonction de la position le long de l'axe 2. Le code couleur indique différents temps entre 0 et 11 h.

En Fig. III.3,A la symétrie spatiale de la norme de la vitesse sur les axes 2_a et 2_b est visible, ainsi que le gradient de vitesse associé. Cette courbe est ajustée par une droite de pente $5.3 \pm 0.1 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ et d'ordonnée à l'origine $11.2 \text{ } \mu\text{m.h}^{-1}$. Pour l'axe de symétrie (axe 1, bleu), la vitesse est constante en amont de l'obstacle et vaut $7.8 \pm 0.3 \text{ } \mu\text{m.h}^{-1}$. Nous ne notons pas de ralentissement aux abords de l'obstacle. Après l'obstacle, il existe un gradient de vitesse qui agit sur une distance de $200 \text{ } \mu\text{m}$.

Sur les axes perpendiculaires au sens principal de la migration, la vitesse sur l'axe de symétrie est à peu près constante et vaut $11.5 \pm 1.0 \text{ } \mu\text{m.h}^{-1}$. L'aval (axe noir) va en moyenne à $12.5 \pm 2.1 \text{ } \mu\text{m.h}^{-1}$ et l'amont (axe jaune) à $9.7 \pm 1.0 \text{ } \mu\text{m.h}^{-1}$. Les axes amonts et aval montrent des oscillations de vitesse de même période.

Ces expériences, grâce à la moyenne temporelle et entre expériences, permettent d'obtenir des courbes maîtresses en vitesse, présentées en Fig.III.3, B, D. Ces courbes maîtresses serviront de référence pour les simulations, les études analytiques et *in vitro* et elles peuvent être décrites par les équations suivantes au temps t_f , après environ 10 h d'expérience :

Symétrie des axes (2_a et 2_b) :

$$\|\vec{v}(x, L/2, t_f)\| = \|\vec{v}(x, -L/2, t_f)\|$$

Gradient de vitesse spatial sur (2_a) :

$$\|\vec{v}(x, y = L/2, t_f)\| = 5.3 \cdot 10^{-3} x + 11.2$$

Plateau de vitesse, puis gradient de vitesse sur l'axe de symétrie

$$\|\vec{v}(x < 0, 0, t_f)\| = 7.8$$

$$\|\vec{v}(x > 0, 0, t_f)\| = \alpha t + \beta$$

Variations sur les axes perpendiculaires

$$\langle \|\vec{v}(x = M/2, y, t_f)\| \rangle = 12.5$$

$$\langle \|\vec{v}(x = -M/2, y, t_f)\| \rangle = 9.7$$

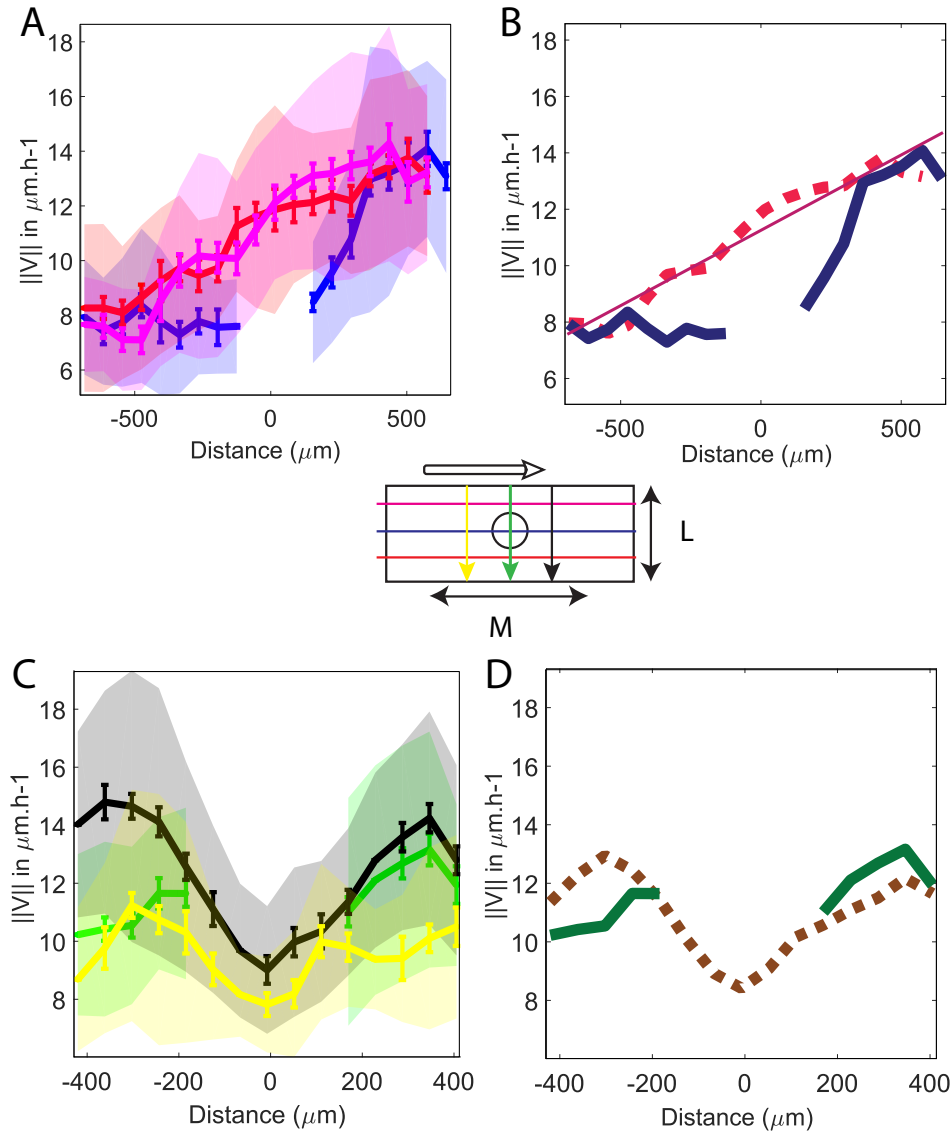


FIGURE III.3 – Variation de la vitesse en fonction de la position. (A) Vitesse en fonction de la position pour les axes 1 (bleu), 2_a (rouge), 2_b (magenta). (B) Représentation simplifiée de la moyenne des axes 2_a et 2_b et de l'axe 1, même données qu'en (A). (C) Pour les axes 3 (vert), 4 (noir), 5 (jaune). (D) Représentation de la moyenne des axes 4 et 5 et de l'axe 3, même données que (C). Les contours représentent l'intervalle de confiance sur les expériences, les barres d'erreurs l'intervalle de confiance de la moyenne temporelle. Résultats issus de la moyenne de 10 temps successifs en fin d'expérience de 16 expériences.

où L est la largeur d'une bande, et $M = 1.5 L$ est la longueur de la région d'intérêt (voir encart de Fig. III.3). La vitesse est en $\mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$, les distances sont en μm et le temps en h.

1.2 Déformation cellulaire eulérienne

De façon analogue à la vitesse, l'étude de la déformation cellulaire est réalisée.

Évolution temporelle La Fig.III.4, A et B montre deux champs de déformation au temps initial et après 11 h de migration. Leur allure est très semblable. Cela est confirmé

par l'évolution de la norme de la déformation au cours du temps qui évolue très peu, d'une déformation de 12% environ au temps initial à une déformation de 14% au temps final, l'augmentation est entre 1 et 2 % de déformation entre le temps initial et final (Fig.III.4, C et D).

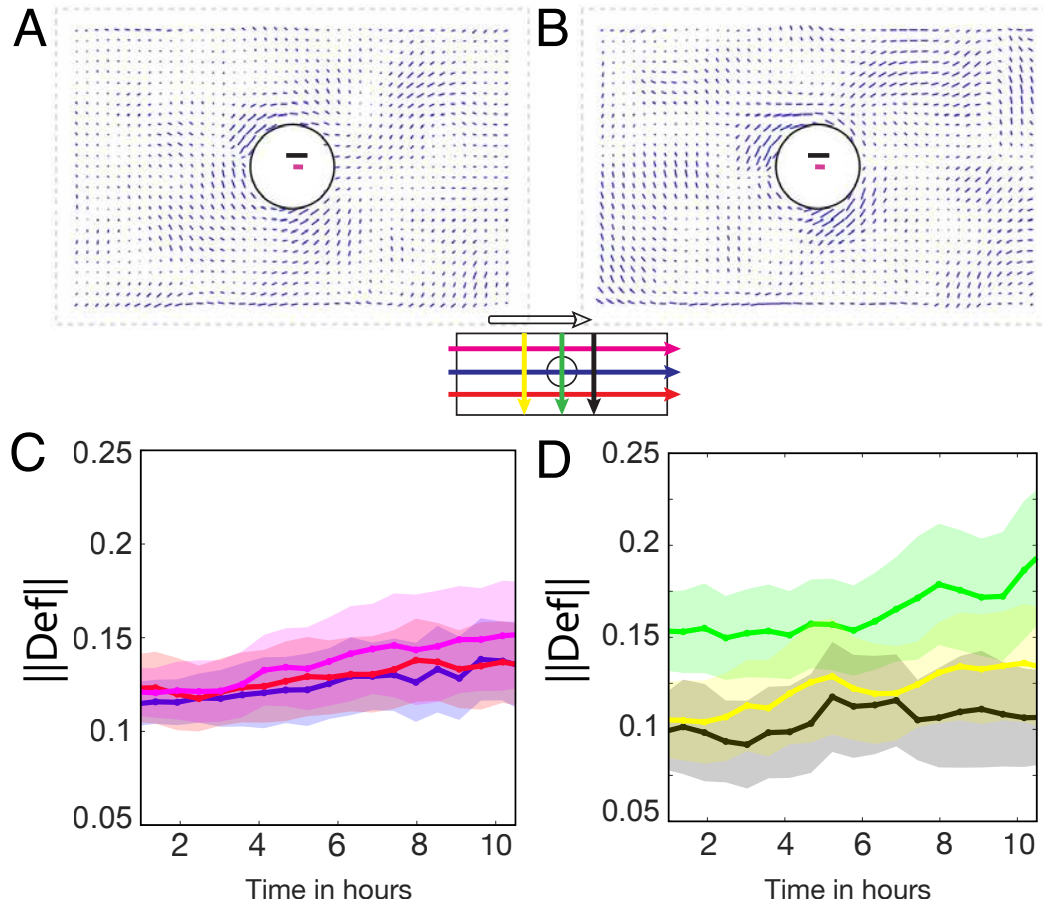


FIGURE III.4 – Norme de la déformation en fonction du temps. (A) Carte représentative de la déformation au temps initial d'une expérience. (B) Carte représentative au temps final d'une expérience. (C) Norme de la déformation en fonction du temps pour les axes 1 (bleu), 2_a (rouge), 2_b (magenta). (D) Norme de la déformation en fonction du temps pour les axes 3 (vert), 4 (noir), 5 (jaune). Pour C et D, les contours représentent l'intervalle de confiance sur les expériences. L'intervalle de confiance dû à la moyenne spatiale est négligeable. La barre d'échelle magenta indique 30% de déformation, la barre d'échelle noire indique 50 μm .

Variation spatiale La variation spatiale et temporelle de la déformation est représentée en Fig. III.5. Le code couleur indique que la déformation augmente légèrement au cours du temps sans changer l'aspect global des courbes. Il serait possible de moyenner les résultats sur toute une expérience en normalisant par la norme de la déformation au temps t , mais par cohérence avec les analyses sur les vitesses nous ne faisons pas ce choix.

Les résultats issus de la variation spatiale de la déformation au cours de la dernière heure d'expérience sont présentés en Fig. III.6. Sur l'axe 1 (bleu) la déformation présente un maximum juste avant l'obstacle, retrouvé en aval. De part et d'autre de l'obstacle il y a un palier de déformation qui est plus faible en amont (11% de déformation) qu'en aval (15% de déformation). Sur les axes 2_a et 2_b la déformation est très

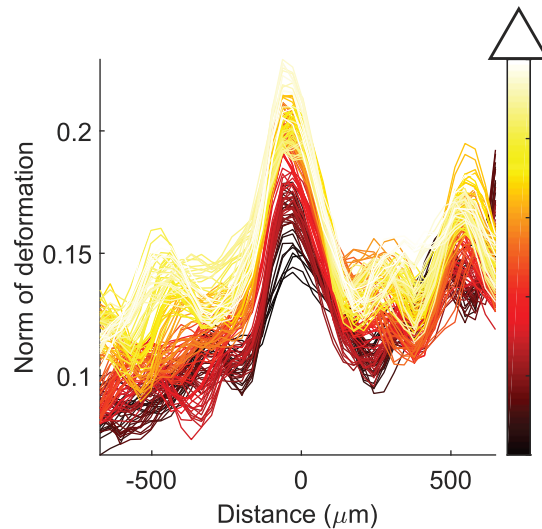


FIGURE III.5 – Norme de la déformation en fonction de la position dans le cas des bandes sur l'axe 3. Le code couleur indique différents temps entre $t = 0$ et $t = 11$ h.

importante à la perpendiculaire de l'obstacle (2.5 fois plus importante qu'ailleurs), ce qui signifie qu'à la distance à laquelle sont pris les axes 2_a et 2_b l'obstacle se fait sentir.

Cela est confirmé par la figure Fig.III.6, B axe 3 sur lequel nous observons de grandes déformations visibles au voisinage de l'obstacle et des bords. Ces déformations se propagent sur une distance de 200 μm environ. Cette courbe montre aussi que la déformation n'est pas la même sur les bords extérieurs des bandes ou sur l'obstacle. Enfin, sur les courbes en amont et en aval (noir et jaune) de l'obstacle, il n'y a pas de pic de déformation visible alors qu'elles sont situées à la même distance que les axes 2_a et 2_b .

À partir de ces observations nous concluons que :

- Les grandes déformations au niveau de l'obstacle ne sont pas uniquement dues à la présence des bords.
- La distance à l'obstacle seule ne suffit pas à expliquer les grandes déformations observées. En effet, selon que la mesure est effectuée en amont, en aval ou sur les côtés, les déformations ne sont pas les mêmes. Cela implique que la présence des bords extérieurs, et/ou du flot et/ou d'autres facteurs influencent celle-ci.

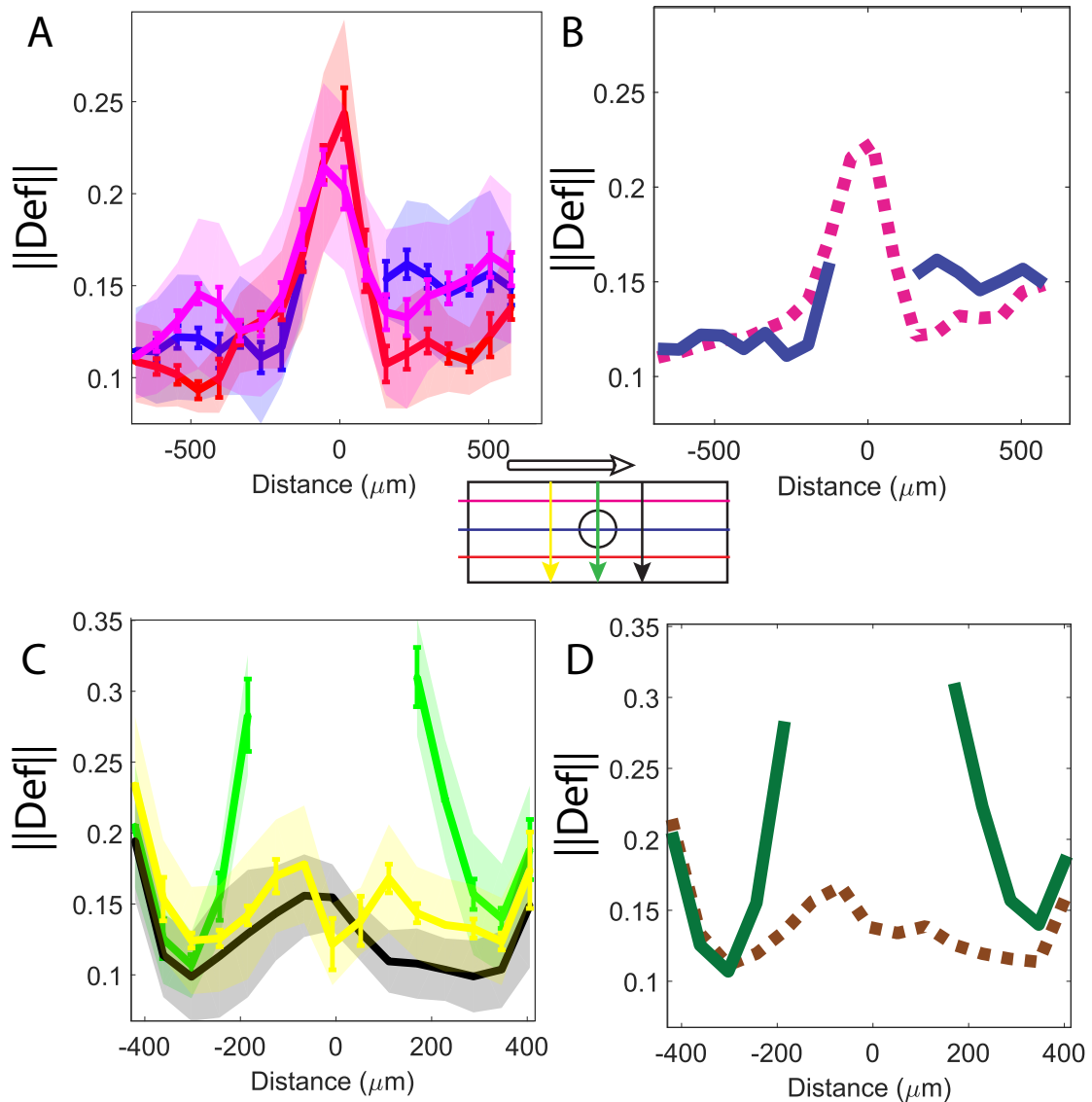


FIGURE III.6 – Norme de la déformation en fonction de la position. A : Pour les axes 1 (bleu), 2_a (rouge), 2_b (magenta). B : Représentation simplifiée de la moyenne des axes 2_a et 2_b et de l'axe 1, même données qu'en (A). C : Pour les axes 3 (vert), 4 (noir), 5 (jaune). D : Représentation de la moyenne des axes 4 et 5 et de l'axe 3, même données que (C). Les contours représentent l'intervalle de confiance sur les expériences, les barres d'erreurs l'intervalle de confiance de la moyenne temporelle. Résultats issus de la moyenne de 10 temps successifs en fin d'expérience de 16 expériences.

2 Asymétrie et organisation cellulaire et protéique

Le second aspect étudié est celui de l'aspect des distributions de protéines des différents réseaux du cytosquelette sur des échantillons fixés. Du fait de l'asymétrie intrinsèque à cette expérience, nous avons voulu voir si elle se retrouvait au niveau cellulaire et moléculaire.

2.1 Densité

La densité de cellules est calculée grâce aux images des noyaux (voir chapitre Méthodes, sec.2.2.c) et sa variation avec la distance est tracée, Fig.III.7. Celle-ci est linéaire

et décroissante ($R^2 = 0.87$). L'asymétrie intrinsèque à l'expérience en bandes induit donc un gradient de densité : les cellules s'étalent.

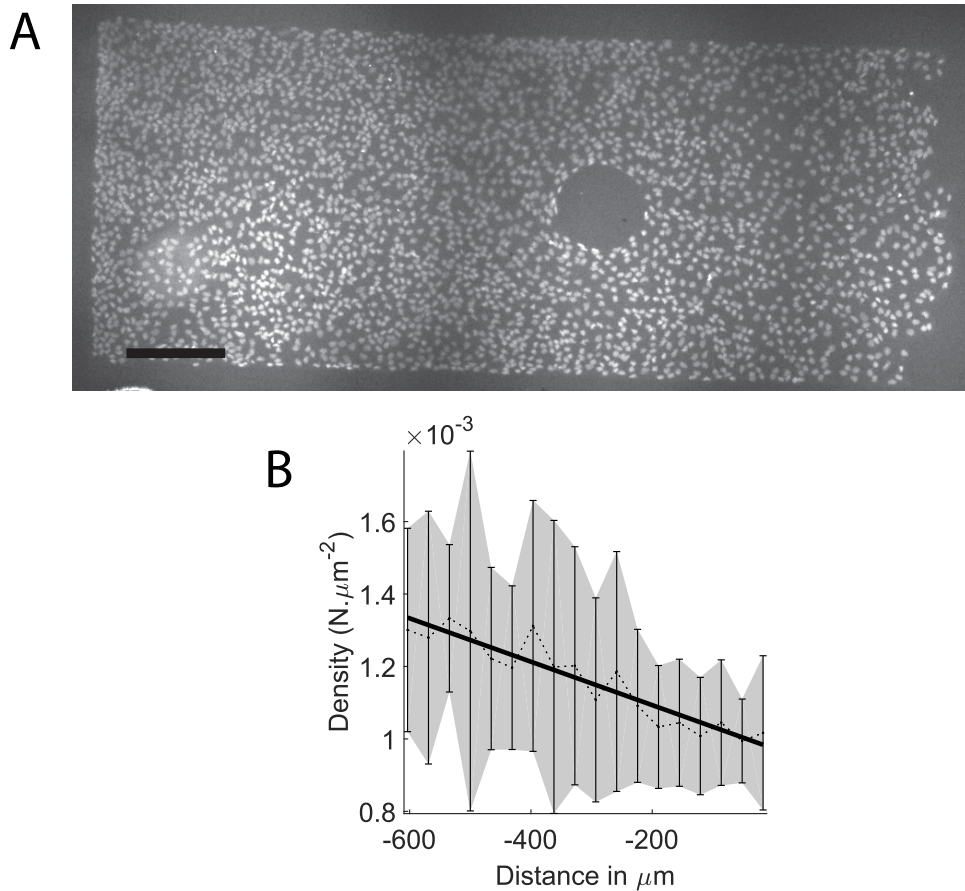


FIGURE III.7 – Densité. (A) Image des noyaux dans une bande. Barre d'échelle de 300 μm . (B) Variation de la densité de cellules avec la distance. Ajustement linéaire de pente $5.98 \pm 1.2 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}^{-3}$, $R^2 = 0.87$.

Nous avons voulu chercher si il existe des marqueurs cellulaires qui reflètent l'asymétrie de l'expérience. Nous nous attendions par exemple à observer des câbles d'actine au niveau de l'obstacle et des bords. Les images caractéristiques sont présentes dans le dossier 'Bandes/Marquages'.

2.2 Actine

L'aspect global de l'actine (Fig.III.8, A) indique l'existence de groupes de cellules plus ou moins marqués. La distribution de l'actine est spatialement hétérogène sans qu'on puisse distinguer de structure particulière au niveau de l'obstacle ou du front.

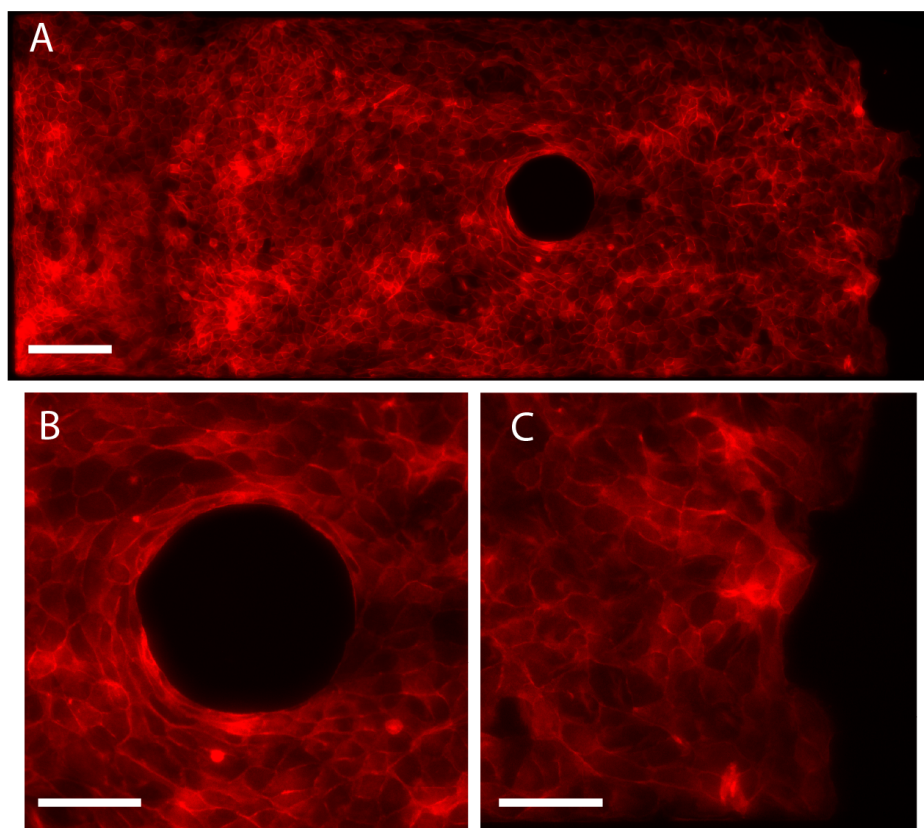


FIGURE III.8 – Allure de l'actine. (A) Bande marquée en actine. La barre d'échelle représente 200 μm . (B) Zoom sur l'obstacle de A, en actine. (C) Zoom sur le front en actine. Pour (B,C) la barre d'échelle blanche indique 100 μm . Les couleurs sont saturées pour la lisibilité.

2.3 Kératine

L'allure de la kératine est aussi étudiée (Fig.III.9) car c'est le filament intermédiaire le plus attendu dans les cellules épithéliales. Ce marqueur est spatialement hétérogène (Fig.III.9, A) : il n'est pas affecté par les bords et sa variation spatiale est très différente de celle de la vimentine, voir les zooms en Fig. III.9, B-E. On ne voit pas d'organisation à grande échelle de la kératine.

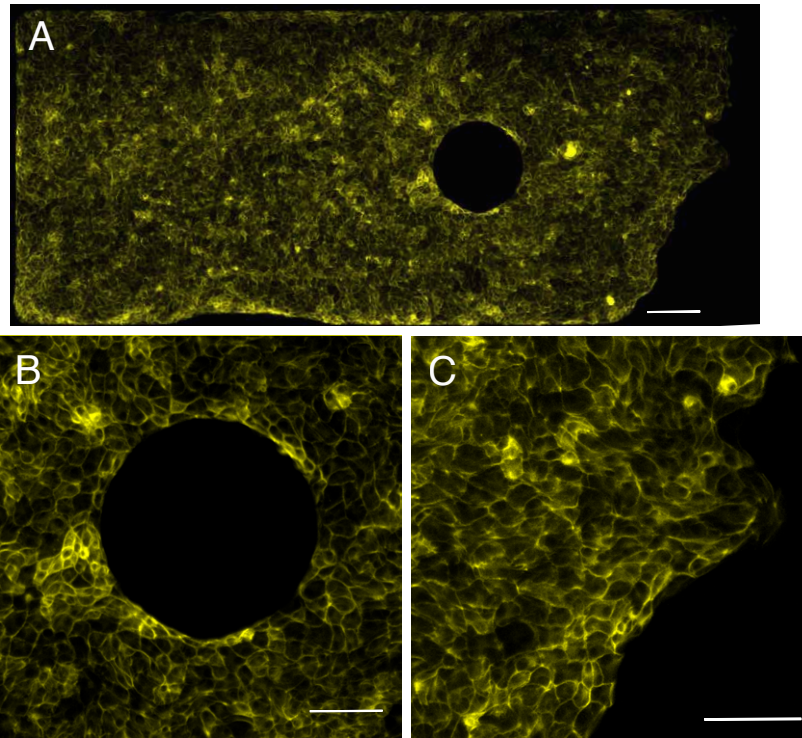


FIGURE III.9 – Allure de la kératine 18. (A) Bande marquée en kératine. La barre d'échelle représente 200 μm . (B) Zoom sur l'obstacle de A, en kératine. (C) Zoom sur le front en kératine. Pour (B,C) la barre d'échelle blanche indique 100 μm . Les couleurs sont saturées pour la lisibilité.

2.4 Vimentine

Enfin nous avons étudié la vimentine, car c'est un marqueur de transition épithélio-mésenchymateuse. La figure Fig. III.10, A est une image caractéristique de la vimentine dans une bande en migration. Qualitativement, il y a un enrichissement de vimentine au bord libre (le front) et aux bords confinés (les frontières du motif : obstacle et côté de bande), tandis que de la vimentine est distribuée de façon homogène dans tout l'intérieur de la monocouche. Cela est confirmé par la variation de l'intensité de la vimentine le long de l'axe 1 (B) ainsi que de l'axe 3 (C) visible en Fig. III.11.

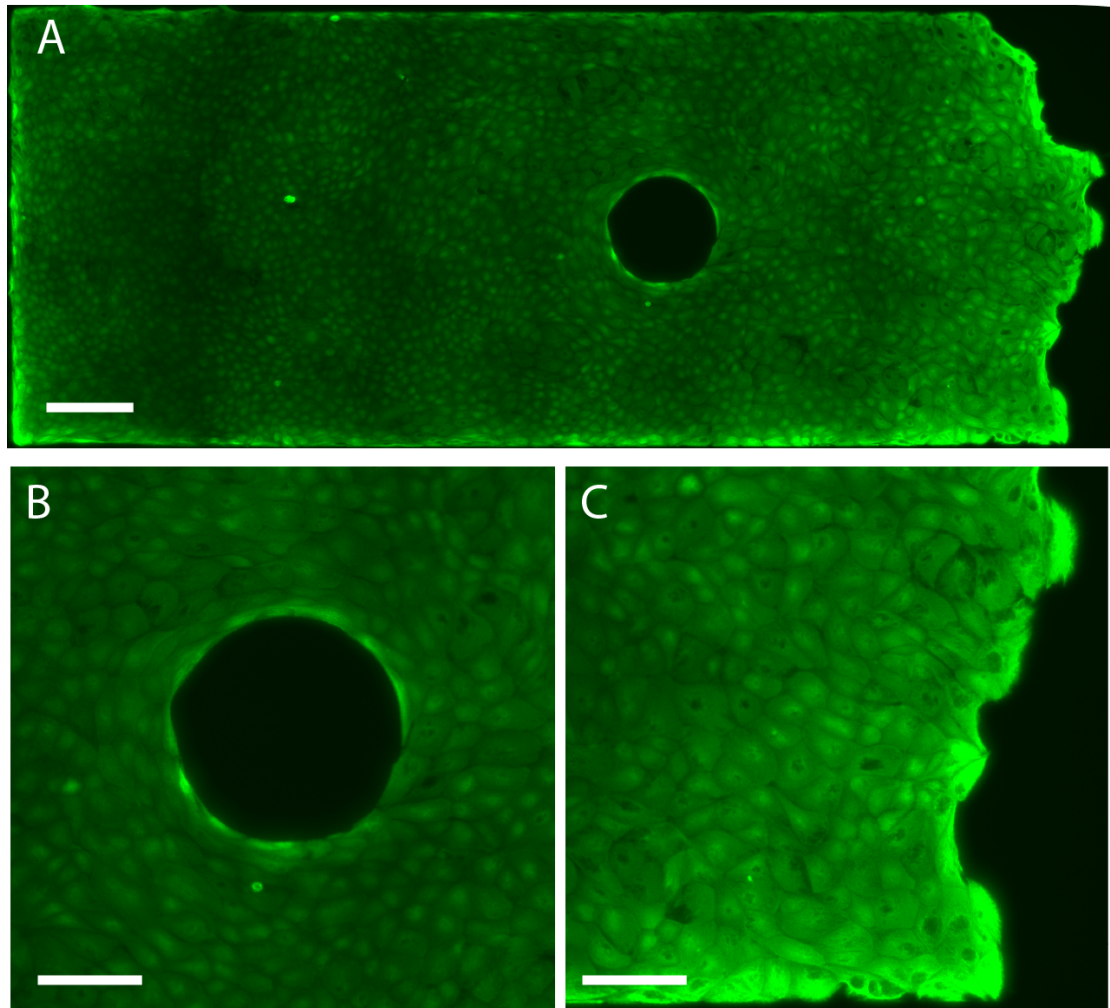


FIGURE III.10 – Marquage de vimentine dans une bande. (A) Image caractéristique dans une bande de 1 mm de largeur avec un obstacle de diamètre 200 μm . Barre d'échelle de 200 μm . (B) Zoom sur l'obstacle de A. (C) Zoom sur le front. Pour (B,C) la barre d'échelle blanche indique 100 μm . Les couleurs sont saturées pour la lisibilité.

Effet des bords confinés sur les niveaux de vimentine Les flèches rouges de la figure Fig. III.11, C marquent les positions des bords confinés (obstacle et côté de bande), où la vimentine est très intense. Pour quantifier cette augmentation, chaque bord est traité indépendamment des autres. C'est-à-dire qu'à partir de la courbe complète $I(x)$, la position x_f et la hauteur I_f de chaque pic est déterminée manuellement. Cela per-

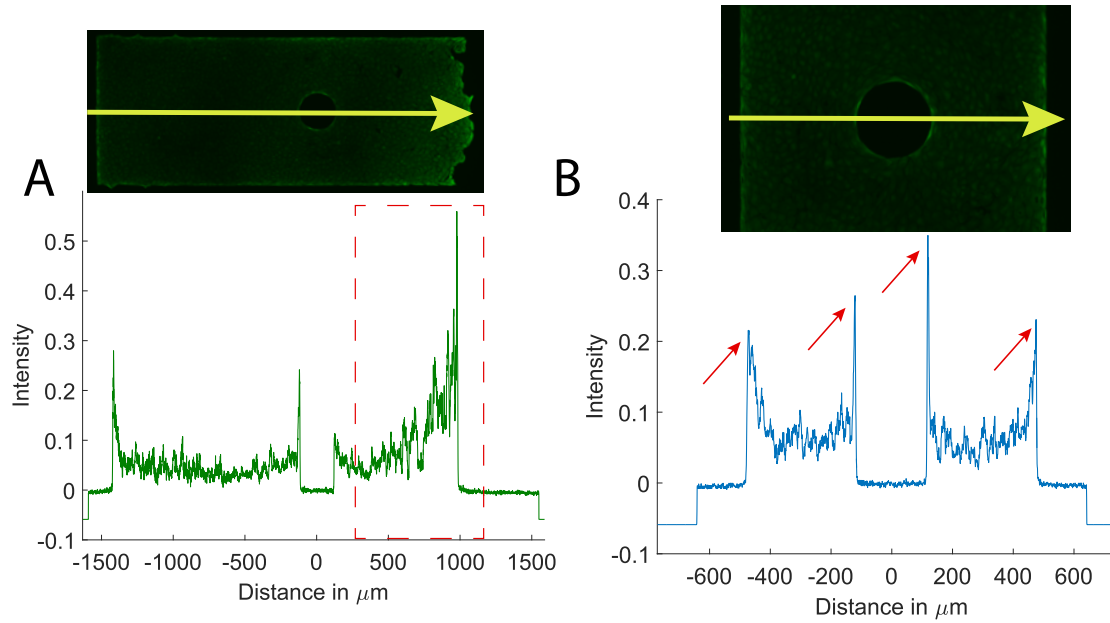


FIGURE III.11 – Variation de la vimentine avec la distance. (A) Intensité de vimentine en fonction de la position le long de l’axe 1. La zone encadrée correspond au front. (B) Intensité de vimentine en fonction de la position le long de l’axe 3. Les flèches rouges indiquent la position des bords confinés (obstacle et côté de bande).

met de tracer une courbe normalisée $\frac{I(x-x_f)-I_b}{I_f}$ où I_b est la valeur du bruit, mesurée au centre de l’obstacle. Une expérience donne 4 courbes de décroissance le long des bords; à partir de 8 expériences, 32 courbes de décroissances sont obtenues. Pour pouvoir les superposer, elles sont binnées en distance.

La Fig. III.12 représente la variation de l’intensité en fonction de la distance. Elle est ajustée avec une exponentielle de la forme $(1-a)e^{-x/d_{confin}} + a$. L’ajustement donne la distance caractéristique de la portée de l’influence du bord confiné, $d_{confin} = 6.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$, et la valeur relative de vimentine à l’intérieur de la monocouche $a = 0.17 \pm 0.01$ avec un $R^2 = 0.99$.

Ainsi, près d’un bord confiné, la vimentine est localement enrichie sur une distance d’environ $6 \mu\text{m}$. Cela correspond à une demi épaisseur caractéristique de cellule “au repos”, ou encore une cellule entière si celle-ci est très aplatie comme c’est le cas près des bords confinés. L’enrichissement en vimentine au bord confiné, comparé à l’intérieur de la monocouche, est d’un facteur 6.25.

Effet d’un bord libre sur les niveaux de vimentine Un gradient de vimentine en s’approchant du front de migration est également visible en Fig. III.10 et Fig. III.11. Afin de le quantifier, toutes les courbes sont tracées sur l’axe 1 et relativement à la position du front, avec une normalisation identique au cas du bord confiné. Les résultats des courbes issues des 8 expériences, à raison d’une courbe par expérience (Fig. III.13, A), se superposent remarquablement bien (Fig. III.13, B). Cela permet de moyenner (Fig. III.13, C) et d’ajuster sur cette courbe une exponentielle décroissante, $(1-a)e^{-x/d_{libre}} + a$. Mais cette courbe n’est pas suffisante pour expliquer la décroissance observée ($R^2 = 0.8$). Nous ajustons alors une double exponentielle de la forme $ae^{-x/d_{cell}} + (1-a)e^{-x/d_{libre}} + b$ ($R^2 = 0.99$), avec deux distances caractéristiques. L’une est de taille cellulaire, $d_{cell} = 3.2 \pm 0,7 \mu\text{m}$. L’autre est de taille tissulaire, $d_{libre} = 65 \pm 4 \mu\text{m}$. On trouve par ailleurs

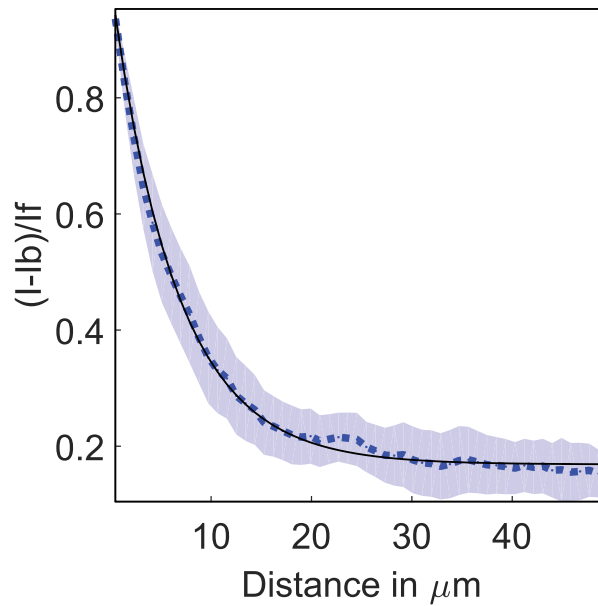


FIGURE III.12 – Intensité de vimentine en fonction de la distance, pour les bords confinés. I représente l'intensité de vimentine, I_b la valeur du bruit, I_f la valeur du pic. Les explications pour obtenir une telle figure sont détaillées dans le texte. Moyenne sur $N = 32$ courbes issues de 8 expériences. Le contour bleuté correspond à l'intervalle de confiance sur la moyenne.

$b = 0.18 \pm 0.02$, soit un enrichissement relatif d'un facteur 5.6 en front de bande.

Résumé et Discussion La vimentine est une protéine initialement présente dans des cellules d'origine mésenchyme : pas de polarité apico-basale, pas de contact cellule-cellule. C'est aussi un marqueur reconnu de la transition épithélio-mésenchymateuse [124][125]. En particulier, c'est un marqueur de différenciation entre les bords libres et le reste d'une monocouche [126], [127]. A notre connaissance, les études réalisées au sujet de la vimentine ont été réalisées à fort grossissement et/ou se sont concentrées sur le front libre [126], [128]. Les expériences présentées ici mettent en avant un net enrichissement au front, en accord avec les études [126], [128], [127]. De plus nous montrons une décroissance exponentielle de la vimentine à grande échelle à partir du front de migration, dont la distance caractéristique de décroissance est de l'ordre de $65 \pm 4 \mu\text{m}$. Une décroissance de vimentine à partir du front de migration a déjà été observée par Balcioglu *et al.* dans des expériences d'expansion de monocouche circulaire sur des substrats de rigidité variables. Les différences entre leur dispositif expérimental et le nôtre sont importantes : nous inhibons les divisions cellulaires et les cellules migrent par relâchement de contrainte, tandis que dans [128] la monocouche s'étend par division et migration cellulaire. Pourtant nous trouvons une distance de décroissance comparable, ce qui suggère qu'elle est indépendante des divisions et du relâchement de contrainte.

Enfin nous montrons qu'il existe une augmentation comparable de l'intensité de la vimentine entre les bords confinés et le bord libre : la vimentine est enrichie partout où des bords existent, qu'ils soient libres ou confinés. La distance caractéristique de décroissance est de l'ordre de $65 \pm 4 \mu\text{m}$ pour un bord libre et de $6.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$ pour un bord confiné. Un ordre de grandeur les sépare, témoignant d'une différence majeure entre ces conditions.

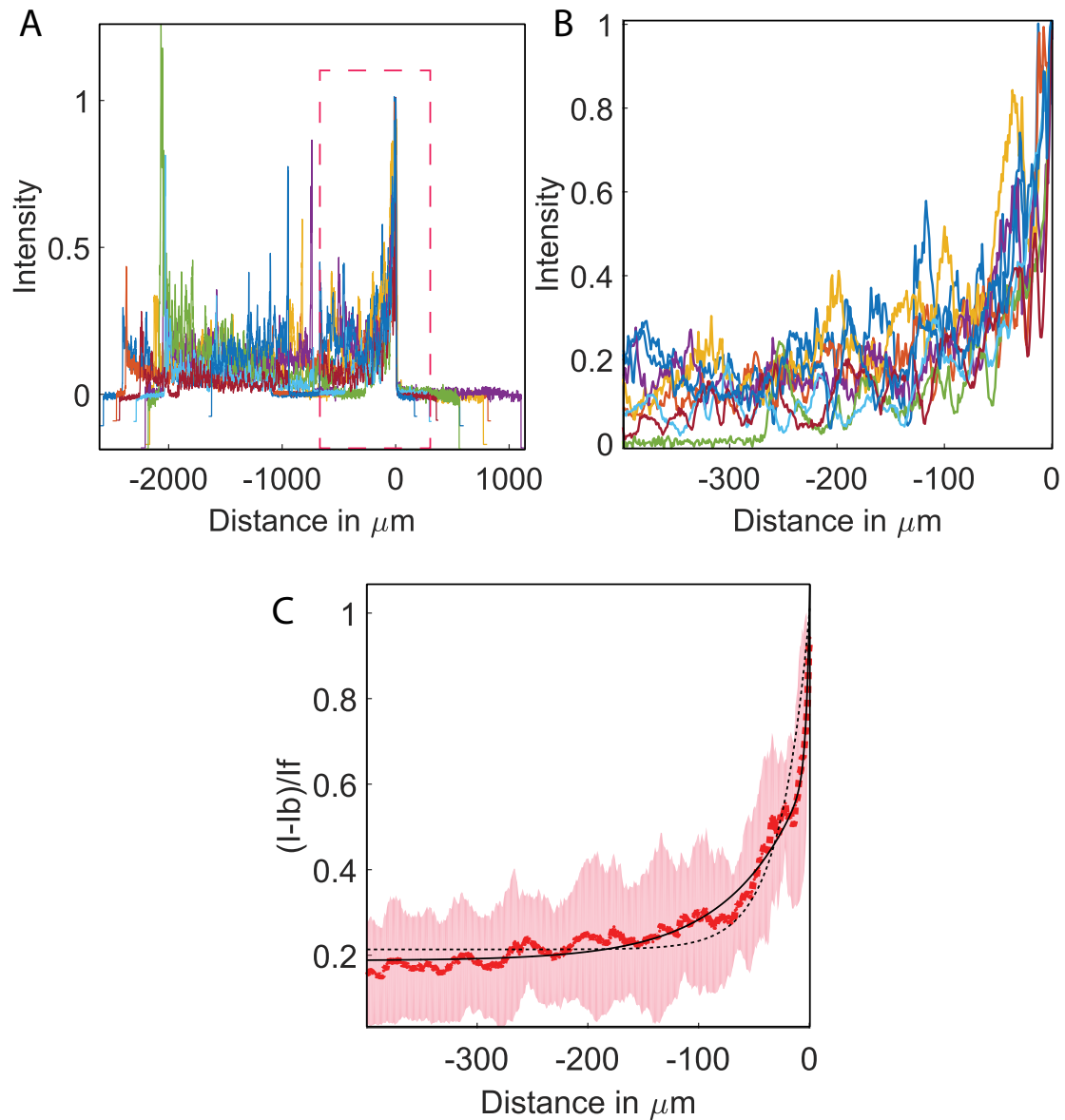


FIGURE III.13 – Intensité de vimentine en fonction de la distance, pour les bords libres. (A) Superposition des courbes, (B) grossissement du rectangle de (A), (C) courbe moyenne. I représente l'intensité de vimentine, I_b la valeur du bruit, I_f la valeur du pic. Les explications pour obtenir une telle figure sont détaillées dans le texte. On moyenne sur 8 expériences. Le contour rouge correspond à l'erreur sur la moyenne.

Une piste pour interpréter ces différences serait d'observer la structure du réseau de vimentine dans ces zones et de les comparer, étant donné que les images à fort grossissement associées au bord libre et confiné présentent des différences d'organisation visibles (Fig.III.14, Fig.III.15).

Ces expériences montrent que la vimentine est un marqueur de la frontière entre une région avec et sans cellules, qu'il y ait migration ou pas. À notre connaissance, cela n'a jamais été documenté dans la littérature.

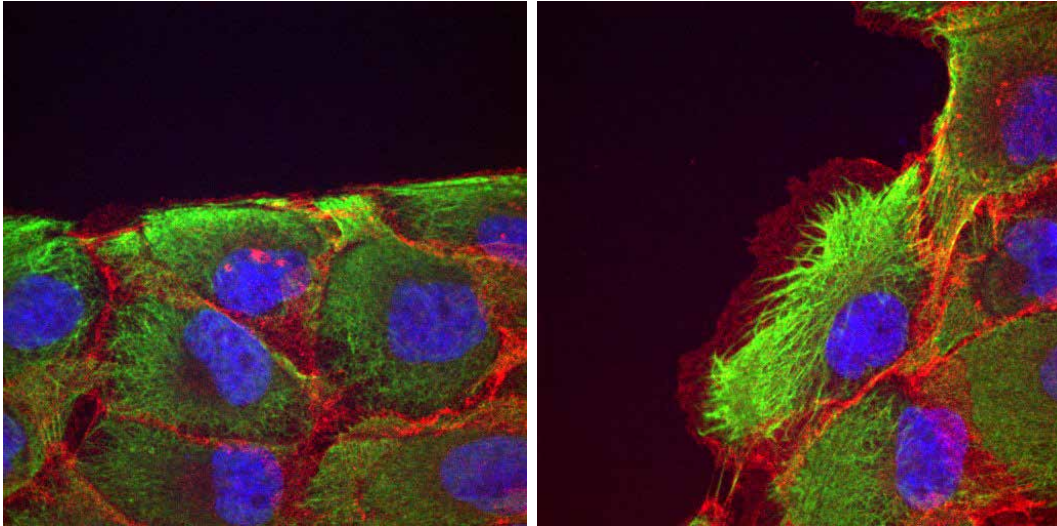


FIGURE III.14 – Images de MDCK II marquées pour le noyau (en bleu), l'actine (en rouge) et la vimentine (en vert). À gauche en bord confiné (bord de motif), à droite en bord libre (front de migration).

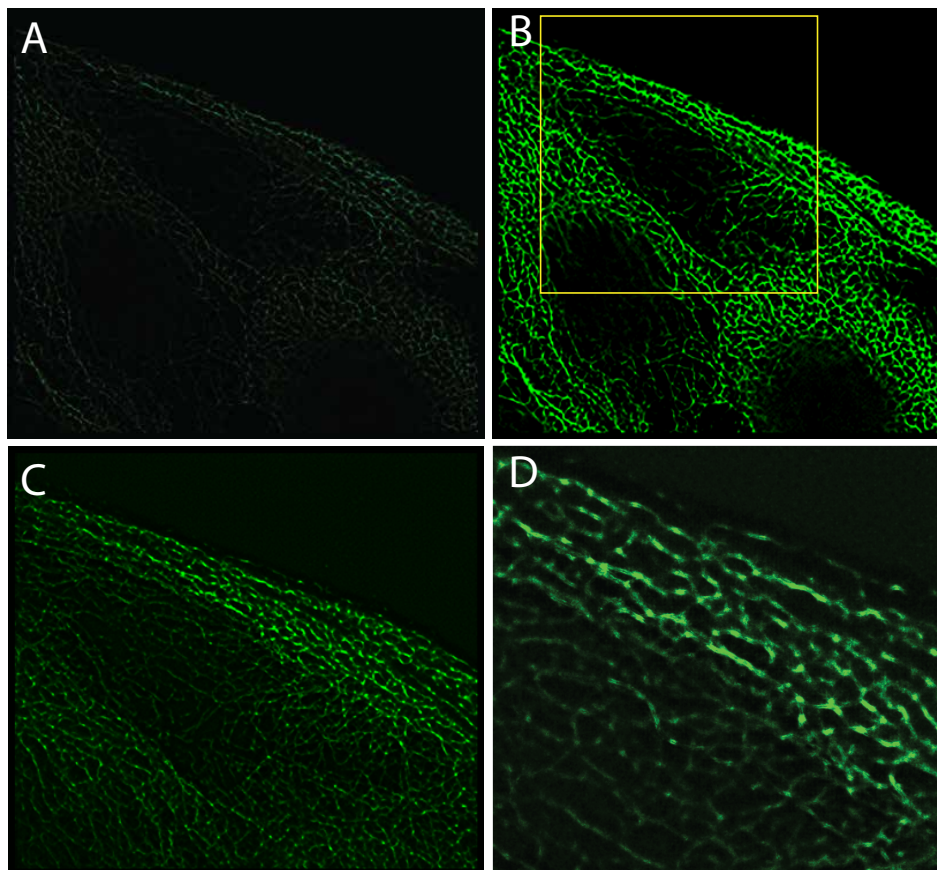


FIGURE III.15 – Architecture du réseau de vimentine en bord de motif. Images en technique SRRF (Fig. 1.3). (A) Une tranche du réseau de vimentine, au 60X. (B) Même tranche que A mais saturée. (C) La zone encadrée en B, prise au 100X. Cette image est la somme des intensités sur une épaisseur de 3 μm . (D) Zoom de C.

3 Cinématique, densité cellulaire et protéique

Dans cette section, nous cherchons des corrélations entre les différents ingrédients mesurés, indépendamment de la distance au front. Les graphiques sont effectués à partir des résultats issus de la moyenne de ces ingrédients sur des boîtes de $130 \mu\text{m}$ avec un recouvrement de 75%. Pour les niveaux protéiques, les quantités tracées en ordonnée sont l'intensité normalisée entre 0 et 1 sur l'intervalle entre le minimum et le maximum défini par la médiane des 1% des pixels les plus intenses. Nous étudions ensuite les variations par rapport à la médiane soit :

$$\frac{I - I_{min}}{I_{max} - I_{min}} - \text{median} \left(\frac{I - I_{min}}{I_{max} - I_{min}} \right) \quad (\text{III.1})$$

Cela permet d'étudier les corrélations des fluctuations.

Liens avec la densité Il y a une anti-corrélation entre la vitesse et la densité, Fig.III.16, A, une anti-corrélation entre la densité et la déformation cellulaire, Fig.III.16, B. Il existe une corrélation entre l'actine et la densité pour des densités inférieures à $1.2\text{N}\mu\text{m}^{-2}$, Fig.III.16, C. Enfin, il y a une anti-corrélation entre la quantité de vimentine et la densité pour des densités inférieures à $1.2\text{N}\mu\text{m}^{-2}$, Fig.III.16, D. La vimentine est presque absente aux grandes densités et l'actine s'exprime de façon importante.

L'intensité d'un signal peut varier pour deux raisons : soit si la concentration en marqueur est constante, mais est intégrée sur la hauteur, qui peut varier; soit si la concentration ou l'organisation du marqueur varie avec la hauteur. Pour éviter toute ambiguïté à ce sujet, les résultats présentés sont calculés sur des images de marqueur prises en microscopie au 20X. Il n'y a pas d'intégration sur la hauteur et toute variation du signal mesuré est due à un changement de concentration et/ou d'organisation du marqueur.

Ainsi, plus un groupe de cellule est dense, moins il va vite, moins il est déformé. Des relations à seuil existent pour l'actine et la vimentine et varient en opposition.

Lien avec la vitesse En ce qui concerne la vitesse : l'actine est anticorrélée aux grandes vitesses; la vimentine est corrélée aux grandes vitesses; et la déformation ne lui est pas corrélée (Fig.III.17).

Lien avec la déformation cellulaire Pour finir, les corrélations entre acteurs protéiques et vitesse (Fig.III.18) indiquent une anticorrélation entre l'actine et la déformation jusqu'à un certain seuil (0.3), et une corrélation entre la déformation et la vimentine pour toute déformation.

Lien actine-vimentine Il n'y a pas de corrélation entre actine et vimentine (Fig.III.19, A).

Discussion La décroissance monotone de la relation entre vitesse et densité a déjà été mesurée plusieurs fois dans la littérature [74], [53], [72] pour des bandes. Ces courbes peuvent être ajustées localement par des droites, mais les résultats quantitatifs semblent dépendants de la gamme de taille des cellules (comparer [53] et [72]). Nous obtenons

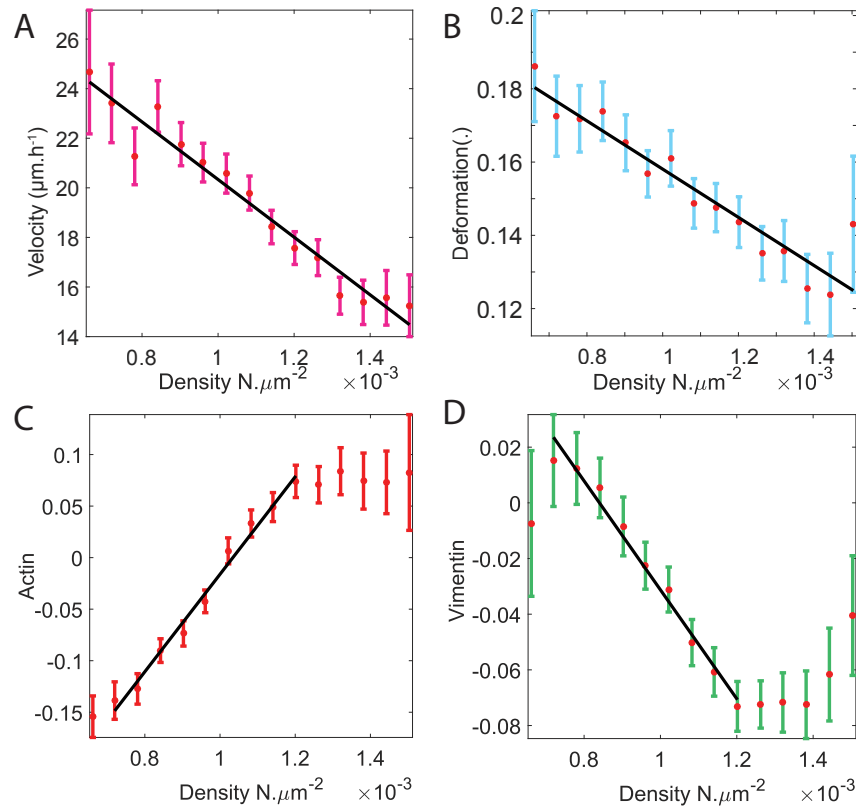


FIGURE III.16 – Corrélation des ingrédients avec la densité. (A) Vitesse v en fonction de la densité ρ , ajustement $v = -1.0 \cdot 10^4 \rho + 29$, $R^2 = 0.96$. (B) déformation, $R^2 = -0.94$. (C) Variation d'intensité en actine, $R^2 = 0.99$. (D) Variation d'intensité en vimentine, $R^2 = -0.98$. Résultats issus de 8 expériences, les intensités sont normalisées (Eq. (III.1)), les barres d'erreurs indiquent l'intervalle de confiance.

une valeur de pente entre vitesse et rayon ($\frac{1}{\sqrt{\pi\rho}}$) de 0.01 min^{-1} pour une gamme de tailles entre 14 et 20 μm , ce qui est en accord avec les valeurs trouvées par [72]. Cette relation signifie que moins les cellules sont denses (plus leur surface de contact avec le substrat augmente) et plus elles vont vite.

Dans une expérience de migration cellulaire en bande, les différents ingrédients cinématiques et protéiques sont corrélés. En particulier, il semble qu'il existe des relations entre actine, vimentine, déformation et vitesse. Toutes ces relations peuvent avoir deux origines : la première est une vraie relation causale entre ingrédients ; et la seconde est une relation par l'intermédiaire de l'existence du front. Le prochain chapitre permettra de lever le doute sur certains liens.

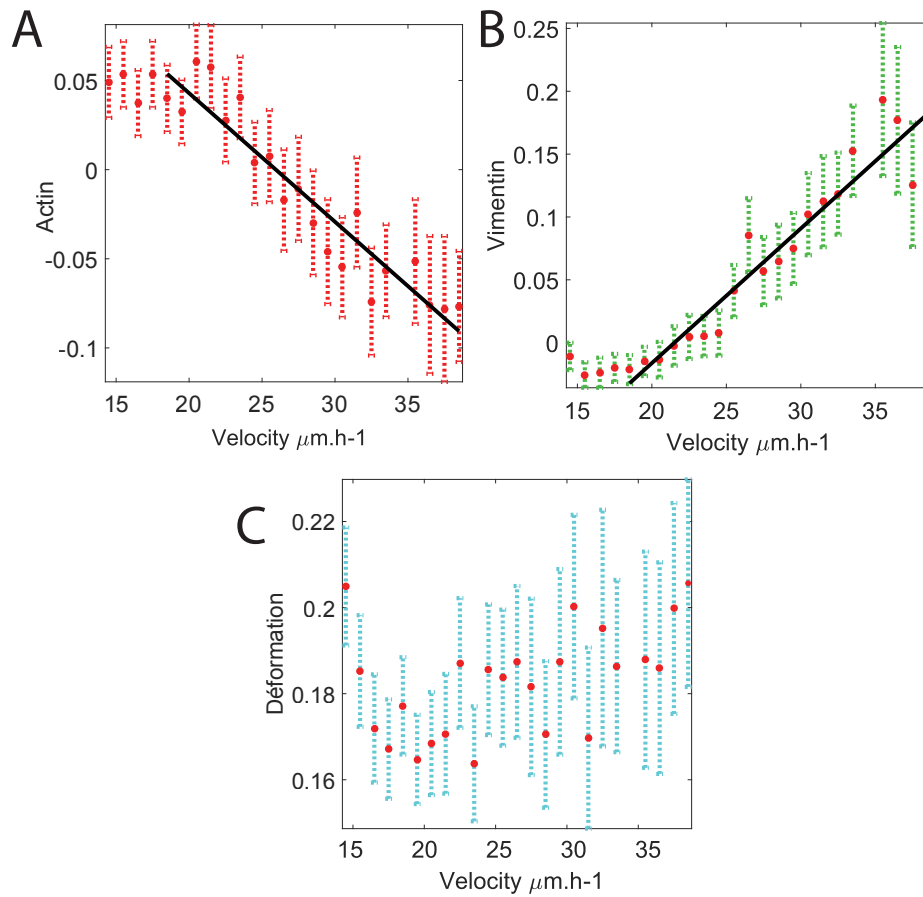


FIGURE III.17 – Marqueurs en fonction de la vitesse. (A) Actine, $R^2 = -0.95$. (B) Vimentine, $R^2 = 0.95$. (C) Déformation, $R^2 = -0.42$. Résultats issus de 8 expériences, les intensités sont normalisées (Eq. (III.1)), les barres d’erreurs indiquent l’intervalle de confiance.

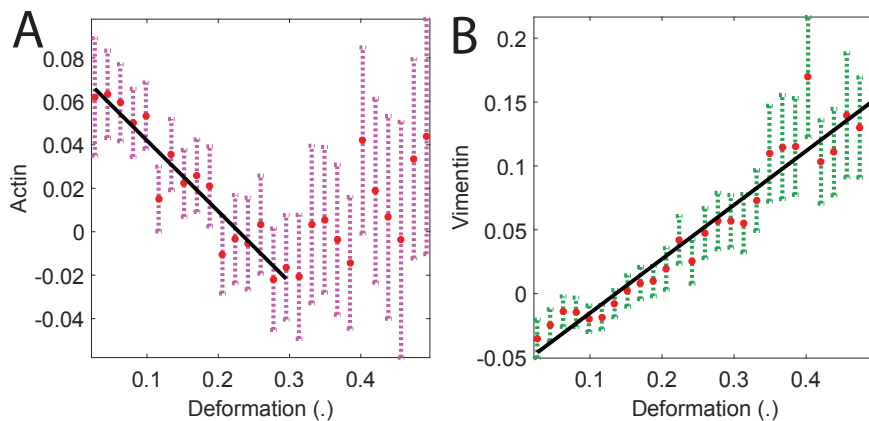


FIGURE III.18 – Marqueurs en fonction de la déformation. (A) Actine, $R^2 = -0.95$. (B) Vimentine, $R^2 = 0.96$. Résultats issus de 8 expériences, les intensités sont normalisées (Eq. (III.1)), les barres d’erreurs indiquent l’intervalle de confiance.

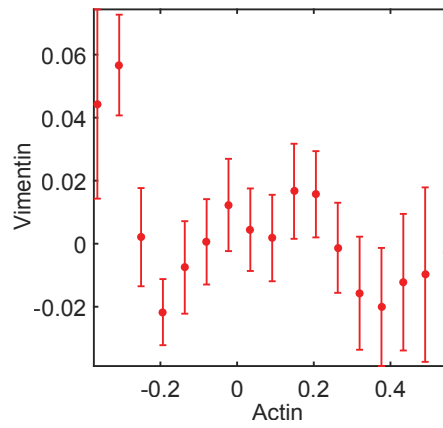


FIGURE III.19 – Relation vimentine actine. (A) Vimentine en fonction de l'actine. Résultats issus de 8 expériences, les intensités sont normalisées (Eq. (III.1)), les barres d'erreurs indiquent l'intervalle de confiance.

4 Polarisation

4.1 Définition de la polarisation

Grâce aux expériences de migration stoppées puis marquées, il est possible de définir une polarité. En effet, à partir des images de DAPI, il est possible d'extraire la position du noyau; et à partir des images de vimentine au 20X, on peut segmenter les contours et en déduire la position du centroïde de la cellule. On définit alors un vecteur polarisation qui va du centre de masse du noyau au centre de masse de la cellule. Le résultat donne un champ de polarisation, Fig.III.20. Il est très hétérogène et ne semble pas contenir d'information évidente.

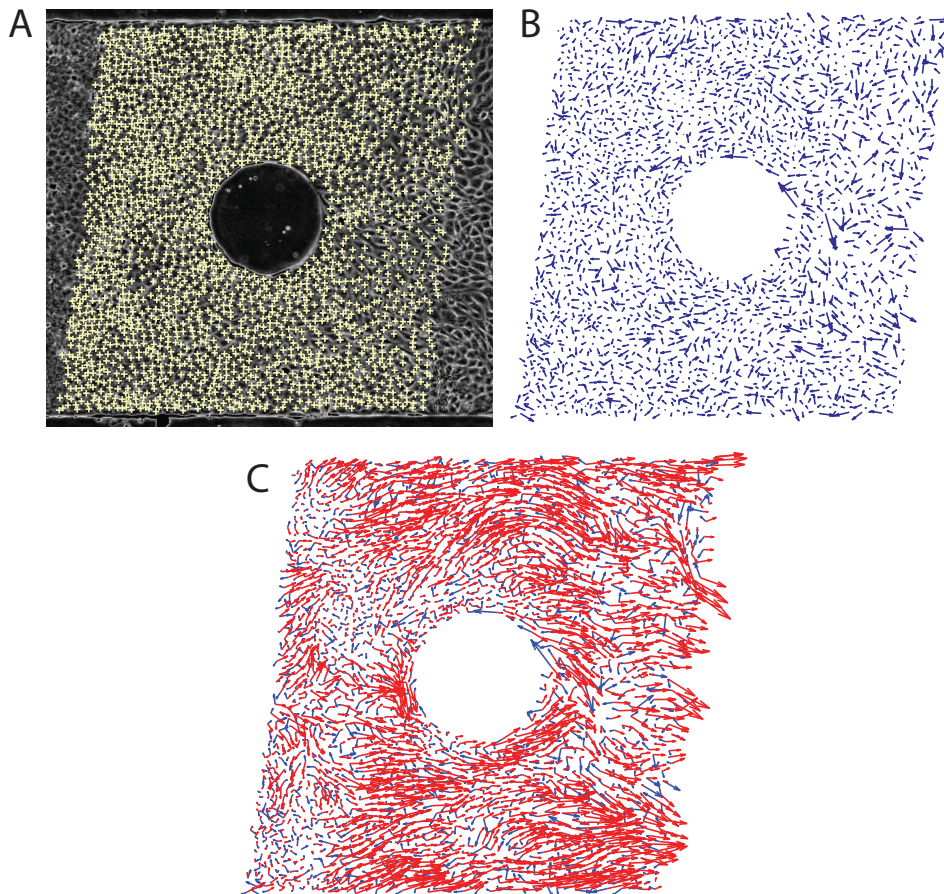


FIGURE III.20 – Polarisation. (A) Champ de position des centres de noyaux. (B) Champ de polarisation associé à (A). (C) Superposition du champ de vitesse (rouge) sur le champ de polarisation (bleu).

4.2 Polarisation et vitesse

Dans la littérature, on s'intéresse à l'angle entre la vitesse et la polarisation [75]. On calcule donc la projection de la polarisation parallèlement (P_{para}) et perpendiculairement (P_{perp}) à la vitesse :

$$P_{para} = \frac{p_x \cdot v_x + p_y \cdot v_y}{\|\vec{p}\|} \quad (\text{III.2})$$

$$P_{perp} = \frac{p_y \cdot v_x - p_x \cdot v_y}{\|\vec{p}\|} \quad (\text{III.3})$$

Comme ces signaux sont bruités, au lieu d'étudier directement leur variation en fonction de x et y , il est préférable d'étudier les fonctions d'autocorrélation spatiales de P_{para} et P_{perp} , notées C_{para} et C_{perp} , car elles s'en affranchissent étant donné que le bruit est blanc. Les résultats sont présentés en Fig. III.21.

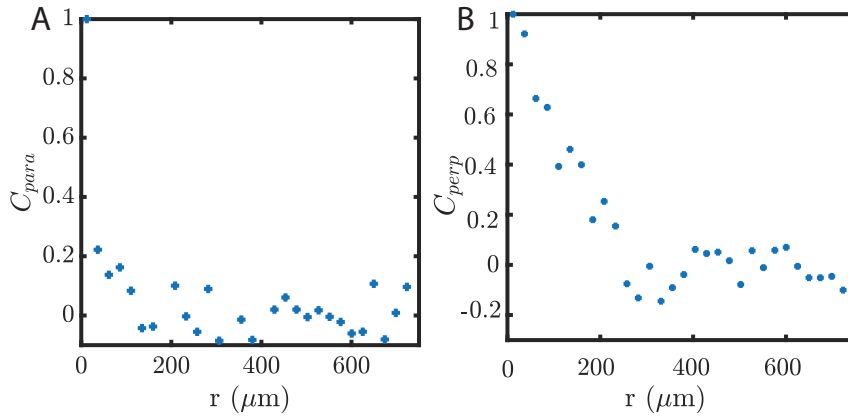


FIGURE III.21 – Fonctions d'autocorrélations : (A) C_{para} , (B) C_{perp} .

Sur celles-ci on voit que C_{para} est toujours nulle excepté en 0. Il semble donc que p et \vec{v} sont perpendiculaires. Pour tester plus avant cette hypothèse, on superpose la fonction d'autocorrélation de $\|\vec{v}\|$ avec la fonction d'autocorrélation de la valeur absolue de P_{perp} . On prend la valeur absolue pour s'affranchir du sens du vecteur et ne garder que la directionnalité (Fig. III.22). Elles sont identiques.

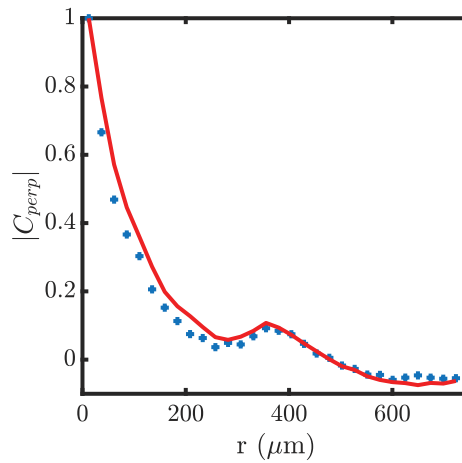


FIGURE III.22 – Comparaison des autocorrélations de vitesse. En bleu : fonction d'autocorrélation de la valeur absolue $\langle |P_{perp}|(r)|P_{perp}|(r + \Delta r) \rangle$. En rouge : fonction d'autocorrélation de la norme de $\langle \|\vec{v}\|(r)\|\vec{v}\|(r + \Delta r) \rangle$. Les résultats sont normalisés par la norme du vecteur pour n'étudier que l'orientation.

Ainsi, l'information de direction de p est entièrement contenue dans \vec{v} , mais ces deux vecteurs sont en moyenne perpendiculaires. Ces résultats peuvent paraître surprenant lorsqu'on a en tête les résultats sur cellule unique où polarisation et vitesse sont alignés. Pourtant les kératocytes [129] ont une polarisation de forme perpendiculaire à la vitesse. Cette configuration a donc déjà été reportée dans la littérature. En cellule unique pour les MDCK la polarisation est confondue avec le dipôle de force que la cellule exerce. Ce dipôle est aussi aligné avec la vitesse. Ce n'est pas ce que l'on observe ici, donc il semble que la collectivité ait changé le lien entre polarisation et vitesse.

Chapitre IV

Perturber les acteurs de la migration

Dans cette section, les lamellipodes, les microtubules, les moteurs moléculaires et la vimentine sont perturbés grâce à l'usage de drogues afin d'étudier leur rôle dans la migration.

Ces drogues sont systématiquement étudiées pour pouvoir les comparer aux cas contrôles du chapitre III. Une expérience de migration est lancée et une fois la migration bien établie, la drogue est ajoutée au milieu ce qui permet d'avoir le contrôle et la drogue le même jour. Les variations temporelles et spatiales sur les axes de travail restent le système de représentation privilégié. Les expériences avec le CK666, la simvastatine et la blebbistatine ont été réalisées en parallèle un même jour, c'est pourquoi la drogue est mise au même moment sur chaque.

1 Réseaux d'actine branchés : CK666

Le réseau d'actine branché, essentiel dans la formation de lamellipodes, est perturbé par ajout de CK666 (chap. II sec. 1.2.a). Les images avant et après ajout de drogue sont illustrées en Fig. IV.1. Dès l'ajout de la drogue dans le milieu, il y a une nette diminution de la vitesse, visible grâce aux cartes (Fig. IV.1), et d'autre part à la quantification de la variation temporelle de la vitesse (Fig. IV.2, A, B, C). En revanche, la déformation n'est modifiée ni temporellement (Fig. IV.3, A), ni spatialement (Fig. IV.3, B, C).

Discussion On voit ici le rôle fondamental des lamellipodes pour la migration. La monocouche semble se figer, lorsque CK666 est ajouté, la migration dirigée disparaît, ne reste que quelques fluctuations.

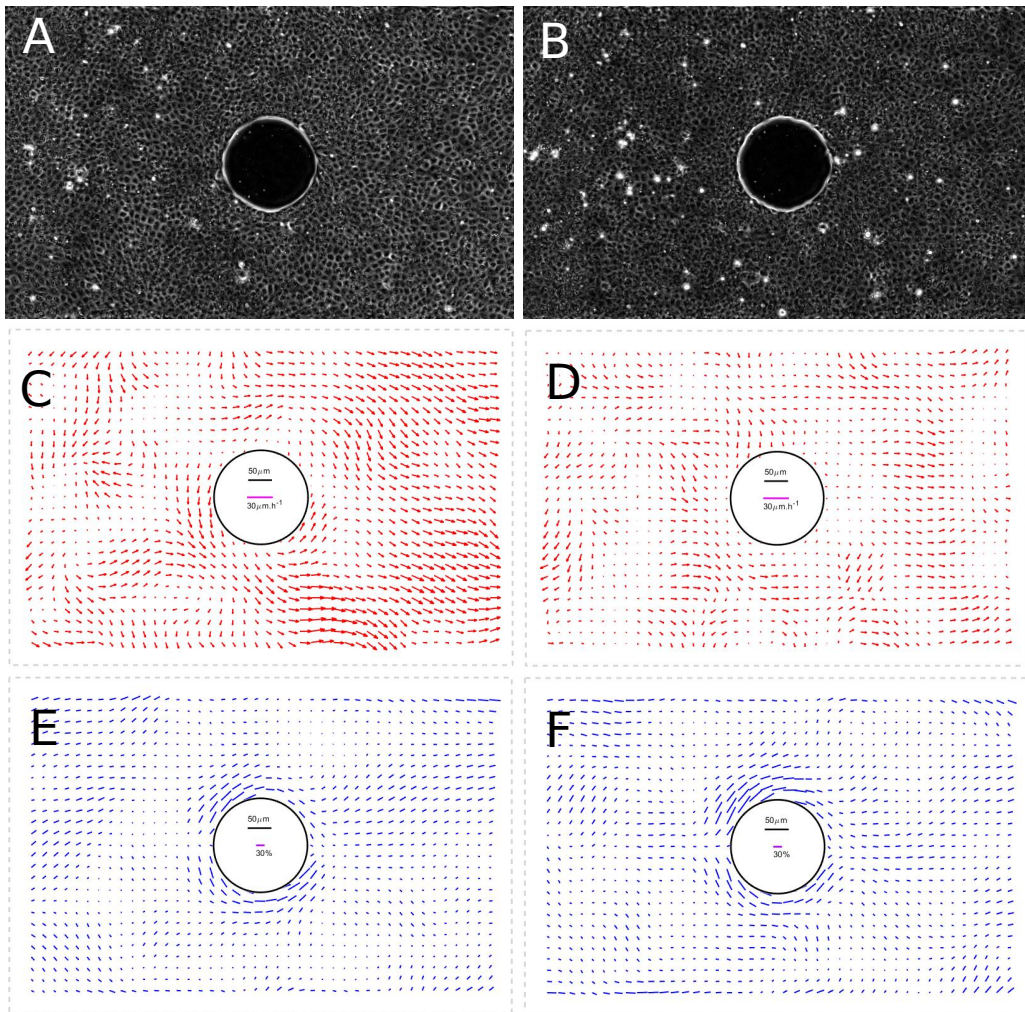


FIGURE IV.1 – Effet du CK666. (A) Image avant ajout de CK666. (B) Image 2 h après ajout de CK666 (C,D). Cartes de vitesse associées aux images (A,B). (E,F) Cartes de déformations associées aux images (A,B).

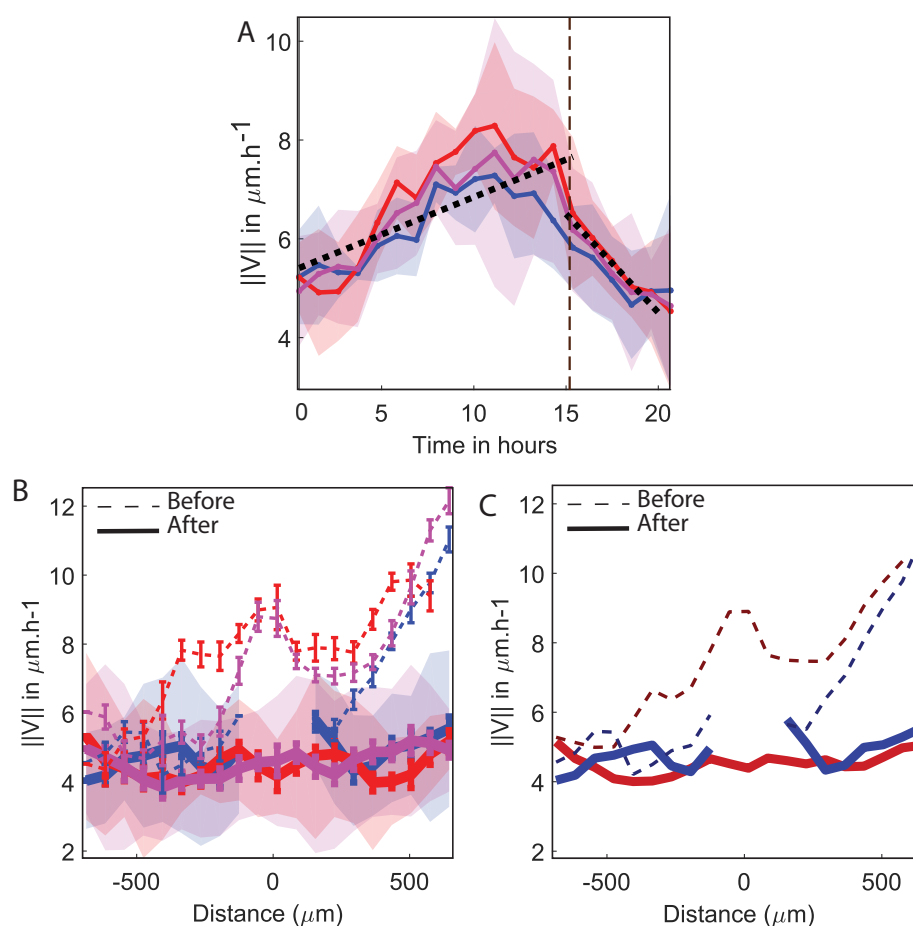


FIGURE IV.2 – Variation de la vitesse avec CK666. (A) Vitesse en fonction du temps sur les axes 1,2_a, 2_b. (B) Variation de la vitesse sur les axes 1,2_a et 2_b avant (pointillés) et après (traits pleins) l'ajout de drogue. (C) Version simplifiée de (B). Des courbes similaires sont obtenues sur les axes 4,5,6. Les contours représentent l'intervalle de confiance sur la moyenne de 4 expériences prises le même jour, après mise des drogues, moyennées pendant 1 h. La ligne pointillée mar-ron marque le moment de l'ajout de la drogue, après ~15 h.

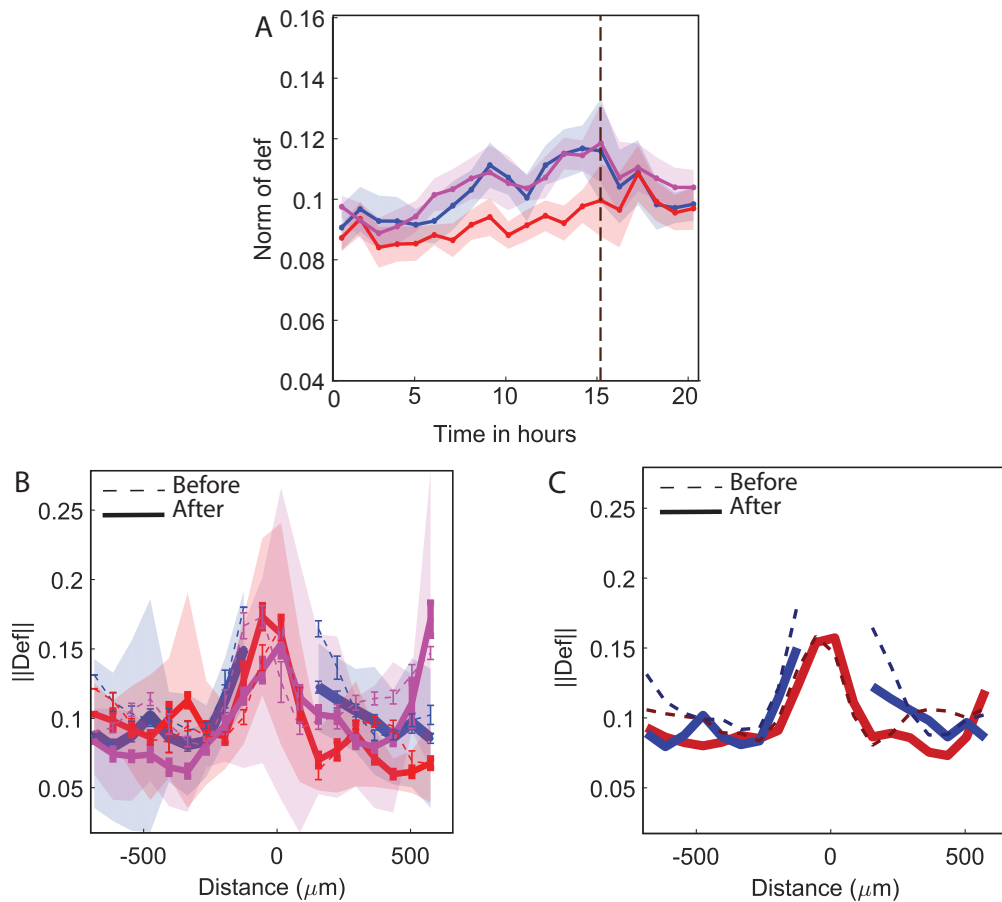


FIGURE IV.3 – Variation de la déformation avec CK666. (A) Déformation en fonction du temps sur les axes $1, 2_a, 2_b$. (B) Variation de la déformation sur les axes $1, 2_a$ et 2_b avant (pointillés) et après (traits pleins) l'ajout de drogue. (C) version simplifiée de (B). Des courbes similaires sont obtenues sur les axes $4, 5, 6$. Les contours représentent l'intervalle de confiance sur la moyenne de 4 expériences prises le même jour, moyennées pendant 1 h. La ligne pointillée marron marque le moment de l'ajout de la drogue, après ~ 15 h.

2 Moteurs moléculaires : blebbistatine

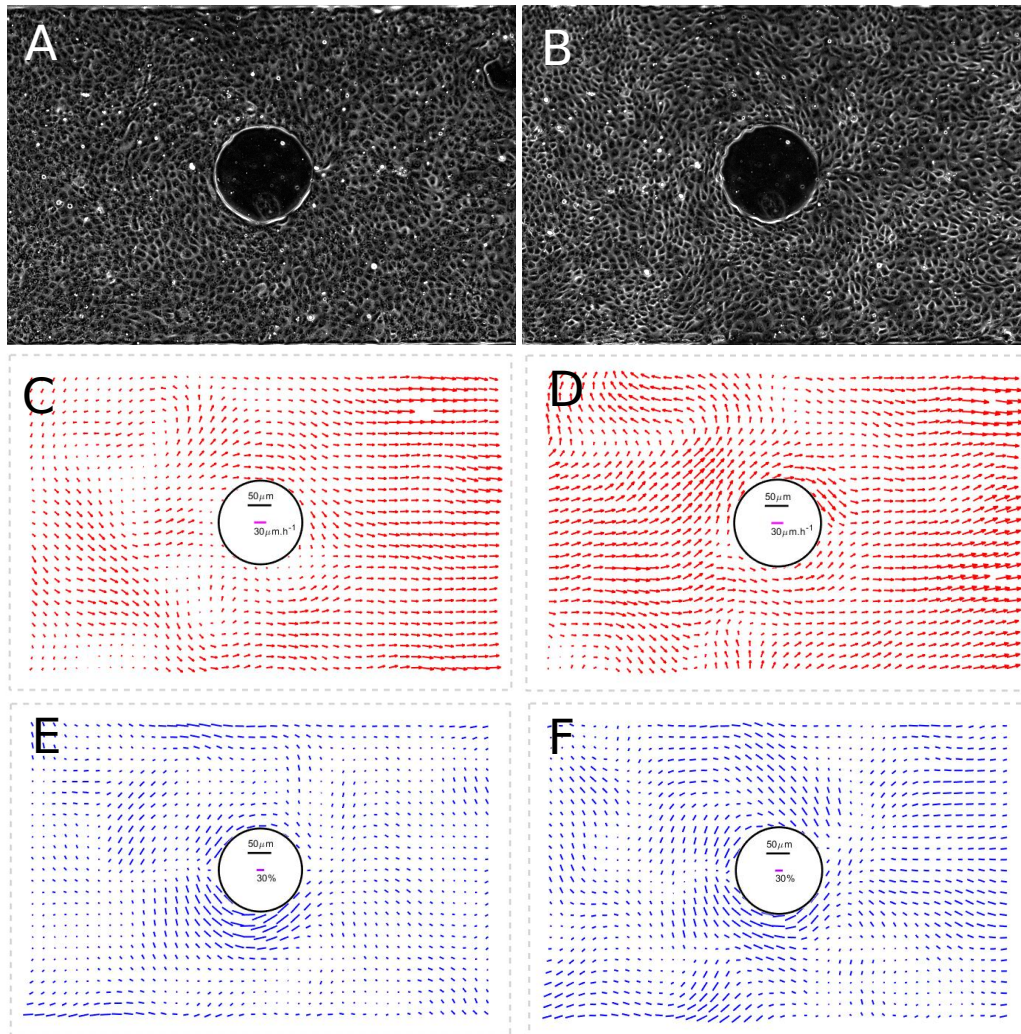


FIGURE IV.4 – Effet de la blebbistatine. (A) Image avant ajout de blebbistatine. (B) Image 2h après ajout de blebbistatine (C,D). Cartes de vitesse associées aux images (A,B). (E,F) Cartes de déformations associées aux images (A,B).

Pour tester l'influence de la myosine sur une migration déjà établie, la blebbistatine, qui est un inhibiteur de myosine II (chap. II sec. 1.2.c), est utilisée. Les images et cartes représentatives des états avant et après ajout de drogue sont représentés en Fig. IV.4. Qualitativement trois observations sont notables :

- Les cellules changent d'aspect (Fig. IV.4, A-B).
- Les cellules accélèrent (Fig. IV.4, C-D).
- Les cellules se déforment plus (Fig. IV.4, E-F).

La quantification de ces observations est représentée en Fig. IV.5. Il y a une rupture de pente brusque de la vitesse au moment de l'ajout de la drogue (Fig. IV.5, A) : la vitesse augmente brutalement. La pente, qui mesure l'accélération, passe de $0.63 \pm 0.05 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-2}$ à $4.0 \pm 0.36 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-2}$, soit un gain d'un facteur 6.3. Spatialement, Fig. IV.5, B, C le gradient de vitesse disparaît sur les axes 2_a et 2_b sauf près du front où il augmente. Sur l'axe de symétrie, le gradient de vitesse est plus important près de l'obstacle et au front. Globalement, la vitesse augmente et a une valeur d'environ $23 \mu\text{m}^{-1}$.

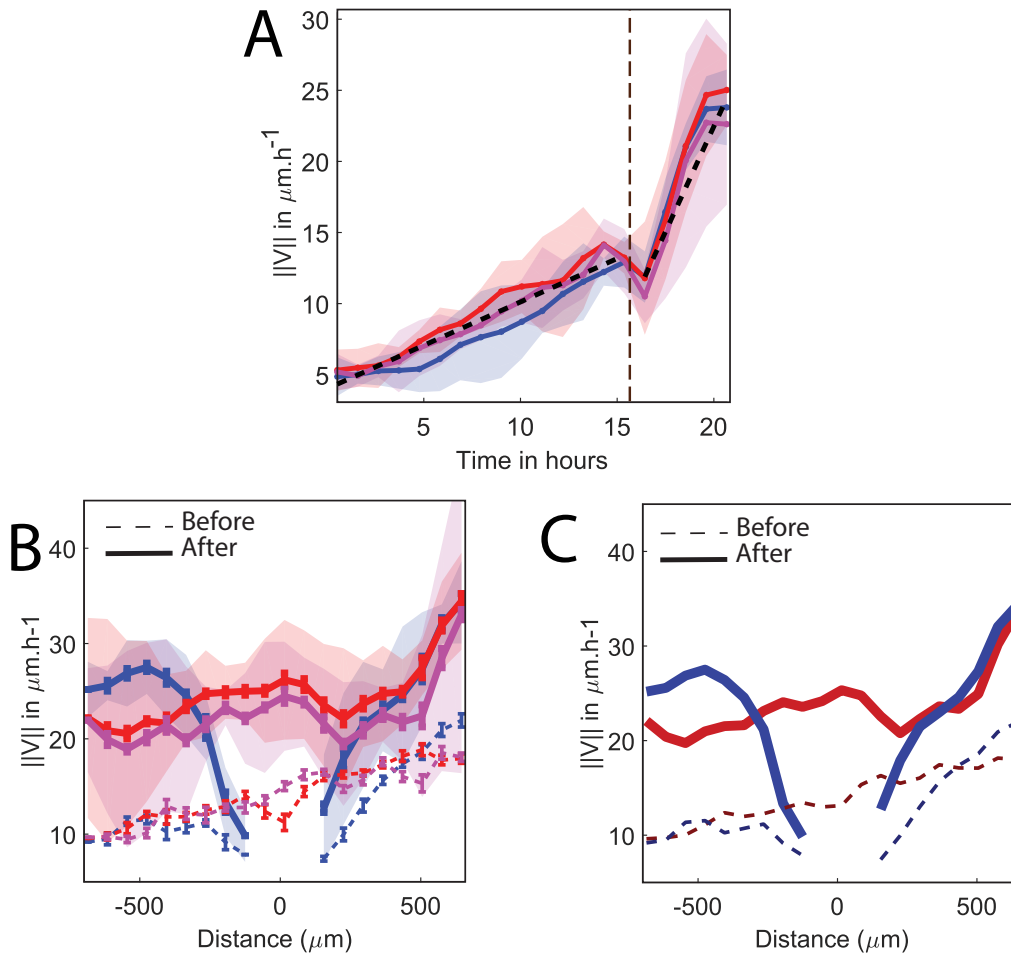


FIGURE IV.5 – Variation de la vitesse avec la blebbistatine. (A) Vitesse en fonction du temps sur les axes 1,2_a, 2_b. (B) Variation de la vitesse sur les axes 1,2_a et 2_b avant (pointillés) et après (traits pleins) l'ajout de drogue. (C) Version simplifiée de (B). Des courbes similaires sont obtenues sur les axes 4,5,6. Les contours représentent l'intervalle de confiance sur la moyenne de 4 expériences prises le même jour, après mise des drogues, moyennées pendant 1 h. La ligne pointillée marron marque le moment de l'ajout de la drogue, après ~15 h.

En ce qui concerne la déformation, la Fig. IV.6, A, indique qu'avant l'ajout de drogue, la déformation évolue peu dans le temps, mais après ajout de drogue, celle-ci augmente linéairement. Quantitativement, le taux de déformation eulérien passe de zéro à 0.4 % par heure après ajout de blebbistatine. Spatialement, cette évolution est légèrement plus importante au front que dans le reste de la bande Fig. IV.6, B, C.

La blebbistatine provoque ainsi :

- Une accélération de la migration.
- Une disparition du gradient de vitesse hors zone proche du front de migration et de l'obstacle.
- Une augmentation de la déformation cellulaire.

Discussion Comme expliqué en 1.2.b, les myosines agissent sur la contractilité cellulaire, ainsi qu'au niveau de la réticulation des filaments d'actine en faisceaux antiparallèles. L'inhibition des myosines dans une monocouche en migration a montré des effets très divers, voire contradictoires. Certaines études montrent que l'inhibition des

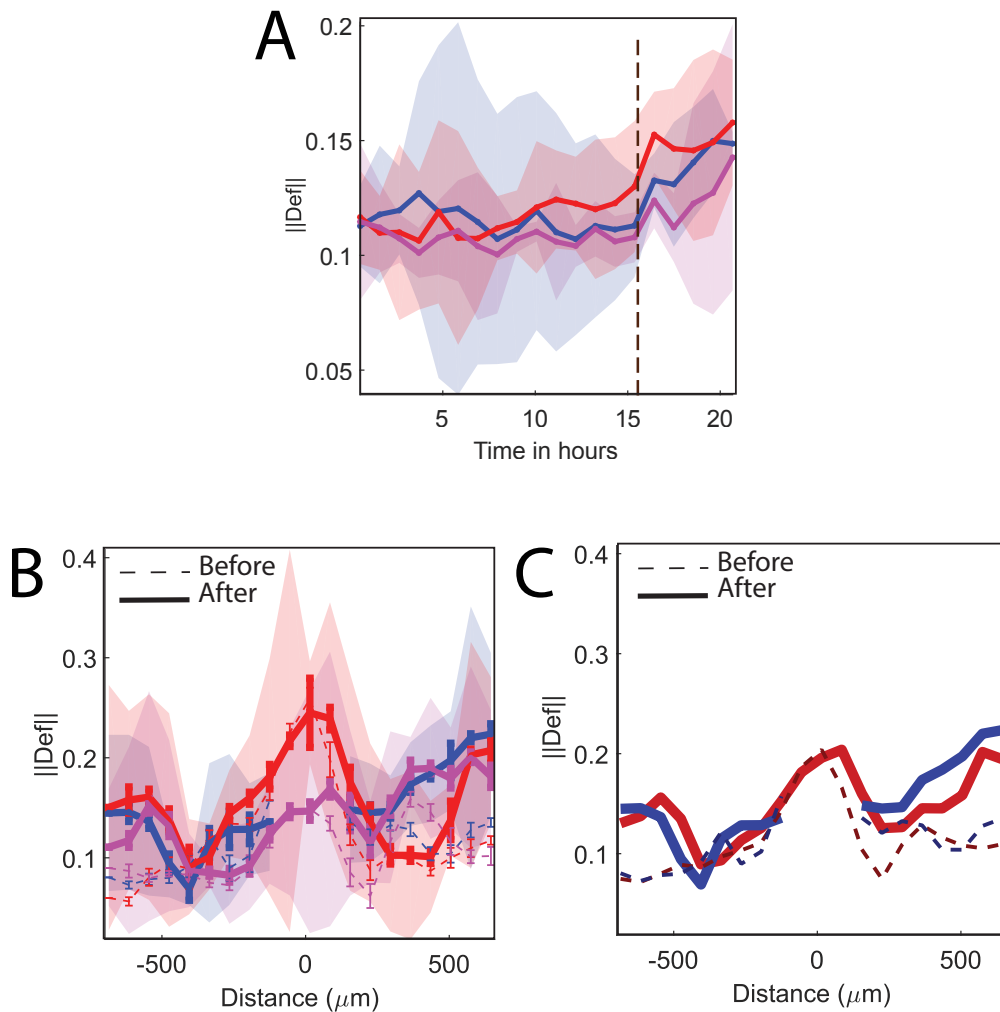


FIGURE IV.6 – Variation de la déformation avec la blebbistatine. (A) Déformation en fonction du temps sur les axes $1,2_a, 2_b$. (B) Variation de la déformation sur les axes $1,2_a$ et 2_b avant (pointillés) et après (traits pleins) l'ajout de drogue. (C) Version simplifiée de (B). Des courbes similaires sont obtenues sur les axes 4, 5, 6. Les contours représentent l'intervalle de confiance sur la moyenne de 4 expériences prises le même jour, après mise des drogues, moyennées pendant 1 h. La ligne pointillée marron marque le moment de l'ajout de la drogue, après ~ 15 h.

mysosines II augmente la vitesse de migration [69], [54], d'autres montrent que la migration est très inhibée [110], [65],[130].

Ici la vitesse augmente, en accord avec [69], [54]. Nous ajoutons que le gradient de vitesse disparaît, et que la déformation augmente fortement. Une perspective serait d'utiliser la méthode développée dans [110] (chap. I sec. 3.1) pour quantifier la variation du temps visco-élastique. Ce temps est défini comme le rapport d'une viscosité intercellulaire et d'une élasticité intracellulaire, toutes deux influencées par les mysosines, et la variation de ce temps permet de faire le bilan global de ces deux effets antagonistes de la mysosine.

3 Filaments intermédiaires : simvastatine

La simvastatine est utilisée pour perturber le réseau de filaments intermédiaires, sans le dépolymériser. Après ajout de la drogue, une fuite des cellules à travers les

bords de motifs (Fig. IV.7,A,B) ainsi qu'une accélération du front (Fig. IV.7,CE,D) sont observées. En revanche il n'y a pas de différence flagrante en terme de déformation cellulaire (Fig. IV.7,C,D).

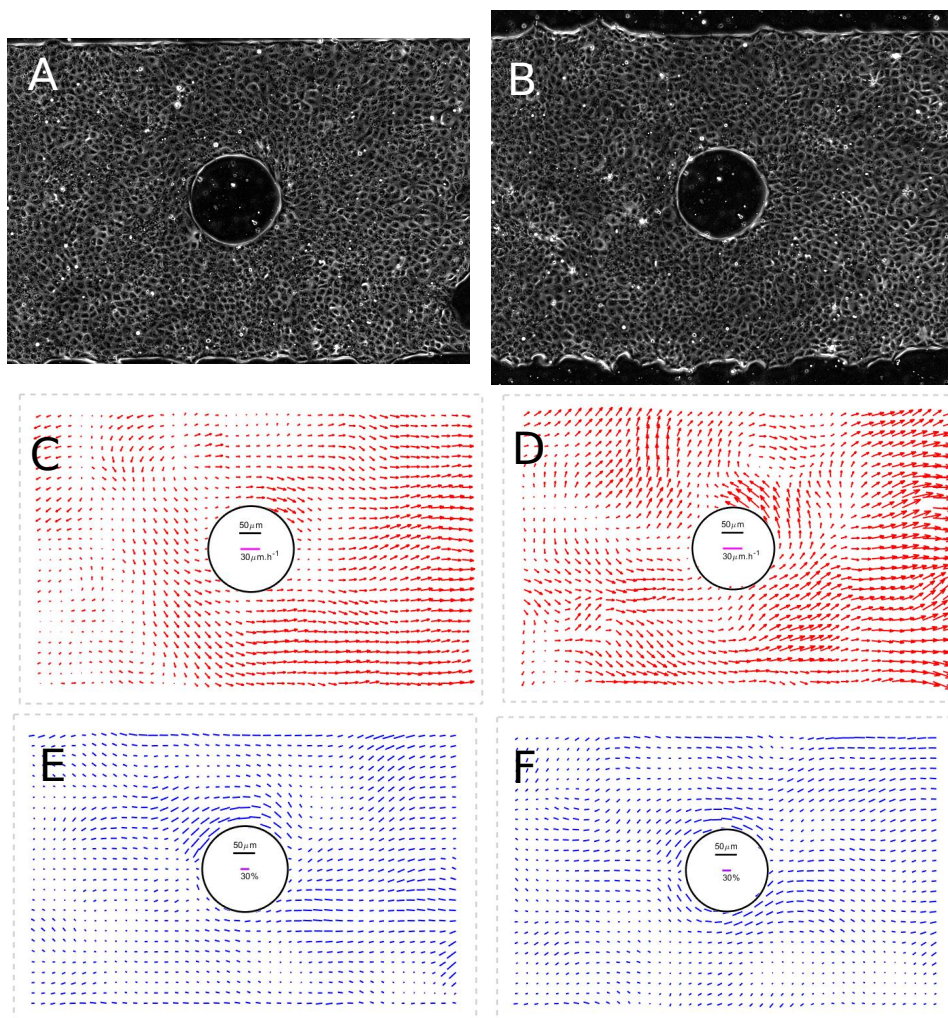


FIGURE IV.7 – (A) Image avant ajout de simvastatine. (B) Image 2h après ajout de simvastatine (C,D). Cartes de vitesse associées aux images (A,B). (E,F) Cartes de déformations associées aux images (A,B).

L'évolution temporelle de la norme de la vitesse (Fig. IV.8,A) montre une augmentation de l'accélération après ajout de drogue. Spatialement (Fig. IV.8, B, C), les cellules de front accélèrent sous l'effet de la drogue, sur une distance de 300 μm . Sur cette zone près du front, l'accélération est 5 fois plus grande que dans le cas contrôle. En arrière de bande, il n'y pas d'influence sur le gradient de vitesse.

La déformation cellulaire est inchangée (Fig. IV.9,A) au cours du temps. La variation spatiale de la déformation cellulaire est aussi inchangée (Fig. IV.9, B, C).

Enfin, dans le cas de la simvastatine l'allure de la divergence est aussi étudiée car il semble y avoir plus de contractions et dilatations cellulaires après l'ajout de la drogue. Les cartes de divergence changent en effet (Fig. IV.10, A, B). L'amplitude crête-crête de la divergence montre une nette rupture de pente après ajout de la drogue (Fig. IV.10, C).

Conclusion des observations en simvastatine :

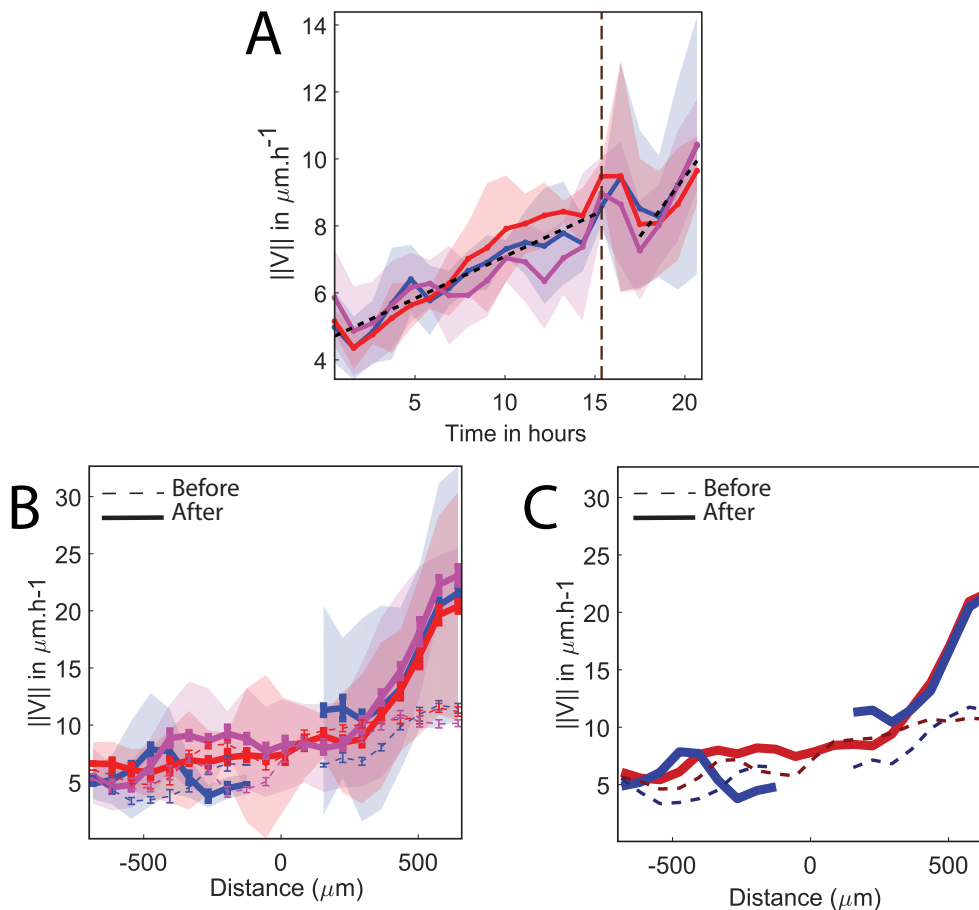


FIGURE IV.8 – Variation de la vitesse avec la simvastatine. (A) Vitesse en fonction du temps sur les axes 1,2_a, 2_b. (B) Variation de la Vitesse sur les axes 1,2_a et 2_b avant (pointillés) et après (traits pleins) l'ajout de drogue. (C) Version simplifiée de (B). Des courbes similaires sont obtenues sur les axes 4, 5, 6. Les contours représentent l'intervalle de confiance sur la moyenne de 4 expériences prises le même jour, après mise des drogues, moyennées pendant 1 h. La ligne pointillée marron marque le moment de l'ajout de la drogue, après ~15 h.

- Pas ou peu d'effet sur la déformation.
- Effet sur le front de vitesse : accélération 5 fois plus grande avec simvastatine, effet visible sur 300 μm .
- Disparition du gradient de vitesse en arrière de bande.
- Augmentation de l'amplitude des contractions et dilatations.

Discussion Le faible changement de la déformation cellulaire est cohérent avec l'absence de perturbation du réseau d'actine et de microtubules [113]. La disparition du gradient spatial en arrière de bande et l'accélération en front de bande indique que la simvastatine agit sur l'ensemble de la monocouche. La fuite des cellules en bord de motif, et l'augmentation de la vitesse au front, sont à mettre en parallèle avec les observations faites au chap. III, sec. 2.4 où les cellules les plus riches en vimentine sont situées au front et en bord de motif et mettent en évidence le rôle de la vimentine en tant que senseur de frontière.

Enfin, l'augmentation de la divergence lors de l'ajout de simvastatine pourrait in-

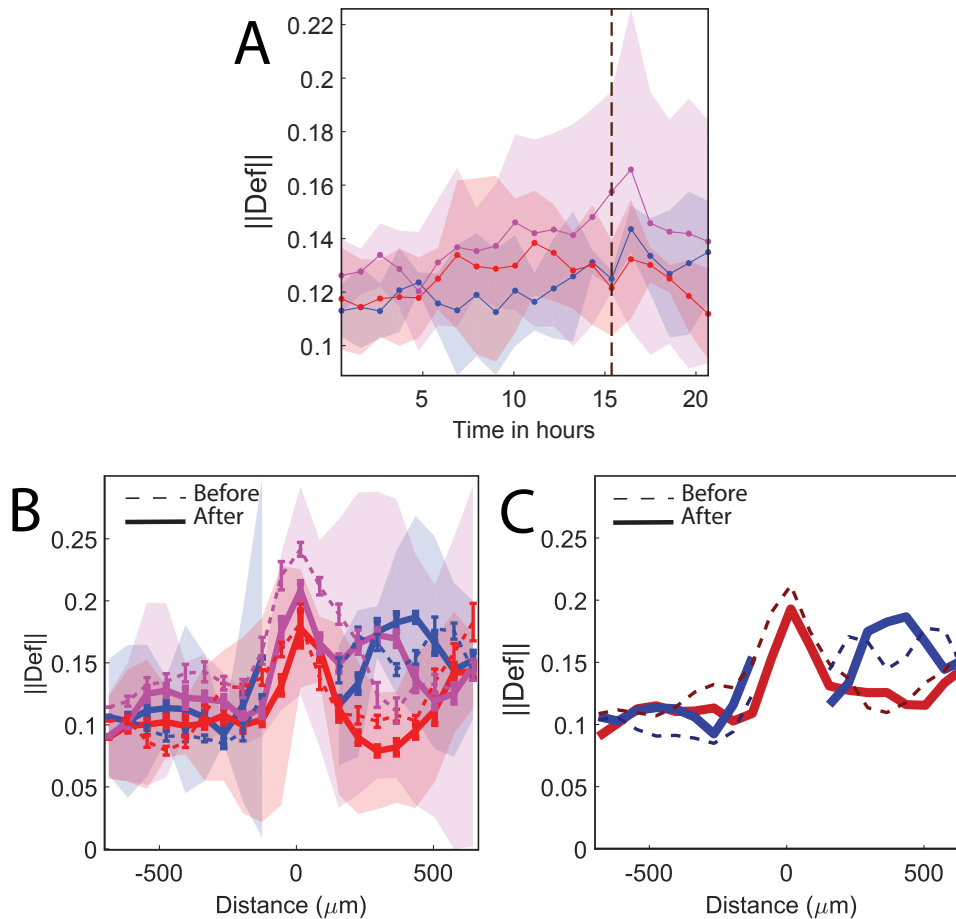


FIGURE IV.9 – Variation de la déformation avec la simvastatine. (A) Déformation en fonction du temps sur les axes 1,2_a, 2_b. (B) Variation de la déformation sur les axes 1,2_a et 2_b avant (pointillés) et après (traits pleins) l’ajout de drogue. (C) Version simplifiée de (B). Des courbes similaires sont obtenues sur les axes 4, 5, 6. Les contours représentent l’intervalle de confiance sur la moyenne de 4 expériences prises le même jour, après mise des drogues, moyennées pendant 1 h. La ligne pointillée marron marque le moment de l’ajout de la drogue, après ~15 h.

diquer que la désorganisation de ce réseau rend les cellules moins rigides. Mendez *et al.* [131], qui étudient les propriétés élastiques de fibroblastes de souris avec et sans vimentine, semblent aller dans ce sens. Dans leur étude, ils montrent que la vimentine a un rôle protecteur envers les contraintes compressives et permet l’intégrité mécanique en augmentant la raideur élastique de la cellule. En revanche, le lien entre la désorganisation du réseau de vimentine et l’évolution du profil de vitesse nécessite des expériences complémentaires pour comprendre si l’effet est purement mécanique, ou s’il y a une cascade de régulation biochimique.

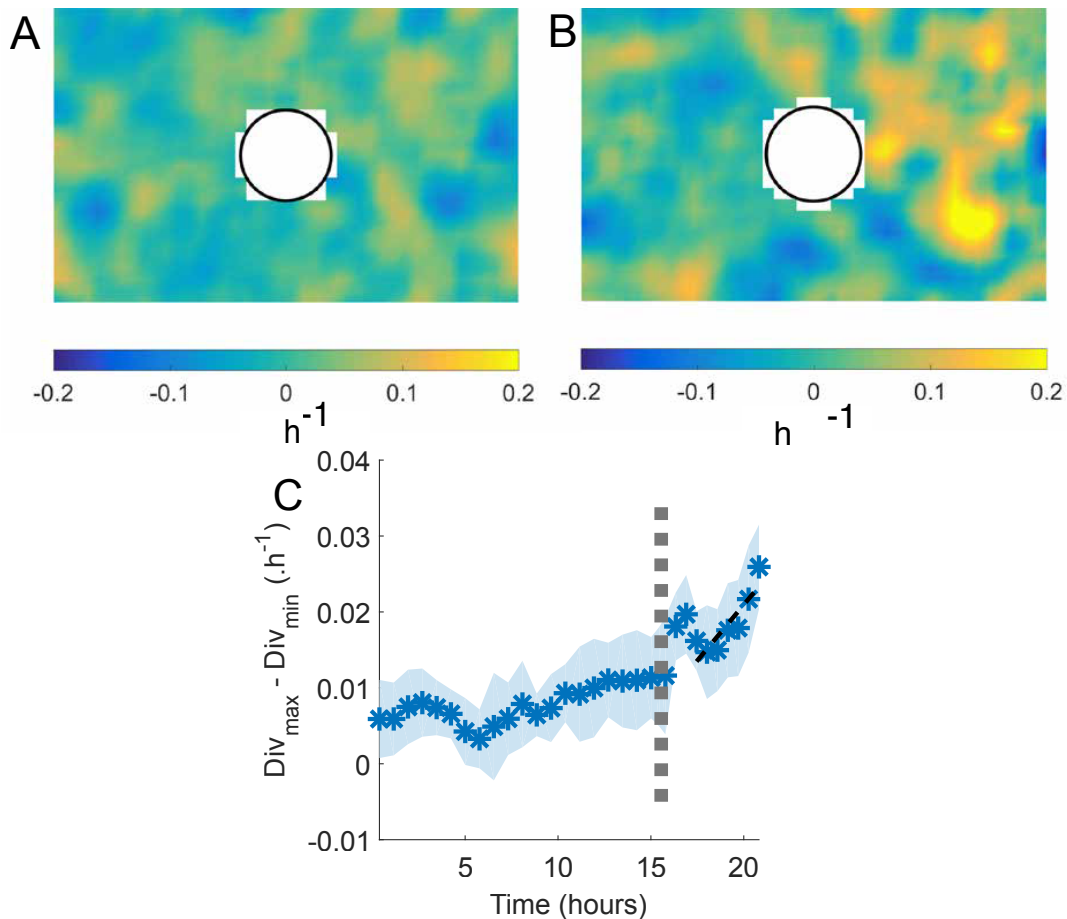


FIGURE IV.10 – Effet de la simvastatine sur la divergence de la vitesse. (A) Divergence avant ajout de simvastatine. (B) Divergence après ajout de simvastatine. (C) Amplitude crête-crête de la divergence au cours du temps. Ajustements linéaires : avant drogue (non tracé), $R^2 = 0.55$; après ajout de drogue (ligne pointillée), pente de $2.9 \pm 0.2 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-2}$, $R^2 = 0.77$.

4 Microtubules : nocodazole

La dernière drogue utilisée est le nocodazole qui agit sur les microtubules. Avec cette drogue, les cellules s'étalent sans pour autant se déformer. En parallèle de ce changement morphologique, les cellules arrêtent de se déplacer (Fig.IV.11).

Spatialement, ces observations sont confirmées (Fig.IV.12, A, B) : il y a une nette diminution globale de la vitesse (bien que les fluctuations semblent comparables) et pas de changement en ce qui concerne la déformation cellulaire (Fig.IV.13, A, B).

Enfin, étant donné le changement morphologique observé, la variation de l'amplitude crête-crête de la divergence est étudiée de la même façon que pour la simvastatine (pente de 0.025 h^{-2}) et le résultat trouvé est identique, Fig.IV.14.

Discussion Quand il n'y a pas de microtubules, les fluctuations augmentent. Cela peut s'expliquer de plusieurs façons. L'une d'elle est à chercher dans le double effet du nocodazole qui dépolymérise les microtubules d'une part et augmente la contractilité aco-myosine et ses oscillations intrinsèque d'autre part [49]. Une autre explication est que la désorganisation d'un réseau (peu importe sa nature, microtubules ou vimentine, tant que l'encombrement stérique dans la cellule est suffisamment changé) augmente les fluctuations.

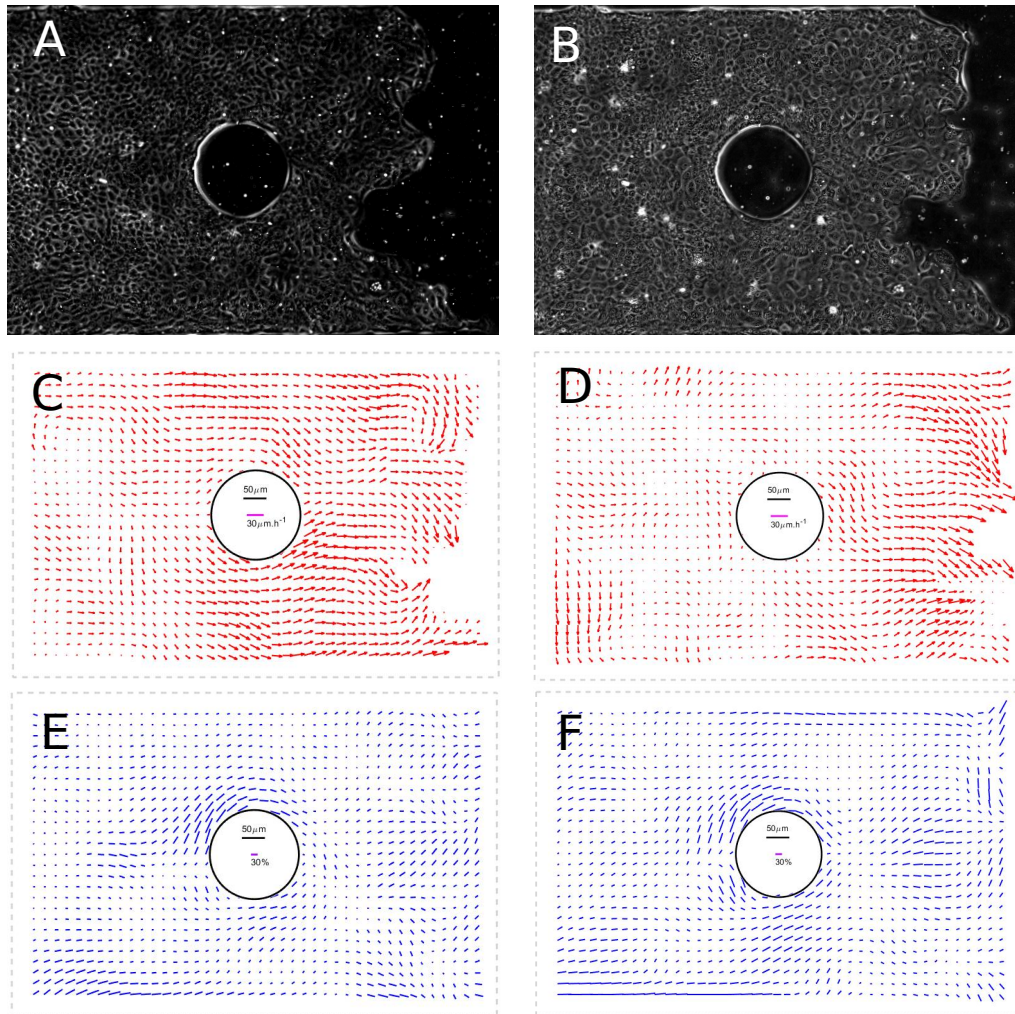


FIGURE IV.11 – Effet du nocodazole. (A) Image avant ajout de nocodazole. (B) Image 2h après ajout de nocodazole (C,D). Cartes de vitesse associées aux images (A,B). (E,F) Cartes de déformations associées aux images (A,B).

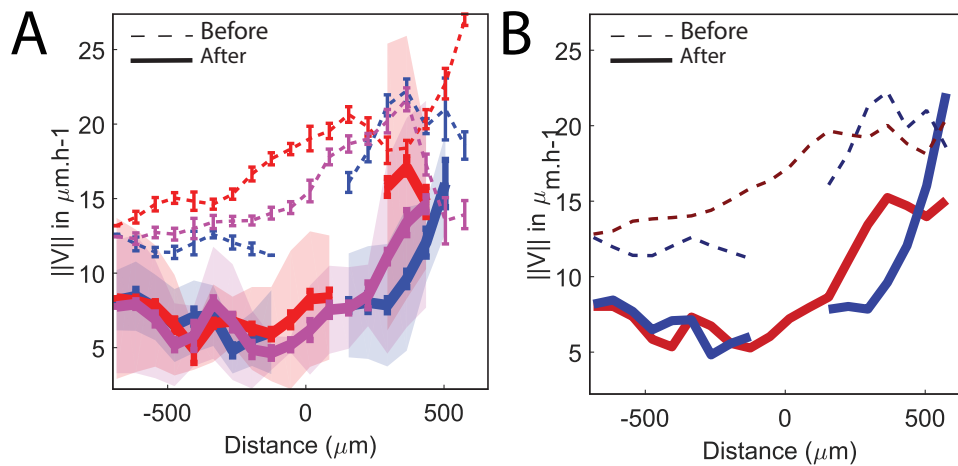


FIGURE IV.12 – Variation de la vitesse avec le nocodazole. (A) Vitesse en fonction du temps sur les axes $1, 2_a, 2_b$. (B) Variation de la vitesse sur les axes $1, 2_a$ et 2_b avant (pointillés) et après (traits pleins) l'ajout de drogue. (C) Version simplifiée de (B). Des courbes similaires sont obtenues sur les axes 4, 5, 6. Les contours représentent l'intervalle de confiance sur la moyenne de 4 expériences prises le même jour, après mise des drogues, moyennées pendant 1 h. La ligne pointillée marron marque le moment de l'ajout de la drogue, après ~ 15 h.

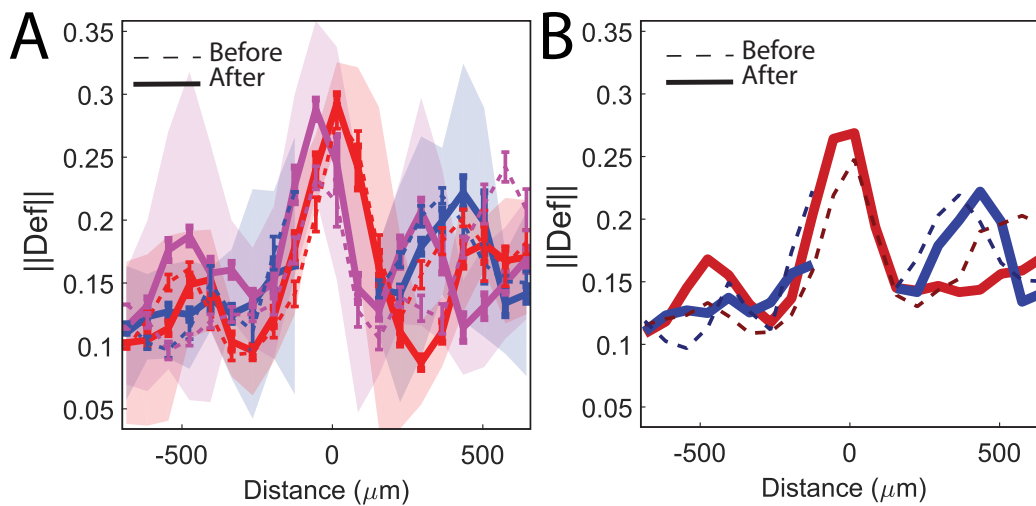


FIGURE IV.13 – Variation de la déformation avec le nocodazole. (A) Déformation en fonction du temps sur les axes $1, 2_a, 2_b$. (B) Variation de la déformation sur les axes $1, 2_a$ et 2_b avant (pointillés) et après (traits pleins) l'ajout de drogue. (C) Version simplifiée de (B). Des courbes similaires sont obtenues sur les axes 4, 5, 6. Les contours représentent l'intervalle de confiance sur la moyenne de 4 expériences prises le même jour, après mise des drogues, moyennées pendant 1 h. La ligne pointillée marron marque le moment de l'ajout de la drogue, après ~ 15 h.

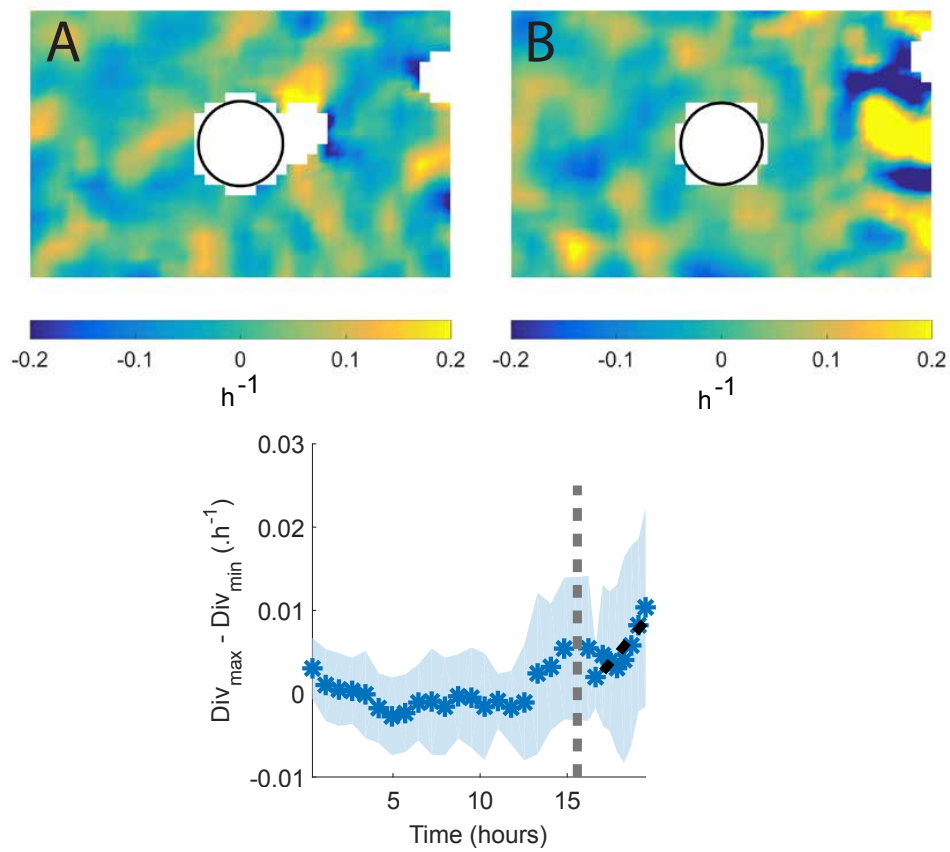


FIGURE IV.14 – Effet du nocodazole sur la divergence. (A) Divergence avant ajout de nocodazole. (B) Divergence après ajout de nocodazole. (C) Évolution de l’amplitude crête-crête de la divergence au cours du temps. Ajustements linéaires : avant drogue (non tracé), $R^2 = 0.05$; après ajout de drogue (ligne pointillée), pente $2.5 \pm 0.2 \cdot 10^{-3} h^{-2}$, $R^2 = 0.69$.

Chapitre V

Migration en hippodrome sur substrat dur

Au départ nous souhaitions étudier les forces autour d'un obstacle, ce qui nécessite de travailler en substrat mou. Or, lorsqu'on essaye de réaliser une expérience de relâchement de contrainte sur un substrat mou, on endommage le substrat. Pour s'affranchir de cette difficulté, nous avons changé les conditions aux limites du motif en pariant qu'un flot apparaîtrait spontanément à grande échelle ; ce qui s'est révélé exact.

Pour faire le lien entre les expériences de migration en front libre (chap. III, IV) et la migration en hippodrome sur substrat mou pour l'analyse des forces (chap. VI), ce chapitre étudie la migration en hippodrome sur substrat dur. Les expériences sont réalisées dans quatre géométries qui diffèrent par leurs dimensions (précisions sur le nombre d'expériences et leurs dimensions indiquées dans le tableau II.1 situé à la fin du chap. II). Comme dans les chap. III, IV, les résultats issus de l'analyse cinématique et des marquages sont étudiés séparément puis confrontés.

1 Cinématique

L'étude cinématique effectuée se divise en deux parties. La première est une analyse sur le motif dans son ensemble qui permet de mesurer les distances sur lesquels les flots s'établissent. La seconde est une analyse autour de l'obstacle, similaire à l'analyse des bandes, de manière à permettre la comparaison avec les bandes.

1.1 Étude grande échelle

Après avoir étudié la cinématique de façon systématique et similaire aux bandes nous étudions les particularités qui proviennent de la géométrie grande échelle des hippodromes. Plus précisément, nous quantifions la longueur sur laquelle le flot est orienté dans un sens.

1.1.a Longueur de cohérence

Les cartes à grande échelle sont obtenues en moyennant sur des boîtes de 1000×1000 pixels ($625 \mu\text{m}$, recouvrement 75%). Un hippodrome complet est représenté en Fig.V.1, A et B avec son champ de vitesse. La longueur caractéristique de cohérence associée au mouvement à grande échelle est définie par la position à laquelle le champ

de vitesse change de direction.

Pour cela, le changement de signe de la vitesse orthoradiale moyennée sur toute la largeur des bras de l'hippodrome est déterminé. A partir des grilles de vitesses cartésiennes, les vitesses radiales et orthoradiales (par rapport au centre de symétrie de l'hippodrome) sont calculées, l'intensité de la vitesse orthoradiale est tracée (Fig.V.1,C). Deux zones majoritaires, une bleue et une jaune qui correspondent respectivement aux vitesses orthoradiales négatives et positives, sont observées. La moyenne de cette carte sur l'angle, et la transformation de la donnée de l'angle en une donnée de distance (abscisse curviligne prise au milieu de l'hippodrome aboutit à un signal v_{ortho} en fonction de la distance le long de l'hippodrome (Fig. V.2) .

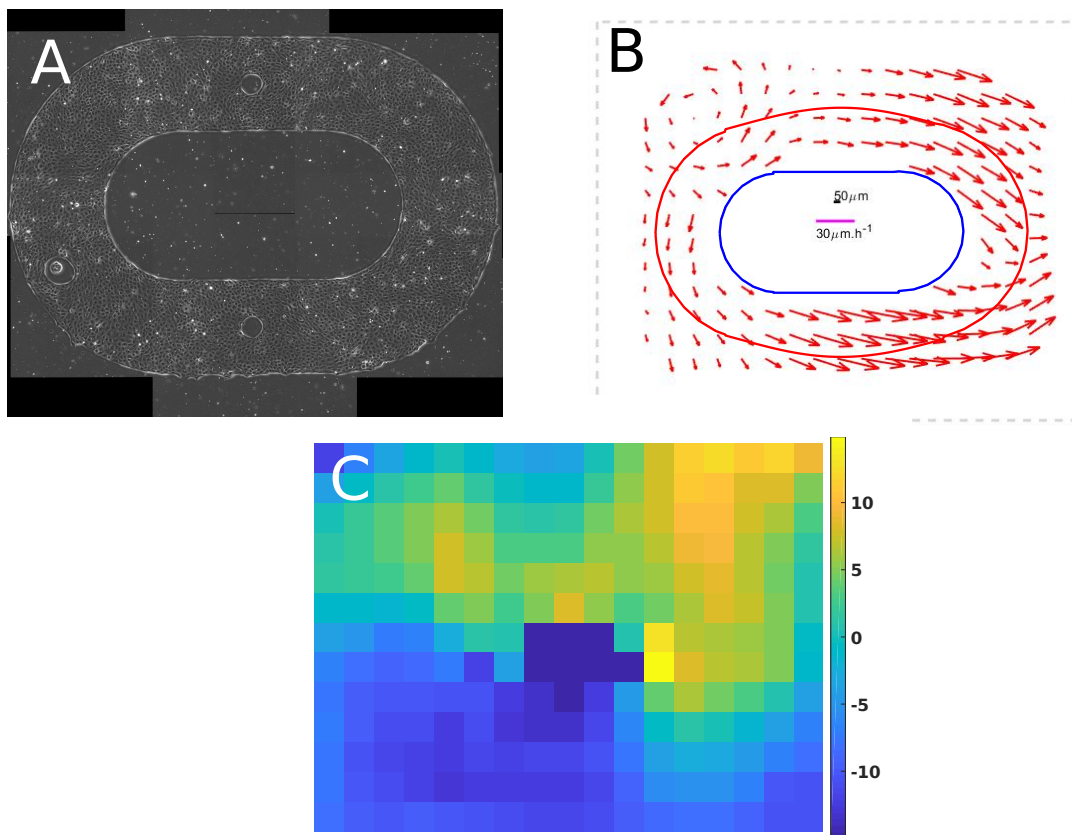


FIGURE V.1 – Détermination des mouvements à grande échelle dans l'hippodrome. (A) Image initiale. (B) Moyenne à grande échelle effectuée sur des boîtes de 1000×1000 pixels ($625 \mu\text{m}$, recouvrement 75%). La ligne rouge représente l'abscisse curviligne prise au milieu des bras de l'hippodrome. (C) Carte représentative de la vitesse orthoradiale en code couleur, en $\mu\text{m.h}^{-1}$.

La valeur de la longueur de cohérence est déterminée par le maximum de distance entre les positions de changement de signe. Cela correspond aux points rouges visibles sur la Fig. V.2.

Cette analyse est réalisée pour 26 hippodromes, de tailles différentes et avec différentes largeurs de bras. La longueur de cohérence extraite est de $4215 \mu\text{m}$, avec une largeur de distribution de $968 \mu\text{m}$ et une erreur sur la moyenne de $318 \mu\text{m}$.

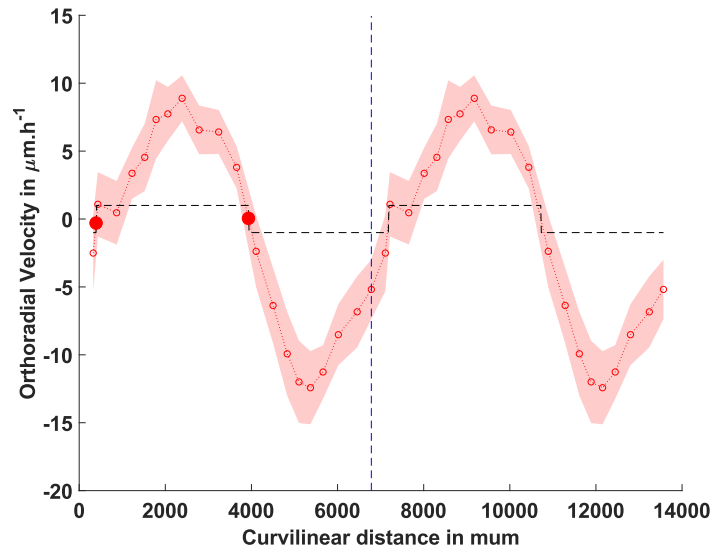


FIGURE V.2 – Variation de la vitesse orthoradiale le long de la distance curvilinéaire. En pointillé : la fonction signe associée à la courbe. Gros points rouges pleins : points qui définissent la longueur de cohérence. Pour éviter les artefacts liés à la position de l'origine, la courbe est dupliquée de part et d'autre de la ligne pointillée verticale, ce qui la rend périodique.

Discussion On serait tenté de comparer cette longueur aux distances de corrélations entre vitesses cellulaires extraites en 2D dans la littérature [65],[69]. Mais nous mesurons ici la longueur de cohérence du signe du flot. Notre système s'apparente à un système à une dimension et de ce fait peut être comparé à celui de Jain *et al.* [132]. Dans leur étude, des cellules migrent de façon cohérente sur des anneaux de une à quelques cellules d'épaisseur, et de longueur de piste de 100 à 1000 μm . C'est compatible avec le fait que nos expériences, qui ont une taille plus grande, peuvent détecter des changements de signes de la vitesse et mesurer une longueur de cohérence de l'ordre de 4 mm.

1.1.b Influence des caractéristiques géométriques

Les mesures de longueurs de cohérence en fonction des caractéristiques géométriques du système sont présentées dans la figure Fig. V.3. On étudie l'influence : de la largeur des bras des hippodromes (A) ; du diamètre de l'obstacle (B) ; de la taille de la plus petite constriction, c'est-à-dire la largeur du bras moins le diamètre de l'obstacle (C) ; et enfin du rapport entre le diamètre de l'obstacle et la largeur du bras (D). Aucun des tests d'exclusion (two sample t-test de Matlab) n'est positif, les résultats sont non significatifs. Dans la suite, tous les hippodromes sont considérés ensemble, seule la valeur moyenne et l'erreur sur l'ensemble sont conservées.

1.2 En représentation identique au bord libre

L'étude de la vitesse et des déformations est réalisée de façon similaire au cas des bandes (chap. III sec. 1). Trois différences sont à prendre en compte. La première est que le sens de la migration n'est pas prévisible. La détermination de l'orientation des axes (2.1) se fait donc *a posteriori* après avoir mesuré le sens principal de la migration. Deuxièmement, les bords intérieurs et extérieurs à l'hippodrome sont différenciés ; on

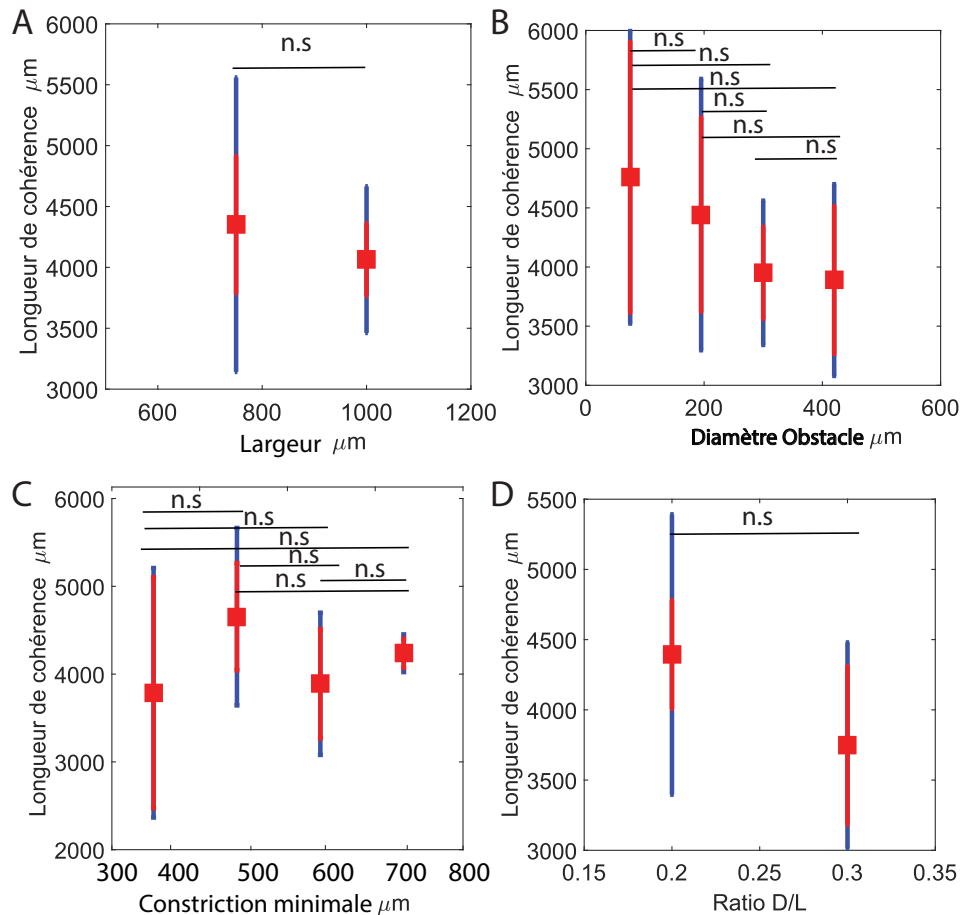


FIGURE V.3 – Influence des tailles caractéristiques de l'hippodrome sur la cohérence. Longueur de cohérence en fonction de : (A) la largeur des bras, (B) le diamètre de l'obstacle, (C) la constriction minimale au passage de l'obstacle, (D) le rapport diamètre sur longueur.

les oriente aussi, en parcourant l'axe des y de l'extérieur de l'hippodrome vers l'intérieur. Enfin, nous avons travaillé sur différentes tailles de motifs et d'obstacles ce qui a rendu les moyennes spatiales délicates. Lorsqu'on étudie une variation spatiale, on travaille à taille fixée. Nous utiliserons deux expériences de tailles de bras de 750 μm et de diamètre d'obstacle de 225 μm , cela nous donne accès à 4 obstacles. Lorsqu'on étudie les évolutions temporelles en revanche, on moyenne tous les échantillons indépendamment de leur taille (11 expériences indépendantes soit 22 obstacles).

1.2.a Vitesse

La Fig V.4 représente deux cartes de vitesse, au temps initial et après 12 h de migration, ainsi que des moyennes spatiales réalisées sur différents axes en fonction du temps.

Sur tous les axes, qu'ils soient perpendiculaires ou parallèles, les évolutions sont comparables. L'accélération moyenne (pente) est de $0.29 \pm 0.03 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-2}$, et l'ordonnée à l'origine de $8.10 \pm 0.3 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$.

La Fig. V.5 indique, pour une géométrie donnée que les courbes de variation spatiale de la vitesse sont comparables dans le temps, avec une translation. La variation spatiale en moyennant sur la dernière heure d'expérience (cohérence avec l'analyse dans les bandes) reflète la variation spatiale à tout autre temps et est représentée sur la

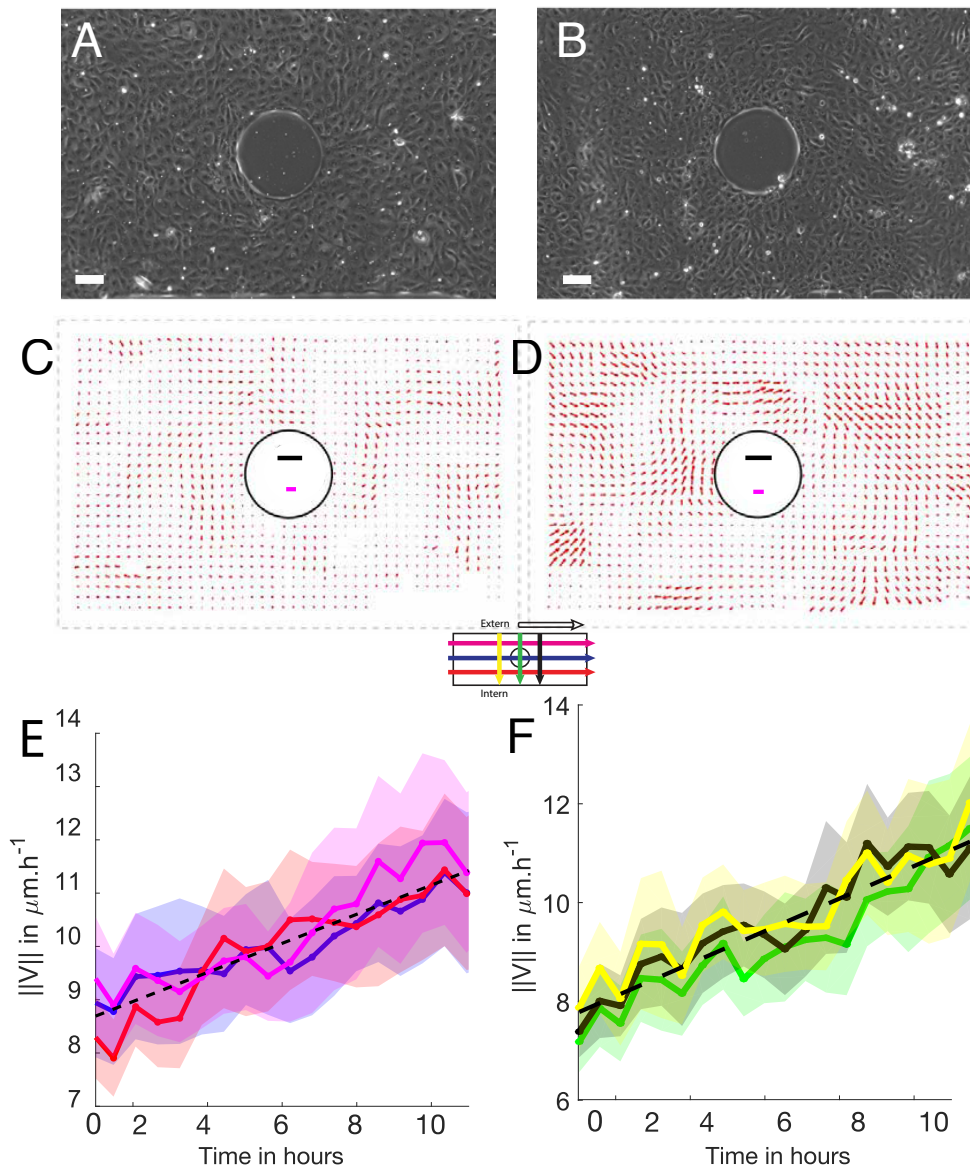


FIGURE V.4 – Évolution temporelle de la vitesse au cours d'une migration dans un hippodrome. (A) image au temps initial de l'expérience. (B) Image au temps final de l'expérience. (C,D) Cartes correspondant aux images A et B. Barre d'échelle noire : $50\ \mu\text{m}$, barre d'échelle magenta : $15\ \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$. (E) Norme de la vitesse en fonction du temps pour les axes 1 (bleu), 2_a (rouge), 2_b (magenta). La ligne hachurée est un ajustement linéaire sur la moyenne des trois axes, pente $0.27\pm 0.03\ \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-2}$, ordonnée à l'origine $8.4\pm 0.2\ \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$. (F) Norme de la vitesse en fonction du temps pour les axes 3 (vert), 4 (noir), 5 (jaune). La ligne hachurée est un ajustement linéaire sur la moyenne des trois axes, pente $0.31\pm 0.03\ \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-2}$, ordonnée à l'origine $7.7\pm 0.3\ \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$. Pour E et F, les moyennes sont réalisées sur 22 expériences, les contours représentent l'intervalle de confiance.

Fig. V.6.

La carte des vitesses de la Fig. V.4, D est très inhomogène, il y a des zones de vitesse différentes. C'est ce que l'on retrouve en Fig. V.6, A, C. sur les axes. Les fluctuations sont très importantes et la valeur moyenne obtenue est quasiment constante autour de $9\ \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$, les écarts à cette valeur moyenne sont difficiles à interpréter étant donné le nombre d'expériences indépendantes réalisées au regard des fluctuations.

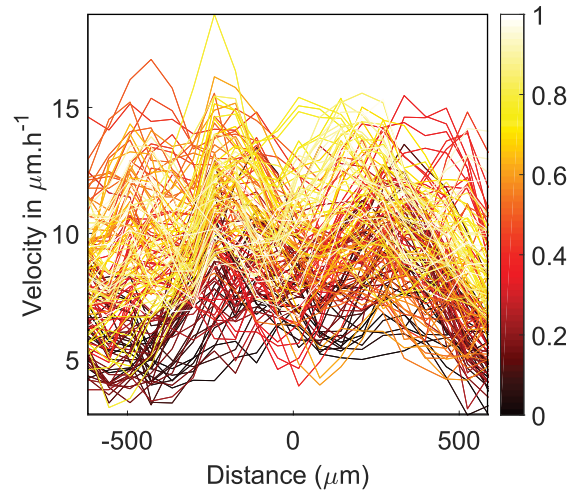


FIGURE V.5 – Variation spatiale de la vitesse dans le cas de la migration en hippodrome sur substrat dur. Le code couleur indique l'évolution temporelle entre $t = 0$, en rouge très foncé, et $t = 12$ h, en jaune très clair. Expérience non moyennée.

1.2.b Déformation

Les cartes de la déformation cellulaire (Fig. V.7, A et B) indiquent qu'il y a peu de changement entre le temps initial et après 12 h de migration, et ceci le long de chaque axe (Fig. V.7, C et D).

Les variations spatiales de la déformation sont comparables à des temps proches (Fig.V.8). L'étude suivante est effectuée en moyennant la dernière heure des expériences sur la même géométrie que la Fig.V.6.

La déformation moyenne se situe autour de 0.2 (Fig.V.9, A, C) et présente tout comme la vitesse de grosses fluctuations.

Conclusion De façon intéressante, le changement du motif de l'expérience et en particulier des conditions aux limites est compatible avec une vitesse d'ensemble de l'écoulement autour de l'obstacle et une très grande longueur de cohérence du flot. Toutefois, il présente de grosses fluctuations spatiales.

En ce qui concerne plus précisément les aspects cinématiques de la migration on observe, comme pour la migration dans les bandes :

- La variation temporelle de la vitesse est conservée.
- La déformation ne varie pas dans le temps.

On attendra d'augmenter la statistique ou de trouver une renormalisation adéquate pour moyennner les différentes géométries et conclure en ce qui concerne les variations spatiales.

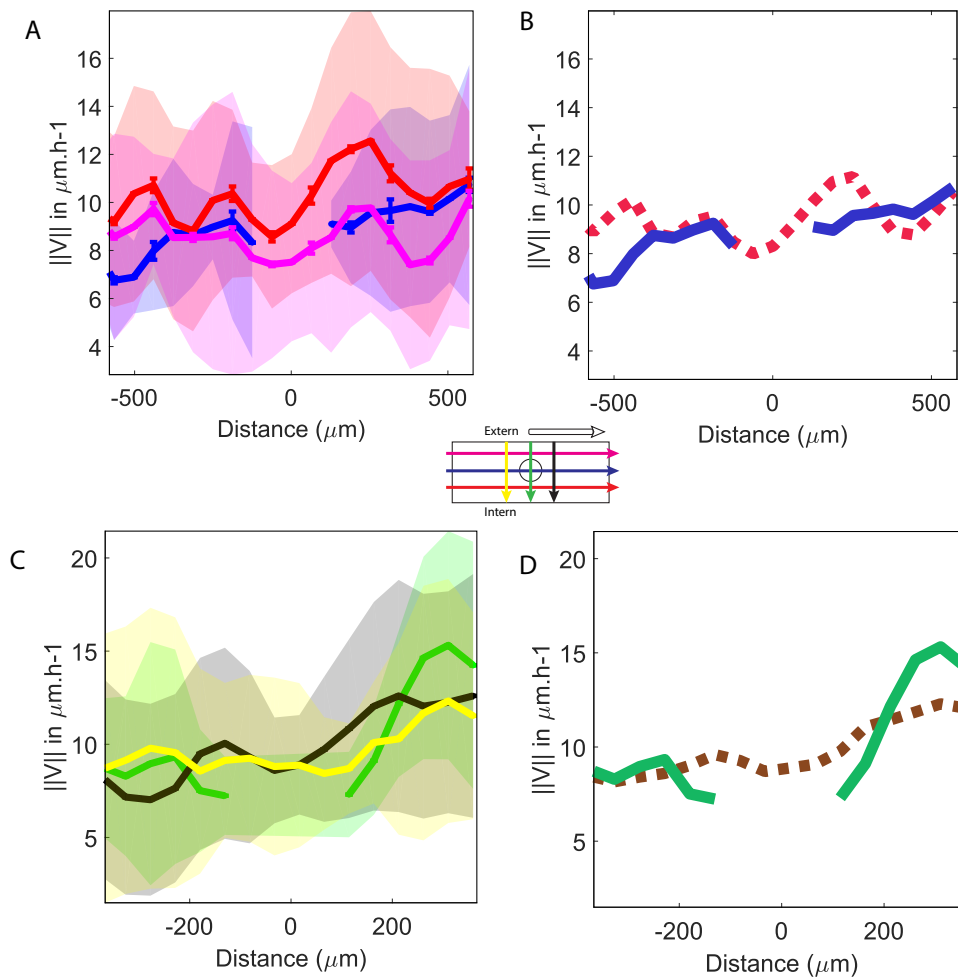


FIGURE V.6 – Variation spatiale de la vitesse dans le cas de la migration en hippodrome sur substrat dur, moyenne sur 10 temps en fin d'expérience. (A) Norme de la vitesse en fonction de la position pour les axes 1 (bleu), 2a (rouge), 2b (magenta). (B) Norme de la vitesse en fonction de la position pour les axes 3 (vert), 4 (noir), 5 (jaune). Les contours représentent l'intervalle de confiance. Les barres d'erreurs indiquent l'intervalle de confiance sur la vitesse. Moyenne pour 4 obstacles issus de 2 expériences de largeur de bras $750 \mu\text{m}$ et de diamètre $225 \mu\text{m}$.

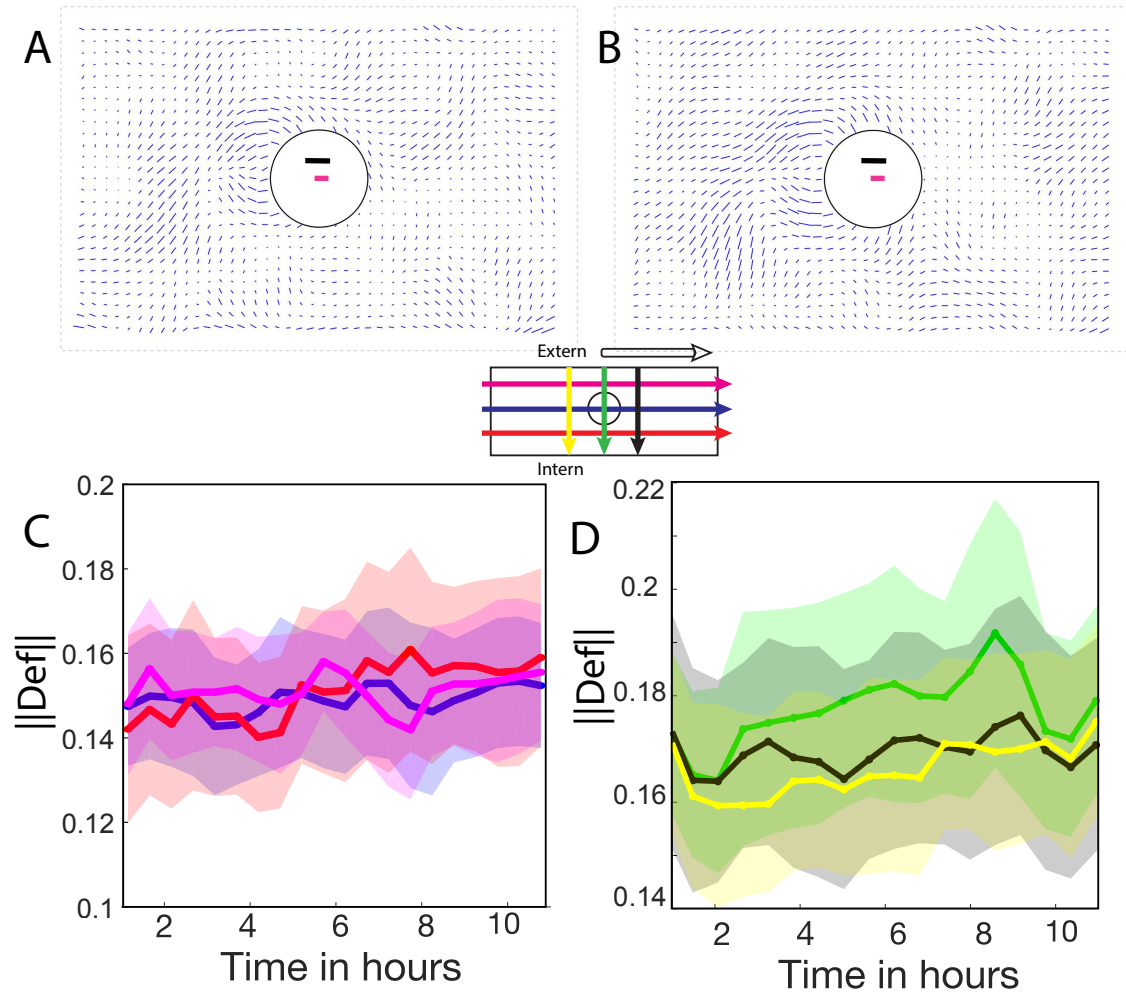


FIGURE V.7 – Évolution de la norme de la déformation au cours de la migration en hippodrome sur substrat dur. (A) Carte représentative de la déformation au temps initial d’une expérience. (B) Carte représentative au temps final d’une expérience. (C) Norme de la déformation en fonction du temps pour les axes 1 (bleu), 2_a (rouge), 2_b (magenta). (D) Norme de la déformation en fonction du temps pour les axes 3 (vert), 4 (noir), 5 (jaune). Pour C et D, les contours représentent l’intervalle de confiance sur les expériences, les barres d’erreurs sont l’intervalle de confiance de la moyenne temporelle.

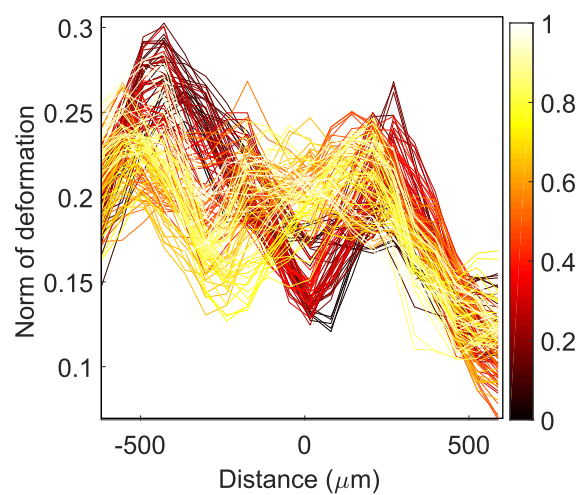


FIGURE V.8 – Variation spatiale de la déformation dans le cas de la migration en hippodrome sur substrat dur. Norme de la déformation en fonction de la distance sur l'axe 2_b . Le code couleur indique l'évolution temporelle entre $t = 0$, en rouge très foncé, et $t = 15$ h, en jaune très clair.

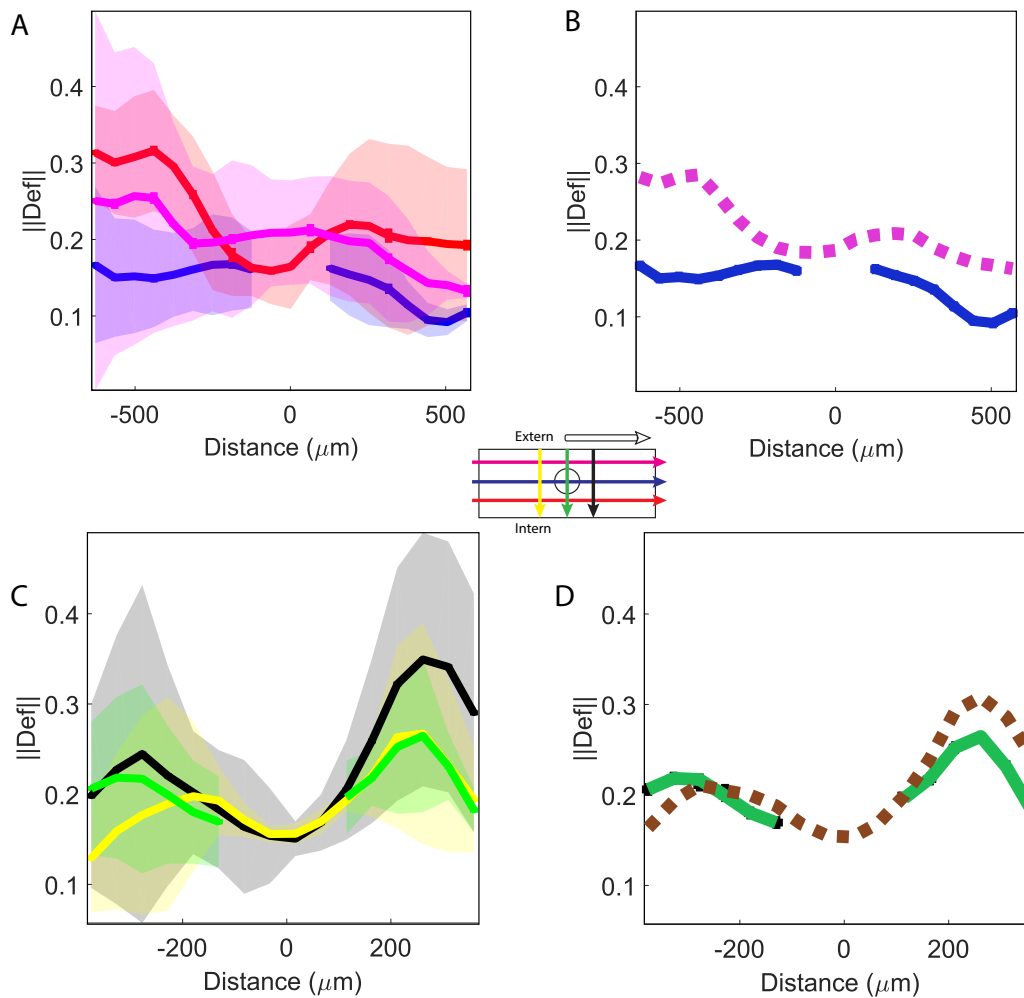


FIGURE V.9 – Variation spatiale de la déformation au cours de la migration en hippodrome sur substrat dur. (A) Norme de la déformation en fonction de la position pour les axes 1 (bleu), 2_a (rouge), 2_b (magenta). (B) Représentation simplifiée de (A). (C) Norme de la déformation en fonction de la position pour les axes 3 (vert), 4 (noir), 5 (jaune). (D) Représentation simplifiée de (C). Les contours représentent l'intervalle de confiance sur 2 expériences de 750 μm de largeur de bras et de diamètre d'obstacle de 225 μm, les barres d'erreur l'intervalle de confiance de la moyenne temporelle.

2 Etude protéique

Tout comme dans le cas des bandes, certaines expériences sont marquées en cours de migration et imagées pour observer l'aspect de l'organisation protéique sous-jacente.

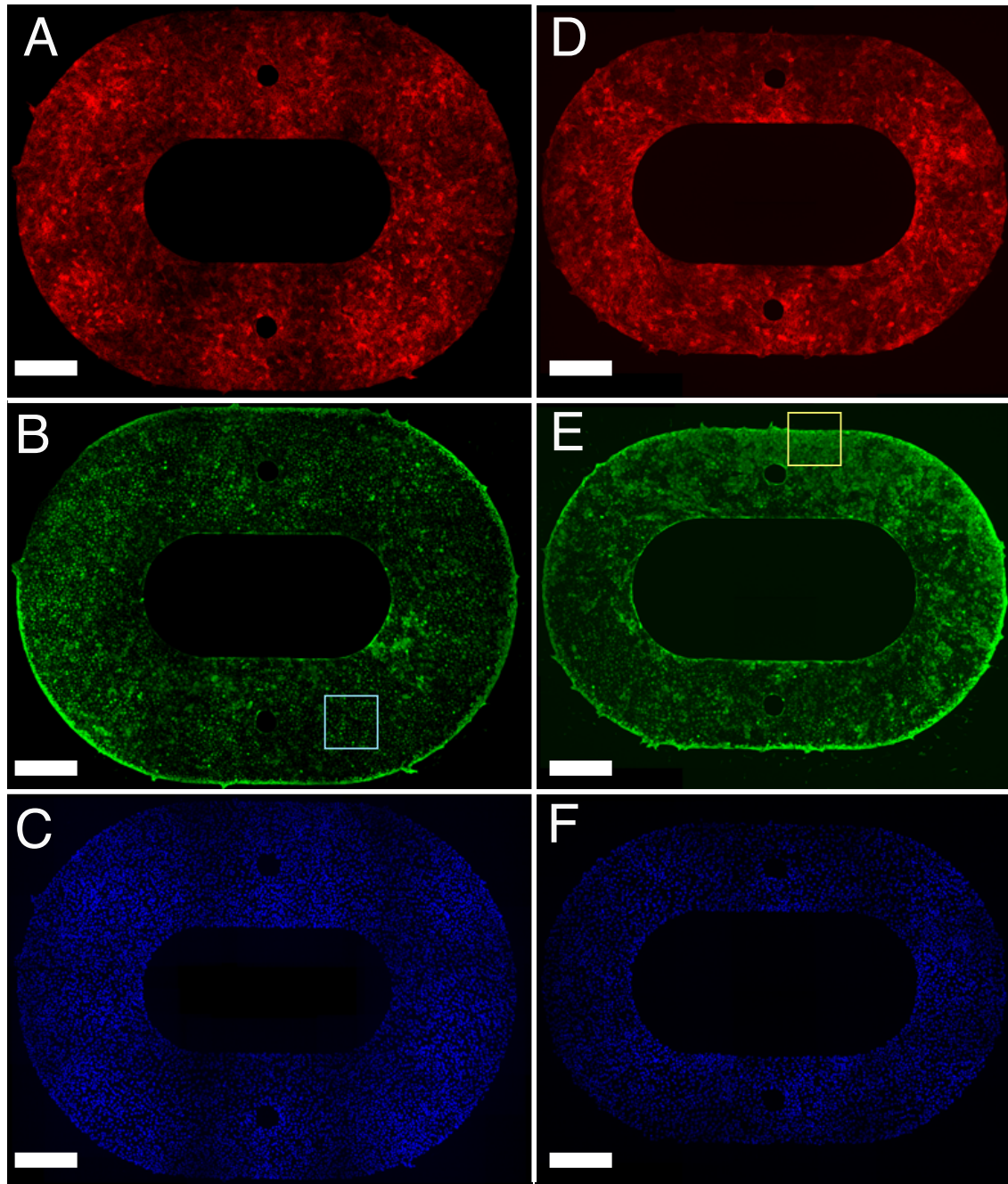


FIGURE V.10 – (A) (B) (C), Marquages d'actine (A), de vimentine (B) et de DAPI (C) pour un hippocrome de largeur de bras de 1000 μm . Carré cyan : cellules qui expriment la vimentine de façon ramassée autour du noyau. (D, E, F) Idem pour un hippocrome de largeur de bras de 750 μm . Carré jaune : cellules qui expriment la vimentine dans tout le cytoplasme. La barre d'échelle indique 500 μm .

L'actine est hétérogène tout au long des hippocromes, sans organisation évidente (Fig.V.10, A). La vimentine (Fig.V.10, B) présente une très grande hétérogénéité phénotypique, avec des cellules qui l'expriment dans l'entièreté du cytoplasme (carré jaune)

et d'autres qui semblent avoir une expression moins importante et/ou plus ramassée autour du noyau (carré cyan).

Les bords de motif sont riches en vimentine, mais avec une asymétrie par rapport au bord interne et externe.

Effet de la distance au bord interne L'étude précise de l'intensité des différents marqueurs en fonction de la distance au centre de l'hippodrome (chap. II sec. 2.3) est présentée en Fig.V.11.

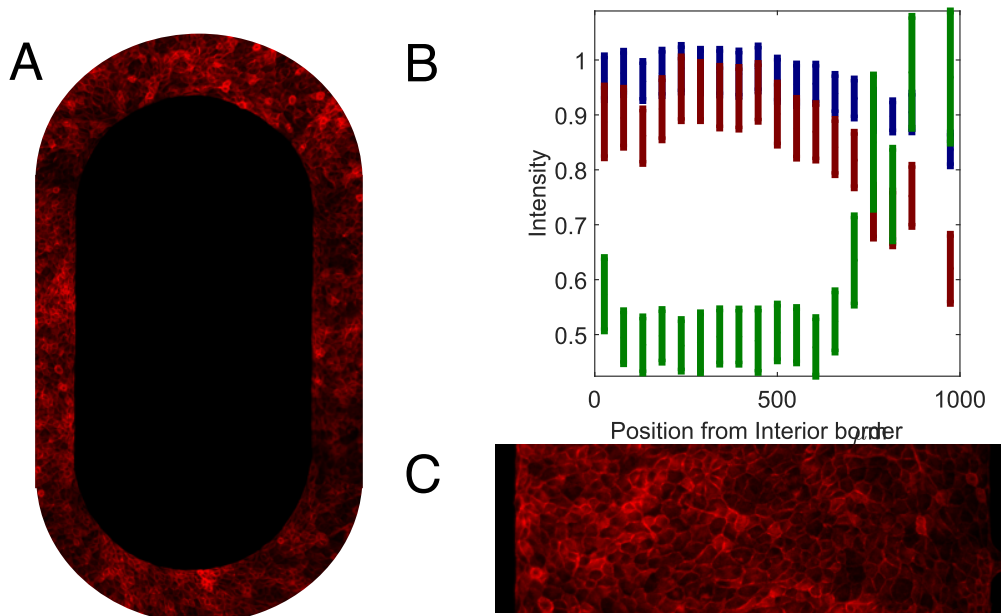


FIGURE V.11 – Effet de la distance au bord interne. (A) Anneau utilisé pour moyenner sur une distance donnée. (B) Intensité en fonction de la distance au centre de l'anneau. En rouge, l'intensité de l'actine. En vert, l'intensité de la vimentine. En bleu, l'intensité du DAPI. Représentation de la moyenne de 4 hippodromes, l'intervalle de confiance est représenté. (C) Une tranche représentative de la variation de l'actine selon la largeur du bras de l'hippodrome, à angle fixé.

Le graphe des intensités en fonction de la distance au bord interne indique que l'actine est plus élevée en centre de bras pour atteindre vers 700 μm un maximum environ 1.25 fois supérieur à la valeur au bord interne. L'intensité de la vimentine est uniforme dans l'intérieur du motif. Près des bords des motifs il y a un enrichissement en vimentine, comme pour les bandes III. Mais une information supplémentaire est disponible, car il y a une asymétrie bord intérieur bord extérieur. La courbure à large échelle semble jouer un rôle important.

Comme dans le cas des bandes, nous observons qualitativement la variation de deux autres rapporteurs que nous comparons à l'actine et à la vimentine (Fig. V.12). La kératine (chap. I sec. 1.2.a) a un aspect très différent de celui de la vimentine. Les microtubules ont un aspect fibreux et s'expriment dans toute la cellule sauf au niveau des contacts cellule-cellule. Il n'y a pas de motif à grande échelle visible pour ces deux marqueurs.

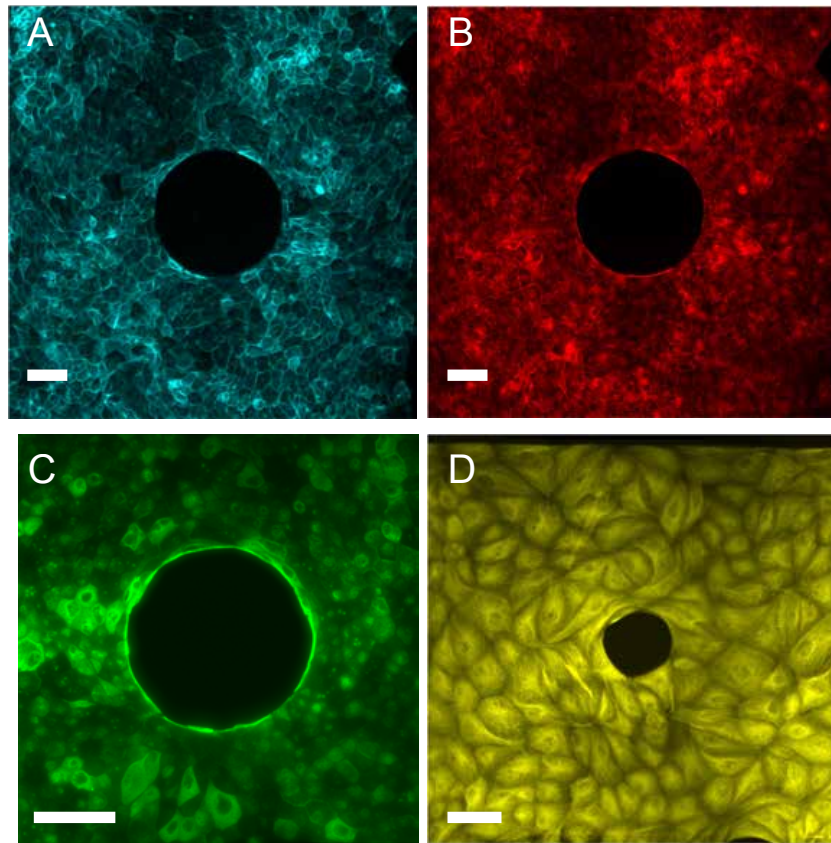


FIGURE V.12 – Comparaison de marqueurs. (A) Kératine. (B) Actine. (C) Vimentine. (D) Microtubules. Images sur tissu fixé. (A,B) sont issus de la même expérience sur des cellules MDCK II Kératine 18 marquées pour le suivi en imagerie *in vivo*; l'actine est marquée en phalloïdine; (C) marquage de la vimentine; (D) marquage des microtubules.

3 Cinématique, densité cellulaire et protéique

De façon similaire au cas des bandes, les corrélations entre les différents ingrédients sont tracées. Les résultats sont issus de la moyenne des marqueurs, vitesses, formes ou densité sur des boîtes de 200×200 pixels ($130 \mu\text{m}$) avec un recouvrement de 75%. Pour les niveaux protéiques, les quantités tracées en ordonnée sont l'intensité normalisée entre 0 et 1 sur l'intervalle entre le minimum et le maximum défini par la médiane des 1% des pixels les plus intenses. Nous étudions ensuite les variations par rapport à la médiane (Eq. (III.1)). Cela permet d'étudier les corrélations des fluctuations.

Densité cellulaire La figure Fig.V.13 récapitule les corrélations de différents ingrédients avec la densité. Il n'y a plus de relation entre la vitesse et la densité, ce qui signifie que la première relation trouvée au chapitre III section 3 est due à l'existence d'un front libre.

Il y a une anti-corrélation linéaire entre la déformation et la densité (B), une corrélation entre l'actine et la densité (C), et il n'y a pas de corrélation entre vimentine et densité. Ce qui signifie que ici aussi, la relation trouvée au chapitre III section 3 est due à l'existence d'un front libre.

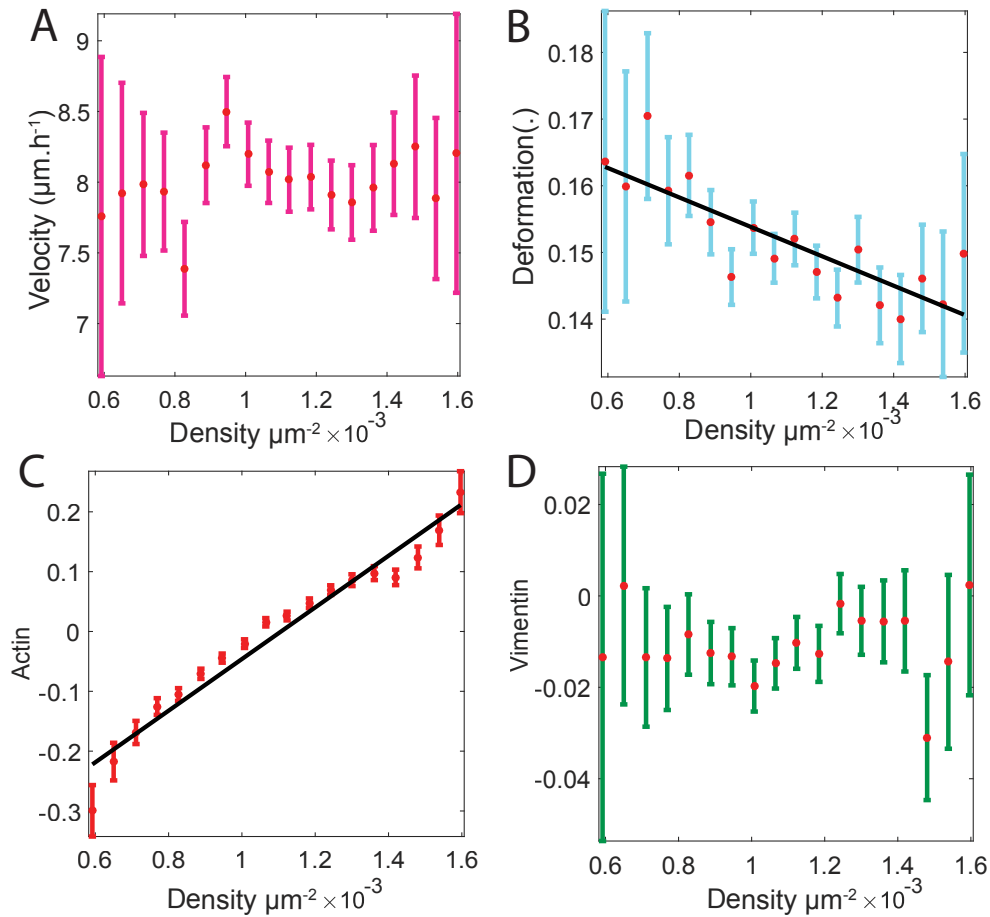


FIGURE V.13 – Corrélations avec la densité des différents ingrédients. (A) Vitesse. (B) Forme, $R^2 = -0.82$. (C) Actine, $R^2 = 0.98$. (D) Vimentine. Les barres d'erreurs indiquent l'intervalle de confiance, les intensités sont normalisées (Eq. (III.1)).

Lien avec la vitesse L'actine et la déformation ne sont pas corrélées à la vitesse, la vimentine lui est anticorrélée (Fig.V.14, A, B, C).

Lien actine-vimentine La relation entre l'actine et la vimentine est non monotone et présente trois zones distinctes (Fig.V.15, A). La première, pour les faibles valeurs d'actine (-0.4 à -0.2), correspond aux grandes déformations (Fig.V.15, B) et à des valeurs de vimentine importantes, qu'on trouve aux bords. La seconde, pour les grandes valeurs d'actine (de 0.2 à 0.4), correspond aux grandes densités, et est faible en vimentine (Fig.V.15, C). Enfin, les valeurs intermédiaires d'actine (-0.2 à 0.2) correspondent aux zones où les cellules bougent (Fig.V.15, D), où l'actine et la vimentine sont corrélées. On peut soupçonner qu'il existe différents états cellulaires qui dépendent de régulations biochimiques distinctes. Au chapitre III, une relation avec des tendances similaires mais bien plus bruitée avait été trouvée. La géométrie en hippodrome permet de l'extraire en s'affranchissant de la variable cachée liée au front libre.

Résumé Des flots corrélés à grande échelle ($4000 \mu\text{m}$) ont été générés sur des hippodromes de bras de largeur variable (750 - $1000 \mu\text{m}$). Les résultats ne montrent pas de dépendance de la longueur de cohérence avec les caractéristiques géométriques du système. La relation vitesse-densité et la relation vimentine-densité ne sont pas re-

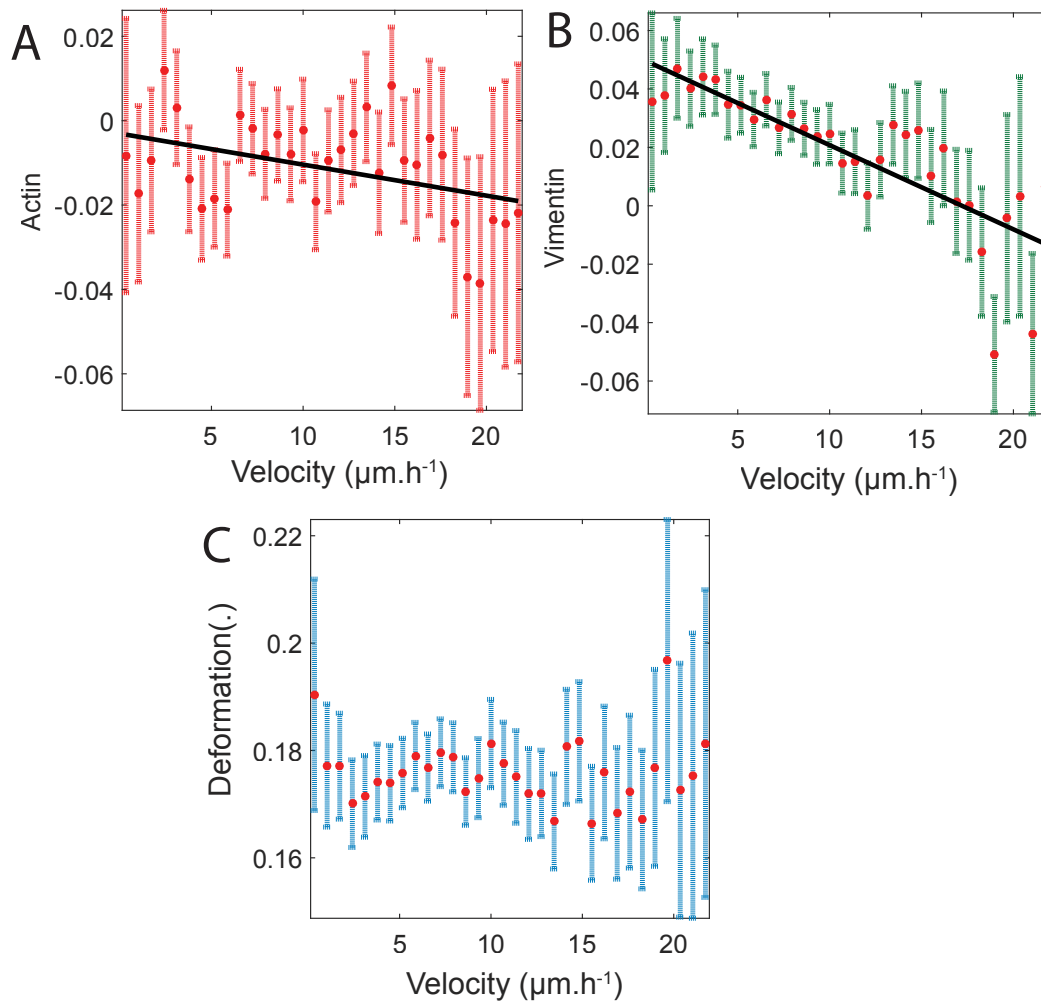


FIGURE V.14 – Corrélations des marqueurs avec la vitesse. (A) Actine. (B) Vimentine, $R^2 = -0.81$. (C) Déformation.

trouvées, ce qui montre que ces relations étaient dues au front libre. En revanche, la relation actine-densité est conservée. La vimentine est retrouvée aux bords, et il existe une asymétrie entre les bords intérieur et extérieur. Cela implique que la courbure à grande échelle a une influence. Enfin, la géométrie de l'hippodrome permet de mettre en évidence une relation actine-vimentine non monotone qui présente trois états distincts. Le premier correspond aux bords d'hippodrome, à de grandes déformations, à de faibles valeurs d'actine et à de grandes valeurs de vimentine. Le second correspond à de fortes densités cellulaires et à un enrichissement d'actine. Enfin, l'état intermédiaire correspond à des vitesses importantes; la vimentine et l'actine y sont corrélées positivement.

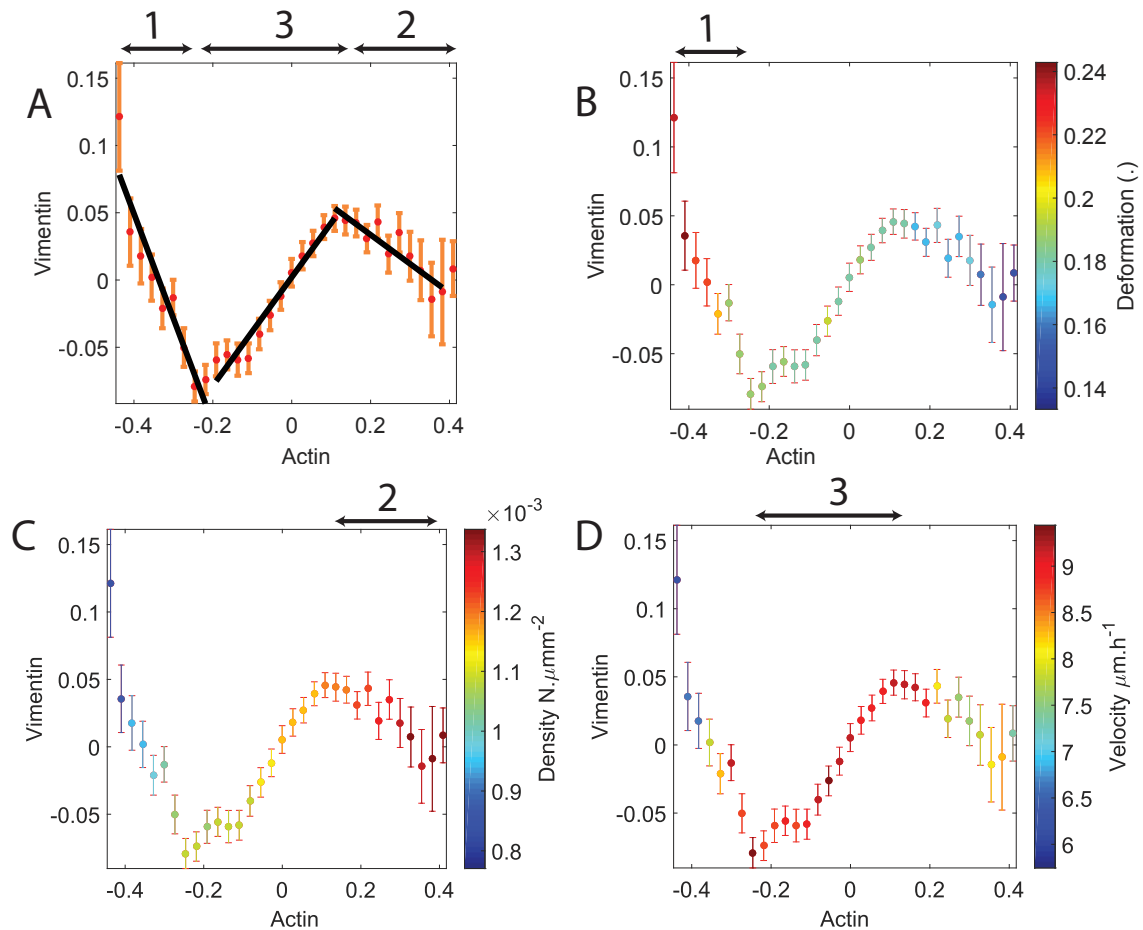


FIGURE V.15 – Relation actine-vimentine. (A) Vimentine en fonction de l’actine, trois zones sont indiquées au-dessus du graphe. (B) Même relation que (A) en code couleur pour la déformation. (B) Même relation que (A) en code couleur pour la densité. (C) Même relation que (A) en code couleur pour la vitesse. Moyenne sur 8 expériences, normalisées (Eq. (III.1)). Les barres d’erreurs représentent l’intervalle de confiance.

Chapitre VI

Migration en hippodrome sur substrat mou

Dans les chapitres précédents, nous avons étudié l'influence d'un changement de conditions aux limites. Les expériences étaient jusqu'à présent effectuées sur substrat dit dur, c'est-à-dire avec un module d'Young de l'ordre du MPa. Dans ce chapitre, nous étudions la migration cellulaire sur un substrat mou dont la valeur du module est de l'ordre 3 kPa. Ce substrat est élastique et permet d'effectuer une étude des forces associées à la migration.

1 Cinématique de la migration

Qualitativement, lorsque les cellules entrent en contact elles se mettent à migrer, de façon similaire au substrat dur. Toutefois il semble aussi que le mouvement soit plus rapide et/ou coordonné (voir film supplémentaire dans le dossier 'Hippodromes/').

1.1 Vitesse

Évolution temporelle La Fig. VI.1, A, B montre la monocouche au temps initial et au bout de 25 h. La vitesse augmente au cours du temps (Fig. VI.1, C,D); elle passe de 14 à 23 $\mu\text{m.h}^{-1}$ sur les axes 1, 2_a, 2_b (Fig. VI.1, E) et de 14 à 21 $\mu\text{m.h}^{-1}$ sur les axes 3, 4, 5 (Fig. VI.1, F), soit un facteur de l'ordre de 1.6. La valeur de la vitesse est deux fois plus élevée que dans les expériences sur substrat dur. La pente de l'évolution temporelle est de $0.4 \pm 0.1 \mu\text{m.h}^{-2}$ avec une ordonnée à l'origine de $12.8 \pm 0.6 \mu\text{m.h}^{-1}$.

Variation spatiale De la même façon que pour les hippodromes du chapitre V les variations spatiales peuvent être moyennées en temps. En effet, au cours du temps le signal semble essentiellement translaté (Fig. VI.2). Mais pour rester cohérent avec les analyses des chapitres précédents, on travaille en moyennant uniquement sur une heure après 12 h d'expérience. C'est également avant qu'un des obstacles soit recouvert (voir film supplémentaire dans le dossier 'Hippodromes/').

Le flot apparaît beaucoup plus homogène que sur substrat dur (Fig. VI.1, D), ce que l'on retrouve sur la Fig. VI.3, B, D où les courbes se superposent.

Selon les axes parallèles au flot (Fig. VI.3, A, B), les cellules vont en moyenne à une vitesse de 18 $\mu\text{m.h}^{-1}$. Selon les axes perpendiculaires au flot, la vitesse est plus élevée en moyenne sur les bords (entre 20 et 25 $\mu\text{m.h}^{-1}$) qu'au centre (environ 10 $\mu\text{m.h}^{-1}$).

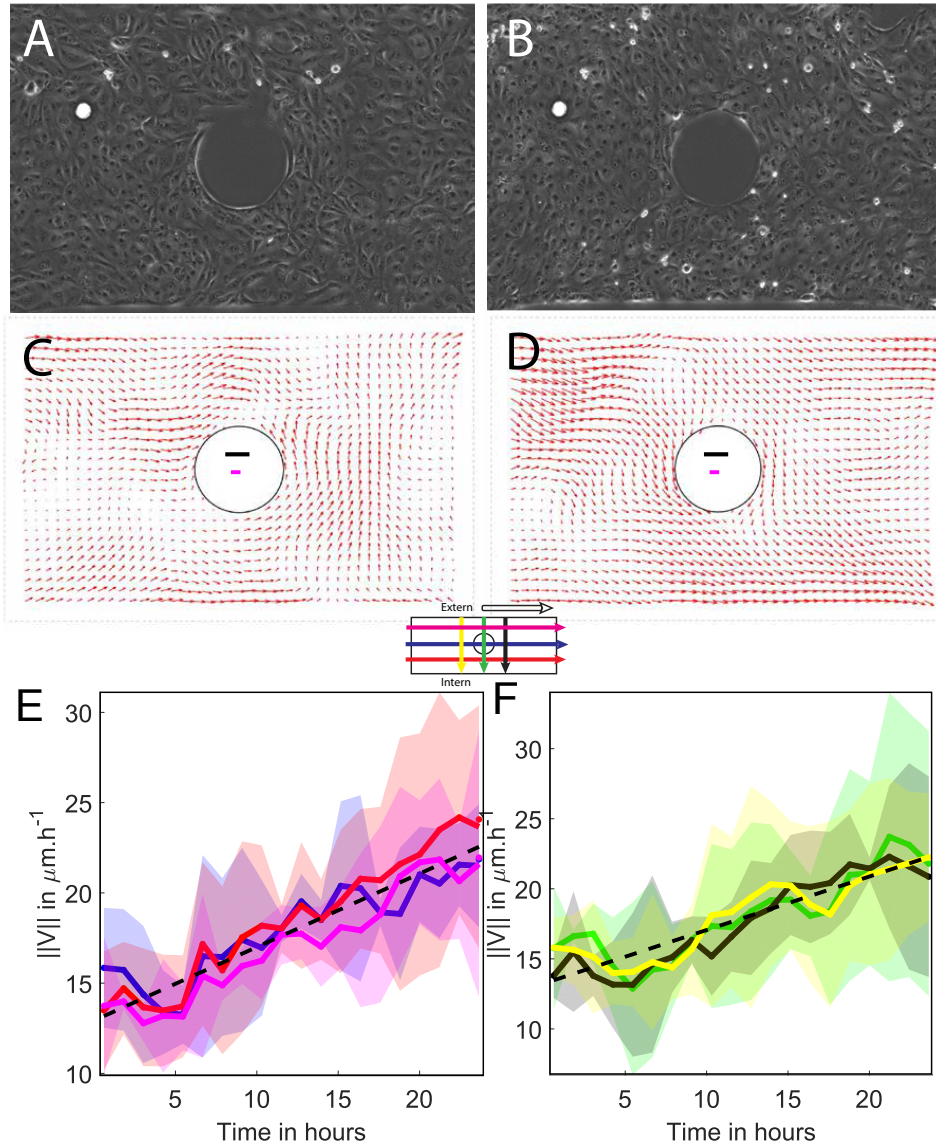


FIGURE VI.1 – Évolution temporelle de la vitesse dans le cas d'un hippodrome sur substrat mou. (A) Image représentative d'une expérience au temps initial. (B) Image représentative après 25 h d'expérience. (C, D) cartes de vitesse correspondant à (A,B). (E) Norme de la vitesse en fonction du temps pour les axes 1 (bleu), 2_a (rouge), 2_b (magenta). (F) Norme de la vitesse en fonction du temps pour les axes 3 (vert), 4 (noir), 5 (jaune). Pour E et F, les contours sont l'intervalle de confiance sur deux expériences. Les lignes pointillées représentent des ajustements linéaires, de pente moyenne $0.4 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-2}$.

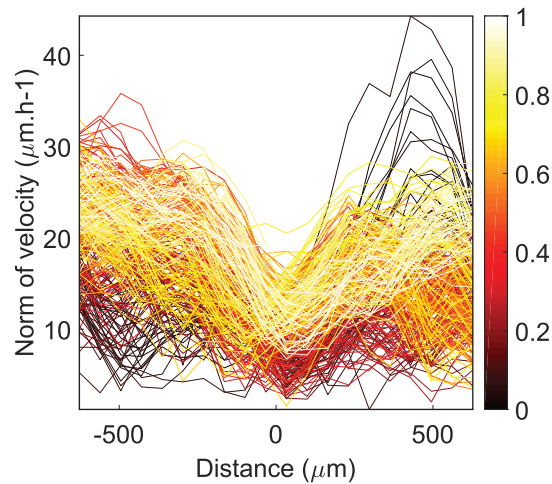


FIGURE VI.2 – Norme de la vitesse en fonction de la position le long de l'axe 2_b . Le code couleur indique différents temps entre 0 et 25 h.

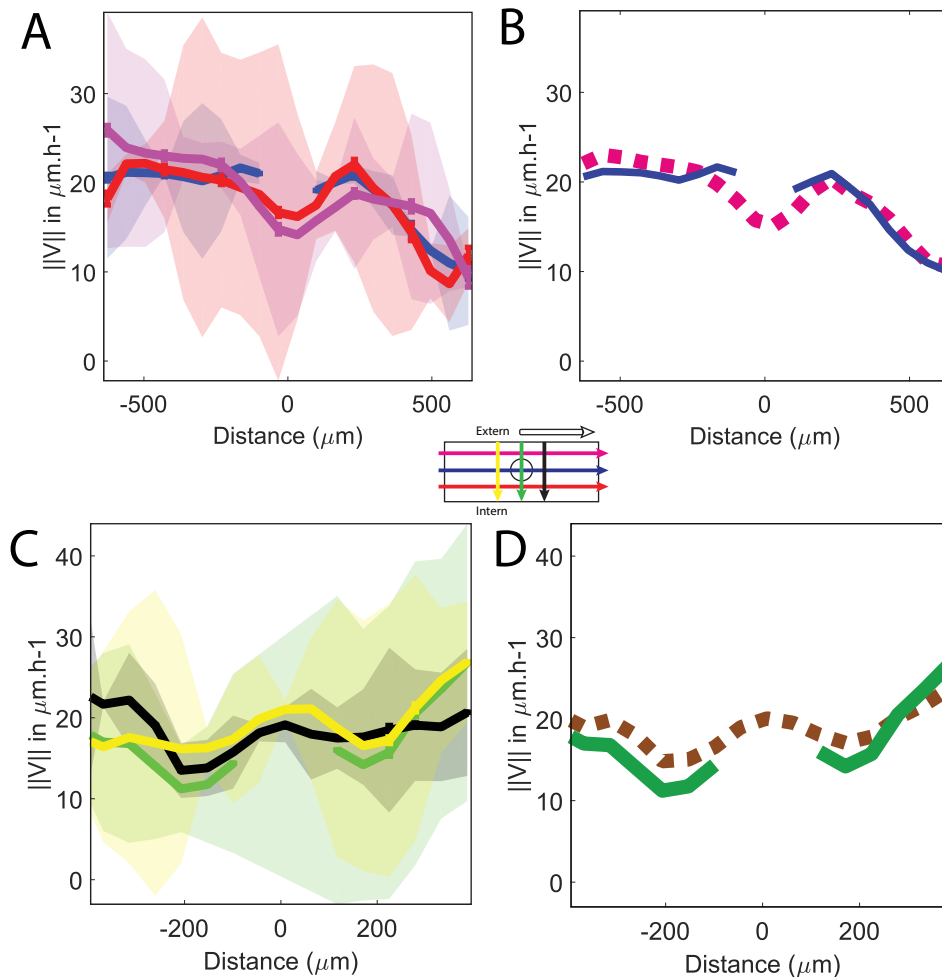


FIGURE VI.3 – Variation de la vitesse en fonction de la position dans un hippodrome sur substrat mou. (A) Vitesse en fonction de la position pour les axes 1 (bleu), 2_a (rouge), 2_b (magenta). (B) Représentation simplifiée de (A). (C) Norme de la vitesse en fonction de la position pour les axes 3 (vert), 4 (noir), 5 (jaune). (D) Représentation simplifiée de (C). Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance associé à la moyenne temporelle. Les résultats sont issus de la moyenne d'une heure, au bout de 12 h, pour 2 expériences.

1.2 Déformation

La déformation (Fig. VI.4) ne montre pas d'évolution au cours du temps sur les axes parallèles à l'écoulement (Fig. VI.5, E). En revanche, elle diminue sur les axes perpendiculaires à l'écoulement, où elle passe en moyenne de 0.2 à 0.15 (Fig. VI.5, F). C'est une caractéristique que nous n'avons observée ni dans le cas des bandes, ni dans le cas des hippodromes sur substrat dur. La déformation est faible partout en moyenne (Fig. VI.5) : autour de 0.1 sur les axes parallèles et autour de 0.2 sur les axes perpendiculaires.

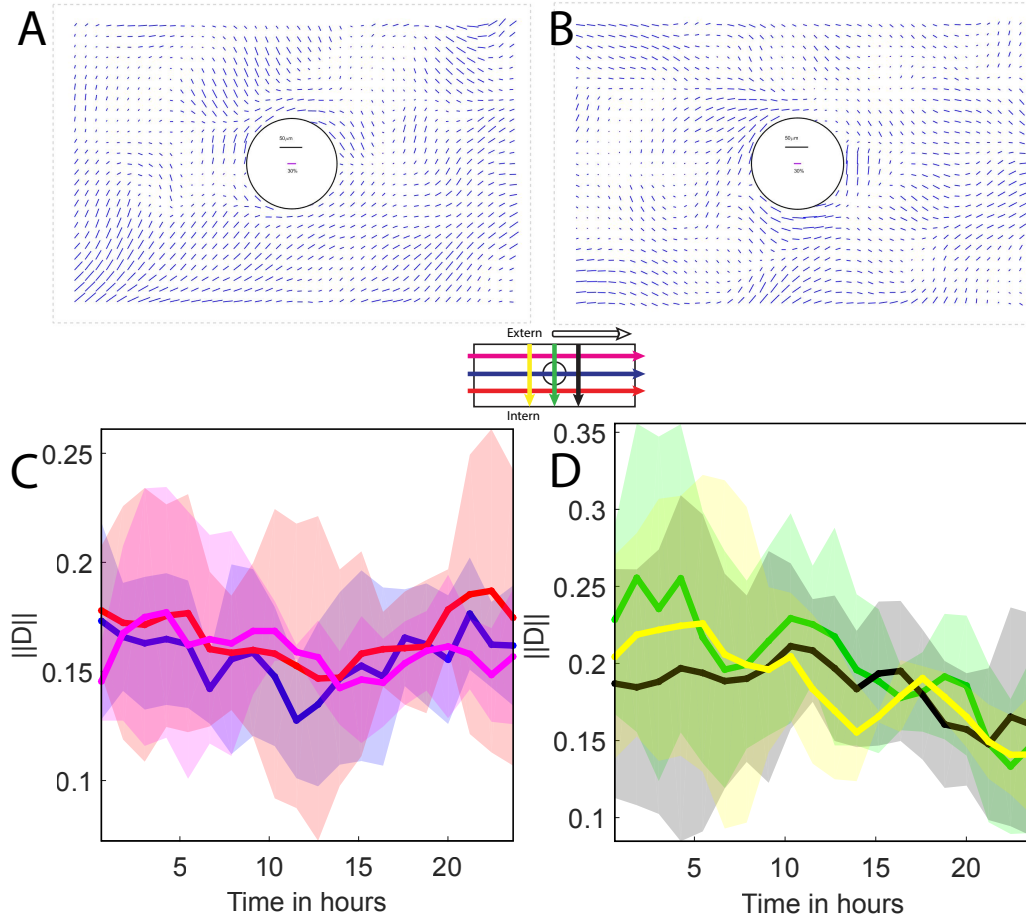


FIGURE VI.4 – Évolution temporelle de la déformation dans le cas des hippodromes sur substrat mou. (A) Carte représentative de la déformation au temps initial d'une expérience. (B) Carte représentative de la déformation au temps final d'une expérience. (C) Norme de la déformation en fonction du temps pour les axes 1 (bleu), 2_a (rouge), 2_b (magenta). (D) Norme de la déformation en fonction du temps pour les axes 3 (vert), 4 (noir), 5 (jaune). Pour C et D, les contours sont l'intervalle de confiance sur les expériences.

Résumé Ainsi, dans le cas des hippodromes sur substrat mou un flot a également pu être généré et celui-ci présente des caractéristiques distinctes du flot obtenu dans l'hippodrome sur substrat dur. On retiendra principalement les grandes vitesses trouvées. Nous reviendrons sur les différences entre hippodromes sur substrat dur et hippodromes sur substrat mou dans la partie discussion.

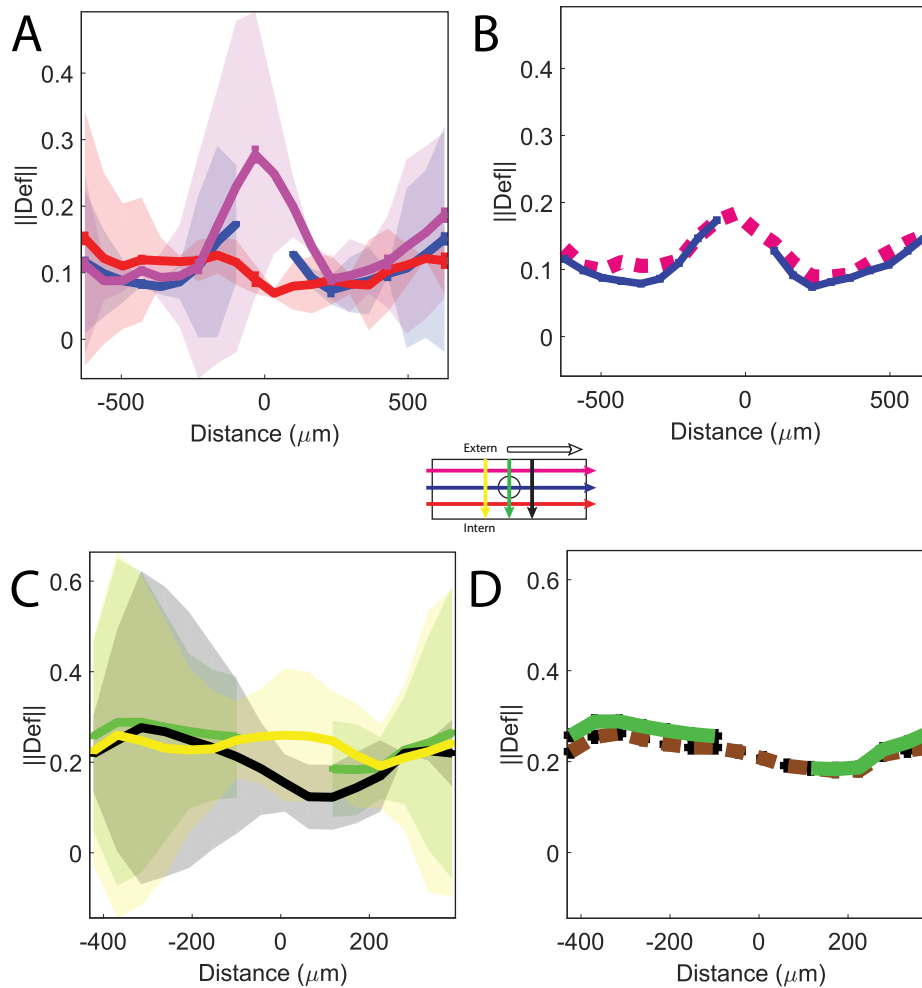


FIGURE VI.5 – Variation de la déformation en fonction de la position dans un hippodrome sur substrat mou. (A) Vitesse en fonction de la position pour les axes 1 (bleu), 2_a (rouge), 2_b (magenta). (B) Représentation simplifiée de (A). (C) Norme de la déformation en fonction de la position pour les axes 3 (vert), 4 (noir), 5 (jaune). (D) Représentation simplifiée de (C). Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance associé à la moyenne temporelle. Les résultats sont issus de la moyenne d'une heure en fin d'expérience pour 2 expériences.

2 Forces

Cette section étudie les forces exercées par les cellules sur le substrat dans l'hippodrome. On regarde dans un premier temps l'allure des forces seules, puis les liens avec la vitesse.

2.1 Hippodrome entier

Pour faciliter les comparaisons entre expériences et avec la littérature, la force est mesurée par unité de surface, et donc exprimée en Pascals. La norme de la force varie entre 0 et 60 Pa environ (Fig. VI.6). Elle augmente significativement du centre vers l'extérieur du motif. La direction de la force est orientée vers l'intérieur du motif. Elle est non nulle sous l'obstacle car la régularisation a lissé le champ de force. La moyenne de la norme des forces sur toute une boîte canonique (chap. II sec. 2.1) est représentée (Fig. VI.7). Les forces sont bien localisées aux bords du motif et décroissent en une

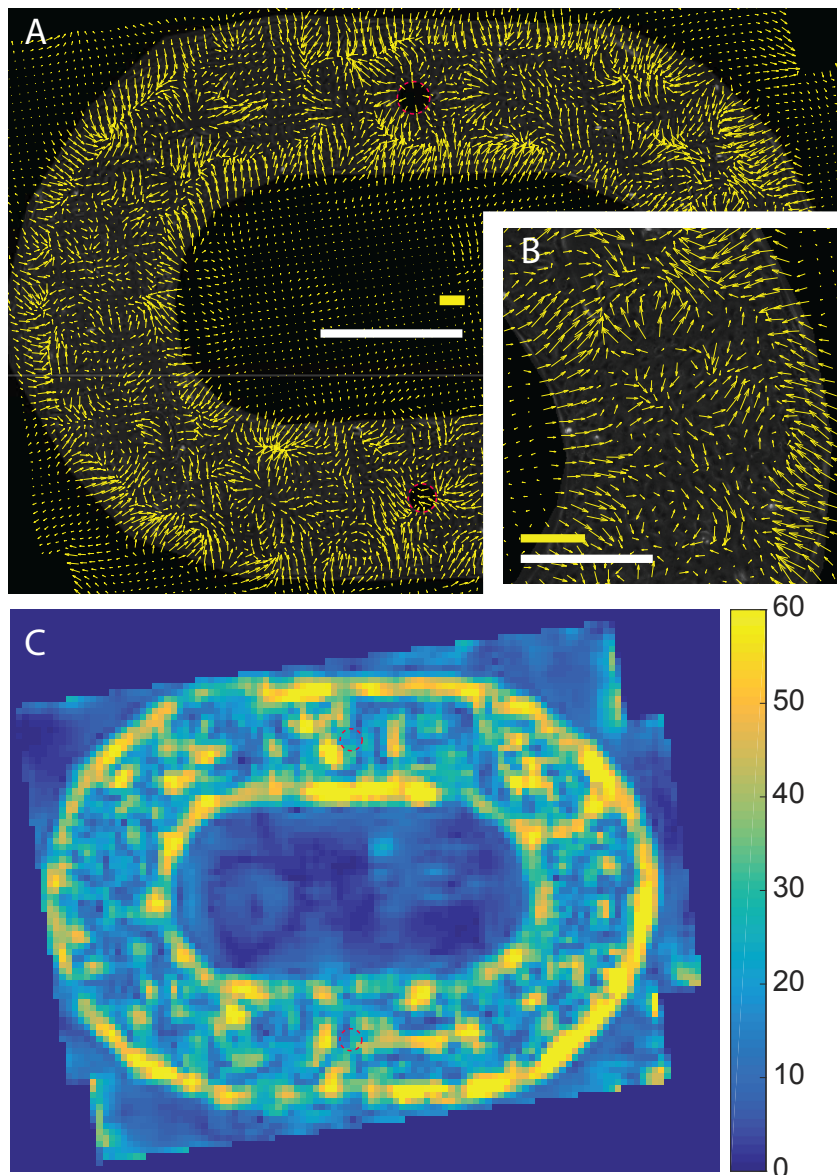


FIGURE VI.6 – Forces par unité de surface exercées par les cellules sur le substrat, dans un hippodrome mou. (A) Mesure sur un hippodrome complet des vecteurs forces moyennés sur des boîtes de 200 pixels. L'échelle blanche représente 750 μm , l'échelle jaune représente 30 Pa. (B) Zoom sur une région de l'hippodrome. L'échelle blanche représente 325 μm , l'échelle jaune représente 30 Pa. (C) Représentation du module de la force en code couleur, de 0 à 60 Pa. Hippodrome de 750 μm de large, avec des obstacles de 100 μm environ. Les données sont moyennées temporellement sur plus de 13 heures. En A, C les ronds rouges indiquent l'emplacement de l'obstacle.

centaine de μm jusqu'à une valeur plateau de 28 Pa environ.

2.2 Autour de l'obstacle

La distribution spatiale des forces radiales autour de l'obstacle (Fig. VI.8, A) montre une couronne autour de l'obstacle, ce qui indique que les forces sont orientées de l'obstacle vers la monocouche. La force devrait être nulle au niveau de l'obstacle, car il n'y a pas de cellules. Or la mesure indique une force non nulle. Cela permet d'évaluer

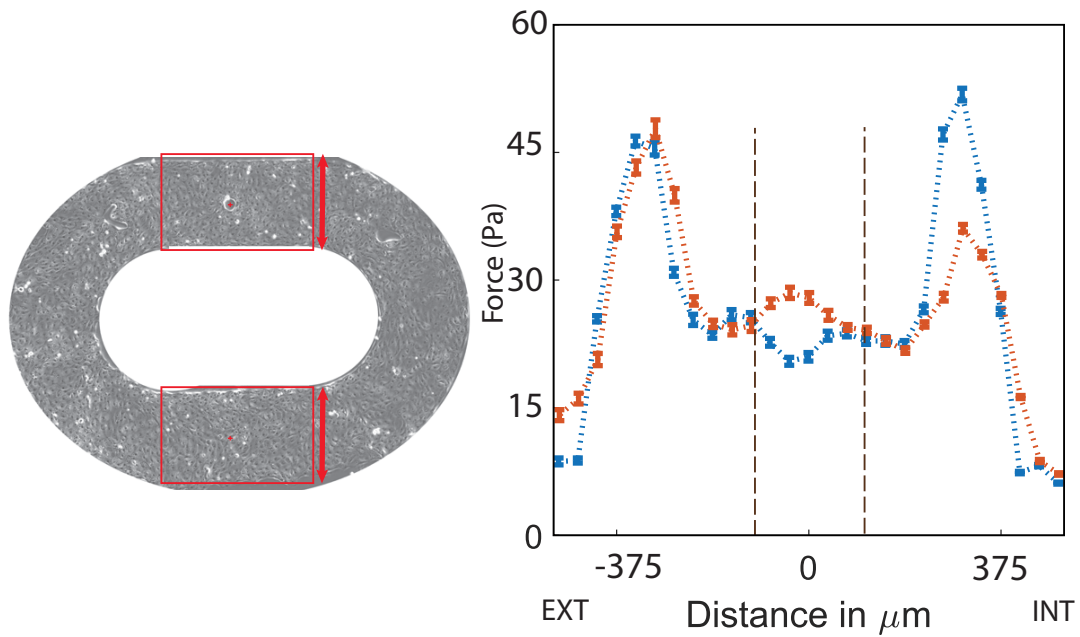


FIGURE VI.7 – Moyenne spatiale de la force. Chaque courbe correspond la moyenne dans la direction parallèle à un bras de l’hippodrome, de $750 \mu\text{m}$ de large et d’obstacle de diamètre $225 \mu\text{m}$, et tracée dans la direction perpendiculaire au bras, en fonction de la distance au centre de chaque obstacle. La force est moyennée sur toute une boîte canonique (cadre rectangulaire rouge), sur 150 images (13 heures). Les barres d’erreurs représentent l’erreur sur la moyenne temporelle. EXT signifie que la courbe est à l’extérieur de l’hippodrome, INT qu’elle est à l’intérieur. Les barres pointillées indiquent la taille de l’obstacle en début d’expérience. La courbe orange est associée à un obstacle englouti par les cellules aux temps longs en bas de l’image de gauche.

l’erreur due à l’inversion de la matrice d’élasticité.

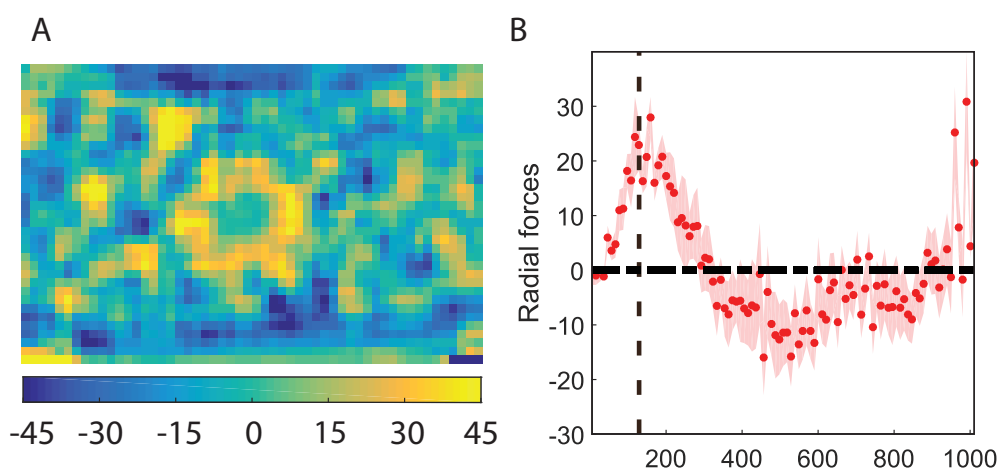


FIGURE VI.8 – Force radiale. (A) Carte de la force radiale depuis le centre d’un obstacle. L’unité du code couleur est le Pa. (B) Force radiale en fonction de la distance au centre de l’obstacle, sans moyenne sur le temps ni sur des expériences. La ligne noire représente la position du bord externe de l’obstacle ($200 \mu\text{m}$). Les barres d’erreurs représentent l’écart type sur l’anneau.

2.3 Corrélation force-vitesse

Comme indiqué en introduction 2.1, une relation très recherchée dans la littérature est celle entre la force et la vitesse. Elle est au centre de cette section.

On définit le déplacement des billes dans la monocouche (noté \vec{D}) par rapport à leur position de référence définie au temps sans cellule (après trypsine) à l'instant t . On appelle \vec{d} le déplacement cellulaire par rapport à l'origine des temps $t = 0$. La vitesse instantanée est donnée par $\vec{v} = \frac{d\vec{d}}{dt}$ mais n'est pas accessible expérimentalement. En revanche, nous avons accès à $\Delta\vec{d}$ qui est l'intégrale sur le pas de temps expérimental de la vitesse instantanée. Δ représente la différence d'une quantité entre deux images consécutives, qui sont séparées d'un temps τ :

$$\Delta\vec{d}(t) = \int_{t-\tau}^t \vec{v}(t') dt' \quad (\text{VI.1})$$

Approche Eulérienne Cette approche est la plus couramment utilisée dans la littérature. On se place sur une grille fixe par rapport au référentiel du laboratoire et on fait le produit scalaire entre le champ $\delta\Delta\vec{d}$ à l'instant $t + dt$ et $\delta\vec{D}$ où δ à l'instant t signifie que l'on a soustrait la valeur moyenne. Le résultat est visible en Fig. VI.9. Sur celle-ci, on observe des oscillations en fonction du temps dt dont les bosses et les creux correspondent respectivement à des corrélations et anticorrélations entre forces et vitesses. Le déphasage entre la force et la vitesse, peu sensible à la durée DT de la moyenne temporelle de la vitesse, est de 90 min environ. Certains auteurs ont voulu voir dans l'existence de pics une relation force-vitesse causale ([87]). Mais ce type de courbe est en fait très difficile à interpréter, puisqu'elles mêlent corrélations spatiales et temporelles : au temps $t + dt$ les cellules ne sont plus au même endroit qu'au temps t .

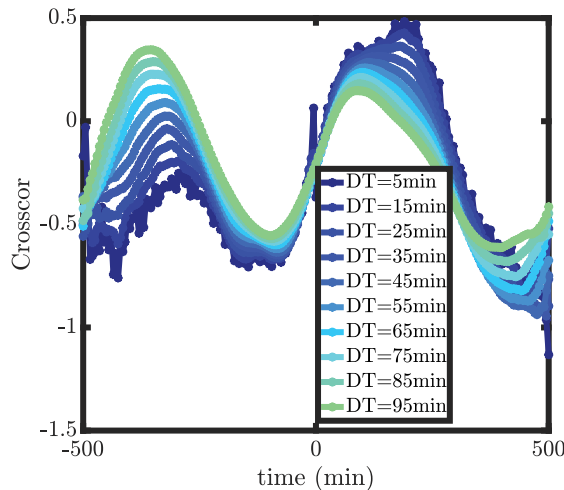


FIGURE VI.9 – Produit scalaire entre les déplacements des billes et des cellules. Corrélation croisée de la vitesse avec la force en fonction du décalage temporel dt entre la mesure de force (instant t) et celle de vitesse (instant $t + dt$). Le code couleur indique la durée DT de la moyenne temporelle utilisée pour la vitesse.

Approche Lagrangienne Pour pouvoir mieux interpréter les résultats, on fait du suivi de cellule et on examine la relation force-vitesse sous une même cellule.

Espace direct On trace la composante en x de $\Delta\vec{D}$ en fonction de la composante en x de $\Delta\vec{d}$ et cette fois les quantités D et d sont liées aux cellules. On obtient la Fig. VI.10, A (la figure sur l'axe y n'est pas montrée ici mais est similaire). Elle montre :

1. Une corrélation très forte entre ces deux quantités.
2. Une pente de 0.6.
3. Des déviations à la linéarité aux extrémités du graphique.

Cette figure montre une corrélation des déplacements au niveau de l'interface cellule-substrat : le déplacement des cellules est proportionnel au déplacement des billes sauf aux extrémités du graphique. Cela n'est pas surprenant car cela témoigne d'un phénomène de saturation/d'élongation maximale : si les cellules se déplacent trop, le substrat ne peut plus suivre le déplacement.

Pour autant, la pente attendue est de 1 en cas de continuité du déplacement. Or celle qui est trouvée ici est de 0.6. Pour donner une explication possible à cela, on regarde comment une relation exacte $Y = X$ se comporte en présence de bruit après moyennage. À cette relation, on ajoute à X un bruit de même largeur que la distribution des déplacements des billes et à Y un bruit de même largeur que la distribution des déplacements des cellules (3 fois plus grand que le premier). On obtient le tracé de la figure (Fig. VI.10, B) qui indique une pente de 0.6, semblable à la précédente où la pente vaut 0.6.

Ainsi, les variations de déplacement cellulaire et les variations de déformation du substrat se suivent, et une explication possible pour la valeur de la pente de la courbe est celle du bruit expérimental.

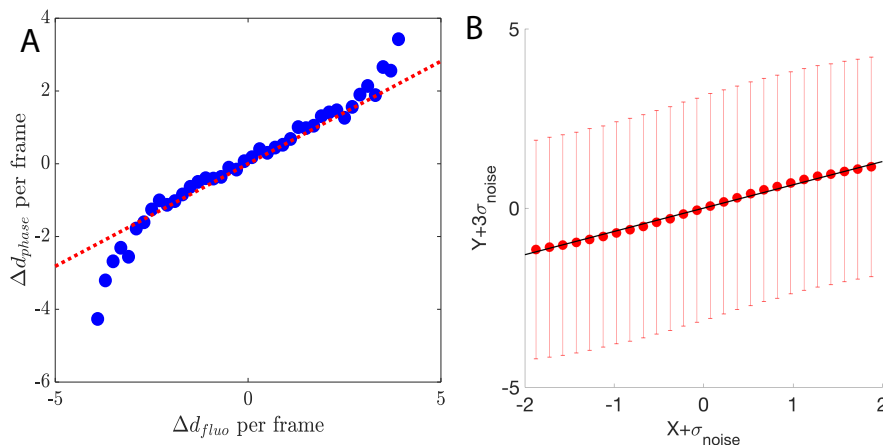


FIGURE VI.10 – Déplacement des cellules et déplacement des billes. (A) Déplacement sur l'axe x des cellules (mesuré sur les images de phase) en fonction du déplacement du substrat (mesuré sur les images de fluorescence). En rouge : ajustement linéaire, pente de 0.6. (B) En rouge, droite d'équation $Y = X$ à laquelle s'ajoute un bruit de σ_{noise} en abscisse et $3\sigma_{noise}$ en ordonnée, correspondant aux bruits expérimentaux sur la phase et la fluorescence. En noir, ajustement linéaire, pente de 0.6.

Espace réciproque Pour essayer de mieux comprendre ces observations on passe dans l'espace de Fourier temporel et on compare la transformée de Fourier temporelle de $\Delta\vec{D}$ et de $\Delta\vec{d}$, en moyennant sur toutes les cellules. On les note $\Delta\vec{D}(\omega)$ et $\Delta\vec{d}(\omega)$. Le rapport $\frac{|\Delta\vec{D}(\omega)|}{|\Delta\vec{d}(\omega)|}$ est constant et vaut 1 pour tout ω (voir Fig.VI.11). L'argument du rapport (Fig.VI.11, B) ($\arg(\Delta\vec{D}(\omega)) - \arg(\Delta\vec{d}(\omega))$) vaut 0 pour tout ω . Ainsi, $\Delta\vec{D}$ et $\Delta\vec{d}$ sont égaux. Cette méthode d'analyse permet de s'affranchir du bruit important sur la variable X qui, comme indiqué au paragraphe précédent, limite intrinsèquement le résultat que l'on peut trouver en comparant les quantités directement. Ici, chaque variable est tracée en fonction de la fréquence qui n'est pas une variable bruitée, et cela permet de conclure que la variation du déplacement au niveau des cellules est la même que la variation du déplacement au niveau des billes.

On vient donc de montrer expérimentalement l'égalité suivante :

$$\Delta\vec{D} = \Delta\vec{d} \quad (\text{VI.2})$$

On suppose que dans la suite on peut approximativement remplacer $\Delta\vec{D}$ par $d\vec{D}$, et $\Delta\vec{d}$ par $dd\vec{d}$.

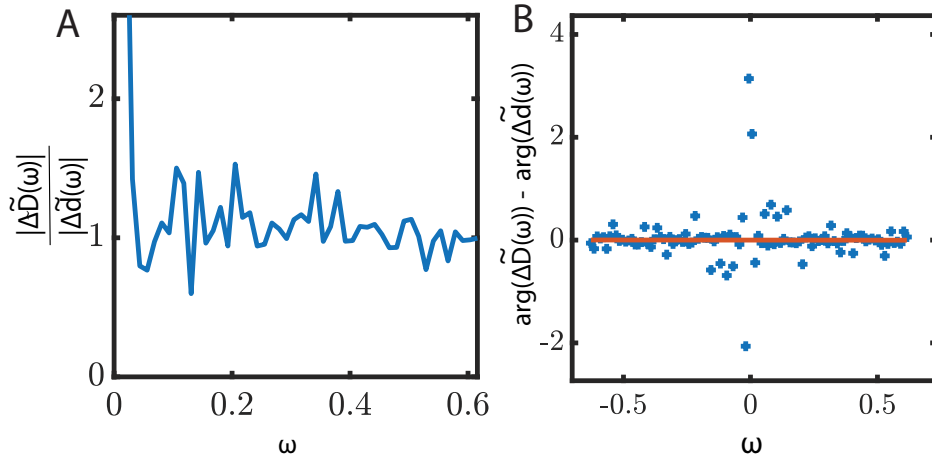


FIGURE VI.11 – Comparaison des spectres $\Delta\vec{d}(\omega)$ et $\Delta\vec{D}(\omega)$ sur l'axe x . Des figures similaires sont obtenues sur l'axe y . (A) Rapport des normes. (B) Différence des phases.

L'équation VI.1 permet de remonter au lien entre le déplacement du substrat et la vitesse mesurée car

$$\Delta\vec{d}(t) = \int_{t-\tau}^t \vec{v} dt' = \int_{t-\tau}^t \frac{d\vec{d}}{dt'} dt' = \int_{t-\tau}^t \frac{d\vec{D}}{dt'} dt' \quad (\text{VI.3})$$

On passe ensuite en transformée de Fourier :

$$\begin{aligned} D_x(t) &= \int_{\omega=-\infty}^{\omega=\infty} \vec{D}_x(\omega) e^{-i\omega t} d\omega \\ \Delta d_x(t) &= \int_{\omega=-\infty}^{\omega=\infty} \Delta\vec{d}_x(\omega) e^{-i\omega t} d\omega \end{aligned} \quad (\text{VI.4})$$

Et on a la même chose pour D_y et v_y . Cela implique que

$$\frac{dD_x(t')}{dt'} = \int_{\omega=-\infty}^{\omega=\infty} -i\omega \vec{D}_x(\omega) e^{-i\omega t'} d\omega \quad (\text{VI.5})$$

On a encore une fois la même chose pour d_y .

On remplace dans VI.3, on intervertit les intégrales, et pour la composante x du déplacement il vient :

$$\Delta \tilde{d}_x(\omega) e^{-i\omega t} = -i\omega \tilde{D}_x(\omega) \left(\int_{t-\tau}^t e^{-i\omega t'} dt' \right) \quad (\text{VI.6})$$

$$\int_{t-\tau}^t e^{-i\omega t'} dt' = \frac{2e^{-i\omega(t-\frac{\tau}{2})}}{\omega} \sin\left(\frac{\omega\tau}{2}\right) \quad (\text{VI.7})$$

on en déduit

$$\Delta \tilde{d}_x(\omega) = 2ie^{i\frac{\omega\tau}{2}} \sin\left(\frac{\omega\tau}{2}\right) \tilde{D}_x(\omega) \quad (\text{VI.8})$$

$$\frac{\Delta \tilde{d}_x(\omega)}{\tilde{D}_x(\omega)} = 2ie^{i\frac{\omega\tau}{2}} \sin\left(\frac{\omega\tau}{2}\right) \quad (\text{VI.9})$$

Sous cette forme, il est immédiat que le déphasage ϕ temporel entre la force et la vitesse suit une droite :

$$\phi = \frac{\omega\tau}{2} + \frac{\pi}{2} \quad (\text{VI.10})$$

Le rapport des normes est ensuite défini par :

$$\|H(\omega)\| = 2 \sin\left(\frac{\omega\tau}{2}\right) \quad (\text{VI.11})$$

Expérimentalement, nous avons tout pour vérifier la cohérence ces calculs. Les résultats pour la norme et la phase de $H(\omega)$ sont présentés en Fig.VI.12. Sur la courbe de la norme, un modèle en $2 \sin\left(\frac{\omega\tau}{2}\right)$ est ajusté et donne $\tau = 6$ min. Sur la courbe de la phase, un modèle linéaire est ajusté et donne $\tau = 4.94$ min. Cela est cohérent avec l'intervalle entre images qui est de 5 min.

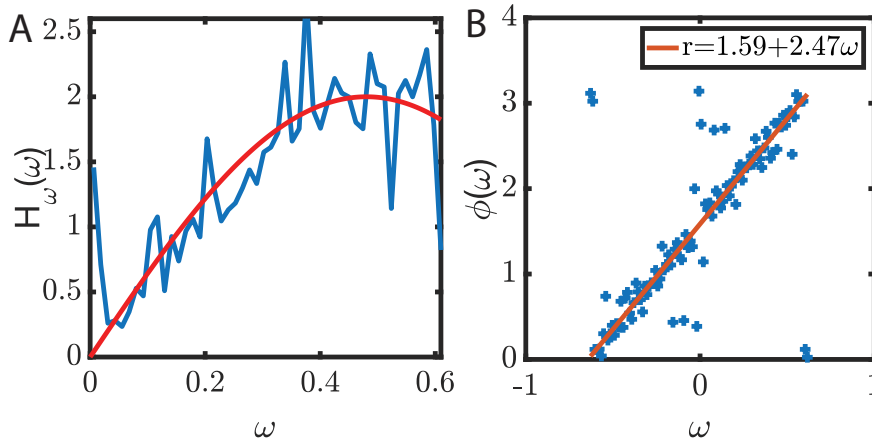


FIGURE VI.12 – Caractérisation de la partie temporelle de la fonction de transfert entre $\Delta \tilde{d}$ et D . (A) La norme est ajustée par $2 \sin\left(\frac{\omega\tau}{2}\right)$. (B) La phase suit une droite $\omega\frac{\tau}{2} + b$ avec $\tau/2 = 2.47$ min et $b = \frac{\pi}{2}$.

Ainsi, on vient de montrer que la vitesse expérimentale et le déplacement au niveau du substrat (qui est à peu de choses près la force) sont corrélés, avec une fonction de transfert bien caractérisée.

2.4 Résumé et Discussion

Un flot autour d'un obstacle a pu être généré spontanément sur des hippodromes de rigidité 3 kPa. Les vitesses mesurées sont 1.5 fois plus grandes sur le substrat mou que sur le substrat dur (chapitre V, section.1). À notre connaissance, il n'y a pas d'étude qui montre une telle différence. Ce résultat peut paraître surprenant si on a en tête l'étude de Sunyer *et al.* [133]. Mais dans leur cas il y a un front libre, et c'est une étude de durotaxie, c'est-à-dire que les cellules préfèrent aller vers un substrat dur.

Les forces exercées par les cellules sur le substrat sont plus élevées aux frontières, perpendiculaires à celles-ci et orientées vers la monocouche. On a pu montrer la continuité du déplacement au niveau de l'interface cellule-substrat. On a ensuite pu établir une relation dans l'espace de Fourier entre le déplacement du substrat et la vitesse des cellules.

Chapitre VII

Comparaison des différentes expériences

Les chapitres III,V,VI ont montré que trois systèmes expérimentaux différents (bandes sur substrat dur, hippodromes sur substrat dur, hippodromes sur substrat mou) permettent de générer un flot de longue portée autour d'un obstacle. Les discussions propres à chaque section ayant été réalisées précédemment, cette partie se concentre sur la comparaison et le rassemblement des résultats obtenus.

1 Comparaison cinématique

Les profils de vitesse et de déformation autour de l'obstacle diffèrent d'une expérience à l'autre (Fig. VII.1) et constituent une base de données pour les modélisateurs. Ici, on cherche à rassembler et comparer les résultats cinématiques obtenus avec quelques quantités simples qui permettent de bien différencier les expériences : la moyenne de la norme de la vitesse, qui mesure l'amplitude des déplacements; l'écart type de la norme de la vitesse, qui mesure la disparité de la norme des vitesses dans le champ; et la norme de la moyenne de la vitesse, qui quantifie la dispersion angulaire des vecteurs vitesse. Jusqu'ici, nous travaillions principalement avec la moyenne de la norme de la vitesse. Les résultats utiles à ces comparaisons sont représentés en Fig. VII.2.

1.1 Hippodrome dur vs mou

La moyenne des normes des vitesses est plus élevée dans les hippodromes mous que dans les hippodromes durs (Fig. VII.2, A). Ce résultat, comme on l'a vu au chapitre VI, peut être mis en parallèle avec [128] où il existe une rigidité sur laquelle la vitesse est plus grande sur substrat mou que sur substrat dur. Cela étant dit, la géométrie est ici très différente car il n'y a pas de front comme dans [128]; nous n'avons pas trouvé d'expériences pour comparer des valeurs de vitesses dans des conditions similaires. Il est également à noter que l'écart type est plus grand sur hippodrome mou que sur hippodrome dur (Fig.VII.2,B). Il y a donc plus de fluctuations de norme sur substrat mou.

Enfin, la norme de la moyenne de la vitesse est bien plus importante sur substrat mou que sur substrat dur (Fig.VII.2,B) : la directionnalité du flot est plus importante sur substrat mou. Cela pourrait être dû à une coopérativité par l'intermédiaire du substrat [134], accrue sur substrat mou.

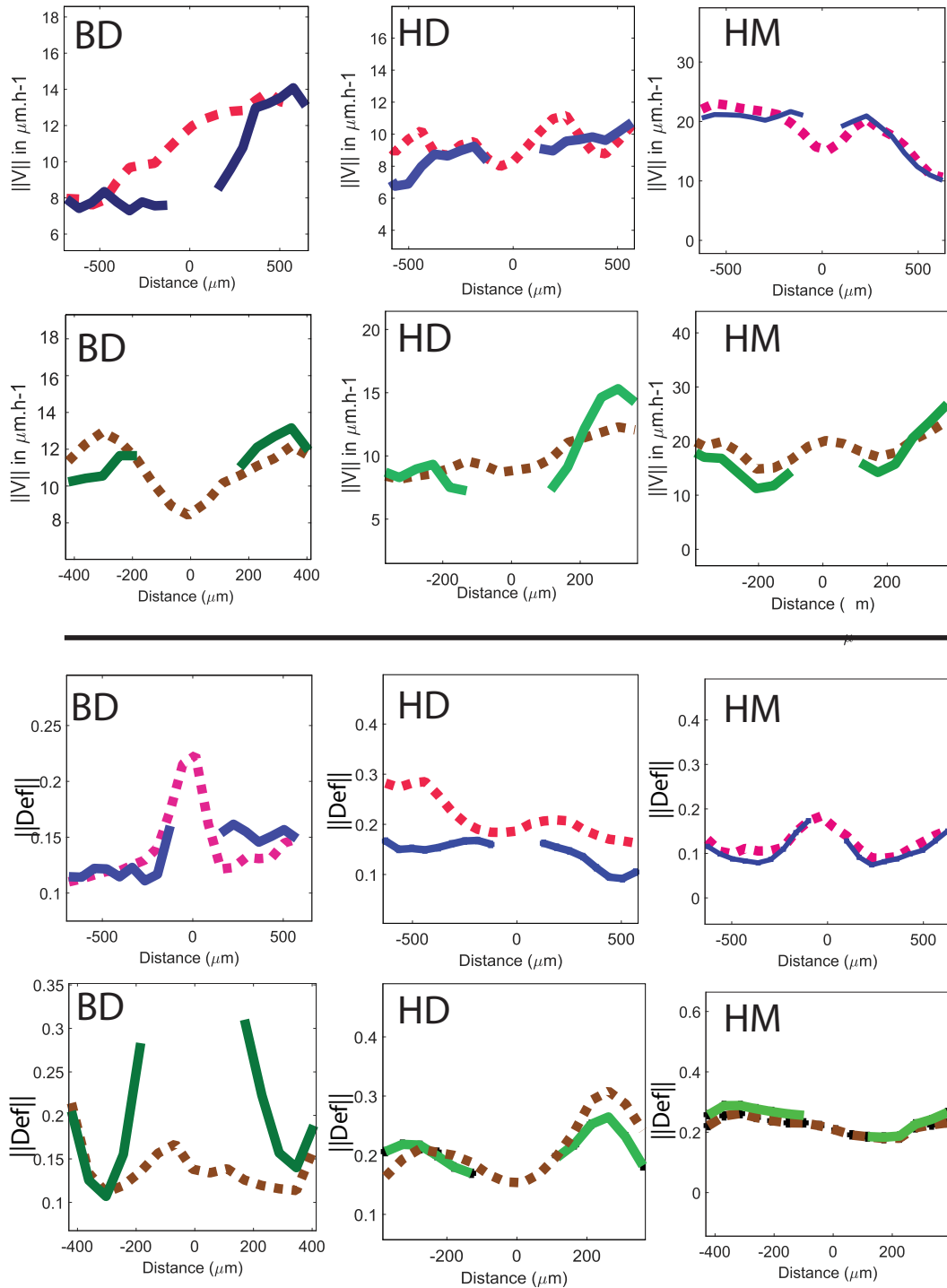


FIGURE VII.1 – Récapitulatif des courbes moyennes obtenues pour les systèmes des bandes sur substrat dur (BD, colonne de gauche), hippodromes sur substrat dur (HD, colonne du milieu) et hippodromes sur substrat mou (HM, colonne de droite). Première ligne : norme de la vitesse sur les axes 1,2 _a, 2_b. Deuxième ligne : sur les axes 3, 4, 5. Troisième ligne : Déformation sur les axes 1,2_a, 2_b. Quatrième ligne : sur les axes 3,4,5. Voir les chapitres III, V, VI pour l’obtention de ces courbes.

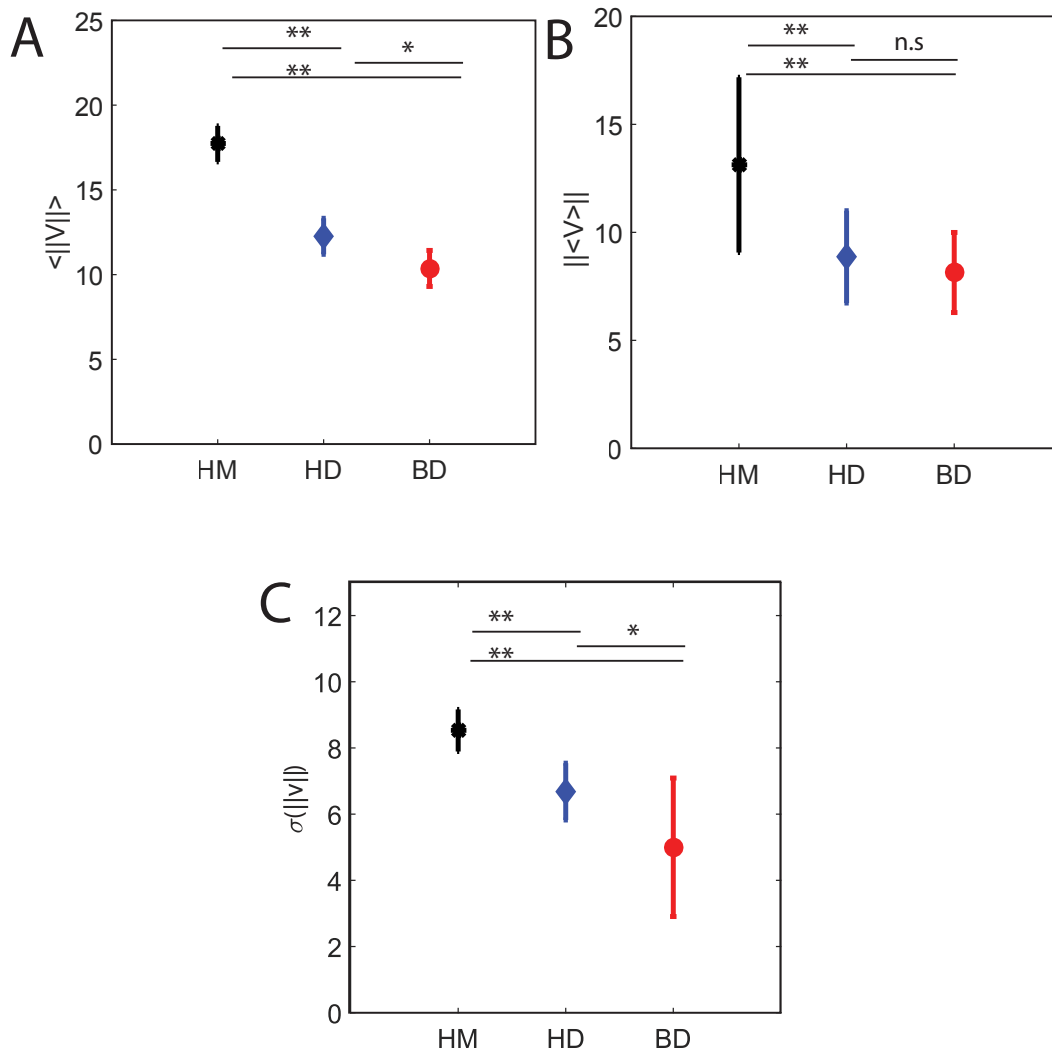


FIGURE VII.2 – Comparaison cinématique des trois types d'expériences. (A) Moyenne de la norme de la vitesse. (B) Norme de la moyenne de la vitesse. (C) Ecart type de la norme de la vitesse. En abscisse, le type d'expérience : HM, hippodrome mou, HD, hippodrome dur, BD, bande dure. Les étoiles indiquent la tranche de valeur du test de Student : ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$, n.s : non significatif.

1.2 Hippodrome dur vs bande dure

La moyenne des normes des vitesses est légèrement plus importante dans les hippodromes durs que dans les bandes dures (Fig.VII.2, A, C). Ce résultat est à prendre avec précaution, car il reste un paramètre caché lié à la densité cellulaire : celle-ci influence sur la valeur de la vitesse dans les bandes dures, et pas dans les hippodromes.

L'écart type de la norme de la vitesse est aussi proche (Fig.VII.2, B).

Enfin, la norme de la moyenne de \vec{v} qui mesure la cohérence angulaire du flot est la même dans les hippodromes durs que dans les bandes dures (Fig.VII.2, B).

Ces résultats sont surprenants : la cohérence angulaire et la cohérence en norme ne naissent pas forcément des conditions aux limites, ce qui va dans le sens de ce qui a été observé par Jain *et al.* [132].

Nous avons voulu représenter toutes nos expériences sur un même graphique pour les comparer entre elles. Nous avons choisi l'espace $\sigma(||\vec{v}||)$ et $||\langle \vec{v} \rangle||$. On définit alors un paramètre (C_{global}) qui selon nous, quantifie la coordination du flot :

$$C_{global} = \frac{\langle \vec{v} \rangle}{\sigma(\|\vec{v}\|)} \quad (\text{VII.1})$$

et on le représente comme

$$\|C_{global}\| = \frac{\|\langle \vec{v} \rangle\|}{\sigma(\|\vec{v}\|)} \quad (\text{VII.2})$$

Cette définition a l'avantage d'être simple, vectorielle, indépendante de la géométrie du système étudié, indépendante d'un quelconque marquage protéique (dont on a vu que leur dépendance avec la vitesse est non monotone et dépend des conditions aux limites), et transposable à tous les systèmes (*in vivo*, numérique, analytique).

La Fig.VII.3 présente un diagramme de phase dans l'espace défini d'une part par la norme de la moyenne des vitesses et d'autre part par l'écart type de la norme des vitesses. Les lignes droites sont différentes lignes d'iso-valeur de la directionnalité, C_{global} . Finalement, les flots les plus coordonnés sont obtenus pour les expériences en bande dure avec blebbistatine (chapitre IV, section 2). Les hippodromes mous ont un score similaire aux bandes dures, pour des origines de coordination différente : l'un par le front libre et l'autre par l'intermédiaire du substrat.

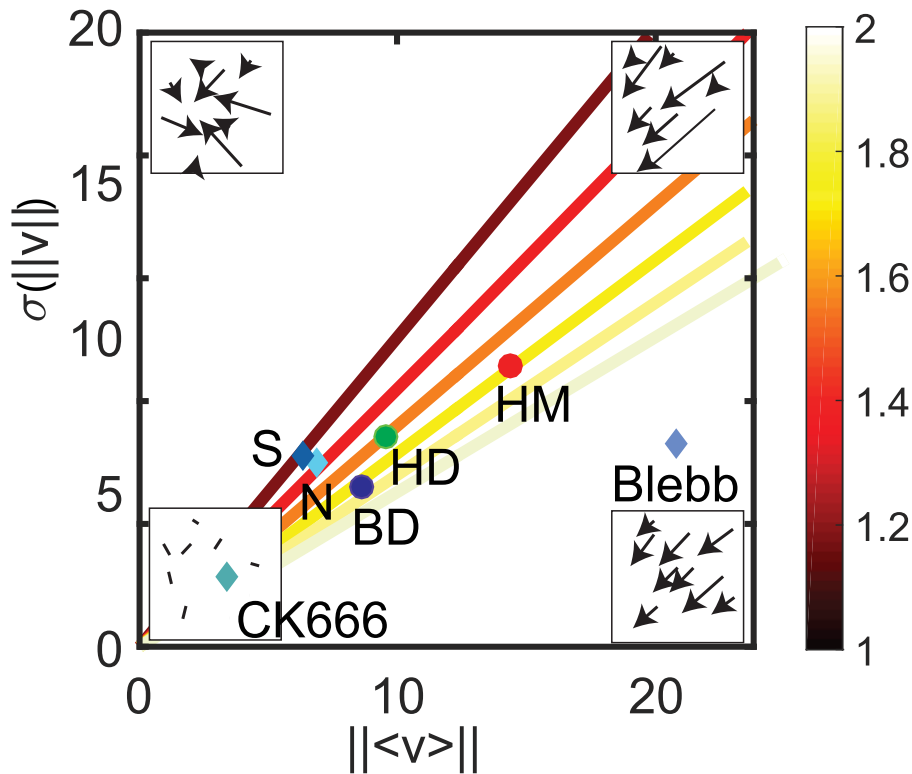


FIGURE VII.3 – Diagramme de phase des différents mouvements cellulaires observés. Les paramètres sont la norme de la moyenne de la vitesse, et son écart type. Quatre archétypes extrêmes sont représentés schématiquement. Les lignes droites sont différentes lignes d'iso-valeur de la directionnalité : l'échelle de couleur représente $\|C_{global}\|$ (Eq. (VII.2)). Les expériences sont reportées dans ce diagramme de phase. Cercles : sans drogue; HD : hippodrome dur; HM : hippodrome mou; BD : bande dure. Losanges : avec drogue; CK666 : CK666; S : simvastatine; N : nocodazole; Blebb : blebbistatine.

2 Effet du front libre

Au chapitre III diverses relations ont été mesurées sur les bandes : les relations vitesse-densité, vimentine-densité, déformation-densité, actine-densité, vimentine-vitesse (avec un effet de seuil), actine-vitesse (avec un effet de seuil), vimentine-déformation et actine-déformation. Mais étant donné l'asymétrie du système, il était difficile de distinguer les corrélations intrinsèques au tissu de celles qui dépendent de l'existence d'un front libre. Les expériences en hippodrome dur au chapitre V ont permis cette distinction.

On a ainsi montré que les relations vitesse-densité, vimentine-densité, vimentine-vitesse, actine-vitesse, vimentine-déformation et actine-déformation sont dépendantes de l'existence du front libre et sont une conséquence de la dynamique de l'étalement cellulaire. À l'inverse, les relations déformation-densité et actine-densité sont conservées et devraient faire l'objet de recherches approfondies, puisque ce sont des caractéristiques intrinsèques à la génération de mouvement.

Il est maintenant établi que la mécanique implique des modifications traductionnelles des protéines [135],[73], et Peyret *et al.* ont montré que des voies de mécano-transduction étaient présentes dans des oscillations de monocouches de MDCK. La relation actine-vimentine non monotone pourrait être interprétée comme un reflet des contraintes cellulaires : à forte densité, les cellules sont sous pression et expriment beaucoup d'actine; à forte déformation de cisaillement [117],[136] la vimentine s'exprime. Entre ces deux domaines, les cellules migrent rapidement, actine et vimentine sont corrélées.

Chapitre VIII

Conclusion

L'objectif de cette thèse était d'identifier et d'extraire les paramètres utiles à l'établissement de modèles physiques ainsi qu'à la compréhension biologique de la migration. Pour cela, nous avons choisi d'étudier la migration cellulaire autour d'un obstacle. En effet, la présence d'un obstacle dans un flot induit des hétérogénéités qui sont discriminantes pour l'établissement de modèles. Nous souhaitons ajouter aux informations de vitesses et de déformations celles des forces exercées par les cellules sur le substrat.

1 Génération de flots à grande échelle

Notre expérience initiale est celle de cellules épithéliales confinées par un bloc qui migrent sur une bande lorsque le bloc est enlevé. Pour obtenir les forces autour de l'obstacle, nous devons passer d'un substrat de rigidité de l'ordre du MPa à un substrat environ mille fois plus mou. Ce changement conceptuellement simple s'est révélé expérimentalement compliqué, car au moment d'enlever le bloc nous avons un problème d'arrachage systématique des protéines d'adhésion sous le bloc.

Pour pallier cela, nous avons changé la structure de l'expérience en passant de conditions aux limites avec un bord libre (les bandes), à une condition aux limites avec des bords périodiques (les hippodromes). Nous espérons que les cellules se mettraient spontanément à migrer dans un sens, générant ainsi un écoulement autour de l'obstacle suffisamment ordonné pour être exploitable, et ne nécessitant pas d'utiliser un bloc.

Les expériences menées sur une géométrie en hippodrome ont en effet permis d'observer une migration sur une très longue distance, autour des obstacles situés sur chaque bras de l'hippodrome. Nous avons alors extrait une longueur de cohérence du flot de l'ordre de 4000 μm . Cela a validé notre intuition en ce qui concernait la possibilité de générer un flot à grande échelle de façon spontanée en fermant les conditions aux limites, et a rendu possible l'étude des forces autour d'un obstacle.

Ainsi, à partir de deux mécanismes *a priori* très différents : le relâchement de contrainte qui impose une direction privilégiée à toutes les cellules dans les bandes, et la périodicité du motif d'adhésion, nous avons abouti à des flots orientés. Entre ces deux protocoles expérimentaux d'hippodrome sur substrat mou (chapitre VI) et de bandes sur substrat dur (chapitre III), deux conditions ont été modifiées dans le même temps, et nous avons donc décidé d'étudier également la migration dans des hippodromes sur

un substrat dur, ce qui a constitué un troisième volet d'étude (chapitre V).

En essayant de comparer ces différentes expériences, nous avons défini une notion de coordination du flot cinématique, par le rapport de la vitesse moyenne d'un ensemble sur l'écart type de la norme de cet ensemble. Cette définition a l'avantage de ne reposer que sur la vitesse, ce qui est techniquement avantageux et permet la comparaison de nombreux systèmes.

Bien que des flots aient été générés dans les trois systèmes, les variations spatiales des vitesses et des déformations autour de l'obstacle sont différentes. Le changement de conditions aux limites nous a appris que la dynamique associée aux expériences en bandes est différente de celle en hippodrome, en ce que la première est une dynamique d'étalement, tandis que la seconde est une migration dans l'état étalé, et se rapproche peut-être plus de ce qui est observé *in vivo*. Un résultat important qui découle de cette différence est que la relation densité-vitesse n'est plus valable dans les hippodromes, elle ne peut donc être moteur de la migration.

Nous avons pu obtenir des courbes maîtresses pour les bandes dures qui pourront servir de base de comparaison aux résultats des modélisateurs et numériciens dans la suite. En particulier, le volet analytique de la compréhension de l'écoulement autour d'un obstacle sera effectué par Nathan Shourick qui commencera une thèse en septembre 2020 sous la supervision de Ibrahim Cheddadi, Pierre Saramito et François Graner, et le volet numérique développé par Carine Beatrice est en passe de première publication. Il traitera premièrement d'une étude purement numérique sur les différences entre modèles numériques pour étudier la migration de monocouche. Par ailleurs la géométrie en hippodrome facilite la comparaison avec des travaux de numériciens et théoriciens avec des conditions aux limites périodiques, et les résultats trouvés au cours de cette thèse sont utiles à la compréhension et à l'établissement de modèles pertinents.

2 Influence de différents acteurs biologiques

Parmi nos objectifs principaux, il y avait aussi celui de faire plus de lien avec différents acteurs biologiques. Il s'agissait de mieux appréhender la migration cellulaire en tant que problème biophysique, afin de pouvoir mettre une réalité biologique sur des arguments physiques souvent employés (tels que la polarité par exemple). C'est ainsi qu'à partir d'une sélection de marquages réalisés sur une monocouche en culture, nous avons choisi de nous concentrer principalement sur l'actine et la vimentine. En particulier, deux méthodes ont été retenues pour étudier les différents acteurs. La première consistait à fixer une expérience en pleine migration puis à en marquer les constituants, et la seconde à administrer des drogues aux cellules au cours de leur migration. Les résultats obtenus se sont révélés très riches en informations.

Il est apparu que le réseau de vimentine est un senseur de frontière. Les cellules de frontière l'expriment fortement. Par ailleurs, nous avons montré un lien entre vimentine et déformation importante des cellules. Beaucoup de questions restent en suspens en ce qui concerne la vimentine, mais il est clair que son architecture sera porteuse de nombreuses informations en ce qui concerne la migration en bandes. La différence

entre les marquages sur les hippodromes et sur les bandes a par ailleurs permis de sélectionner les relations invariantes par changement de conditions aux limites, et donc plus susceptibles d'être intrinsèques au matériau. Il s'agit des relations qui lient l'actine et la densité, et de la relation non monotone entre vimentine et actine qui suggère trois états cellulaires possibles : l'un très déformé et riche en vimentine, le second très dense et riche en actine, et entre les deux le troisième état, où les cellules migrent, et où la vimentine et l'actine varient de concert.

Enfin, l'asymétrie que nous avons mesurée sur les hippodromes entre les bords interne et externe constitue encore une nouvelle piste de recherche, liée à la courbure cette fois, et sera à relier à l'asymétrie de vitesse mesurée.

En plus des courbes maîtresses expérimentales et des résultats sur les marquages d'actine et de vimentine, nous avons pu montrer dans une bande que le vecteur polarisation (défini du centre du noyau vers le centre de la cellule) est orthogonal à la vitesse en moyenne. Ce résultat surprenant doit faire l'objet de recherches supplémentaires et ouvre de nouvelles perspectives sur la compréhension des cellules en monocouche. En particulier, faire le lien entre cette définition et celle le plus couramment utilisée qui relie le centre de masse de la cellule et le centre de masse des lamellipodes est une piste de recherche pour la suite. Des expériences réalisées avec des mosaïques de cellules (15% de cellules marquées et 85 % de cellules non marquées) seraient d'un grand intérêt pour voir si une organisation des lamellipodes a lieu à grande échelle, avec par exemple l'établissement d'un gradient de taille de lamellipodes comme cela a pu être observé *in vivo* dans la *Drosophile*.

3 Forces

L'étude des forces par microscopie de force de traction a été réalisée sur des hippodromes de rigidité de l'ordre du kPa. Ces expériences ont confirmé qu'une monocouche en migration est contractile. Nous avons montré qu'il est équivalent de mesurer le déplacement des billes dans le substrat ou le déplacement des cellules à petite échelle sur des images de phase. En d'autre terme, la vitesse instantanée (celle utilisée par les théoriciens mais non mesurable expérimentalement) est égale à la dérivée du déplacement, $\frac{d\vec{D}}{dt}$ des billes. Nous concluons, approximativement d'après les tests dans l'espace réel, et plus précisément par les tests menés dans l'espace réciproque, qu'il y a continuité du déplacement entre le substrat et la cellule. Cependant, étant donné que le plan de prise de vue des cellules est situé à l'intérieur de la monocouche et non directement sur le substrat, on pourrait même affirmer qu'il y a continuité entre le déplacement de l'intérieur de la monocouche et le déplacement du substrat. Cette remarque suggérerait que les parties de la cellule situées à des hauteurs différentes se déplacent en bloc; autrement dit, que le comportement de la monocouche est élastique, au moins aux temps courts considérés (à l'échelle du temps $\tau = 5$ min de l'intervalle entre images).

La suite immédiate de ces expériences serait de calculer la contrainte dans la monocouche, par une, deux ou trois des techniques utilisées dans la littérature. Parmi celles-ci, on suppose que la technique dite ISM sera particulièrement adaptée car la continuité du déplacement à l'interface cellule-substrat est valide et qu'aux petites échelles de temps le substrat semble élastique. On pourra comparer aux autres mé-

thodes et en particulier au BISM qui ne suppose aucun modèle rhéologique à priori.

Pour conclure, à partir d'un objectif initial qui était d'étudier la migration autour d'un obstacle, le développement d'un système à grande échelle sur des hippodromes nous a permis de mieux comprendre les ingrédients sous-jacents de la migration, tout en développant le cadre expérimental qui permettra de faire des comparaisons quantitatives entre systèmes. Nous aimerions aussi comparer et intégrer les observations *in vivo* faites dans la Drosophile.

Annexe A

Détails des méthodes

1 Préparation des tampons pour impression

Dessin des moules La première étape est de dessiner les motifs choisis sur un logiciel adapté, dans notre cas Adobe Illustrator. Ces dessins sont ensuite envoyés à l'entreprise JD Photo Data qui les imprime sur feuille. Le masque créé est occultant au niveau des motifs à imprimer, et permet de passer à la fabrication du moule par photolithographie (Fig.A.1, A).

Préparation des moules Le principe de la photolithographie réside dans l'utilisation d'une résine sensible au rayonnement UV. La nature de la résine induit une réticulation soit de la partie qui est occultée (résine photo-positive), soit de la partie qui est exposée (résine photo-négative). Ici, une résine négative (SU8-2080) est utilisée : seules les régions directement accessibles à la lumière réticulent (Fig.A.1, B), le reste est soluble et peut être enlevé grâce à des lavages

Le protocole de fabrication des moules se réalise en salle blanche et est le suivant :

1. On nettoie une galette de silicium à l'acétone puis on la sèche à l'air comprimé pour éviter les bulles.
2. On enlève toute l'eau qui serait restée sur la galette, en la laissant 5 min sur une plaque à 100 °C, puis on attend qu'elle revienne à température ambiante.
3. On dépose une noix de résine SU-8 sur la galette, et on étale par centrifugation (spin-coating) en fonction de l'épaisseur désirée. En pratique, on réalise un cycle de pré-étalement à 500 rpm pendant 30 s puis à 2000 rpm pendant une minute.
4. On cuit ensuite la résine à 65°C pendant l'étape dite de cuisson molle (soft baking), puis on passe sur une plaque à 95°C pendant l'étape dite de cuisson dure (hard baking). Les temps sont à ajuster en fonction de l'épaisseur désirée.
5. On dépose le photomasque sur la résine qu'on expose aux UVs pendant 60 s.
6. On cuit pour la seconde fois la résine à 65 °C puis 90 °C.
7. On dissout la résine non réticulée en plongeant la galette dans un bain de développeur pendant une dizaine de minutes, et sous agitation.
8. Enfin on nettoie à l'isopropanol et on sèche à l'air comprimé.

Après ces étapes, l'épaisseur des structures est vérifiée grâce à un profilomètre, et la surface est silanisée pour rendre le moule superhydrophobe. Cette étape permet de dé-mouler la membrane de PDMS sans accroche après sa réticulation. La silanisation est

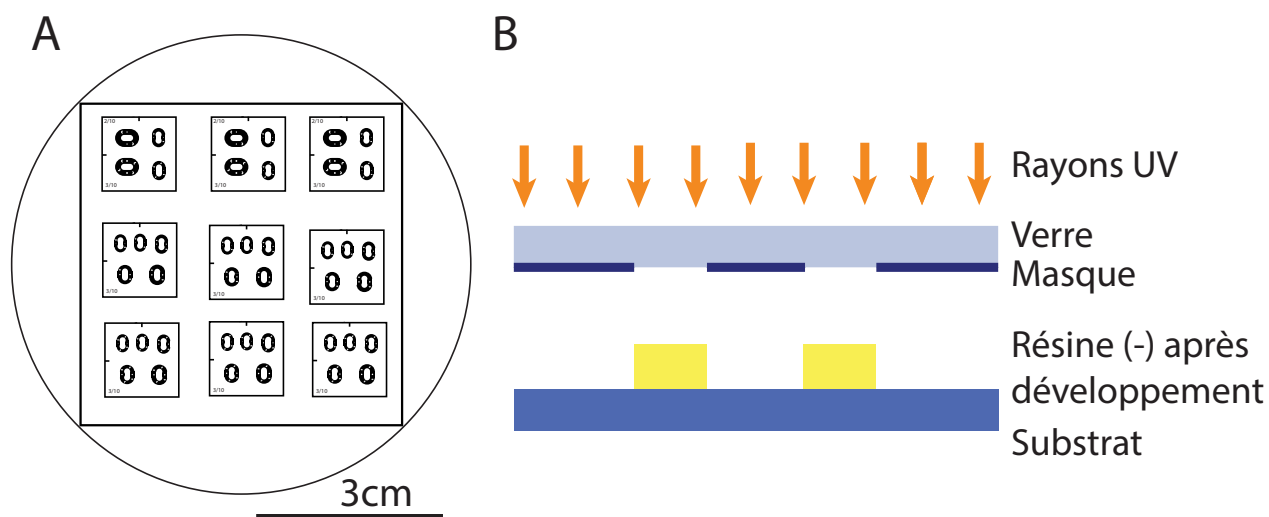


FIGURE A.1 – (A) Dessin d'un masque utilisé en photolithographie. Le disque externe correspond à une galette (wafer) de silicium de 3 pouces, chaque carré correspond à la découpe associée à un tampon. (B) Principe de la photolithographie avec une résine négative. Là où les rayons UV ne sont pas bloqués par le masque, la résine polymérise.

réalisée dans une cloche sous vide à environ 100 Pa, avec du trichloro(1H,2H,2H,2H,-perfluorooctyl)silane pendant une nuit (Sigma, 448931). Une fois le moule réalisé, on peut couler le PDMS.

Préparation des tampons Du PDMS Sylgard 184, Neyco est mélangé avec son réticulant en proportion massique 1 :10. Il faut mélanger vigoureusement et dégazer pendant environ 1 h sous une cloche à vide. Le PDMS est ensuite coulé sur les moules et laissé à 65°C pendant une nuit pour qu'il réticule. Puis on procède au démoulage et à la découpe précautionneuse des motifs.

2 Culture cellulaire

Les cellules utilisées sont des Madin-Darby canine kidney cells (MDCK II) commandées en début de thèse à ECACC, Acc No : 00062107, Lot : 14G026. Ces cellules sont dérivées des MDCK et quand on les réceptionne elles sont indiquées être à 27 passages (processus de décollement-recollement). C'est notre base de travail et on l'appelle passage zéro. Les cellules sont ensuite gardées en culture jusqu'à 20 passages de plus, avant d'être jetées pour éviter les dérives génétiques trop importantes.

Les passages sont réalisés lorsque les cellules sont à 75 % de confluence, et se font un jour sur trois. À partir de cellules à confluence, on repique systématiquement au moins deux boîtes de cellules. L'une est diluée 10 fois par rapport à la boîte initiale, et l'autre est diluée 20 fois.

On ajuste également ces passages pour avoir des boîtes à confluence les jours d'expérience.

Le milieu de culture utilisé est un milieu enrichi en glutamax DMEM Flutamax Gibco 61965-0.25, avec 1% de streptomycine et 10 % de sérum foetal de boeuf.

3 Préparation de produits

Préparation d'une membrane de polyvinylalcool Mélanger 0.5g de PVA dans 20 mL d'eau pure, sous agitation avec chauffage (environ 80 °C) jusqu'à ce que ce soit dissous (5 ou 6 heures suffisent en pratique).

Verser en filtrant avec un filtre à 0.22 µm dans une boîte de Pétri de diamètre 10 cm. Faire sécher sous une sorbonne avec le couvercle très légèrement entrouvert. L'idée est que l'air puisse passer, mais qu'il y en ait le moins possible. Cela permet d'éviter la formation de vaguelettes à la surface de la membrane. La stocker ensuite une semaine ou deux, en l'entourant de parafilm pour faire bien attention à ne pas la laisser trop sécher.

Préparation de la solution de billes Pour préparer la solution de billes, nous fabriquons dans de l'eau distillée et avec toutes les précautions nécessaires une solution de :

1. tétraborate de sodium à 3.8 mg/mL;
2. acide borique à 5 mg/mL.

Ce mélange est mis sous agitation jusqu'à dissolution pendant une nuit sous une sorbonne. On sonique ensuite la solution de billes non diluée pendant 10 min, avant de l'ajouter au milieu en concentration voulue (1/250 ou 1/500). Ce mélange se garde au moins un mois.

Juste avant une expérience, on sonique 5 min pour bien homogénéiser et décoller les billes qui seraient collées entre elles. Juste avant de mettre en contact avec le substrat, on ajoute de l'EDC (Sigma E7750) à 0.1 mg/mL. Ce produit se dégrade extrêmement vite dans un milieu basique, mais c'est un catalyseur puissant s'il est ajouté au milieu juste avant son emploi.

Préparation de Pluronic Nous utilisons du Pluronic à 2 % obtenu en mélangeant 1 g de Pluronic dans 50 mL d'eau distillée et en laissant sous agitation. Puis nous filtrons la solution avec un filtre à 0.22 µm.

4 Étude rhéologique du substrat

L'étude rhéologique du substrat de la microscopie de force de traction est réalisée dans un rhéomètre qui nous permet d'extraire les modules élastique et visqueux du matériau.

La contrainte σ d'un matériau en réponse à une déformation peut s'écrire sous la forme :

$$\sigma = \mu\varepsilon + \alpha\eta\dot{\varepsilon} \quad (\text{A.1})$$

On impose grâce au rhéomètre que $\varepsilon = Ae^{ik\omega}$. Alors il en sort :

$$\begin{aligned} \sigma &= (\mu + i\alpha\eta)Ae^{ik\omega} \\ \sigma &= (G' + iG'')Ae^{ik\omega} \end{aligned} \quad (\text{A.2})$$

où ω est la fréquence d'étude, G' le module élastique et G'' le module visqueux. Pour être dans le domaine de validité de la microscopie de force de traction, il faut que l'on

soit dans le cas d'un solide élastique, c'est-à-dire que $G' \gg G''$. La Fig. A.2 nous montre que c'est bien le cas, l'échelle des fréquences nécessaires à nos expériences étant plutôt située entre 0 et 1 Hz. Enfin, dans l'hypothèse où le substrat est élastique, le module d'Young vaut environ $3G'$.

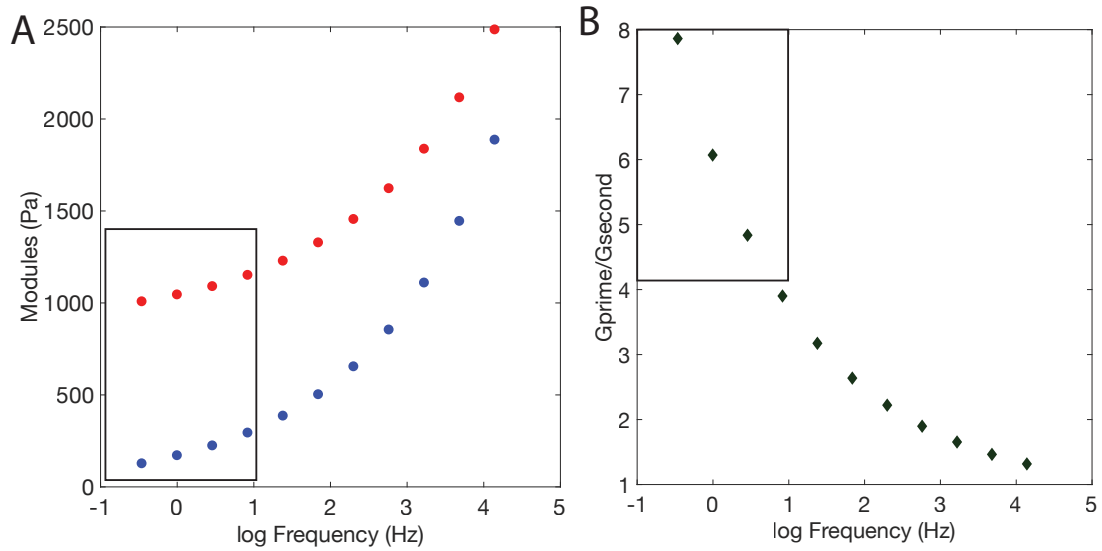


FIGURE A.2 – Rhéologie du substrat. (A) Variation des modules G' (rouge) et G'' (bleu) en fonction du logarithme de la fréquence. (B) Variation du rapport G'/G'' en fonction du logarithme de la fréquence. Le rectangle noir indique la région d'intérêt.

5 Effet de la mitomycine C

Pour quantifier l'effet de la mitomycine deux quantités sont observées :

- La densité : comment augmente le nombre de cellules par rapport à un cas sans mitomycine.
- La vitesse : comment varie la vitesse par rapport à un cas sans mitomycine.

5.1 Évolution de la densité

Le principal effet attendu et voulu de la mitomycine est son rôle sur l'évolution de la densité. Pour étudier cela, deux plaques qui contiennent des cellules MDCK II transfectées histone GFP pour imager les noyaux sont imagées. Dans l'une de ces plaques, de la mitomycine est ajoutée et rincée, dans l'autre les cellules sont simplement rincées.

Sans mitomycine, en 15 h le nombre de cellules a fortement augmenté (Fig.A.3, A et B). Cela n'empêche pas de bien détecter les noyaux dans les deux cas, en utilisant l'algorithme décrit au chap. II, sec. 2.2.c.

Sur la figure A.3, C l'évolution en fonction du temps du logarithme du nombre de noyaux détectés divisé par le nombre initial de noyaux est représentée. On voit que les évolutions sont linéaires. Cela nous permet d'effectuer des ajustements et d'extraire les temps caractéristiques de croissance. Un temps caractéristique d'évolution de 15 h environ pour le contrôle et de 33 h pour les expériences mitomycinées est extrait. En d'autres termes, l'augmentation de la densité est ralentie d'un facteur 2 entre ces deux conditions.

5.2 Évolution de la vitesse

Ensuite, on étudie la façon dont l'ajout de mitomycine influe sur la vitesse dans une expérience de migration en bandes. Sur la Fig.A.4, les courbes rouges correspondent aux courbes de vitesse du chapitre III. Seules les différences entre les deux conditions sont commentées ici.

Sur tous les axes représentés, la vitesse augmente progressivement avec la mitomycine (accélération de $0.35 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-2}$) alors que sans mitomycine la vitesse est autour de $5 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ et l'accélération est négligeable.

Cette étude nous permet de conclure que la mitomycine ralentit l'augmentation de la densité d'un facteur 2. L'inhibition de la prolifération permet aussi d'augmenter graduellement la vitesse au cours du temps.

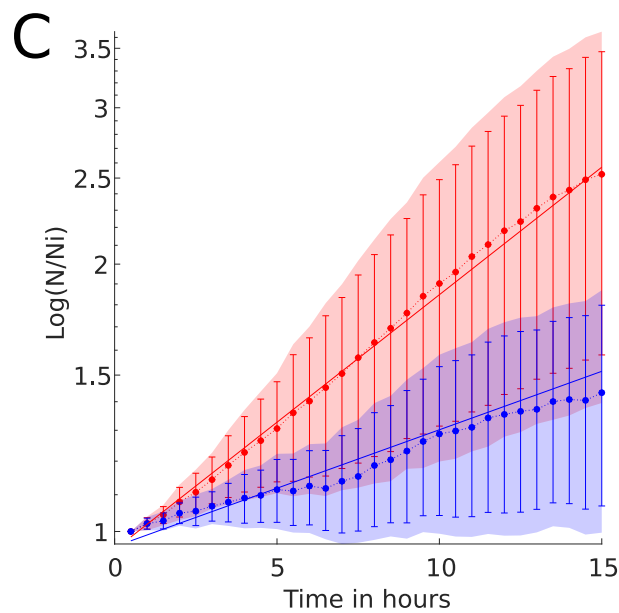
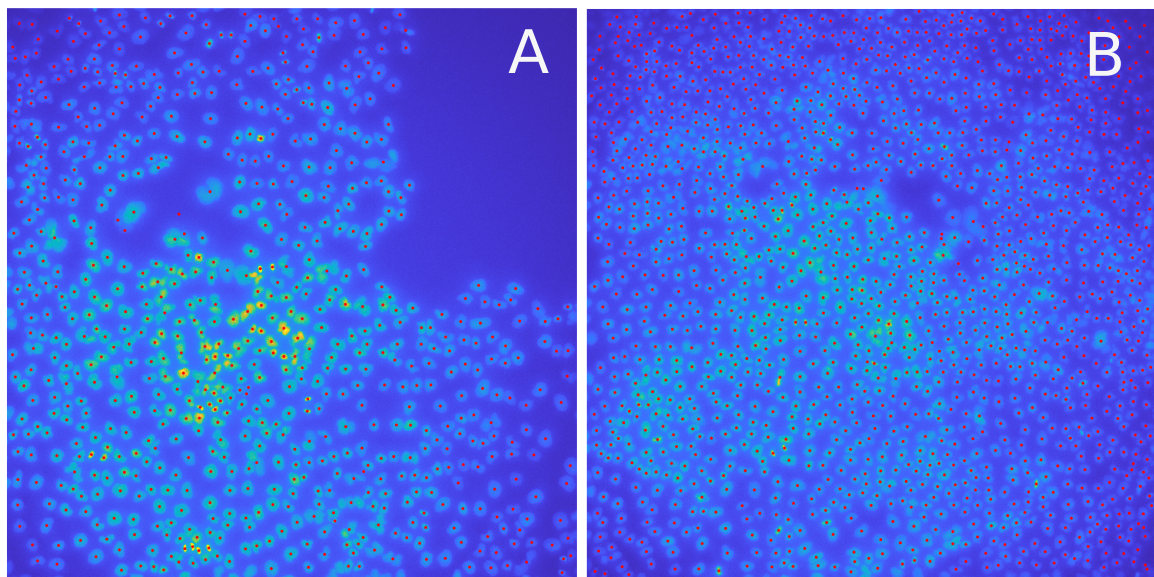


FIGURE A.3 – Effet de la mitomycine sur la densité. (A) Une image initiale des cellules marquées en histone GFP après détection des noyaux par l’algorithme (points rouges). (B) La même zone après 15 h, sans mitomycine. (C) Nombre de cellules dans l’image en fonction du temps. Représentation semi-logarithmique de $\frac{N}{N_i}$ où N est le nombre de cellules dans l’image et N_i le nombre de cellules au temps initial. Courbes tracées chacune avec 8 expériences. Rouge : contrôle ; bleu : mitomycine. Les contours représentent l’écart type moyen des distributions, les barres d’erreur représentent l’intervalle d’erreur sur la moyenne. Les lignes continues représentent des ajustements avec des temps d’évolution de 15 h pour le contrôle et de 33 h pour la mitomycine.

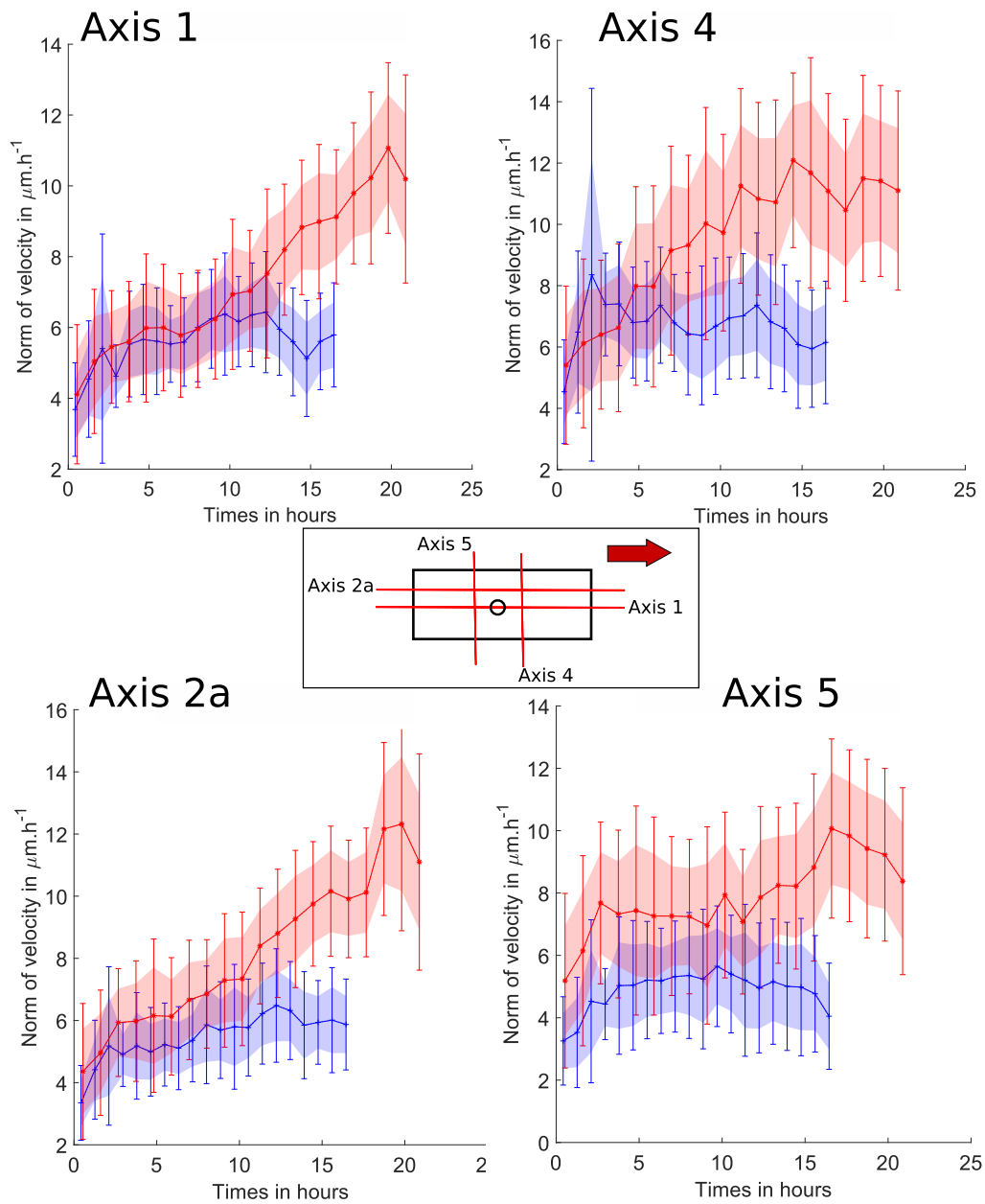


FIGURE A.4 – Évolution temporelle de la vitesse en présence de mitomycine. Vitesse en fonction du temps dans le cas contrôle (courbes bleues) et avec mitomycine (courbes rouges). Les contours correspondent à l'écart type de la distribution, les barres d'erreurs correspondent à l'erreur sur la moyenne. Chaque courbe est moyennée sur 4 expériences. L'encart central permet de se remémorer les positions des axes définis précédemment (chap. II sec. 2.1) ainsi que le sens de déplacement des cellules (flèche rouge).

Bibliographie

- [1] Peter Friedl and Darren Gilmour. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10(7) :445–457, jul 2009. [3](#)
- [2] Jose Javier Bravo-Cordero, Louis Hodgson, and John Condeelis. Directed cell invasion and migration during metastasis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 24(2) :277–283, apr 2012. [3](#)
- [3] Anne J. Ridley. Life at the Leading Edge. *Cell*, 145(7) :1012–1022, jun 2011. [3](#)
- [4] Eric Theveneau and Roberto Mayor. Collective cell migration of epithelial and mesenchymal cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 70(19) :3481–3492, oct 2013. [3](#)
- [5] M. Abercrombie, E. Joan, M. Heaysman, and Susan M. Pegrum. The locomotion of fibroblasts in culture. *Exp. Cell Res.*, 60(3) :437–444, jun 1970. [3](#)
- [6] Dan Cojoc, Francesco Difato, Enrico Ferrari, Rajesh B. Shahapure, Jummi Laishram, Massimo Righi, Enzo M. Di Fabrizio, and Vincent Torre. Properties of the Force Exerted by Filopodia and Lamellipodia and the Involvement of Cytoskeletal Components. *PLoS One*, 2(10) :e1072, oct 2007. [3](#)
- [7] Cécile Sykes and Julie Plastino. Actin filaments up against a wall. *Nature*, 464(7287) :365–366, mar 2010. [3](#), [7](#)
- [8] Masazumi Tada and C.-P. Heisenberg. Convergent extension : using collective cell migration and cell intercalation to shape embryos. *Development*, 139(21) :3897–3904, nov 2012. [3](#)
- [9] Carl-Philipp Heisenberg and Yohanns Bellaïche. Forces in Tissue Morphogenesis and Patterning. *Cell*, 153(5) :948–962, may 2013. [3](#), [12](#)
- [10] Pooja R. Sonavane, Chong Wang, Bette Dzamba, Gregory F. Weber, Ammasi Periasamy, and Douglas W. DeSimone. Mechanical and signaling roles for keratin intermediate filaments in the assembly and morphogenesis of *Xenopus* mesoderm tissue at gastrulation. *Development*, 144(23) :4363–4376, dec 2017. [3](#)
- [11] Laurel A. Rohde and Carl-Philipp Heisenberg. Zebrafish Gastrulation : Cell Movements, Signals, and Mechanisms. In *Int. Rev. Cytol.*, volume 261, pages 159–192. Int Rev Cytol, 2007. [3](#)
- [12] Wilhelm His. *Unsere Körperform und das physiologische Problem ihrer Entstehung Briefe an einen befreundeten Naturforscher / von Wilhelm His*. F.C.W. Vogel,, Leipzig :, nov 1874. [3](#)

-
- [13] D'Arcy Wentworth Thompson. *On Growth and Form*. Cambridge University Press, jul 1992. [3](#), [12](#)
- [14] Charles R. Gausch, Walter L. Hard, and Thomas F. Smith. Characterization of an Established Line of Canine Kidney Cells (MDCK). *Exp. Biol. Med.*, 122(3) :931–935, jul 1966. [4](#)
- [15] Emily Steed, Maria S. Balda, and Karl Matter. Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol.*, 20(3) :142–149, mar 2010. [4](#)
- [16] Aurelien Villedieu. *Epithelial folding and migration*. PhD thesis, Sorbonne Université, oct 2019. [4](#), [25](#)
- [17] Boris Guirao, Stéphane U Rigaud, Floris Bosveld, Anaïs Bailles, Jesús López-Gay, Shuji Ishihara, Kaoru Sugimura, François Graner, and Yohanns Bellaïche. Unified quantitative characterization of epithelial tissue development. *Elife*, 4 :e08519, dec 2015. [4](#)
- [18] Boris Guirao and Yohanns Bellaïche. Biomechanics of cell rearrangements in Drosophila. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 48 :113–124, 2017. [4](#)
- [19] Agustí Brugués, Ester Anon, Vito Conte, Jim H. Veldhuis, Mukund Gupta, Julien Colombelli, José J. Muñoz, G. Wayne Brodland, Benoit Ladoux, and Xavier Trepat. Forces driving epithelial wound healing. *Nat. Phys.*, 10(9) :683–690, sep 2014. [4](#), [17](#), [19](#)
- [20] Pierre Hainaut and Amelie Plymoth. Targeting the hallmarks of cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, 25(1) :50–51, jan 2013. [6](#)
- [21] Yang Yang, Hongmei Zheng, Yuting Zhan, and Songqing Fan. An emerging tumor invasion mechanism about the collective cell migration. *Am. J. Transl. Res.*, 11(9) :5301–5312, 2019. [6](#)
- [22] Kevin J. Cheung and Andrew J. Ewald. A collective route to metastasis : Seeding by tumor cell clusters. *Science (80-.)*, 352(6282) :167–169, apr 2016. [6](#)
- [23] Wenyang Li and Yibin Kang. Probing the Fifty Shades of EMT in Metastasis. *Trends in Cancer*, 2(2) :65–67, feb 2016. [6](#)
- [24] Gray W. Pearson. Control of Invasion by Epithelial-to-Mesenchymal Transition Programs during Metastasis. *J. Clin. Med.*, 8(5) :646, may 2019. [6](#), [8](#)
- [25] B. Johnson A. Lewis J. Raff M. Roberts K. Alberts and Walter P. Molecular biology of the cell (4th ed.). *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 31(4) :212–214, jul 2003. [6](#), [11](#)
- [26] Morrisbook. Chapter 10. Cell and Tissue Architecture : Cytoskeleton, Cell Junctions, and Extracellular Matrix. [7](#)
- [27] Daniel A. Fletcher and R. Dyche Mullins. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280) :485–492, jan 2010. [7](#)
- [28] Ekta Seth Chhabra and Henry N. Higgs. The many faces of actin : matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.*, 9(10) :1110–1121, oct 2007. [7](#)

- [29] Changsong Yang and Tatyana Svitkina. Visualizing branched actin filaments in lamellipodia by electron tomography. *Nat. Cell Biol.*, 13(9) :1012–1013, sep 2011. [7](#)
- [30] Changsong Yang and Tatyana Svitkina. Filopodia initiation. *Cell Adh. Migr.*, 5(5) :402–408, sep 2011. [7](#)
- [31] Pirta Hotulainen and Pekka Lappalainen. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J. Cell Biol.*, 173(3) :383–394, may 2006. [7](#)
- [32] Damien Laporte, Nikola Ojkic, Dimitrios Vavylonis, and Jian-Qiu Wu. α -Actinin and fimbrin cooperate with myosin II to organize actomyosin bundles during contractile-ring assembly. *Mol. Biol. Cell*, 23(16) :3094–3110, aug 2012. [7](#)
- [33] V. Noireaux, R.M. Golsteyn, E. Friederich, J. Prost, C. Antony, D. Louvard, and Cecile Sykes. Growing an Actin Gel on Spherical Surfaces. *Biophys. J.*, 78(3) :1643–1654, mar 2000. [7](#)
- [34] V erane Achard, Jean-Louis Martiel, Alph ee Michelot, Christophe Gu erin, Anne-C ecile Reymann, Laurent Blanchoin, and Rajaa Boujemaa-Paterski. A “Primer”-Based Mechanism Underlies Branched Actin Filament Network Formation and Motility. *Curr. Biol.*, 20(5) :423–428, mar 2010. [7](#)
- [35] Kurt J. Amann and Thomas D. Pollard. Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98(26) :15009–15013, dec 2001. [7](#)
- [36] B. J. Nolen, N. Tomasevic, A. Russell, D. W. Pierce, Z. Jia, C. D. McCormick, J. Hartman, R. Sakowicz, and T. D. Pollard. Characterization of two classes of small molecule inhibitors of Arp2/3 complex. *Nature*, 460(7258) :1031–1034, aug 2009. [7](#)
- [37] Si an Culley, Kalina L. Tosheva, Pedro Matos Pereira, and Ricardo Henriques. SRRF : Universal live-cell super-resolution microscopy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 101 :74–79, aug 2018. [7](#), [8](#), [38](#)
- [38] Zhao Qin, Markus J. Buehler, and Laurent Kreplak. A multi-scale approach to understand the mechanobiology of intermediate filaments. *J. Biomech.*, 43(1) :15–22, jan 2010. [7](#)
- [39] Geoffrey M Cooper. *The cell : A molecular Approach. 2nd edition*. Sinauer Associates, 2000. [8](#)
- [40] R Moll. Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors. *Veroff. Pathol.*, 142 :1–197, 1993. [8](#)
- [41] D Ivanyi, J M Minke, C Hageman, E Groeneveld, G van Doornewaard, and W Misdorp. Cytokeratins as markers of initial stages of squamous metaplasia in feline mammary carcinomas. *Am. J. Vet. Res.*, 54(7) :1095–102, jul 1993. [8](#)
- [42] Andrew P. Kowalczyk and Kathleen J. Green. Structure, Function, and Regulation of Desmosomes. In *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, volume 116, pages 95–118. Elsevier B.V., 2013. [8](#)

- [43] Peter M. Steinert and Dennis R. Roop. Molecular and Cellular Biology of Intermediate Filaments. *Annu. Rev. Biochem.*, 57(1) :593–625, jun 1988. [8](#)
- [44] Werner W. Franke, Christine Grund, Caecilia Kuhn, Brian W. Jackson, and Karl Illmensee. Formation of Cytoskeletal Elements During Mouse Embryogenesis. *Differentiation*, 23(1-3) :43–59, dec 1982. [8](#)
- [45] R. Y.-J. Huang, Parry Guilford, and Jean Paul Thiery. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Sci.*, 125(19) :4417–4422, oct 2012. [8](#)
- [46] Alison E Patteson, Amir Vahabikashi, Katarzyna Pogoda, Stephen A Adam, Anne Goldman, Robert Goldman, and Paul Janmey. Vimentin protects the structural integrity of the nucleus and suppresses nuclear damage caused by large deformations, mar 2019. [8](#)
- [47] Olga Biskou, Victor Casanova, Kirsty M. Hooper, Sadie Kemp, Graham P. Wright, Jack Satsangi, Peter G. Barlow, and Craig Stevens. The type III intermediate filament vimentin regulates organelle distribution and modulates autophagy. *PLoS One*, 14(1) :e0209665, jan 2019. [8](#)
- [48] A Uzman. Molecular Cell Biology (4th edition) Harvey Lodish, Arnold Berk, S. Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore and James Darnell; Freeman & Co., New York, NY, 2000, 1084 pp., ISBN 0-7167-3136-3. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 29(3) :126–128, 2001. [9](#), [10](#)
- [49] Yuan-Chen Chang, Perihan Nalbant, Jörg Birkenfeld, Zee-Fen Chang, and Gary M. Bokoch. GEF-H1 Couples Nocodazole-induced Microtubule Disassembly to Cell Contractility via RhoA. *Mol. Biol. Cell*, 19(5) :2147–2153, may 2008. [9](#), [89](#)
- [50] M. Amanda Hartman and James A. Spudich. The myosin superfamily at a glance. *J. Cell Sci.*, 125(7) :1627–1632, apr 2012. [10](#)
- [51] Christiane Nüsslein-Volhard and Eric Wieschaus. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287(5785) :795–801, oct 1980. [12](#)
- [52] Andrew Fire, SiQun Xu, Mary K. Montgomery, Steven A. Kostas, Samuel E. Driver, and Craig C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669) :806–811, feb 1998. [12](#)
- [53] Sham Tlili, Estelle Gauquelin, Brigitte Li, Olivier Cardoso, Benoît Ladoux, Hélène Delanoë-Ayari, and François Graner. Collective cell migration without proliferation : density determines cell velocity and wave velocity. *R. Soc. Open Sci.*, 5(5) :172421, may 2018. [14](#), [19](#), [72](#)
- [54] Xavier Serra-Picamal, Vito Conte, Romaric Vincent, Ester Anon, Dhananjay T. Tambe, Elsa Bazellieres, James P. Butler, Jeffrey J. Fredberg, and Xavier Trepat. Mechanical waves during tissue expansion. *Nat. Phys.*, 8(8) :628–634, aug 2012. [14](#), [16](#), [17](#), [19](#), [20](#), [21](#), [58](#), [85](#)
- [55] BENJAMIN DOLLET and FRANÇOIS GRANER. Two-dimensional flow of foam around a circular obstacle : local measurements of elasticity, plasticity and flow. *J. Fluid Mech.*, 585 :181–211, aug 2007. [15](#)

- [56] Kévin Alessandri, Bibhu Ranjan Sarangi, Vasily Valériévitch Gurchenkov, Bidisha Sinha, T. R. Kiessling, Luc Fetler, Felix Rico, Simon Scheuring, Christophe Lamaze, Anthony Simon, Sara Geraldo, D. Vignjevic, H. Domejean, Leslie Rolland, Anette Funfak, Jérôme Bibette, Nicolas Bremond, and Pierre Nassoy. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110(37) :14843–14848, sep 2013. [16](#)
- [57] David Gonzalez-Rodriguez, Karine Guevorkian, Stéphane Douezan, and Françoise Brochard-Wyart. Soft Matter Models of Developing Tissues and Tumors. *Science (80-.)*, 338(6109) :910–917, nov 2012. [16](#)
- [58] Philippe Marmottant, Abbas Mgharbel, Jos Käfer, Benjamin Audren, Jean Paul Rieu, Jean Claude Vial, Boudewijn Van Der Sanden, Athanasius E.M. Marée, François Graner, and Hélène Delanoë-Ayari. The role of fluctuations and stress on the effective viscosity of cell aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106(41) :17271–17275, oct 2009. [16](#)
- [59] Karine Guevorkian, Marie-Josée Colbert, Mélanie Durth, Sylvie Dufour, and Françoise Brochard-Wyart. Aspiration of Biological Viscoelastic Drops. *Phys. Rev. Lett.*, 104(21) :218101, may 2010. [16](#)
- [60] Gabor Forgacs, Ramsey A. Foty, Yinon Shafrir, and Malcolm S. Steinberg. Viscoelastic Properties of Living Embryonic Tissues : a Quantitative Study. *Biophys. J.*, 74(5) :2227–2234, may 1998. [16](#)
- [61] Tomita Vasilica Stirbat, Sham Tlili, Thibault Houver, Jean-Paul Rieu, Catherine Barentin, and Hélène Delanoë-Ayari. Multicellular aggregates : a model system for tissue rheology. *Eur. Phys. J. E*, 36(8) :84, aug 2013. [16](#)
- [62] Jonas Ranft, Markus Basan, Jens Elgeti, J.-F. Joanny, Jacques Prost, and F. Julicher. Fluidization of tissues by cell division and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107(49) :20863–20868, dec 2010. [16](#)
- [63] M Reffay, L Petitjean, S Coscoy, E Grasland-Mongrain, F Amblard, A Buguin, and P Silberzan. Orientation and Polarity in Collectively Migrating Cell Structures : Statics and Dynamics. *Biophysj*, 100 :2566–2575, 2011. [16](#), [21](#)
- [64] Andrew R. Harris, Loic Peter, Julien Bellis, Buzz Baum, Alexandre J. Kabla, and Guillaume T. Charras. Characterizing the mechanics of cultured cell monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109(41) :16449–16454, oct 2012. [16](#), [19](#)
- [65] Kevin Doxzen, Sri Ram Krishna Vedula, Man Chun Leong, Hiroaki Hirata, Nir S. Gov, Alexandre J. Kabla, Benoit Ladoux, and Chwee Teck Lim. Guidance of collective cell migration by substrate geometry. *Integr. Biol.*, 5(8) :1026, jul 2013. [16](#), [18](#), [19](#), [85](#), [95](#)
- [66] Olivier Cochet-Escartin, Jonas Ranft, Pascal Silberzan, and Philippe Marcq. Border Forces and Friction Control Epithelial Closure Dynamics. *Biophys. J.*, 106(1) :65–73, jan 2014. [16](#), [17](#), [19](#), [21](#)

- [67] Nargess Khalilgharibi, Jonathan Fouchard, Nina Asadipour, Ricardo Barrientos, Maria Duda, Alessandra Bonfanti, Amina Yonis, Andrew Harris, Payman Mosaffa, Yasuyuki Fujita, Alexandre Kabla, Yanlan Mao, Buzz Baum, José J. Muñoz, Mark Miodownik, and Guillaume Charras. Stress relaxation in epithelial monolayers is controlled by the actomyosin cortex. *Nat. Phys.*, 15(8) :839–847, aug 2019. [16](#)
- [68] Rizwan Farooqui and Gabriel Fenteany. Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement. *J. Cell Sci.*, 118(1) :51–63, jan 2005. [17](#), [21](#)
- [69] Sri Ram Krishna Vedula, Man Chun Leong, Tan Lei Lai, Pascal Hersen, Alexandre J. Kabla, Chwee Teck Lim, and Benoit Ladoux. Emerging modes of collective cell migration induced by geometrical constraints. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109(32) :12974–12979, aug 2012. [18](#), [19](#), [85](#), [95](#)
- [70] Wang Xi, Surabhi Sonam, Thuan Beng Saw, Benoit Ladoux, and Chwee Teck Lim. Emergent patterns of collective cell migration under tubular confinement. *Nat. Commun.*, 8(1) :1517, dec 2017. [18](#)
- [71] Ernest Latorre, Sohan Kale, Laura Casares, Manuel Gómez-González, Marina Uroz, Léo Valon, Roshna V. Nair, Elena Garreta, Nuria Montserrat, Aránzazu del Campo, Benoit Ladoux, Marino Arroyo, and Xavier Trepap. Active superelasticity in three-dimensional epithelia of controlled shape. *Nature*, 563(7730) :203–208, nov 2018. [18](#)
- [72] Estelle Gauquelin, Sham Tlili, Cyprien Gay, Grégoire Peyret, René-Marc Mège, Marc A. Fardin, and Benoît Ladoux. Influence of proliferation on the motions of epithelial monolayers invading adherent strips. *Soft Matter*, 15(13) :2798–2810, mar 2019. [19](#), [34](#), [57](#), [58](#), [72](#), [73](#)
- [73] Grégoire Peyret, Romain Mueller, Joseph D’Alessandro, Simon Begnaud, Philippe Marcq, René-Marc Mège, Julia M. Yeomans, Amin Doostmohammadi, and Benoît Ladoux. Sustained Oscillations of Epithelial Cell Sheets. *Biophys. J.*, 117(3) :464–478, aug 2019. [19](#), [20](#), [21](#), [22](#), [125](#)
- [74] Danahe Mohammed, Guillaume Charras, Eléonore Vercruyse, Marie Versaevol, Joséphine Lantoine, Laura Alaimo, Céline Bruyère, Marine Luciano, Karine Glinel, Geoffrey Delhayé, Olivier Théodoly, and Sylvain Gabriele. Substrate area confinement is a key determinant of cell velocity in collective migration. *Nat. Phys.*, 15(8) :858–866, aug 2019. [19](#), [72](#)
- [75] Vincent Hakim and Pascal Silberzan. Collective cell migration : a physics perspective. *Reports Prog. Phys.*, 80(7) :076601, jul 2017. [19](#), [76](#)
- [76] Benoit Ladoux and René-Marc Mège. Mechanobiology of collective cell behaviours. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 18(12) :743–757, dec 2017. [19](#), [21](#)
- [77] Ricard Alert and Xavier Trepap. Physical Models of Collective Cell Migration. *Annu. Rev. Condens. Matter Phys.*, 11(1) :77–101, mar 2020. [19](#)
- [78] M. Poujade, E. Grasland-Mongrain, A. Hertzog, J. Jouanneau, P. Chavrier, B. Ladoux, A. Buguin, and P. Silberzan. Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(41) :15988–15993, oct 2007. [19](#)

- [79] Xavier Trepata, Michael R. Wasserman, Thomas E. Angelini, Emil Millet, David A. Weitz, James P. Butler, and Jeffrey J. Fredberg. Physical forces during collective cell migration. *Nat. Phys.*, 5(6) :426–430, 2009. [19](#), [20](#), [21](#)
- [80] O. du Roure, Alexandre Saez, Axel Buguin, Robert H. Austin, Philippe Chavrier, P. Silberzan, and Benoit Ladoux. Force mapping in epithelial cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102(7) :2390–2395, feb 2005. [19](#)
- [81] Chiara De Pascalis, Carlos Pérez-González, Shailaja Seetharaman, Batiste Boëda, Benoit Vianay, Mithila Burute, Cécile Leduc, Nicolas Borghi, Xavier Trepata, and Sandrine Etienne-Manneville. Intermediate filaments control collective migration by restricting traction forces and sustaining cell-cell contacts. *J. Cell Biol.*, 217 :3031–3044, 2018. [19](#)
- [82] Andrew R. Harris, Alicia Daeden, and Guillaume T. Charras. Formation of adherens junctions leads to the emergence of a tissue-level tension in epithelial monolayers. *J. Cell Sci.*, 127(11) :2507–2517, jun 2014. [19](#)
- [83] Ulrich S. Schwarz and Samuel S. Safran. Physics of adherent cells. *Rev. Mod. Phys.*, 85(3) :1327–1381, sep 2013. [19](#)
- [84] Martin Bergert, Anna Erzberger, Ravi A. Desai, Irene M. Aspalter, Andrew C. Oates, Guillaume Charras, Guillaume Salbreux, and Ewa K. Paluch. Force transmission during adhesion-independent migration. *Nat. Cell Biol.*, 17(4) :524–529, apr 2015. [19](#)
- [85] Ulrich S. Schwarz and Jerome R. D. Soine. Traction force microscopy on soft elastic substrates : a guide to recent computational advances. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 1853(11) :3095–3104, jun 2015. [19](#), [20](#)
- [86] Jae Hun Kim, Xavier Serra-Picamal, Dhananjay T. Tambe, Enhua H. Zhou, Chan Young Park, Monirosadat Sadati, Jin-Ah Park, Ramaswamy Krishnan, Bomi Gweon, Emil Millet, James P. Butler, Xavier Trepata, and Jeffrey J. Fredberg. Propulsion and navigation within the advancing monolayer sheet. *Nat. Mater.*, 12(9) :856–863, sep 2013. [20](#)
- [87] Thomas E. Angelini, Edouard Hannezo, Xavier Trepata, Jeffrey J. Fredberg, and David A. Weitz. Cell migration driven by cooperative substrate deformation patterns. *Phys. Rev. Lett.*, 104(16) :168104, apr 2010. [20](#), [21](#), [116](#)
- [88] Michel Moussus, Christelle Der Loughian, David Fuard, Marie Courçon, Danielle Gulino-Debrac, Hélène Delanoë-Ayari, and Alice Nicolas. Intracellular stresses in patterned cell assemblies. *Soft Matter*, 10(14) :2414–2423, dec 2013. [21](#)
- [89] Vincent Nier, Shreyansh Jain, Chwee Teck Lim, Shuji Ishihara, Benoit Ladoux, and Philippe Marcq. Inference of Internal Stress in a Cell Monolayer. *Biophys. J.*, 110(7) :1625–1635, apr 2016. [21](#)
- [90] Roberto Mayor and Sandrine Etienne-Manneville. The front and rear of collective cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 17(2) :97–109, feb 2016. [21](#), [22](#)
- [91] Sandrine Etienne-Manneville. Microtubules in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 29(1) :471–499, oct 2013. [21](#)

- [92] Lisa A. Mingle. Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *J. Cell Sci.*, 118(11) :2425–2433, jun 2005. [21](#)
- [93] Clare Garcin and Anne Straube. Microtubules in cell migration. *Essays Biochem.*, 63(5) :509–520, oct 2019. [21](#)
- [94] GW Gant Luxton and Gregg G. Gundersen. Orientation and function of the nuclear-centrosomal axis during cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 23(5) :579–588, oct 2011. [21](#)
- [95] Jean-Baptiste Manneville and Sandrine Etienne-Manneville. Positioning centrosomes and spindle poles : looking at the periphery to find the centre. *Biol. Cell*, 98(9) :557–565, sep 2006. [21](#)
- [96] Brian T. Helfand, Atsushi Mikami, Richard B. Vallee, and Robert D. Goldman. A requirement for cytoplasmic dynein and dynactin in intermediate filament network assembly and organization. *J. Cell Biol.*, 157(5) :795–806, may 2002. [21](#)
- [97] Robert P. J. Nieuwenhuizen, Leila Nahidiazar, Erik M. M. Manders, Kees Jalink, Sjoerd Stallinga, and Bernd Rieger. Co-Orientation : Quantifying Simultaneous Co-Localization and Orientational Alignment of Filaments in Light Microscopy. *PLoS One*, 10(7) :e0131756, jul 2015. [21](#)
- [98] Fatima K. Gyoeva and Vladimir I. Gelfand. Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin. *Nature*, 353(6343) :445–448, oct 1991. [21](#)
- [99] Zhuo Gan, Liya Ding, Christoph J. Burckhardt, Jason Lowery, Assaf Zaritsky, Karlyndsay Sitterley, Andressa Mota, Nancy Costigliola, Colby G. Starker, Daniel F. Voytas, Jessica Tytell, Robert D. Goldman, and Gaudenz Danuser. Vimentin Intermediate Filaments Template Microtubule Networks to Enhance Persistence in Cell Polarity and Directed Migration. *Cell Syst.*, 3(3) :252–263.e8, sep 2016. [21](#)
- [100] Cécile Leduc and Sandrine Etienne-Manneville. Regulation of microtubule-associated motors drives intermediate filament network polarization. *J. Cell Biol.*, 216(6) :1689–1703, jun 2017. [21](#)
- [101] Courtney R. Bone and Daniel A. Starr. Nuclear migration events throughout development. *J. Cell Sci.*, 129(10) :1951–1961, may 2016. [22](#)
- [102] Gregg G. Gundersen and Howard J. Worman. Nuclear Positioning. *Cell*, 152(6) :1376–1389, mar 2013. [22](#)
- [103] Francisco J. Calero-Cuenca, Cátia S. Janota, and Edgar R. Gomes. Dealing with the nucleus during cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 50 :35–41, feb 2018. [22](#)
- [104] G G Stokes. On the Effect of the Internal Friction of Fluids on Pendulums. *Cambridge Phil. Soc. Trans*, 9 :8, 1851. [22](#)
- [105] P Saramito. *Complex fluids : modelling and algorithms*. Springer, 2016. [22](#)
- [106] I. Cheddadi, P. Saramito, B. Dollet, C. Raufaste, and F. Graner. Understanding and predicting viscous, elastic, plastic flows. *Eur. Phys. J. E*, 34(1) :1, jan 2011. [22](#), [39](#)

- [107] Evelyne Kolb, Pierre Cixous, Niels Gaudouen, and Thierry Darnige. Rigid intruder inside a two-dimensional dense granular flow : Drag force and cavity formation. *Phys. Rev. E*, 87(3) :032207, mar 2013. [22](#)
- [108] Iker Zuriguel, Daniel Ricardo Parisi, Raúl Cruz Hidalgo, Celia Lozano, Alvaro Janda, Paula Alejandra Gago, Juan Pablo Peralta, Luis Miguel Ferrer, Luis Ariel Pugnaroni, Eric Clément, Diego Maza, Ignacio Pagonabarraga, and Angel Garcimartín. Clogging transition of many-particle systems flowing through bottle-necks. *Sci. Rep.*, 4(1) :7324, may 2015. [22](#)
- [109] S Tlili. *Biorhéologie in vitro : de la cellule au tissu*. PhD thesis, Université Paris-Diderot, 2015. [23](#)
- [110] S. Tlili, M. Durande, C. Gay, B. Ladoux, F. Graner, and H. Delanoë-Ayari. A migrating epithelial monolayer flows like a Maxwell viscoelastic liquid. *arXiv*, nov 2018. [23](#), [85](#)
- [111] Ernest Latorre, Sohan Kale, Laura Casares, Manuel Gómez-González, Marina Uroz, Léo Valon, Roshna V. Nair, Elena Garreta, Nuria Montserrat, Aránzazu del Campo, Benoit Ladoux, Marino Arroyo, and Xavier Trepát. Active superelasticity in three-dimensional epithelia of controlled shape. *Nature*, 563(7730) :203–208, nov 2018. [35](#)
- [112] Tianchi Chen, Andrew Callan-Jones, Eduard Fedorov, Andrea Ravasio, Agustí Brugués, Hui Ting Ong, Yusuke Toyama, Boon Chuan Low, Xavier Trepát, Tom Shemesh, Raphaël Voituriez, and Benoît Ladoux. Large-scale curvature sensing by directional actin flow drives cellular migration mode switching. *Nat. Phys.*, 15(4) :393–402, apr 2019. [35](#)
- [113] Kathryn P. Trogden, Rachel A. Battaglia, Parijat Kabiraj, Victoria J. Madden, Harald Herrmann, and Natasha T. Snider. An image-based small-molecule screen identifies vimentin as a pharmacologically relevant target of simvastatin in cancer cells. *FASEB J.*, 32(5) :2841–2854, may 2018. [35](#), [36](#), [87](#)
- [114] Boglárka H. Várkuti, Miklós Képiró, István Ádám Horváth, László Végner, Szilvia Ráti, Áron Zsigmond, György Hegyi, Zsolt Lenkei, Máté Varga, and András Málnási-Csizmadia. A highly soluble, non-phototoxic, non-fluorescent blebbistatin derivative. *Sci. Rep.*, 6(1) :26141, sep 2016. [35](#)
- [115] B Lucas and T Kanade. *An Iterative Image Registration Technique with an Application to Stereo Vision*, volume 2. Morgan Kaufmann, San Francisco, 1981. [40](#)
- [116] Jean-Yves Bouguet. *Pyramidal Implementation of the Lucas Kanade Feature Tracker Description of the algorithm*, 2001. [40](#)
- [117] M. Durande, S. Tlili, T. Homan, B. Guirao, F. Graner, and H. Delanoë-Ayari. Fast determination of coarse-grained cell anisotropy and size in epithelial tissue images using Fourier transform. *Phys. Rev. E*, 99(6) :062401, jun 2019. [43](#), [44](#), [125](#)
- [118] W. H. Reid L. D. Landau, E.M. Lifshits , E.M. Lifshitz, A. M. Kosevich, L. P. Pitaevskii, J. B. Sykes. *Theory of elasticity*. Butterworth-Heinemann, 1986. [51](#), [52](#)

- [119] James P. Butler, Iva Marija Tolić-Nørrelykke, Ben Fabry, and Jeffrey J. Fredberg. Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am. J. Physiol. Physiol.*, 282(3) :C595–C605, mar 2002. [52](#)
- [120] Benedikt Sabass, Margaret L. Gardel, Clare M. Waterman, and Ulrich S. Schwarz. High Resolution Traction Force Microscopy Based on Experimental and Computational Advances. *Biophys. J.*, 94(1) :207–220, jan 2008. [52](#)
- [121] Sergey V. Plotnikov, Benedikt Sabass, Ulrich S. Schwarz, and Clare M. Waterman. High-Resolution Traction Force Microscopy. In *Methods Cell Biol.*, volume 123, pages 367–394. Academic Press Inc., 2014. [52](#)
- [122] Per Christian Hansen. *Discrete Inverse Problems*. Society for Industrial and Applied Mathematics, jan 2010. [52](#)
- [123] Sham Tlili, Estelle Gauquelin, Brigitte Li, Olivier Cardoso, Benoît Ladoux, Hélène Delanoë-Ayari, and François Graner. Collective cell migration without proliferation : density determines cell velocity and wave velocity. *R. Soc. Open Sci.*, 5(5) :172421, may 2018. [58](#)
- [124] Jean Paul Thiery. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer*, 2(6) :442–454, jun 2002. [69](#)
- [125] Gaorav P. Gupta and Joan Massagué. Cancer Metastasis : Building a Framework. *Cell*, 127(4) :679–695, nov 2006. [69](#)
- [126] Cécile Leduc and Sandrine Etienne-Manneville. Intermediate filaments in cell migration and invasion : the unusual suspects. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 32 :102–112, feb 2015. [69](#)
- [127] A. S. Menko, B. M. Bleaken, A. A. Libowitz, L. Zhang, M. A. Stepp, and J. L. Walker. A central role for vimentin in regulating repair function during healing of the lens epithelium. *Mol. Biol. Cell*, 25(6) :776–790, mar 2014. [69](#)
- [128] Hayri E. Balcioglu, Lakshmi Balasubramaniam, Tomita Vasilica Stirbat, Bryant L. Doss, Marc Antoine Fardin, René Marc Mège, and Benoit Ladoux. A subtle relationship between substrate stiffness and collective migration of cell clusters. *Soft Matter*, 16(7) :1825–1839, feb 2020. [69](#), [121](#)
- [129] Falko Ziebert, Sumanth Swaminathan, and Igor S. Aranson. Model for self-polarization and motility of keratocyte fragments. *J. R. Soc. Interface*, 9(70) :1084–1092, may 2012. [78](#)
- [130] Jacob Notbohm, Shiladitya Banerjee, Kazage J.C. Utuje, Bomi Gweon, Hwanseok Jang, Yongdoo Park, Jennifer Shin, James P. Butler, Jeffrey J. Fredberg, and M. Cristina Marchetti. Cellular Contraction and Polarization Drive Collective Cellular Motion. *Biophys. J.*, 110(12) :2729–2738, jun 2016. [85](#)
- [131] M.G. Mendez, D. Restle, and P.A. Janmey. Vimentin Enhances Cell Elastic Behavior and Protects against Compressive Stress. *Biophys. J.*, 107(2) :314–323, jul 2014. [88](#)

- [132] Shreyansh Jain, Victoire M.L. Cachoux, Gautham H.N.S. Narayana, Simon de Beco, Joseph D'Alessandro, Victor Cellerin, Tianchi Chen, Mélina L. Heuzé, Philippe Marcq, René Marc Mège, Alexandre J. Kabla, Chwee Teck Lim, and Benoit Ladoux. The role of single-cell mechanical behaviour and polarity in driving collective cell migration. *Nat. Phys.*, pages 1–8, may 2020. [95](#), [123](#)
- [133] Raimon Sunyer, Vito Conte, Jorge Escribano, Alberto Elosegui-Artola, Anna Labernadie, Léo Valon, Daniel Navajas, J. M. Garcia-Aznar, J. J. Munoz, Pere Rocacuschs, and Xavier Trepas. Collective cell durotaxis emerges from long-range intercellular force transmission. *Science (80-.)*, 353(6304) :1157–1161, sep 2016. [120](#)
- [134] I. B. Bischofs, S. A. Safran, and U. S. Schwarz. Elastic interactions of active cells with soft materials. *Phys. Rev. E*, 69(2) :021911, feb 2004. [121](#)
- [135] Alexis Hubaud, Ido Regev, L Mahadevan, and Olivier Pourquié. Excitable Dynamics and Yap-Dependent Mechanical Cues Drive the Segmentation Clock. *Cell*, 171(3) :668–682.e11, oct 2017. [125](#)
- [136] Shuji Ishihara, Philippe Marcq, and Kaoru Sugimura. From cells to tissue : A continuum model of epithelial mechanics. *Phys. Rev. E*, 96(2) :022418, aug 2017. [125](#)