



HAL
open science

Réponse biomécanique de cellules épithéliales à l'activation de l'oncoprotéine Src

Nastassia Pricoupenko

► **To cite this version:**

Nastassia Pricoupenko. Réponse biomécanique de cellules épithéliales à l'activation de l'oncoprotéine Src. Cancer. Université Paris sciences et lettres, 2022. Français. NNT : 2022UPSLS054 . tel-04842238

HAL Id: tel-04842238

<https://theses.hal.science/tel-04842238v1>

Submitted on 17 Dec 2024

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 PSL

Préparée à l'Institut Curie
au Laboratoire Physico-Chimie Curie

**Réponse biomécanique de cellules épithéliales à
l'activation de l'oncoprotéine Src**

Soutenue par

Nastassia Pricoupenko

Le 4 octobre 2022

École doctorale n°564

Physique en Ile-de-France

Spécialité

Biophysique

Composition du jury :

Nicolas Borghi

Université de Paris

Président

Emmanuèle Helfer

Centre Interdisciplinaire de
Nanoscience de Marseille

Rapportrice

Thomas Boudou

Laboratoire Interdisciplinaire de
Physique

Rapporteur

Mathieu Coppey

Institut Curie

Examineur

Isabelle Bonnet

Sorbonne Université, Institut Curie

Directrice de thèse

Résumé

Au cours de la progression tumorale, les cellules acquièrent de nouvelles caractéristiques biomécaniques qui affectent la façon dont elles interagissent avec leur environnement. Ces changements biomécaniques peuvent d'ailleurs leur conférer un avantage sur les cellules normales pour envahir les tissus environnants.

Nous nous sommes intéressés à l'oncoprotéine Src, suractivée dans de nombreux cancers et associée à la survenue de métastases. L'objectif de cette thèse a été de caractériser la réponse biomécanique de cellules uniques à l'activation de Src. Nous avons choisi l'optogénétique pour contrôler dans le temps et de façon réversible, l'activation de Src dans des cellules épithéliales en culture, déposées sur des gels de polyacrylamide. En parallèle, nous avons caractérisé le phénotype biomécanique des cellules transformées en utilisant, d'une part, la Microscopie de Force de Traction (TFM) et en observant, d'autre part, le cytosquelette des cellules.

Nous avons d'abord montré que des cellules isolées Src-activées réorganisent leur cytosquelette et changent leur phénotype mécanique : elles s'étalent et accroissent leur contractilité. Notre étude a également permis d'identifier différentes voies de signalisation impliquées dans ce changement de phénotype mécanique. De manière intéressante, l'augmentation de la contractilité des cellules Src-transformées ne repose pas sur l'activation de Rho mais sur l'activation de la kinase MLCK, et sur un flux de calcium provenant en partie du réticulum endoplasmique. Afin de mieux comprendre les interactions de cellules transformées avec leur environnement, nous avons ensuite étudié l'influence de la rigidité du substrat sur la réponse mécanique des cellules à l'activation de Src. Nous avons identifié une rigidité particulière, autour de 10 kPa, pour laquelle le changement de phénotype mécanique est maximal.

Notre étude apporte un nouvel éclairage sur les changements biomécaniques des cellules transformées au début de la tumorigenèse et révèle comment la mécanosensibilité cellulaire est altérée.

Abstract

During tumoral progression, cells acquire new biomechanical properties, which affect the way they interact with their environment. These biomechanical changes may give them an advantage over normal cells to invade surrounding tissues.

We are interested on the Src oncoprotein, which is overactivated in many cancers and involved in their metastatic spread. The aim of this thesis was to characterize the biomechanical response of single cells to Src activation. We chose optogenetics to control in time and in a reversible way, the activation of Src in cultured epithelial cells, deposited on polyacrylamide gels. In parallel, we characterized the biomechanical phenotype of transformed cells by using Traction Force Microscopy (TFM) and by observing their cytoskeleton.

We first showed that isolated Src-activated cells reorganize their cytoskeleton and change their mechanical phenotype : they spread and increase their contractility. Our study also identified different signaling pathways involved in this change of mechanical phenotype. Interestingly, the increase in contractility of Src-transformed cells does not rely on Rho activation but on MLCK activation, and on a calcium influx coming in part from the endoplasmic reticulum. To better understand the interactions of transformed cells with their environment, we then studied the influence of substrate rigidity on the mechanical response of cells to Src activation. We identified a particular rigidity, around 10 kPa, for which the change in mechanical phenotype is maximal.

Our study sheds new light on the biomechanical changes of transformed cells in the early stage of cancer and reveals how cell mechanosensitivity is affected.

Remerciements

La thèse est une expérience inoubliable. C'était une aventure au chemin imprévisible, faite de moments merveilleux mais aussi de moments difficiles, qui n'aurait pas été aussi riche humainement et scientifiquement sans le soutien de beaucoup de personnes que j'aimerais remercier ici.

Tout d'abord, je remercie ma directrice de thèse, Isabelle Bonnet, qui m'a accueillie en stage puis en thèse, pour m'avoir guidée dans ces recherches pendant quatre ans, d'avoir toujours été présente et disponible quand j'en avais besoin, d'avoir mis autant d'énergie pour faire avancer ce projet. Merci d'avoir toujours été dynamique et efficace, de m'avoir motivée quand j'avais des doutes, de m'avoir appris à communiquer sur mon sujet, de m'avoir fait découvrir un domaine de recherche passionnant. Je garderai de très bons souvenirs de ces longues après-midi à tourner dans tous les sens les courbes, à chercher des mécanismes moléculaires pour arriver à dérouler un fil. C'était une véritable aventure, semée d'embûches et je pense qu'en quatre ans, nous avons réussi à débroussailler un terrain bien miné. Il reste beaucoup à faire, comme nous aimons à le dire, « l'escape game » continue toujours.

J'aimerais ensuite remercier tous les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail, pour cette discussion très agréable et intéressante lors de ma soutenance. Je remercie en particulier Emmanuèle Helfer et Thomas Boudou, mes rapporteurs, pour leur lecture attentive du manuscrit et pour leurs commentaires. Je remercie également les membres de mon comité de thèse, Mathieu Coppey et Claire Wilhelm pour leurs encouragements et leurs conseils tout au long de cette thèse.

J'aimerais remercier chaleureusement tous mes collaborateurs, qui m'ont apporté leur soutien et leur expertise :

-Olivier Destaing pour son optimisme légendaire et sa passion pour la biologie, pour m'avoir toujours remotivée dans les moments de doute, pour ses conseils, pour toutes nos discussions de biologie et pour toutes les constructions optogénétiques sans lesquelles mon projet n'aurait pas pu exister.

-Maxime Liboz et Clément Campillo d'avoir accepté de faire ces expériences d'AFM avec moi. Ces expériences m'ont laissé d'excellents souvenirs entre prières à « Saint Lamellipodia » et veillées joyeuses au laboratoire d'Evry.

-Carles Blanch Mercader et Philippe Marcq pour avoir apporté votre expertise théorique et pour toutes nos discussions sur le projet tissu. Il y a encore tant à comprendre et tant à faire sur le comportement collectif des cellules !

-Andrew Callan Jones pour toutes nos discussions sur la mécanosensibilité des cellules, les matinées à essayer de modéliser mes résultats parfois déroutants.

-Toute la plateforme BMBC de l'UMR 168 pour son aide précieuse : merci à Fahima Di Federico pour les constructions de plasmides, merci à Fanny Tabarin et Aude Battistella pour m'avoir appris la culture cellulaire, pour m'avoir toujours aidée dans mes expériences lorsque j'en avais besoin, pour toutes nos discussions personnelles et scientifiques. Je remercie en particulier Fanny Tabarin pour avoir réalisé nombre de lignées cellulaires essentielles dans l'avancée de mon projet !

Je remercie le labex IPGG ainsi que la fondation ARC pour avoir financé cette thèse.

Je remercie chaleureusement tous les membres de mon équipe PhysicoBiologie aux Méso-Échelles, toutes ces personnes qui ont su donner de bons conseils, avec qui il était toujours bon d'avoir une discussion en salle de manipe, en salle de culture ou dans les bureaux, dans le désordre : Pascal, Axel, Sylvie, Thomas, Thibault, Artem, Trinish, Xingming, Hsiang, Flavia, Brice, Sarah, Pierre, Pauline, Caroline et Mathilde. J'aimerais remercier en particulier Sylvie pour sa gentillesse et son aide en biologie, Thomas pour nos discussions de TFM et son optimisme, Artem pour m'avoir initiée au western blot, Thibault pour toutes nos discussions, pour m'avoir initiée à Inskcape, et pour ton carrot cake, Caroline pour ses conseils et toutes nos discussions cuisine/écologie/féminisme, Pierre pour toutes nos discussions en salle de culture sur nos galères expérimentales et pour avoir été mon interlocuteur préféré pour parler inhibiteurs/mécanismes moléculaires, Pauline pour son énergie et pour tous nos joggings sur la coulée verte châillonnaise, Hsiang pour sa gentillesse et ses petites attentions, Flavia, pour sa bienveillance, son soutien à la fin de cette thèse et à qui j'ai eu le plaisir de transmettre mes combines expérimentales.

Je remercie tous les membres du bureau 216 b, bureau à la température tropicale, où il faisait bon vivre et travailler : merci Thibault, Antoine, Henri et Caroline !

J'aimerais remercier aussi tous les membres de l'UMR 168 de l'Institut Curie pour son ambiance très chaleureuse, stimulante et sympathique. Je remercie toutes ces personnes que je ne cite pas ici mais qui se reconnaîtront pour les longues discussions en salle de culture ou dans les couloirs du labo qui m'ont toujours motivée entre deux manipes compliquées. En particulier, je remercie tous ces compagnons de galères que je rencontrais à des horaires improbables au labo : Lucie, Oleg et Achille, nos discussions m'ont toujours donné du courage dans les longues soirées d'expériences ! Merci aussi à Jean pour tous nos échanges en particulier nos discussions d'optogénétique.

Je remercie tout le service administratif pour leur aide précieuse, notamment Nathanaële pour son efficacité redoutable et sa bonne humeur et Brigitte, qui me donnait tous les jours envie d'aller travailler.

Je remercie aussi Pascal Martin et Thomas Risler avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler pour la License Frontières du Vivant du CRI !

J'aimerais remercier mes précédent.e.s directeurs/directrices de stage pour m'avoir initiée et donné le goût de la recherche expérimentale à la frontière entre la physique et la biologie : Sophie Cribier et Nicolas Rodriguez, Laurin Ginner et Rainer Leitgeb, Thierry Gallopin.

Je tiens à remercier tous mes ami.e.s qui m'ont apporté tant de réconfort, fait oublier mes déceptions expérimentales et m'ont accompagnée pendant ces années, entre périodes sombres et périodes plus lumineuses : toutes mes partenaires de course (Pauline, Alice et Mathilde à différents moments de cette thèse), mon amie de toujours Elora, une personne merveilleuse, pour son soutien et ses conseils, les Queneau, la bande de l'Ardèche pour les soirées et vacances exceptionnelles passées ensemble, la

bande de Sommerère pour les nombreux week-end à la campagne et les soirées déguisées, les Supops que j'aurais hélas moins vus mais toujours avec un grand plaisir et tous les autres que je ne cite pas ici.

Je remercie infiniment toute ma famille pour leur soutien à toutes épreuves depuis tant d'années. En particulier merci à mes parents qui m'ont accompagnée, motivée et qui m'ont toujours relevée dans les moments difficiles, de m'avoir transmis la valeur du travail et de m'avoir appris à être résiliente, mon père pour m'avoir donné tôt le goût des Sciences, Saphia pour sa bienveillance, mon frère pour sa joie de vivre et son soutien depuis toujours, ma sœur pour ses attentions, sa gentillesse et nos vacances d'été dans le Sud, mon papy pour tous ses conseils avisés et ses encouragements, ma belle-famille pour les nombreux séjours ressourçants dans la Sarthe ou à Gadagne.

Enfin j'aimerais remercier tout particulièrement deux personnes sans qui cette aventure aurait été beaucoup moins belle :

Mathilde, ma camarade de galère et grande amie, avec qui j'ai tout partagé ces dernières années et grâce à qui j'ai beaucoup appris ! Merci de m'avoir épaulée, d'avoir illuminé mes journées au labo par ta présence, pour tous ces petits thés, ces pauses rue de l'estrapade, rebaptisée "rue de l'escapade", pour toutes nos discussions personnelles, philosophiques et scientifiques ! Merci d'être une personne aussi joyeuse et inspirante !

Pierre, pour son soutien infaillible depuis tant d'années, d'avoir accepté de me partager avec mes cellules, de m'avoir supportée lorsque j'étais insupportable, d'avoir célébré avec moi les joies, de m'avoir consolée et remotivée dans les moments difficiles. Merci de rendre ma vie toujours plus belle !

Dans cette thèse, nous nous intéressons aux changements de propriétés biomécaniques des cellules épithéliales soumises à une perturbation signalétique particulière : la suractivation de l'oncoprotéine Src. Cette protéine se retrouve suractivée dans de nombreux cancers humains et cette suractivation a été associée au caractère malin des cellules cancéreuses. Le manuscrit comporte 5 chapitres qui visent d'abord à étudier la cellule isolée puis la cellule en interaction avec son environnement :

- Dans le **Chapitre I**, nous décrivons les propriétés mécaniques des cellules épithéliales, les outils *in vitro* pour les mesurer, l'oncoprotéine Src et enfin l'approche que nous avons choisie pour mesurer le changement de phénotype mécanique ainsi que les changements dans l'organisation du cytosquelette associés à une suractivation de Src
- Dans le **Chapitre II**, nous décrivons les méthodes d'analyse et les protocoles expérimentaux utilisés pour mener cette étude.
- Dans le **Chapitre III**, nous caractérisons le phénotype mécanique de la cellule Src-activée et l'organisation de son cytosquelette ainsi que les voies moléculaires responsables de ces changements.
- Dans le **Chapitre IV**, nous étudions la mécanosensibilité de cette cellule transformée vis-à-vis de la rigidité de son substrat.
- Dans le **Chapitre V**, nous faisons un bilan des principaux résultats obtenus et discutons des différentes perspectives de cette étude.

Table des matières

I	Introduction	1
1	Mise en contexte	2
2	Description mécanique de la cellule épithéliale	3
2.1	Description mécanique d'une cellule épithéliale isolée	3
2.1.1	Acteurs biologiques impliqués dans la production de force	3
2.1.2	Mécanismes de la génération de forces	6
2.2	L'environnement direct de la cellule épithéliale	7
2.2.1	Matrice extracellulaire	8
2.2.2	Cellules voisines : le tissu épithélial	9
2.3	Interaction avec la matrice extracellulaire	11
2.3.1	Adhésions cellulaires à la MEC	11
2.3.2	Mécanosensibilité et mécanotransduction au niveau des adhésions focales	13
2.4	Altération du phénotype mécanique de la cellule cancéreuse	16
2.4.1	Altérations physiologiques des cellules cancéreuses	16
2.4.2	Étapes de la carcinogenèse	16
2.4.3	De l'importance de la mécanique dans le cancer	17
2.4.4	Altérations des propriétés mécaniques des cellules cancéreuses	18
3	Les outils pour étudier le phénotype mécanique des cellules	20
3.1	Les systèmes <i>in vitro</i> sont particulièrement adaptés à l'étude du phénotype mé- canique	20
3.2	Mesure des propriétés mécaniques de cellules isolées	20
3.2.1	Méthodes de contact	21
3.2.2	Méthodes optiques	23
3.2.3	Méthodes non invasives	23
3.3	Microscopie de forces de traction (TFM)	23
3.3.1	Historique	23
3.3.2	Principe d'une expérience de TFM	24
3.3.3	Approche analytique	25
3.3.4	Une alternative à la TFM : la méthode des micro-piliers	27
3.3.5	Détermination des forces de traction en 3D	28

3.3.6	Relation entre forces de traction et propriétés morphologiques des cellules	28
4	Src, acteur de la mécanique cellulaire et de la progression tumorale	29
4.1	Src : découverte, caractéristiques et mécanisme	29
4.1.1	Rétrospective historique	29
4.1.2	Structure de Src et localisation	30
4.2	Rôle de Src dans la mécanique cellulaire	31
4.2.1	Rôle de Src dans les système adhésifs de la cellule	31
4.2.2	Rôle de Src dans la mécanotransduction	31
4.2.3	Rôle de Src dans la migration cellulaire	31
4.3	Rôle de Src dans le processus tumoral	32
4.3.1	Dérégulation de Src dans les cancers	32
4.3.2	Src, une cible thérapeutique	34
4.4	Études <i>in vitro</i> sur la suractivation de Src	35
4.5	Src et la compétition cellulaire	37
5	Notre approche pour étudier le phénotype mécanique de cellules Src-activées	39
5.1	Questions posées	39
5.2	L'optogénétique pour suractiver Src	39
5.2.1	Principe de l'optogénétique	39
5.2.2	Avantages et limitations de l'optogénétique	39
5.2.3	Le système CRY2-CIBN	40
5.2.4	L'optoSrc, une version photoactivable de Src	41
5.2.5	Autres constructions optogénétiques permettant de contrôler l'activation de Src	44
5.3	La microfabrication pour contrôler l'environnement cellulaire	45
5.3.1	Contrôle de la rigidité du substrat	45
5.3.2	Contrôle du voisinage	46
5.4	Étude du cytosquelette et des mécanismes moléculaires	48
II	Matériel et méthodes	49
1	Biologie cellulaire	50
1.1	Lignées cellulaires	50
1.2	Culture cellulaire	51
2	Acquisition des images	51
3	Photoactivation	52
4	Réalisation des gels de PAA pour les expériences de TFM	54
4.1	Protocole de fabrication des gels uniformes	54
4.2	Protocole de fabrication des gels "patternés"	56
4.3	Caractérisation des gels	58

5	Réalisation des expériences de TFM	59
6	Mesure des forces de traction	60
6.1	Mesure du déplacement des billes fluorescentes	60
6.2	Reconstruction du champ de forces de traction	61
7	Analyse des expériences de TFM à l'échelle de la cellule isolée	62
7.1	Contour des cellules	62
7.2	Critères de sélection des cellules analysées	62
7.3	Influence du masque de la cellule pour la mesure des forces	62
7.4	Grandeurs mesurées	63
7.5	Calcul du gain/changement maximal des grandeurs mesurées pendant l'activation de Src	65
8	Microscopie de Force Atomique (AFM)	65
8.1	Description du dispositif utilisé	65
8.2	Procédure expérimentale	66
9	Approche pharmacologique	67
10	Visualisation du cytosquelette	70
10.1	Réalisation des expériences	70
10.2	Mesure du flux rétrograde d'actine	70
10.3	Analyse des adhésions focales	71
10.4	Analyse des fibres de stress	72
11	Probabilité et durée d'arrondissement	72
12	Tests statistiques	72

III Phénotype mécanique des cellules Src-transformées **73**

1	Description du phénotype mécanique des cellules Src-activées	74
1.1	Mesure du phénotype mécanique	75
1.2	Expériences contrôles	78
1.2.1	Inhibition de Src	78
1.2.2	Src à la membrane <i>vs.</i> Src cytoplasmique	78
1.2.3	Effet de la lumière bleue	80
1.2.4	Effet des paramètres d'activation en lumière bleue	80
1.2.5	Effet de la puissance lumineuse	80
1.2.6	Effet de la durée d'activation de Src	81
1.3	Caractérisation AFM du phénotype mécanique : mesure du volume et de la rigidité corticale	82
1.4	Effet du type cellulaire	83
2	Mécanismes moléculaires à l'origine du phénotype mécanique	85
2.1	Acteurs impliqués dans l'étalement des cellules Src-activées	86

2.2	Acteurs impliqués dans l'augmentation de contractilité des cellules Src-activées	88
2.2.1	Inhibition des myosines II	89
2.2.2	Voie de contractilité RhoA/ROCK	90
2.2.3	Voie de contractilité : MRCK/Cdc42	91
2.2.4	Voie de contractilité MLCK	93
2.2.5	Origine du flux de calcium intracellulaire	94
3	Caractérisation de la réponse biologique	97
3.1	Dynamique de l'actine filamenteuse	97
3.2	Réorganisation des adhésions	98
3.3	Réorganisation des fibres de stress	99
4	État mécanique après l'activation de Src	103
4.1	Arrondissement des cellules après l'activation transitoire de Src	103
4.1.1	Description du phénomène	103
4.1.2	Arrondissement des cellules : un phénomène lié à la destruction des adhésions ?	104
4.1.3	Contribution de l'"arrondissement" au phénotype mécanique	106
4.2	Étalement et contractilité des cellules après l'activation de Src	107
5	Discussion	108
5.1	Pertinence du système choisi	108
5.2	Src coordonne un gain en étalement et en contractilité	109
5.2.1	Couplage entre l'étalement et le gain en contractilité des cellules Src-activées ?	109
5.2.2	Gain en contractilité des cellules Src-activées <i>vs.</i> RhoA-activées	112
5.3	Le gain en contractilité est MLCK-dépendant et ROCK-indépendant	112
5.4	L'activation de Src induit un flux de calcium	113
5.5	Ré-arrangement du cytosquelette des cellules Src-activées	115
5.6	Phénotype mécanique des cellules Src-activées : un avantage sur les cellules normales ?	115
5.7	Arrondissement des cellules après l'activation transitoire de Src	116
5.8	Perte mécanique après l'activation	117
5.9	Importance du temps d'activation de Src	118
5.10	Phénotype mécanique d'un groupe de cellules Src-activées	120

IV Mécanosensibilité des cellules Src-transformées 121

1	Influence de la rigidité du substrat sur le phénotype mécanique de la cellule normale et cancéreuse	122
1.1	Comment la cellule sent-elle la rigidité de son substrat ?	122
1.2	Adaptation du phénotype cellulaire à la rigidité du substrat	123

1.3	Mécanosensibilité des cellules cancéreuses à la rigidité du substrat	131
2	La réponse à l'activation de Src est mécanosensible	134
2.1	Mécanosensibilité des cellules MDCK OS avant activation	134
2.2	Mécanosensibilité des cellules MDCK Src-activées	135
2.3	Comparaison avec la mécanosensibilité des cellules normales	138
2.4	Mesures AFM des cellules Src-activées en fonction de la rigidité du substrat . .	139
2.5	Étalement des cellules Src-activées sur le verre	142
3	Effet de la rigidité du substrat sur la réorganisation du cytosquelette des cellules Src-activées	142
3.1	Dynamique de l'actine filamenteuse	142
3.2	Réorganisation du système adhésif	144
3.3	Réorganisation du réseau de fibres de stress	146
3.4	Phénotype mécanique des cellules MDCK après l'activation transitoire de Src en fonction de la rigidité du substrat	149
3.5	Rôle des adhésions dans la réponse mécanosensible des cellules à l'activation transitoire de Src	151
4	Discussion	153
4.1	Mécanosensibilité des cellules MDCK avant activation	153
4.2	Mécanosensibilité des cellules Src-activées	156
V	Conclusion & Perspectives	160
1	Principaux résultats	160
2	Bilan	162
2.1	Caractériser le phénotype mécanique des cellules transformées sur des substrats de rigidité physiologique...	162
2.2	...et dans le temps	163
2.3	Des outils adaptés à l'étude du phénotype mécanique dans le temps sur des substrats de rigidités physiologiques	163
2.4	Identifier des "marqueurs mécaniques"	164
3	Questions ouvertes	164
3.1	Trouver la cascade d'activation à l'origine du changement de phénotype mécanique des cellules Src-activées	164
3.2	Lier la réorganisation du réseau de fibres de stress au gain en contractilité des cellules Src-activées	165
3.3	Comprendre la perte de force après l'activation de Src	165
3.4	Modéliser la mécanosensibilité des cellules épithéliales MDCK normales et Src-activées	166
4	Perspectives	166

4.1	Des stratégies pour limiter le changement de phénotype mécanique des cellules Src-activées?	166
4.2	Que se passe-t-il à l'échelle du tissu?	167
4.3	Que se passe-t-il en 3D?	168
Annexes		169
A Méthode de PIV		170
B Reconstruction du champ de forces de traction		171
1	Procédure de régularisation	171
2	Qualité de la reconstruction	172
3	Méthode BFTTC : choix de "stratégie" et influence de la rigidité du substrat	173
3.1	"Stratégies" de reconstruction des forces de traction	173
3.2	Influence de la rigidité du substrat sur le facteur de régularisation	175
4	Comparaison des méthodes de reconstruction FTTC (plugin Fiji) et BFTTC	175
C Autres séquences d'activation de Src		178
1	Réponse mécanique des cellules MDCK à l'activation soutenue de Src	178
2	Réponse mécanique des cellules MDCK à des cycles d'activation/désactivation de Src	178

Table des figures

I.1	Plan de l'étude	2
I.2	Les différentes organisations de l'actine d'une cellule adhérente	4
I.3	Les différentes fibres de stress d'une cellule adhérente	5
I.4	Mécanismes de génération de forces dans les cellules	7
I.5	Adhésions et polarité apico-basale d'un tissu épithélial	9
I.6	Contraintes intercellulaires au niveau des jonctions adhérentes	10
I.7	Adhésions de la cellule à son environnement	11
I.8	Étapes de maturation des adhésions focales	12
I.9	Mécanotransduction au niveau des adhésions focales	14
I.10	La mécanotransduction, un processus rapide	15
I.11	Étapes constituant la "cascade métastatique"	17
I.12	Propriétés mécaniques des cellules cancéreuses	18
I.13	Méthodes pour mesurer les propriétés mécaniques de cellules isolées	21
I.14	Mesure des forces de traction par la méthode de TFM	24
I.15	Principe de la TFM	25
I.16	Procédure de régularisation en FTTC	26
I.17	Méthode des micro-piliers pour la mesure des forces de traction	27
I.18	Influence des paramètres géométriques sur l'amplitude des forces de traction	28
I.19	Structure et fonctionnement de l'oncoprotéine Src	30
I.20	Rôle de Src dans les systèmes adhésifs de la cellule	32
I.21	Src, acteur de la progression tumorale	34
I.22	Effets de la suractivation de Src sur la morphologie, le cytosquelette et les propriétés mécaniques des cellules	37
I.23	Compétition entre des cellules suractivant Src et des cellules normales	38
I.24	Système optogénétique CRY2-CIBN	41
I.25	Le système optoSrc	42
I.26	Activation de l'optoSrc (OS) dans des cellules MDCK	43
I.27	Système optogénétique Light-R pour contrôler l'activation de Src dans les cellules	44
I.28	Gamme de rigidité cellulaire chez l'Homme	45
I.29	Utilisation de micro-patrons de fibronectine pour contrôler la géométrie, le cytosquelette de cellules épithéliales et pour la mesure de forces de traction	47

II.1	Contrôle de l'illumination en lumière bleue : contrôle spatial et temporel	53
II.2	Séquences d'illumination en lumière bleue pour contrôler la suractivation de Src dans les cellules	53
II.3	Protocole pour la réalisation de gels de TFM uniformes	56
II.4	Protocole pour la réalisation des gels TFM patternés	57
II.5	Étapes d'une expérience de TFM sur gel uniforme, pour la caractérisation du phénotype mécanique de cellules isolées	59
II.6	Méthode BFTTC pour la reconstruction des forces : paramètre de régularisation, facteur de qualité et choix du masque	63
II.7	Paramètres géométriques utilisés pour la caractérisation du phénotype mécanique	64
II.8	Images des leviers utilisés dans les expériences AFM présentées dans de ce manuscrit	66
II.9	Effet du DMSO sur la réponse mécanique des cellules Src-activées à une activation de Src de 1 h	67
II.10	Réalisation des expériences de mesure du flux rétrograde d'actine	71
II.11	Mesure du flux rétrograde d'actine	71
II.12	Analyse des fibres de stress contractiles	72
III.1	Caractérisation du phénotype mécanique de cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src de 1 h	74
III.2	Les cellules Src-activées sont plus étalées, plus contractiles et ont une une forme et une distribution des forces plus isotropes que des cellules normales	76
III.3	Comparaison du gain en force totale avec les autres métriques de la contractilité cellulaire	77
III.4	Le changement de phénotype mécanique des cellules MDCK OS photo-activées en lumière bleue est lié à l'activation de Src et à son recrutement à la membrane	79
III.5	Effet de la lumière bleue sur le phénotype mécanique de cellules MDCK wt	79
III.6	Influence de la puissance de la source de lumière bleue sur le phénotype mécanique des cellules Src-activées	80
III.7	Influence de la durée d'activation de Src sur le phénotype mécanique des cellules Src-activées	81
III.8	Rigidité corticale et volume des cellules Src-activées	82
III.9	Phénotype mécanique des cellules MEF Src-activées	83
III.10	Phénotype mécanique des cellules MEF Src-activées	84
III.11	L'étalement des cellules Src-activées est lié à l'activation de la voie Rac1-Arp2/3	86
III.12	Formation de filopodes dans les cellules MDCK Src-activées	87
III.13	Rôle de mDia dans l'étalement des cellules Src-activées	88
III.14	Voies de signalisation étudiées dans ce manuscrit, à l'origine de la phosphorylation des myosines II	89

III.15	Rôle des myosines II dans le phénotype mécanique des cellules Src-activées	90
III.16	Le gain en contractilité des cellules Src-activées est RhoA-ROCK indépendant . . .	91
III.17	Rôle de la voie de signalisation Cdc42/MRCK dans le gain en contractilité des cellules Src-activées	92
III.18	Le gain en contractilité des cellules Src-activées est MLCK-dépendant et repose sur une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire	94
III.19	Le gain en contractilité des cellules Src-activées est indépendant des canaux mécanosensibles mais dépend de l'activité du récepteur IP3	95
III.20	Mécanismes moléculaires proposés, à l'origine du changement de phénotype mécanique des cellules Src-activées	96
III.21	Flux rétrograde d'actine avant et pendant l'activation de Src	97
III.22	Réorganisation du système adhésif de la cellule Src-activée	98
III.23	Réorganisation des fibres de stress des cellules MDCK OS Src-activées	100
III.24	La réorganisation des fibres de stress des cellules Src-activées est ROCK-indépendante mais MLCK-dépendante	101
III.25	Réorganisation du cytosquelette des cellules MDCK Src-activées	102
III.26	"Arrondissement" d'une cellule après l'activation transitoire de Src	103
III.27	"Arrondissement" des cellules après l'activation transitoire de Src : influence de l'isotropie de forme	104
III.28	Effet de Mn^{2+} et de l'inhibition de FAK sur le phénomène d'arrondissement observé après l'activation de Src	105
III.29	Comparaison des réponses mécaniques des cellules qui s'arrondissent ou pas après l'activation transitoire de Src	106
III.30	Comparaison de l'état mécanique des cellules MDCK OS après l'activation de Src avec leur état d'avant activation	107
III.31	Influence de l'état mécanique avant activation et de la réponse mécanique à l'activation sur la perte mécanique	108
III.32	Relation entre étalement et force totale pour des cellules MDCK normales et Src-activées	110
III.33	Phénotype mécanique de cellules Src-activées déposées sur des micro-patrons adhésifs rectangulaires	111
III.34	Activation de RhoA <i>vs.</i> activation de Src : des stratégies différentes pour accroître le gain en contractilité des cellules	114
III.35	Arrondissement de cellules cancéreuses suite à l'inhibition de Src par le Dasatinib .	116
III.36	Perte de forces suite à l'étirement de cellules isolées	118
III.37	Réponse mécanique d'un groupe de cellules à une activation transitoire de Src . . .	119
IV.1	Mécanismes pour sentir la rigidité du substrat	123

IV.2	Effet de la rigidité du substrat sur l'étalement des cellules	124
IV.3	Effet de la rigidité du substrat sur les forces de traction générées par les cellules . .	125
IV.4	Effet de la rigidité du substrat sur les forces de traction générées par les cellules . .	126
IV.5	Effet de la rigidité du substrat sur la rigidité corticale des cellules	127
IV.6	Effet de la rigidité du substrat sur le cytosquelette cellulaire	128
IV.7	Transition isotrope-nématique du cytosquelette d'actine de fibroblastes en fonction de la rigidité du substrat	129
IV.8	Effet de la rigidité du substrat sur la vitesse de migration des cellules	130
IV.9	Mécanosensibilité des cellules transformées et cancéreuses	131
IV.10	Phénotype mécanique des cellules MDCK OS dans le noir 6 h après ensemencement, en fonction de la rigidité du substrat	134
IV.11	Réponse mécanique des cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src de 1 h en fonction de la rigidité du substrat sur lequel les cellules sont déposées	136
IV.12	Gain maximal en aire et en force totale, et changement maximal en anisotropie de forme et de force des cellules Src-activées, comparés à leur état avant activation . .	137
IV.13	Phénotype mécanique de cellules MDCK OS non illuminées en lumière bleue en fonc- tion de la rigidité du substrat sur lequel elles sont déposées	138
IV.14	Comparaison des mécanosensibilités des cellules MDCK OS normales et Src-activées	139
IV.15	Rigidité et volume des cellules MDCK OS normales et Src-activées, obtenues par mesure AFM, en fonction de la rigidité du substrat sur lequel elles sont déposées . .	140
IV.16	Rigidité dans la région lamellaire des cellules normales (avant activation) et des cel- lules Src-activées	141
IV.17	Étalement des cellules MDCK OS, soumises à une activation transitoire de Src sur du verre	141
IV.18	Flux rétrograde d'actine des cellules MDCK OS avant et pendant l'activation de Src en fonction de la rigidité du substrat sur lequel elles sont déposées	143
IV.19	Réorganisation du système adhésif des cellules MDCK OS lors de l'activation de Src en fonction de la rigidité du substrat	144
IV.20	Nombre et taille des adhésions focales des cellules MDCK OS soumises à une acti- vation transitoire de Src en fonction de la rigidité du substrat sur lequel elles sont déposées	145
IV.21	Disparition d'adhésions de cellules soumises à une activation transitoire de Src sur un substrat de 40 kPa	146
IV.22	Réorganisation du réseau de fibres de stress de cellules MDCK OS lors de l'activation de Src en fonction de la rigidité du substrat	147
IV.23	Disparition des fibres de stress dans des cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src sur un substrat de 40 kPa	148

IV.24	Aire totale et intensité totale du réseau de fibres de stress de cellules MDCK OS lors de l'activation de Src en fonction de la rigidité du substrat	149
IV.25	État mécanique des cellules MDCK OS après l'activation transitoire de Src en fonction de la rigidité du substrat	150
IV.26	"Arrondissement" d'une cellule après l'activation transitoire de Src	151
IV.27	Réponse mécanique des cellules MDCK OS en fonction de la rigidité du substrat, en présence d'ions manganèse	152
IV.28	Arrondissement des cellules MDCK OS après l'activation transitoire de Src, en fonction de la rigidité du substrat, en présence d'ions manganèse	153
IV.29	Taille des adhésions focales dans un tissu de MDCK en fonction de la rigidité du substrat	154
IV.30	Modèle de <i>molecular clutch</i>	154
V.1	Réponse mécanique d'un groupe de cellules déposé sur du verre à une activation prolongée de Src	167
A.1	Principe de la PIV	170
B.1	Mesure des forces de traction en utilisant la TFM	171
B.2	Présentation des trois stratégies de BFTTC qui peuvent être employées pour les forces de traction	173
B.3	Comparaison de stratégies pour la reconstruction des forces à partir de la méthode BFTTC	174
B.4	Paramètre de régularisation et facteur de qualité en fonction de la rigidité du substrat	175
B.5	Comparaison de la reconstruction des forces en utilisant plugin FTTC Fiji et celle obtenue avec la méthode BFTTC	177
C.1	Réponse mécanique des cellules MDCK OS soumises à une activation soutenue de Src	178
C.2	Réponse mécanique des cellules MDCK OS soumises à des cycles d'activation/désactivation de Src	179

Liste des tableaux

I.1	Récapitulatif des principaux outils utilisés pour la mesure des propriétés mécaniques des cellules	22
I.2	Conditions expérimentales et principaux résultats des études <i>in vitro</i> , mentionnées dans ce manuscrit, décrivant les effets de la suractivation de Src dans des cellules en culture	36
II.1	Lignées cellulaires utilisées dans les expériences	51
II.2	Réalisation des mélanges acrylamide/bis-acrylamide/eau pour la polymérisation de gel de PAA de module d'Young donné	55
II.3	Tableau comparatif des modules d'Young des gels de PAA mesurés par Tse et Engler et ceux obtenus pour nos gels de PAA, avec ou sans bille fluorescente, en utilisant un AFM	58
II.4	Tableau donnant les paramètres utilisés pour la PIV itérative réalisée avec plugin Fiji <i>iterative PIV</i>	60
II.5	Caractéristiques des leviers et pointes utilisés dans les expériences AFM	66
II.6	Récapitulatif des drogues utilisées et les mécanismes d'action associés	68
II.7	Récapitulatif des drogues utilisées dans les expériences	69

Liste des abréviations

ADP	Adénosine Di-Phosphate
AF	Adhésion Focale
AFM	Atomic Force Microscopy, Microscopie de Force Atomique
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BFTTC	Bayesian Fourier Transform Traction Cytometry
BIS	N,N-méthylène bisacrylamide
Caax	Cysteine, aliphatic amino acid, any amino acid (x)
CIBN	truncated Cryptochrome-Interacting Basic- helix-loop-helix
CRC	Cancer colorectal
CRISPR-Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9 protein
CRY2	Arabidopsis cryptochrome 2
ddH₂O	double distilled water
DMD	Digital Micromirror Device
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FAK	Focal Adhesion Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
FTTC	Fourier Transform Traction Cytometry
GFP	Green Fluorescent Protein
iRFP	near-infraRed Fluorescent Protein
JA	Jonction Adhérente
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MRLC	Myosin Regulatory Light Chain
OS	optoSrc
PBS	Phosphate Buffered Saline
PAA	Polyacrylamide
PDMS	Polydimethylsiloxane
PIV	Particle Image Velocimetry
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
RSV	Rous Sarcoma Virus
siRNA	Small interfering Ribonucleic Acid

SEM	Scanning Electron Microscopy
SF	Stress Fibers, fibres de stress
SFK	Src Family of Kinases
SH2-SH3	Src Homology domain 2-3
TEM	Transition Épithélio-Mésenchymateuse
TFM	Traction Force Microscopy
TGF	Transforming Growth Factor
TRP	Transient Receptor Potential
VEGF	Vascular endothelial growth factor
wt	wild type

Rhéologie : lexique

Contrainte : La contrainte $\bar{\sigma}$ est un tenseur d'ordre 2. Elle correspond à la force \vec{F} exercée sur un objet par unité de surface. Elle s'exprime en Pascal, Pa, ou (N/m²) : 1 Pa correspond à 1 pN/μm².

On considère dans la suite un objet soumis à une contrainte $\bar{\sigma}$ sur une de ses faces. Soit \vec{n} le vecteur unitaire normal à la surface sur laquelle la contrainte est appliquée.

Contrainte normale : Contrainte associée aux forces appliquées perpendiculairement au plan de la face considérée. La force \vec{F} est donc parallèle à \vec{n} .

- si $\vec{F} \cdot \vec{n} > 0$: **contrainte de compression**
- si $\vec{F} \cdot \vec{n} < 0$: **contrainte d'extension**

Contrainte de cisaillement : Contrainte associée aux forces agissant parallèlement ou tangentielllement au plan de la face considérée : la force \vec{F} est perpendiculaire à \vec{n} .

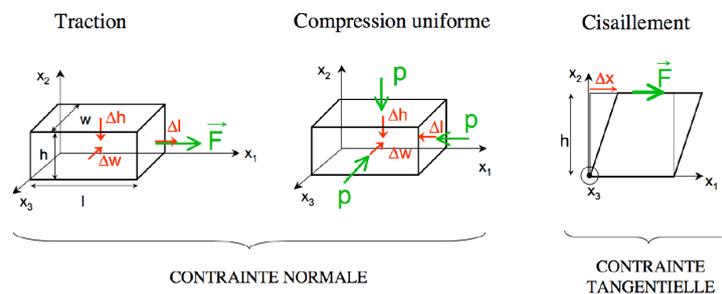
Pour une **contrainte uniaxiale** ($\bar{\sigma}$ est alors un scalaire) et si l'objet a un **comportement élastique linéaire**, on définit deux paramètres : le module d'Young E et le coefficient de poisson ν . La relation reliant la contrainte exercée σ à la déformation ϵ (allongement relatif) s'écrit :

$$\sigma = E\epsilon \text{ avec } \mathbf{E} : \text{module d'Young (Pa)} \text{ et } \epsilon = \frac{l - l_0}{l_0} = \frac{\Delta l}{l} \quad (1)$$

Si $\epsilon > 0$: contrainte d'extension. Si $\epsilon < 0$: contrainte de compression

Souvent, l'objet se contracte dans le plan perpendiculaire à l'étirement, le **coefficient de poisson** ν , sans unité, correspond au rapport de la déformation transverse sur la déformation en allongement.

$$\nu = -\frac{\frac{\Delta w}{w}}{\epsilon} \text{ avec } -1 \leq \nu \leq \frac{1}{2} \text{ (objet incompressible)} \quad (2)$$



Déformations sous contraintes normales et tangentielles. Extrait du polycopié de cours de F. Elias (Elias, 2018).

Rigidité : valeur maximale de la contrainte qui peut être tolérée par un objet avant sa défaillance. Dans ce manuscrit, nous emploierons abusivement le terme de **rigidité** pour désigner le **module d'Young** (en Pa) de la cellule ou de son substrat.

Chapitre I

Introduction

Table des matières

1	Mise en contexte	2
2	Description mécanique de la cellule épithéliale	3
2.1	Description mécanique d'une cellule épithéliale isolée	3
2.2	L'environnement direct de la cellule épithéliale	7
2.3	Interaction avec la matrice extracellulaire	11
2.4	Altération du phénotype mécanique de la cellule cancéreuse	16
3	Les outils pour étudier le phénotype mécanique des cellules	20
3.1	Les systèmes <i>in vitro</i> sont particulièrement adaptés à l'étude du phénotype mécanique	20
3.2	Mesure des propriétés mécaniques de cellules isolées	20
3.3	Microscopie de forces de traction (TFM)	23
4	Src, acteur de la mécanique cellulaire et de la progression tumorale	29
4.1	Src : découverte, caractéristiques et mécanisme	29
4.2	Rôle de Src dans la mécanique cellulaire	31
4.3	Rôle de Src dans le processus tumoral	32
4.4	Études <i>in vitro</i> sur la suractivation de Src	35
4.5	Src et la compétition cellulaire	37
5	Notre approche pour étudier le phénotype mécanique de cellules Src-activées	39
5.1	Questions posées	39
5.2	L'optogénétique pour suractiver Src	39
5.3	La microfabrication pour contrôler l'environnement cellulaire	45
5.4	Étude du cytosquelette et des mécanismes moléculaires	48

1 Mise en contexte

Au cours du processus tumoral, les propriétés mécaniques des cellules cancéreuses et de leur environnement évoluent. De nombreuses études ont montré que l'évolution de ces propriétés jouait un rôle essentiel dans la progression tumorale : de la transformation oncogénique, qui correspond à l'initiation du processus tumoral au développement des métastases. Les cellules cancéreuses modifient et adaptent leurs propriétés mécaniques en fonction de l'environnement dans lequel elles évoluent, ce qui leur permet, entre autres, d'échapper aux processus de régulations physiologiques. Cette adaptation leur est nécessaire pour survivre et proliférer dans des conditions difficiles. Il est donc important de comprendre les changements des propriétés mécaniques des cellules transformées au cours du processus tumoral.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'effet de la suractivation de l'oncoprotéine Src (expression de l'oncogène *c-src*) sur les propriétés mécaniques de cellules épithéliales. La protéine Src se trouve suractivée dans de nombreux cancers humains et sa suractivation a été associée à une augmentation du pouvoir invasif des cellules et au développement de métastases. Dans nos expériences, les cellules sont soumises à une suractivation transitoire de Src (d'une durée de 1 h), soutenue (pendant plusieurs h) ou des cycles d'activation courts et répétés. En particulier nous avons étudié le "phénotype mécanique" des cellules, terme qui englobe les aspects géométriques (aire d'étalement, isotropie de forme) et dynamiques (amplitude et distribution des forces exercées par la cellule) en réponse à la suractivation de Src (Chapitre III). La cellule n'est pas seule, elle interagit avec son environnement "direct" : le support sur lequel elle repose (la matrice extracellulaire MEC) mais aussi les cellules voisines. Nous avons choisi d'étudier un aspect de ces interactions : l'effet de la rigidité de la MEC sur le phénotype de la cellule Src-activée (Chapitre IV) (Figure I.1).

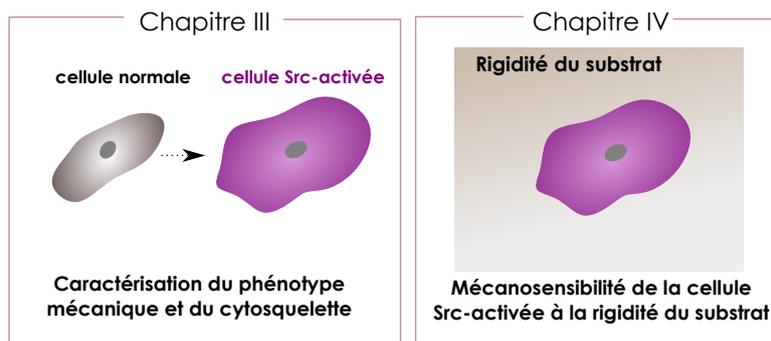


FIGURE I.1 – Plan de ce manuscrit sur l'étude du phénotype mécanique des cellules Src-activées

Dans ce chapitre d'introduction, nous décrivons les propriétés mécaniques de la cellule épithéliale. Nous présentons ensuite les outils *in vitro* qui ont été développés pour étudier le phénotype mécanique des cellules. Cette partie est suivie d'une présentation de la protéine Src, qui fait l'objet de notre étude : Src est à la fois un acteur important de la mécanique cellulaire mais aussi un protagoniste de la progression tumorale. Enfin, nous présentons l'approche que nous avons adoptée pour étudier le

phénotype mécanique des cellules transformées par la suractivation de Src.

2 Description mécanique de la cellule épithéliale

Dans cette partie, nous décrivons les acteurs biologiques qui interviennent dans les mécanismes de production de forces cellulaires à l'échelle de la cellule épithéliale individuelle puis nous décrivons les interactions de la cellule avec son "environnement physique" direct : son substrat et ses cellules voisines.

2.1 Description mécanique d'une cellule épithéliale isolée

2.1.1 Acteurs biologiques impliqués dans la production de force

L'architecture de la cellule épithéliale et ses propriétés mécaniques sont assurées par un réseau organisé et complexe de biopolymères (Bausch & Kroy, 2006). Ce réseau est constitué principalement de trois types de filaments : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules (Alberts *et al.*, 2017). Ces filaments peuvent être associés à des moteurs moléculaires, qui transforment une énergie chimique (hydrolyse de l'ATP en ADP) en une énergie mécanique (Iino *et al.*, 2020). Parmi ces moteurs moléculaires, nous nous intéressons en particulier aux myosines qui se déplacent le long des filaments d'actine. Il existe plusieurs types de myosines (Sellers, 2000). Citons la myosine I qui permet le transport d'organites le long des filaments d'actine et la myosine II qui permet à la cellule de générer des forces contractiles. Nous présentons ici la structure du cytosquelette d'actine ainsi que celle des myosines II qui constituent les acteurs essentiels de la génération de forces par la cellule.

Le cytosquelette d'actine Le cytosquelette d'actine est composé de monomères d'actine globulaire (actine-G), structures polaires de 5,4 nm de diamètre. La polymérisation de ces monomères grâce à l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP donne naissance à des chaînes de monomères. Ces chaînes s'assemblent en structure hélicoïdale de 5-9 nm de diamètre qui correspond à l'enroulement de deux chaînes de monomères, formées l'une sur l'autre. Les filaments d'actine formés présentent une extrémité dite "barbée", extrémité (+), lieu de polymérisation des monomères d'actine et une extrémité (-) dite "pointue", lieu de dépolymérisation de l'actine. Les filaments d'actine s'associent en structures complexes par l'intermédiaire d'agents de pontage et de nucléation (Figure I.2). L'actine est régulée par de nombreuses molécules comme la tropomyosine, protéine fibreuse dimérique enroulée autour du filament d'actine qui permet de le stabiliser et de réguler l'interaction entre la myosine et le filament d'actine (Gunning *et al.*, 2015). Décrivons maintenant les principales organisations de l'actine à l'intérieur de la cellule adhérente (Blanchoin *et al.*, 2014).

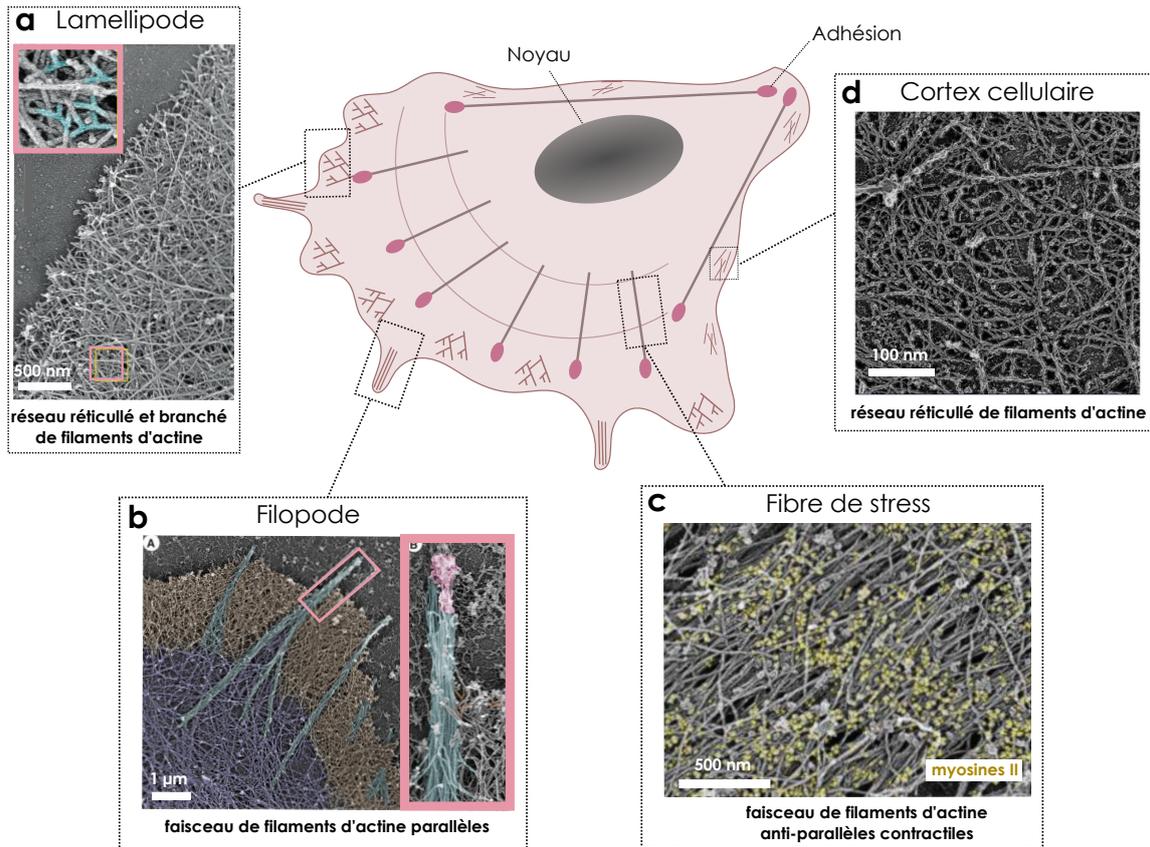


FIGURE I.2 – Les différentes organisations de l'actine d'une cellule adhérente Schéma d'une cellule adhérente montrant différentes structures composées d'actine ainsi que leurs images en microscopie électronique (a) Lamellipode, réseau réticulé et branché de filaments d'actine. (b) Filopode, faisceau de filaments parallèles d'actine. (c) Fibre de stress, faisceau de filaments anti-parallèles et contractiles d'actine. L'activité des myosines II (marquées en jaune) permet de contracter le faisceau de filaments d'actine. (d) Cortex cellulaire, réseau réticulé de filaments d'actine. Adapté de (Morone *et al.*, 2006; Blanchoin *et al.*, 2014; Svitkina, 2018).

- Le **lamellipode** (Pollard & Borisy, 2003) est une large protrusion membranaire, caractérisée par un flux rétrograde de filaments d'actine branchés entre eux (Figure I.2 a). Pour une cellule non polarisée, il existe un flux d'actine dirigé vers le centre de la cellule. Ce réseau enchevêtré d'actine est formé grâce au complexe Arp 2/3 qui se fixe sur un filament déjà formé et joue le rôle de nucléateur de la polymérisation d'actine pour permettre l'embranchement de deux filaments. Un réseau dit "branché" est formé par la répétition de ces embranchements. Les lamellipodes permettent aux cellules épithéliales d'adhérer et de migrer sur leur substrat (Giannone *et al.*, 2004).
- Les **filopodes** sont des protrusions membranaires cylindriques, plus petites que les lamellipodes, composées de faisceaux de filaments parallèles d'actine (Figure I.2 b). Ils sont liés entre eux par l'intermédiaire de protéines de pontages comme la fascine (Mellor, 2010). Les filopodes permettent, entre autres, aux cellules de sentir les propriétés de l'environnement comme sa rigidité (Wong *et al.*, 2014).

- Les **fibres de stress** (SF) sont des faisceaux de filaments d'actine organisés de façon anti-parallèle (Figure I.2 c). Leur association est assurée par des protéines de pontage comme l' α -actinine. Il en existe trois types (Hotulainen & Lappalainen, 2006) (Figure I.3) :
 - les **fibres de stress ventrales** sont ancrées à chaque extrémité par des adhésions focales
 - les **fibres de stress dorsales** sont ancrées à une seule extrémité par des adhésions focales ou des complexes focaux
 - les **arcs transversaux**, de forme convexe, ne sont pas directement ancrés aux adhésions et "glissent" vers le centre de la cellule *via* un flux rétrograde d'actine (Figure I.3 e-f).

Les fibres de stress ventrales et les arcs transversaux contiennent des myosines II (voir paragraphe suivant) qui leur permettent de se contracter.

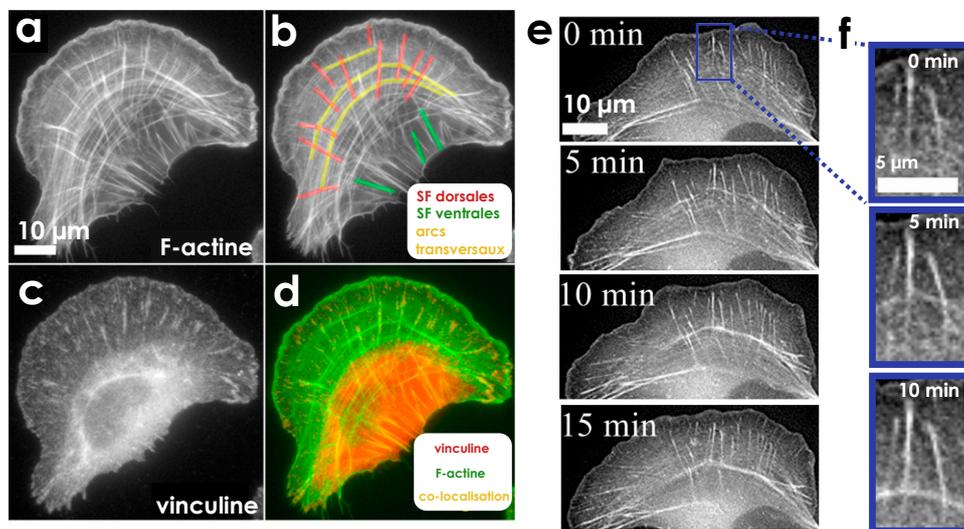


FIGURE I.3 – Les différentes fibres de stress d'une cellule adhérente. Fibres de stress dans les cellules U2OS fixées (a) Marquage de la F-actine (utilisation de la phalloïdine) pour visualiser les filaments d'actine de la cellule. (b) Trois types de fibres de stress sont mis en évidence sur l'image de F-actine : les fibres de stress dorsales (en rouge), les fibres de stress ventrales (en vert) et les arcs transversaux (en jaune). (c) Marquage des vinculines (utilisation de l'anticorps anti-vinculine) pour visualiser les adhésions focales de la cellule. (d) Image fusionnée du marquage de la F-actine (en vert) et des vinculines (en rouge). (e) Dynamique de l'actine visualisée par la GFP-actine. (f) Zoom de la région d'intérêt indiquée par un rectangle bleu sur (e) : les fibres de stress dorsales interagissent avec les arcs transversaux pour former un réseau continu de fibres de stress. Les arcs transversaux sont entraînés vers le centre de la cellule en raison du flux rétrograde d'actine. Adapté de (Hotulainen & Lappalainen, 2006).

- Le **cortex de la cellule** est constitué principalement de filaments d'actine réticulés (Figure I.2 d) par des protéines de pontage telles que la filamine ou la fascine, qui lient les filaments entre eux, mais n'influent pas sur la polymérisation de l'actine. Le cortex cellulaire, lié à la membrane plasmique, permet de réguler la forme globale de la cellule. Il permet également aux cellules de résister aux contraintes mécaniques extérieures et d'exercer des contraintes sur les cellules voisines au sein d'un tissu (Kelkar *et al.*, 2020).

Les myosines II L'activité des myosines II sur les filaments d'actine permet à la cellule de générer des forces contractiles, essentielles dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que l'adhésion, la migration ou la division (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009). Les myosines II sont constituées de deux chaînes lourdes qui se dimérisent. Sur chacune de ces chaînes au niveau du cou se trouvent deux chaînes légères : une chaîne dite "régulatrice", partie phosphorylable de la myosine et une chaîne dite "essentielle" qui stabilise le cou. (Figure I.4 b). La tête de la myosine contient un site actif (hydrolyse de l'ATP) et un site de liaison à l'actine. Si l'actine le permet (libération des sites de liaison *ie* en absence de tropomyosine), la myosine se fixe sur un filament d'actine. En l'absence d'ATP, la myosine est stable. En revanche en présence d'ATP, le groupement phosphate se détache ce qui entraîne un changement de conformation de la myosine, qui se détache et subit une inversion de conformation pour le prochain cycle (Watanabe *et al.*, 2007). La myosine II se déplace vers l'extrémité (+) d'un filament d'actine par des cycles successifs de phosphorylation et de déphosphorylation de sa chaîne légère régulatrice. En utilisant un dispositif *in vitro* à l'échelle de la molécule unique, Finer *et al.* ont montré qu'à chaque cycle de phosphorylation, la myosine II se déplace d'environ 11 nm sur un filament d'actine et génère une force de 3-4 pN (pour des concentrations en ATP allant de 0,01 à 2 mM)(Finer *et al.*, 1994).

2.1.2 Mécanismes de la génération de forces

Nous allons décrire ici deux mécanismes importants de la génération de forces (Figure I.4) : la polymérisation des filaments d'actine et la contraction de l'actomyosine, complexe protéique formé par l'assemblage d'actine et de myosine.

Forces de polymérisation de l'actine Les filaments d'actine polymérisent avec des cinétiques d'association différentes à leurs extrémités (+) et (-). L'énergie chimique libérée lors de l'insertion d'un monomère à l'extrémité (+) du filament est convertie en travail mécanique. Les filaments utilisent cette énergie mécanique pour pousser la structure s'opposant à leur croissance, comme la membrane plasmique (Figure I.4 a). Ce mécanisme est à l'origine des forces de protrusion générées par la cellule pour adhérer et migrer sur son substrat (Theriot, 2000; Démoulin *et al.*, 2014).

Contractilité de l'acto-myosine Les myosines II se lient et "marchent" sur les filaments d'actine dans la direction imposée par la polarité du filament : vers l'extrémité (+). Pour deux filaments associés en parallèle mais ayant une polarité opposée, le mouvement en sens opposé des myosines II va induire le glissement d'un filament sur l'autre et générer des forces contractiles (Figure I.4 c). Les myosines II ainsi associées à des filaments d'actine antiparallèles, forment ce qu'on appelle des "fibres de stress" (Figure I.2 c), structures essentielles de la contractilité cellulaire. La cellule épithéliale peut ainsi générer des contraintes de plusieurs dizaines de nN/ μm^2 sur un substrat constitués de micro-piliers de PDMS (rigidité allant de 1.3 à 21.8 nN/m) (du Roure *et al.*, 2005).

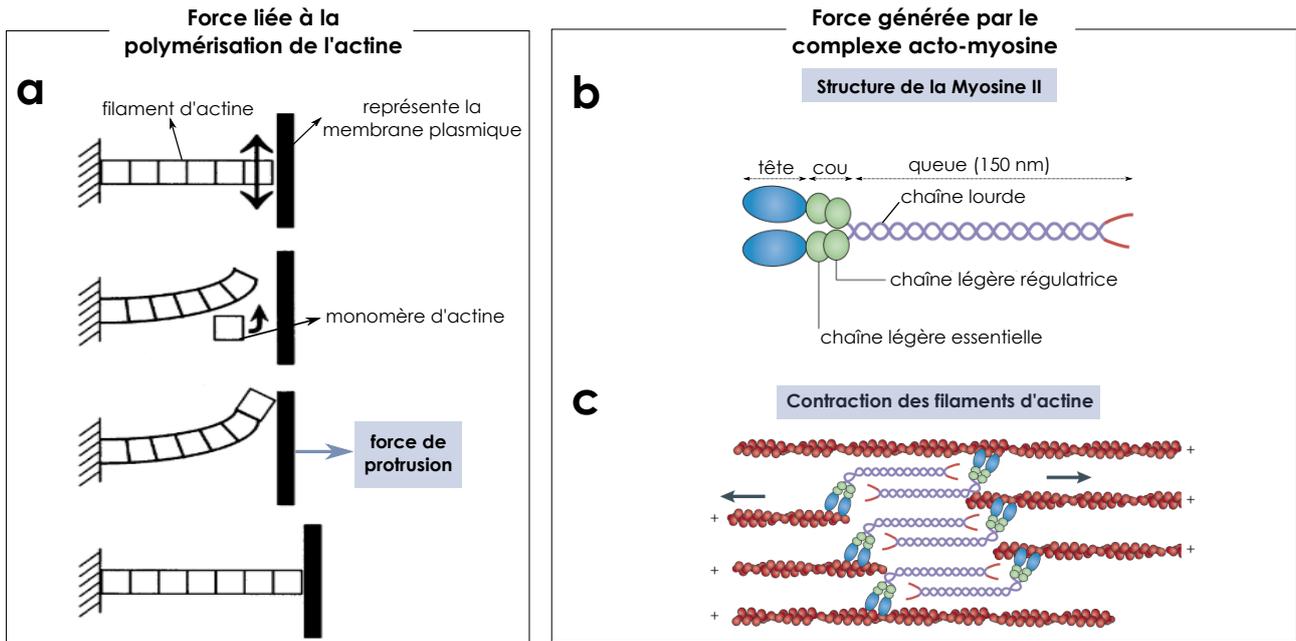


FIGURE I.4 – Mécanismes de génération de forces dans les cellules (a) Modèle de *brownian ratchet* pour expliquer la génération d'une force de protrusion lors de la polymérisation de l'actine. Les fluctuations thermiques engendrent un mouvement de l'extrémité (+) du filament d'actine. Ce mouvement permet l'insertion d'un monomère qui étend la longueur du filament. Il en résulte une force de protrusion sur la structure s'opposant à la croissance, telle que la membrane plasmique de la cellule. Adapté de (Theriot, 2000). (b) Organisation moléculaire de la myosine II. Elle est constituée de deux chaînes lourdes qui se dimérisent. Chaque chaîne lourde comprend : une tête qui permet la fixation à un filament d'actine, un cou et une queue (une partie hélicoïdale en violet et une partie non hélicoïdale en rouge). Au niveau du cou de chaque chaîne lourde, on trouve deux chaînes légères : une chaîne dite "régulatrice", partie phosphorylable de la myosine, et une chaîne dite "essentielle" qui stabilise le cou. (c) Dans les fibres de stress, les molécules de myosine II s'associent avec des filaments d'actine arrangés de manière antiparallèle. La translocation (indiquée par des flèches) des myosines dans les assemblages bipolaires conduit à la contraction du réseau d'actine. Adapté de (Kneussel & Wagner, 2013).

2.2 L'environnement direct de la cellule épithéliale

In vivo, la cellule épithéliale est dans un environnement complexe, composé d'une matrice extracellulaire (MEC), de cellules et de fluides interstitiels. Cet environnement génère des signaux biochimiques (libération de facteurs de croissance, d'hormones, d'ions, protéines de la MEC,...) mais aussi des signaux physiques (rigidité, adhésion, topographie, confinement, ...) qui influencent le fonctionnement de la cellule et en particulier ses propriétés mécaniques (Frantz *et al.*, 2010; Charras & Sahai, 2014). Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à un aspect de l'environnement physique de la cellule : son interaction avec la MEC, en étudiant l'influence de la rigidité.

Dans la suite, nous utiliserons le terme **environnement** pour désigner, soit le substrat sur lequel la cellule repose, soit les cellules qui l'entourent au sein d'un tissu.

2.2.1 Matrice extracellulaire

In vivo, la plupart des cellules sont attachées à une MEC qui joue un rôle essentiel dans leur fonctionnement (Calderwood *et al.*, 1999; Bear *et al.*, 2002; Galbraith *et al.*, 2007). Cette dernière est constituée d'un ensemble de macromolécules (Frantz *et al.*, 2010) :

- les **collagènes** : protéines majoritaires (30% de la masse totale des protéines de la MEC chez les mammifères) qui déterminent en grande partie les propriétés physiques de la MEC.
- des **glycosaminoglycanes** et **protéoglycanes** : protéines hydrophiles négativement chargées capables de retenir l'eau et les ions, qui forment un hydrogel autour des cellules.
- des **fibres élastiques** : composées principalement d'élastine qui donnent à la MEC son élasticité. Cette élasticité permet par exemple aux tissus de se rétracter après avoir été étirés de façon transitoire.
- des **glycoprotéines** : protéines qui participent à l'architecture de la MEC et qui facilitent l'adhésion des cellules. Citons entre autre :
 - la **laminine** qui permet de mailler le réseau créé par le collagène (Aumailley, 2013).
 - la **fibronectine**, une protéine fibreuse, mécano-régulatrice du comportement cellulaire. Le dépliement de la fibronectine permet d'exposer plusieurs sites de liaison aux intégrines, ce qui permet l'adhésion de la cellule à la MEC. Cette protéine peut être étirée d'une longueur plusieurs fois supérieure à sa longueur au repos par les forces de traction exercées par la cellule (Smith *et al.*, 2007).

La MEC est avant tout une source de signaux biochimiques. En particulier, elle contient un grand nombre de facteurs de croissance solubles tels que TGF- β qu'elle libère et qui agissent sur les cellules (Wipff *et al.*, 2007). Elle est aussi un substrat mécanique sur lequel les cellules adhèrent et exercent des forces pour migrer. La MEC permet aussi de stabiliser mécaniquement les cellules soumises à des forces externes. Listons ici les propriétés physiques de la MEC, essentielles pour son interaction avec la cellule (Ruprecht *et al.*, 2017; Charras & Sahai, 2014) :

- **topographie**, déterminée par la taille et l'orientation des fibres qui la composent.
- **élasticité** : la MEC a un module d'Young allant de 0,1 kPa (tissu cérébral) à 100 kPa (os). Ce module d'Young dépend notamment de la composition en collagène et de l'organisation de la MEC (épaisseur des fibres, taux de réticulation).
- **adhésion** : la MEC présente des zones aux propriétés adhésives hétérogènes qui dépendent notamment des glycoprotéines qui la composent.
- **confinement** : la géométrie de la MEC peut créer un confinement spatial des cellules dans une ou plusieurs dimensions.

Toutes ces propriétés physiques influent profondément sur le comportement des cellules : adhésion, migration, croissance, survie des cellules et différenciation (Walma & Yamada, 2020).

2.2.2 Cellules voisines : le tissu épithélial

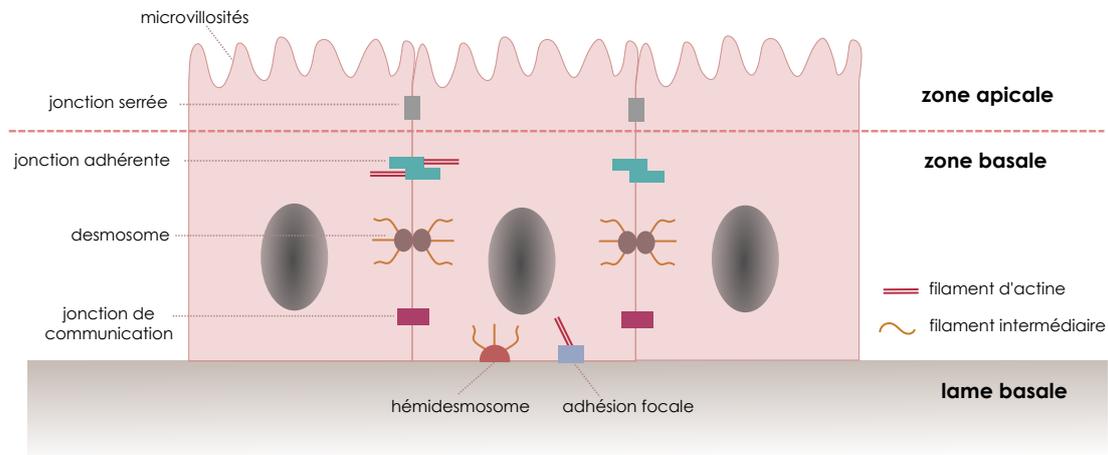


FIGURE I.5 – **Adhésions et polarité apico-basale d'un tissu épithélial** La cellule adhère à la MEC *via* les hémidesmosomes et les adhésions focales. Les cellules adhèrent entre elles *via* différents types de jonctions : les jonctions serrées séparant la zone apicale de la zone basale, les jonctions adhérentes, les desmosomes et enfin les jonctions de communication. Adapté d'un schéma accessible à l'adresse suivante : <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-adhesion-and-cell-communication-14050486/>

In vivo, la cellule épithéliale n'est pas seule mais entourée d'autres cellules épithéliales avec lesquelles elle forme un tissu épithélial. Les tissus épithéliaux ou *epithelium*, tels que la peau ou l'épithélium intestinal, s'organisent en tissus cohésifs composés de cellules jointives, situés à la surface des organes : ils constituent une "barrière" qui protège le corps et les organes de "l'extérieur".

Polarité apico-basale Les tissus épithéliaux sont caractérisés par une polarité apico-basale (Figure I.5). Les zones apicale et basale ont des compositions en protéines et lipides particulières, et sont séparées par des jonctions, appelées jonctions serrées. Cette polarité apico-basale est nécessaire au bon fonctionnement du tissu épithélial : elle règle la prolifération, l'adhésion cellulaire, la croissance, le métabolisme et l'apoptose au sein des tissus épithéliaux (Martin-Belmonte & Perez-Moreno, 2011). La perte de cette polarité est impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), un processus au cours duquel les cellules épithéliales acquièrent peu à peu le phénotype des cellules mésenchymateuses. La TEM intervient au cours de la progression tumorale à laquelle elle participe en augmentant la motilité et le pouvoir invasif des cellules (Thiery *et al.*, 2009; Martin-Belmonte & Perez-Moreno, 2011; Puisieux *et al.*, 2018). Plus précisément :

- La **zone apicale** est en contact avec le milieu extérieur. Cette zone contient des protéines spécifiques à l'organe qu'elle protège : elle assure ainsi les échanges de substances avec l'environnement (sécrétion et absorption) et permet le bon fonctionnement de l'organe. Les microvillosités présentes au niveau de l'interface avec l'environnement facilitent ces échanges en augmentant la surface d'échange avec le milieu extérieur.
- La **zone basale** est celle qui fait face au milieu intérieur et repose sur la MEC. La membrane

basale est en contact avec le substrat et permet l'ancrage du tissu. Elle assure aussi une certaine perméabilité, aux nutriments en particulier. *In vivo*, les tissus épithéliaux reposent sur un feuillet de matériau extracellulaire appelé lame basale qui les sépare des tissus conjonctifs, parcourus par des vaisseaux sanguins transportant l'oxygène et les nutriments. Celle-ci est composée principalement de collagène IV et de laminine (Khalilgharibi & Mao, 2021). *In vitro*, cultivés sur des substrats 2D, les tissus épithéliaux présentent aussi une polarité apico-basale : la partie apicale fait face au milieu de culture et la partie basale adhère au substrat (Yonemura, 2014).

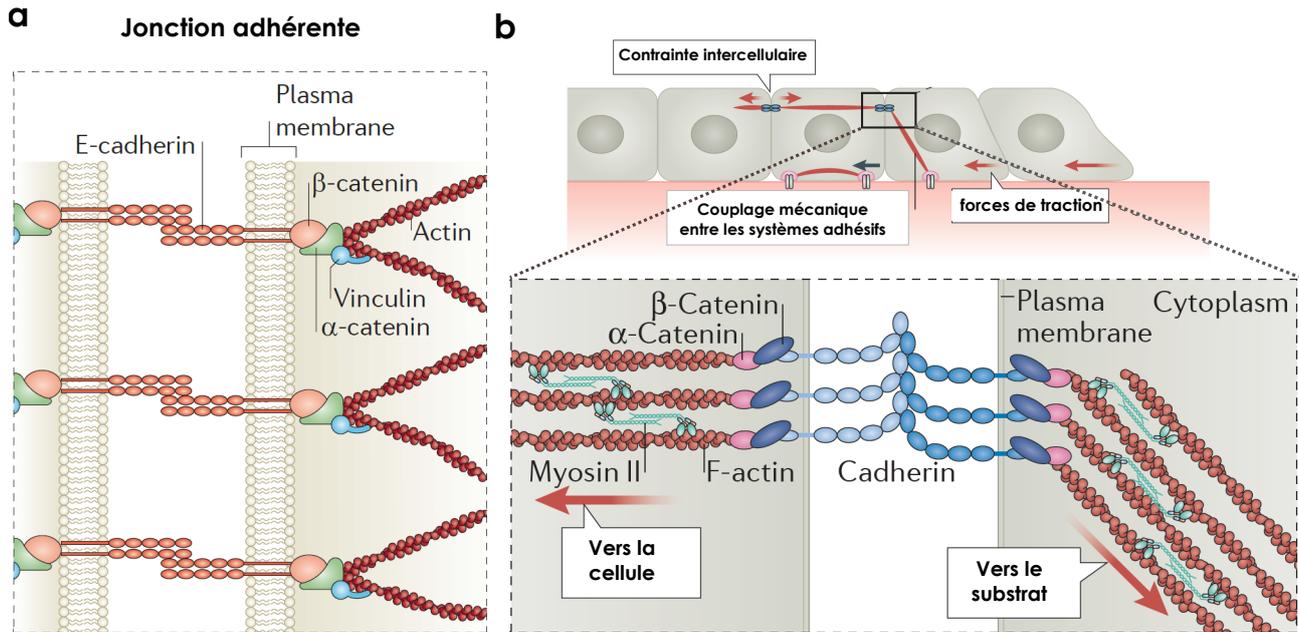


FIGURE I.6 – **Contraintes intercellulaires au niveau des jonctions adhérentes** (a) Jonctions adhérentes (JA), complexes protéiques dynamiques constitués de E-cadherine et d'une multitude de protéines adaptatrices et de signalisation, dont la vinculine et l' α -caténine, qui assurent le lien mécanique entre les cytosquelettes d'actomyosine de deux cellules voisines. Adapté de (Dufort *et al.*, 2011). (b) Les JA sont les principaux mécanosenseurs qui permettent à la cellule de sentir les contraintes exercées par ses voisines et de transmettre des contraintes à ses voisines. Il existe un couplage entre le système d'adhésion avec la MEC et le système d'adhésion entre cellules voisines. Ce couplage permet aux cellules d'adapter leur comportement à celui de leurs voisines et ainsi de se coordonner au sein du tissu épithélial. Adapté de (Ladoux & Mège, 2017).

Les jonctions cellule-cellule dans les tissus épithéliaux Au sein d'un tissu épithélial, les cellules adhèrent entre elles *via* différents types de jonctions : les jonctions serrées, les jonctions d'ancrage et enfin les jonctions de communication (Figure I.5) :

- **Les jonctions serrées**, situées au niveau de la partie apicale du tissu épithélial, permettent d'assurer la cohésion et la fonction barrière du tissu épithélial.
- **Les jonctions d'ancrage**, situées sous les jonctions serrées, connectent le cytosquelette d'une cellule avec celui de ses voisines. Il en existe deux types : les jonctions adhérentes et les desmosomes, reliant respectivement les filaments d'actine et les filaments intermédiaires de deux cellules voisines. Les jonctions adhérentes jouent un rôle important dans la transmission de

l'information mécanique ainsi que dans l'émergence des comportements collectifs (Ladoux & Mège, 2017). Elles sont constituées d'une multitude de protéines dont la plus connue est la E-cadhérine. Cette protéine recrute les caténines α et β permettant la liaison des cytosquelettes d'actine de deux cellules voisines (Figure I.6). Les E-cadhérines se trouvent le plus souvent sous-exprimées dans la TEM, ce qui altère la cohésion du tissu et la migration collective des cellules qui s'individualisent (Gheldof & Berx, 2013).

- **Les jonctions de communication**, situées au niveau de la membrane basale, permettent aux cellules de communiquer entre elles *via* des signaux chimiques ou électriques : échange d'ions, de messagers secondaires et de petits métabolites (Meşe *et al.*, 2007).

2.3 Interaction avec la matrice extracellulaire

2.3.1 Adhésions cellulaires à la MEC

La cellule adhère à la MEC *via* différentes familles de protéines transmembranaires. Ces protéines, sensibles aux propriétés chimiques et mécaniques de l'environnement, lient la MEC au cytosquelette de la cellule (Burrige & Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Berrier & Yamada, 2007; Zaidel-Bar *et al.*, 2007). Il existe deux types d'adhésions avec la MEC : les hémidesmosomes et les adhésions focales (AF) liant respectivement les filaments intermédiaires et les filaments d'actine à la MEC (Figure I.5).

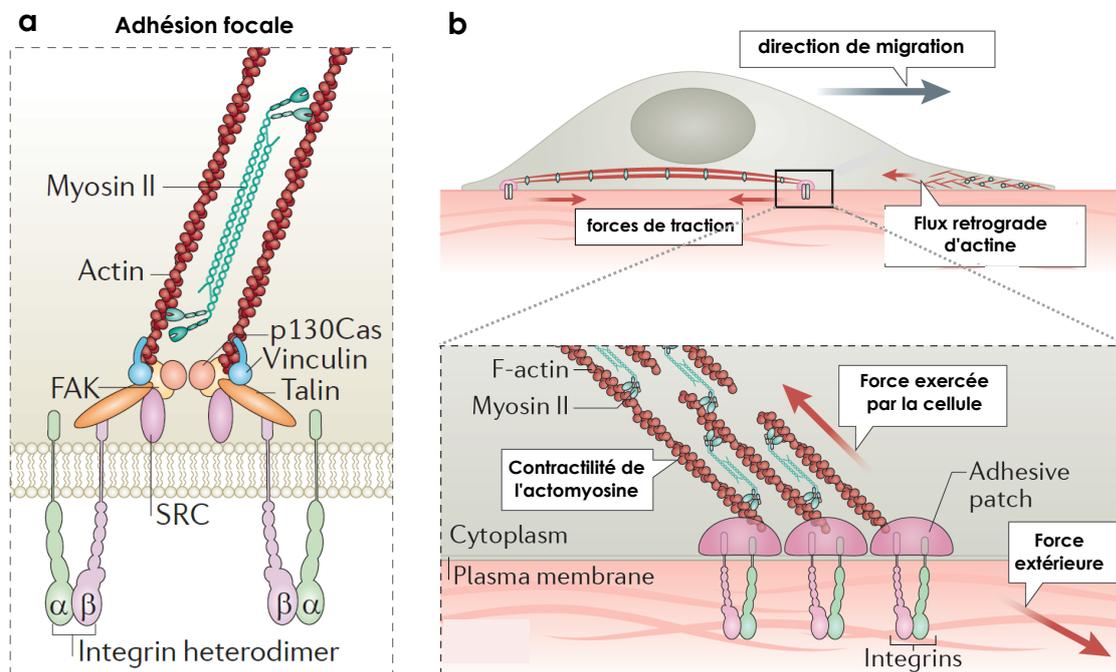


FIGURE I.7 – Adhésions de la cellule à la MEC (a) Adhésions focales, complexes protéiques dynamiques constitués d'intégrines et d'une multitude de protéines adaptatrices et de signalisation, dont la vinculine et la taline, qui assurent le lien mécanique entre le cytosquelette d'actomyosine et la MEC. Les AF permettent à la cellule de communiquer avec son environnement. Adapté de (Dufort *et al.*, 2011) (b) Les AF servent notamment de points d'ancrage sur lesquels les cellules tirent pour adhérer ou migrer sur leur substrat en générant des forces de traction. Adapté de (Ladoux & Mège, 2017).

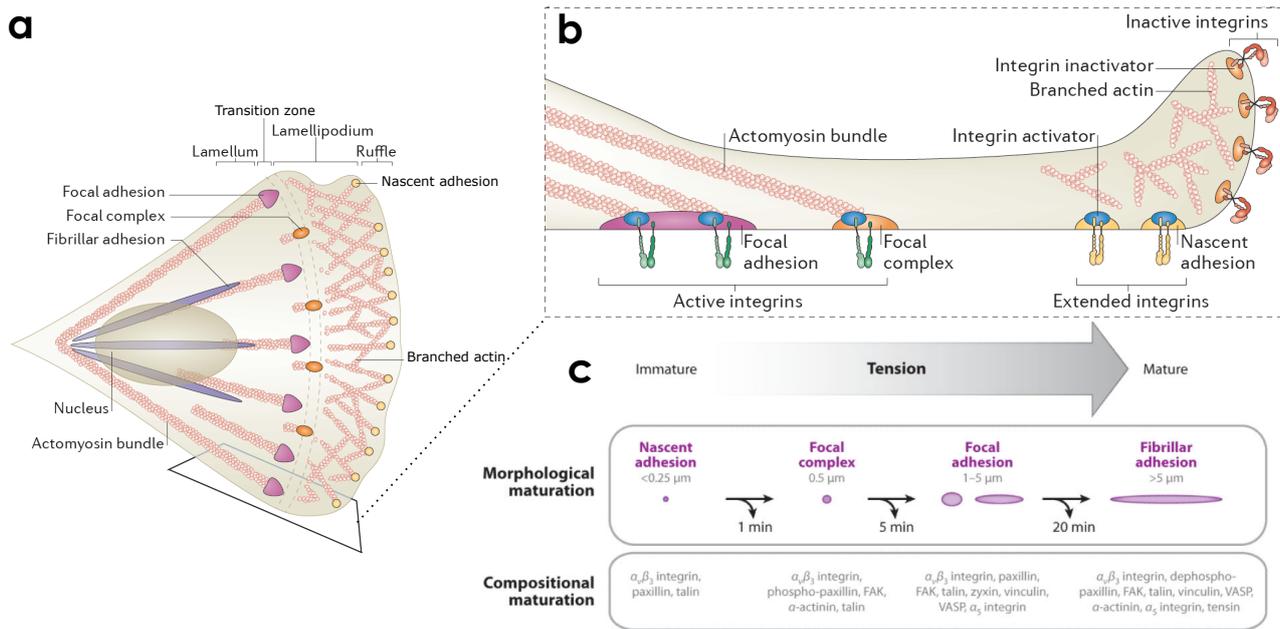


FIGURE I.8 – **Étapes de maturation des adhésions focales** (a) Schéma d'une cellule adhérente et de son système adhésif avec la MEC (b) Zoom de la zone encadrée en noire en (a) : les adhésions naissantes sont situées dans le lamellipode, les complexes focaux à la limite entre le lamellipode et la zone lamellaire, les adhésions focales dans la zone lamellaire et les adhésions fibrillaires dans le corps cellulaire. Adapté de (Bouvard *et al.*, 2013). (c) Morphologie, temps de vie moyen, composition des adhésions au cours du processus de maturation. Adapté de (Gardel *et al.*, 2010).

Dans notre étude, nous nous intéressons aux adhésions focales (AF) (Figure I.7 a), un ensemble de protéines qui comprend les intégrines qui permettent à la cellule de "sentir" son environnement. Les intégrines sont des protéines hétérodimériques transmembranaires composées de sous-unités α et β qui constituent les briques de base des AF. On compte une vingtaine de couples α et β différents. Les intégrines comportent une partie extracellulaire qui peut se lier à certaines protéines de la MEC (fibronectine, laminine), une partie transmembranaire et enfin une partie intracellulaire qui se lie aux filaments d'actine *via* des protéines d'adaptation telles que la taline et la vinculine. Lorsqu'elles sont dans un état de faible affinité avec la MEC, les sous-unités α et β sont en configuration repliée. Mais lorsqu'elles sont activées, elles subissent un changement de conformation : les deux sous-unités se déplient ce qui permet de dévoiler des sites cryptiques sur lesquels d'autres molécules vont pouvoir être recrutées (Figure I.8). Les intégrines sont activées par des protéines telles que la taline (Tadokoro *et al.*, 2003) qui permet leur attachement à la MEC et la formation d'adhésions "naissantes" (taille caractéristique inférieure à 0,25 μm) au niveau des lamellipodes de la cellule *via* le recrutement de la paxilline (Gardel *et al.*, 2010). Les adhésions naissantes peuvent se désassembler rapidement (temps de vie de l'ordre de la minute) ou s'associer à d'autres protéines telles que FAK pour former des "complexes focaux" (taille caractéristique de 0,5 μm) dans la région lamellaire de la cellule (Gardel *et al.*, 2010) (Figure I.8). L'activité de la myosine II dans cette région génère une tension sur les adhésions qui stimule leur maturation par le recrutement de nouvelles molécules telles que la vinculine et la zyxine. En effet lorsqu'elle est soumise à des forces suffisantes, la taline se déplie exposant des

sites de liaison pour la vinculine. Les AF matures, de forme elliptique (1 μm en largeur, 1-10 μm en longueur), génèrent des adhésions stables entre la cellule et la MEC pendant en moyenne 17 min dans des cellules épithéliales PtK1 (Gupton & Waterman-Storer, 2006) (Figure I.8). Liées aux fibres de stress de la cellule, les AF constituent des "embrayages" moléculaires (*molecular clutch*) sur lesquels les cellules tirent pour générer des "forces de traction" (Case & Waterman, 2015) (Figure I.7 b). Les AF peuvent mûrir davantage *via* le recrutement de la tensine, entre autres, pour donner des adhésions fibrillaires stables qui participent au remodelage de la MEC (Zaidel-Bar *et al.*, 2003). Les forces de traction naissent lors de l'engagement des intégrines dans la MEC puis leur intensité augmente avec la maturation des AF qui renforce leur lien avec le cytosquelette (Schwarz & Gardel, 2012). Les forces générées par la polymérisation de l'actine entraînent un flux rétrograde d'actine. Lorsque les intégrines s'engagent dans la MEC, les forces de traction atteignent une centaine de Pa, entraînant une diminution du flux rétrograde d'actine de 25 à 2 nm/s dans des cellules épithéliales PtK1 (Gardel *et al.*, 2008).

Les contraintes que les cellules exercent sur leur substrat pour adhérer et migrer sont exprimées en **Pa** : il s'agit de forces surfaciques. Dans la suite on les nommera **forces de traction** qui est d'ailleurs le terme utilisé, abusivement, dans la littérature.

2.3.2 Mécanosensibilité et mécanotransduction au niveau des adhésions focales

Pour interagir avec son environnement, la cellule procède en trois étapes (Vogel & Sheetz, 2006) :

- elle "sent" les propriétés mécaniques de son environnement *via* des mécanismes de **mécanosensibilité**. La mécanosensibilité des cellules décrit la capacité des cellules à percevoir les signaux mécaniques de son environnement : contraintes, déformation, rigidité, topographie et adhésivité du substrat (Bershadsky *et al.*, 2006; Geiger *et al.*, 2009).
- elle "transmet" et "interprète" l'information mécanique *via* des mécanismes de **mécanotransduction** (Wang *et al.*, 1993). Ces mécanismes désignent les processus par lesquels la cellule transforme les signaux mécaniques détectés dans son environnement en signaux biochimiques, qui déclenchent une réponse biologique.
- elle "répond" en **adaptant** son phénotype ou modifie les propriétés de son environnement.

Dans le cas des cellules adhérentes à une MEC, la mécanotransduction se fait principalement au niveau des AF qui couplent la MEC au cytosquelette de la cellule (Geiger *et al.*, 2009). D'autres voies permettant la mécanotransduction sont utilisées par la cellule telles que les canaux mécanosensibles activés lors de l'étirement de la membrane plasmique de la cellule comme Piezo1 (Ridone *et al.*, 2019) ou l'activation des récepteurs couplés aux protéines G (Alonso *et al.*, 2016). Dans le cadre de cette thèse, nous décrivons uniquement la mécanosensibilité et la mécanotransduction au niveau des AF.

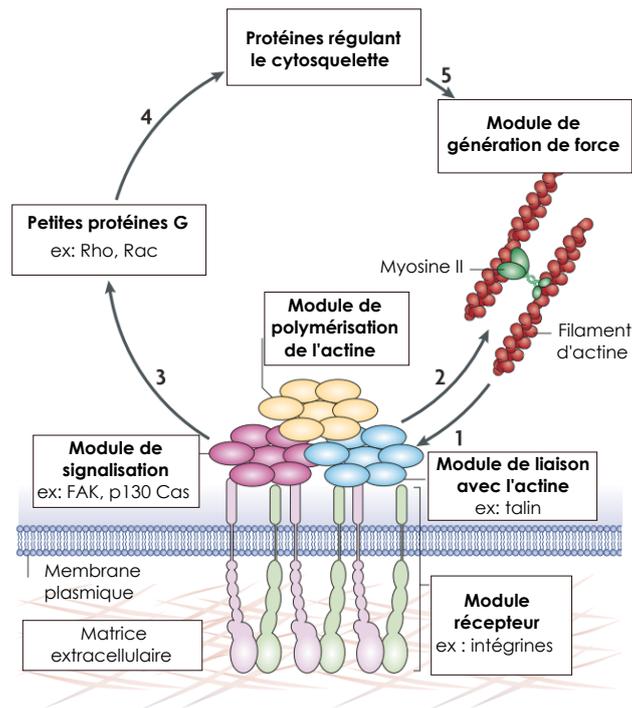


FIGURE I.9 – **Mécanotransduction au niveau des adhésions focales** Schéma montrant les interactions entre les différents modules qui permettent à la cellule de communiquer avec la matrice extracellulaire (MEC). (1) Les forces générées par la polymérisation de l'actine et par l'actomyosine affectent des protéines mécanosensibles spécifiques dans le module de liaison de l'actine comme la taline, le module récepteur (représenté par les intégrines), le module de polymérisation de l'actine et le module de signalisation (par exemple, la kinase d'adhésion focale FAK, p130Cas). (2) Tous ces modules en interaction répondent aux propriétés de la MEC et aux forces mécaniques appliquées en agissant sur la génération de force et le cytosquelette de la cellule. (3) La stimulation du module de signalisation entraîne l'activation ou l'inactivation de petites protéines G, telles que Rho et Rac. (4) Ces petites protéines G agissent sur les protéines régulant le cytosquelette, affectant le module de génération de force (5). Adapté de (Geiger *et al.*, 2009)

Mécanosensibilité au niveau des AF Les AF sont les principaux mécanosenseurs qui permettent à la cellule de "sentir" sa MEC. Le degré de maturation ainsi que le recrutement des protéines au sein des AF dépendent directement des propriétés physiques de l'environnement (Schiller & Fässler, 2013). La relation entre AF et génération de forces est bidirectionnelle : les AF permettent la génération de force mais évoluent aussi en fonction des forces auxquelles elles sont soumises. Elles s'adaptent à la force appliquée (traction interne ou force extérieure) en modifiant leur taille : l'AF change de taille en fonction de la force appliquée (Geiger *et al.*, 2001). Ainsi la tension mécanique générée par les forces contractiles sur les AF participe à leur maturation et au recrutement de nouvelles protéines, en particulier la vinculine, qui stabilise et renforce les AF (Case & Waterman, 2015). La rigidité du substrat affecte directement les propriétés des AF. Le temps de vie des AF et le taux de maturation sont plus importants sur des substrats rigides (rigidité supérieure à quelques dizaines de kPa) que sur des substrats plus "mous" (quelques kPa) (Féréol *et al.*, 2009; Oakes *et al.*, 2018).

Mécanotransduction au niveau des AF Après avoir "lu" les signaux mécaniques de son environnement, la cellule transmet ces signaux à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire du cytosquelette (Hoffman *et al.*, 2012). Les molécules composant les AF activent une cascade de voies de signalisation (module de signalisation, activation de petites protéines G) qui modifie l'architecture du cytosquelette et la génération de force (Figure I.9). Par exemple, l'activation de la voie de signalisation Rho/ ROCK augmente l'activité des myosines II et l'assemblage des filaments d'actine, participant à l'augmentation de la contractilité cellulaire. Les signaux mécaniques peuvent être transmis jusqu'au noyau où ils affectent la transcription de l'ADN ainsi que l'expression de protéines. Les forces ressenties par la cellule au niveau des AF se propagent *via* le cytosquelette sur des distances allant de quelques μm jusqu'à quelques dizaines de μm (échelle de la cellule) (Wang *et al.*, 2009) et la signalisation mécanique se produit rapidement sur des échelles de temps de quelques secondes, voire moins (Dufort *et al.*, 2011) (Figure I.10).

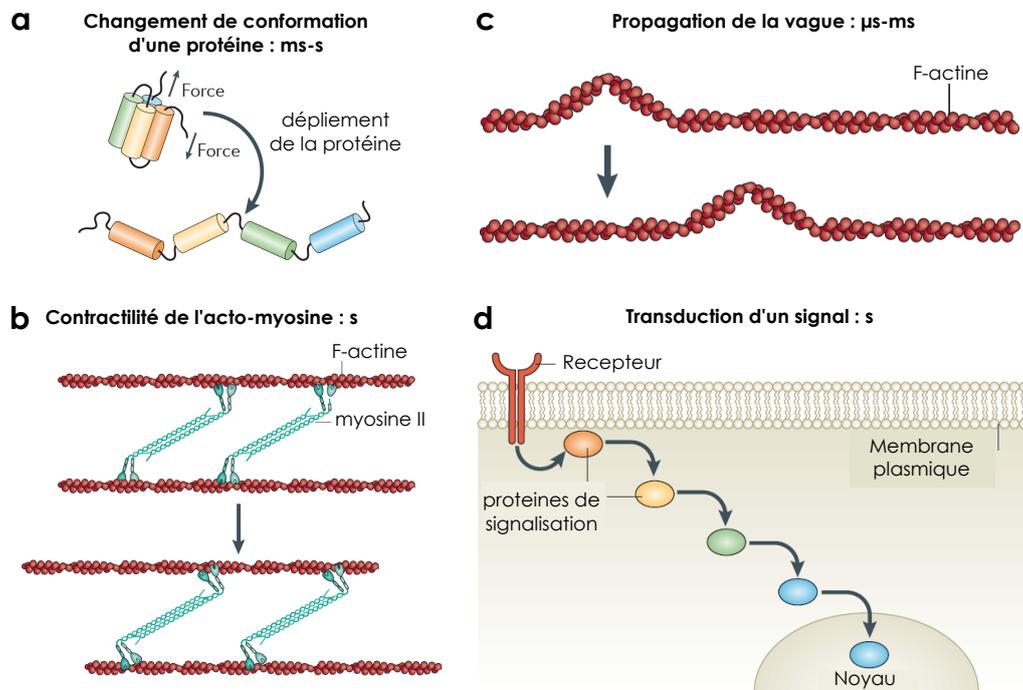


FIGURE I.10 – **La mécanotransduction, un processus rapide** Les câbles d'acto-myosine se contractent à un taux de $1 \mu\text{m/s}$ (b), et les ondes de tension générées par la contractilité peuvent rapidement se propager à travers le cytosquelette (c). Les contraintes exercées sur les protéines mécaniquement sensibles telles que la taline et p130Cas peuvent induire des changements de conformation, comme le dépliement des protéines, en quelques ms à quelques s pour des forces de l'ordre de quelques pN (a). Au cours de la mécanotransduction, ces changements de conformation des protéines activent des réseaux de signalisation biochimique, qui peuvent atteindre le noyau en quelques dizaines de secondes (d). Adapté de (Dufort *et al.*, 2011).

Adaptation En "lisant" (mécanosensibilité) et en "transmettant" (mécanotransduction) l'information mécanique de l'environnement, la cellule est capable de s'adapter aux changements de propriétés physiques de ce dernier. En particulier, ces mécanismes permettent aux cellules de maintenir un état

d'équilibre interne en dépit des changements de leur environnement, appelé homéostasie (Humphrey, 2008; Boudou *et al.*, 2019). La cellule et la MEC s'influencent mutuellement (Bissell *et al.*, 1982; Schultz *et al.*, 2011) : on parle d'interactions réciproques (Boudou *et al.*, 2019). D'un côté, la cellule adapte ses propriétés mécaniques à celles de l'environnement (Vogel & Sheetz, 2006). De l'autre, elle modifie les propriétés mécaniques de la MEC en remodelant les fibres de collagène, en dégradant ou en synthétisant des protéines comme la fibronectine (Jordan *et al.*, 2010; Humphrey *et al.*, 2014; Schultz *et al.*, 2015). La cellule sent la rigidité de son substrat et adapte ses propriétés bio-mécaniques à cette dernière. Cette mécanosensibilité à la rigidité du substrat sera décrite plus en détail dans le Chapitre IV.

A l'échelle de la cellule et du tissu, les mécanismes de mécanotransduction et d'homéostasie permettent aux cellules de s'adapter à leur environnement et d'assurer leur fonctionnement (Humphrey *et al.*, 2014; Boudou *et al.*, 2019; Andersen *et al.*, 2022). L'altération des mécanismes d'homéostasie est à l'origine de nombreuses pathologies comme le cancer (Paszek *et al.*, 2005; Huang & Ingber, 2005).

2.4 Altération du phénotype mécanique de la cellule cancéreuse

Un cancer est le plus souvent dû à la mutation ou à la dérégulation de gènes affectant des fonctions physiologiques essentielles telles que l'apoptose ou la prolifération.

2.4.1 Altérations physiologiques des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses présentent six altérations physiologiques (Hanahan & Weinberg, 2011) :

- un **maintien de la signalisation proliférative** : les cellules peuvent se diviser en l'absence de facteurs de croissance
- un **contournement des suppresseurs de croissance** : Les cellules cancéreuses ont la capacité d'échapper aux programmes d'inhibition de la prolifération cellulaire. Elles peuvent, par exemple, contourner l'"inhibition de contact de prolifération", qui correspond à l'arrêt de la division cellulaire au delà d'une certaine densité cellulaire dans le tissu épithélial.
- une **résistance à la mort cellulaire** ou apoptose (en cas de dommage de l'ADN notamment)
- une **immortalité répllicative** qui leur permet de se diviser indéfiniment et d'éviter la sénescence cellulaire précédant la mort cellulaire
- une **capacité à induire l'angiogenèse** pour développer de nouveaux vaisseaux sanguins et assurer la survie et la croissance de la tumeur
- une **activation des processus d'invasion** des tissus environnants et l'activation du **développement de métastases**

2.4.2 Étapes de la carcinogenèse

Les carcinomes, cancers qui se développent à partir de cellules épithéliales, représentent plus de 80 % des cancers humains (Jemal *et al.*, 2008). La carcinogenèse correspond au processus de formation

des carcinomes et comprend trois phases :

- une **phase d'initiation** au cours de laquelle une cellule épithéliale subit une ou plusieurs mutation(s).
- une **phase de promotion** au cours de laquelle des promoteurs participent à la croissance et à la prolifération de la cellule mutée : une colonie de cellules mutées se forme, l'adénome.
- une **phase de progression** au cours de laquelle certaines cellules de l'adénome vont accumuler d'autres mutations, entraînant la formation d'une tumeur maligne : les cellules se divisent de façon excessive, sont capables de vasculariser la tumeur et d'envahir les tissus environnants. Elles peuvent ensuite se détacher de la tumeur primaire, circuler dans les vaisseaux sanguins pour atteindre et coloniser d'autres organes (métastases).

2.4.3 De l'importance de la mécanique dans le cancer

Le développement des métastases, responsables de 90% des morts causées par un cancer (Steeg, 2016), reste un événement rare en raison des nombreuses étapes que la cellule cancéreuse doit franchir. Au cours des différentes étapes formant la « cascade métastatique » (Figure I.11), les cellules font en effet face à de nombreuses contraintes mécaniques pouvant affecter leur survie et leur progression (Gensbittel *et al.*, 2020).

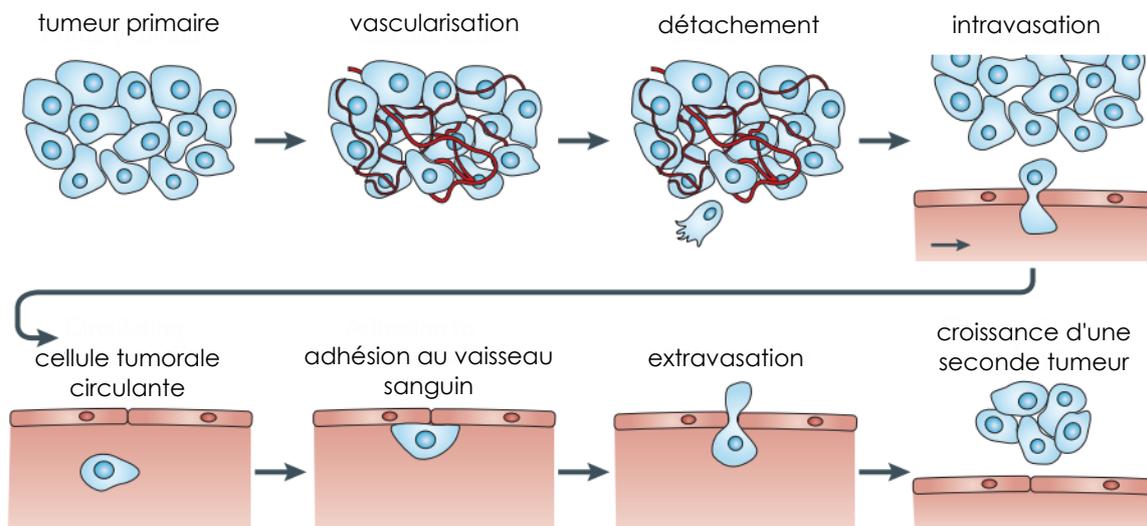


FIGURE I.11 – Étapes constituant la "cascade métastatique". Adapté de (Wirtz *et al.*, 2011).

Dans la tumeur primaire, les cellules sont exposées à des forces de compression importantes en raison de l'augmentation du volume de la tumeur et de l'augmentation de la rigidité du micro-environnement lors du remodelage du tissu entourant la tumeur, qui se produit dans plusieurs types de tumeurs comme le cancer du sein (Gensbittel *et al.*, 2020). Les cellules doivent ensuite s'extraire de la tumeur primaire et franchir la MEC puis l'endothélium pour atteindre les vaisseaux sanguins (intravasation). Dans ces vaisseaux, les cellules font face à des forces liées au flux sanguin (cisaillement) ainsi qu'à des forces de compression importantes lorsqu'elles se retrouvent confinées dans des

vaisseaux sanguins étroits. Les cellules cancéreuses doivent ensuite parvenir à s'accrocher au niveau de l'endothélium : elles quittent les vaisseaux sanguins et s'infiltrant dans l'endothélium d'un autre organe (extravasation). Le franchissement de cette barrière endothéliale permet aux cellules de coloniser cet organe. Les cellules cancéreuses doivent modifier leurs propriétés mécaniques tout au long de cette cascade métastatique pour échapper aux processus de régulation physiologique de l'organisme.

2.4.4 Altérations des propriétés mécaniques des cellules cancéreuses

Dans cette partie, nous décrivons les altérations des propriétés mécaniques des cellules cancéreuses.

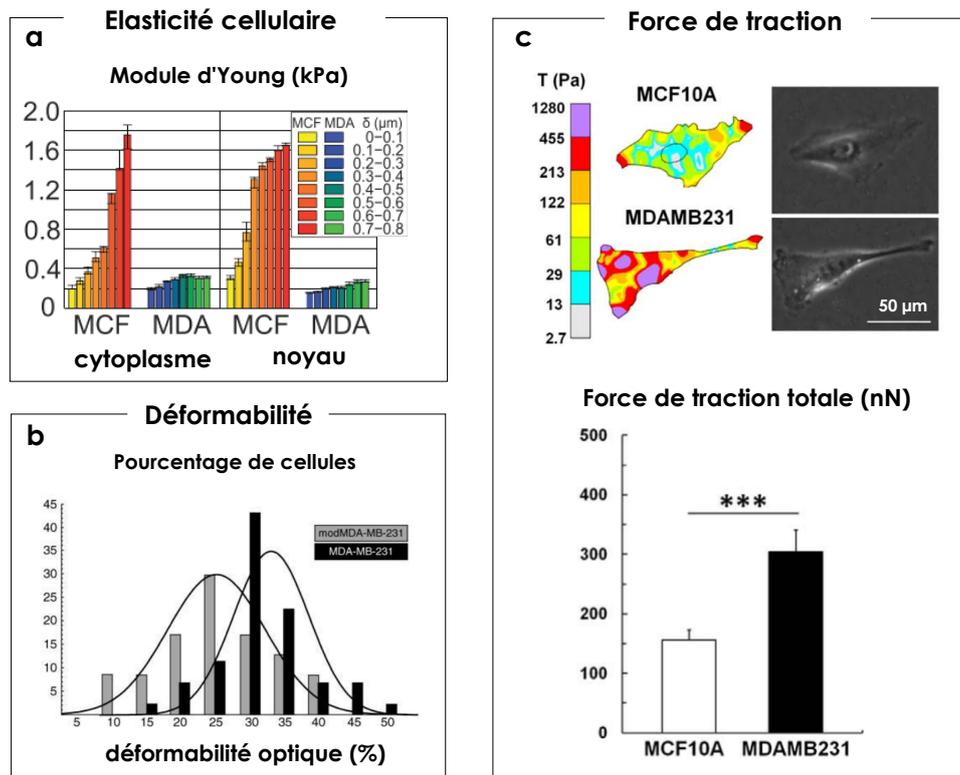


FIGURE I.12 – **Propriétés mécaniques des cellules cancéreuses.** Propriétés mécaniques des cellules cancéreuses humaines du sein (a) Mesure du module d'Young au niveau du noyau et dans le cytoplasme de cellules normales MCF10A et métastatiques MDA-MB-231. Adapté de (Agus *et al.*, 2013). (b) Mesure de la déformabilité de cellules cancéreuses non métastatiques mod-MDA-MB-231 et métastatiques MDA-MB-231. Adapté de (Guck *et al.*, 2005). (c) Mesure de la force de traction totale pour des cellules cancéreuses non métastatiques MCF10A et métastatiques MDA-MB-231. Haut (de gauche à droite) : cartographie des forces de traction et images en contraste de phase. Bas : comparaison des forces de traction totales. Adapté de (Kraning-Rush *et al.*, 2012).

Modification de la rigidité et de la déformabilité cellulaire A l'échelle de la cellule unique, de nombreuses études *in vitro* ont montré une diminution de la rigidité des cellules au cours de la progression tumorale (Lekka *et al.*, 1999; Cross *et al.*, 2008; Weder *et al.*, 2014; Alibert *et al.*, 2017). En utilisant un AFM, Lekka *et al.* ont mesuré le module d'Young de cellules humaines issues de l'uretère et de la vessie, normales ou cancéreuses. Ils ont montré que les cellules cancéreuses ont un

module d'Young 10 fois plus petit que celui des cellules normales (Lekka *et al.*, 1999). De même, Agus *et al.* ont montré que des cellules cancéreuses métastatiques du sein, les MDA-MB-231, ont un module d'Young deux fois plus faible que celui des cellules normales MCF10 (Figure I.12 a) (Agus *et al.*, 2013). L'évolution de la rigidité cellulaire a été proposée comme pouvant être un marqueur de la progression tumorale (Xu *et al.*, 2012). Cette diminution de rigidité se traduit par une meilleure capacité des cellules à se déformer. Guck *et al.* ont mesuré la capacité de cellules cancéreuses du sein à se déformer en réponse à une contrainte, en utilisant un étireur optique désigné par le terme de "déformabilité" (Guck *et al.*, 2005). Ils ont montré que la déformabilité des cellules augmente avec leur pouvoir métastatique (Figure I.12 b). Cette meilleure déformabilité permet aux cellules de s'adapter aux contraintes géométriques rencontrées, et peut faciliter l'invasion des cellules cancéreuses dans les tissus voisins ou leur migration dans des vaisseaux sanguins étroits. Bien que la majorité des cellules cancéreuses soit moins rigide que les cellules normales (Alibert *et al.*, 2017), cette relation est inversée à l'échelle du tissu : les tissus cancéreux ont une rigidité plus importante que les tissus sains en raison de l'augmentation de rigidité du micro-environnement qui les entoure (Gensbittel *et al.*, 2020). La palpation manuelle des tissus est d'ailleurs une méthode utilisée par les médecins pour détecter les lésions cancéreuses (Ingber *et al.*, 1995).

Modification des forces de traction De nombreuses études ont montré que les forces de traction exercées par les cellules cancéreuses sur la MEC sont modifiées au cours du processus tumoral (Li *et al.*, 2017). Certaines études *in vitro* ont établi un lien entre les forces de traction et le potentiel métastatique des cellules. Ainsi, Kraning-Rush *et al.* ont montré que les forces de traction augmentent avec le potentiel métastatique de cellules humaines du sein, du poumon et de la prostate (Kraning-Rush *et al.*, 2012) (Figure I.12 c). D'autres études sont nécessaires pour parvenir à associer l'état de contractilité de la cellule au stade de la transformation cellulaire (Tseng *et al.*, 2012) ou avec leur pouvoir invasif (Peschetola *et al.*, 2013).

Modification des mécanismes de mécano-sensibilité Wolfenson *et al.* ont montré que les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 étaient insensibles à la rigidité de leur substrat contrairement aux cellules normales MCF10 (cellules cultivées sur une matrice de micro-piliers de raideur 0,85 pN/nm à 8,4 pN/nm). Ils ont montré que cette absence de mécanosensibilité est liée à l'absence d'une protéine dans le module de détection des cellules, la tropomyosine Tpm2.1. Cette insensibilité à la rigidité du substrat permet ainsi aux cellules d'échapper aux processus de régulation physiologique, comme le processus d'apoptose qui est favorisé sur un substrat de faible rigidité (Wolfenson *et al.*, 2016). Nous détaillerons davantage les altérations de la mécanosensibilité des cellules cancéreuses dans le Chapitre IV de ce manuscrit.

Pour mesurer le phénotype mécanique des cellules dans les cas physiologiques comme pathologiques, de nombreux outils *in vitro* ont été développés.

3 Les outils pour étudier le phénotype mécanique des cellules

3.1 Les systèmes *in vitro* sont particulièrement adaptés à l'étude du phénotype mécanique

Les systèmes *in vivo* sont complexes et leur compréhension nécessite d'intégrer un grand nombre de paramètres. Déterminer l'influence de chaque paramètre peut s'avérer hardu. Les systèmes *in vitro* visent à décortiquer ces systèmes biologiques complexes en sous-systèmes. L'utilisation de systèmes *in vitro* permet de contrôler un grand nombre de paramètres : température, géométrie, type cellulaire ainsi que les propriétés mécaniques de l'environnement (Ruprecht *et al.*, 2017; Bao & Suresh, 2003). Les systèmes *in vitro* présentent quelques avantages comparés aux systèmes *in vivo* :

- ils sont **minimalistes** : le nombre de paramètres à considérer est plus faible que dans les systèmes *in vivo*
- ils permettent de réaliser des mesures plus facilement **reproductibles** car les paramètres tel que la température, l'humidité, les propriétés physiques des substrats, le type cellulaire sont contrôlés.
- ils sont **moins coûteux** (argent, temps) : les systèmes *in vivo* nécessitent d'élever des animaux.

Ces systèmes *in vitro* présentent néanmoins des limitations, principalement liées à leur caractéristique minimaliste :

- **Lignées cellulaires utilisées** Les lignées cellulaires utilisées dans les études *in vitro* sont des lignées immortalisées : les cellules ont subi des mutations qui peuvent impacter leur phénotype et modifier leur comportement.
- **Un environnement extrêmement simplifié** *In vivo*, les cellules évoluent dans un environnement 3D complexe. Elles sont entourées d'une matrice extracellulaire à la composition et à la topographie hétérogène et dynamique, et interagissent avec d'autres cellules.
 - Les **substrats utilisés** dans les études *in vitro* sont plus rigides (plastique : 2 GPa, verre : 60 GPa) que les rigidités physiologiques de la MEC (0,5-100 kPa). Pour s'approcher des rigidités physiologiques, il faut utiliser des substrats en polyacrylamide ou en PDMS. De plus, les substrats utilisés *in vitro* ont une composition et une topographie "figée", qui ne rendent pas compte de l'aspect dynamique et hétérogène de l'environnement cellulaire *in vivo*
 - Les systèmes *in vitro* **limitent les interactions**. *In vivo*, les cellules reçoivent des messages biologiques, physiques et chimiques de l'organisme.

3.2 Mesure des propriétés mécaniques de cellules isolées

Pour mesurer les propriétés mécaniques des cellules, en particulier leur propriétés rhéologiques (élasticité, viscosité) à l'échelle de la cellule unique, de nombreuses méthodes *in vitro* ont été développés : des méthodes dites "actives" pour lesquelles une déformation est mesurée en réponse à

l'application d'une contrainte et des méthodes dites "passives" qui consistent à mesurer des déformations (Table I.1). Ces méthodes peuvent être rangées en 3 catégories : les méthodes optiques, les méthodes dites "de contact" et les méthodes "non invasives" (Figure I.13, Table I.1). Nous décrivons ci-dessous rapidement le principe et les grandeurs mesurées pour chacune de ces méthodes. La microscopie de forces de traction (TFM), méthode à la base de ce travail de thèse, sera présentée plus en détail dans la partie suivante.

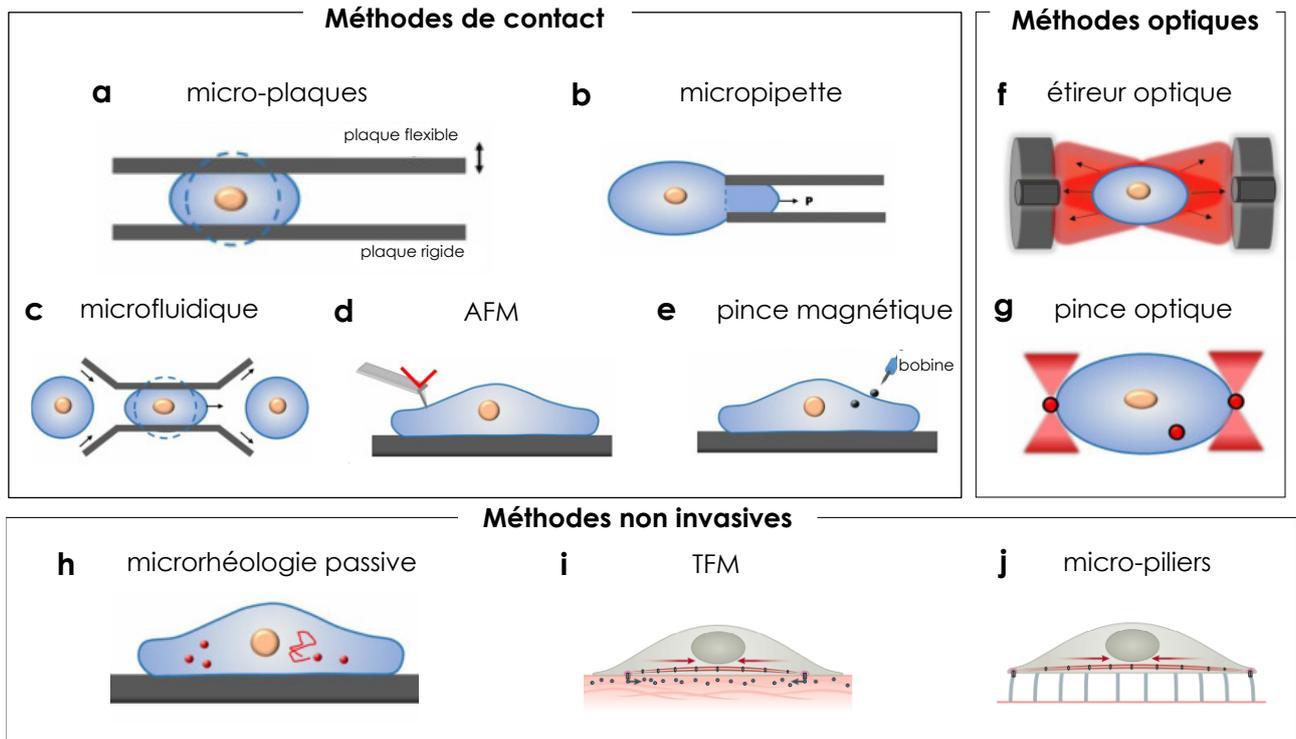


FIGURE I.13 – Méthodes pour mesurer les propriétés mécaniques de cellules isolées (a) Micro-plaques (b) Micropipette (c) Microfluidique (d) AFM (e) Pince magnétique (f) Étireur optique (g) Pince optique (h) microrhéologie passive (i) TFM (j) Micro-piliers. Adapté de (Ladoux & Mège, 2017; Hao *et al.*, 2020).

3.2.1 Méthodes de contact

Micro-plaques La méthode consiste à comprimer une cellule entre deux micro-plaques parallèles (une plaque est rigide sous la cellule/agrégat et l'autre plaque est rigide ou flexible). Cette méthode permet de mesurer la tension de surface, les contraintes ainsi que les propriétés rhéologiques d'une cellule (Figure I.13 a) (Forgacs *et al.*, 1998; Desprat *et al.*, 2005; Marmottant *et al.*, 2009).

Micropipette La méthode consiste à aspirer une cellule avec une micropipette circulaire en contrôlant la pression d'aspiration (Figure I.13 b). Il est possible d'obtenir la tension de surface et les propriétés rhéologiques de la cellule (Hochmuth, 2000; Guevorkian & Maître, 2017).

Technique	A/P	Mesure	Quantité mécanique mesurée	OG force/contrainte /déformabilité	Débit de mesures	Avantages	Inconvénients
Micro-plaques	A	déformations	-tension de surface -contraintes	0,1 – 1000 Pa	6 c/h	-mesure précise	-invasif (contact permanent) -débit de mesures faible
Micropipette	A	déformations de surface	-tension de surface -propriétés rhéologiques	1-1000 Pa	1-100 c/h	-mise en place facile -mesure cellule adhérente ou en suspension	-perturbatif (contact permanent)
Microfluidique	A	déformations	-déformabilité -propriétés rhéologiques	0-50 %	10-10 ⁴ c/s	- robuste et facile à utiliser -débit de mesures élevé -mesure de cellules circulantes	-repose sur des modèles pour mesurer élasticité ou la viscosité -sonde la mécanique sur des temps courts -pas de mesure de cellule adhérente à un substrat
AFM	A	déplacement du levier	-tension de surface -propriétés rhéologiques	10 ⁻² -10 ² nN	1-20 c/h	-mesure d'une grande précision -cartographie	-invasif (nécessite un contact) -débit de mesures faible -étape de calibration nécessaire
Pince magnétique	A	déformations	-tension de surface	0,01-100 Pa	1-10 c/h	-permet de manipuler des objets intracellulaires en profondeur -utilisation in vivo possible	-invasif (nécessité d'injecter des particules magnétiques) -débit de mesures faible
Etireur optique	A	déformation	-déformabilité -propriétés rhéologiques	s/o	1-10 c/s	-mesure sans contact avec la cellule -peut être combiné à un dispositif microfluidique pour automatisation/tri	-perturbatif (élévation de température générée par les lasers) -pas de mesure de cellule adhérente à un substrat
Pince optique	A	déformations	-tension de membrane -propriétés rhéologiques	0,01-10 Pa	10-100 c/h	-peut être intégré facilement dans un dispositif optique	-calibration difficile -perturbatif (élévation locale de température générée par le laser) -étude de mécanismes longs impossibles
Microrhéologie passive	P	positions des traceurs	-propriétés rhéologiques	s/o	10-30 c/h	-non invasif -mesures locales	-mesures difficiles
TFM	P	déformation du substrat	-forces de traction	1-10 ⁴ Pa	10-100 c/h	-mesure absolue -méthode non invasive -possibilité de moduler la rigidité du substrat	-reconstruction des forces, erreurs liées à l'inversion numérique -grande sensibilité au bruit de déplacement des billes
Micro-piliers	P	déplacement des piliers	-forces de traction	10 ⁻² -100 nN	10-100 c/h	-mesure absolue -pas d'image de référence nécessaire -calcul direct des forces	-substrat utilisé : points d'adhésion discrets (difficile de comparer avec situation physiologique)

TABLE I.1 – **Récapitulatif des principaux outils utilisés pour la mesure des propriétés mécaniques des cellules** Pour chaque méthode, A/P : méthode active/passive, mesures effectuées, quantité(s) mécanique(s) mesurée(s), ordre de grandeur des forces/contraintes/déformabilités mesurées, débit de mesures (c/s : nombre de cellules/s, c/h : nombre de cellules/h), avantages et inconvénients.

Microfluidique La méthode consiste à faire circuler une cellule dans un canal microfluidique (Figure I.13 c). La cellule peut être comprimée au niveau d'une construction ou soumise à un flux (cisaillement, élongation). Ces méthode permettent de mesurer la déformabilité des cellules (leur capacité à se déformer en réponse à une contrainte), et en s'appuyant sur des modèles, de mesurer les propriétés rhéologiques de la cellule (Urbanska *et al.*, 2020; Dupire *et al.*, 2020).

AFM La méthode consiste à sonder la topographie de la surface avec une résolution subnanométrique en utilisant une pointe ayant un rayon de courbure allant de quelques nm à quelque μm , reliée à un levier flexible (Krieg *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018). Le choix du rayon de courbure de la pointe dépend

de l'échantillon à mesurer. La pointe de l'AFM est utilisée pour indenter la cellule localement. La déflexion du levier, mesurée sur des photodiodes, permet d'obtenir la force en fonction de l'indentation de la cellule. En particulier, la spectroscopie de forces AFM vise à mesurer le module d'Young et la topographie de la cellule (Figure I.13 d).

Pinces magnétiques La méthode consiste à injecter des particules magnétiques dans une cellule et à les manipuler grâce à un gradient de champ magnétique. La déformabilité de la cellule est mesurée en fonction des contraintes appliquées (Figure I.13 e) (Bausch *et al.*, 1999; Tanase *et al.*, 2007).

3.2.2 Méthodes optiques

Étireur optique La méthode consiste à utiliser deux lasers pour piéger et déformer une cellule sans la toucher : en imposant une contrainte sur la cellule, les propriétés rhéologiques de la cellule sont mesurées (Figure I.13 f) (Yang *et al.*, 2016).

Pinces optiques La méthode consiste à manipuler des objets diélectriques, de tailles micrométriques, injectés dans la cellule pour imposer des forces sur la surface avec lesquels ils sont en contact (Figure I.13 g) (Svoboda & Block, 1994). Les déformations mesurées permettent de mesurer les propriétés rhéologiques de la cellule (Ayala *et al.*, 2016).

3.2.3 Méthodes non invasives

Microrhéologie passive La méthode consiste à suivre le mouvement brownien de traceurs dans le cytoplasme des cellules (organelles ou particules endocytées par les cellules) (Figure I.13 h). Le mouvement des traceurs permet de mesurer les propriétés rhéologiques du cytoplasme de la cellule (Yamada *et al.*, 2000; Helfer *et al.*, 2000, 2001; Wirtz, 2009).

La **TFM** et la méthode des **micro-piliers** sont décrites dans les paragraphes suivants.

3.3 Microscopie de forces de traction (TFM)

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé la TFM pour caractériser le phénotype mécanique de cellules seules, ou en groupe. Cette méthode permettant de mesurer les forces de tractions exercées par les cellules sur leur substrat, apparaît la plus adaptée pour étudier le "phénotype mécanique" des cellules Src-activées : elle est "passive", non invasive et nous donne la possibilité de mesurer les forces en temps réel.

3.3.1 Historique

Les premières études décrivant les "forces de traction" datent des années 1980 avec les observations de Harris (Harris *et al.*, 1980, 1981) : des fibroblastes individuels déposés sur des substrats déformables en silicone créent des ridules lorsqu'ils se déplacent (Figure I.14 a). Plus tard, des études montreront que ces cellules migrent en rampant sur leur substrat et pour cela génèrent des forces de traction (Lee

et al., 1994; Burton *et al.*, 1999). Ces forces peuvent être estimées en mesurant les déformations du substrat, elles-mêmes mesurées *via* le déplacement de petites billes incorporées dans le substrat supposé élastique (Oliver *et al.*, 1995; Beningo & Wang, 2002) (Figure I.14 b) : des gels de polyacrylamide (PAA) (Kadow *et al.*, 2007) ou de polydiméthylsiloxane (PDMS) (Teo *et al.*, 2020b). Les caractéristiques de ces deux substrats seront détaillées dans la suite du manuscrit (voir paragraphe 5.3.1). Cette idée donne naissance à la technique de TFM, méthode aujourd'hui couramment utilisée pour mesurer les forces de traction exercées par les cellules (Figure I.14 b-c).

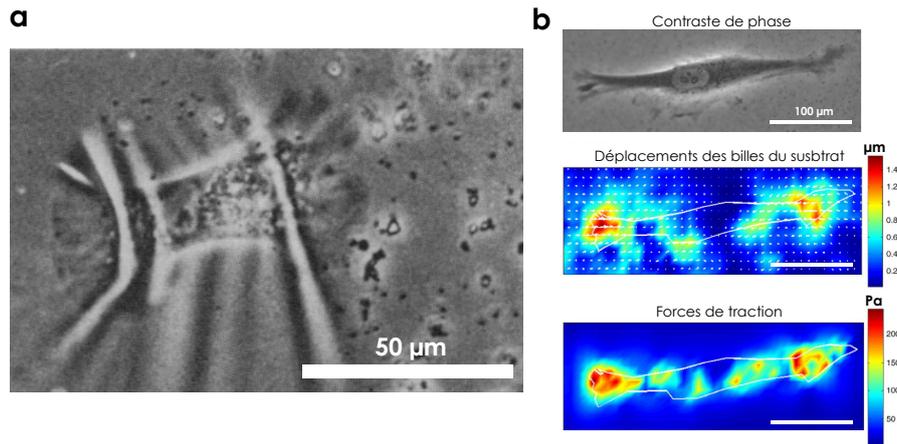


FIGURE I.14 – **Mesure des forces de traction par la méthode de TFM** (a) Déformations créées par des fibroblastes sur une surface en caoutchouc de silicone. Adapté de (Harris *et al.*, 1980) (b) (haut) Image en contraste de phase d'un fibroblaste déposé sur un gel de PAA (milieu) Champ de déplacement des billes dans le substrat (bas) Reconstruction des forces de traction. Adapté de (Wang & Lin, 2007).

3.3.2 Principe d'une expérience de TFM

Décrivons le principe de la microscopie de forces de traction, tel qu'il a été utilisé pour notre projet. Les cellules sont déposées sur des gels de PAA contenant des billes fluorescentes suffisamment petites pour pouvoir être considérées comme ponctuelles. Lorsque les cellules ont adhéré au substrat, elles sont imagées ainsi que le plan renfermant les billes situées sous la cellule, à différents points de temps t (Figure I.15 a). À la fin de l'expérience, une image de référence des billes doit être prise, après avoir détaché les cellules avec de la trypsine : elle correspond à l'image des billes dans l'"état relâché" du gel (Figure I.15 b). Notons que cette image de référence ne peut être prise avant l'expérience étant donné qu'il n'est pas possible de prédire où les cellules sont déposées. L'image des billes dans l'état "contraint" à l'instant t est comparée à l'image "de référence" dans l'état "relâché" pour mesurer le déplacement des billes en utilisant la méthode de PIV (*Particle Image Velocimetry*) (Annexe A, Figure I.15 c). Les forces de traction sont obtenues à partir du déplacement des billes par une inversion numérique, et sous certaines hypothèses, que nous décrivons dans le paragraphe suivant. En répétant cette procédure pour tous les points de temps t d'une expérience de quelques heures, l'évolution des forces de traction au cours du temps est obtenue (Figure I.15 d).

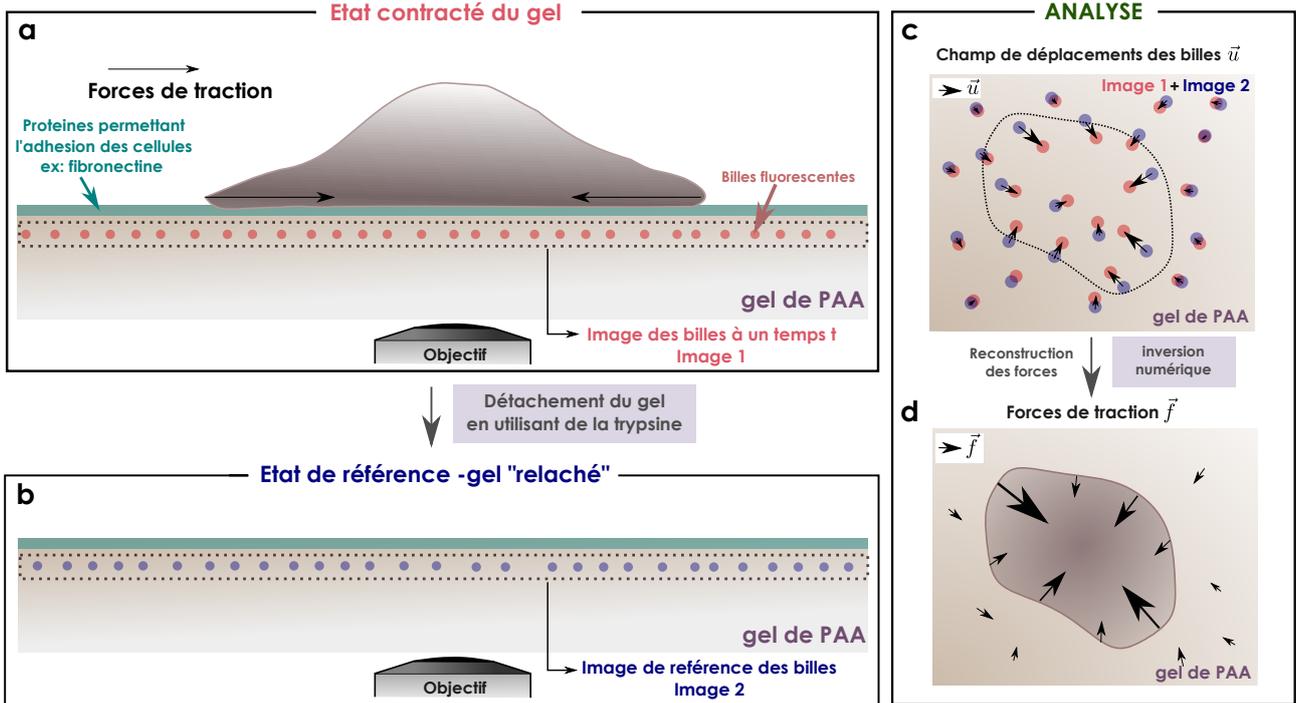


FIGURE I.15 – **Principe de la TFM** (a) Acquisition de l'image 1 : image des billes et de la cellule dans l'état contraint du gel de PAA à un point de temps t . (b) Acquisition de l'image 2 : image des billes dans l'état relâché du gel de PAA après avoir détaché la cellule avec de la trypsine. (c) Détermination du déplacement des billes à l'instant t en comparant l'image 1 et l'image 2 (d) Reconstruction des forces de traction à l'instant t à partir du champ de déplacement trouvé en (c). Notons que le bruit expérimental peut faire apparaître lors de la reconstruction numérique, des forces de traction là où il ne devrait pas y en avoir.

3.3.3 Approche analytique

Hypothèses La reconstruction des forces de traction requiert la théorie de l'élasticité pour décrire les déformations du substrat comme une conséquence des forces qui lui sont appliquées (Landau *et al.*, 1986). Les déformations du gel sont considérées faibles ($< 5\%$) ce qui permet de se placer dans le régime linéaire (Martiel *et al.*, 2015). Le substrat est, lui, supposé homogène, élastique et semi-infini. Pour être considéré semi-infini, l'épaisseur du gel doit être suffisamment grande devant les déplacements mesurés des billes. En pratique, nous avons estimé l'épaisseur des gels de PAA à $40 \mu\text{m}$ (voir 4.3 du Chapitre II), en accord avec la littérature, et les déplacements mesurés sont de l'ordre du μm . Sous ces hypothèses, la formulation de Boussinesq peut être utilisée et l'équation liant le déplacement des billes \vec{u} aux forces de traction \vec{f} est donnée par (Burton & Taylor, 1997) :

$$\vec{u}(\vec{r}) = (\vec{f} * \underline{\underline{G}})(\vec{r}) = \int_{\vec{r}' \in \Omega_c} \underline{\underline{G}}(\vec{r} - \vec{r}') \vec{f}(\vec{r}') d\vec{r}' \quad (\text{I.1})$$

$$\text{avec } \underline{\underline{G}}(\vec{r}) = \frac{(1 + \nu)}{\pi E r^3} \begin{pmatrix} (1 - \nu)r^2 + \nu x^2 & \nu xy \\ \nu xy & (1 - \nu)r^2 + \nu y^2 \end{pmatrix} \text{ où } r = \sqrt{x^2 + y^2} \quad (\text{I.2})$$

où

- Ω_c : domaine cellulaire

- \vec{u} : vecteur déplacement
- \vec{f} : champ de force surfacique
- \vec{r} : vecteur position
- $\underline{\underline{G}}(\vec{r})$: fonction de Green qui dépend des propriétés du substrat
- E : module d'Young du substrat, supposé constant
- ν : coefficient de poisson du substrat
- (x, y) : coordonnées cartésiennes en un point du substrat.

Méthodes pour le calcul des forces de traction Pour reconstruire les forces de traction \vec{f} à partir du champ de déplacement des billes \vec{u} , une inversion mathématique de l'équation I.1 doit être réalisée. Il existe plusieurs méthodes de reconstruction des forces. Nous allons décrire ici la méthode la plus utilisée, la FTTC (*Fourier Transform Traction Cytometry*) (Figure I.16). Elle consiste à calculer la formulation de Boussinesq dans l'espace de Fourier (Butler *et al.*, 2002). L'équation I.1 devient alors :

$$\vec{f}(x, y) = \mathcal{F}^{-1}(\mathcal{F}(\vec{u})/\mathcal{F}(\underline{\underline{G}})) \text{ avec } \mathcal{F} : \text{transformée de Fourier en 2D} \quad (\text{I.3})$$

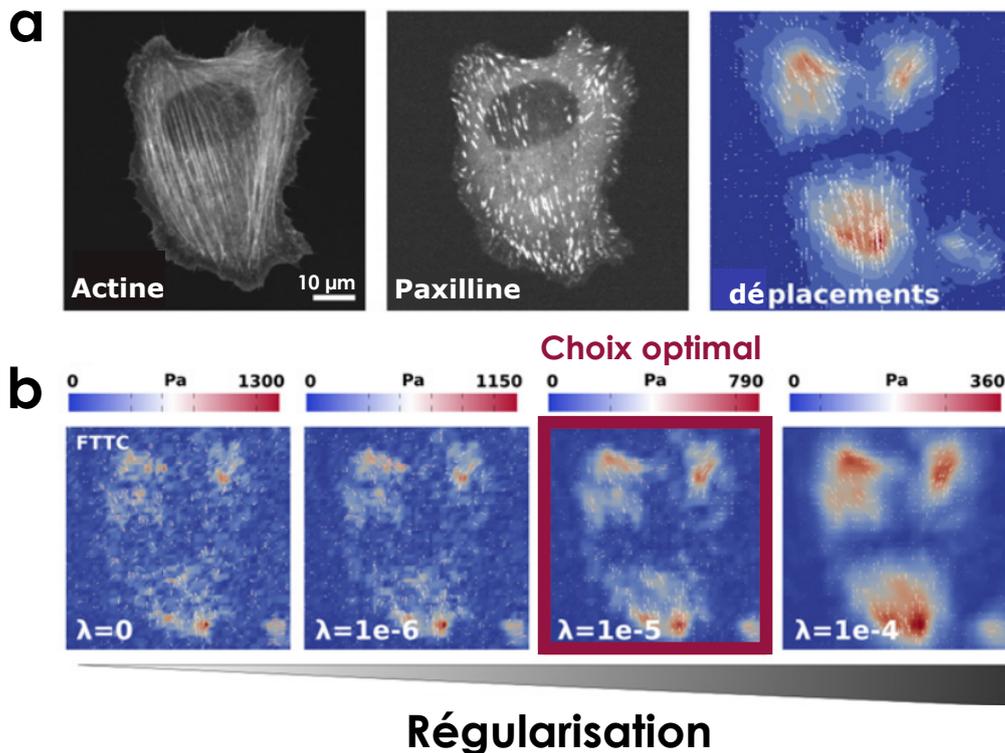


FIGURE I.16 – **Procédure de régularisation en FTTC** (a) De gauche à droite : marquage de l'actine, des adhésions (paxilline) dans une cellule et déplacements des billes associées. (b) Reconstruction des forces de traction en utilisant la méthode FTTC et en choisissant différentes valeurs pour le paramètre de régularisation λ . Le cadre rouge correspond au paramètre de régularisation optimal $\lambda = 10^{-5}$ (qui permet d'obtenir une réduction optimale du bruit expérimental) obtenu par une approche bayésienne. Adapté de (Soiné *et al.*, 2015).

Nécessité d'utiliser une méthode de régularisation pour la FTTC : Le calcul des forces en utilisant la FTTC est sensible aux petites variations des déplacements mesurés. Ainsi les solutions peuvent être erronées en présence de bruit expérimental (Schwarz & Soiné, 2015). Pour résoudre ce problème, la FTTC est associée à une méthode de régularisation qui permet de minimiser l'erreur due au bruit expérimental (Soiné *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2019) (voir Annexe B pour plus de détails sur les procédures de régularisation). Ces méthodes de régularisation consistent à faire des hypothèses sur la distribution spatiale et sur la gamme de forces de traction attendues : les forces de traction locales trop élevées ou les gradients de traction trop abrupts sont filtrés. Le choix du paramètre de régularisation ajuste ce "filtrage". Il peut être choisi de façon arbitraire ou déterminé automatiquement pour obtenir une réduction optimale du bruit expérimental sur la position des billes. Pour le déterminer automatiquement, plusieurs méthodes sont utilisées : le critère dit de la courbe en L (Hansen, 1992) ou l'estimation par une approche bayésienne (Huang *et al.*, 2019). Le choix du paramètre de régularisation influe beaucoup sur la distribution et la valeur des forces de traction reconstruites (Figure I.16 f). Si ce paramètre de régularisation est choisi trop petit, le bruit l'emporte sur les forces de traction estimées. Au contraire, s'il est choisi trop grand, la résolution spatiale du champ de force est plus faible et les valeurs de forces de traction sont sous-estimées.

3.3.4 Une alternative à la TFM : la méthode des micro-piliers

Cette méthode consiste à déposer les cellules sur un tapis de piliers cylindriques et élastiques. Typiquement, il s'agit de piliers en PDMS de rayon de l'ordre du μm , espacés de quelques μm (Figure I.13 j, Figure I.17). En générant des forces de traction, les cellules "fléchissent" les micro-piliers. Dans le régime linéaire des petites déformations, la déviation des micro-piliers est directement proportionnelle aux forces exercées par la cellule sur le substrat (Tan *et al.*, 2003; du Roure *et al.*, 2005; Ghibaudo *et al.*, 2008) (Figure I.17).

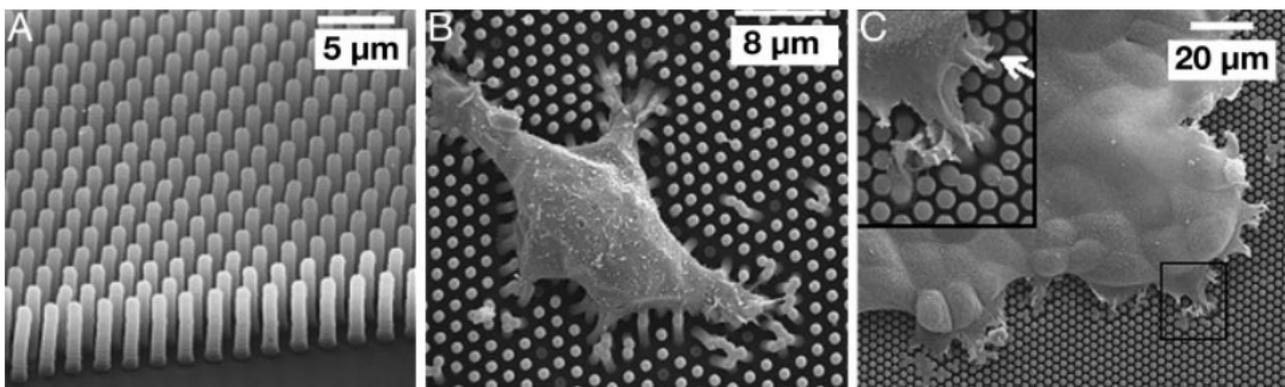


FIGURE I.17 – Méthode des micro-piliers pour mesurer les forces de traction (a) Image SEM du tapis de micro-piliers en PDMS utilisés pour mesure des forces de traction (b) Image SEM d'une cellule individuelle déposée sur un tapis de micro-piliers (1 μm de diamètre et 2 μm de distance centre à centre) qui exerce des forces faisant fléchir les piliers (c) Image SEM d'une monocouche de cellules, déposée sur un tapis de micro-piliers (2 μm de diamètre et 3 μm de distance centre à centre). Encart : Vue agrandie de la zone délimitée par le carré noir. Extrait de (du Roure *et al.*, 2005)

La méthode des micro-piliers présente l'avantage d'une reconstruction simple des forces à partir des déplacements par rapport à la TFM : il n'y a pas d'étape d'inversion numérique qui nécessite une procédure de régularisation. De plus, en jouant sur les facteurs de forme des piliers (hauteur L , diamètre D), une large gamme de raideurs K est accessible ($K \propto ED^4/L^3$). Elle présente néanmoins quelques inconvénients : difficultés de mise en œuvre (les piliers doivent toujours être en milieu aqueux pour éviter qu'ils ne collent les uns aux autres) et topographie particulière du substrat qui peut affecter le comportement physiologique de la cellule.

3.3.5 Détermination des forces de traction en 3D

Des études ont montré que les cellules exercent des forces de traction dans le plan mais aussi des forces normales au substrat qui peuvent être mesurées par la TFM "2,5 D" (0,5 D étant la dimension verticale située sous les cellules) (Hur *et al.*, 2009; Maskarinec *et al.*, 2009; Legant *et al.*, 2013). Des méthodes de TFM "3D" ont également été développées afin de mesurer les forces de traction exercées par les cellules confinées dans des matrices 3D à l'échelle de la cellule unique (Legant *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2013) et d'un groupe de cellules (Gjorevski *et al.*, 2015). Dans cette thèse, nous nous limitons à la mesure des forces de traction exercées par les cellules dans le plan 2D du substrat.

3.3.6 Relation entre forces de traction et propriétés morphologiques des cellules

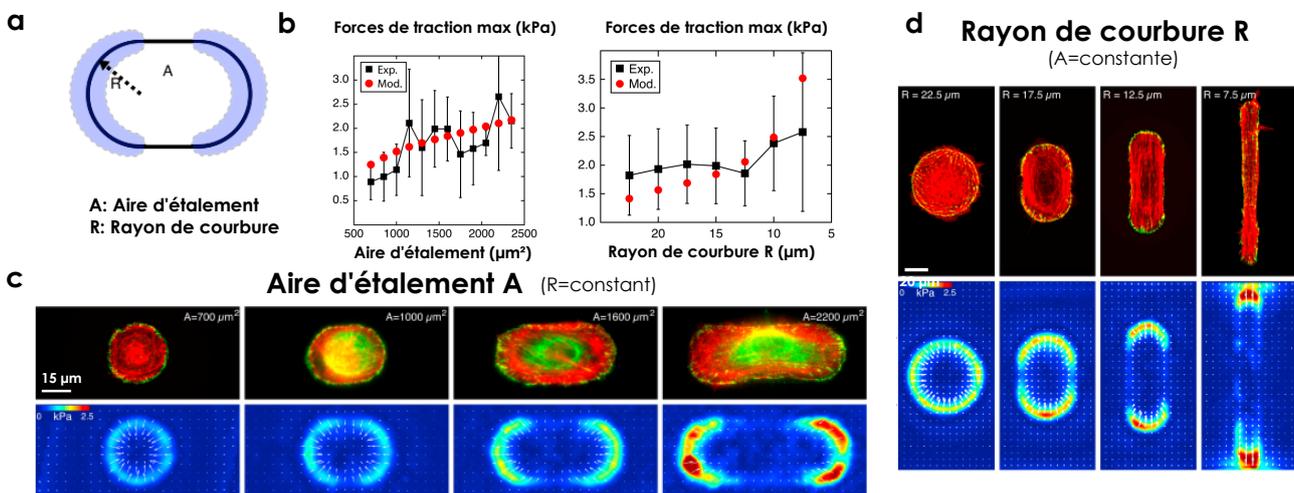


FIGURE I.18 – Influence des paramètres géométriques sur l'amplitude des forces de traction (a) Schéma montrant les paramètres géométriques étudiés avec des cellules fibroblastes NIH 3T3 : l'aire d'étalement A et le rayon de courbure R . (b) Forces de traction maximales en fonction de l'aire d'étalement de la cellule (à gauche) et du rayon de courbure (à droite). (c) Influence de l'aire d'étalement A (augmentation de A de gauche à droite) sur les forces de traction à R constant : (haut) marquage de l'actine (en rouge) et des adhésions focales (en vert) dans les cellules (bas) cartographie des forces de traction exercées par les cellules (d) Influence du rayon de courbure R (augmentation de R de gauche à droite) sur les forces de traction à A constante : (haut) marquage de l'actine (en rouge) et des adhésions focales (en vert) dans les cellules (bas) cartographie des forces de traction exercées par ces cellules. Adapté de (Oakes *et al.*, 2014).

Plusieurs études ont tenté d'identifier les paramètres affectant les forces de traction exercées par une cellule. Oakes *et al.* ont montré que l'amplitude de la force totale générée par une cellule est indépendante de la densité d'AF de la cellule mais qu'elle dépend fortement des paramètres géométriques (aire, courbure) (Oakes *et al.*, 2014) (Figure I.18). De plus, ils ont montré que :

- l'amplitude des forces de traction augmente avec la surface d'étalement de la cellule (Figure I.18 c)
- pour une surface d'étalement donnée, la courbure locale de la membrane cellulaire détermine la distribution et l'amplitude des forces de traction : l'amplitude des forces est d'autant plus grande que la courbure est importante.

4 **Src, acteur de la mécanique cellulaire et de la progression tumorale**

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à la protéine Src qui joue un rôle essentiel dans la régulation du phénotype mécanique des cellules. Src est également une oncoprotéine (Yeatman, 2004). La dérégulation de son activité est d'ailleurs observée dans de nombreux cancers humains et la suractivation de Src a été associée à un pouvoir invasif et métastatique accrue des cellules (Irby & Yeatman, 2000).

4.1 **Src : découverte, caractéristiques et mécanisme**

4.1.1 **Rétrospective historique**

v-Src est le premier oncogène viral à avoir été découvert. Cet oncogène viral est identifié pour la première fois par Peyton Rous en 1911 comme un virus pouvant produire des tumeurs dans le poulet (Rous, 1911). Il faut attendre les années 50 pour que son observation soit confirmée (Rubin, 1955; Svet-Moldavsky, 1957) : le Rous sarcoma virus (RSV) est bien responsable du développement de cellules tumorales dans le poulet. Le fait qu'un virus puisse causer un cancer reste un mystère jusqu'en 1970, année où Steve Martin isole un mutant thermosensible de RSV qui transforme les cellules de poulet à 35 ° C mais laisse les cellules normales si la température dépasse 35 ° (Martin, 1970). Cette découverte suggère qu'il existe au moins un gène dans l'ARN du virus responsable de la transformation cancéreuse des cellules du poulet, c'est-à-dire un oncogène. En 1976, Mickael Bishop et ses collègues découvrent que le gène responsable de l'induction de cancer dans le RSV, *v-src*, est un gène provenant d'une cellule normale du poulet, le gène *c-src* (Stehelin *et al.*, 1976). Durant une répllication, le virus RSV a inséré dans son génome un gène cellulaire, créant ainsi l'oncogène viral. Suite à ces découvertes, l'idée que ces oncogènes soient impliqués dans la progression tumorale sans l'intervention d'un virus émerge. Cette hypothèse sera vérifiée dans les décennies qui suivent : c-Src, une protéine importante dans de nombreux processus physiologiques se trouve sur-exprimée et suractivée dans de nombreux cancers (Yeatman, 2004).

Dans la suite, nous écrivons Src pour parler de l'oncoprotéine c-SRC, sauf mention contraire.

4.1.2 Structure de Src et localisation

La protéine Src appartient à la famille des SFKs (*Src Family Kinases*) : un groupe de tyrosine kinases non réceptrices. Les tyrosines kinases sont des enzymes qui transfèrent un phosphate de l'ATP vers un résidu tyrosine d'une protéine (phosphorylation) pour transmettre un signal depuis la surface de la cellule aux protéines cytoplasmiques ou au noyau. Elles sont dites "non réceptrices" lorsqu'elles sont non transmembranaires (par opposition aux réceptrices tyrosines kinases (RTK)) et sont localisées du côté interne de la membrane plasmique (Ingley, 2008).

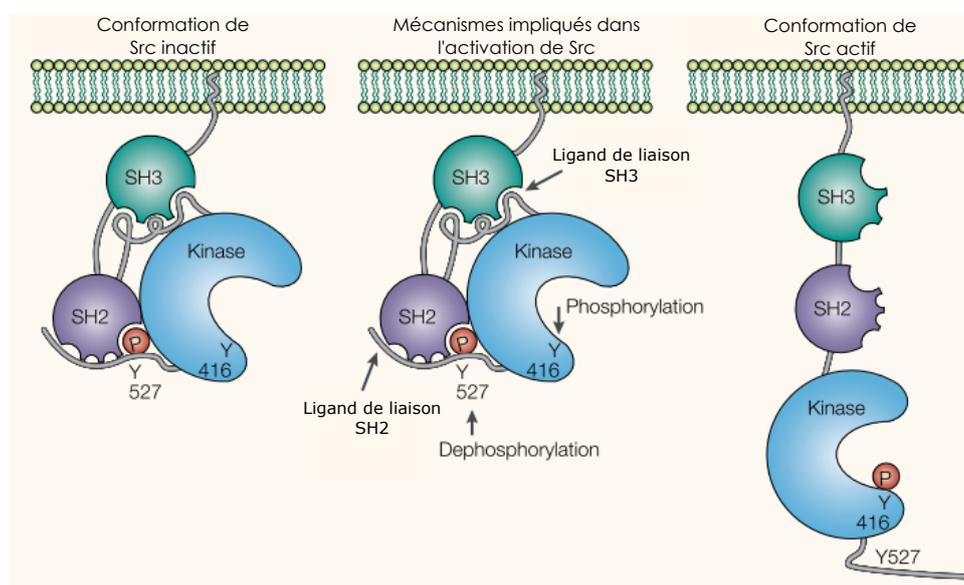


FIGURE I.19 – **Structure et fonctionnement de l'oncoprotéine c-Src (du poulet)** (a) Conformation inactive de Src dans le poulet : Y527 interagit avec le domaine SH2, SH3 interagit avec le domaine SH2 et le domaine catalytique. (b) Mécanismes impliqués dans l'activation de Src : déphosphorylation de Y527 et autophosphorylation de Y416 (c) Conformation ouverte, active de Src, la kinase peut phosphoryler ses substrats. Adapté de (Martin, 2001).

Chaque protéine de la famille Src contient une ancre méristoyle N-terminale qui la lie à la membrane plasmique ; une région SH4 spécifique à chaque protéine ; un domaine SH2 qui peut se lier à des sites spécifiques de phosphorylation de la tyrosine ; un domaine SH3 impliqué dans l'interaction protéine-protéine ; un domaine catalytique SH1 (domaine dit "tyrosine kinase") et une région C-terminale (Brown & Cooper, 1996). L'activité biologique de Src est régulée par la phosphorylation de deux sites : Y416 et Y527 dans le poulet (Y419 et Y530 chez l'homme). L'autophosphorylation de Y416 et la déphosphorylation de Y527 résultent en l'activation de Src alors que la phosphorylation de Y527 provoque son inhibition (Pawson *et al.*, 1987) (Figure I.19). Src est activée par de nombreux stimuli extracellulaires comme le facteur de croissance EGF (Maa *et al.*, 1995) mais aussi par les RTK (Bromann *et al.*, 2004).

4.2 Rôle de Src dans la mécanique cellulaire

4.2.1 Rôle de Src dans les système adhésifs de la cellule

Src, présente dans les adhésions focales de la cellule (Figure I.20 a), joue un rôle essentiel tout au long de leur vie : de leur naissance à leur désassemblage (Yeatman, 2004; Wu *et al.*, 2016). Pour permettre l'adhésion de la cellule à un substrat, Src inhibe RhoA, une protéine essentielle de la contractilité cellulaire (Boateng & Huttenlocher, 2012; Huveneers & Danen, 2009). Src participe ensuite à la maturation des AF (Playford & Schaller, 2004) en phosphorylant deux substrats : p130Cas et paxilline (Sachdev *et al.*, 2009). Enfin Src joue un rôle essentiel dans le désassemblage des AF (Webb *et al.*, 2004).

Src régule également les jonctions adhérentes entre cellules (Yeatman, 2004; Gayrard *et al.*, 2018; Teo *et al.*, 2020a) (Figure I.20 a). Des études ont d'ailleurs montré son rôle dans le remodelage du tissu épithélial (Shindo *et al.*, 2008; Hunter *et al.*, 2018). Récemment, Teo *et al.* ont montré que l'activation de Src permettait de diminuer la tension au niveau des jonctions entre cellules pour faciliter l'extrusion d'une cellule apoptotique (Teo *et al.*, 2020a). L'activation de Src peut aussi donner lieu au désassemblage des JA (Fujita *et al.*, 2002). De plus, il semble que l'activation de Src soit à l'origine d'une TEM partielle ou complète des cellules épithéliales (Boyer *et al.*, 2002; Frame, 2002). Behrens *et al.* ont montré que l'oncogène *v-src* participe à la différenciation épithéliale et à leur pouvoir invasif. Les cellules épithéliales MDCK transfectées avec un mutant thermosensible de *v-src* ont un phénotype épithélial à 40,5°C et acquièrent une morphologie de type fibroblaste à la température spécifique de 35°C qui se caractérise notamment par une perte des contacts entre les cellules (Behrens *et al.*, 1993).

4.2.2 Rôle de Src dans la mécanotransduction

Src régule l'interaction entre les intégrines et le cytosquelette de la cellule et se trouve donc au cœur des mécanismes de mécanotransduction (Thomas & Brugge, 1997; Guarino, 2010) : Src peut interagir directement avec les intégrines $\beta 3$ *via* son domaine SH3 (Huveneers & Danen, 2009; De Mets *et al.*, 2019). Au niveau des sites d'engagement des intégrines, l'activation de Src est responsable de l'activation de Rac et, par conséquent, de l'activité protrusive ainsi qu'au recrutement de p130Cas et de la paxilline, participant à la maturation des adhésions (Playford & Schaller, 2004). L'association de Src aux intégrines permet de traduire la déformation mécanique en signaux biochimiques (Figure I.20) (Koudelková *et al.*, 2021). Une étude parue en 2005 montre qu'une stimulation mécanique locale (poussée sur la membrane à l'aide de billes, manipulées avec une pince optique) dans des HUVECs donne naissance à une vague d'activation de Src, directionnelle et à portée longue (à plusieurs dizaine de μm du point d'application de la force) (Wang *et al.*, 2005).

4.2.3 Rôle de Src dans la migration cellulaire

Src orchestre le renouvellement des adhésions et joue ainsi un rôle central dans la migration cellulaire : en l'absence de Src, la motilité des cellules est fortement altérée (Klinghoffer *et al.*, 1999). Src

Mutation de Src Src est rarement mutée en comparaison à d'autres oncogènes comme Ras, muté dans 30% des cancers (Prior *et al.*, 2012). Irby *et al.* ont rapporté qu'un mutant de Src (mutation au niveau de Y530), montrant une activité oncogène significative lorsqu'il est transfecté dans des fibroblastes de rongeurs, était exprimé dans 12% des cellules du CRC testées (Irby *et al.*, 1999). En séquençant les kinases d'un grand nombre de biopsies cancéreuses, une étude plus récente a montré que le taux de mutation de Src dans les CRC était plus faible que celui obtenu par Irby *et al.* : Src est mutée dans seulement 1% des cellules CRC analysées (Greenman *et al.*, 2007). Le fait que les mutations soient rares indique que la dérégulation de Src dans les cancers est induite par d'autres mécanismes (Frame, 2002; Sirvent *et al.*, 2012) (Figure I.21 a).

Surexpression La dérégulation de Src dans le CRC est associée à une surexpression de la protéine (Summy & Gallick, 2003) : Src se trouve en effet surexprimée dans les biopsies tumorales (Yeatman, 2004). Cependant, la surexpression seule de Src n'est pas suffisante pour induire une transformation cellulaire (Maa *et al.*, 1995). La surexpression de Src dans les cancers semble donc liée à une altération des régulateurs de Src (Brown & Cooper, 1996; Mao *et al.*, 1997; Summy & Gallick, 2003). Sirvent *et al.* ont ainsi montré que la rétention de CSK, principal inhibiteur de l'activité de Src, est suffisante pour induire pleinement l'activité oncogénique de Src dans le CRC (Sirvent *et al.*, 2009).

Suractivation Src se trouve également suractivée dans de nombreux cancers humains (Irby & Yeatman, 2000). Le niveau d'autophosphorylation du site Y416 permet de mesurer l'activité de Src dans les cellules. L'activité de Src est 4 à 20 fois plus importante dans les cellules cancéreuses du sein et 5 à 8 fois plus grande dans la majorité des CRC (Irby & Yeatman, 2000). Cette suractivité correspond à une activité oncogénique suffisante pour transformer la cellule (Summy & Gallick, 2003). De plus, le niveau de suractivation de Src est associé à un mauvais pronostic clinique (Allgayer *et al.*, 2002; Elsberger *et al.*, 2010), suggérant un rôle crucial de Src dans la tumorigénèse tardive. Talamonti *et al.* ont montré que le niveau d'activation de c-Src augmentait au cours de la progression tumorale : des cellules métastatiques de CRC présentent des niveaux d'activation de Src 90 fois plus grand que les niveaux détectés dans la muqueuse normale (Talamonti *et al.*, 1993). La diminution des adhésions entre cellules et l'activation de protéines qui dégradent la MEC suite à l'activation de Src augmentent le pouvoir invasif des cellules (Figure I.21 c). Src accroît également la motilité des cellules cancéreuses en régulant les adhésions focales et le cytosquelette (Yeatman, 2004). De plus, l'activation de Src stimule l'angiogenèse par l'activation de VEGF (Abu-Ghazaleh *et al.*, 2001) (Figure I.21 c). Src est aussi impliquée dans la TEM *via* la désorganisation des adhésions cellule-cellule (De Rooij *et al.*, 2005) et l'activation de la voie de signalisation FAK-ERK-MLCK-myosines II (Avizienyte *et al.*, 2004; Avizienyte & Frame, 2005) (Figure I.21 c). Ayant un rôle mineur dans la prolifération cellulaire, Src semble plus importante dans le maintien d'un phénotype malin que dans l'initiation tumorale (Summy & Gallick, 2003). Dans le CRC, une surexpression et une suractivation de Src interviennent au début de la carcinogenèse puis la progression vers l'état métastatique est associée à une augmentation de

l'activité de Src (Figure I.21 b) (Summy & Gallick, 2003; Yeatman, 2004).

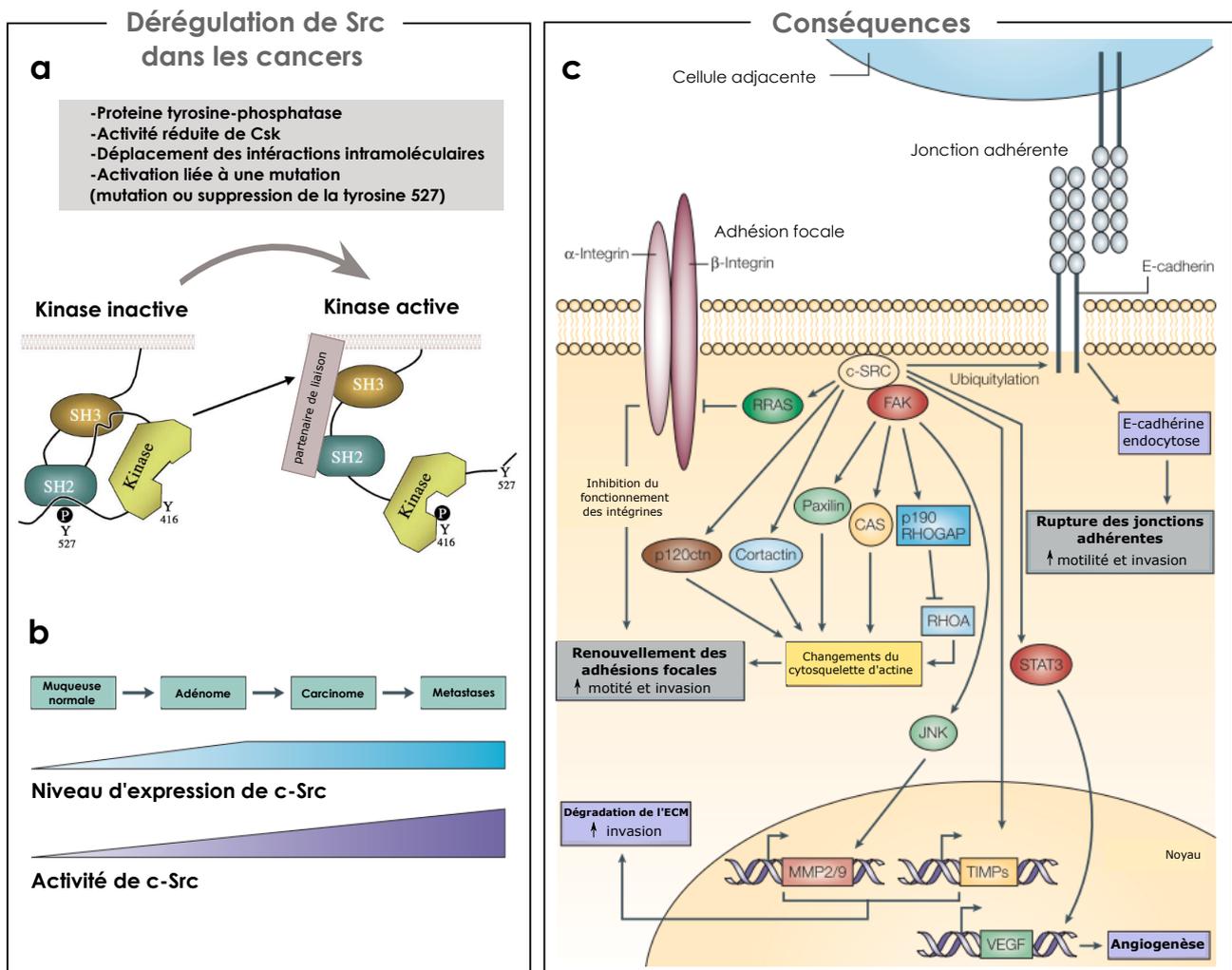


FIGURE I.21 – **Src, acteur de la progression tumorale** (a) Mécanismes pouvant mener à la conformation ouverte de Src (conformation active de Src) dans les cellules cancéreuses. Adapté de (Frame, 2002). (b) Niveaux d'expression et d'activité de Src dans la progression du cancer colorectal. La surexpression et l'activation de Src sont des caractéristiques précoces de la formation des adénomes, tandis que l'augmentation continue de l'activité de Src est observée avec la progression tumorale vers le stade métastatique. (c) Rôle d'une suractivation de Src dans la progression tumorale. Src augmente le pouvoir invasif et la motilité des cellules : perte des adhésions cellule-cellule et renouvellement des adhésions focales. Son activation entraîne par ailleurs l'activation des protéines de dégradation de la matrice extracellulaire et participe à l'angiogenèse. Adapté de (Yeatman, 2004).

4.3.2 Src, une cible thérapeutique

Src est apparue comme une cible thérapeutique de choix et de nombreuses molécules pharmacologiques ont été développées dans le but d'inhiber Src de façon sélective dans les cancers : la plus connue est le dasatinib (Aleshin & Finn, 2010; Mayer & Krop, 2010). Ces inhibiteurs semblent mieux fonctionner au début de la carcinogenèse et pourraient se révéler assez efficaces si ils sont combinés à d'autres traitements (Aleshin & Finn, 2010). Le succès de ces molécules s'est cependant avéré limité

en raison de l'implication de Src dans de nombreux processus physiologiques : son inhibition peut être au désavantage du patient.

4.4 Études *in vitro* sur la suractivation de Src

De nombreuses études *in vitro* ont porté sur l'effet de la suractivation de Src dans des cellules en culture (Table I.2). Listons ici les changements de morphologie et de propriétés mécaniques des cellules suractivant Src.

Effet sur la morphologie de la cellule La suractivation de Src induit un étalement des cellules (Polackwich *et al.*, 2013; Karginov *et al.*, 2014; Klomp *et al.*, 2016; Shaaya *et al.*, 2020; Kerjouan *et al.*, 2021). Karginov *et al.* ont utilisé un commutateur allostérique (*Rap-R*) pour étudier les effets d'une suractivation de Src sur la morphologie de cellules HeLa (Karginov *et al.*, 2014). *Rap-R* permet d'activer Src lors d'ajout de rapamycine. Le système *Rap-R* a été fabriqué en insérant une protéine de liaison iFKBP dans le domaine catalytique de c-Src qui provoque son inactivation. L'ajout de rapamycine entraîne l'hétérodimérisation de l'iFKBP avec FRB (*FKBP-rapamycin binding*), ce qui provoque la réactivation de Src. En utilisant ce système, Karginov *et al.* ont montré que des cellules HeLa s'étaient fortement étalées suite à l'activation de Src (augmentation de l'aire d'un facteur 2) (Figure I.22 a) (Karginov *et al.*, 2014). Un peu plus tôt, en 2013, une étude avait montré que dans un environnement 3D de collagène, des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 suractivant Src ont une aire et un volume plus grand que des cellules Src wt (Polackwich *et al.*, 2013) (Figure I.22 b).

Effet sur le cytosquelette d'actine L'étalement des cellules Src-activées s'accompagne de la formation d'extensions membranaires : lamellipodes et filopodes. Polackwich *et al.* ont montré que dans un environnement 3D de PAA, des cellules MDA-MB-231 suractivant Src présentent deux fois plus de filopodes et que ceux-ci sont deux fois plus longs que ceux des cellules contrôles (exprimant un Src wt) (Polackwich *et al.*, 2013). Ils ont aussi montré que les extensions formées ont un temps de vie plus grand dans les cellules Src-activées que dans les cellules wt (Figure I.22 d). La présence de *ruffles*, cycles de protrusion/rétraction de la membrane au niveau des lamellipodes est une autre caractéristique de l'activation de Src (Hamadi *et al.*, 2009; Shaaya *et al.*, 2020). Du point de vue moléculaire, l'activation de Src entraîne l'activation de Rac (Guarino, 2010; Klomp *et al.*, 2016), petite GTPase qui sous sa forme active déclenche la formation de lamellipodes. La suractivation de Src provoque également l'activation de FAK et de p130Cas (Karginov *et al.*, 2014), tous deux impliqués dans la formation de lamellipodes et de filopodes.

Effet sur le système adhésif de la cellule La suractivation de Src affecte les systèmes adhésifs de la cellule (adhésions avec la MEC et adhésions cellule-cellule). En observant la localisation de Src dans des astrocytomes humains U87-MG suractivant Src (transfectées avec le mutant Src-Y530F), Hamadi *et al.* ont montré que la protéine Src, initialement dans les AF des cellules, se relocalise dans

les membranes nouvellement formées, où elle initie la formation de nouvelles adhésions. Karginov *et al.* ont ensuite montré que les adhésions sont deux fois plus nombreuses et plus longues dans des cellules HeLa Src-activées (activation du système *Rap-R*) (Karginov *et al.*, 2014). Cette observation avait d'ailleurs d'ailleurs été observée par Polackwich *et al.* (Polackwich *et al.*, 2013) (Figure I.22 c). Les adhésions entre cellules sont également affectées par la suractivation de Src. Irby *et al.* ont montré que les cellules du CRC suractivant Src ont jusqu'à sept fois moins d'adhésions entre elles que des cellules wt (Irby & Yeatman, 2002). En effet, la suractivation de Src entraîne la phosphorylation des cadhérines donc la perte de l'association entre cadhérine et caténine. En particulier, l'activité élevée de Src entraîne la redistribution des composants des jonctions adhérentes vers les complexes adhésifs avec la MEC (Avizienyte *et al.*, 2002).

Effet sur les forces de traction et la rigidité corticale En utilisant la TFM, Polackwich *et al.* ont montré que la suractivation de Src dans des cellules MDA-MD-231 augmente les forces de traction d'un facteur 1,5 dans un environnement 3D (Polackwich *et al.*, 2013) (Figure I.22 e). En 2014, par des mesures AFM, Sreenivasappa *et al.* ont montré que des cellules musculaires VSMC suractivant Src sont, dans la région lamellaire, plus rigides que les cellules wt (Sreenivasappa *et al.*, 2014) (Figure I.22 f). Ces études montrent que les propriétés mécaniques cellulaires sont modifiées sous l'effet de l'activation de Src.

Etude	Type cellulaire	Espèce	2D /3D	Substrat	I/C	Technique utilisée pour suractiver Src	Résultats majeurs sur le phénotype mécanique des cellules Src-activées
(Irby & Yeatman, 2002)	SW 480 et HCT 116 cellules cancéreuses du colon	H	2D	plastique	C	Src-531	diminution de l'adhésion entre cellules
(Avizienyte <i>et al.</i> , 2002)	KM12C cellules cancéreuses du colon	H	2D	plastique	C	pUSE/Src527F	redistribution du système adhésif
(Hamadi <i>et al.</i> , 2009)	U87-MG	H	2D	178 mg/ml Matrigel	I	c-Src-Y530F	formation de nouvelles adhésions
(Polackwich <i>et al.</i> , 2013)	MDA-MB-231	H	3D	collagène 80 Pa	I	c-Src(Y527F)	étalement, augmentation du volume, des forces de traction, du nombre, du temps de vie et de la longueur des adhésions
(Karginov <i>et al.</i> , 2014)	HeLa	H	2D	verre	I	RapR	étalement, augmentation du nombre et de la taille des adhésions, mécanismes moléculaires
(Sreenivasappa <i>et al.</i> , 2014)	VSMC	R	2D	verre	I	c-Src-Y530F	augmentation de la rigidité dans la zone lamellaire
(Klomp <i>et al.</i> , 2016)	HeLa	H	2D	verre	I	RapR	étalement, mécanismes moléculaires
(Shaaya <i>et al.</i> , 2020)	HeLa	H	2D	verre	I	LightR	étalement, mécanismes moléculaires
(Kerjouan <i>et al.</i> , 2021)	MDCK, SYF	C,S	2D	verre	I	optoSrc	étalement, relocalisation de Src au niveau des adhésions focales

TABLE I.2 – Conditions expérimentales et principaux résultats des études *in vitro*, mentionnées dans ce manuscrit, décrivant les effets de la suractivation de Src dans des cellules en culture : type cellulaire, espèce (H : humain, R : rat, C : chien, S : souris), dimension, substrat utilisé, échelle de l'étude (I : cellule individuelle, C : colonie de cellules), méthode utilisée pour suractiver Src, principaux résultats sur le phénotype mécanique des cellules Src-activées.

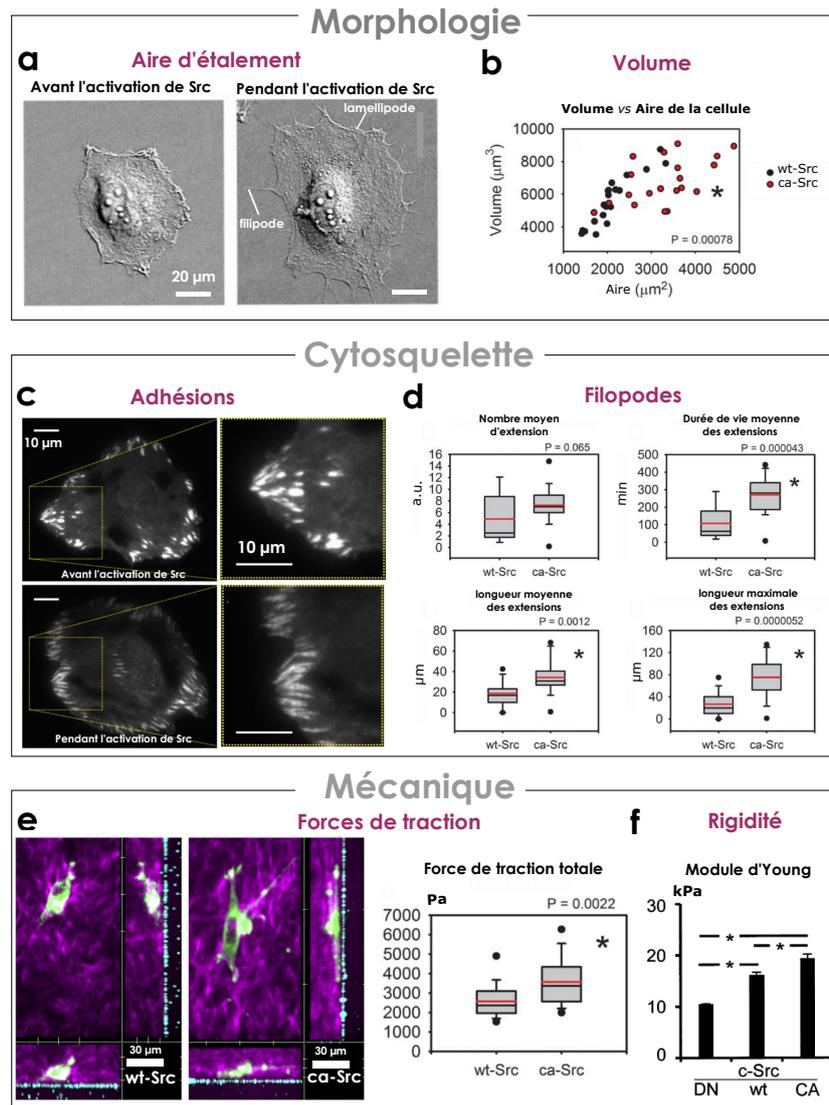


FIGURE I.22 – Effets de la suractivation de Src sur la morphologie, le cytosquelette et les propriétés mécaniques des cellules (a) Image d'une cellule HeLa avant activation (gauche) et après activation de Src (avec le système de switch allostérique *Rap-R*) (droite). Adapté de (Karginov *et al.*, 2014). (b) Comparaison de la morphologie (Volume en fonction de l'aire) de cellules cancéreuses du sein MDA-MD-231 transfectées avec un Src wt ou un Src constitutivement actif (ca-Src) dans un environnement 3D de collagène de rigidité 80 Pa, adapté de (Polackwich *et al.*, 2013). (c) Image en fluorescence des adhésions dans des cellules HeLa, avant et pendant l'activation de Src, même système qu'en (a) : formation de nouvelles adhésions et élongation des adhésions dans les cellules Src-activées. Adapté de (Karginov *et al.*, 2014). (d) Mesure du nombre, de la durée de vie moyenne, des longueurs moyenne et maximale des extensions des cellules wt et ca-Src. (e) (gauche) Images confocales des cellules Src wt et ca-Src dans le gel de PAA (droite) Forces de traction totales (en Pa). (d-e) adapté de (Polackwich *et al.*, 2013). (f) Mesure du module d'Young dans la zone lamellaire de cellules Src dominant négatif (DN), Src wt et suractivant Src (constitutivement actif, CA) en utilisant un AFM. Adapté de (Sreenivasappa *et al.*, 2014).

4.5 Src et la compétition cellulaire

L'interaction entre des cellules normales et des cellules suractivant Src donne lieu à un phénomène de compétition entre les deux populations cellulaires (Kajita *et al.*, 2010; Moitrier *et al.*, 2019a;

Kajiwara *et al.*, 2021). Kajita *et al.* ont montré que dans l'embryon de poisson zèbre, les cellules *Src*-activées (activation induite par *v-Src*) sont extrudées du tissu sain (Kajita *et al.*, 2010) (Figure I.23 a). *In vitro*, ils ont aussi montré que la suractivation de *Src* (induite par le mutant *ts-Src*) dans des cellules isolées au sein d'une monocouche MDCK entraîne aussi leur extrusion apicale (Kajita *et al.*, 2010) (Figure I.23 b). Plus récemment, notre équipe a montré que la suractivation locale de *Src* dans un groupe de cellules au sein d'une monocouche de cellules MDCK (en utilisant le système optogénétique *optoSrc* décrit dans la partie suivante) résulte en une extrusion apicale et collective des cellules transformées (Moitrier *et al.*, 2019a) (Figure I.23 c).

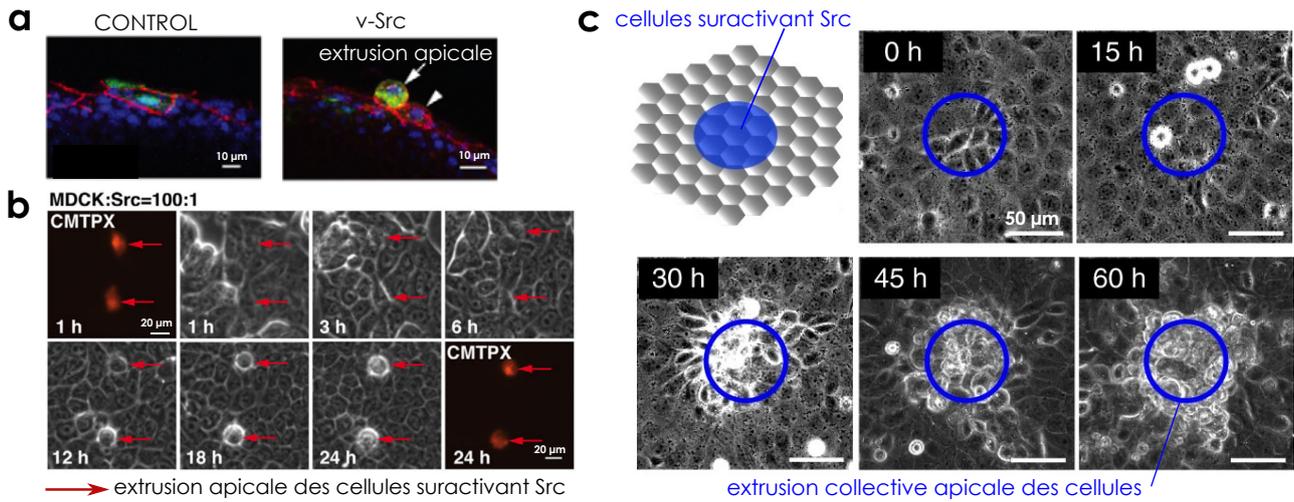


FIGURE I.23 – **Compétition entre cellules suractivant *Src* et cellules normales** (a) Une cellule exprimant *v-Src* (en vert) est extrudée apicalement d'une monocouche de la couche enveloppante d'un embryon de poisson zèbre. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu et les jonctions entre cellules en rouge. Adapté de (Kajita *et al.*, 2010). (b) Des cellules MDCK *ts-Src* sont marquées par un fluorophore (CMTPIX, rouge) et mélangées avec des cellules MDCK normales. Un changement de température (35°C) entraîne l'activation de *Src* dans ces cellules : les cellules *Src*-activées (indiquées par les flèches rouges) sont alors extrudées apicalement par les cellules MDCK normales. Adapté de (Kajita *et al.*, 2010). (c) Images en contraste de phase montrant l'extrusion collective de cellules suractivant *Src* (situées dans le cercle bleu), après 30 h de suractivation, dans une monocouche de cellules MDCK. Adapté de (Moitrier *et al.*, 2019a).

Les études *in vitro* ont permis de décrire les changements de morphologie des cellules *Src*-activées. Certaines d'entre elles ont aussi permis d'identifier quelques acteurs moléculaires impliqués dans ces changements. Dans notre étude *in vitro*, nous avons combiné optogénétique, TFM, pharmacologie, et microfabrication pour pouvoir étudier non seulement le changement de phénotype mécanique (aire et force) mais aussi les voies de signalisation, associés à la suractivation de *Src*, à l'échelle de la cellule individuelle (**Chapitre III**) puis en fonction de la rigidité du substrat (**Chapitre IV**).

5 Notre approche pour étudier le phénotype mécanique de cellules Src-activées

5.1 Questions posées

Cette étude vise à étudier le phénotype biomécanique de cellules transformées par la suractivation de Src et à analyser dans un second temps comment ces cellules transformées adaptent leur phénotype à la rigidité de leur environnement.

5.2 L'optogénétique pour suractiver Src

5.2.1 Principe de l'optogénétique

L'optogénétique allie optique et génétique pour contrôler dans le temps et dans l'espace l'expression d'un gène ou d'une protéine *via* la lumière. Cette méthode a tout d'abord été développée dans le domaine des neurosciences ; depuis 2010 elle s'impose comme une méthode de choix en biologie cellulaire (Toettcher *et al.*, 2010; Kennedy *et al.*, 2010; Deisseroth, 2011; Tischer & Weiner, 2014). En effet, l'optogénétique permet d'étudier de manière spécifique le rôle de protéines à différentes échelles : intracellulaire (Toettcher *et al.*, 2013; Cavanaugh *et al.*, 2020), cellulaire (Valon *et al.*, 2017; Moitrier *et al.*, 2019a) et même à l'échelle d'un organisme entier comme dans les embryons de drosophile pour l'étude de la morphogenèse (Guglielmi *et al.*, 2016; Hartmann *et al.*, 2020). Les systèmes optogénétiques utilisent des couples de protéines photosensibles. Les plus connus étant :

- les domaines LOV (*light-oxygen-voltage*) activables en lumière bleue ($\lambda \sim 450$ nm) (Crosson *et al.*, 2003)
- les cryptochromes CIB1 et CRY2 activables en lumière bleue ($\lambda \sim 390-480$ nm) (Liu *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2010)
- les phytochromes B et PIF6 activables en lumière rouge ($\lambda \sim 650$ nm) et inactivés en lumière infra-rouge ($\lambda \sim 750$ nm) (Pathak *et al.*, 2013)

L'exposition à la lumière de ces systèmes optogénétiques permet soit la dimérisation des protéines, soit un changement de conformation allostérique, ou de rendre active une protéine dont la fonction était stériquement bloquée (Shaaya *et al.*, 2021).

5.2.2 Avantages et limitations de l'optogénétique

Approches "classiques" de biologie cellulaire Les approches "classiques" pour perturber l'expression d'une protéine englobent la pharmacologie et les approches génétiques.

- **L'approche pharmacologique** consiste à utiliser de petites molécules (centaines de g/mol), le plus souvent perméables à la membrane, qui inhibent/ activent l'action d'une ou plusieurs protéines pour étudier leurs rôles dans les mécanismes biologiques étudiés (Martino *et al.*, 2018).
- **Approches génétiques** Pour perturber l'expression des protéines, plusieurs outils génétiques existent : le *knock down*, qui consiste à réduire l'expression d'un ou plusieurs gènes (en utilisant des siARN) et le *knock out* qui consiste à inactiver un gène en le remplaçant ou le supprimant. La

technologie CRISPR-Cas9 est aussi utilisée depuis quelques années pour contrôler l'expression des protéines en changeant directement le génome des cellules (Adli, 2018). Cette technologie permet d'ailleurs de réaliser plus efficacement des *knock in* (Banan, 2020) et des *knock out* (Ishibashi *et al.*, 2020).

L'approche pharmacologique est relativement peu coûteuse, rapide et simple à mettre en place. Cependant elle ne permet pas un contrôle précis ni dans le temps ni dans l'espace ; elle n'est pas très sélective et est rarement réversible. Les approches génétiques, quant à elles, peuvent être longues, coûteuses et complexes à mettre en place ; elles ne sont pas non plus réversibles mais offrent une meilleure spécificité.

Avantages de l'optogénétique L'optogénétique présente plusieurs avantages : une grande spécificité (car l'inhibition ou l'activation est génétiquement encodée), une excellente résolution dans le temps (échelle de la s-min) et dans l'espace (μm), une toxicité moindre et un processus souvent réversible (Tischer & Weiner, 2014). En outre, les systèmes optogénétiques permettent d'activer de façon transitoire une protéine donnée, avec la possibilité d'effectuer des cycles répétés d'activation/inactivation. Lorsqu'ils ciblent une kinase, ils miment alors ce qu'il se passe *in vivo* (Kholodenko, 2006).

Limitations de l'optogénétique L'optogénétique présente néanmoins quelques limitations :

- **Longueur et difficulté à mettre en place**
- **Limitations des canaux de fluorescence utilisables** : la majorité des systèmes optogénétiques sont sensibles à la lumière bleue (longueurs d'onde comprises entre 405-530 nm). Ceci limite le choix des protéines fluorescentes pour l'observation des protéines ou composants cellulaires.
- **Phototoxicité** : la lumière bleue peut être toxique pour les cellules (Magidson & Khodjakov, 2013). Il convient de l'utiliser à puissance faible et de privilégier l'utilisation de pulses d'activation pour éviter les effets phototoxiques (Douthwright & Sluder, 2017).
- **Contraintes pour le marquage de composants cellulaires** : l'optogénétique rend difficile la mise en place de certaines techniques nécessitant de fixer l'échantillon telles que l'immunomarquage.

5.2.3 Le système CRY2-CIBN

Le système CRY2/CIBN est un couple de protéines issues de plantes, couramment utilisé en optogénétique. Les protéines CRY2 et CIBN s'associent rapidement (environ 3 s) lorsqu'elles sont illuminées en lumière bleue (390-480 nm) et se dissocient à l'arrêt de l'illumination dans le bleu (Figure I.24 a-c). Le temps de demi-vie est de 6 ± 1 min (Idevall-Hagren *et al.*, 2012) et la complète dissociation du dimère CRY2-CIBN se fait en 12 min (Kennedy *et al.*, 2010) (Figure I.24 d).

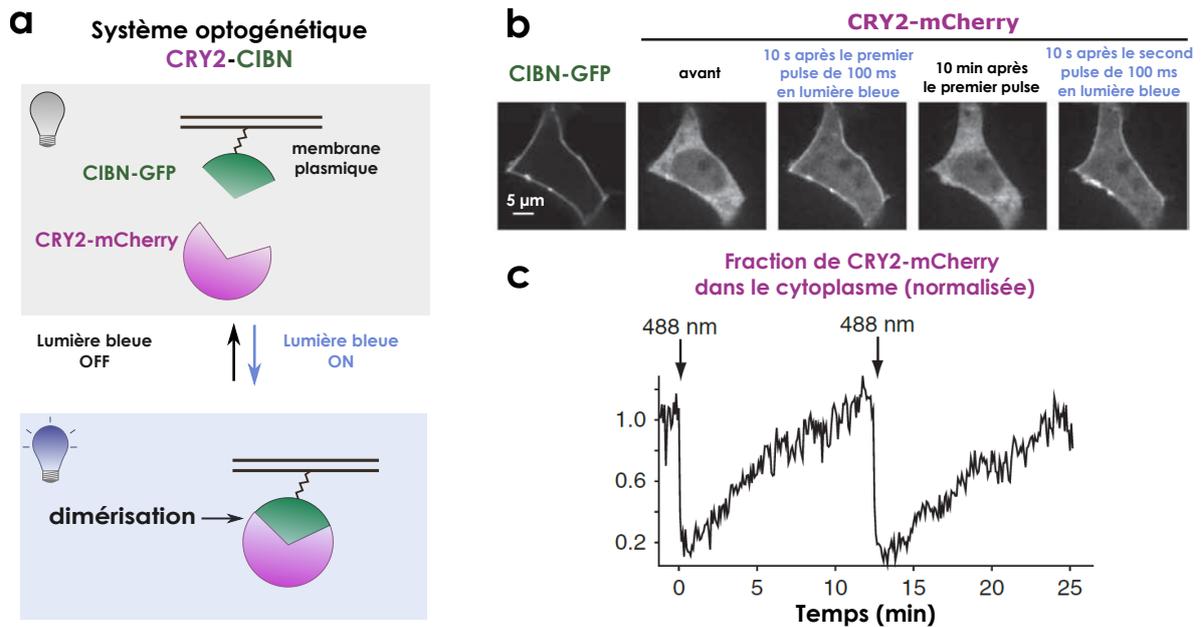


FIGURE I.24 – **Système optogénétique CRY2-CIBN** (a) Schéma de la dimérisation des protéines CRY2 (marquée par la m-Cherry) et CIBN (marquée par la GFP, à la membrane) sous lumière bleue, réversible en l'absence de lumière bleue. (b) Images de fluorescence de CIBN-GFP et de CRY2-mCherry co-exprimées dans des cellules HEK293T. CRY2-mCherry est imagée avant l'excitation lumineuse (CRY2 est cytoplasmique) et après deux impulsions de 100 ms de lumière bleue (488 nm) espacées de 12,5 min. (c) Quantification de la fluorescence du CRY2-mCherry cytoplasmique d'une cellule soumise à des impulsions de lumière bleue à 0 et 12,5 min (indiquées par les flèches noires). Au bout de 12 min, la fraction de CRY2-mCherry qui s'est transloquée à la membrane après l'impulsion en lumière bleue a rediffusé entièrement dans le cytoplasme. Adapté de (Kennedy *et al.*, 2010).

5.2.4 L'optoSrc, une version photoactivable de Src

Notre collaborateur (O. Destaing, Institute for Advanced Biosciences, Inserm U 1209, CNRS UMR 5309 et Université Grenoble Alpes) a élaboré une version synthétique et photoactivable de la protéine Src basé sur le système CRY2-CIBN : l'optoSrc (Figure I.25). Pour cela il a réalisé plusieurs mutations, inspirées de la littérature :

- suppression de l'ancrage membranaire méristoyale
- suppression de l'activité de SH2 par la mutation R175L
- substitution de la tyrosine par la phénylalanine pour obtenir une conformation ouverte de Src (mutation Y527F)
- fusion avec CRY2-mCherry

Pour résumer, l'optoSrc est un mutant Src constitutivement actif, qui est (Figure I.25) :

- cytoplasmique
- fusionné à CRY2-mCherry
- prêt à être relocalisé à la membrane sous l'effet d'un pulse de lumière bleue où il pourra phosphoryler ses substrats (il est dit "potentiellement actif").

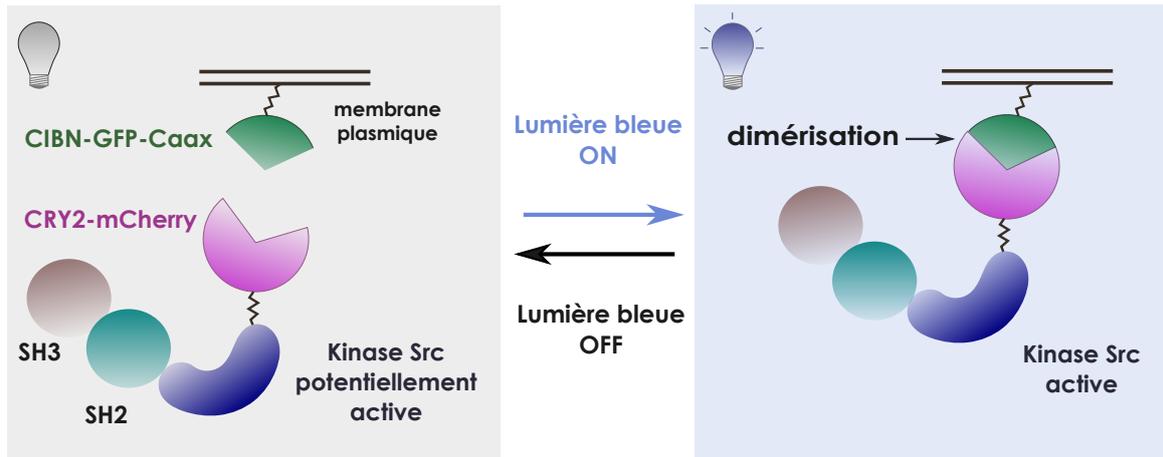


FIGURE I.25 – **Le système optoSrc (à gauche)** En l'absence de lumière bleue, l'optoSrc fusionné au marqueur fluorescent mCherry est situé dans le cytoplasme de la cellule. **(à droite)** Sous illumination en lumière bleue, il y a dimérisation de OS et du CIBN-GFP-Caax ancré à la membrane : l'optoSrc se relocalise à la membrane où il peut phosphoryler ses substrats. Cette activation forcée de Src est réversible : à l'arrêt de l'illumination bleue, l'optoSrc rediffuse dans le cytoplasme (temps caractéristique de dissociation de ~ 3 min).

L'optoSrc (OS) ne mime donc pas complètement la structure de Src : l'ancrage spécifique à la membrane manque et est remplacé par un motif Caax (*Cysteine, aliphatic amino acid x : amino acid*). De plus, l'OS présente une mutation ponctuelle importante dans le domaine SH2 qui limite sa capacité à se lier aux motifs phosphotyrosines (pTyr). Enfin le site Tyr527, important dans la régulation de l'ouverture de la kinase, a aussi été supprimé dans l'OS.

Cette construction a été exprimée de façon stable dans une lignée épithéliale modèle, la lignée MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) pour obtenir des cellules "MDCK optoSrc" (Figure I.26). L'illumination dans le bleu de ces cellules induit une suractivation de la protéine Src après quelques s. Le système optoSrc permet ainsi de contrôler dans le temps et dans l'espace le niveau de Src actif, et ce, de manière réversible (temps de dissociation totale de ~ 12 min) (Moitrier *et al.*, 2019a; Kerjouan *et al.*, 2021) (Figure I.26 a et d).

Caractérisation biologique des cellules MDCK OS éclairées en lumière bleue Pour des cellules MDCK OS éclairées dans le bleu, l'expression de pY416 (autophosphorylation) augmente de plus d'un facteur 2, signe que l'OS est capable de s'autophosphoryler sous lumière bleue (Kerjouan *et al.*, 2021) (Figure I.26 b). De plus, la suractivation de Src dans des cellules SYF (cellules dépourvues de Src endogène) montrent des niveaux de phosphorylation de la paxilline équivalents à ceux d'un Src wt (Kerjouan *et al.*, 2021). L'illumination dans le bleu de l'OS crée donc une suractivation de Src dans la même gamme qu'un Src endogène : il s'agit d'une activation physiologique de Src. D'un point de vue morphologique, le recrutement de l'OS à la membrane génère des lamellipodes et des *ruffles* dorsaux (Figure I.26 a). Les lamellipodes sont formés immédiatement après la photoactivation de Src ($1 \pm 0,5$ min) et disparaissent environ 5 min après l'arrêt de l'illumination (Kerjouan *et al.*, 2021) (Figure I.26 c), en accord avec la littérature (Karginov *et al.*, 2014) (voir Paragraphe 4.4). La

dynamique d'apparition et de disparition des lamellipodes est cohérente avec le temps caractéristique de dimérisation (~ 3 s) et de dissociation (~ 3 min) du système CRY2-CIBN.

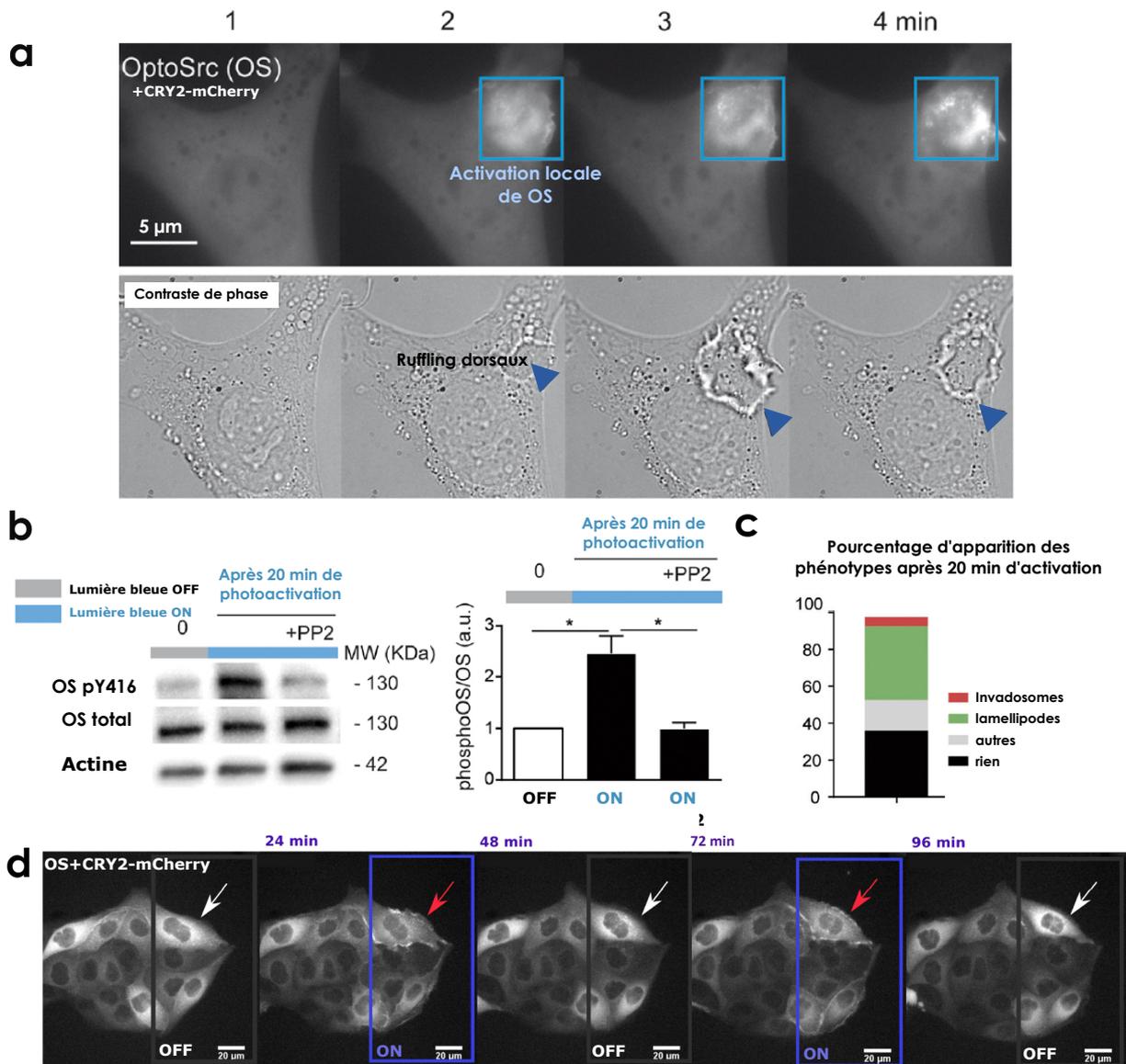


FIGURE I.26 – Activation de l'optoSrc dans des cellules MDCK (a) Séquence temporelle d'images en fluorescence montrant l'activation cyclique locale de l'OS marqué en mCherry (carré bleu, impulsion de 100 ms toutes les 30 s pendant 5 min) dans des cellules MDCK optoSrc. L'activation de OS induit son recrutement à la membrane plasmique exprimant CIBN-GFP-Caax, déclenchant localement des *ruffles* dorsaux de la membrane (flèches bleues). (b) L'illumination de l'OS dans le bleu induit une activation de son domaine kinase (mesurée par le ratio OS pY416 :OS total) mais pas en présence de PP2, un inhibiteur de Src. L'actine est représentée comme un contrôle de charge. (c) Quantification des différents phénotypes acto-adhésifs obtenus après 20 min d'activation cyclique en lumière bleue de cellules MDCK optoSrc. (a-c) adapté de (Kerjouan *et al.*, 2021). (d) Série temporelle d'images en fluorescence montrant l'activation de l'OS marqué par la mCherry. Illumination partielle d'un groupe de cellules MDCK optoSrc (dans le rectangle bleu) avec des impulsions bleues toutes les 20 secondes pendant 20 minutes, puis 20 minutes dans l'obscurité. Le cycle est répété une fois. Les flèches rouges indiquent le recrutement de l'OS à la membrane sous illumination bleue. Après l'arrêt de la stimulation, OS diffuse à nouveau vers le cytoplasme (flèches blanches). Adapté de (Moitrier *et al.*, 2019a)

5.2.5 Autres constructions optogénétiques permettant de contrôler l'activation de Src

Nous ne sommes pas les seuls à s'être intéressés au contrôle optogénétique de la protéine Src. L'équipe de Karginov (Illinois, USA, Université de l'Illinois Chicago) a développé récemment un autre outil optogénétique pour photoactiver Src dans des cellules : le système Light-R (Shaaya *et al.*, 2020) (Figure I.27 a). Light-R est composé de deux domaines photorécepteurs Vivid (VVD) (provenant d'un champignon, *Neurospora crassa*) connectés par un lien flexible composé de 22 acides aminés permettant de créer une "pince" ouverte dans l'obscurité et qui se referme sous lumière bleue. Inséré dans le domaine catalytique de Src, Light-R agit donc comme un commutateur allostérique. L'activation du système Light-R dans des cellules HeLa reproduit les effets d'une suractivation de Src : un étalement cellulaire (Figure I.27 b) et la formation de nouvelles adhésions (Figure I.27 c) mais aussi l'activation, entre autres, de p130Cas et de la paxilline, principaux substrats de Src. Cependant, une des limitations de ce système réside dans son inactivation assez lente : il faut 2 h pour que la phosphorylation de Src retourne à son état d'avant activation alors que l'inactivation de l'OS se fait en ~ 12 min.

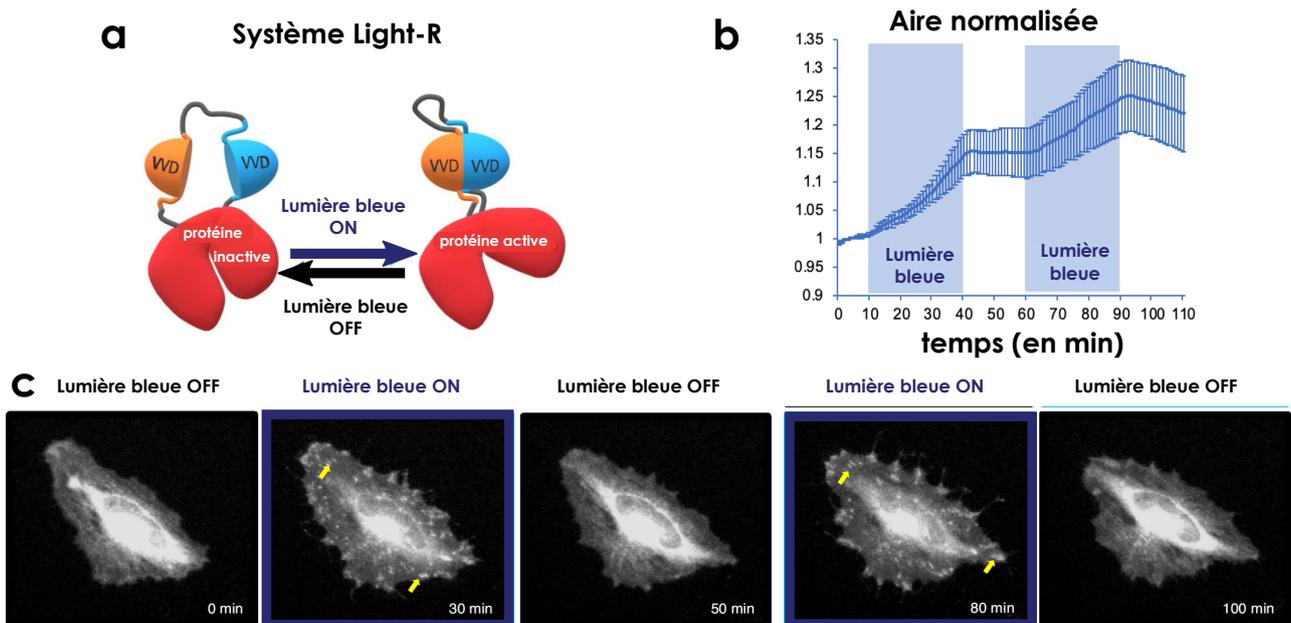


FIGURE I.27 – **Système optogénétique Light-R pour contrôler l'activation de Src dans les cellules** (a) Système Light-R permettant l'activation d'une protéine lorsqu'il est illuminé en lumière bleue, et l'inactivation de la protéine dans le noir. (b) Aire normalisée moyenne de cellules HeLa soumises à une séquence d'activation en lumière bleue : OFF/30 min ON/20 min OFF/30 min ON puis OFF. (c) Séquences d'images en fluorescence de Light-R-Src-mCherry soumise à la séquence d'activation décrite en (b). Les flèches jaunes montrent la relocalisation de Src au niveau de structures ressemblant à des adhésions focales. Adapté de (Shaaya *et al.*, 2020). L'article ne fournit pas de barre d'échelle pour (c), la taille de la cellule est de l'ordre de $50 \mu\text{m}$.

5.3 La microfabrication pour contrôler l'environnement cellulaire

5.3.1 Contrôle de la rigidité du substrat

In vivo, les rigidités cellulaires s'étendent sur plusieurs ordres de grandeur : de 0,1 kPa (tissu nerveux) à 100 kPa (os) (Figure I.28).

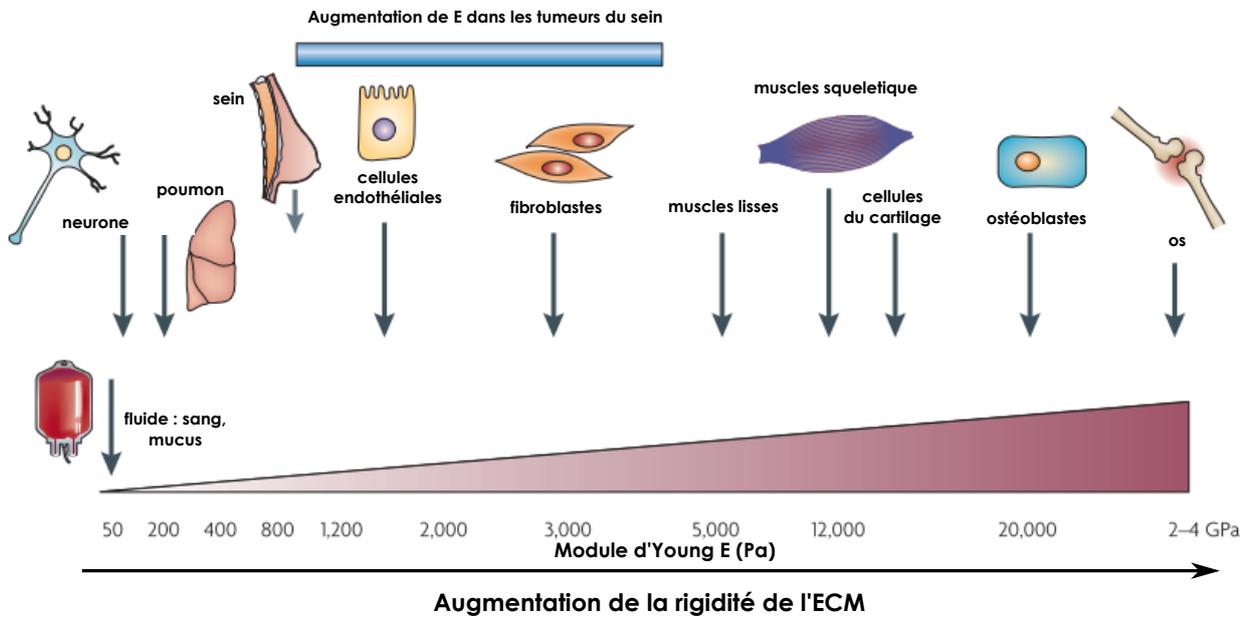


FIGURE I.28 – **Gamme de rigidité cellulaire chez l'Homme** Module d'Young de différents tissus : de quelques centaines de Pa pour les tissus mous comme celui du poumon à plus de 100 kPa pour les tissus osseux, les tissus les plus rigides. Adapté de (Butcher *et al.*, 2009).

In vitro, pour se rapprocher de ces rigidités physiologiques, les cellules peuvent être cultivées sur des gels de PAA ou du PDMS qui présentent de nombreux avantages :

- biocompatibilité
- transparence
- peu coûteux et facile à préparer
- matériaux pouvant être utilisés pour la microscopie de force de traction.
- possibilité de contrôler leur module d'Young :
 - pour le PAA : sur la gamme 100 Pa-100 kPa en ajustant la concentration relative des monomères (acrylamide) et des agents de réticulation (bis-acrylamide) (Tse & Engler, 2010)
 - pour le PDMS : sur la gamme 2-100 kPa en ajustant le taux de réticulant (Teo *et al.*, 2020b)

Comparaison des gels de PAA et du PDMS Les gels de PAA présentent quelques limitations :

- **Conservation** Les gels de PAA doivent être utilisés rapidement (quelques jours) car leurs propriétés mécaniques évoluent dans le temps (Denisin & Pruitt, 2016). Denisin *et al.* ont montré que des gels de PAA (conservés dans du PBS à 4°C) ont un module d'Young qui

augmente au cours du temps ($\times 1,55$ au bout de 10 jours pour certains gels).

- **Hydratation** Les gels de PAA doivent être hydratés en permanence dans du milieu de culture ou du PBS. Un manque d'hydratation peut entraîner des craquelures à leur surface rendant impossible la mesure de forces de traction avec la méthode de TFM.

Face à ces limitations, le PDMS peut représenter une alternative de choix. Le PDMS permet en effet d'obtenir un substrat inerte, à la durée de vie indéfinie (pas d'altération des propriétés mécaniques) qui ne nécessite pas de conditions de stockage particulières (Teo *et al.*, 2020b). Cependant, ces substrats en PDMS présentent aussi plusieurs inconvénients comparé aux gels de PAA :

- **Rigidité minimale de 2 kPa** : en dessous, il est nécessaire d'utiliser les gels de PAA.
- **Comportement visqueux** : le PDMS présente un comportement visqueux lorsqu'il est utilisé à faible rigidité (Kenry *et al.*, 2015).
- **Résolution** : la résolution de la cartographie des forces de traction est plus petite avec des substrats en PDMS en raison de leur indice de réfraction de 1,4 alors que celui du PAA est proche de celui de l'eau (1,33) pour les gels de PAA.
- **Moins adaptés aux expériences longue durée** (plusieurs jours) que les gels de PAA. En effet, des cellules comme les MDCK sont capables de pomper des ions. Le PDMS étant hydrophobe (hydrophobicité qui peut être légèrement atténuée après passage au plasma cleaner), une accumulation de liquide peut se former sous la monocouche cellulaire, ce qui perturbe l'architecture de l'épithélium et mène à la formation d'une structure en 3D (Latorre *et al.*, 2018). Ce phénomène n'est pas observé sur des gels de PAA qui sont eux, perméables aux ions.

Dans cette thèse, nous avons utilisé les gels de PAA pour nos expériences, technique utilisée dans l'équipe (Moitrier *et al.*, 2019a,b).

5.3.2 Contrôle du voisinage

Microfabrication En utilisant des techniques de microfabrication, il est possible de contrôler l'adhésion des cellules sur leur substrat en créant des zones adhésives aux cellules et des zones non-adhésives. Plusieurs méthodes permettent de créer des micro patrons adhésifs à l'échelle de la cellule ou d'un groupe de cellules sur des surfaces dures (verre). Ces méthodes ont ensuite été adaptées aux gels de PAA ou au PDMS. Pour créer ces micro patrons sur les gels de PAA ou sur du PDMS, différentes techniques existent. Citons-en quelques unes : le *stencil patterning* (Wang *et al.*, 2002), le *micro-contact printing* (Versaevel *et al.*, 2012) ou encore le *micro-patterning* (Vignaud *et al.*, 2014) que nous avons utilisée dans notre projet .

Avantages La variabilité de comportements entre cellules constitue un défi dans les expériences *in vitro*. En effet, sur un substrat homogène, les cellules d'un même type cellulaire présentent une grande diversité dans leurs formes et l'organisation de leur cytosquelette. L'utilisation de micro patrons adhésifs permet de contrôler l'étalement, la géométrie (Oakes *et al.*, 2014), l'organisation du cytosquelette

(Albert & Schwarz, 2016) des cellules ainsi que les forces de traction qu'elles génèrent (Vitiello *et al.*, 2019) (Figure I.29). Les cellules confinées sur des micro-patrons adhésifs peuvent être moyennées pour obtenir l'organisation moyenne du cytosquelette (Figure I.29 a,b) et la distribution moyenne des forces de traction pour une géométrie adhésive donnée (Figure I.29 c) (Tseng *et al.*, 2011). Les micro-patrons limitent ainsi la variabilité expérimentale. De plus, en confinant les cellules dans des micro-patrons, les cellules isolées ou les groupes de cellules ne peuvent ni se toucher ni sortir du champ d'observation du microscope, ce qui permet de mesurer plus de cellules ou de groupes de cellules. L'analyse est aussi plus aisée car il n'est pas nécessaire de détecter les contours de la cellule/ du groupe de cellules (Figure I.29 a,b).

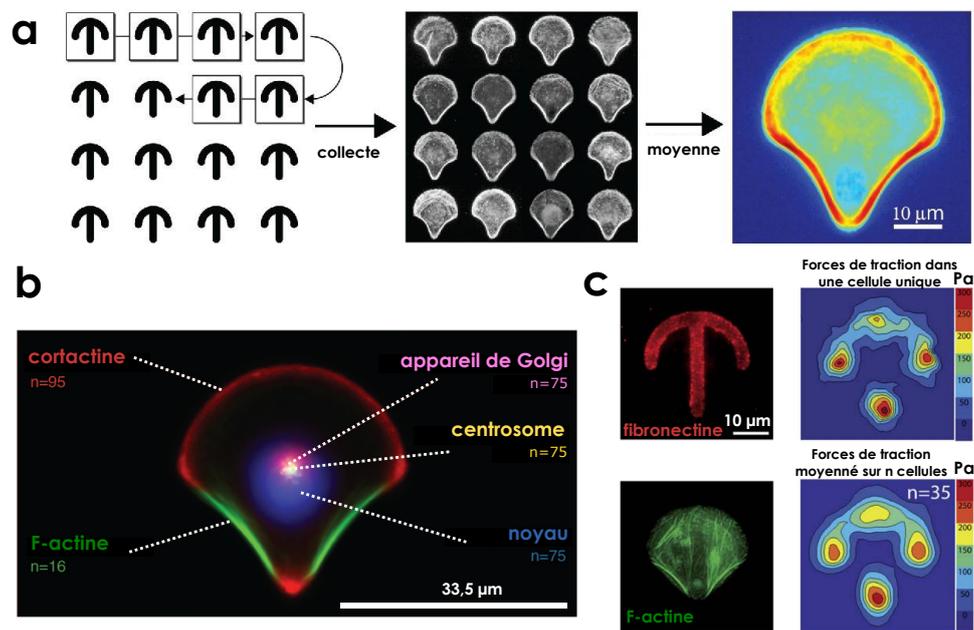


FIGURE I.29 – Utilisation de micro-patrons de fibronectine pour contrôler la géométrie, le cytosquelette de cellules épithéliales et pour la mesure de forces de traction (a) Ensemble de micro-patrons de fibronectine (33,5 µm de large, image de gauche) sur du verre sur lesquelles les cellules adhèrent (image du milieu, marquage des filaments d'actine), collectés pour l'analyse puis moyennés pour obtenir la distribution moyenne des filaments d'actine dans une cellule (image de droite). Adapté de (Albert & Schwarz, 2016). (b) Organisation interne moyenne d'une cellule épithéliale RPE1 déposée sur un micro-patron de fibronectine en forme d'arbalète (sur du verre). Image obtenue après moyennage des distributions d'organites cellulaires (noyau, centrosome, appareil de Golgi, cortactine et F-actine) de n cellules. Adapté de (Théry *et al.*, 2006). (c) Cellule MCF10A individuelle sur un gel de PAA confinée dans un micro-patron de fibronectine en forme d'arbalète. Image en fluorescence de la fibronectine (haut gauche), des filaments d'actine (bas gauche), forces de traction en Pa pour une cellule unique (haut droite) et forces de traction moyennées sur 35 cellules. Adapté de (Tseng *et al.*, 2011).

Limitations Confiner la cellule dans des micro-patrons constitue une perturbation de son comportement physiologique puisque la cellule est contrainte. Or, naturellement une cellule modifie sa forme, son étalement et migre sur son substrat. Dans notre étude, nous n'avons en pratique pas utilisé les micro-patrons car les cellules suractivant Src (éclairées en lumière bleue) forment un lamellipode : en

les confinant, nous aurions perturbé la formation du lamellipode. Nous avons cependant utilisé les micro-patrons adhésifs pour des expériences visant justement à limiter l'étalement des cellules : ces expériences ont donné des résultats difficiles à interpréter comme nous le verrons dans le Chapitre III de ce manuscrit.

5.4 Étude du cytosquelette et des mécanismes moléculaires

Pour compléter notre étude du phénotype mécanique associé à l'activation de Src, nous avons visualisé les changements du cytosquelette. Nous avons choisi de marquer trois composants importants de la génération de forces : l'actine, les adhésions focales et les myosines II.

Pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'activation de Src, nous avons utilisé une approche pharmacologique. Nous avons inhibé/activé un ou plusieurs acteurs de différentes voies de signalisation, en ajoutant les inhibiteurs/activateurs dans le milieu cellulaire avant l'activation de Src.

- Le phénotype mécanique des cellules avant activation en présence de l'inhibiteur/activateur permet de vérifier l'efficacité de la drogue ajoutée.
- La comparaison du phénotype mécanique des cellules lors de l'activation de Src, avec et sans drogue, permet de connaître l'effet de la drogue sur l'activation de Src.

En résumé, dans ce projet, nous utilisons :

- l'**optogénétique** pour contrôler dans le temps et de façon réversible, l'activation de Src dans les cellules
- la **TFM** pour mesurer dans le temps les forces de traction exercées par les cellules sur leur substrat
- le **marquage fluorescent** de l'actine, des adhésions focales et des myosines II pour étudier la réorganisation du cytosquelette des cellules Src-activées
- une **approche pharmacologique** pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'activation de Src
- des **gels de PAA** pour étudier le phénotype mécanique des cellules en fonction de la rigidité du substrat et sur des rigidités physiologiques.

Chapitre II

Matériel et méthodes

Table des matières

1	Biologie cellulaire	50
1.1	Lignées cellulaires	50
1.2	Culture cellulaire	51
2	Acquisition des images	51
3	Photoactivation	52
4	Réalisation des gels de PAA pour les expériences de TFM	54
4.1	Protocole de fabrication des gels uniformes	54
4.2	Protocole de fabrication des gels "patternés"	56
4.3	Caractérisation des gels	58
5	Réalisation des expériences de TFM	59
6	Mesure des forces de traction	60
6.1	Mesure du déplacement des billes fluorescentes	60
6.2	Reconstruction du champ de forces de traction	61
7	Analyse des expériences de TFM à l'échelle de la cellule isolée	62
7.1	Contour des cellules	62
7.2	Critères de sélection des cellules analysées	62
7.3	Influence du masque de la cellule pour la mesure des forces	62
7.4	Grandeurs mesurées	63
7.5	Calcul du gain/changement maximal des grandeurs mesurées pendant l'activation de Src	65
8	Microscopie de Force Atomique (AFM)	65
8.1	Description du dispositif utilisé	65
8.2	Procédure expérimentale	66
9	Approche pharmacologique	67
10	Visualisation du cytosquelette	70
10.1	Réalisation des expériences	70
10.2	Mesure du flux rétrograde d'actine	70

10.3	Analyse des adhésions focales	71
10.4	Analyse des fibres de stress	72
11	Probabilité et durée d'arrondissement	72
12	Tests statistiques	72

1 Biologie cellulaire

1.1 Lignées cellulaires

Nous avons utilisé les lignées cellulaires immortalisées MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) et MEF (Mouse Embryonic fibroblast) dans leur forme normale (non éclairées) ou dans leur forme optoSrc (éclairées).

La lignée MDCK est une lignée cellulaire épithéliale, issue de rein de chien. La lignée MEF est une lignée cellulaire de type fibroblaste, issue de l'embryon de souris. Ces deux lignées cellulaires modèles (très utilisées dans les études *in vitro*), faciles à cultiver, se caractérisent par un cycle cellulaire rapide (≤ 24 h) et forment facilement des monocouches en culture.

Toutes les constructions optoSrc (656+654, 656+653, 653+909) (voir Table II.1 pour les détails) ont été produites par Olivier Destaing (IAB, Inserm U 1209, CNRS UMR 5309 et Université Grenoble). Les constructions optoSrc 656+653 et 656+654 ont été transfectées de façon stable dans des cellules MDCK par Olivier Destaing. Les constructions 653+909 ont été transfectées de façon stable dans des cellules MDCK et MEF par Fanny Tabarin (Équipe BMBC, Institut Curie).

Pour visualiser les composants du cytosquelette, nous avons choisi un marqueur fluorescent dans le rouge lointain, l'iRFP ; la GFP et la mCherry ne pouvant être utilisées (marquant respectivement CIBN-Caax et CRY2-OS). Nous avons choisi d'observer trois composants du cytosquelette :

- les **filaments d'actine** (actine-F) avec le marquage **LifeAct**. Les cellules MDCK OS (653+656) expriment déjà la LifeAct-iRFP mais à un niveau trop faible pour être visualisé avec notre système optique, une nouvelle lignée cellulaire a dû être construite.
- l'**activité de la myosine** par le marquage de **MRLC** (chaîne légère régulatrice de la myosine II) qui est la partie phosphorylable des myosines II.
- les **adhésions focales** par le marquage des **vinculines**, protéines présentes dans les adhésions focales matures.

Pour le marquage des composants du cytosquelette, les plasmides LifeAct-iRFP, MRLC-iRFP et vinculin-GFP ont été donnés par Mathieu Coppey (Institut Curie). Le plasmide vinculin-iRFP a été généré par Fahima Di Federico (Équipe BMBC, Institut Curie) à partir du plasmide vinculin-GFP. La transfection de ces plasmides dans les cellules MDCK 653+909 a été réalisée par Fanny Tabarin (Table II.1).

Les cellules MDCK optoRhoA ont été données par Xavier Trépat (IBEC, Barcelone). Pour toutes les expériences de TFM et d'AFM nous avons utilisé les cellules MDCK OS "656+653". Les lignées cellulaires sans CIBN à la membrane ("656+654") ou wt sont utilisées comme contrôle pour la lignée MDCK OS. Les cellules MDCK 653+909 (+LifeAct-iRFP ou +MRLC-iRFP ou +vinculine-iRFP) ont été utilisées pour les expériences de visualisation du cytosquelette (Table II.1).

Lignée cellulaire	mCherry	GFP	iRFP	Utilisation dans les expériences
MDCK 656+653 "MDCK OS"	OS	CIBN-Caax	LifeAct*	-TFM cellule isolée -AFM cellule isolée -TFM groupe de cellules
MDCK 656+654	OS	Caax	LifeAct*	Contrôle TFM cellule isolée
MDCK 653+909	OS	CIBN-Caax	s/o	Contrôle TFM cellule isolée
MDCK 653+909 LifeAct-iRFP	OS	CIBN-Caax	LifeAct	Visualisation cytosquelette
MDCK 653+909 vinculine-iRFP	OS	CIBN-Caax	vinculine	Visualisation cytosquelette
MDCK 653+909 MRLC-iRFP	OS	CIBN-Caax	MRLC	Visualisation cytosquelette
MDCK optoRhoA	optoRhoA	CIBN-Caax	s/o	TFM cellule isolée
MDCK wt	s/o	s/o	s/o	Contrôle TFM cellule isolée
MEF 653+909	OS	CIBN-Caax	s/o	TFM cellule isolée

TABLE II.1 – **Lignées cellulaires utilisées dans les expériences** Pour chaque lignée cellulaire : protéines marquées en mCherry, GFP ou i-RFP et pour quelles expériences présentées dans ce manuscrit elles ont été utilisées. s/o signifie sans objet. * faible expression.

1.2 Culture cellulaire

Toutes les lignées cellulaires sont cultivées à 37°C, 5 % CO₂ et 95 % d'humidité relative dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM GlutaMAX, Gibco) auquel est ajouté de la pénicilline-streptomycine à 1% vol/vol (Gibco) et du serum foetal de bovin (FBS, Gibco) à 10 % vol/vol. Le passage des cellules est effectué tous les 2-4 jours à l'aide de Trypsin-EDTA (Gibco). Les cellules sont testées régulièrement pour l'absence de mycoplasmes. Avant chaque expérience, les cellules sont comptées avec un appareil numérique Scepter 2.0 (Mercks Millipore).

2 Acquisition des images

Toutes les expériences (hormis les expériences d'AFM) ont été réalisées sur un vidéomicroscope inversé (Zeiss AxioObserver 7) équipé :

- d'une platine motorisée (SCAN IM 130×100, Marzhauser)
- d'une source de fluorescence pE-300 *white* (CoolLed)
- d'une LED pE-100 (CoolLed) pour la lumière de transmission (contraste de phase)
- d'une caméra CCD Retiga 6000 (Qimaging)

- d'objectifs $\times 10$ (Zeiss, EC Plan Neofluar, 0.3, Ph1), $\times 20$ (Olympus, LCPlanFI, 0.4, Ph1), $\times 40$ (Olympus, UPlanFLN, 0.75, Ph2, infini/0.17, OFN 26.5), $\times 60$ (Olympus, UPlanSAPO, 1.35 huile, infini/0.17, FN 26.5).

Des filtres permettant de sélectionner les longueurs d'onde comprises entre 610 nm et 710 nm (FGS900S et RG610, Thorlabs) sont placés en sortie de la LED pE-100 pour éviter l'illumination parasite du CRY2 et protéger les cellules de la phototoxicité importante dans l'infrarouge. Le microscope est piloté par le logiciel MetaMorph (Molecular Devices). L'atmosphère autour de l'échantillon est maintenue à 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité avec le système « The Brick » (Life Imaging Services) et à 37 °C avec le système « The Cube and the Box » (Life Imaging Services).

L'acquisition des images en Cy5 (filtre 49006, Chroma), en Cy5.5 (filtre 49022, Chroma), en GFP (Filter Set 10, Zeiss), en contraste de phase et en mCherry (filtre 49008, Chroma) se fait :

- toutes les 1,5, 3 ou 6 min pendant la durée de l'expérience pour les expériences de TFM de cellules isolées ou les groupes de cellules non confinées dans les micro-patrons
- toutes les 1 ou 3 min pendant la durée de l'expérience pour les expériences de visualisation des adhésions et des fibres de stress
- toutes les 2 s pendant la durée de l'expérience pour les expériences de visualisation de la F-actine.

3 Photoactivation

Afin de suractiver Src dans les cellules optoSrc, les cellules sont éclairées en lumière bleue en utilisant deux sources d'illumination (Figure II.1) :

- Pour les expériences de cellules isolées ou de groupe de cellules non confinées, la **source X-Cite XLED, BDX LED** (émission : 450-495 nm, Lumen Dynamics) couplée à un filtre d'excitation (450-490 nm)
- Pour les expériences de cellules confinées dans des micro-patrons, le canal GFP du microscope à épifluorescence : **source LED pE-300 *white*** combinée au filtre d'excitation du Filter Set 10 (Zeiss, 450-490 nm).

Contrôle spatial de l'illumination en lumière bleue Le système Mosaic 2 (Andor) couplé à la source X-Cite contrôlé par le plugin "Mosaic Targeted Illumination" permet de réaliser une illumination localisée sur les cellules. Le DMD (*Digital micromirror device*) du Mosaic 2 est une grille de 800 par 600 micro-miroirs carrés de côté 16 μm . L'aire maximale d'illumination du Mosaic 2 est de 160 \times 120 μm^2 avec l'objectif 40 \times , ce qui correspond à une fenêtre plus petite que celle de la caméra Rétiga R6 qui est de 235 \times 175 μm^2 . Sur un même gel de PAA, on peut donc appliquer des protocoles d'illumination différents pour chaque cellule (Figure II.1).

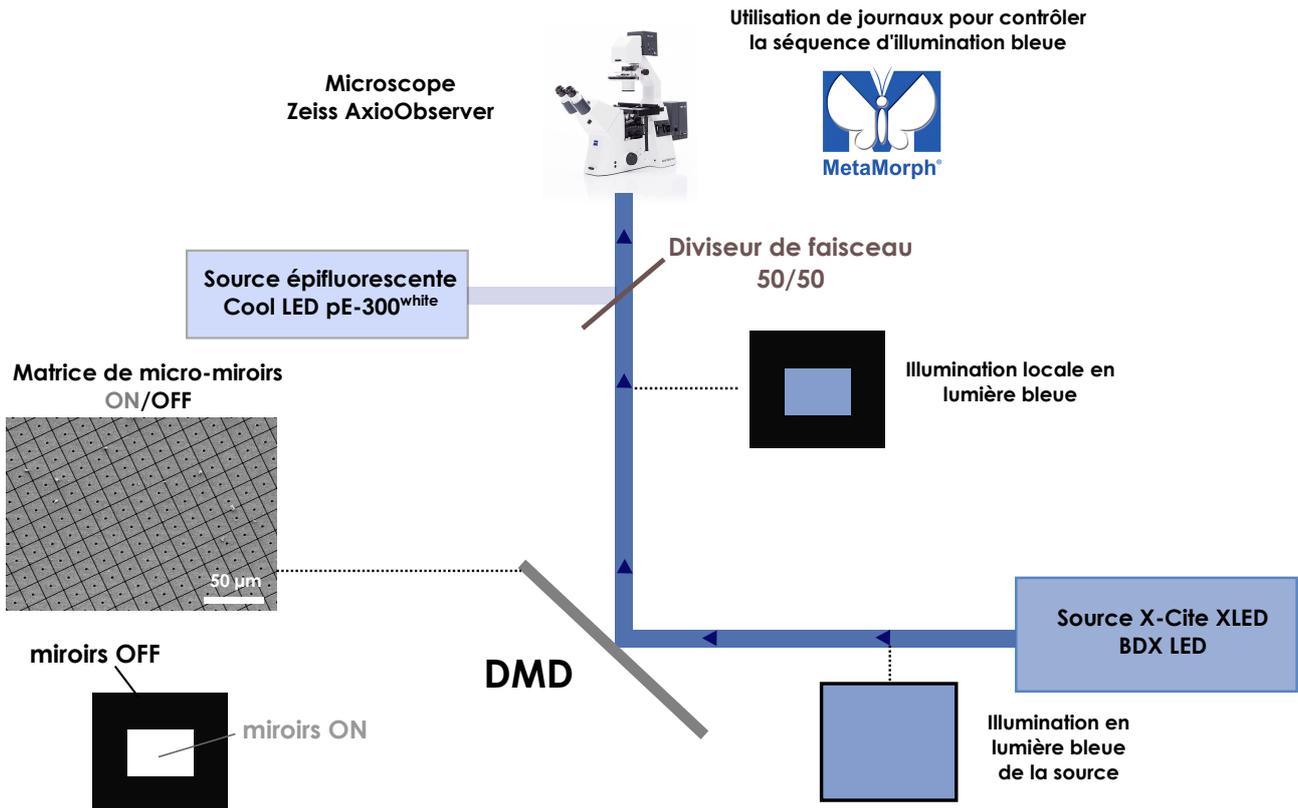


FIGURE II.1 – Contrôle de l'illumination en lumière bleue : contrôle spatial et temporel Image en microscopie électronique d'un DMD disponible sur le site www.optics.rochester.edu/workgroups/cml/opt307/spr05/john/

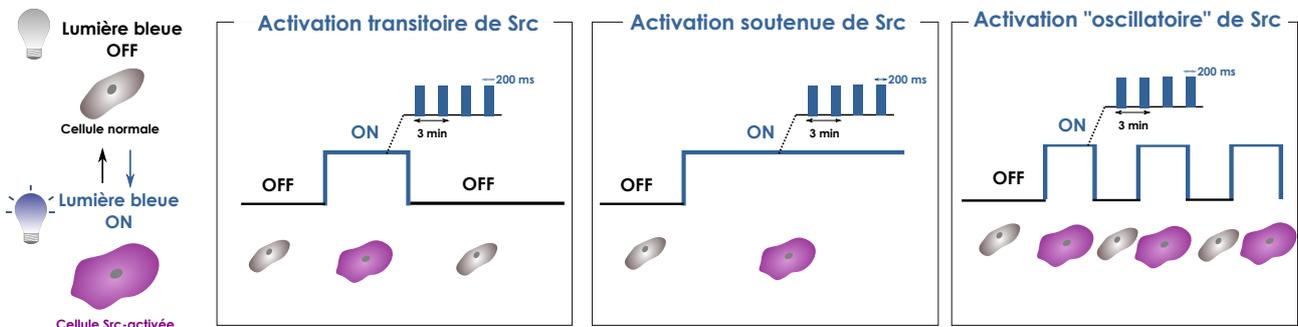


FIGURE II.2 – Séquences d'illumination en lumière bleue pour contrôler la suractivation de Src dans les cellules Activation transitoire (gauche), activation soutenue (milieu) et activation en "oscillation" (droite) de Src. Les séquences temporelles détaillées ainsi que la réponse des cellules à ces différentes activations sont étudiées dans le Chapitre III (activation transitoire de Src) et en annexe C de ce manuscrit (activations soutenue et en "oscillation" de Src).

Contrôle temporel de l'illumination en lumière bleue L'écriture de journaux sur le logiciel MetaMorph (Molecular Devices) permet de choisir les paramètres temporels de l'illumination en lumière bleue : fréquence des pulses, durée des pulses de lumière bleue, durée des périodes avec ou sans lumière bleue (Figure II.2).

Trois types de séquence d'illumination en lumière bleue ont été utilisées pour suractiver Src dans les

cellules :

- OFF-ON-OFF permettant une activation transitoire de Src
- OFF-ON permettant une activation soutenue de Src
- OFF-ON-OFF-ON-OFF... permettant une activation en "oscillations" de Src

Conditions standards d'illumination en lumière bleue : pulses de 200 ms toutes les 3 min. Dans la suite, sauf mention contraire, la mention «illumination en lumière bleue » fait référence à cette séquence d'illumination. Ces conditions d'illumination permettent un recrutement modéré et quasi-continu de l'optoSrc à la membrane.

Puissance lumineuse La puissance lumineuse de sortie (à 1 cm environ de l'objectif 40x du microscope) pour la source XCite-XLED-BDX et la source GFP est de 0,19 mW, mesure réalisée avec le puissance-mètre Thorlabs PR100 A $\lambda=488$ nm, sur le calibre 5 mW. Pour avoir la même puissance lumineuse de sortie pour les deux sources, nous avons ajouté un diviseur de faisceau pour ne prendre que 70 % de la puissance lumineuse de la source XCite-XLED-BDX et 30 % de la source pE-300 white ; et nous avons ajusté le % d'intensité des LED des deux sources dans le menu *Configure Illumination* de MetaMorph (80 % pour la source XCite-XLED-BDX et 10 % pour la source GFP).

4 Réalisation des gels de PAA pour les expériences de TFM

Les gels de polyacrylamide (PAA), utilisés pour les expériences TFM, sont réalisés en salle blanche afin de limiter la présence de particules parasites sur ces gels.

4.1 Protocole de fabrication des gels uniformes

Le protocole, adapté de (Tse & Engler, 2010), comporte 4 grandes étapes que nous allons détailler (Figure II.3) :

Étape 1 La première étape consiste à "activer" des lamelles de verres (#1.5, épaisseur ~ 170 μm , diamètre 30 μm , Warner Instruments). Les lamelles de verre sont rendues hydrophiles par oxydation au plasma pendant 10 min. Elles sont ensuite plongées dans une solution contenant 1 mL de 3-aminopropyltriéthoxysilane (Sigma) dans 49 mL d'isopropanol pendant 10 min sous agitation. Elles sont rincées abondamment à l'eau distillée puis placées dans une solution à 0,5 % de glutaraldéhyde (1 mL) dans de l'eau distillée (49 mL) pendant 30 min sous agitation. Elles sont à nouveau rincées abondamment à l'eau puis séchées à l'air comprimé. Ces lamelles "activées" sont conservées dans un endroit sec et propre et utilisées dans les 48 h.

Étape 2 En parallèle, une solution de fibronectine dans du PBS à 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ est préparée à partir d'une solution de fibronectine stock à 1 mg/mL (Gibco). Deux gouttes de 100 μL sont ensuite déposées

sur du parafilm puis recouvertes par une lame de microscope (Thermofisher). Après 1-2 h d'incubation, la lame de microscope est lavée au PBS puis séchée à l'air libre, à la verticale (contre une paroi).

Rigidité gels	2 kPa	10 kPa	40 kPa	100 kPa
Acrylamide 40%	1 mL	2,5 mL	2 mL	3 mL
Bis Acrylamide 2%	0,75 mL	0,5 mL	2,4 mL	1,25 mL
H ₂ O	8,25 mL	7 mL	5,6 mL	5,75 mL
$E_{mesuré}$ (kPa)	2,55±0,17	10,61	40,4 ±2,39	103 ±29

TABLE II.2 – Réalisation des mélanges acrylamide/bis-acrylamide/eau pour la polymérisation des gels de PAA de module d'Young donné. Pour un volume total de 10 mL, volume de solution d'acrylamide à 40 %, de solution de bisacrylamide à 2% et d'eau pour réaliser des gels de 2, 10, 40 et 100 kPa. Pour les gels de 2, 10 et 40 kPa, $E_{mesuré}$ correspond à la mesure du module d'Young faite par Tse et Engler (par AFM) des gels de PAA dans l'eau, polymérisés à partir de ces solutions. Adapté de (Tse & Engler, 2010). Pour le gel à 100 kPa, $E_{mesuré}$ correspond à la mesure du module d'Young par rhéologie (rhéomètre AR 2000ex, TA Instruments, New Castle, Delaware) avec une géométrie de plaque parallèle faite par Syed *et al.* du gel PAA, polymérisé à partir du mélange Acrylamide/Bisacrylamide indiqué. Adapté de (Syed *et al.*, 2017)

Étape 3 Afin de réaliser les gels de PAA, des solutions d'acrylamide/bis-acrylamide sont préparées à partir de solutions commerciales d'acrylamide à 40 % (Biorad) et de bis-acrylamide à 2% (Biorad). La proportion relative de ces solutions détermine la rigidité du gel. Différents mélanges sont réalisés afin d'obtenir des gels de rigidité 2 kPa, 10 kPa et 40 kPa en utilisant comme référence la table de correspondance établie par Tse et Engler (Tse & Engler, 2010) (Tableau II.2). Pour obtenir un gel de rigidité 100 kPa, nous avons utilisé le mélange proposé dans (Syed *et al.*, 2017). Ces solutions sont conservées à 4°C et placées au sonicateur pendant 30 s avant utilisation.

L'étape de polymérisation du mélange acrylamide/bis-acrylamide consiste à réaliser une solution contenant :

- la solution d'acrylamide/bisacrylamide préalablement préparée
- 0,01 % de solution de billes fluorescentes Cy5 de diamètre 0,2 μm (FluoSpheres 0,2 μm (660/680), Life technologies), préalablement placée au sonicateur pour éviter tout agrégat de billes qui se serait formé. Après l'ajout des billes dans la solution d'acrylamide/bisacrylamide, le mélange est mis au sonicateur de façon à obtenir une solution homogène
- 0,1 % de solution d'APS (Amonium Persulfate) (Sigma), initiateur de la réaction de polymérisation
- 1 % de TEMED (Tetra Methyl Ethylene Diamine) (Biorad), catalyseur de la polymérisation.

Le TEMED et l'APS sont ajoutés rapidement et la solution polymérisante est homogénéisée de façon énergique avec une micro-pipette. Deux gouttes de 30 μL de cette solution sont placées sur chaque lame de microscope recouverte de fibronectine. Cette lame est ensuite recouverte par deux lamelles activées (chaque lamelle recouvre une goutte de 30 μL de solution polymérisante).

Étape 4 Le gel pris entre la lamelle activée et la lame de microscope est laissé à polymériser pendant 30 min à température ambiante puis immergé dans de l'eau distillée pendant 10 min. La lamelle activée comportant le gel de PAA recouvert à la surface est décollée délicatement de la lame de microscope, en utilisant un scalpel, et placée immédiatement dans une solution de PBS. Le gel de PAA est ensuite rincé trois fois avec du PBS afin de retirer les molécules qui n'ont pas réagi. La lamelle portant le gel de PAA est conservée à 4°C et utilisée rapidement (maximum deux semaines après confection). Avant toute utilisation, le gel est lavé au PBS.

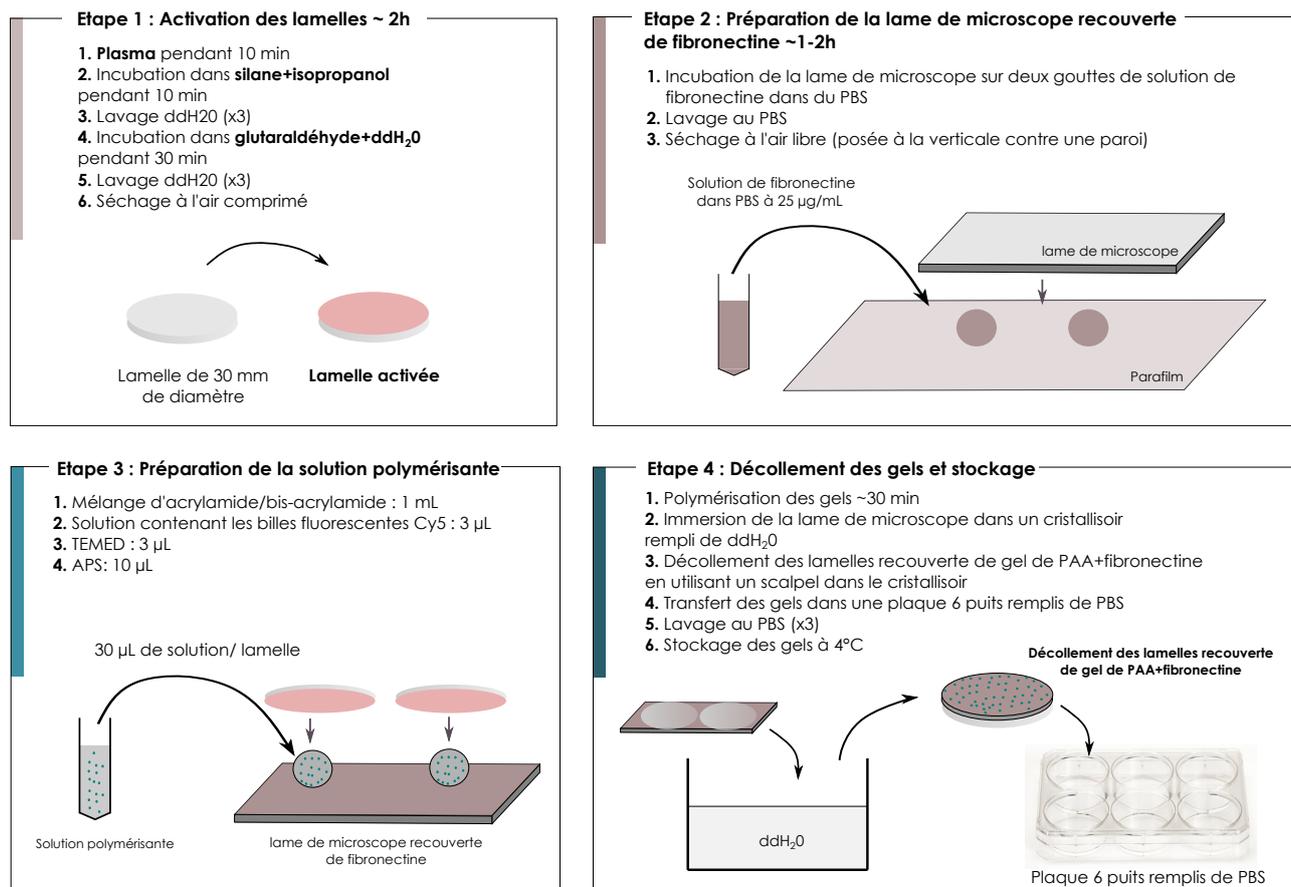


FIGURE II.3 – **Protocole pour la réalisation de gels de TFM uniformes** Schéma des différentes étapes du protocole : activation de la lamelle de verre (étape 1), préparation de la lame de microscope recouverte de fibronectine (étape 2), préparation des gels de PAA avec billes (étape 3), décollement des gels et stockage (étape 4). Adapté de (Tse & Engler, 2010).

4.2 Protocole de fabrication des gels "patternés"

Pour réaliser un gel de TFM "patterné" (avec des micro-patterns adhésifs recouverts de fibronectine), on réalise une lamelle de verre (#1.5, épaisseur ~ 170 µm, diamètre 30 µm, Warner Instruments) comportant des micro-patterns de fibronectine.

Étape 1 Les lamelles de verres sont tout d'abord passées au plasma pendant 30 s afin de les rendre hydrophiles.

Étape 2 Une solution de Pll-g-PEG (Susos) dans l'HEPES à 0,4 mg/mL est ensuite préparée à partir d'une solution stock à 1 mg/mL de Pll-g-PEG dans l'HEPES (pH de la solution équilibré à 7,4). Un volume de 100 μ L est placé sur un morceau de parafilm et recouvert par une lamelle. Après une heure d'incubation, la lamelle de verre est retirée puis placée verticalement pour un séchage à l'air libre.

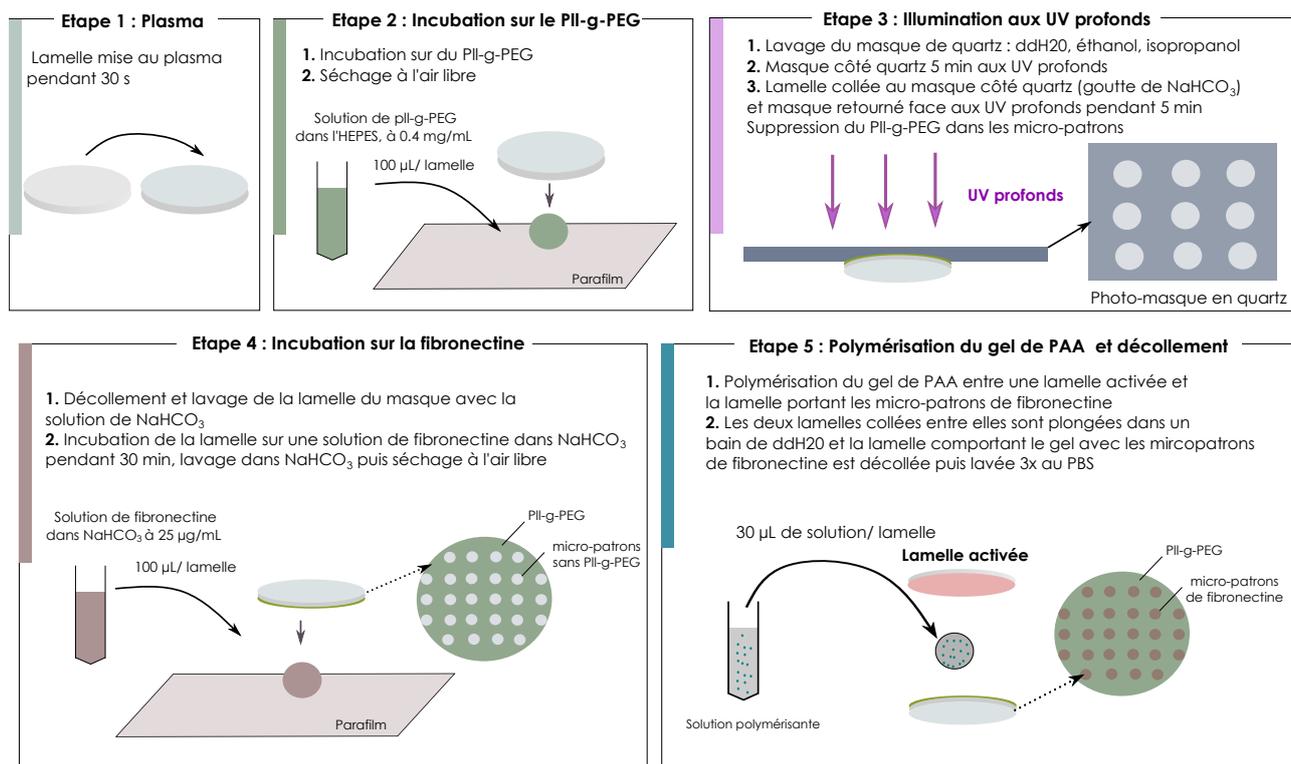


FIGURE II.4 – **Protocole pour la réalisation des gels TFM patternés** Schéma des différentes étapes du protocole : activation de la lamelle de verre au plasma (étape 1), incubation sur le Pll-g-PEG (étape 2), illumination de la lamelle recouverte de Pll-g-PEG aux UV profonds à travers le masque des micro-patrons (étape 3), incubation de la lamelle sur la fibronectine (étape 4) et enfin polymérisation du gel de PAA entre une lamelle activée et la lamelle de verre avec les micro-patrons de fibronectine (étape 5). Adapté de (Vignaud *et al.*, 2014).

Étape 3 Un masque en chrome (Compugraphics) comportant les micro-patrons est lavé à l'eau et séché à l'air comprimé puis lavé à l'éthanol, séché à l'air comprimé enfin, lavé à l'isopropanol et séché à nouveau à l'air comprimé. Il est illuminé face chrome aux UV profonds (longueur d'onde \sim 254 nm) d'une lampe UV (UVO cleaner, Jelight Company Inc.) pendant 5 min afin de nettoyer la surface. La lamelle recouverte de Pll-g-PEG est ensuite collée (face Pll-g-PEG) sur la partie du masque comportant les motifs à réaliser (face chrome) à l'aide de 10 μ L de solution de NaHCO₃ (100 μ M). Le masque est retourné (face argentée) et exposé aux UV profonds pendant 5 min. Lors de cette étape, le répulsif cellulaire Pll-g-PEG est éliminé là où il y a des micro-patrons.

Étape 4 La lamelle de verre est ensuite décollée en versant sur le masque une solution de NaHCO_3 . La lamelle est placée verticalement pour permettre un séchage à l'air libre. Une solution de fibronectine à $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ dans une solution de NaHCO_3 est préparée et un volume de $100 \mu\text{L}$ est placé sur du parafilm et recouvert par la lamelle (face Pll-g-PEG). Après 30 min d'incubation, la lamelle est lavée à nouveau avec la solution de NaHCO_3 et séchée verticalement à l'air libre.

Étape 5 Une solution de polymérisation d'acrylamide/bisacrylamide contenant des billes fluorescentes (décrite dans le paragraphe précédent pour la réalisation des gels uniformes) est préparée. Un volume de $30 \mu\text{L}$ est mis à polymeriser entre une lamelle activée (voir protocole des gels uniformes) et la lamelle comportant les micropatrons de fibronectine. Après 30 min de polymérisation. Les deux lamelles collées sont placées dans un cristallisateur rempli d'eau distillée. La lamelle comportant le gel "patterné" est décollée en utilisant un scalpel et directement placée dans une solution de PBS puis lavée $3\times$ au PBS. Les gels de PAA "patternés" sont conservés à 4°C et utilisés rapidement (dans la semaine qui suit la fabrication).

4.3 Caractérisation des gels

Hauteur des gels Pour évaluer l'épaisseur des gels de PAA (rigidité 10 kPa), nous avons réalisé une marque de feutre sur la face de la lamelle activée avant la polymérisation du gel de TFM et placé des billes GFP (diamètre $1 \mu\text{m}$) à la surface des gels. En mesurant la position de la marque de feutre et celle des billes à la surface du gel sur MetaMorph (Molecular Devices), nous avons obtenu une hauteur de $46 \pm 9 \mu\text{m}$ pour les gels de PAA (mesures réalisées sur 2 gels).

Rigidité des gels La rigidité des gels a été mesurée à Evry avec Maxime Liboz, doctorant sous la direction de Clément Campillo (Laboratoire LAMBE, Université d'Evry). Nous avons utilisé un AFM en mode Quantitative ImagingTM(QI) et une pointe sphérique CP-CONT-PS-C pour mesurer la rigidité des gels de PAA réalisés ($2, 10$ et 40 kPa) (Table II.3). Les modules d'Young mesurés sont proches de ceux obtenus par Tse et Engler (Tse & Engler, 2010).

Gels PAA	2 kPa	10 kPa	40 kPa
$E_{Tse/Engler}$ (kPa)	$2,55 \pm 0,17$	10,61	$40,4 \pm 2,39$
$E_{m, billes, AFM}$ (kPa)	$2,01 \pm 0,08$	$9,66 \pm 0,07$	$34,19 \pm 0,85$
$E_{m, sans bille, AFM}$ (kPa)	$1,99 \pm 0,49$	$9,74 \pm 0,09$	$35,96 \pm 0,92$

TABLE II.3 – Tableau comparatif des modules d'Young des gels de PAA mesurés par Tse et Engler et ceux obtenus pour nos gels de PAA, avec ou sans bille fluorescente, en utilisant un AFM. Mesure du module d'Young des gels de PAA avec billes et sans bille en utilisant un levier CP-CONT-PS-C (au moins 2 mesures par condition).

Les écarts relatifs entre nos mesures et celles effectuées par Tse et Engler sont :

- pour 2 kPa : $\sim 21\%$
- pour 10 kPa : $\sim 9\%$
- pour 40 kPa : $\sim 15\%$

Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que Tse et Engler ont réalisé les mesures de gels dans l'eau ; nous avons réalisé les mesures dans du milieu de culture pour être plus proche des conditions expérimentales. En effet d'après Tse et Engler, l'hydrogel peut avoir un taux de gonflement différent dans ces deux solutions, ce qui peut affecter ses propriétés mécaniques (Tse & Engler, 2010). Nous avons également comparé la rigidité des gels avec ou sans bille pour s'assurer que la rigidité des gels utilisés pour nos expériences TFM (avec billes) et celles de visualisation du cytosquelette (sans bille) n'était pas significativement différente ($\leq 5\%$).

Densité de bille dans les gels de PAA Pour estimer la densité de billes dans nos gels de TFM, nous avons seillé 10 champs de vue (de taille $120 \times 120 \mu\text{m}^2$) de 5 expériences différentes (gels uniformes de 10 kPa) et utilisé le plugin *Analyze Particle* de ImageJ pour le comptage automatique des objets circulaires. Nous avons obtenu une densité moyenne de billes de $2,1 \pm 0,5$ billes/ $10 \mu\text{m}^2$.

5 Réalisation des expériences de TFM

Le gel de PAA est lavé au PBS puis placé au fond d'une POCmini (Pecon) dans du milieu de culture DMEM. La POCmini est placée à l'incubateur à 37°C , 5% CO_2 et 95% d'humidité pendant 30 min puis le milieu de culture est changé par du milieu frais et 1 à 3×10^4 cellules sont déposées sur le gel. Après environ 6-8 h (selon la rigidité du gel) d'incubation à 37°C , 5% CO_2 et 95% d'humidité, les cellules ont adhéré.

- Pour les expériences de cellules isolées, les cellules sont mises sous le microscope et l'expérience est lancée 6 à 8 h après le dépôt des cellules sur le gel (Figure II.5).
- Pour les expériences avec groupe de cellules, les gels sont laissés à l'incubateur toute la nuit afin d'obtenir des petits groupes de cellules à la surface du gel. Les expériences sont lancées le lendemain.

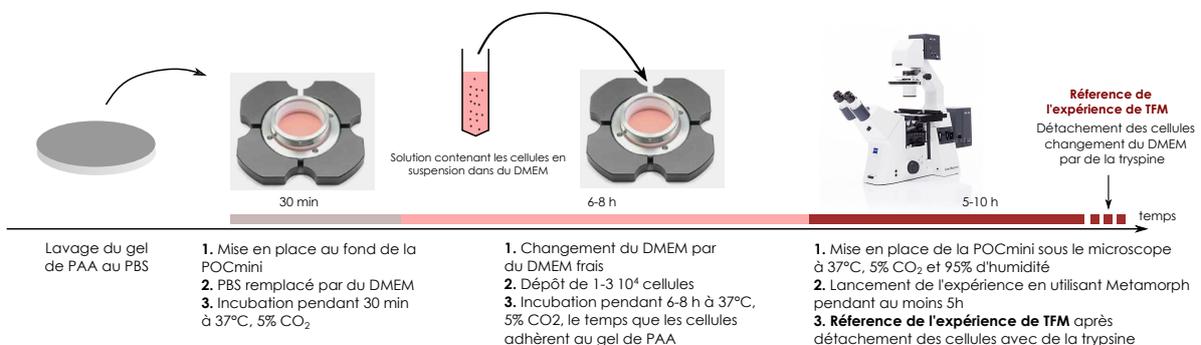


FIGURE II.5 – Étapes d'une expérience de TFM sur gel uniforme, pour la caractérisation du phénotype mécanique de cellules isolées

Pour toutes ces expériences, l'objectif 40× du microscope est utilisé. L'expérience dure entre 5 à 10 h. À la fin de l'expérience, les cellules sont détachées du gel en remplaçant le milieu de culture par de la trypsine, directement sous le microscope (le détachement survient au bout de 30 min-1 h) (Figure II.5).

6 Mesure des forces de traction

6.1 Mesure du déplacement des billes fluorescentes

Les déplacements des billes fluorescentes dans le gel de PAA, qui rendent compte des déformations du substrat par les cellules, sont mesurés en utilisant l'image des billes fluorescentes avant et après le détachement des cellules. Les plugins Fiji utilisés pour cette mesure ont été écrit par Qingtsong Tseng et sont disponibles sur le site <https://sites.google.com/site/qingzongtseng/tfm> :

Étape 1 Les images des billes dans l'état "contracté" du gel et dans l'état "relâché" du gel (image de référence) après trypsinisation, sont alignées en utilisant le plugin Fiji *Align Slices in stack*. Cette étape permet de supprimer les éventuels mouvements de la platine pendant l'expérience.

Étape 2 Les déplacements des billes sont mesurés en réalisant une PIV (*Particle Image Velocimetry*) itérative en utilisant le plugin Fiji *iterative PIV* avec une taille de fenêtre d'interrogation décroissante à chaque passage (Table II.4). Le déplacement des billes entre l'état "contracté" du gel et l'état "relâché" du gel est déterminé à partir de la corrélation maximale de fluorescence entre les deux fenêtres d'interrogation (voir Annexe A pour la méthode de PIV). Les déplacements mesurés à chaque passage de PIV servent à pré-décaler la fenêtre d'interrogation pour l'itération suivante de la PIV, de sorte qu'un déplacement important peut être capturé lorsqu'une petite fenêtre d'interrogation est utilisée. La fenêtre de recherche, choisie plus grande que la fenêtre d'interrogation permet d'améliorer la PIV itérative en évitant les erreurs dans la détermination du pré-décalage. En testant les paramètres de PIV de ce plugin, Martiel *et al.* ont montré qu'il était nécessaire d'avoir au moins 4 billes par fenêtre d'interrogation pour minimiser les erreurs dans la mesure des déplacements (Martiel *et al.*, 2015). Pour des gels uniformes de rigidité 10 kPa, nous avons obtenu une densité moyenne de billes de $0,21 \pm 0,05$ billes/ μm^2 ce qui correspond à ~ 12 billes, en moyenne, pour la dernière fenêtre d'interrogation de PIV (32 pixels \times 32 pixels), au dessus de la densité minimale de billes préconisée par fenêtre d'interrogation (Martiel *et al.*, 2015).

Itération PIV	Fenêtre de recherche (pixels)	Fenêtre d'interrogation (pixels)	Espacement des vecteurs (pixels)
Premier passage	256	128	64
Second passage	128	64	32
Troisième passage	64	32	16

TABLE II.4 – Tableau donnant les paramètres utilisés pour la PIV itérative réalisée avec le plugin Fiji *iterative PIV* Pour chaque passage de PIV, taille (en pixels) de la fenêtre de recherche, de la fenêtre d'interrogation et de l'espace entre les vecteurs de déplacements. 1 pixel correspond à $0,24 \mu\text{m}$ (objectif 40x, binning 2).

6.2 Reconstruction du champ de forces de traction

Pour reconstruire les forces de traction à partir des déformations du substrat, nous avons utilisé la méthode FTTC (*Fourier Transform Traction Cytometry*) (Butler *et al.*, 2002). Deux approches ont été utilisées : une approche dans laquelle le paramètre de régularisation est choisi arbitrairement (FTTC, plugin Fiji) et une approche dans laquelle le paramètre de régularisation est déterminé automatiquement pour minimiser le bruit expérimental (BFTTC, code Matlab disponible en ligne sur le site <https://github.com/CellMicroMechanics>).

Méthode FTTC sur Fiji La première méthode pour reconstruire les forces de traction consiste à utiliser le plugin Fiji *FTTC* écrit par Q. Tseng. Ce plugin permet d'obtenir le champ de forces de traction sur la même grille que celle choisie pour la PIV. Pour toutes les reconstructions effectuées avec ce plugin, nous avons choisi un paramètre de régularisation λ égal à 8×10^{-11} , choisi arbitrairement pour minimiser le bruit expérimental de manière qualitative.

Méthode BFTTC Nous avons aussi utilisé la méthode BFTTC pour la reconstruction des forces de traction. Un article récent (Huang, Dai, Shen, Gu, Wang, Liu, Chen & Sun, 2020) a proposé une méthode pour calculer automatiquement le paramètre de régularisation λ à partir du bruit de mesure, estimé par la variance du déplacement des billes dans une fenêtre en dehors de la cellule (masque B, Figure II.6 a,b). Par une approche bayésienne, le code Matlab (MathWorks, Natick, MA) disponible sur le site <https://github.com/CellMicroMechanics> calcule le paramètre de régularisation optimal *ie* celui qui minimise les forces en dehors des cellules comparées aux forces générées par les cellules. La méthode utilise ensuite le code, développé dans l'équipe de G. Danuser (UT Southwestern Medical Center, Dallas, Texas), `regfourierTFM.m` accessible à l'adresse <https://github.com/DanuserLab/TFM/tree/master/software> pour reconstruire les forces de traction par une méthode FTTC. Le code Matlab écrit par Huang *et al.* a été adapté pour l'analyse de nos expériences (Figure II.6 b). Nous avons trouvé un paramètre de régularisation de $2 \times 10^{-7} \mu\text{m}^2/\text{Pa}^2$, valeur médiane pour 71 cellules (cellules MDCK OS soumises à une activation de Src pendant 1 h sur un gel de 10 kPa) (Figure II.6 d).

Nous avons comparé ces deux méthodes dans l'annexe B de ce manuscrit. Nous avons choisi d'utiliser la méthode BFTTC pour toutes nos analyses car :

- elle évite le choix plus ou moins arbitraire d'un facteur de régularisation
- elle prend en compte le bruit expérimental pour chaque cellule : le bruit expérimental n'est pas le même d'un gel de TFM à l'autre et peut même varier au sein d'un même gel

7 Analyse des expériences de TFM à l'échelle de la cellule isolée

7.1 Contour des cellules

Pour ces expériences, nous avons essayé de détecter les contours des cellules automatiquement, sans succès : la qualité des images en contraste de phase n'était pas suffisante pour éviter les erreurs de segmentation et l'utilisation des images de fluorescence en m-Cherry (cytoplasmique lorsque les cellules ne sont pas illuminées en lumière bleue) n'était pas possible car le signal était trop faible au niveau du lamellipode des cellules. Les masques de cellules imagées au 40x sont donc dessinés à la main en utilisant une tablette graphique (Wacom Cintiq 13HD creative).

7.2 Critères de sélection des cellules analysées

Niveau de fluorescence et durée minimale avant cytokinèse Dans les expériences à l'échelle de la cellule isolée, nous analysons des cellules :

- individuelles et suffisamment éloignées des autres (cellules "isolées")
- marquées en m-Cherry (marquage de l'optoSrc) et en GFP (marquage du CIBN-Caax)
- pour lesquelles la division n'intervient pas durant les 2,5 premières heures de l'expérience (pour les expériences avec une durée totale de photoactivation dans le bleu de 15 min, 30 min, 1 h ou soutenue dans le temps) ou pendant les 4 premières heures (pour une durée totale d'activation de 2 h).

Nous avons limité notre analyse aux 5 premières heures d'expérience car la majorité des cellules se sont divisées après les 5 h. Une fois divisées, les cellules ne sont plus considérées dans les statistiques.

Qualité de la reconstruction des forces La qualité de la reconstruction des forces de traction à partir du déplacement des billes du gel peut être évaluée en comparant la somme vectorielle des forces de traction \vec{T} (en Pa) de la cellule avec la force totale exercée par la cellule sur son substrat (somme de la norme des forces). En effet, la cellule étant isolée, la somme des forces de traction qu'elle exerce sur son substrat doit être nulle. En raison des erreurs liées à la reconstruction numérique des forces, cette somme n'est rigoureusement pas nulle. On définit alors le facteur de qualité Q de la reconstruction des forces de traction :

$$Q = 1 - \frac{\sum_{cellule} \vec{T}}{\sum_{cellule} \|\vec{T}\|} \quad (\text{II.1})$$

La reconstruction des forces est considérée comme acceptable lorsque ce facteur de qualité est supérieur à 0,85 (Maruthamuthu *et al.*, 2011) (Figure II.6 c) : au maximum 15 % des forces de traction de la cellule ne sont pas équilibrées.

7.3 Influence du masque de la cellule pour la mesure des forces

Les forces de traction qu'exercent les cellules sur leur substrat s'étendent au-delà des bords de la cellule. Pour prendre en compte ces forces, le masque de la cellule est dilaté. Sur l'exemple donné

en Figure II.6 a, nous avons dilaté le masque de la cellule par pas de δ , avec $\delta=16$ pixels (distance entre les vecteurs déplacements mesurés par la PIV). La taille 2δ maximise le facteur de qualité de la reconstruction des forces (Figure II.6 c). Nous avons donc utilisé le masque de la cellule dilaté d'une distance de 32 pixels soit $7,6 \mu\text{m}$, pour la mesure des forces de traction exercées par la cellule. Ce masque est dilaté en utilisant la fonction *imdilate.m* de Matlab avec un élément structurant ("disk") de taille 2δ . Nous avons trouvé un facteur de qualité Q_m de $0,93$ (valeur médiane pour 71 cellules MDCK OS soumises à une activation de Src pendant 1 h sur un gel de 10 kPa) ce qui signifie qu'après reconstruction des forces, moins de 7% des forces exercées par les cellules ne sont pas équilibrées (Figure II.6 d).

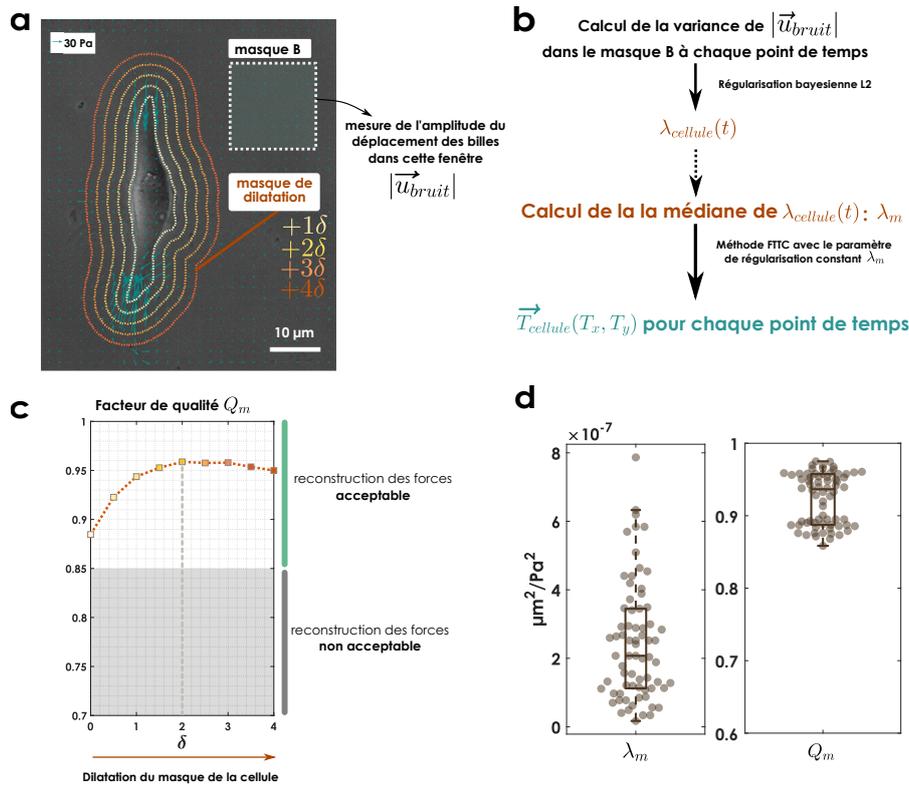


FIGURE II.6 – Méthode BFTTC pour la reconstruction des forces : paramètre de régularisation, facteur de qualité et choix du masque (a) Image en contraste de phase d'une cellule MDCK OS sur laquelle sont représentées des masques dilatés du masque original en blanc (du jaune au rouge : dilatation du masque de 1 à 4 δ avec $\delta=16$ pixels). Le masque B, choisi en dehors de la cellule, permet de mesurer la variance du déplacement des billes dans cette région afin d'estimer le bruit. (b) Démarche utilisée pour la reconstruction des forces de traction en utilisant la méthode BFTTC. (c) Facteur de qualité "médian" Q_m pour la cellule présentée en (a) en fonction de la dilatation du masque. Lorsque $Q_m > 0,85$, la reconstruction des forces est considérée "acceptable". (d) Facteur de régularisation médian λ_m et facteur de qualité médian Q_m pour des cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src d'1 h ($n=71$ cellules, $N=8$ expériences).

7.4 Grandeurs mesurées

À partir du champ de déplacement des billes \vec{u} (u_x, u_y), et des forces de traction \vec{T} (T_x, T_y) (expérimentées en Pa) d'une cellule et des paramètres géométriques de la cellule (Figure II.7), plusieurs

quantités peuvent être mesurées :

- L'**aire d'étalement** A de la cellule (en μm^2)

$$A = \sum_{\text{masque cellule}} p^2 \text{ avec } p \text{ la taille d'un pixel} \quad (\text{II.2})$$

- La **force de traction moyenne** T_m exercée par la cellule (en Pa) qui est une contrainte surfacique

$$T_m = \langle \|\vec{T}\| \rangle_{\text{masque dilaté}} \quad (\text{II.3})$$

- La **force totale** F_{tot} (en N) exercée par la cellule sur son substrat

$$F_{tot} = \sum_{\text{masque dilaté}} \|\vec{T}\| p^2 \quad (\text{II.4})$$

- Le **moment contractile** M_c des forces de traction (J), premier moment des forces de traction

$$M_c = M_{xx} + M_{yy} = \sum_{\text{masque dilaté}} (T_x x + T_y y) p^2 \quad (\text{II.5})$$

- L'**énergie de déformation** SE (en J); elle correspond au travail dépensé par la cellule pour déformer le substrat

$$SE = \frac{1}{2} \sum_{\text{masque dilaté}} (T_x u_x + T_y u_y) p^2 \quad (\text{II.6})$$

- La **densité d'énergie de déformation** SED (en J/m²) calculée à partir de l'énergie de déformation SE et de l'aire du masque dilaté

$$SED = \frac{SE}{A_{\text{masque dilaté}}} \quad (\text{II.7})$$

- L'**isotropie de forme** I_S et l'**anisotropie de forme** A_F calculée à partir du petit b et du grand a demi-axe de l'ellipse ajustée à la cellule

$$I_S = 1 - A_S = \frac{b}{a} \quad (\text{II.8})$$

- L'**isotropie de force** I_F et l'**anisotropie de force** A_F calculée à partir des valeurs propres de la matrice du premier moment des forces de traction M , Λ_1 et Λ_2 avec $\Lambda_1 \leq \Lambda_2$

$$I_F = 1 - A_F = 1 - \frac{\Lambda_2 - \Lambda_1}{\Lambda_2 + \Lambda_1} \quad (\text{II.9})$$

Toutes ces quantités sont calculées à partir d'un code Matlab, qui utilise la fonction *regionprops.m* de Matlab.

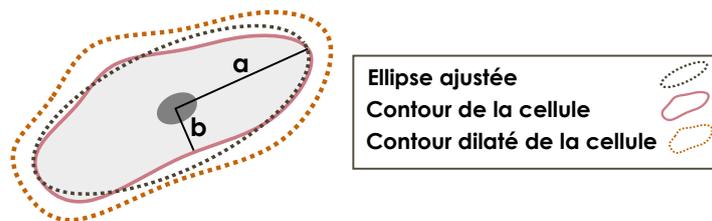


FIGURE II.7 – Paramètres géométriques utilisés pour la caractérisation du phénotype mécanique

7.5 Calcul du gain/changement maximal des grandeurs mesurées pendant l'activation de Src

- Pour mesurer les gains maximaux en aire g_A et en force totale g_F pendant l'activation de Src, nous calculons la moyenne des 5 plus grandes valeurs de ces quantités parmi les 20 points mesurés pendant l'activation (points au delà du 3^{ème} quartile) ; moyenne que nous normalisons par la valeur moyenne de ces quantités avant l'activation.
- Pour mesurer les changements maximaux en isotropie/anisotropie de forme ($\Delta I_s/\Delta A_s$) et en anisotropie/isotropie de force ($\Delta I_F/\Delta A_F$) pendant l'activation de Src, nous calculons la moyenne m des 5 plus grandes valeurs de l'isotropie de forme et de l'isotropie de force parmi les 20 points mesurés pendant l'activation puis nous soustrayons à cette moyenne m , la valeur moyenne avant activation.

8 Microscopie de Force Atomique (AFM)

8.1 Description du dispositif utilisé

Les mesures d'AFM ont été réalisées à l'Université d'Evry avec Maxime Liboz (Doctorant sous la direction de C. Campillo, laboratoire LAMBE) sur un AFM Nanowizard 4 Bioscience AFM (JPK/-Bruker). Nous avons utilisé le mode Quantitative ImagingTM(QI) qui permet d'obtenir une courbe force-indentation à chaque cycle d'approche/rétraction de la pointe.

Pour la mesure du module d'Young des gels de PAA, nous avons utilisé un levier rectangulaire avec une pointe sphérique de rayon 3 μm CP-CONT-PS-C (Figure II.8 b, Table II.5), mieux adaptée à la mesure globale d'échantillon (Urbanski *et al.*, 2019). Les courbes force-indentation sont obtenues en choisissant les paramètres suivant :

- vitesse de déplacement de la pointe : 2 $\mu\text{m/s}$
- valeur de consigne de la force : 5 nN
- taille de la fenêtre de mesure variable allant de 10 à 100 μm^2 avec une résolution de 32×32 ou 64×64 pixels
- méthode de calibration de la raideur du levier avec la méthode dite de "contact"

Pour la mesure du module d'Young des cellules, nous avons utilisé un levier en as de pic avec une pointe pyramidale de rayon de courbure 65 nm PFQNM-LC-A-CAL (Figure II.8 a, Table II.5), adaptée à la mesure d'échantillon peu rigide comme les cellules (rigidité de quelques kPa) avec une bonne résolution spatiale (Yang *et al.*, 2019). Les courbes force-indentation sont obtenues en choisissant les paramètres suivant :

- vitesse de déplacement de la pointe : 100 $\mu\text{m/s}$
- valeur de consigne de la force : 5-25 pN
- hauteur de retrait entre chaque indentation : 3 μm

- taille de la fenêtre de mesure variable allant de 10 à 100 μm^2 avec une résolution de 32×32 ou 64×64 pixels
- méthode de calibration de la raideur du levier avec la méthode dite de "contact"

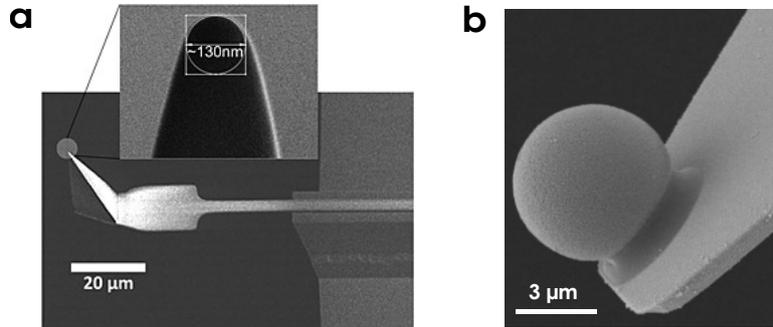


FIGURE II.8 – Images des leviers utilisés dans les expériences AFM présentées dans de ce manuscrit (a) Levier PFQNM-LC-A-CAL. Extrait de (Schillers *et al.*, 2016). (b) Levier CP-CONT-PS-C. Image disponible sur le site <https://www.nanoandmore.com/AFM-Probe-CP-CONT-PS>.

Type de levier	PFQNM-LC-A-CAL	CP-CONT-PS-C
Fournisseur	Bruker AFM probes	Nano And More
Géométrie du levier	levier en "as de pic"	levier rectangulaire
Longueur du levier	52 μm	450 μm
Constante de raideur du levier	0,06-0,1 N/m	0,02-0,07 N/m
Géométrie de la pointe	pointe pyramidale	pointe sphérique
Longueur de la pointe	17 μm	s/o
Rayon de la pointe	65 nm	3 μm

TABLE II.5 – Caractéristiques des leviers et pointes utilisés dans les expériences AFM. Caractéristiques du levier PFQNM-LC-A-CAL, utilisé pour la mesure du module d'Young des cellules MDCK OS et du levier CP-CONT-PS-C, utilisé pour la mesure du module d'Young des gels de PAA.

Nous avons utilisé un arduino pour contrôler le shutter de la lampe fluorescente pour pouvoir activer les cellules MDCK optoSrc dans le bleu. En utilisant un puissance-mètre Thorlabs PR100 A $\lambda=488$ nm, sur le calibre 5 mW, nous avons réglé l'intensité de la source LED (2 barres d'intensité sur 5) de façon à avoir une puissance lumineuse proche de celle utilisée dans nos expériences, 0,19 mW ~ 1 cm après l'objectif 40x.

8.2 Procédure expérimentale

Pour réaliser les expériences d'AFM, les gels de PAA sont placés au fond d'une plaque 6 puits et recouverts de milieu DMEM. Après incubation pendant 30 min, le milieu DMEM est changé par du milieu frais et 4×10^3 cellules sont déposées à la surface de chaque gel. Après un temps d'incubation

de 5 h à 37°C, 5 % CO₂ et 95 % d'humidité relative, la plaque 6 puits est transportée à l'Université d'Evry et immédiatement placée dans l'incubateur à 37°C, 5 % CO₂ et 95 % d'humidité relative, pendant au moins 1 h. Avant utilisation, le gel de PAA est placé dans une boîte de pétri de diamètre 33 mm en plastique remplie de 2 mL de milieu DMEM. La boîte de pétri est alors placée sous le microscope (régulation de la température avec un anneau à 37°C, 5 % CO₂) après calibration de la pointe. Les analyses des expériences AFM ont été réalisées par M. Liboz à l'aide du logiciel JPK et de codes Matlab. Les données AFM sont filtrées, en particulier : substrat mis à 0, hauteur de la cellule comprise entre 0,1 et 15 µm, rigidité comprise entre 0 et 100 kPa, indentation inférieure à 30 % de la hauteur locale de la cellule.

9 Approche pharmacologique

Nous avons utilisé une approche pharmacologique pour identifier les acteurs moléculaires à l'origine du changement de phénotype mécanique des cellules Src-activées. Les drogues sont mélangées au milieu de culture DMEM pour atteindre la concentration $C_{utilisée}$ (ajout d'un volume V_S par mL de milieu DMEM de la solution stock de concentration C_{stock}). Le milieu de DMEM de la POCmini est remplacé par le milieu contenant la drogue. Après un temps d'incubation t_i à 37°C, 5 % CO₂ et 95 % d'humidité, les cellules sont placées sous le microscope et l'expérience est lancée.

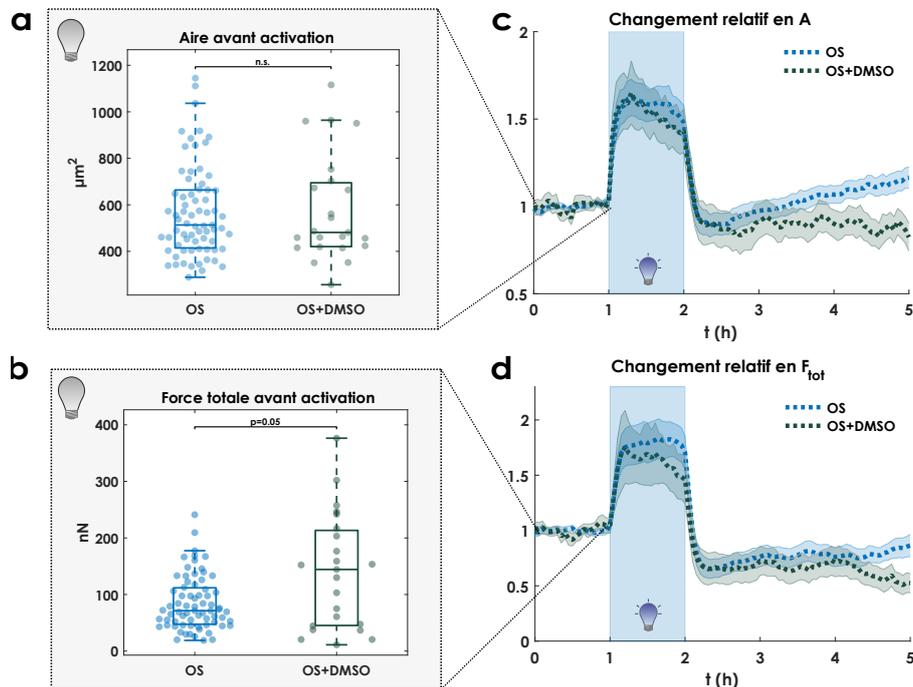


FIGURE II.9 – Effet du DMSO sur la réponse mécanique des cellules Src-activées à une activation de Src de 1 h (a-b) Phénotype mécanique de cellules MDCK OS dans un milieu de culture standard (bleu, OS, $n=71$, $N=8$), ou en présence de 10 μL de DMSO (vert, OS + DMSO, $n=23$, $N=2$), avant activation : aire (a) et force totale (b). (c-d) Changement de phénotype mécanique des cellules soumises à une activation de Src d'1 h pour les deux conditions décrites en a,b : aire (c) et force totale (d), normalisées par leur valeur moyenne avant activation.

Drogues	Cible	Mécanisme d'action	Référence
BAPTA-AM	Ca ²⁺ intracellulaire	Chélateur de calcium, perméable à la membrane : fixe les ions calcium après l'élimination du groupe acétoxyméthyle par les estérases cytoplasmiques	(Tymianski <i>et al.</i> , 1994)
BDP9066	MRCK	Composé azaindole formant un complexe avec MRCK et réduisant la phosphorylation des substrats de MRCK	(Unbekandt <i>et al.</i> , 2018)
C3 transferase	Rho	Exoenzyme C3 transferase : ADP ribosyl transférase qui 'ribosyle' sélectivement les protéines RhoA, RhoB et RhoC sur le résidu 41 de l'asparagine, les rendant ainsi inactives.	(Aktories <i>et al.</i> , 1989)
CID44	Cdc42	Puissant inhibiteur de liaison de liaison nucléotidique (guanine), sélectif de Cdc42.	(Hong <i>et al.</i> , 2013)
CK666	Arp 2/3	Stabilise l'état inactif du complexe Arp 2/3, en bloquant le mouvement des sous-unités Arp2 et Arp3 dans la conformation activée de type filament	(Hetrick <i>et al.</i> , 2013)
FR180204	ERK	Inhibiteur de l'activité kinase de ERK1 et ERK2, perméable à la membrane.	(Ohuri <i>et al.</i> , 2005)
Gd ³⁺	canaux mécano- sensibles, TRP	Ion trivalent qui possède un rayon ionique similaire à celui du Ca ²⁺ , bloque les canaux calciques activés par l'étirement et les canaux TRP	(Bourne & Trifaró, 1982), (Yang & Sachs, 1989)
GsmTx4	Piezo1	Peptide provenant du venin d'araignée : agit comme une "réserve mobile" de matériau membranaire, s'incorpore dans la membrane d'une manière dépendante de la tension et déforme la distribution de la tension près du canal : réduit l'ampleur effective de la force agissant sur le canal	(Gnanasambandam <i>et al.</i> , 2017)
ML141	Rac1/Cdc42	CID-2950007, composé dihydropyrazole trisubstitué, perméable aux cellules et allostérique, qui agit comme un inhibiteur puissant, réversible et non compétitif des GTPases Cdc42. Diminue GTP-Cdc42 ($\leq 95\%$) et GTP-Rac1 ($\leq 40\%$)	(Surviladze <i>et al.</i> , 2010) (Hong <i>et al.</i> , 2013)
ML7	MLCK	Inhibition compétitive réversible par l'ATP de la MLCK des muscles lisses indépendante ou dépendante de la calmoduline Ca ²⁺ .	(Saitoh <i>et al.</i> , 1987)
Mn ²⁺	integrines	Puissant activateur d'intégrine qui maintient les récepteurs d'intégrine dans une conformation présentant une forte affinité de liaison avec les ligands du substrat ou de l'ECM.	(Mould <i>et al.</i> , 1995), (Lin <i>et al.</i> , 2013) , (Oakes <i>et al.</i> , 2018)
NSC23766	Rac1	Trihydrochloride qui inhibe efficacement la liaison et l'activation de Rac1 par les GEF spécifiques de Rac, Trio ou Tiam1, mais n'affecte pas les interactions avec RhoA ou Cdc42.	(Gao <i>et al.</i> , 2004)
PF573228	FAK	PF-573,228 inhibe la phosphorylation de FAK sur Tyr(397), inhibition du renouvellement des adhésions focales.	(Slack-Davis <i>et al.</i> , 2007)
pnbb	myosine II	Para-nitro-blebbistatine, forme non phototoxique de la blebbistatine, inhibiteur de la myosine II ATPase	(Képiró <i>et al.</i> , 2014)
PP2	Src	Pyrazolopyrimidine, inhibiteur puissant, réversible, ATP-compétitif et "sélectif" de la famille Src des protéines tyrosine kinases	(Hanke <i>et al.</i> , 1996)
SMIFH2	mDia	<i>Small Molecule Inhibitor of Formin Homology 2 domains</i> , inhibiteur des domaines d'homologie 2 de la formine (facteur de nucléation de l'actine) : inhibe l'assemblage de l'actine médiée par la formine	(Rizvi <i>et al.</i> , 2009)
Xestospongine	IP3	Isolé de l'éponge Xestospongia, inhibiteur perméable à la membrane de la libération de Ca ²⁺ médiée par l'IP3, sans interagir avec le site de liaison à l'IP3 : suggère un mécanisme indépendant du site effecteur de l'IP3.	(Gafni <i>et al.</i> , 1997)
Y27632	ROCK	Inhibe ROCK en entrant en compétition avec l'ATP pour la liaison au site catalytique.	(Ishizaki T <i>et al.</i> , 2000)

TABLE II.6 – Récapitulatif des drogues utilisées et les mécanismes d'action associés. Colonnes de gauche à droite : Drogue utilisée, cible biologique, mécanisme d'action et référence bibliographique. pnbb pour para-nitro-blebbistatine.

Drogues	Fournisseur	I/A	Cible	$C_{utilisée}$	Solvant	C_{stock}	V_s	t_i
BAPTA-AM	Bertin	I	Ca^{2+} intracellulaire	5 μ M	DMSO	20 mM	0,25 μ L	1 h
BDP9006	MedChemExpress	I	MRCK	0,4 μ M	DMSO	10 mM	0,4 μ L	1 h
C3 transferase	Cytoskeleton Inc.	I	Rho	1 μ g/mL	eau+DTT 1mM	1 mg/mL	1 μ L	6 h
CID44	MedChemExpress	I	Cdc42	10 μ M	DMSO	10 mM	1 μ L	1 h
CK666	Sigma	I	Arp 2/3	100 μ M	DMSO	10 mM	10 μ L	1 h
FR180204	Sigma	I	ERK	10 μ M	DMSO	10 mM	1 μ L	1 h
Gd ³⁺	Bertin	I	canaux mécano-sensibles, TRP	100 μ M	eau	100 mM	1 μ L	1 h
GsmTx4	Bio-Techne	I	Piezo1	5 μ M	eau	250 μ M	20 μ L	1 h
ML141	Sigma	I	Rac1/MLCK	10 μ M	DMSO	10 mM	1 μ L	1 h
ML7	Sigma	I	MLCK	20 μ M	DMSO	10 mM	2 μ L	1 h
Mn ²⁺	Sigma	A	intégrines	6 μ M	eau	1 mol/L	0,006 μ L	1 h
NSC23766	Tocris	I	Rac1	50 μ M	DMSO	50 mM	1 μ L	5 h
PF573228	Sigma	I	FAK	1 μ M	DMSO	10 mM	0,1 μ L	1 h
pnb	Sigma	I	myosine II	1 μ M	DMSO	10 mM	1 μ L	1 h
PP2	Sigma	I	c-Src	15 μ M	DMSO	10 mM	1,5 μ L	1 h
SMIFH2	Sigma	I	mDia	10 μ M	DMSO	10 mM	1 μ L	1 h
Xestospongine	Bertin	I	IP3	5 μ M	DMSO	2 mM	2,5 μ L	1 h
Y27632	Sigma	I	ROCK	1 μ M	eau	10	1 μ L	1 h
ZCL278	Sigma	I	Cdc42	50 μ M	DMSO	50 mM	1 μ L	1 h

TABLE II.7 – Récapitulatif des drogues utilisées dans les expériences. Colonnes de gauche à droite : Drogue utilisée, fournisseur, I/A : Inhibiteur/Activateur, cible biologique, $C_{utilisée}$: concentration de drogue utilisée dans les expériences, Solvant de la solution stock contenant la drogue, C_{stock} : concentration de drogue dans la solution stock, V_s : volume de solvant utilisé dans les expériences par mL de milieu cellulaire DMEM et t_i : temps d'incubation moyen entre l'ajout de la drogue dans le milieu de culture et le lancement de l'expérience.

Le DMSO a été utilisé à une concentration relativement élevée pour une condition, celle de l'inhibition de Arp 2/3 avec le CK666 (1% v/v en DMSO). Pour cette concentration en DMSO, nous avons vérifié que le gain en aire et en contractilité des cellules Src-activées étaient similaires à ceux des cellules Src-activées dans la situation sans drogue (Figure II.9 c,d). En revanche, nous remarquons que dans ce cas, l'état mécanique des cellules avant l'activation est modifié : les cellules ont le même étalement que dans la situation sans DMSO mais elles sont plus contractiles (Figure II.9 a,b). Après l'activation de Src, nous observons également que les cellules sont moins étalées en présence de DMSO que dans la situation contrôle (Figure II.9 c,d). Pour les autres expériences d'inhibition en présence de DMSO, la concentration en DMSO n'excède pas 0,25 % v/v : des expériences contrôles devront être réalisées en présence d'une plus faible concentration de DMSO (0,25 % v/v) pour vérifier que le DMSO n'affecte pas, dans ce cas, ni l'état des cellules avant l'activation ni la réponse mécanique des cellules MDCK à l'activation de Src.

10 Visualisation du cytosquelette

10.1 Réalisation des expériences

Nous avons marqué certaines structures du cytosquelette (LifeAct, vinculine, MRLC) en rouge lointain (iRFP). Les billes fluorescentes utilisées dans nos expériences de TFM sont, elle aussi, marquées en rouge profond (Cy5), empêchant la mesure des forces de traction en parallèle de la visualisation du cytosquelette. Nous avons donc dû utiliser des gels de PAA sans bille pour étudier le remodelage du cytosquelette des cellules Src-activées. Nous avons vérifié que la rigidité des gels n'était pas affectée par la présence des billes (Tableau II.3) : l'écart relatif est inférieur à 5 %. Nous réalisons les expériences de visualisation du cytosquelette en suivant un protocole similaire à celui utilisé pour les expériences de TFM. Les gels de PAA sans bille sont montés dans une POC-mini 2 (Pecon). Les cellules sont ensuite déposées dans la POC-mini à faible densité ($1-3 \cdot 10^4$ cellules). Après 6 h d'incubation permettant l'adhésion des cellules, les cellules sont mises sous le microscope et l'expérience est lancée.

Expériences de visualisation de l'activité des myosines et des adhésions Pour visualiser la dynamique du cytosquelette en présence des inhibiteurs ML7 et Y27632, nous avons procédé en trois temps :

- **Étape 1** : le cytosquelette des cellules est imagé pendant 30 min avant l'ajout de la drogue
- **Étape 2** : l'inhibiteur est ajouté directement sous le microscope : préparation d'une solution contenant l'inhibiteur dans du milieu de culture et changement du milieu de culture.
- **Étape 3** : après un temps d'incubation de 1 à 2 h, les cellules sont soumises à la séquence d'illumination en lumière bleue.

10.2 Mesure du flux rétrograde d'actine

Réalisation des expériences Pour ces expériences, nous avons réalisé des films en iRFP du marquage de LifeAct dans les cellules 653+909 + LifeAct-iRFP déposées sur des gels de rigidité donnée avec un intervalle de 2 s entre deux images successives afin de voir la dynamique de l'actine. Pour chaque cellule observée :

- **Avant l'activation de Src** : acquisition d'images pendant 3 min avec un intervalle de temps de 2 s entre les images.
- **Activation de Src** toutes les 3 min pendant 12 min (soit 4 pulses de lumière bleue MOSAIC LED-BDX de 200 ms)
- **"Pendant" l'activation** : Immédiatement après cette période d'activation, acquisition d'images pendant 3 min avec un intervalle de temps de 2 s entre les images.

Pour la mesure du flux rétrograde d'actine sur des gels de 100 kPa, notons que la durée totale d'acquisition est de 2 min, et non de 3 min.

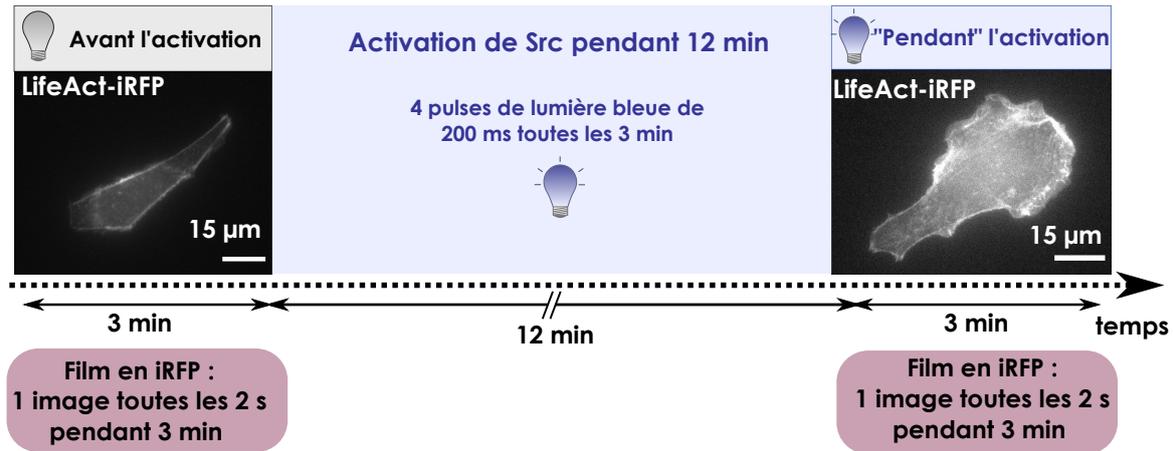


FIGURE II.10 – Réalisation des expériences de mesure du flux rétrograde d'actine

Analyse des expériences Pour l'analyse du flux rétrograde d'actine, une première étape consiste à dessiner à la main le masque de la cellule (Figure II.11, étape 1). Le masque est ensuite utilisé pour trouver les coordonnées des points du contour sur Matlab et déterminer des segments perpendiculaires (de taille 80 pixels soit $12,8 \mu\text{m}$) aux tangentes au contour en 40 points. Un fichier texte est créé avec les coordonnées de ces points et du vecteur perpendiculaire (Figure II.11, étape 2). Ce fichier est ensuite lu par Fiji pour tracer en chacun des points du contour une ligne selon laquelle un kymographe est généré (Figure II.11, étape 3). Les kymographes sont ensuite ouverts un à un et les pentes tracées à la main (Figure II.11, étape 4) pour déterminer une vitesse en nm/s . Plusieurs mesures de flux rétrograde sont obtenues pour une cellule donnée.

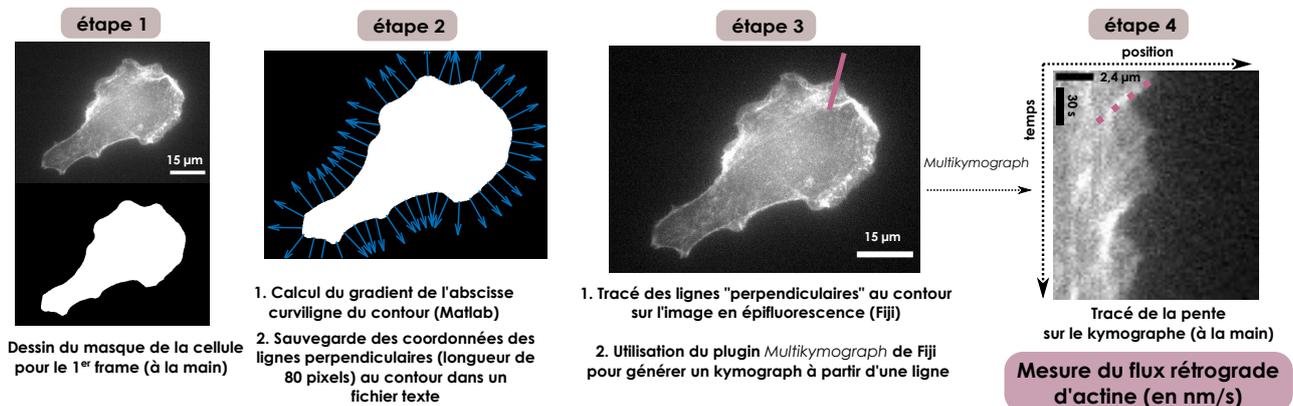


FIGURE II.11 – Mesure du flux rétrograde d'actine Étapes permettant de mesurer le flux rétrograde d'actine en utilisant Matlab et Fiji

10.3 Analyse des adhésions focales

Pour analyser le signal vinculin-IRFP, les adhésions sont segmentées à la main en utilisant la tablette Wacom à différents points de temps de l'expérience. En utilisant ces masques et la fonction *regionprops.m* de Matlab, le nombre d'adhésions et l'aire moyenne des adhésions sont mesurés.

10.4 Analyse des fibres de stress

Pour analyser les fibres de stress contractiles marquées par MRLC, nous avons utilisé la fonction *threshold* de Matlab afin d'obtenir un masque du réseau de fibres (Figure II.12). Nous avons ensuite utilisé la fonction *regionprops* de Matlab pour déterminer l'aire totale du réseau et l'intensité lumineuse totale (proportionnelle à l'activité des myosines) dans le réseau.



FIGURE II.12 – Analyse des fibres de stress contractiles

11 Probabilité et durée d'arrondissement

Les événements "d'arrondissement" après l'activation transitoire de Src sont détectés de façon automatique : après activation, une cellule est considérée comme s'arrondissant si elle remplit deux conditions, l'une sur son isotropie de forme ($I_S > 0,65$) et l'autre sur sa surface ($A < 0,15 A_0$), où A_0 est sa surface moyenne avant activation. Pour chaque condition étudiée, la probabilité d'arrondissement est définie comme : $P_r = \frac{n_{arrondies}}{n_{cellules}}$ où $n_{arrondies}$ est le nombre total de cellules arrondies détectées et $n_{cellules}$ est le nombre total de cellules considérées. Nous considérons la distribution binomiale avec les paramètres $n_{cellules}$ et P_r . L'incertitude sur P_r est alors donnée par :

$$\sqrt{\text{var}(P_r)} = \sqrt{\frac{P_r(1 - P_r)}{n_{cellules}}}$$

La durée de l'arrondissement est le temps pendant lequel une cellule remplit ces deux conditions.

12 Tests statistiques

- Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de Matlab (Mathworks). Les probabilités p permettant de déterminer la significativité ont été calculées par un test U de Mann-Whitney (fonction *ranksum* de Matlab) et les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives et sont indiquées dans les figures, les valeurs p supérieures à 0,05 ont été considérées comme non significatives ("n.s.").
- Sur les courbes, les barres d'erreur représentent 95% de l'intervalle de confiance de la moyenne, sauf mention contraire.

Chapitre III

Phénotype mécanique des cellules Src-transformées

Table des matières

1	Description du phénotype mécanique des cellules Src-activées	74
1.1	Mesure du phénotype mécanique	75
1.2	Expériences contrôles	78
1.3	Caractérisation AFM du phénotype mécanique : mesure du volume et de la rigidité corticale	82
1.4	Effet du type cellulaire	83
2	Mécanismes moléculaires à l'origine du phénotype mécanique	85
2.1	Acteurs impliqués dans l'étalement des cellules Src-activées	86
2.2	Acteurs impliqués dans l'augmentation de contractilité des cellules Src-activées	88
3	Caractérisation de la réponse biologique	97
3.1	Dynamique de l'actine filamenteuse	97
3.2	Réorganisations des adhésions	98
3.3	Réorganisation des fibres de stress	99
4	État mécanique après l'activation de Src	103
4.1	Arrondissement des cellules après l'activation transitoire de Src	103
4.2	Étalement et contractilité des cellules après l'activation de Src	107
5	Discussion	108
5.1	Pertinence du système choisi	108
5.2	Src coordonne un gain en étalement et en contractilité	109
5.3	Le gain en contractilité est MLCK-dépendant et ROCK-indépendant	112
5.4	L'activation de Src induit un flux de calcium	113
5.5	Ré-arrangement du cytosquelette des cellules Src-activées	115
5.6	Phénotype mécanique des cellules Src-activées : un avantage sur les cellules normales?	115

5.7	Arrondissement des cellules après l'activation transitoire de Src	116
5.8	Perte mécanique après l'activation	117
5.9	Importance du temps d'activation de Src	118
5.10	Phénotype mécanique d'un groupe de cellules Src-activées	120

Dans ce chapitre, nous caractérisons le phénotype bio-mécanique des cellules individuelles, déposées sur des gels de polyacrylamide (PAA) de rigidité 10 kPa, et soumises à une activation transitoire de Src d'1 h. Nous nous sommes intéressés à la réponse bio-mécanique en étudiant les mécanismes moléculaires sous-jacents au changement de phénotype mécanique observé, puis en étudiant les changements de l'architecture du cytosquelette de la cellule (actine, adhésions et fibres de stress) associés. Enfin nous nous sommes intéressés à l'état mécanique de la cellule après activation.

1 Description du phénotype mécanique des cellules Src-activées

Pour étudier le phénotype mécanique des cellules Src-activées, nous avons utilisé la lignée cellulaire épithéliale MDCK exprimant de manière stable une version photosensible de Src, l'optoSrc : les cellules MDCK optoSrc (MDCK OS) (Moitrier *et al.*, 2019a; Kerjouan *et al.*, 2021).

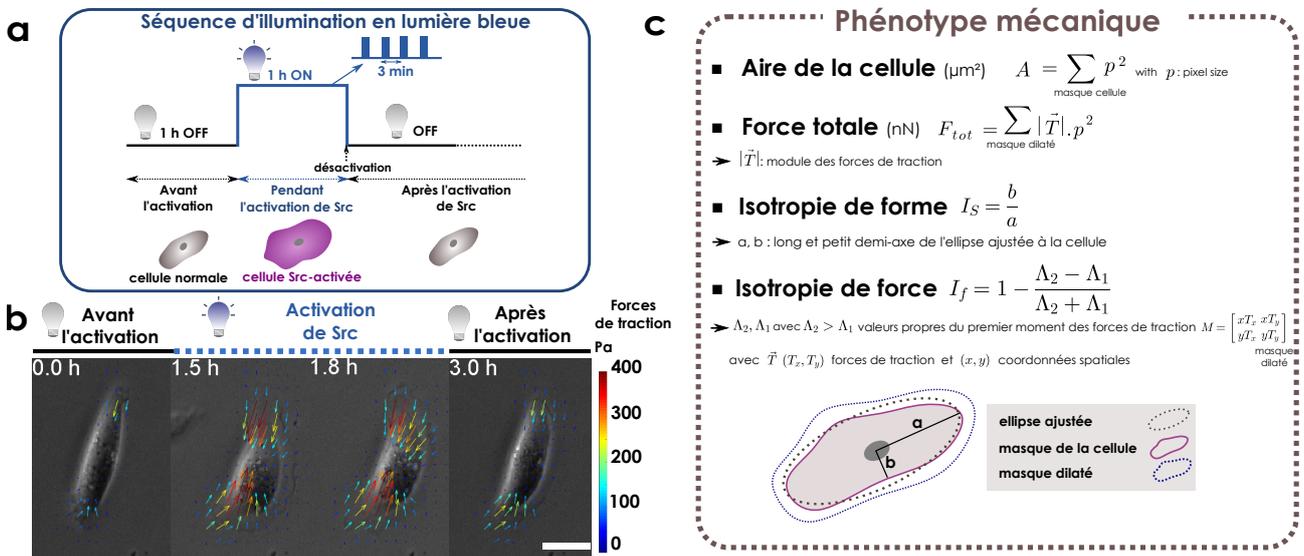


FIGURE III.1 – Caractérisation du phénotype mécanique de cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src de 1 h (a) Séquence d'illumination en lumière bleue (OFF / 1h ON / OFF) utilisée pour activer de façon transitoire Src. (b) Images en contraste de phase d'une cellule MDCK OS isolée, soumise à la séquence d'illumination décrite en (a) pour quatre points de temps. Le temps est indiqué en heures, et l'origine des temps $t = 0$ correspond au début de l'expérience. Les cellules sont déposées sur un gel de polyacrylamide de rigidité ~ 10 kPa contenant des billes fluorescentes pour calculer les forces de traction qu'elles exercent : les forces de traction sont superposées aux images (flèches) et leur amplitude (en Pa) est codée en couleur. Barre d'échelle : 20 μm . (c) Quatre quantités sont mesurées pour caractériser le phénotype mécanique de la cellule : la surface d'étalement A , la force totale exercée par la cellule F_{tot} , l'isotropie de forme de la cellule I_S et l'isotropie de force I_f .

1.1 Mesure du phénotype mécanique

Nous avons étudié la réponse mécanique de cellules MDCK optoSrc isolées soumises à une activation transitoire de Src d'une durée d'une heure (Figure III.1 a) en utilisant la séquence d'illumination en lumière bleue suivante : 1 h OFF / 1 h ON puis OFF. L'imagerie en contraste de phase combinée à la TFM (Figure III.1 b) permet de caractériser le phénotype mécanique de la cellule (Figure III.1 c), mesuré au cours de la séquence d'illumination (voir paragraphe 7.4 du Chapitre II pour plus de détails) :

- l'aire d'étalement de la cellule, A , en μm^2
- la force totale que la cellule exerce pour déformer son substrat, F_{tot} , en nN
- l'isotropie de forme I_S qui correspond au rapport d'aspect de la cellule
- l'isotropie de force I_F qui rend compte de l'isotropie de la distribution des forces de traction dans la cellule

Sur un gel de PAA, la majorité des cellules MDCK OS qui sont isolées sont polarisées et présentent une distribution polarisée de leurs forces de traction. Sur l'exemple donné en Figure III.1 b, la cellule est polarisée et exerce principalement ses forces à ses deux extrémités. Lors de l'activation de Src (lumière bleue ON), on remarque que la cellule :

- s'étale en formant un lamellipode
- devient plus isotrope
- exerce des forces de traction d'amplitude plus grande
- a une distribution des forces plus isotrope.

Après l'activation (lumière bleue OFF), la cellule se rétracte : son aire diminue, elle est de nouveau polarisée, et les forces qu'elle exerce sont plus faibles et moins isotropes que durant l'activation (Figure III.1 b).

Dans la suite du manuscrit, nous utiliserons le terme de "**contractilité**" pour parler de la force de traction totale exercée par la cellule sur son substrat. Un "**gain en contractilité**" correspondra ainsi à une augmentation de la force de traction totale exercée par la cellule.

Nous avons mesuré le phénotype mécanique de plusieurs cellules ($n=71$ cellules, $N=8$ expériences indépendantes). Nous avons normalisé toutes les réponses en aire et en force par leur valeur moyenne avant activation : l'évolution de ces deux quantités normalisées donne ainsi le changement relatif (gain ou perte) en aire et en contractilité pendant et suivant l'activation de Src, par rapport à l'état de référence, avant activation. Une fois que Src est activée (lumière bleue ON), l'aire et la contractilité augmentent soudainement (Figure III.2 a,b) : nous avons mesuré un gain maximal en aire de $\sim 1,6$ et en contractilité de $\sim 1,8$. Nous avons également mesuré les changements de l'isotropie de forme I_S et de force I_F . Les cellules MDCK optoSrc isolées sont polarisées en l'absence de lumière bleue ($I_S \sim 0,35$) : lors de l'activation de Src, elles s'étalent en formant un lamellipode pour atteindre une forme quasi-circulaire ($I_S \sim 0,55$) (Figure III.2 c). La distribution des forces de traction est aussi polarisée avant

activation ($I_F \sim 0,35$), elle devient également plus isotrope lorsque Src est activée ($I_F \sim 0,55$) (Figure III.2 d). Nous avons vérifié que les cellules MDCK OS ne présentent pas de changement significatif de leur phénotype mécanique au cours du temps, en l'absence de lumière bleue (courbes noires, Figure III.2). Ces observations montrent que les changements de phénotype mécanique observés sont liés à l'illumination en lumière bleue, et donc vraisemblablement à la translocation de l'OS à la membrane, c'est-à-dire à l'activation de Src.

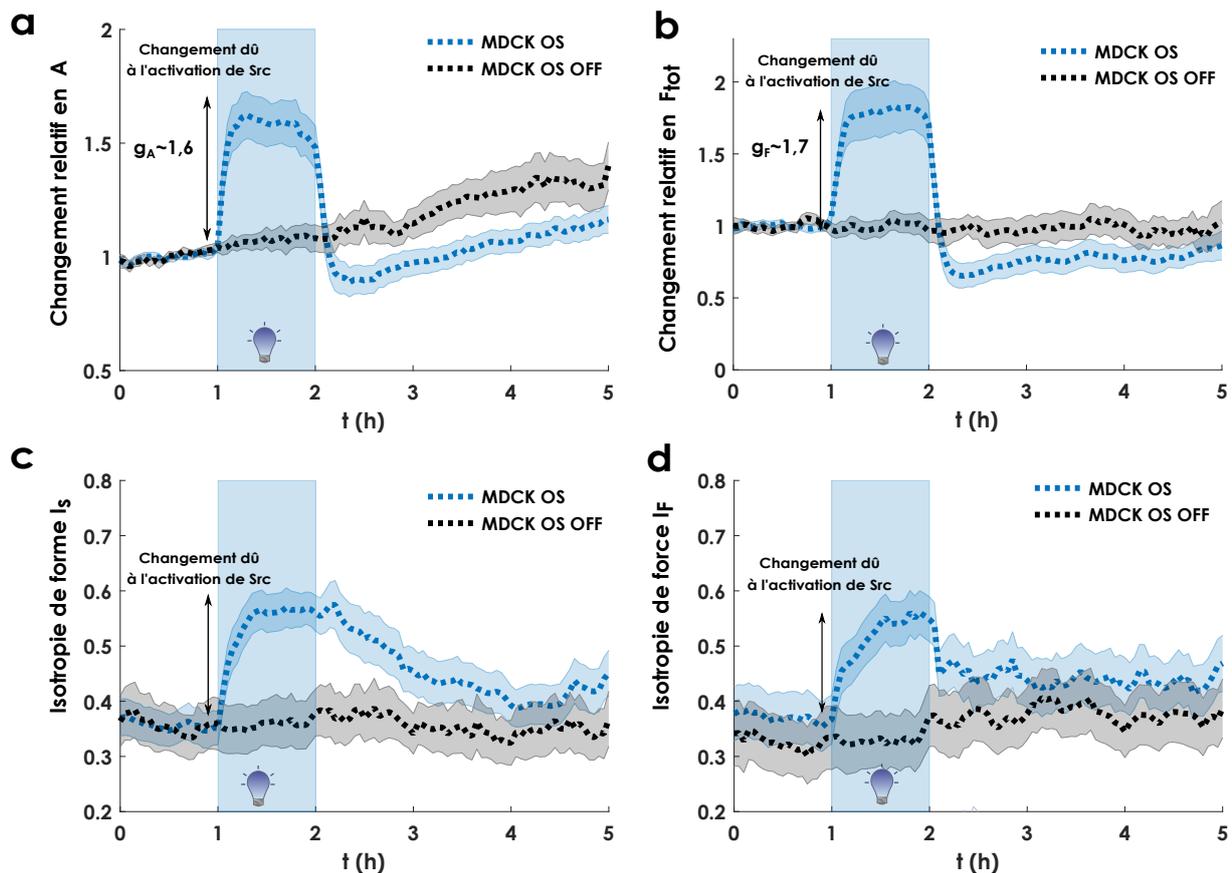


FIGURE III.2 – Les cellules Src-activées sont plus étalées, plus contractiles et ont une forme et une distribution des forces plus isotropes que des cellules normales. Changement du phénotype mécanique de cellules MDCK optoSrc (courbes bleues, MDCK OS, $n=71$ cellules de $N=8$ expériences) au cours de la séquence d'illumination décrite en Figure III.1 a, et de cellules MDCK optoSrc maintenues dans l'obscurité (courbes noires, MDCK OS OFF, $n=42$ cellules de $N=8$ expériences) : (a) aire d'étalement (b) force totale (c) isotropie de forme et (d) isotropie de force. Les lignes pointillées représentent les valeurs moyennes sur la population ; les zones ombrées indiquent un intervalle de confiance de 95 % pour la moyenne. En (a) et (b), l'aire et la force totale sont normalisées par leur valeur moyenne avant activation.

Lorsque la lumière bleue est éteinte, l'aire et la contractilité reviennent rapidement (~ 10 min) à une valeur inférieure à celle d'avant l'activation (Figure III.2 a,b). L'isotropie de force (Figure III.2 d) revient en quelques minutes à une valeur supérieure à celle d'avant activation : la distribution des forces est donc plus isotrope après activation qu'avant activation. En revanche, l'isotropie de forme prend quelques heures pour revenir à une valeur stable, légèrement au-dessus de sa valeur avant activation

(Figure III.2 c). La perte en force totale dans l'état post-activation comparé à l'état avant activation n'est pas observée pour les cellules MDCK OS laissées dans le noir, suggérant que cette perte est bien associée à l'activation transitoire de Src.

Nous avons tracé le changement relatif des autres métriques liées à la contractilité cellulaire (voir paragraphe 7.4 du Chapitre II pour les définitions) et nous l'avons comparé au changement relatif de la force totale F_{tot} . La force totale correspond à la somme de toutes les forces de traction (en amplitude) exercées par la cellule sur son substrat. Cette dernière est donc directement liée à l'étalement cellulaire : elle augmente lorsque l'étalement augmente. Les autres métriques liées à la contractilité cellulaire sont :

- Énergie de déformation, SE , qui correspond à l'énergie dépensée par la cellule entière pour déformer le substrat : mesure d'une énergie contractile "globale".
- Densité d'énergie de déformation, SE par unité de surface : SED , qui prend en compte l'étalement cellulaire dans l'énergie dépensée par la cellule pour déformer son substrat, permet de mesurer une contractilité indépendante de l'étalement de la cellule.
- Moment contractile, M_c , premier moment des forces des traction : autre quantité mesurant l'énergie contractile à l'échelle de la cellule entière.
- Force de traction moyenne dans la cellule $\langle T \rangle$: intègre les forces exercées localement par les cellules.

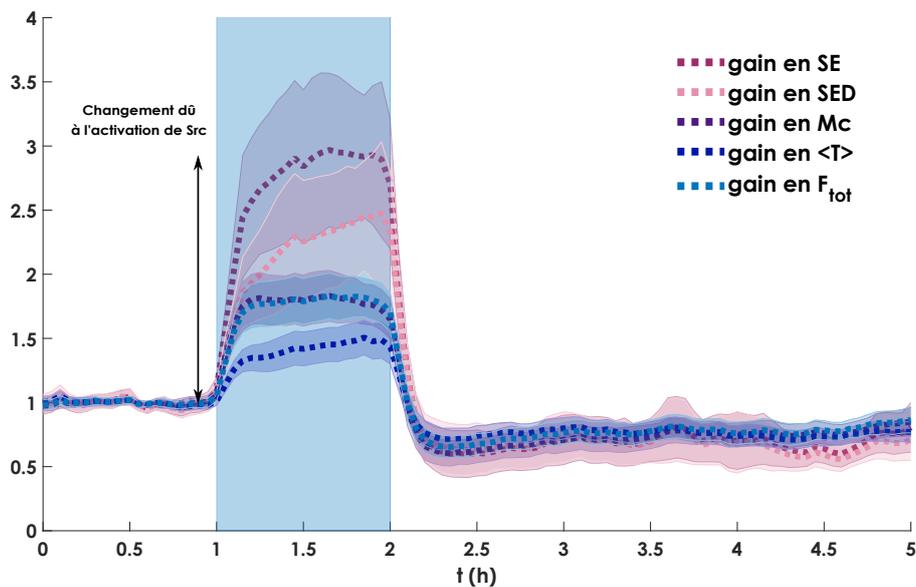


FIGURE III.3 – Comparaison du gain en force totale avec les autres métriques de la contractilité cellulaire de cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src de 1 h ($n=71$ cellules de $N=8$ expériences), normalisées par leur valeur moyenne avant activation. De haut en bas : énergie de déformation (SE , rose foncé), densité d'énergie de déformation (SED , rose clair), moment contractile (M_c , violet), force de traction moyenne ($\langle T \rangle$, bleu foncé) et force de traction (F_{tot} , bleu clair).

Suite à l'activation de Src, le gain de toutes ces quantités augmente rapidement (~ 10 min) avec quelques différences, notamment sur l'amplitude : les réponses en SE et SED sont plus grandes que les autres quantités ($g_{SE} \sim 3$ et $g_{SED} \sim 2,3$), M_c et la force totale F_{tot} ($g_F \sim 1,8$) se superposent et le gain

en force de traction moyenne est plus faible ($g_T \sim 1,4$) (Figure III.3). Toutes ces tendances confirment que les cellules Src-activées ont une contractilité accrue, par rapport à leur état avant activation. La *SED* augmente également pendant l'activation de Src, ce qui confirme que la contractilité des cellules augmente indépendamment de l'aire. Dans la suite, nous avons choisi d'utiliser la force totale comme métrique de la contractilité cellulaire plutôt que la *SED*, qui est plus bruitée que F_{tot} .

Dans les figures de ce chapitre, sauf mention contraire :

- n indique le nombre de cellules considérées, N le nombre d'expériences indépendantes pour la condition considérée.
- pour le phénotype mécanique avant activation : les *boxplots* indiquent le premier quartile, la médiane et le troisième quartile. Les tests utilisés sont des tests-U de Mann-Whitney : n.s (non significatif) correspond à une valeur de p supérieure à 0,05, autrement la valeur de p est indiquée sur le graphe.
- pour les courbes de changement de phénotype mécanique : la courbe en pointillée correspond à la moyenne et la zone ombrée à 95 % de l'intervalle de confiance de la moyenne des quantités mesurées.
- les données correspondant aux MDCK OS soumises à une activation transitoires de Src de 1 h (courbes bleues de la Figure III.2) sont dupliquées de nombreuses fois dans la suite du manuscrit pour faciliter la comparaison avec les autres conditions.

1.2 Expériences contrôles

1.2.1 Inhibition de Src

Afin de vérifier que le changement de phénotype mécanique décrit dans le paragraphe précédent est lié à une activation de la protéine Src, nous avons utilisé un inhibiteur de Src, l'inhibiteur PP2 (Hanke *et al.*, 1996) (Tables II.7 et II.6), que nous avons ajouté 1 h avant le début de la séquence d'illumination. En présence de PP2, les cellules Src-activées s'étalent moins ($g_A \sim 1,2$) et développent moins de forces de traction ($g_F \sim 1,1$) que dans la situation sans inhibiteur (courbes rouges, Figure III.4). Cela montre que le changement de phénotype mécanique des cellules MDCK OS illuminées en lumière bleue, est bien lié à l'activation de Src.

1.2.2 Src à la membrane *vs.* Src cytoplasmique

Nous avons réalisé l'expérience d'activation transitoire avec une autre lignée cellulaire photosensible, la lignée MDCK 656+654, pour laquelle l'OS ne peut être recruté à la membrane à cause de l'absence de CIBN (courbes violettes, Figure III.4). Nous observons que, lors de l'activation de Src, les cellules MDCK 656+654 présentent un faible gain en aire ($g_A \sim 1,1$) et en contractilité ($g_F \sim 1,2$), comparés à ceux des cellules MDCK OS. Ce résultat montre que le phénotype mécanique des cellules MDCK OS illuminées en lumière bleue nécessite le recrutement de Src à la membrane.

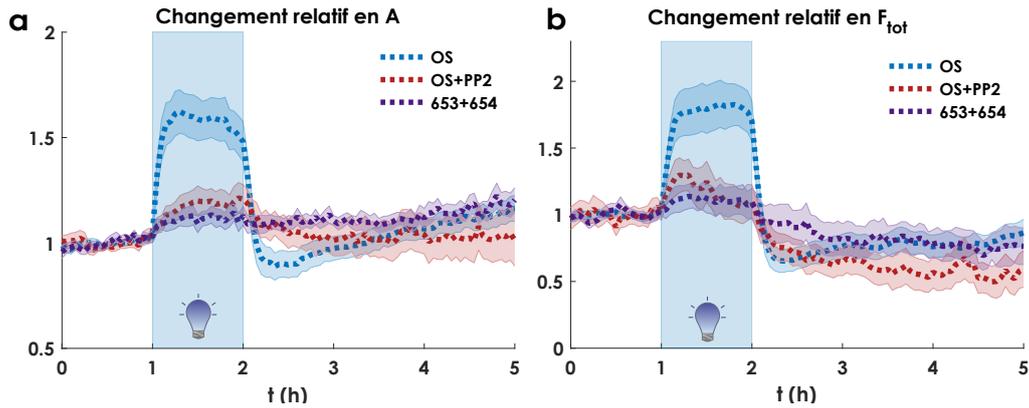


FIGURE III.4 – Le changement de phénotype mécanique des cellules MDCK OS photo-activées en lumière bleue est lié à l'activation de Src et à son recrutement à la membrane. Changement du phénotype mécanique de cellules MDCK OS (bleu, OS, n=71, N=8) en conditions standards, en présence d'un inhibiteur de Src, PP2 (rouge, OS+PP2, n=23, N=3) et de cellules MDCK 656+654 dépourvues de CIBN pour lesquelles le recrutement de Src à la membrane n'est pas possible (violet, 656+654, n=16, N=2), soumises à une activation de Src de 1 h, au cours du temps : (a) aire d'étalement (b) force totale, normalisées par leur valeur moyenne avant activation.

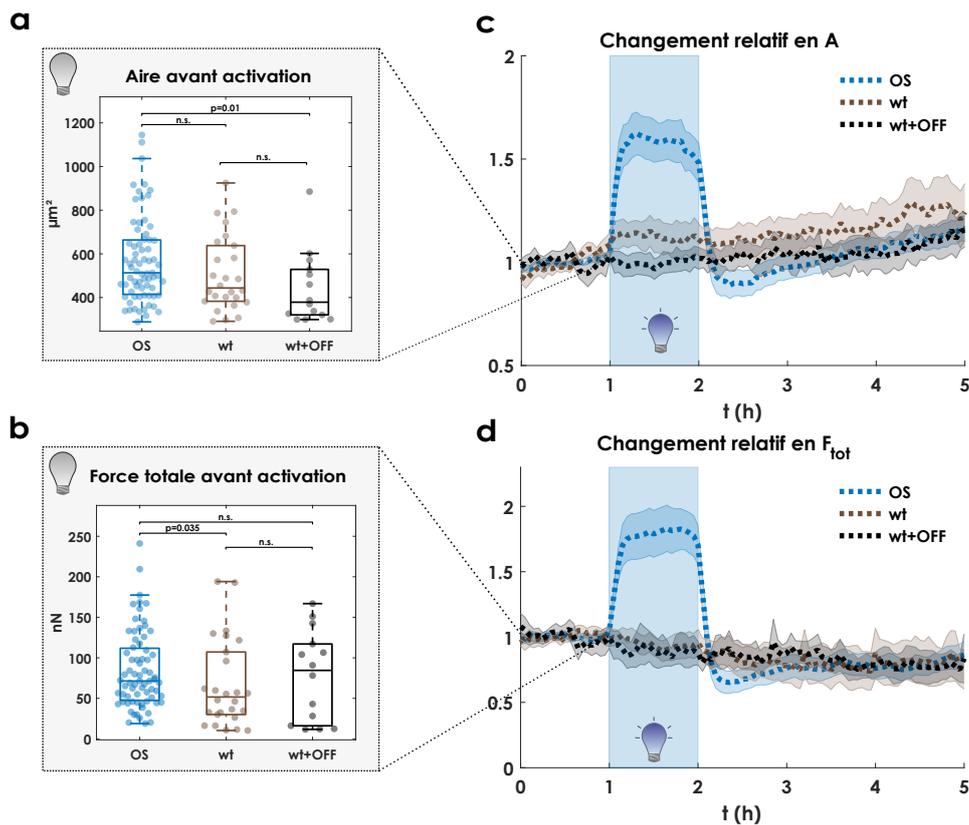


FIGURE III.5 – Effet de la lumière bleue sur le phénotype mécanique de cellules MDCK wt. Phénotype mécanique des cellules MDCK OS (OS, bleu, n=71, N=8), MDCK wt (wt, marron, cellules, n=26, N=3) soumises à une activation transitoire de Src de 1 h et MDCK wt, non illuminées en lumière bleue (wt+OFF, noir, n=14, N=2). (a-b) Phénotype mécanique des cellules, dans le noir (avant activation pour OS et wt) : aire (a) force totale (b). (c-d) Changement relatif du phénotype mécanique pour les trois conditions décrites en (a) : aire d'étalement (c) et force totale (d), normalisées par leur valeur moyenne avant activation.

1.2.3 Effet de la lumière bleue

Afin de tester l'effet de la lumière bleue, nous avons utilisé des cellules MDCK *wild type* (wt) non photo-sensibles et les avons soumises à la même séquence d'illumination en lumière bleue de 1 h décrite en Figure III.1 (a) (courbes marrons, Figure III.5).

Avant activation, nous remarquons que le phénotype mécanique des cellules MDCK OS diffère de celui des cellules MDCK wt : les cellules wt ont la même aire d'étalement mais sont moins contractiles que les cellules MDCK OS (Figure III.5 a,b). Cela suggère que la transfection des cellules MDCK avec la construction optoSrc modifie leur phénotype mécanique. Pendant l'activation, les cellules wt illuminées en lumière bleue ont un petit gain en étalement mais pas de gain en contractilité. Ce résultat indique que la lumière bleue seule, favorise l'étalement cellulaire mais n'a pas d'effet sur la contractilité cellulaire. De plus, nous remarquons que les cellules wt ont une contractilité qui diminue tout le temps, dès le début de l'expérience, qu'elles soient éclairées ou non en lumière bleue (Figure III.5 c,d). Cette baisse de contractilité naturelle au cours du temps est donc indépendante de l'illumination en lumière bleue, mais nous n'avons pas identifié son origine.

1.2.4 Effet des paramètres d'activation en lumière bleue

1.2.5 Effet de la puissance lumineuse

Afin de tester l'effet de la puissance de la lumière bleue sur la réponse des cellules Src-activées, nous avons soumis les cellules MDCK OS à la même séquence d'illumination en lumière bleue décrite en Figure III.1 (a) mais en divisant par 4 la puissance de la source en lumière bleue ($\sim 0,2$ mW, puissance mesurée après l'objectif).

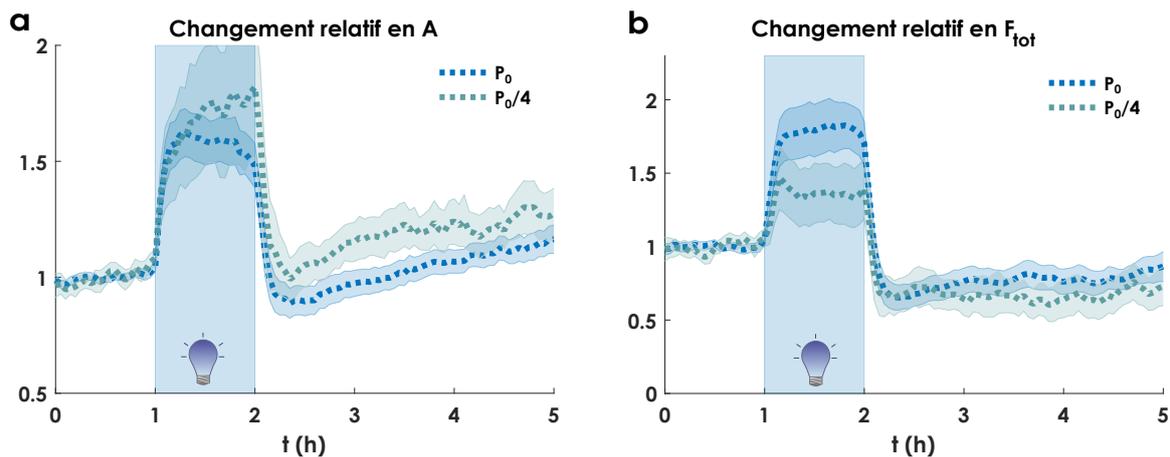


FIGURE III.6 – Influence de la puissance de la source de lumière bleue sur le phénotype mécanique des cellules Src-activées. Changement du phénotype mécanique de cellules MDCK OS soumises à une activation de Src de 1 h avec une puissance en lumière bleue $P_0 \sim 0,2$ mW (P_0 , courbes bleues, $n=71$, $N=8$) ou $P_0/4$ ($P_0/4$, courbes vertes, $n=17$, $N=2$) : (a) aire d'étalement (b) force totale, normalisées par leur valeurs moyennes avant activation.

Lors de l'activation de Src, les cellules s'étaient et sont plus contractiles mais les gains maximaux

en aire et en force sont différents : le gain en aire est légèrement supérieur ($g_A \sim 1,8$) et le gain en contractilité est significativement plus faible ($g_F \sim 1,4$) lorsque la puissance est plus faible. Cela montre que la puissance en lumière bleue a un plus grand impact sur la contractilité que sur l'étalement des cellules Src-activées.

Après activation, les cellules illuminées avec une puissance en lumière bleue de $P_0/4$ reviennent à une aire d'étalement similaire à celles qu'elles avaient avant activation, contrairement aux cellules illuminées à P_0 . Les cellules illuminées à $P_0/4$ exhibent une perte en force similaire à celle obtenue pour les cellules activées avec une puissance de P_0 . Nous vérifions ainsi que la perte en contractilité post-activation n'est pas liée à une puissance trop importante de la lumière bleue.

1.2.6 Effet de la durée d'activation de Src

Nous avons ensuite étudié l'effet de la durée totale d'activation de Src (ΔT) sur le phénotype mécanique des cellules en réalisant des activations d'une durée de 6 min, 15 min, 30 min ou 2 h (Figure III.7).

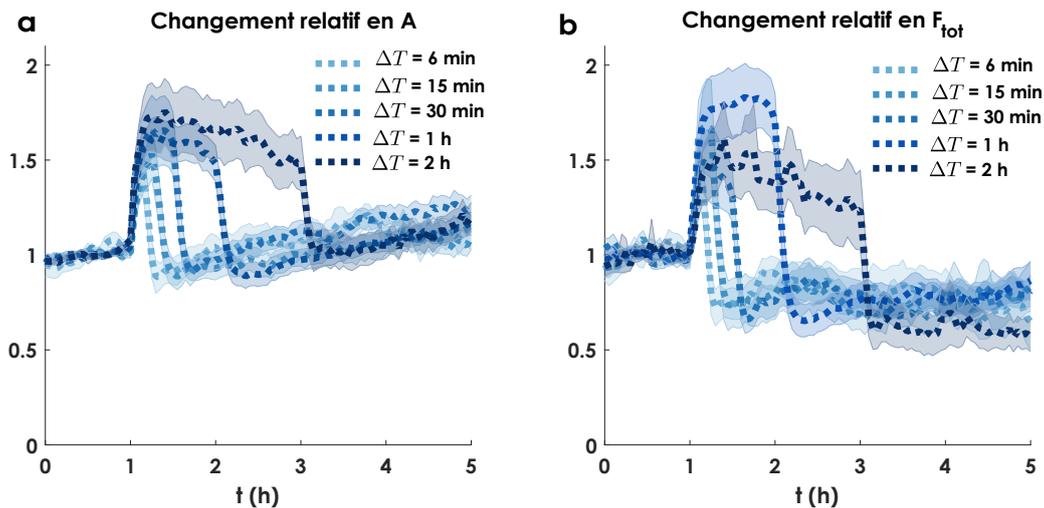


FIGURE III.7 – **Influence de la durée d'activation de Src sur le phénotype mécanique des cellules Src-activées** Changement du phénotype mécanique en aire d'étalement (a) et en force totale (b) des cellules MDCK OS soumises à différentes durées d'activation de Src (courbes allant du bleu clair au bleu foncé : 6 min ($n=22$, $N=2$), 15 min ($n=45$, $N=3$), 30 min ($n=50$, $N=5$), 1 h ($n=71$, $N=8$) et 2 h ($n=35$, $N=5$)).

Ces expériences permettent de "disséquer" la cinétique de la réponse mécanique des cellules : pour une durée d'activation de 6 min, les gains maximaux en aire et en contractilité mesurés pour une durée d'activation de 1 h ne sont pas atteints. Pour une durée d'activation de 15 min ou 30 min, les gains en aire et en contractilité des cellules Src-activées sont similaires à ceux obtenus pour une activation d'une heure. Cela signifie que les cellules MDCK OS mettent entre 6 et 15 min pour atteindre un état mécanique stable en réponse à l'activation de Src. De manière surprenante, pour une durée totale d'activation de 2 h, le gain en F_{tot} de 1,8 n'est pas atteint et ne se maintient pas (Figure III.7).

Pour toutes les périodes d'activation testées, nous observons une perte mécanique entre l'état avant

activation et l'état post-activation : il semble que la perte mécanique n'est pas liée à la durée totale d'activation de Src (Figure III.7).

1.3 Caractérisation AFM du phénotype mécanique : mesure du volume et de la rigidité corticale

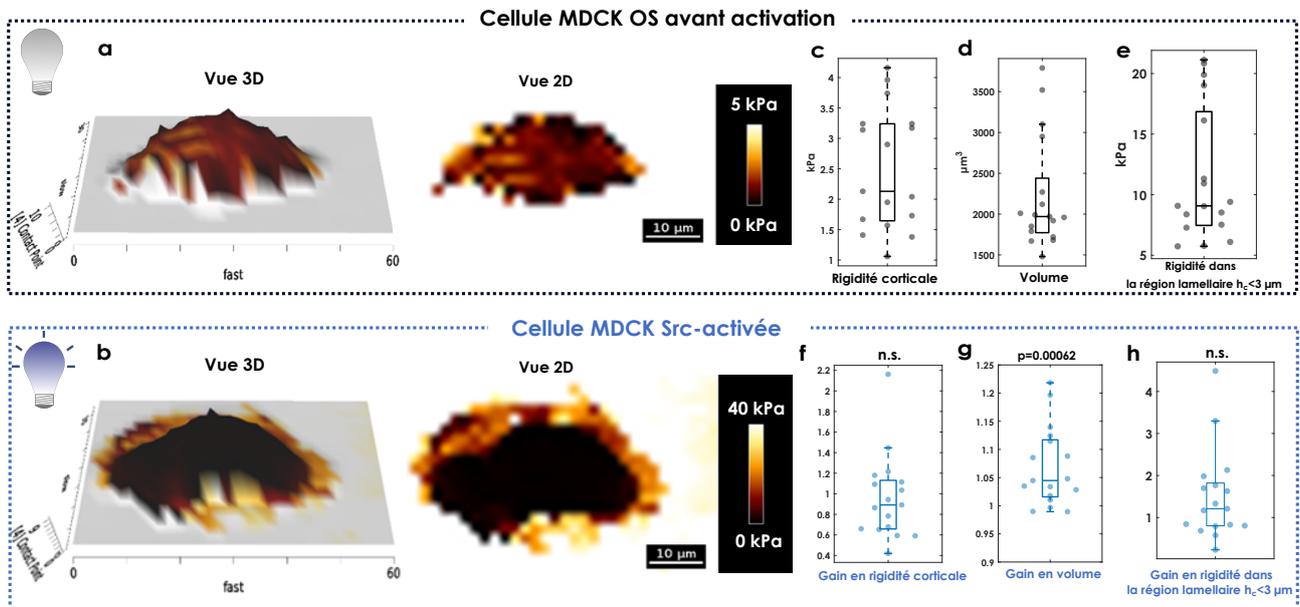


FIGURE III.8 – **Rigidité corticale et volume des cellules Src-activées** Mesures AFM de cellules MDCK OS (n=17, N=4) déposées sur des gels de PAA de 10 kPa (a-b) Cartographie de la rigidité d'une cellule MDCK OS (la couleur code pour la valeur de rigidité en kPa) représentée en 3D (Vue 3D, à gauche) et en 2D (Vue 2D, à droite) avant l'activation de Src (a) et pendant l'activation de Src (b). (c-e) Mesure de la rigidité et du volume des cellules MDCK OS dans le noir : moyenne géométrique de la rigidité corticale (c), volume cellulaire (d) et valeur moyenne de la rigidité dans la partie lamellaire des cellules ($h \leq 3 \mu\text{m}$) (e). (f-h) Mesure du gain en rigidité et en volume des cellules MDCK OS Src-activées : gain en rigidité corticale (f), gain en volume (g) et gain en rigidité dans la partie lamellaire des cellules ($h \leq 3 \mu\text{m}$) (h). Pour (e),(f),(g), la valeur de p ou 'n.s.' indique le résultat du test U de Mann-Whitney entre la distribution présentée et une distribution de même taille ne contenant que des 1.

Pour compléter notre étude du phénotype mécanique des cellules Src-activées, nous avons mesuré la rigidité et le volume de cellules MDCK OS déposées sur des gels de PAA de 10 kPa avant activation et après ~ 10 min d'activation de Src, en utilisant un AFM¹. La cartographie de rigidités montre que les valeurs de rigidités sont plus petites au centre de la cellule que dans la région périphérique ($h \leq 3 \mu\text{m}$, région dite "lamellaire") où elles sont maximales (Figure III.8 a) : nous avons donc choisi de mesurer la rigidité de la cellule à l'échelle globale (moyenne de la rigidité corticale) et dans la partie lamellaire.

Avant activation, la rigidité à l'échelle de la cellule entière est en moyenne de 2,5 kPa (Figure III.8 c),

1. Les mesures et les analyses ont été réalisées avec Maxime Liboz et Clément Campillo (Laboratoire LAMBE, Université d'Evry)

comparable aux valeurs trouvées dans la littérature : ~ 1 kPa dans une monocouche de MDCK peu dense (Nehls *et al.*, 2019). Dans la région lamellaire, nous mesurons une rigidité plus grande, elle est de 11,5 kPa en moyenne (Figure III.8 e). Avant activation, le volume moyen des cellules est de $2220 \mu\text{m}^3$ pour les cellules MDCK OS (Figure III.8 d). Après ~ 10 min d'activation, nous avons mesuré le gain en rigidité et en volume (valeurs pendant l'activation divisées par les moyennes avant activation) :

- Les cellules Src-activées ne modifient pas de façon significative leur rigidité globale ni leur rigidité dans la partie lamellaire (Figure III.8 b,f,h)
- Les cellules Src-activées sont en moyenne légèrement plus volumineuses que les cellules normales : augmentation moyenne en volume de 7 % (Figure III.8 g).

En conclusion, ces mesures d'AFM restent préliminaires et mériteraient de plus amples investigations. En particulier, la rigidité mesurée dans la partie lamellaire, proche de celle du substrat, doit être confirmée.

1.4 Effet du type cellulaire

Enfin, nous voulions savoir si le changement de phénotype mécanique associé à l'activation de Src et observé avec des cellules épithéliales MDCK était universel. Pour cela, nous avons exprimé l'optoSrc dans des fibroblastes de souris MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*).

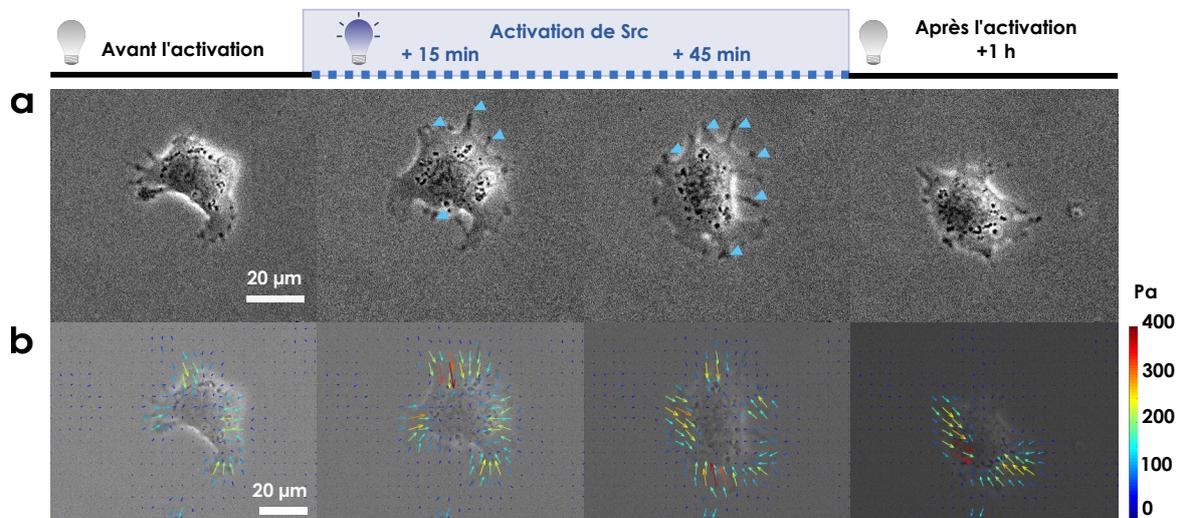


FIGURE III.9 – **Phénotype mécanique des cellules MEF Src-activées (a-b)** Images en contraste de phase d'une cellule MEF OS isolée soumise à une activation transitoire de Src de 1 h à quatre points de temps : avant l'activation, 15 et 45 min après le début de l'activation et 1 h après la fin de l'activation de Src (a) et avec les forces de traction surperposées (flèches) (b), leur amplitude (Pascal) est codée en couleur. De nombreux filopodes se forment suite à l'activation de Src (haut, flèches bleues).

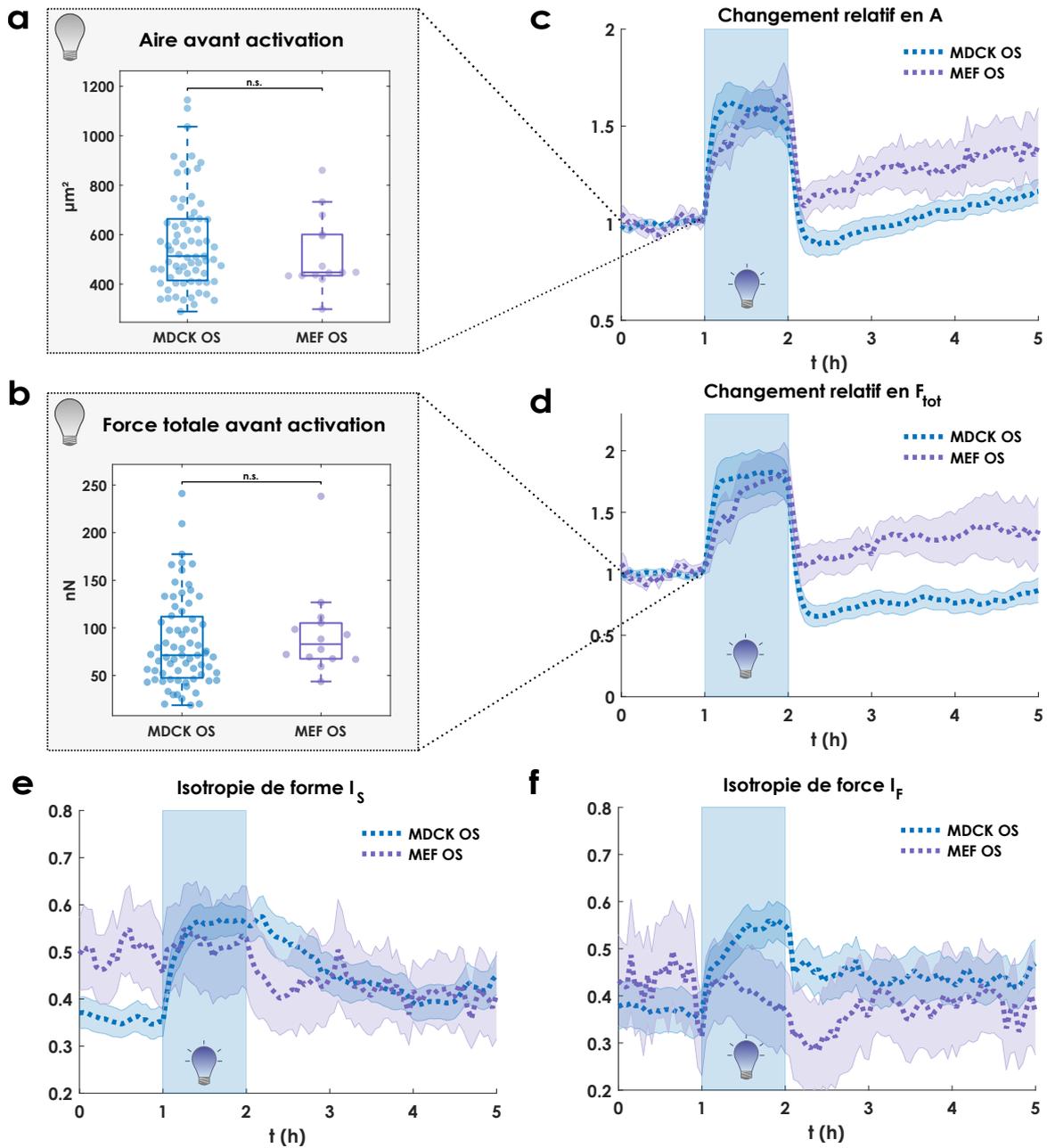


FIGURE III.10 – **Phénotype mécanique des cellules MEF Src-activées** Comparaison du phénotype mécanique de cellules MDCK OS (bleu, MDCK OS, $n=71$, $N=8$) et MEF OS (violet, MEF OS, $n=14$, $N=1$). Avant activation, aire moyenne (a) et force totale moyenne (b). (c-f) Changement de phénotype mécanique au cours du temps : aire (c), force (d), isotropie de forme (e) et isotropie de force (f). L'aire et la force ont été normalisées par leur valeurs moyennes d'avant activation.

Avant activation, l'aire d'étalement et la force totale sont similaires pour les MDCK OS et MEF OS (Figure III.10 a,b) mais les fibroblastes présentent une isotropie de forme et de force plus grandes que celles des cellules épithéliales (Figure III.10 e,f). Pendant l'activation de Src, les cellules MEF OS sont plus contractiles qu'avant activation et s'étalent en formant un lamellipode mais aussi de nombreux filopodes (Figure III.9 a, flèches bleues). Les protrusions membranaires générées lors de l'activation

de Src diffèrent donc selon le type cellulaire : plus de filopodes pour les cellules de type fibroblaste, un plus grand lamellipode pour les cellules épithéliales. De façon remarquable, les gains en aire et en force atteints après 1 h d'activation sont similaires à ceux des cellules MDCK OS (Figure III.10 c,d). En revanche les cellules MEF optoSrc ne présentent pas de changement notable de l'isotropie de forme et de force pendant l'activation de Src (Figure III.10 e,f). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les cellules MEF OS ont, déjà avant activation, une forme et une distribution des forces plus isotropes que les cellules MDCK OS. De façon intéressante, nous remarquons que les cellules MEF optoSrc ne présentent pas de perte en force totale, post-activation. Cette observation suggère que le changement en isotropie de forme ou en isotropie de force subi lors de l'activation de Src pourrait jouer un rôle dans la perte mécanique post-activation.

Dans cette partie, nous avons décrit le phénotype mécanique des cellules Src-activées. Nous avons montré que l'activation de Src est associée à un étalement cellulaire, une augmentation de la contractilité et de l'isotropie de force et de l'isotropie de forme cellulaire. Nous avons également montré que les cellules Src-activées ont un volume légèrement plus grand que les cellules normales mais ne modifient pas leur rigidité de façon significative. Enfin, nos résultats suggèrent que le changement de phénotype mécanique en étalement et en force serait indépendant du type cellulaire. Dans la partie suivante, nous étudions les voies de signalisation associées à ce changement de phénotype mécanique.

2 Mécanismes moléculaires à l'origine du phénotype mécanique

Dans cette partie, nous cherchons à identifier les acteurs moléculaires impliqués dans le changement de phénotype mécanique des cellules Src-activées. Pour cela, nous utilisons une approche pharmacologique : les inhibiteurs sont ajoutés quelques heures avant le début de la séquence d'illumination en lumière bleue.

- La comparaison des phénotypes mécaniques des cellules avant l'activation (lorsqu'elles sont dans le noir) avec ou sans inhibiteur permet ainsi d'évaluer l'impact de l'inhibiteur et de vérifier son efficacité.
- La comparaison des gains en aire et en contractilité pendant l'activation de Src avec et sans inhibiteur permet de déterminer le rôle du ou des cibles moléculaire(s) inhibée(s) dans le changement de phénotype des cellules Src-activées.

Dans un premier temps, nous étudions les voies de signalisation à l'origine de l'étalement des cellules Src-activées puis nous nous intéressons à différentes voies de signalisation contractiles et étudions leur possible rôle dans le gain en contractilité arboré par les cellules Src-activées.

2.1 Acteurs impliqués dans l'étalement des cellules Src-activées

L'activation de Src dans les cellules MDCK OS induit un étalement des cellules *via* la formation de lamellipodes (Figure III.1 b), phénotype déjà décrit dans la littérature (Karginov *et al.*, 2014; Klomp *et al.*, 2016; Shaaya *et al.*, 2020; Kerjouan *et al.*, 2021). Ces protrusions membranaires sont régulées par le complexe protéique Arp2/3 lié à l'actine, lui-même sous contrôle de l'activation de Rac1 (Steffen *et al.*, 2014).

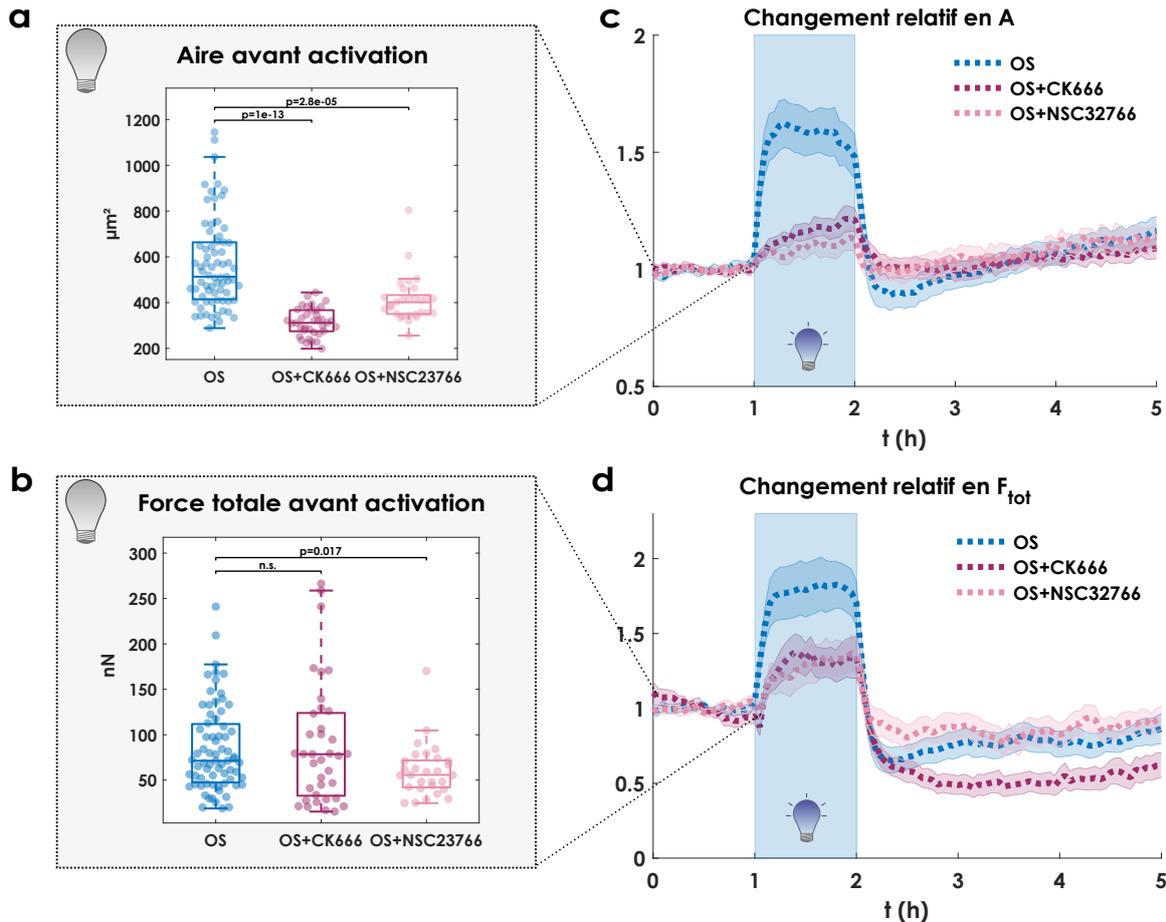


FIGURE III.11 – L'étalement des cellules Src-activées est lié à l'activation de la voie Rac1-Arp2/3 (a-b) Phénotype mécanique de cellules MDCK OS dans un milieu de culture standard (bleu, OS, $n=71$, $N=8$), ou en présence d'un inhibiteur d'Arp 2/3, CK666 (rose foncé, OS + CK666, $n=37$, $N=4$) ou d'un inhibiteur de Rac1, NSC23766 (rose clair, OS+NSC23766, $n=29$, $N=2$), avant activation : aire (a) et force totale (b). (c-d) Changement de phénotype mécanique des cellules soumises à une activation de Src d'1 h pour les trois conditions décrites en a,b : aire (c) et force totale (d), normalisées par leur valeur moyenne avant activation.

Pour évaluer le rôle des protéines Arp 2/3 et Rac1 dans l'étalement des cellules Src-activées, nous avons utilisé deux inhibiteurs : CK666 pour inhiber Arp 2/3 (Hetrick *et al.*, 2013) et NCS23766 pour inhiber Rac1 (Gao *et al.*, 2004) (Tables II.7 et II.6). Dans l'obscurité, l'ajout de ces inhibiteurs réduit significativement l'aire des cellules (Figure III.11 a), démontrant leur efficacité. Lors de l'activation de Src, leur présence réduit l'étalement des cellules (Figure III.11 c). Ce résultat montre que l'étalement

des cellules Src-activées dépend de l'activation de la voie de signalisation Rac1-Arp2/3, comme suggéré dans la littérature (Servitja *et al.*, 2003; Klomp *et al.*, 2016).

Avant activation, l'inhibition de Arp2/3 n'a pas d'effet sur la contractilité des cellules alors que l'inhibition de Rac1 la diminue (Figure III.11 b), cohérent avec le fait que Rac1 est impliqué dans la régulation des forces de traction (Hu *et al.*, 2022). Notons également qu'en présence de CK666 et de NSC23766, le gain en contractilité des cellules Src-activées est retardé et réduit (Figure III.11 d). Ce résultat suggère que la formation d'un lamellipode est nécessaire pour avoir un gain en contractilité maximal. Le fait qu'étalement et contractilité soient tous les deux affectés par ces inhibiteurs fait supposer que ces deux aspects sont couplés.

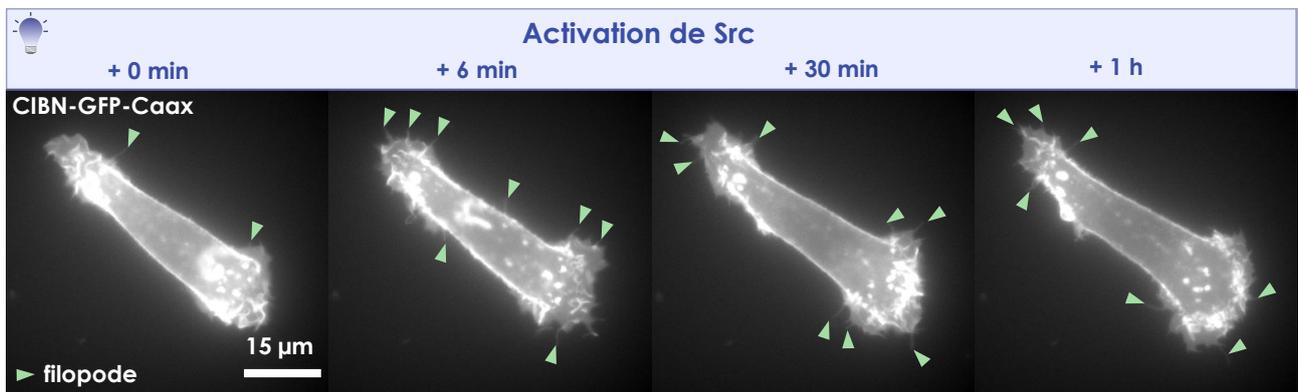


FIGURE III.12 – **Formation de filopodes dans les cellules MDCK Src-activées** Séquence temporelle d'images en épifluorescence (marquage GFP de Caax-CIBN) d'une cellule MDCK OS soumise à une activation de Src de 1h, montrant la formation de filopodes (indiqués par les flèches vertes) pendant l'activation de Src (après 6 min, 30 min et 1 h d'activation). L'image à (+0 min) correspond à la situation avant activation de Src.

Comme déjà décrit dans la littérature (Karginov *et al.*, 2014), l'activation de Src induit également la formation de filopodes (Figure III.12). Nous avons donc étudié le principal acteur moléculaire impliqué dans la formation de ces filopodes, mDia, en l'inhibant avec du SMIFH2 (Rizvi *et al.*, 2009) (Table II.6). L'ajout de cet inhibiteur a pour effet de diminuer l'aire et la contractilité des cellules avant activation (Figure III.13 a,b). En présence de cet inhibiteur, les gains maximaux en aire et en contractilité des cellules Src-activées atteignent quasiment le même niveau que sans l'inhibiteur (Figure III.13 c,d). En revanche, on remarque une chute rapide du gain en aire, certainement dû au fait que certaines cellules deviennent rondes : il y a un phénomène d'arrondissement des cellules pendant l'activation de Src (Figure III.13 c,e). Cette dé-adhésion entraîne également une perte importante du gain en contractilité (Figure III.13 d). Cela montre que mDia est fondamental pour maintenir le phénotype mécanique des cellules Src-activées, en particulier pour stabiliser l'étalement des cellules.

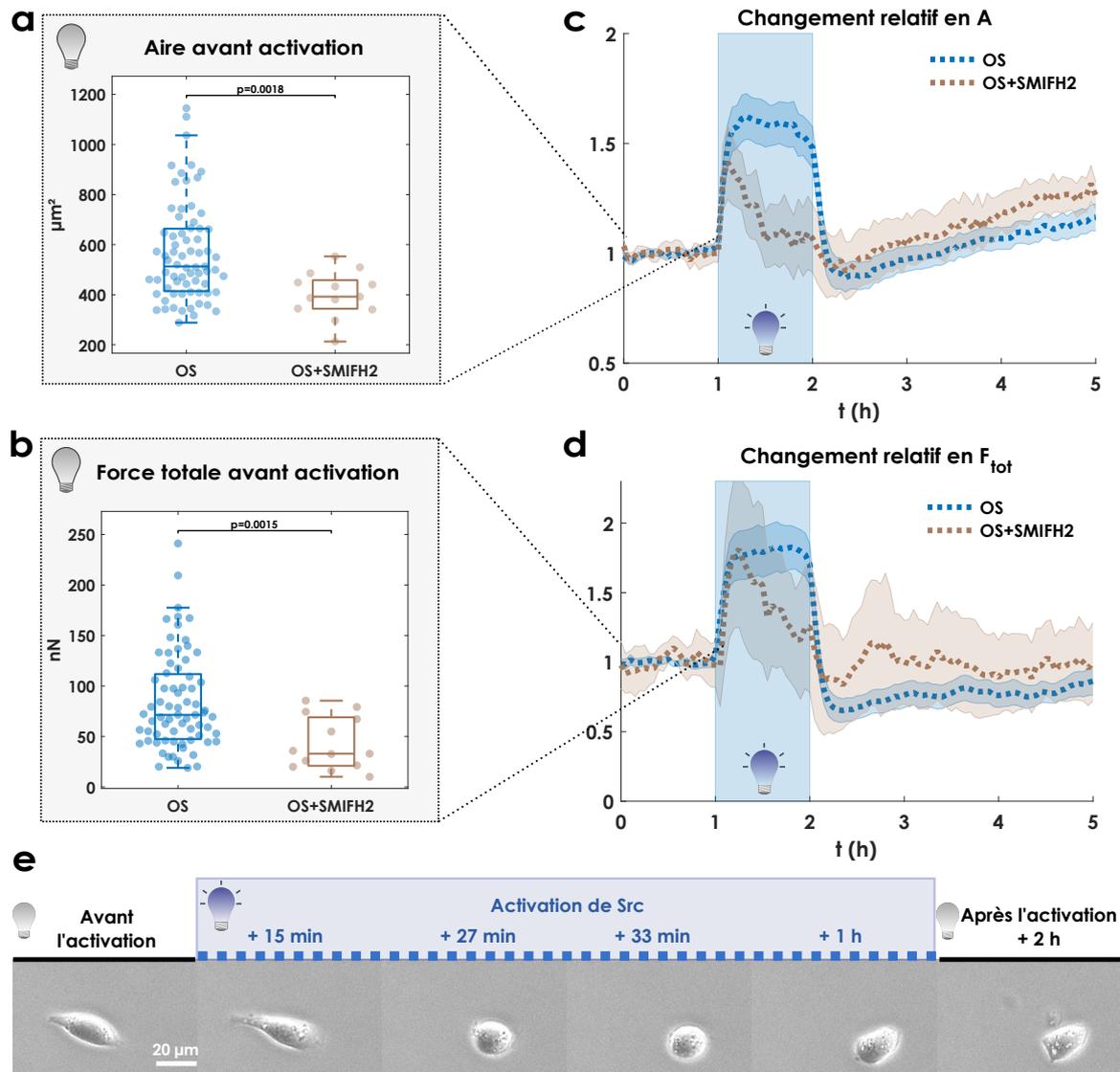


FIGURE III.13 – Rôle de mDia dans l'étalement des cellules Src-activées (a-b) Phénotype mécanique de cellules MDCK OS dans un milieu de culture standard (bleu, OS, $n=71$, $N=8$), ou en présence d'un inhibiteur de mDia, SMIFH2 (marron, OS+SMIFH2, $n=13$, $N=1$) avant activation : aire (a) et force totale (b). (c-d) Changement de phénotype mécanique des cellules soumises à une activation de Src d'1 h pour les deux conditions décrites en (a,b) : aire (c) et force totale (d), normalisées par leur valeur moyenne avant activation. (e) Images en contraste de phase à différents points de temps de la séquence d'activation montrant une cellule MDCK OS s'arrondissant pendant l'activation de Src, en présence d'un inhibiteur de mDia, SMIFH2.

2.2 Acteurs impliqués dans l'augmentation de contractilité des cellules Src-activées

Comme décrit dans la littérature, l'activation de Src est responsable d'une augmentation des forces de traction : Polackwich *et al.* ont également mesuré une augmentation de 1,5 fois de la force totale pour des cellules épithéliales cancéreuses MDA231 exprimant un Src constitutivement actif, par rapport aux cellules normales, dans un environnement 3D de collagène (Polackwich *et al.*, 2013). Cependant, les

mécanismes moléculaires à l'origine d'une telle augmentation de force n'ont pas été identifiés. Dans cette partie, nous nous lançons dans une investigation des différentes voies de contractilité cellulaire pouvant expliquer le gain en contractilité des cellules Src-activées.

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la contractilité des cellules. Citons les trois principales voies de signalisation pouvant phosphoryler les myosines II, actrices principales de la contractilité cellulaire. Ces voies constituent donc des candidates pouvant participer au gain en contractilité des cellules Src-activées. Il s'agit des voies :

- RhoA/ROCK/myosines II
- Cdc42/MRCK/myosines II
- MLCK/myosines II

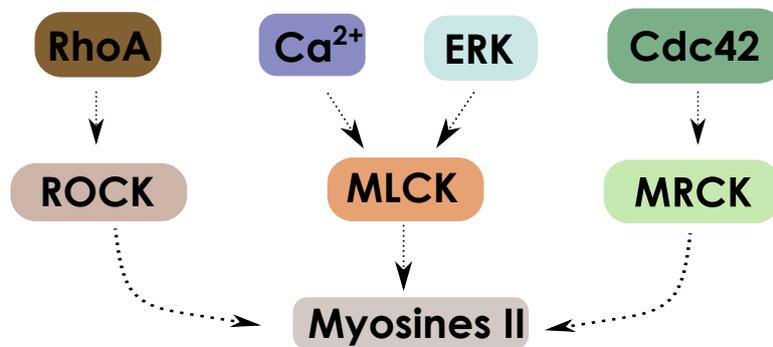


FIGURE III.14 – Voies de signalisation étudiées dans ce manuscrit, à l'origine de la phosphorylation des myosines II : RhoA/ROCK (à gauche), MLCK activée par un flux de calcium ou par l'activation de ERK (au centre), Cdc42/MRCK (à droite).

2.2.1 Inhibition des myosines II

Nous avons tout d'abord inhibé partiellement les myosines II en utilisant la para-nitro blebbistatine ("pnbb"), une version moins phototoxique de la blebbistatine (Képiró *et al.*, 2014) (Tables II.7 et II.6). Cet inhibiteur réduit la contractilité des cellules sans impacter leur étalement avant l'activation de Src (Figure III.15 a,b). De manière surprenante, en présence de pnbb, les cellules activées par Src présentent toujours un gain de contractilité au début de l'activation de Src mais ne sont pas capables de le maintenir (Figure III.15 d), ce qui suggère que la myosine II joue un rôle dans le maintien d'une contractilité élevée plutôt que dans son établissement, lorsque Src est activée. De même, en présence de pnbb, le gain en étalement des cellules Src-activées est plus faible et n'est pas maintenu dans le temps.

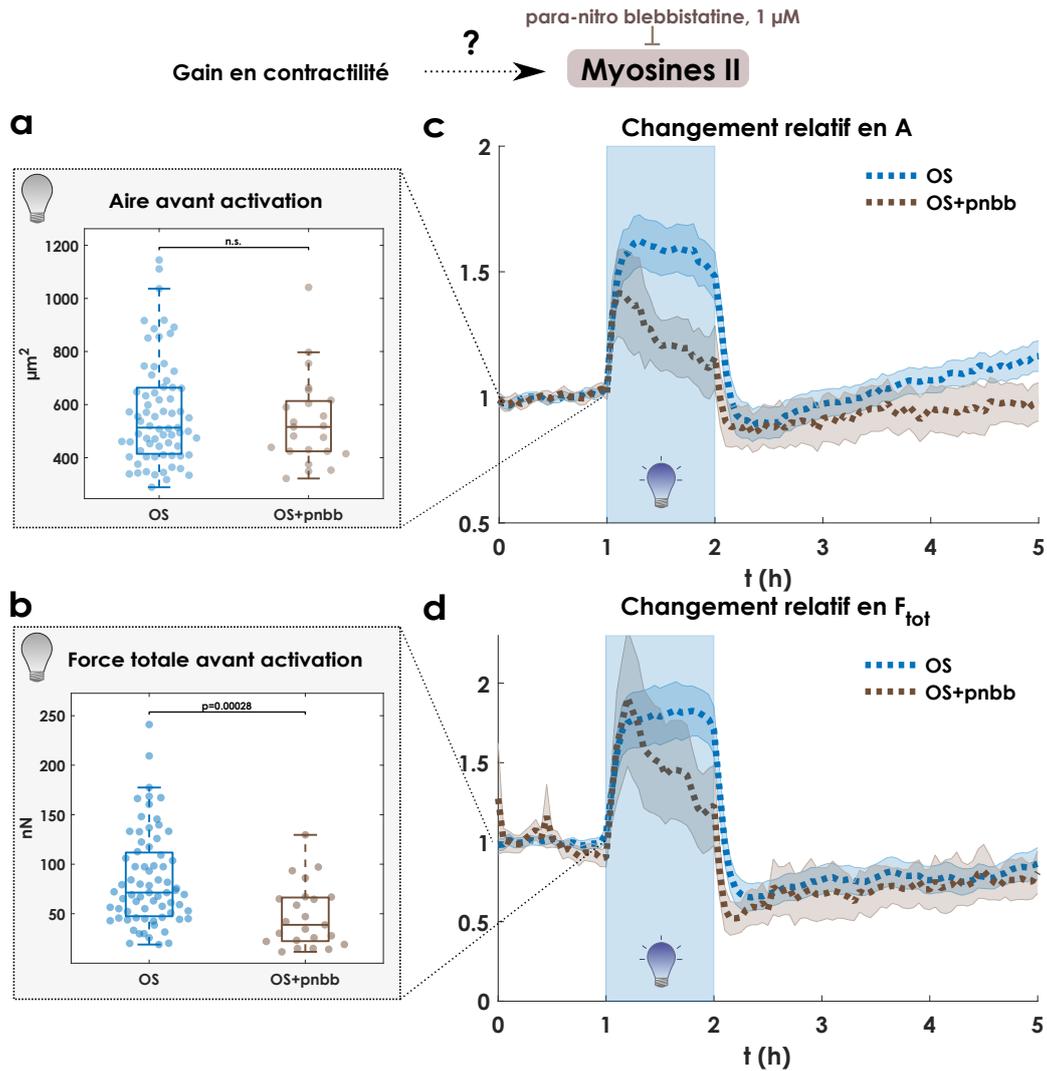


FIGURE III.15 – Rôle des myosines II dans le phénotype mécanique des cellules Src-activées (a-b) Phénotype mécanique de cellules MDCK OS dans un milieu de culture standard (bleu, OS, n=71, N=8), ou en présence d'un inhibiteur des myosines II, la para-nitro blebbistatine (marron, OS+pnbb, n=23, N=3) avant activation : aire (a) et force totale (b). (c-d) Changement de phénotype mécanique au cours du temps des cellules, soumises à une activation de Src d'1 h, pour les deux conditions décrites en (a,b) : aire (c) et force totale (d), normalisées par leur valeur moyenne avant activation.

2.2.2 Voie de contractilité RhoA/ROCK

Nous avons ensuite ciblé la voie contractile classique RhoA/ROCK, soit en inhibant ROCK avec l'ajout de Y27632 (Ishizaki T *et al.*, 2000), soit en inhibant RhoA avec l'ajout de C3 transférase (Aktories *et al.*, 1989) (Tables II.7 et II.6). Dans l'obscurité, l'utilisation de l'un de ces inhibiteurs diminue à la fois la contractilité des cellules et l'aire des cellules (Figure III.16 a,b). De façon remarquable, lorsque Src est activée, en présence de ces inhibiteurs, les gains en aire et en force des cellules sont similaires à ceux observés sans inhibiteur (Figure III.16 c,d). Ces résultats surprenants au premier abord, montrent que la voie de contractilité RhoA/ROCK n'est pas impliquée dans le gain en contractilité

associé à l'activation de Src.

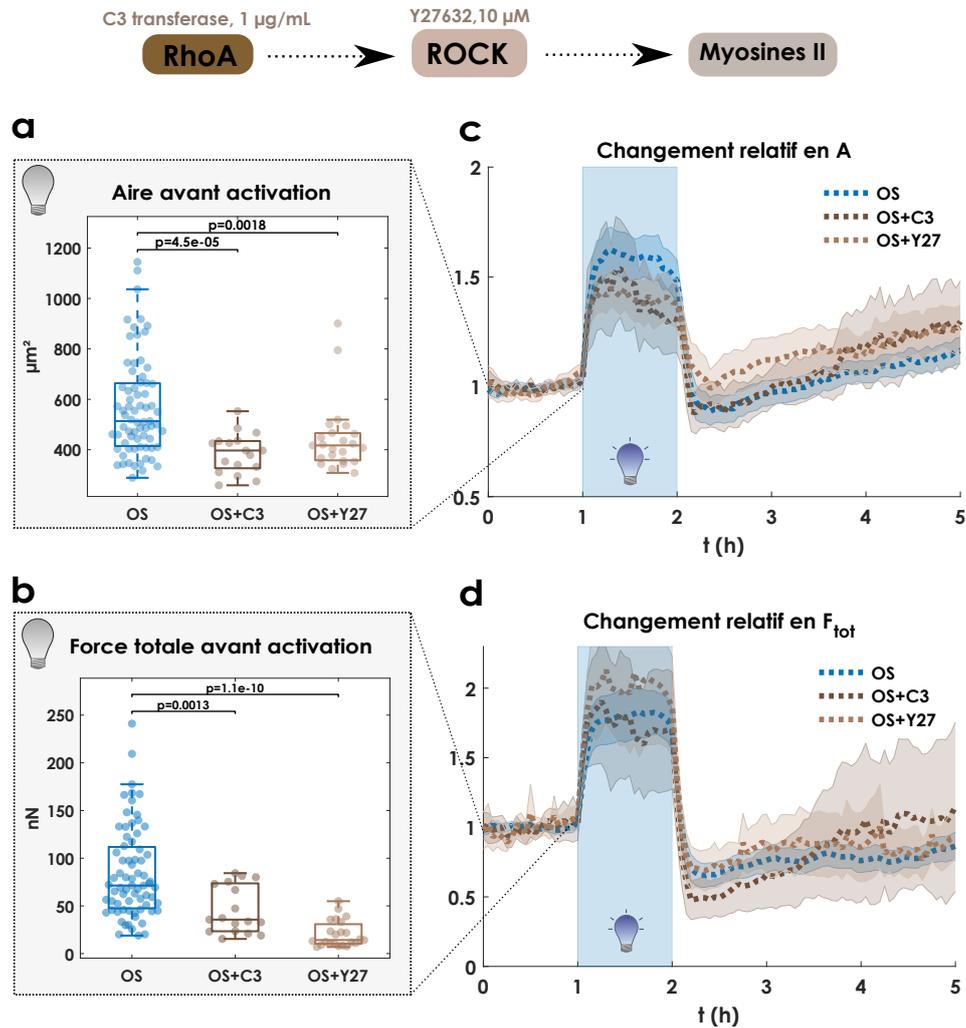


FIGURE III.16 – Le gain en contractilité des cellules Src-activées est RhoA-ROCK indépendant (a-b) Phénotype mécanique de cellules MDCK OS dans un milieu de culture standard (bleu, OS, n=71, N=8), ou en présence d'un inhibiteur de RhoA, C3 transferase (marron foncé, OS+C3, n=17, N=2) ou d'un inhibiteur de ROCK, Y27632 (marron clair, OS+Y27, n=23, N=3), avant activation : aire (a) et force totale (b). (c-d) Changement de phénotype mécanique des cellules soumises à une activation de Src d'1 h pour les trois conditions décrites en (a,b) : aire (c) et force totale (d), normalisées par leur valeur moyenne avant activation.

2.2.3 Voie de contractilité : MRCK/Cdc42

Lors de l'activation de Src, les cellules forment des filopodes (Figure III.12), comme décrit dans la littérature (Karginov *et al.*, 2014; Polackwich *et al.*, 2013). L'activation de Cdc42 est connue pour être impliquée dans la formation des filopodes (Kim *et al.*, 2008). La voie de signalisation Cdc42/MRCK apparaît donc comme une candidate de choix pour expliquer le gain en contractilité des cellules Src-activées. Nous avons d'abord utilisé un inhibiteur non spécifique de Cdc42, l'inhibiteur ML141 (Surviladze *et al.*, 2010) (Tables II.7 et II.6), qui inhibe à la fois Rac1 et Cdc42. En présence de cet inhibiteur, l'aire des cellules diminue et la contractilité est inchangée (Figure III.17 a,b). Suite

à l'activation de Src, en présence de ML141, le gain en contractilité et celui en aire restent faibles, suggérant un rôle important de Cdc42 dans le gain en aire et en contractilité des cellules Src-activées.

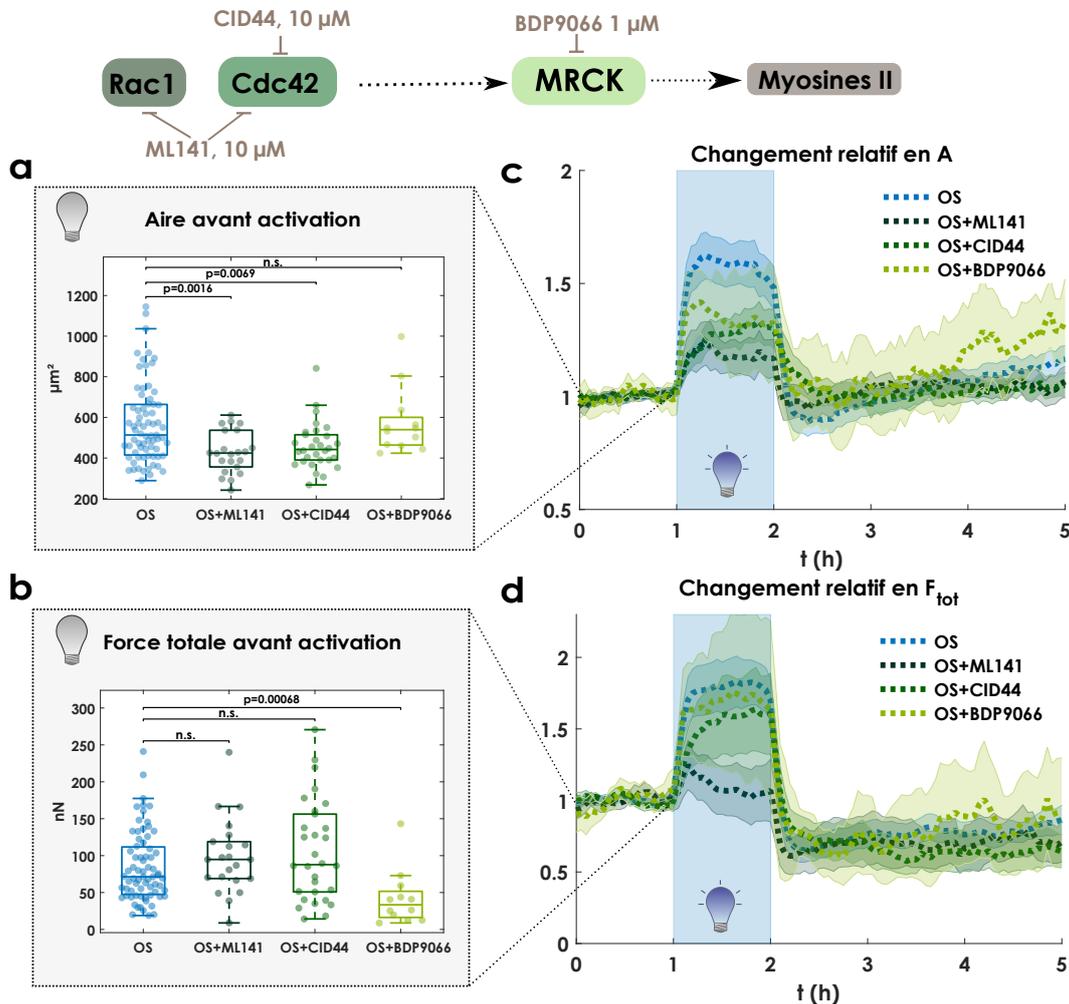


FIGURE III.17 – Rôle de la voie de signalisation Cdc42/MRCK dans le gain en contractilité des cellules Src-activées (a-b) Phénotype mécanique de cellules MDCK OS dans un milieu de culture standard (bleu, OS, $n=71$, $N=8$), ou en présence d'un inhibiteur de Cdc42 et de Rac1, ML141 (vert foncé, OS+ML141, $n=22$, $N=2$), ou d'un inhibiteur de Cdc42, CID44 (vert, OS+CID44, $n=30$, $N=2$), ou d'un inhibiteur de MRCK, BDP9066 (vert clair, OS+BDP9066, $n=12$, $N=1$) avant activation : aire (a) et force totale (b). (c-d) Changement de phénotype mécanique des cellules soumises à une activation de Src d'1 h pour les quatre conditions décrites en (a,b) : aire (c) et force totale (d), normalisées par la valeur moyenne avant activation.

Nous avons ensuite utilisé un inhibiteur spécifique de Cdc42, CID44 (Hong *et al.*, 2013) (Tables II.7 et II.6). En présence de cet inhibiteur, les cellules sont moins étalées mais la force totale est inchangée. Lors de l'activation de Src, en présence de CID44, le gain en aire est réduit et le gain en contractilité est légèrement plus faible comparé à la situation sans inhibiteur. Ce résultat suggère que le gain en contractilité des cellules Src-activées implique peu l'activation de Cdc42. Nous avons ensuite utilisé un inhibiteur de MRCK, la kinase en amont des myosines II qui est régulée par Cdc42, BDP9066 (Unbekandt *et al.*, 2018) (Tables II.7 et II.6). Dans le noir, cet inhibiteur diminue la contractilité des

cellules sans modifier leur aire. En revanche, lors de l'activation de Src, en présence de cet inhibiteur, nous observons que le gain en aire diminue mais que le gain en contractilité est inchangé comparé à la situation sans inhibiteur. Ces deux observations (pas de diminution du gain en contractilité en présence de CID44 et BDP9066) suggèrent que la voie de contractilité Cdc42/MRCK n'est pas impliquée dans la hausse de contractilité des cellules Src-activées.

2.2.4 Voie de contractilité MLCK

Nous nous sommes enfin intéressés à la voie de contractilité impliquant MLCK (Pfitzer, 2001). Pour inhiber MLCK de façon spécifique, nous avons utilisé ML7 (Saitoh *et al.*, 1987) (Tables II.7 et II.6) : ajouté au milieu de culture, cet inhibiteur de MLCK n'affecte pas la contractilité cellulaire mais diminue l'aire des cellules (Figure III.18 a,b), en accord avec la littérature (Beningo *et al.*, 2006; Hui *et al.*, 2015). De façon remarquable, en présence de ML7, les cellules Src-activées présentent un gain en aire réduit (Figure III.18 c) et un gain en force réduit aussi : il est même ~ 1 au début de l'activation et augmente après 20 min d'activation en restant plus faible que dans la situation sans inhibiteur (Figure III.18 d). Ce résultat suggère que le gain en contractilité associé à l'activation de Src est MLCK-dépendant.

Pour aller plus loin dans notre étude, nous avons voulu savoir comment Src activait MLCK. Une activation de ERK ou une augmentation de calcium intracellulaire peuvent activer MLCK (Tansey *et al.*, 1994). Dans une étude récente, Shaaya *et al.* ont d'ailleurs montré que ERK était activé de façon transitoire suite à l'activation de Src (Shaaya *et al.*, 2020). Nous avons donc inhibé ERK en utilisant un inhibiteur spécifique, FR180204 (Ohori *et al.*, 2005) (Tables II.7 et II.6). L'ajout de cet inhibiteur ne modifie pas le phénotype mécanique des cellules (Figure III.18 a,b). Lors de l'activation de Src, en présence de cet inhibiteur, le gain en aire est fortement diminué et le gain en contractilité est également impacté comparé à la situation sans inhibiteur (Figure III.18 a,b). Vu qu'il n'y a pas d'impact sur le phénotype mécanique avant activation, ces résultats sont difficiles à interpréter. Ils évoquent un possible rôle de ERK ou un inhibiteur pas assez efficace. Notons que l'inhibiteur n'a pas pu être utilisé à une concentration plus élevée car cela engendrait des morts cellulaires.

Nous avons ensuite exploré le rôle du calcium dans la réponse contractile des cellules Src-activées. Pour cela, nous avons utilisé un chélateur de calcium permettant de réduire la concentration de calcium intracellulaire, le BAPTA-AM (Tymianski *et al.*, 1994)(Tables II.7 et II.6). Ce chélateur de calcium ne modifie pas significativement le phénotype mécanique des cellules dans l'obscurité (Figure III.18 a,b). Cependant, la présence de BAPTA-AM supprime remarquablement le gain de force et réduit considérablement l'étalement des cellules Src-activées (Figure III.18 c,d). Ce résultat indique que l'activation de Src nécessite un flux de calcium intracellulaire, flux qui pourrait être à l'origine de l'activation de MLCK.

Pour identifier l'origine de ce flux intracellulaire, nous avons étudié différentes pistes.

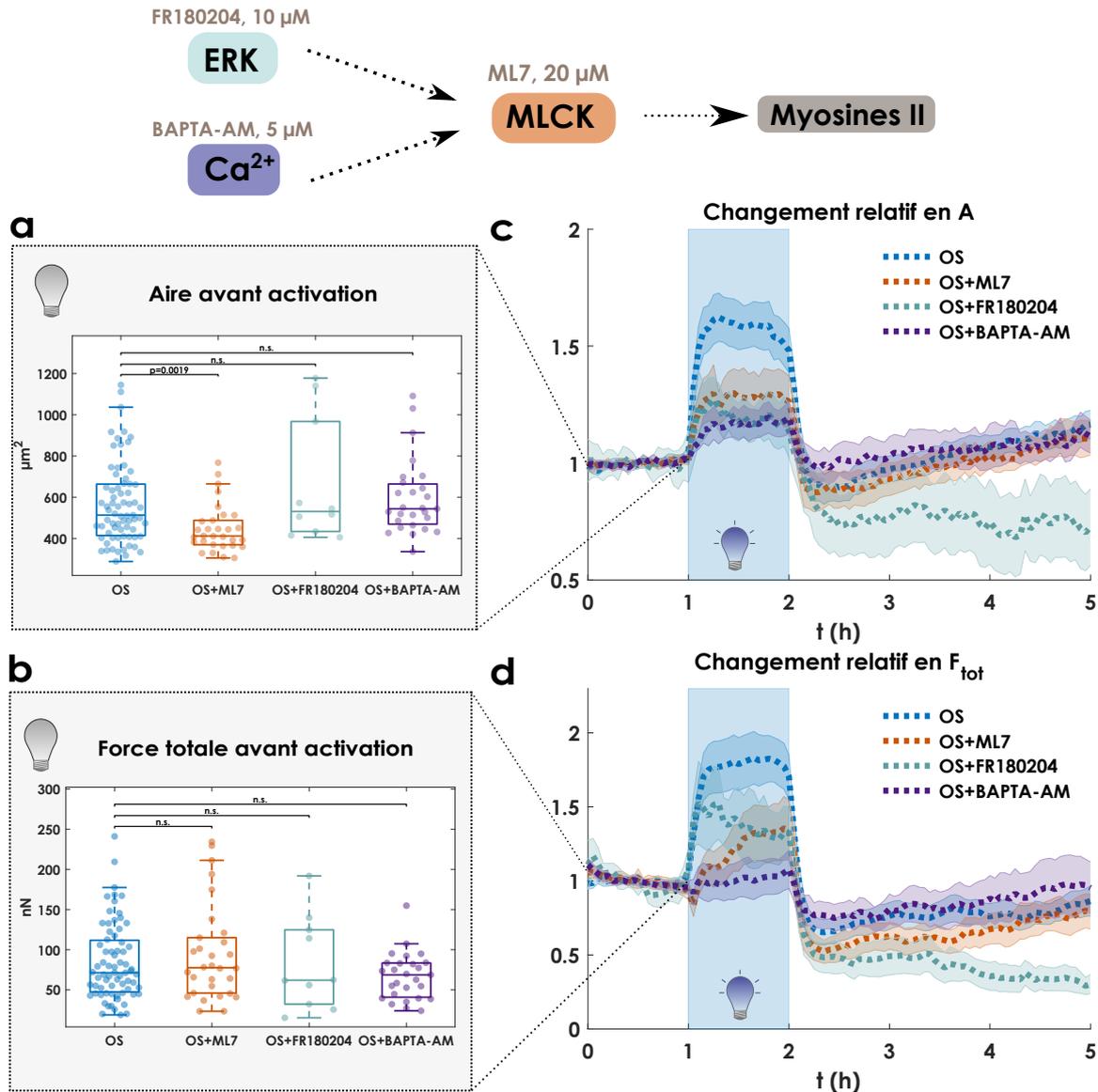


FIGURE III.18 – Le gain en contractilité des cellules Src-activées est MLCK-dépendant et repose sur une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (a-b) Phénotype mécanique de cellules MDCK OS dans un milieu de culture standard (bleu, OS, n=71, N=8), ou en présence d'un inhibiteur de MLCK, ML7 (orange, OS+ML7, n=30, N=2), ou d'un inhibiteur de ERK, FR180204 (turquoise, OS+FR180204, n=10, N=1), ou d'un chélateur de calcium, BAPTA-AM (violet, OS+BAPTA-AM, n=27, N=2) avant activation : aire (a) et force totale (b). (c-d) Changement de phénotype mécanique des cellules soumises à une activation de Src d'1 h pour les quatre conditions décrites en (a,b) : aire (c) et force totale (d), normalisées par leur valeur moyenne avant activation.

2.2.5 Origine du flux de calcium intracellulaire

La libération de flux de calcium joue un rôle clé dans la contractilité cellulaire (Clapham, 2007). Citons deux sources importantes de flux calcique, que nous avons étudié dans le cadre de cette étude :

- les canaux cationiques, au niveau de la membrane plasmique, qui permettent un flux de calcium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire
- la vidange du calcium du réticulum endoplasmique, qui possède deux types de canaux ioniques :

les récepteurs IP3 (inositol trisphosphate) et les récepteurs RyR (récepteurs de la ryanodine) (Woll & Van Petegem, 2022).

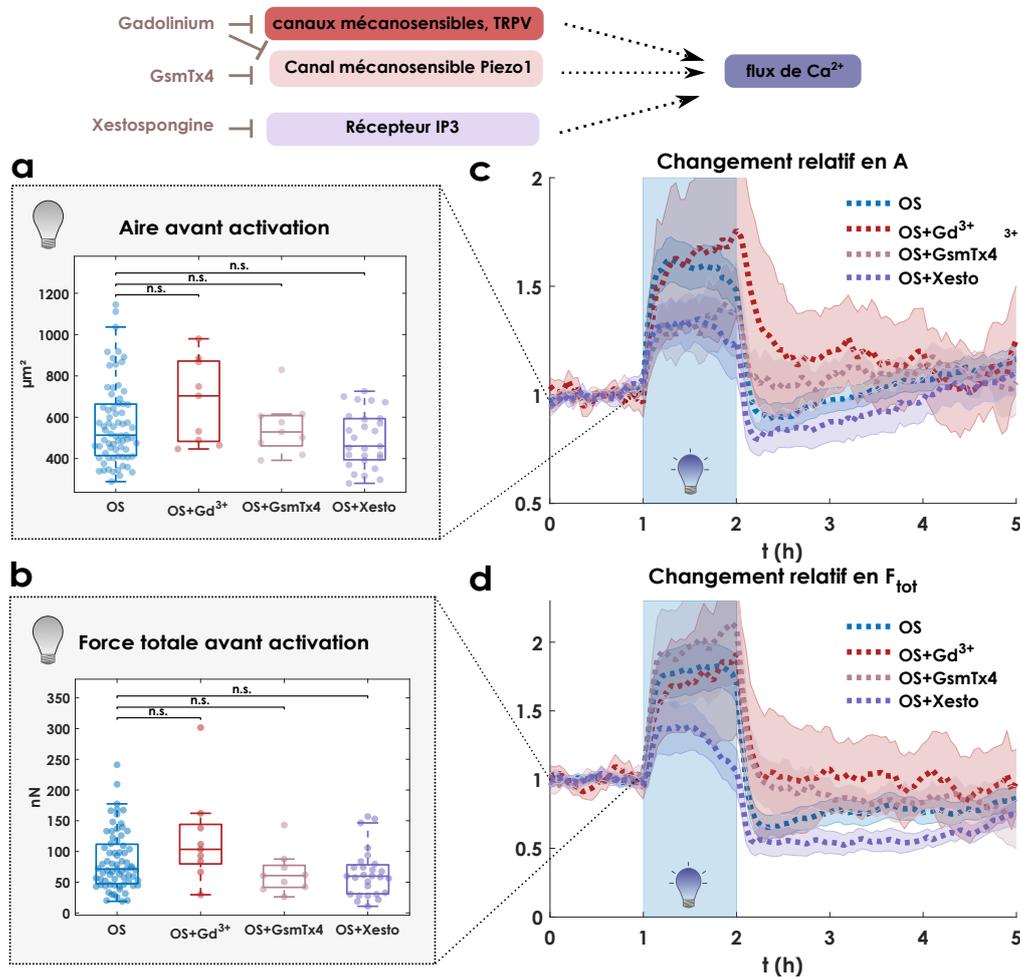


FIGURE III.19 – Le gain en contractilité des cellules Src-activées est indépendant des canaux mécanosensibles mais dépend de l'activité du récepteur IP3 (a-b) Phénotype mécanique de cellules MDCK OS dans un milieu de culture standard (bleu, OS, n=71, N=8), ou en présence d'un inhibiteur de canaux cationiques à spectre large, le gadolinium (rouge, OS+Gd³⁺, n=9, N=1), ou d'un inhibiteur de Piezo1, GsmTx4 (rose, OS+GsmTx4, n=9, N=1), ou d'un inhibiteur de IP3, la xestospongine (violet, OS+Xesto, n=27, N=2) avant activation : aire (a) et force totale (b). (c-d) Changement de phénotype mécanique des cellules soumises à une activation de Src d'1 h pour les quatre conditions décrites en (a,b) : aire (c) et force totale (d), normalisées par leur valeur moyenne avant activation. Notez que le petit n pour la condition OS+Gd³⁺ ne permet pas d'avoir de différence significative, si elle doit l'être, pour l'étalement et la contractilité des cellules avec la condition OS avant activation.

Canaux mécano-sensibles Nous avons d'abord évalué le rôle des canaux cationiques car une étude récente a montré que Src pouvait activer Piezo1 (Kang *et al.*, 2019). Nous avons utilisé deux inhibiteurs : un inhibiteur à large spectre, le gadolinium permettant d'inhiber principalement les TRP (*Transient Receptor Potential*) et Piezo1 (Yang & Sachs, 1989), et un inhibiteur spécifique de Piezo1, GsmTx4 (Gnanasambandam *et al.*, 2017) (Tables II.7 et II.6). En présence de ces deux inhibiteurs, le phénotype mécanique des cellules est inchangé (Figure III.19 a,b). Pendant l'activation de Src, nous

observons que les gains en force des cellules ne sont pas modifiés en présence de ces deux inhibiteurs, comparé à la situation sans inhibiteur (Figure III.19 d). Cela suggère que les canaux cationiques de la membrane plasmique ne sont pas impliqués dans le flux de calcium intracellulaire associé à l'activation de Src.

Canal IP3 dans le réticulum endoplasmique Dans un second temps, nous avons étudié la régulation du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique. Nous avons choisi d'étudier le rôle des récepteurs IP3 car plusieurs études suggèrent un lien entre l'activation de Src et IP3 (Tokmakov *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2016). Pour inhiber cette source de calcium, nous avons utilisé la xestospongine (Gafni *et al.*, 1997) (Tables II.7 et II.6). En présence de cet inhibiteur, le phénotype mécanique des cellules avant activation est inchangé (Figure III.19 a,b). En revanche, durant l'activation de Src, la présence de l'inhibiteur diminue le gain en étalement et le gain en contractilité des cellules Src-activées (Figure III.19 c,d). Le gain en contractilité est réduit au début de l'activation puis diminue jusqu'à être quasiment égal à 1 après 1 h d'activation. Le flux de calcium impliqué dans le gain en contractilité des cellules Src-activées provient donc en partie du canal IP3 du réticulum endoplasmique. Nous n'avons pas pris le temps d'étudier le rôle des récepteurs RyR.

Globalement, nos expériences suggèrent que l'activation de Src est accompagnée d'une libération de calcium provenant en partie du RE; ce flux de calcium pourrait activer MLCK, participant ainsi à l'augmentation de la contractilité des cellules.

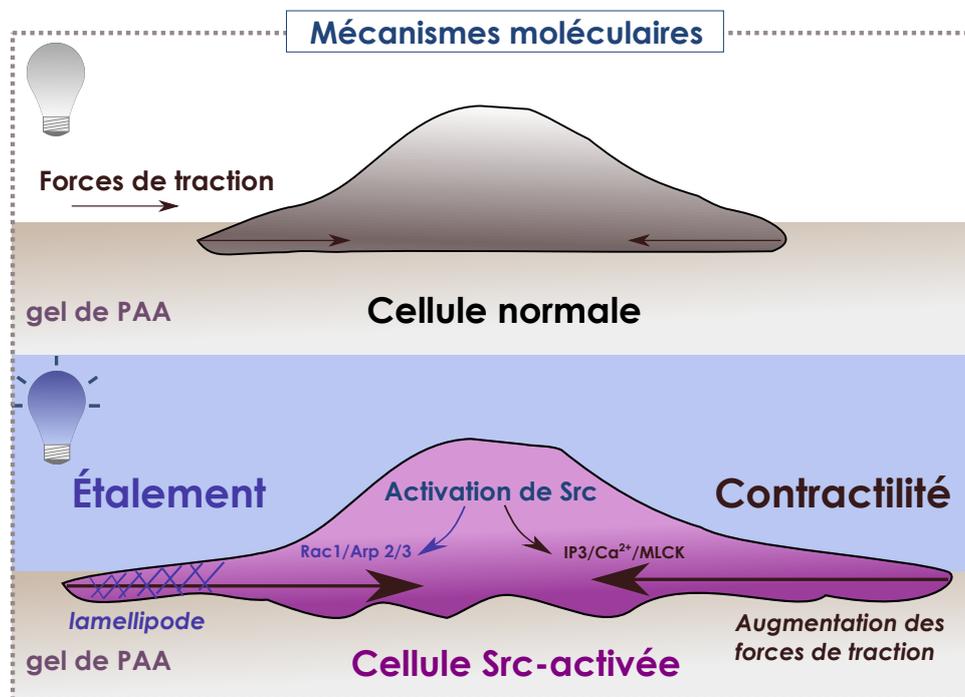


FIGURE III.20 – Mécanismes moléculaires proposés, à l'origine du changement de phénotype mécanique des cellules Src-activées

En résumé, nous proposons que les mécanismes moléculaires sous-jacents au changement de phénotype mécanique des cellules Src-activées (Figure III.20) sont :

- l'activation de la voie de signalisation Rac1-Arp2/3 pour permettre l'étalement des cellules
- le relargage de calcium en partie *via* IP3 au niveau du réticulum endoplasmique activant certainement MLCK et participant ainsi à l'accroissement de contractilité des cellules

3 Caractérisation de la réponse biologique

Nous avons décrit le changement de phénotype mécanique cellulaire associé à l'activation de Src ainsi que les voies de signalisation possiblement impliquées. Dans cette partie, nous étudions les changements dans l'organisation du cytosquelette des cellules Src-activées (actine, adhésions et fibres de stress), qui ont lieu en parallèle de ce changement de phénotype mécanique.

3.1 Dynamique de l'actine filamenteuse

L'activation de Src dans des cellules MDCK OS s'accompagne de la formation de protrusions membranaires, où a lieu un flux rétrograde d'actine. Pour visualiser l'actine dans les cellules MDCK OS, nous avons induit l'expression stable de LifeAct fusionné au marqueur iRFP (rouge profond) dans les cellules MDCK OS (Figure III.21).

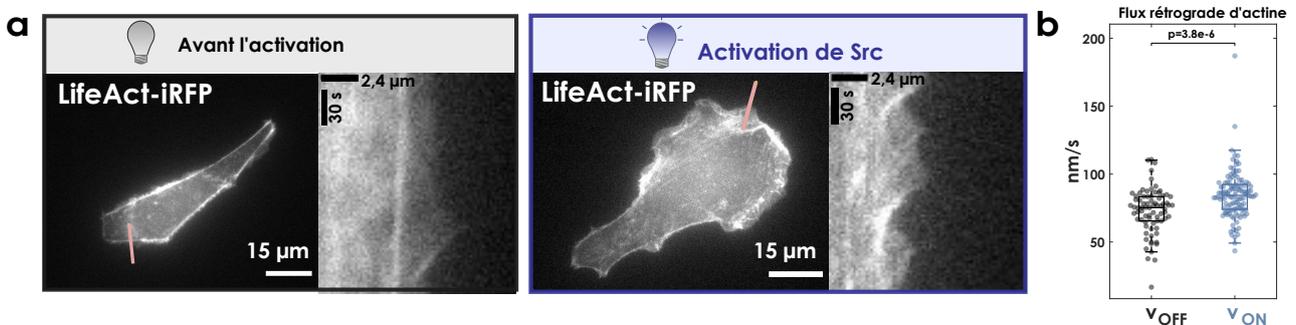


FIGURE III.21 – Flux rétrograde d'actine avant et pendant l'activation de Src (a) Images représentatives en épifluorescence d'une cellule MDCK optoSrc isolée exprimant LifeAct-iRFP dans l'obscurité (à gauche) ou après 12 min d'activation de Src (à droite). Il s'agit de la même cellule. Les segments roses sont utilisés pour générer les kymographes montrés à droite des images. (b) Vitesse du flux rétrograde d'actine (en nm/s) dans les cellules avant activation (v_{OFF} , noir, $n=76$ traces, 6 cellules) ou Src-activées (v_{ON} , bleu, $n=118$ traces, 6 cellules) mesurée à partir des traces des kymographes de 6 cellules (voir paragraphe 10.2 du Chapitre II pour la méthode).

Nous avons vérifié que les cellules MDCK OS LifeAct-iRFP se comportent de la même façon que les cellules MDCK OS en ce qui concerne le changement de phénotype mécanique pour l'activation transitoire de 1 h. Nous avons déposé ces cellules sur des gels ne contenant pas de bille fluorescente. Après 12 min d'activation de Src, le marquage LifeAct révèle que l'actine filamenteuse est proéminente et circulante à la périphérie de la cellule, où les lamellipodes sont formés (Figure III.21 a). Nous avons

mesuré ce flux d'actine à partir de kymographes (voir paragraphe 10.2 du Chapitre II pour la méthode) et avons constaté qu'il est plus élevé pour les cellules Src-activées que pour les cellules avant activation (Figure III.21 b). Cette observation confirme que l'étalement cellulaire associé à l'activation de Src résulte de l'augmentation de la dynamique du réseau d'actine à la périphérie de la cellule.

3.2 Réorganisation des adhésions

Src est essentielle dans les systèmes adhésifs de la cellule et son activation est responsable de la formation de nouvelles adhésions sur du verre en 2D (Hamadi *et al.*, 2009; Karginov *et al.*, 2014) mais aussi dans des gels 3D de collagène de rigidité 80 Pa (Polackwich *et al.*, 2013). Nous avons voulu étudier le changement du système adhésif des cellules MDCK OS, déposées sur des gels de 10 kPa, soumises à une activation transitoire de Src. Nous avons utilisé l'iRFP pour marquer de façon stable la vinculine, protéine située dans les adhésions focales (AF).

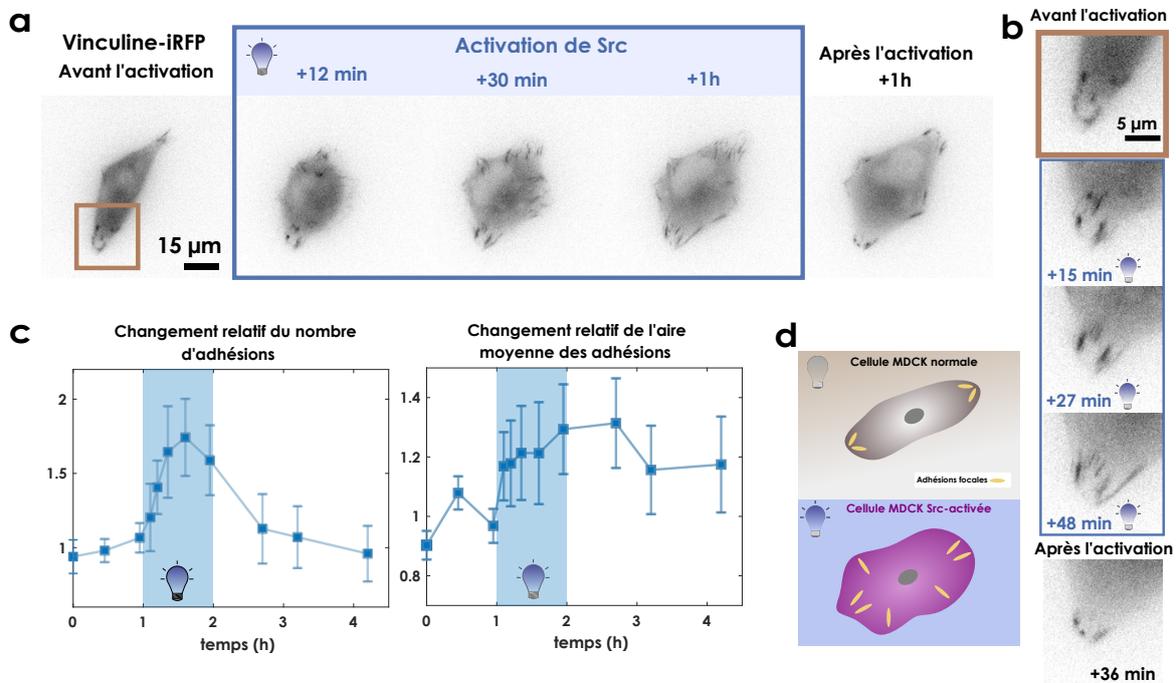


FIGURE III.22 – **Réorganisation du système adhésif de la cellule Src-activée** Images en épifluorescence des adhésions focales (vinculine-iRFP) dans une cellule MDCK optoSrc, avant, pendant (12 min, 30 min et 1 h après le début de l'activation) et après l'activation de Src. **(b)** Vue agrandie du rectangle marron en (a) pour 5 points de temps. **(c)** Évolution temporelle du nombre relatif de FA (à gauche) et de leur aire moyenne relative (à droite) pendant une activation transitoire de Src. Les lignes en pointillés représentent la moyenne, et les barres d'erreur représentent 95 % de l'intervalle de confiance de la moyenne (n=20, N=4). **(d)** Schéma illustrant la réorganisation du réseau adhésif des cellules Src-activées.

Nous avons vérifié que les cellules MDCK OS vinculin-iRFP se comportent de la même façon que les cellules MDCK OS en ce qui concerne le changement de phénotype mécanique pour l'activation transitoire de 1 h. L'imagerie de la vinculine-iRFP révèle que de nouvelles adhésions apparaissent dans les lamellipodes formés lors de l'activation de Src (Figure III.22 a,b). En utilisant le signal de la

vinculine comme un proxy pour les AF, nous avons mesuré une augmentation d'environ 1,5 du nombre d'AF lorsque Src est activée (Figure III.22 c,d).

- **Avant activation**, les AF sont de forme allongée et elles sont situées aux extrémités de l'axe d'élongation de la cellule.
- **Après 15 min d'activation**, de nouvelles adhésions sont formées, et les adhésions initialement présentes s'allongent vers le centre de la cellule (Figure III.22 a,b). Le nombre d'adhésions dans la cellule atteint son maximum 30 min après l'activation, puis diminue (Figure III.22 c).
- **Après l'activation**, le nombre d'adhésions diminue : 3 h après la fin de l'activation, la cellule retrouve le même nombre d'adhésions qu'avant activation mais celles-ci sont plus grosses (Figure III.22 a,b).

Ces observations confirment que l'étalement cellulaire associé à l'activation de Src résulte de la réorganisation du système adhésif : formation de nouvelles AF et élongation des adhésions vers le centre de la cellule.

3.3 Réorganisation des fibres de stress

Nous avons ensuite examiné l'organisation des fibres de stress (FS), principales structures responsable de la contractilité cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé une lignée cellulaire MDCK OS exprimant également la MRLC marquée en iRFP. Nous avons vérifié que les cellules MDCK OS MRLC-iRFP se comportent de la même façon que les cellules MDCK OS en ce qui concerne le changement de phénotype mécanique lors de l'activation transitoire de 1 h.

Avant l'activation de Src, les FS sont périphériques, peu nombreuses, elles ont un diamètre important et lorsque les cellules sont polarisées, les FS sont parallèles à l'axe d'élongation de la cellule (Figure III.23 a). Au début de l'activation de Src (dans les vingt premières minutes de l'activation), les myosines II se déplacent le long des fibres de stress pour former des agrégats (Figure III.23). Ensuite, nous observons deux sortes de réorganisation du réseau de FS, qui semble dépendre de l'isotropie de forme de la cellule :

- **Pour des cellules "polarisées"** (~ 60 % des cellules, $I_s < 0,3$) : Les clusters de myosines II se forment au centre des FS périphériques (Figure III.23 c). Ils disparaissent peu à peu avec l'apparition de fibres de stress plus fines au niveau des lamellipodes formés (Figure III.23 a,b). Trente minutes après le début de l'activation de Src, les FS sont ainsi plus nombreuses, plus fines et présentent "un flux" dirigé vers le centre de la cellule, rappelant le comportement d'arcs transversaux (Hotulainen & Lappalainen, 2006) (Figure III.23 a,b).
- **Pour des cellules "plus isotropes"** (~ 40 % des cellules, $I_s > 0,3$) : Des clusters de myosines II se forment le long des FS (Figure III.23 d,e). Après 30 min d'activation, un réseau dense de fibres intérieures plus fines, semblables à des fibres de stress ventrales (Hotulainen & Lappalainen, 2006) apparaît et se maintient jusqu'à la fin de l'activation de Src (Figure III.23 d,e).

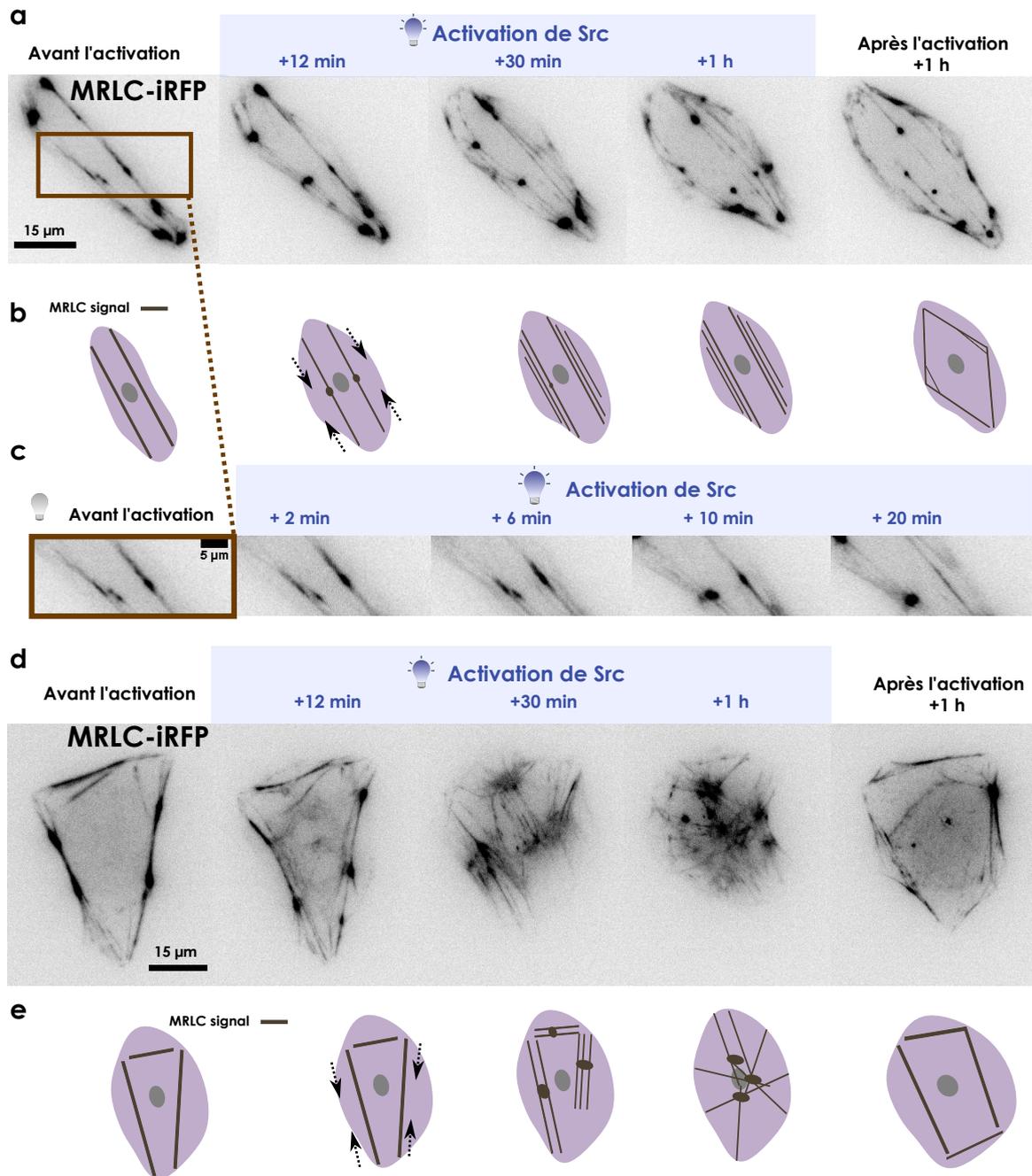


FIGURE III.23 – Réorganisation des fibres de stress des cellules MDCK OS Src-activées (a) Images représentatives des fibres de stress (MRLC-iRFP) en épifluorescence avant, pendant et après l'activation de Src des cellules MDCK OS "polarisées". (b) Schéma illustrant la réorganisation des FS montrée en (a). (c) Vue agrandie du rectangle marron en (a) avant l'activation et à différents points de temps au début de l'activation de Src : le signal MRLC se concentre vers leur centre des FS. (d) Images représentatives des fibres de stress (MRLC-iRFP) en épifluorescence avant, pendant et après l'activation de Src dans des cellules MDCK OS "plus isotropes" montrant l'autre type de réorganisation observée lors de l'activation de Src. (e) Schéma illustrant la réorganisation des FS montrée en (c).

Après l'activation transitoire de Src, les fibres de stress fines qui se sont formées pendant l'activation, disparaissent peu à peu et la cellule retrouve une organisation périphérique des FS. Cependant une heure après l'activation transitoire de Src, la cellule n'a pas retrouvé un réseau de FS semblable à celui

d'avant activation : les FS sont plus fines qu'avant activation (Figure III.23).

Nous avons utilisé le signal de fluorescence MRLC comme un indicateur des FS de la cellule. Pendant l'activation de Src, nous mesurons une augmentation de l'aire et de l'intensité totale du réseau de FS : l'aire totale augmente relativement d'un facteur $\sim 1,7$ et l'intensité augmente relativement d'un facteur $\sim 1,9$ (Figure III.24 b). Ce nouvel arrangement des FS est probablement responsable du gain en contractilité arboré par les cellules Src-activées.

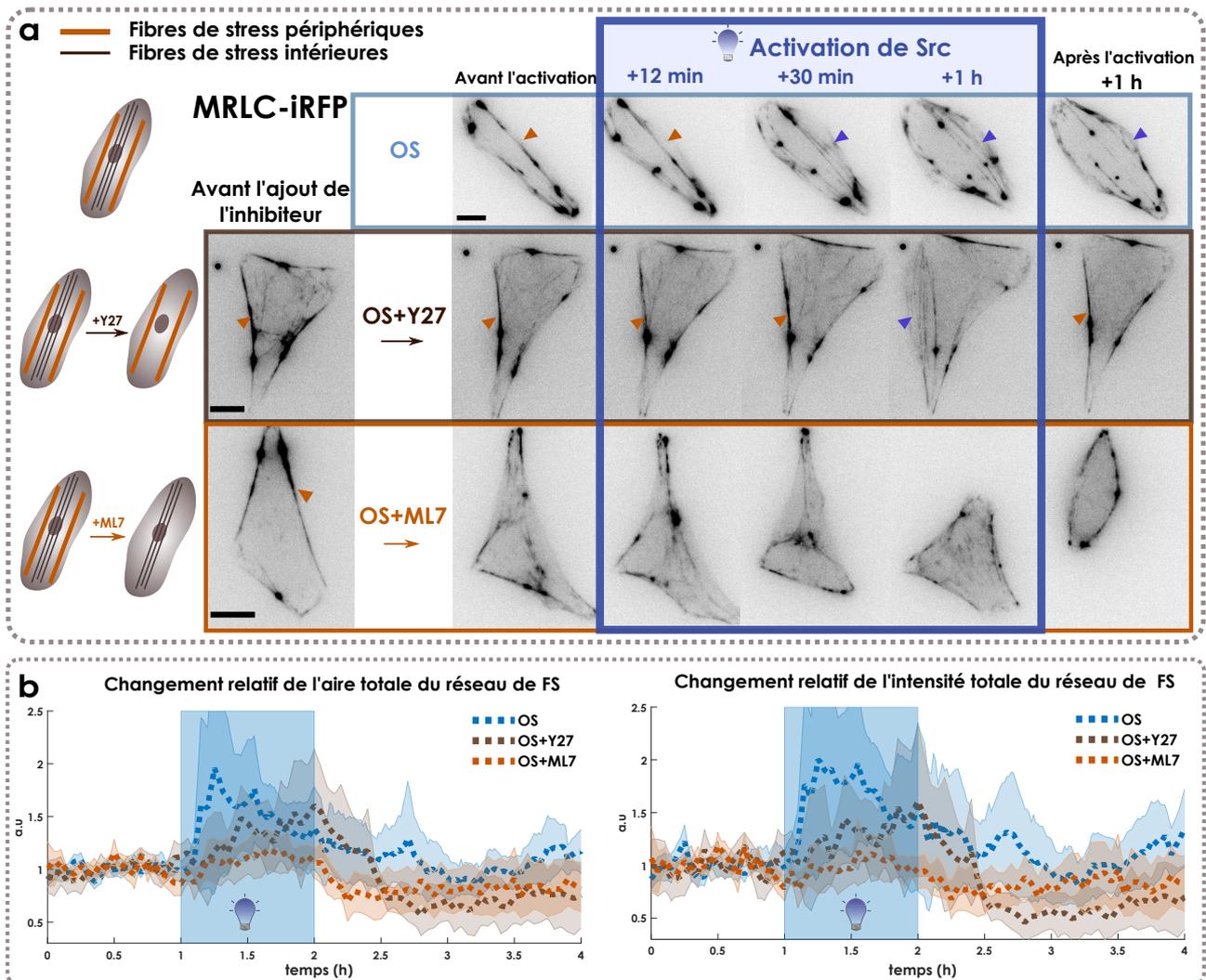


FIGURE III.24 – La réorganisation des fibres de stress des cellules Src-activées est ROCK-indépendante mais MLCK-dépendante (a) Images représentatives des fibres de stress (MRLC-iRFP) en épifluorescence avant, pendant et après l'activation de Src des cellules MDCK OS dans des conditions standard (en haut, OS), en présence d'un inhibiteur de ROCK, Y27632 (au milieu, OS+Y27) et en présence d'un inhibiteur de MLCK, ML7 (en bas, OS+ML7). Barre d'échelle : 10 μ m. Les pointes de flèches indiquent l'emplacement des fibres de stress : périphériques (en orange) et des fibres fines semblables à des arcs transverses formées pendant l'activation de Src pour OS et OS+Y27 (en violet). (b) Aire totale (à gauche) et intensité totale (à droite) du réseau de fibres de stress normalisées par leur valeur moyenne avant activation dans les trois conditions décrites en (a) : OS (courbes bleues, n=18, N=4) , OS+Y27 (courbes marrons, n=7, N=1), OS+ML7 (courbes oranges, n=10, N=1).

Pour étudier l'origine de ce ré-arrangement des FS, nous avons visualisé le signal MRLC en présence de Y27632 (Figure III.24 a, milieu), inhibiteur de ROCK ; et en présence de ML7, inhibiteur de MLCK (Figure III.24 a, bas).

Inhibition de ROCK L'ajout de l'inhibiteur de ROCK ne modifie pas l'architecture du réseau de fibres périphériques des cellules mais a un impact sur le réseau intérieur de FS, en accord avec le fait que ROCK contrôle les FS centrales et non périphériques (Katoh *et al.*, 2001; Totsukawa *et al.*, 2004). Suite à l'activation de Src, nous observons un ré-arrangement des FS, similaire à celui observé en l'absence d'inhibiteur : des clusters de myosines II se forment le long des FS au début de l'activation puis les quelques FS périphériques de gros diamètre présentes avant activation sont remplacées par plusieurs fibres plus fines (Figure III.24 a, milieu, flèche violette). Nous remarquons cependant que le ré-arrangement des FS est retardé par rapport à la situation sans drogue. Ces observations sont confirmées par l'augmentation de l'aire et de l'intensité du réseau de FS pendant l'activation de Src en présence de Y27632 (Figure III.24 b). Ce résultat montre que le ré-arrangement de FS suite à l'activation de Src semble peu dépendre de ROCK.

Inhibition de MLCK L'ajout de l'inhibiteur de MLCK, ML7, modifie le réseau de FS des cellules MDCK OS avant activation : le réseau de FS périphériques disparaît, en accord avec le fait que MLCK agit principalement sur les FS périphériques (Katoh *et al.*, 2001; Totsukawa *et al.*, 2004). De plus, pendant l'activation de Src, ML7 empêche le ré-arrangement des FS observé sans inhibiteur : il n'y a pas d'augmentation du nombre de FS ni de réduction du diamètre des FS à la périphérie de la cellule (Figure III.24 a, bas). Cette observation est confirmée par le fait que l'aire et l'intensité du réseau de FS n'augmentent pas pendant l'activation de Src (Figure III.24 b). Ce résultat suggère que le ré-arrangement du réseau de FS dans les cellules Src-activées est bien MLCK-dépendant.

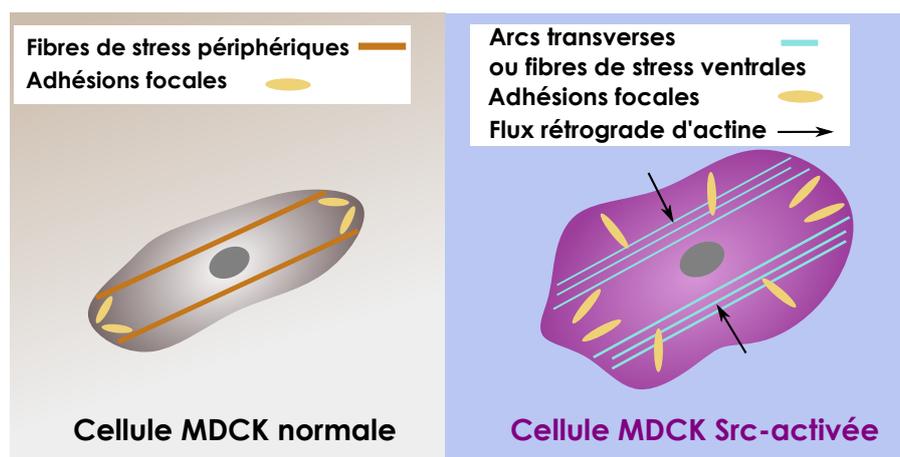


FIGURE III.25 – Réorganisation du cytosquelette des cellules MDCK Src-activées

En résumé, l'activation de Src est associée à un changement important du cytosquelette de la cellule :

- **Actine** : augmentation du flux rétrograde d'actine au niveau des lamellipodes formés
- **Adhésions focales** : augmentation du nombre et de la taille des adhésions
- **Réseau de fibres de stress** : ré-arrangement MLCK-dépendant, des fibres de stress périphériques en fibres de stress plus fines, ressemblant à des arcs transverses ou à des fibres de stress ventrales.

4 État mécanique après l'activation de Src

4.1 Arrondissement des cellules après l'activation transitoire de Src

4.1.1 Description du phénomène

Immédiatement après l'activation de Src, nous avons observé pour $\sim 40\%$ un phénomène de dé-adhésion des cellules MDCK OS : les cellules deviennent rondes, comme si elles rentraient en cytokinèse, elles restent ainsi pour une durée moyenne de 40 min ; puis elles se ré-étalent sur le substrat (Figure III.26). Ces évènements d'"arrondissement" sont responsables de l'inflexion de la courbe d'aire après activation par Src (Figure III.2). Un tel "arrondissement" à l'arrêt de l'activation de Src n'a jamais été observé pour les autres lignées cellulaires étudiées au cours de cette thèse (MDCK wt, MDCK optoSrc privé d'ancrage membranaire, MEF OS, MDCK optoRhoA). Il n'est donc pas lié à l'arrêt de la lumière bleue ou aux constructions optogénétiques.

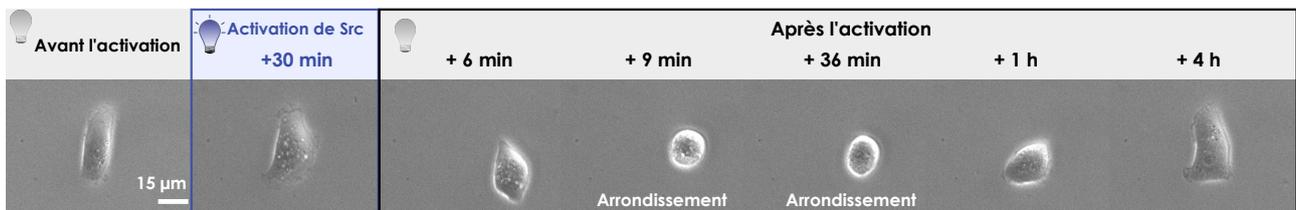


FIGURE III.26 – "Arrondissement" d'une cellule après l'activation transitoire de Src Séquence temporelle d'images en contraste de phase d'une cellule MDCK OS soumise à une activation transitoire de Src d'1 h, illustrant le phénomène d'"arrondissement" qui a lieu après l'activation de Src, dans 40 % des cas.

Nous avons observé que P_r (nombre de cellules qui s'arrondissent sur le nombre total de cellules analysées) augmente avec l'isotropie de forme qu'a la cellule avant l'activation de Src (Figure III.27 c). Pendant l'activation de Src, ces cellules isotropes forment des lamellipodes dans toutes les directions et l'étalement se fait de façon isotrope (Figure III.27 a,d). Nous supposons que la rétractation isotrope des cellules Src-activées favorise l'arrondissement des cellules. Lorsque les cellules sont anisotropes, le lamellipode se forme préférentiellement dans la direction perpendiculaire à l'axe d'élongation (lamellipode "anisotrope") et l'étalement se fait uniquement dans cette direction (Figure III.27 b,d). Dans ce cas, nous observons moins d'arrondissement après l'activation transitoire de Src.

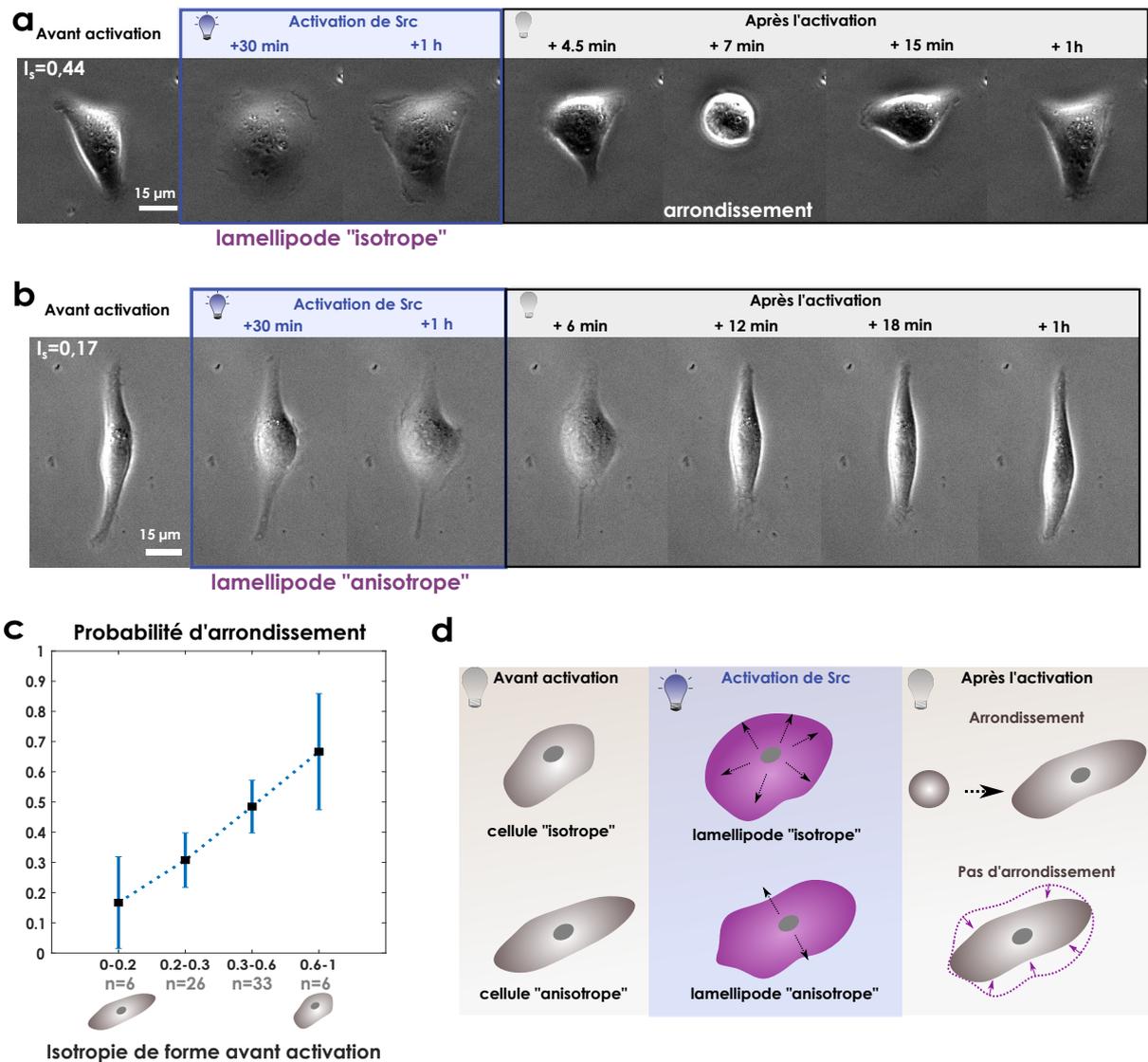


FIGURE III.27 – "Arrondissement" des cellules après l'activation transitoire de Src : influence de l'isotropie de forme (a) Séquence temporelle d'images en contraste de phase d'une cellule MDCK OS "isotrope" avant l'activation de Src ($I_{S,0} = 0,4$), soumise à une activation de Src d'1 h et s'arrondissant après l'activation transitoire de Src. Notons ici que le temps d'arrondissement de la cellule n'est que de 7 min. (b) Séquence temporelle d'images en contraste de phase d'une cellule MDCK OS "anisotrope" avant l'activation de Src ($I_{S,0} = 0,17$), soumise à une activation de Src d'1 h et ne s'arrondissant pas après l'activation transitoire de Src. (c) Probabilité d'arrondissement P_r après une activation de Src d'1 h en fonction de l'isotropie de forme $I_{S,0}$ des cellules avant activation ($n=71$, $N=8$). Les cellules sont divisées en 4 groupes suivant la valeur de $I_{S,0}$ (groupe 1 : $0 \leq I_{S,0} < 0,2$ ($n=6$); groupe 2 : $0,2 \leq I_{S,0} < 0,3$ ($n=26$); groupe 3 : $0,3 \leq I_{S,0} < 0,6$ ($n=33$) et groupe 4 : $0,3 \leq I_{S,0} < 0,6$) ($n=6$). d Schéma illustrant la réponse d'une cellule "isotrope" et d'une cellule "anisotrope" en réponse à l'activation transitoire de Src d'1 h.

4.1.2 Arrondissement des cellules : un phénomène lié à la destruction des adhésions ?

Nous avons émis l'hypothèse que l'arrondissement des cellules était dû à la rupture des contacts adhésifs entre la cellule et son substrat, liée à la diminution brutale de l'aire d'étalement, immédiatement après la dé-activation de Src. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé le Mn^{2+} , un

activateur des intégrines qui favorise la maturation des AF (Mould *et al.*, 1995) (Tables II.7 et II.6). Avant l'activation de Src, le Mn^{2+} augmente la contractilité des cellules sans modifier leur aire, comme précédemment rapporté (Lin *et al.*, 2013) (Figure III.28 b). Bien que nous n'ayons pas observé de changements importants dans la réponse cellulaire à l'activation de Src en présence de Mn^{2+} (Figure III.28 b), nous avons mesuré une probabilité d'arrondissement P_r des cellules plus petite (Figure III.28 c) ainsi qu'une durée d'arrondissement plus faible (Figure III.28 d) en présence de Mn^{2+} comparé à la situation sans manganèse. Nous interprétons ce résultat comme une conséquence d'un système d'AF mieux ancrées en présence de manganèse et donc plus difficile à rompre lorsque Src est désactivée.

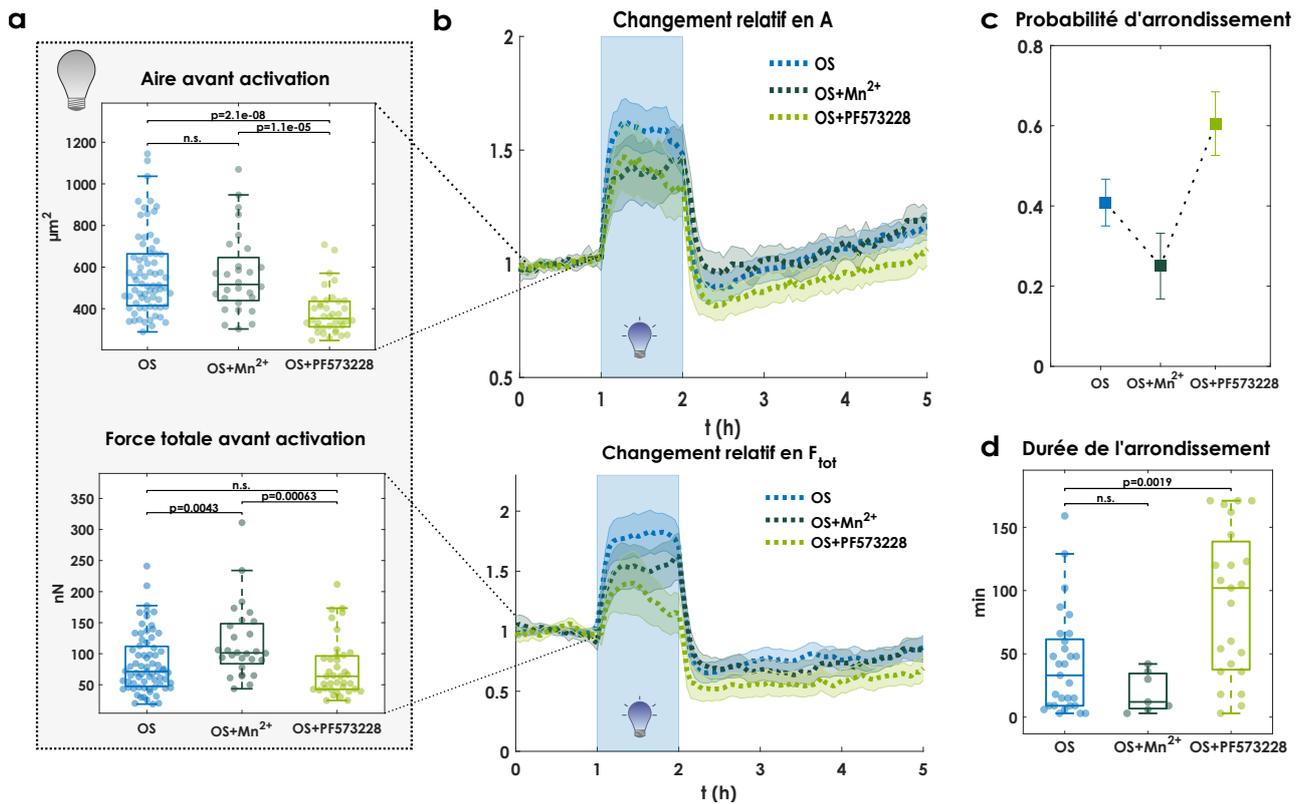


FIGURE III.28 – Effet de Mn^{2+} et de l'inhibition de FAK sur le phénomène d'arrondissement observé après l'activation de Src (a) Phénotype mécanique de cellules MDCK OS dans un milieu de culture standard (bleu, OS, $n=71$, $N=8$), en présence d'un activateur des intégrines, Mn^{2+} (vert foncé, OS+ Mn^{2+} , $n=28$, $N=2$) ou en présence d'un inhibiteur de FAK, PF573228 (vert clair, OS+PF573228, $n=38$, $N=2$) avant activation : aire (haut) et force totale (bas). (b) Changement de phénotype mécanique des cellules soumises à une activation de Src d'1 h pour les trois conditions décrites en (a) : aire (haut) et force totale (bas), normalisées par leur valeur moyenne avant activation. (c-d) Probabilité d'arrondissement (c) et durée moyenne d'arrondissement des cellules (d) après l'activation transitoire de Src pour les trois conditions décrites en (a).

Nous avons également évalué le rôle du renouvellement des AF en utilisant un inhibiteur de FAK, PF573228 (Tables II.7 et II.6). Avant l'activation de Src, le PF573228 diminue l'aire des cellules sans modifier leur contractilité (Figure III.28 a). Pendant l'activation de Src, le PF573228 affecte principalement le gain en contractilité des cellules (Figure III.28 b) : il est réduit et est faible au bout d'1 h d'activation ($g_F \sim 1,1$). Ces résultats montrent l'importance de FAK dans le changement de

phénotype mécanique des cellules Src-activées et vient confirmer le rôle de FAK comme partenaire essentiel de Src (Avizienyte & Frame, 2005; Huvneers & Danen, 2009; Karginov *et al.*, 2014; Gayrard *et al.*, 2018). Ces expériences montrent également que le renouvellement des adhésions est nécessaire pour maintenir le gain en contractilité des cellules Src-activées. Ce renouvellement joue aussi un rôle important après l'activation transitoire de Src. En effet, en présence de PF573228, nous avons mesuré une probabilité d'arrondissement P_r des cellules plus grande (Figure III.28 c) ainsi qu'une durée d'arrondissement plus grande (Figure III.28 d) comparé à la situation sans inhibiteur. Sans renouvellement des adhésions, l'arrondissement des cellules après l'activation transitoire de Src est favorisé. Le fait que la durée d'arrondissement soit plus grande en présence de l'inhibiteur de FAK suggère que FAK participe au ré-étalement des cellules après l'arrondissement.

4.1.3 Contribution de l'"arrondissement" au phénotype mécanique

Nous avons comparé l'évolution du phénotype mécanique des cellules soumises à l'activation de Src selon que la cellule s'arrondisse ou pas après l'activation transitoire de Src.

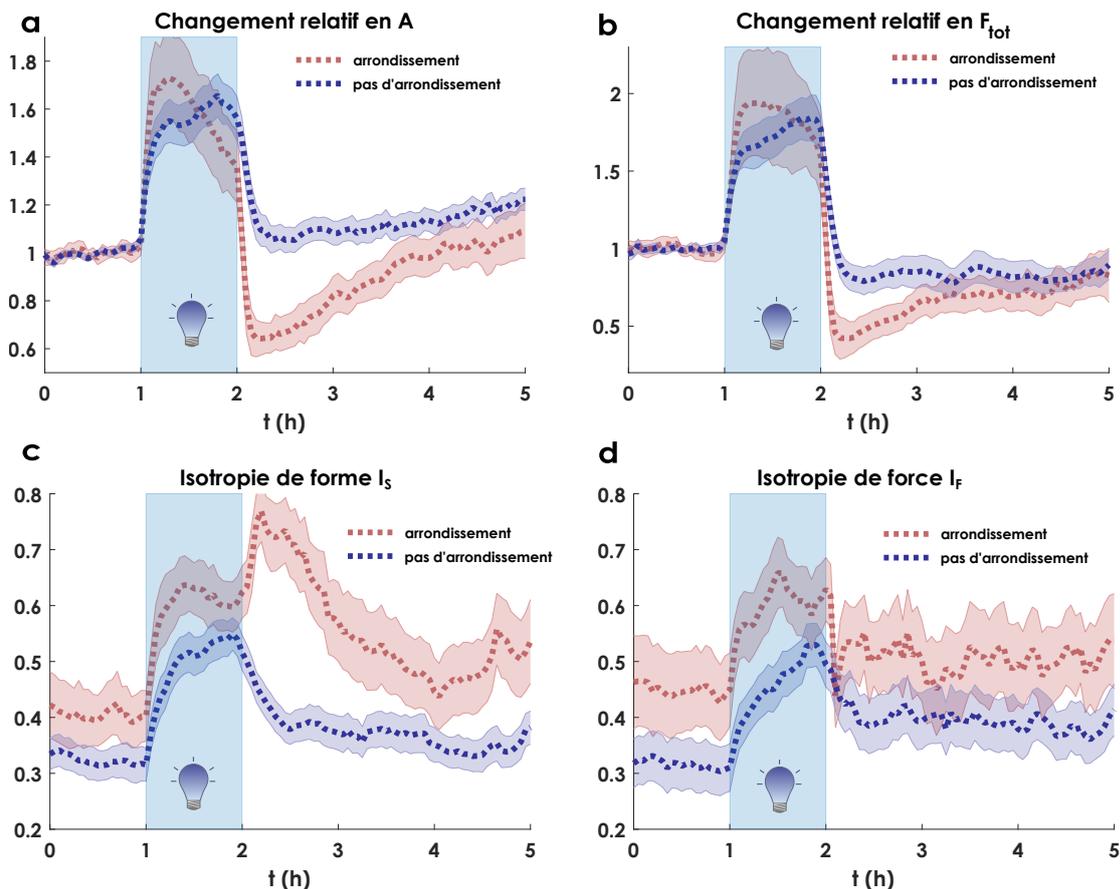


FIGURE III.29 – Comparaison des réponses mécaniques des cellules qui s'arrondissent ou pas après l'activation transitoire de Src. Changement de phénotype mécanique de cellules MDCK OS soumises à une activation de Src d'1 h s'arrondissant après l'activation transitoire de Src (rose, $n=29$, $N=8$) et ne s'arrondissant pas après l'activation transitoire de Src (bleu, $n=42$, $N=8$) : aire (a) et force totale (b), normalisées par leur valeur moyenne avant activation, isotropie de forme (c) et isotropie de force (d).

Après l'activation, les cellules qui ne se sont pas arrondies retrouvent un étalement similaire à celui avant activation (Figure III.29 a). En revanche, la courbe correspondant aux cellules s'arrondissant chute brutalement après l'activation, ce qui explique la baisse de l'aire après l'activation transitoire de Src (Figure III.2 a). Cette inflexion se retrouve aussi dans la réponse en force : il n'y a pas d'inflexion de la force pour les cellules ne s'arrondissant pas. L'arrondissement des cellules est logiquement responsable d'un pic en isotropie de forme après l'activation de Src (Figure III.29 c), qui est à l'origine du lent retour de I_S pour les cellules MDCK OS après l'activation de Src (Figure III.2 c). Notons que l'allure de l'isotropie de force I_F est similaire pour les cellules s'arrondissant ou pas (Figure III.29 d).

4.2 Étalement et contractilité des cellules après l'activation de Src

Après l'activation transitoire de Src d'1 h, les cellules MDCK OS ne retrouvent pas leur état mécanique d'avant activation. Pour tenir compte des cellules s'arrondissant juste après l'activation transitoire, nous avons mesuré l'état mécanique dans la période allant de 1 h à 3 h après l'activation de Src (Figure III.30 a). Dans cette période, les cellules sont légèrement plus étalées qu'avant l'activation (Figure III.30 a,b), en revanche elles exercent moins de forces de traction qu'avant l'activation (Figure III.30 a,c) : nous mesurons une perte en force ΔF moyenne de 20 %.

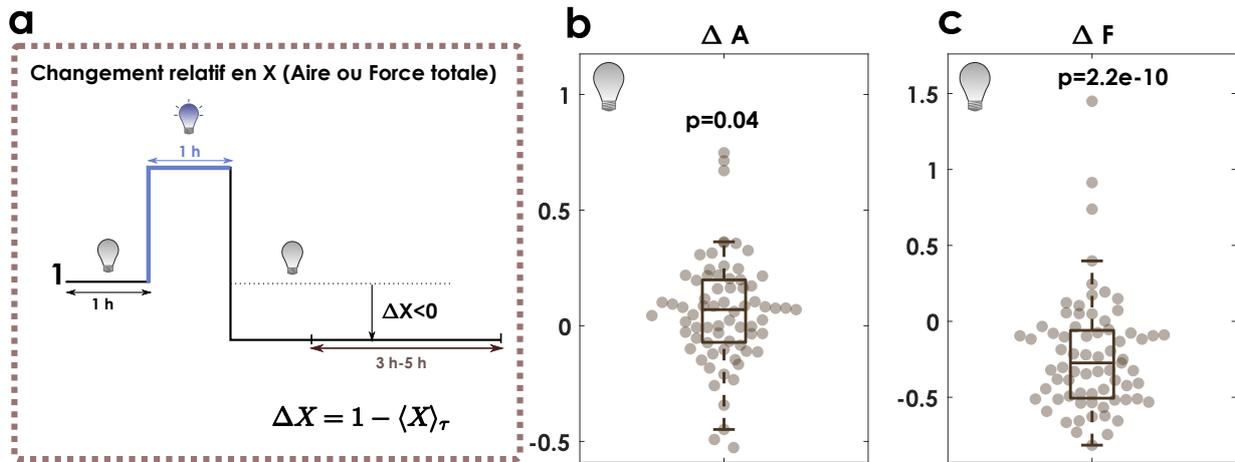


FIGURE III.30 – Comparaison de l'état mécanique des cellules MDCK OS après l'activation de Src avec leur état d'avant activation (a) Mesure de l'écart relatif ΔX entre l'état avant et après l'activation à partir de la courbe de changement relatif de la quantité X de cellules soumises à un activation de Src d'1 h. $\langle X \rangle_\tau$ correspond à la moyenne de X dans la période $\tau = [3 \text{ h}, 5 \text{ h}]$ où τ a été choisie pour tenir compte des cellules qui s'arrondissent juste après l'activation. (b-c) Écarts relatifs ΔA (aire) (b) et ΔF (force totale) (c) entre l'état avant et après l'activation de cellules MDCK soumises à une activation transitoire de Src d'1 h ($n=71$, $N=8$). La valeur p indique le résultat du test U de Mann-Whitney entre la distribution présentée et une distribution de même taille ne contenant que des 0.

Tout d'abord, nous avons étudié l'influence de l'état mécanique avant activation sur cette perte mécanique (Figure III.31 a-d) en traçant l'écart relatif en force moyen pour chaque cellule en fonction de l'aire, de la force totale, de l'isotropie de forme et de l'isotropie de force avant activation. Nous ne dégagons aucune tendance claire. Nous avons ensuite étudié l'influence de la réponse à l'activation

de Src. La question étant de savoir si une perte en force plus grande était associée à une amplitude de réponse plus grande à l'activation de Src sur cet écart relatif. Cependant, ici aussi, les tracés de l'écart relatif ΔF en fonction des gains et changements maximaux pendant l'activation ne montrent pas de tendance particulière (Figure III.31 e-h). Le fait que les MEF OS ne se déforment pas pendant l'activation et ne perdent pas de force après l'activation suggérait un lien entre la perte mécanique et les changements en isotropie de forme et de force des cellules pendant l'activation de Src : il semble qu'elle n'en dépend pas (Figure III.31 g-h). Ces résultats suggèrent que la perte de force après l'activation de Src ne peut être prédite simplement à partir de l'état mécanique avant activation ou de la réponse pendant l'activation. D'autres paramètres devront être étudiés pour comprendre l'origine de cette perte mécanique.

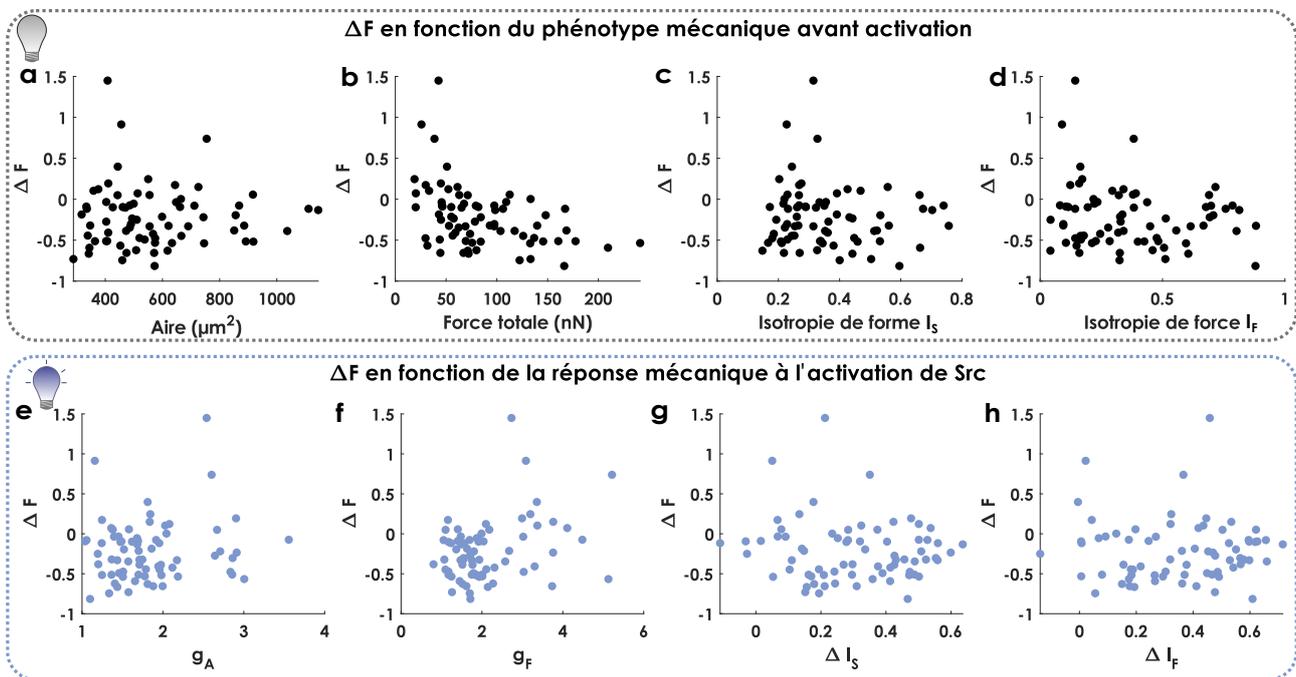


FIGURE III.31 – **Influence de l'état mécanique avant activation et de la réponse mécanique à l'activation sur la perte mécanique (a-d)** Écart relatif ΔF des cellules MDCK OS après une activation de Src d'1 h ($n=71$, $N=8$) en fonction de leur état mécanique avant activation : aire (a), force totale (b), isotropie de forme (c) et isotropie de force (d). (e-h) Écart relatif des cellules MDCK OS après une activation de Src d'1 h ($n=71$, $N=8$) en fonction de leur réponse à l'activation de Src : en fonction des gains maximaux en aire g_A (e) et en force g_F (f) et des changements maximaux en isotropie de forme (g) et isotropie de force (h).

5 Discussion

5.1 Pertinence du système choisi

Choix de l'échelle Compte tenu de la variabilité des phénotypes observés au sein d'une population cellulaire (Snijder & Pelkmans, 2011), nous avons choisi de travailler à l'échelle de la cellule unique, afin de comprendre comment la réponse cellulaire est corrélée à une perturbation de signalisation spécifique. L'idée dans ce manuscrit étant de comprendre la réponse mécanique des cellules à l'activation de Src,

nous avons débuté notre étude à l'échelle de la cellule unique avant de "complexifier" le système en nous intéressant à l'influence de la rigidité du substrat (Chapitre IV).

Choix du substrat Nous avons choisi de travailler avec des gels de PAA recouverts de fibronectine, de rigidité 10 kPa, proche de la rigidité des tissus du rein dont sont issues les cellules MDCK utilisées (Guimarães *et al.*, 2020). L'utilisation des gels de PAA a permis également de mesurer les forces, contrairement aux études utilisant des substrats en verre ou en plastique. Étudier la réponse mécanique des cellules sur des substrats de rigidité physiologique est essentiel. En effet, comme nous le verrons dans le Chapitre IV de ce manuscrit, la rigidité du substrat affecte la réponse à l'activation d'oncogènes (Panciera *et al.*, 2020).

Choix de l'optogénétique L'optogénétique est un outil intéressant pour disséquer les processus biologiques : ici, nous l'avons utilisée pour contrôler précisément dans le temps l'activation/la désactivation de la tyrosine kinase Src. Chaque paramètre de la lumière bleue (puissance lumineuse, durée des pulses, fréquence des pulses et durée totale d'activation) peut affecter la quantité d'optoSrc à la membrane, et donc l'état mécanique de la cellule pendant et après l'activation de Src. La puissance lumineuse et la durée d'activation n'ont pas d'effet majeur sur le phénotype mécanique après l'activation de Src (Figure III.6, Figure III.7). La durée des pulses et leur fréquence sont supposées avoir plus d'effet sur le niveau d'optoSrc à la membrane (Valon *et al.*, 2015) ; elles sont donc plus critiques. Ici, nous avons choisi ces deux paramètres pour atteindre un régime dans lequel les cellules Src maintiennent un plateau à la fois en étalement et en contractilité. La modification de ces paramètres donnerait certainement lieu à un autre régime, qui mériterait d'être étudié plus en profondeur mais qui dépasse le cadre de notre étude. Il est important de noter que nous n'avons pas observé d'effets phototoxiques avec les différents paramètres de lumière bleue utilisés ici.

5.2 Src coordonne un gain en étalement et en contractilité

5.2.1 Couplage entre l'étalement et le gain en contractilité des cellules Src-activées ?

Des études ont montré qu'il existait une corrélation importante entre l'étalement et la force totale générée par une cellule (Califano & Reinhart-King, 2010; Oakes *et al.*, 2014). Califano *et al.* ont ainsi montré que la force totale générée par une cellule endothéliale est d'autant plus grande que la cellule est étalée (Califano & Reinhart-King, 2010). Nous avons tracé la force totale en fonction de l'étalement pour les cellules MDCK OS avant l'activation : nous n'avons pas trouvé de corrélation entre ces deux quantités (Figure III.32 a). Nous avons également étudié la relation entre le gain en étalement et le gain en contractilité des cellules Src-activées : ici encore, aucune corrélation claire n'a été trouvée (Figure III.32 b), ce qui suggère que la contractilité des cellules Src-activées ne peut être prédite par le gain en étalement. Cependant nous avons trouvé peu de situations où un seul gain (en aire ou en contractilité) était affecté et pas l'autre (seulement pour les expériences avec une puissance lumineuse

plus faible ou en présence de l'inhibiteur de MRCK, BDP9066). Cela suggère qu'il existe probablement un couplage entre les gains en étalement et en contractilité.

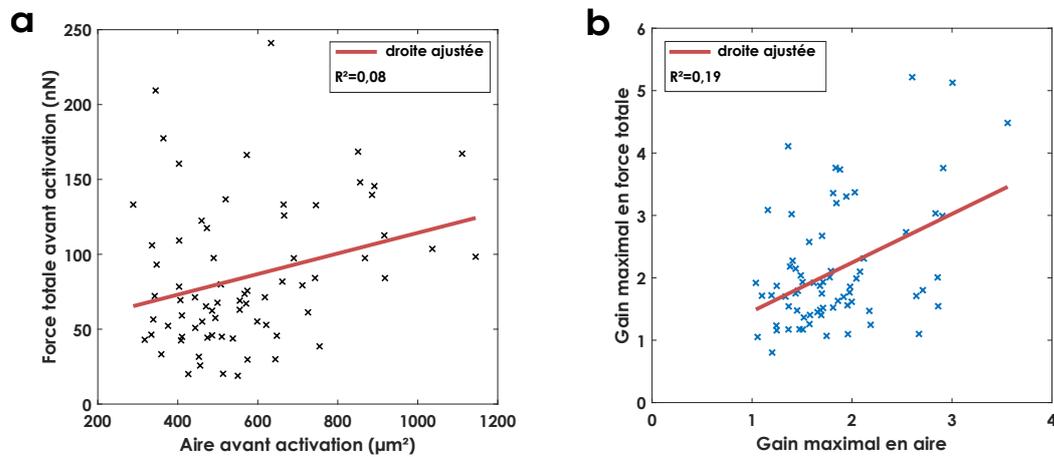


FIGURE III.32 – **Relation entre étalement et force totale pour des cellules MDCK normales et Src-activées** (a) Force totale moyenne des cellules MDCK OS en fonction de leur aire avant activation ($n=71$, $N=8$). (b) Gain maximal en force totale de cellules MDCK OS soumises à une activation de Src de 1 h en fonction de leur gain maximal en étalement ($n=71$, $N=8$) (voir paragraphe 7.5 du Chapitre II pour la mesure des gains maximaux). Les courbes rouges correspondent à l'ajustement d'une droite affine sur les données. R^2 correspond au coefficient de la régression linéaire.

Pour tester l'hypothèse du couplage entre force et étalement, nous avons utilisé des micro-patrons adhésifs rectangulaires recouverts de fibronectine (taille $60 \mu\text{m} \times 13 \mu\text{m}$) de façon à contraindre spatialement les cellules (Figure III.33 a) : la zone adhésive correspond à la zone présentant une forte densité de billes. Avant activation, nous observons que les cellules MDCK OS confinées dans les micro-patrons ont un étalement similaire à celui des cellules non confinées mais elles sont significativement plus contractiles (Figure III.33 e-f). Le confinement seul affecte le phénotype mécanique des cellules. Durant l'activation de Src, les cellules confinées parviennent à former un lamellipode en dehors du motif adhésif, dans la partie "non adhésive" (Figure III.33 b,c). De manière surprenante, nous mesurons un gain en aire plus important que lorsque les cellules ne sont pas confinées (Figure III.33 g). Ces lamellipodes semblent être faiblement adhérent au substrat, étant donné que les forces en dehors du micro-patron sont faibles comparées à celles développées à l'intérieur (Figure III.33 d) : nous ne mesurons d'ailleurs pas de gain en contractilité pendant l'activation (Figure III.33 h). Ce résultat pourrait s'expliquer par un contact faible avec le substrat : durant l'activation de Src, il n'y a quasiment pas d'adhésions formées donc peu de forces générées par la cellule en dehors de la zone adhésive. Le gain en contractilité requiert la formation d'un lamellipode bien ancré dans le substrat. Enfin, nous observons que la perte de force des cellules confinées après l'activation est similaire à celle des cellules non confinées : la perte mécanique après l'activation de Src ne dépend pas du gain en contractilité pendant l'activation mais semble provenir de la déformation de la cellule pendant l'activation de Src (Figure III.33 g,i,j). Malgré ces résultats, ces expériences de confinement ne permettent pas de bloquer l'étalement des cellules. Elles ne nous ont donc pas permis d'étudier correctement le couplage entre gain en étalement et gain en contractilité.

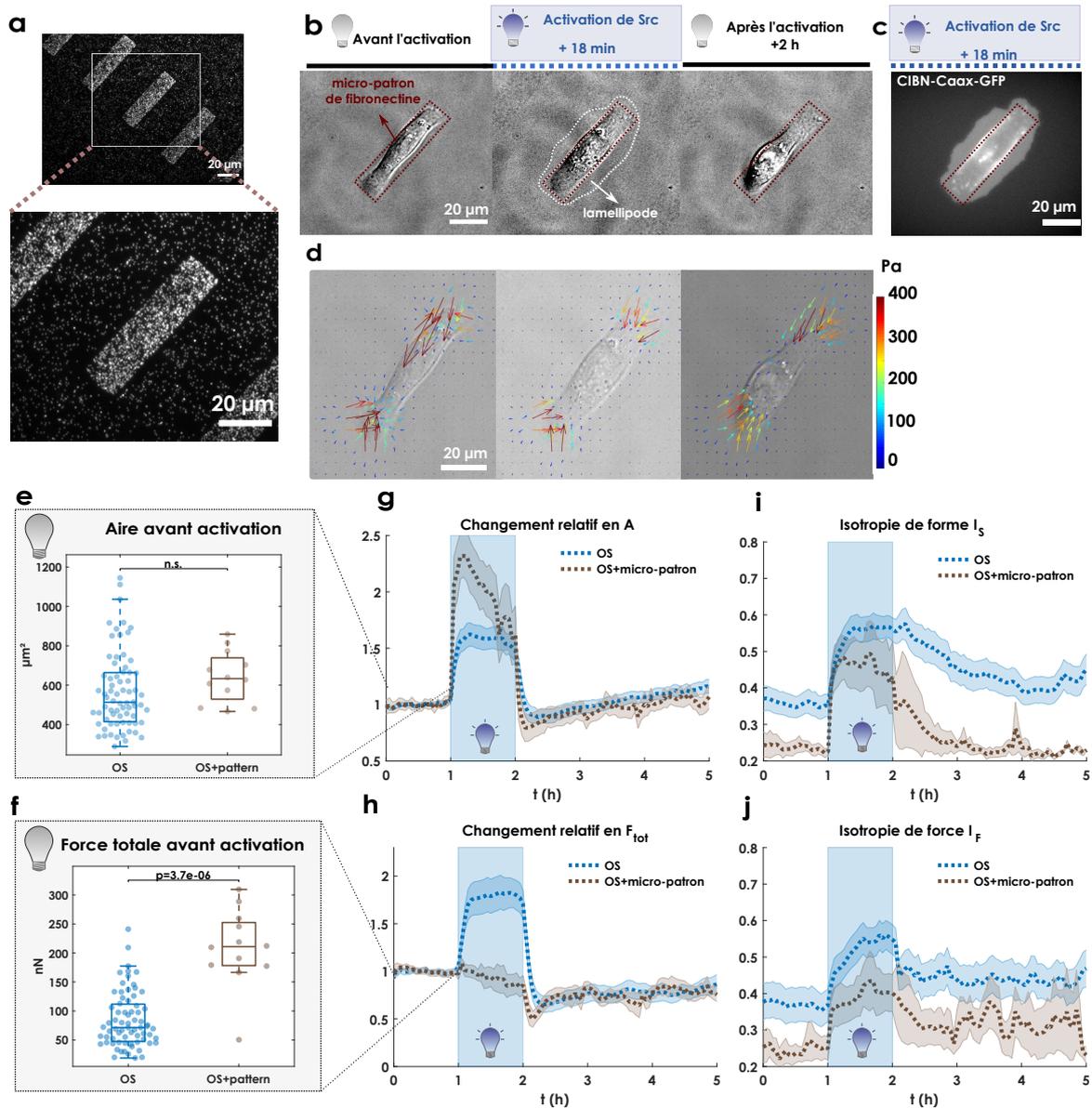


FIGURE III.33 – **Phénotype mécanique de cellules Src-activées déposées sur des micro-patterns adhésifs rectangulaires** (a) Image en épifluorescence montrant le plan des billes Cy5 dans un gel de PAA avec des micro-patterns adhésifs rectangulaires (taille $60\ \mu\text{m} \times 13\ \mu\text{m}$) recouverts de fibronectine (haut) et image agrandie d'un micro-pattern montrant une plus grande concentration de billes dans les micro-patterns qu'à l'extérieur (bas). (b) Images en contraste de phase d'une cellule MDCK OS déposée sur un micro-pattern (indiqué par le rectangle rouge) et soumise à une activation transitoire de Src de 1 h pour trois points de temps : avant l'activation, 18 min après le début de l'activation montrant la formation d'un lamellipode en dehors de la zone adhésive, et 2 h après la fin de l'activation de Src. (c) Image en épifluorescence de CIBN-Caax (marqué en GFP) de la cellule montrée en (b), 18 min après l'activation, montrant clairement le lamellipode formé. (d) Images décrites en (b) avec les forces de traction superposées (flèches). Leur amplitude en Pascal est codée en couleur. (e-j) Comparaison du phénotype mécanique de cellules MDCK OS (bleu, OS, $n=71$, $N=8$) et MDCK OS confinées dans les micro-patterns décrits en (a) (marron, OS+micro-pattern, $n=12$, $N=1$). Avant activation aire moyenne (e) et force totale moyenne (f). (g-j) Changement de phénotype mécanique : aire (g), force totale (h), isotropie de forme (i) et isotropie de force (j). L'aire et la force totale ont été normalisées par leur valeurs moyennes d'avant activation.

5.2.2 Gain en contractilité des cellules Src-activées vs. RhoA-activées

Le fait de s'étendre et d'être plus contractile peut sembler contradictoire à première vue. Si l'on augmente la contractilité cellulaire (cellules qui expriment RhoA par exemple) alors les cellules deviennent rondes et s'étalent peu. Par ailleurs, lorsque la contractilité des cellules est réduite en bloquant l'action des myosines II (en utilisant de la blebbistatine par exemple), alors les cellules ont tendance à s'étaler (Oakes *et al.*, 2018). Pour aller plus loin, nous avons utilisé des cellules MDCK optoRhoA, surexprimant RhoA lorsqu'elles sont illuminées en lumière bleue (Valon *et al.*, 2017) et les avons soumis à la même séquence d'illumination dans le bleu de 1 h que celle utilisée pour activer Src de façon transitoire (Figure III.34 a).

Avant activation, nous remarquons que les cellules optoRhoA ont le même étalement que les cellules optoSrc mais elles sont plus contractiles avec une isotropie de forme et de force plus grandes que les optoSrc (Figure III.34,c,d,g,h). Suite à l'activation de l'optoRhoA, les cellules sont légèrement plus contractiles (optoRhoA, Figure III.34 f), ce qui n'est pas le cas des cellules optoRhoA non illuminées (optoRhoA+OFF, Figure III.34 f). Nous remarquons que ce gain en contractilité se fait sans gain en étalement (Figure III.34 a,e) ni changement en isotropie de forme ou de force (Figure III.34 g,h). Les cellules RhoA-activées sont donc plus contractiles mais sans s'être étalées. Ces observations sont en accord avec les résultats décrits dans la littérature (Vasiliev *et al.*, 2004; Valon *et al.*, 2017). Il n'est donc pas surprenant que l'activation de Src ne repose pas sur la voie de signalisation RhoA/ROCK. Src est capable d'accroître la contractilité tout en permettant à la cellule de s'étaler : Src réalise ce tour de force en coordonnant deux voies qui ne se répriment pas mutuellement : puisque RhoA a tendance à ne pas diminuer l'étalement, Src active une autre voie de contractilité, la voie de contractilité MLCK.

5.3 Le gain en contractilité est MLCK-dépendant et ROCK-indépendant

Certaines études suggèrent que l'augmentation de contractilité des cellules Src-activées provient de l'activation de Rho (Sreenivasappa *et al.*, 2014). Tous nos résultats tendent cependant à montrer que le gain en contractilité des cellules Src-activées ne dépend pas de Rho mais de MLCK. Nos résultats viennent d'ailleurs confirmer des suggestions faites dans d'autres articles (Krndija *et al.*, 2010; Shaaya *et al.*, 2020). En effet, Shaaya *et al.* ont montré un rôle plus important de MLCK que celui de ROCK dans le *ruffling* des cellules Src-activées (Shaaya *et al.*, 2020). Bien avant, Krndija *et al.* ont montré que RPTP α (*receptor-type tyrosine-protein phosphatase α*) est à l'origine de la formation de sites d'adhésion et de fibres de stress par l'activation de SFK (c-Src, c-Yes ou c-Fyn) ; cette réorganisation du cytosquelette est contrôlée par MLCK et est indépendante de la voie de signalisation Rho/ROCK (Krndija *et al.*, 2010). Cette observation est en accord avec nos résultats qui montrent que la réorganisation des fibres de stress associée à l'activation de Src est MLCK-dépendante, et ROCK-indépendante. De plus, plusieurs études ont montré que l'activité de Src pouvait réguler l'activité de MLCK dans les cellules endothéliales *via* la phosphorylation de différents sites sur MLCK (Y464 et Y471 sur l'isoforme MLCK-1 dans des cellules endothéliales) (Birukov *et al.*, 2001; Garcia *et al.*,

1999). Enfin, Barfod *et al.* suggèrent que MLCK et Src forment un complexe qui régule le volume de la cellule (Barfod *et al.*, 2011). Nous avons d'ailleurs montré que les cellules Src-activées ont un volume plus élevé par rapport aux cellules normales (voir paragraphe 1.3 de ce chapitre), observation précédemment rapportée dans la littérature : dans un environnement 3D de collagène, Polackwich *et al.* mesure un volume compris entre 4000 et 8000 μm^3 pour des cellules MDA-231 wt alors qu'il est compris entre 5000 et 9000 μm^3 pour des cellules MDA-231 suractivant Src (Polackwich *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent un rôle de Src-MLCK dans le gain en volume des cellules Src-activées.

De façon surprenante, les expériences d'inhibition des myosines II avec la para-nitro blebbistatine, montrent qu'elles ne sont pas impliquées dans le gain en contractilité au début de l'activation de Src (pendant les ~ 20 premières min) mais elles sont importantes dans le maintien de ce gain. En revanche, les expériences d'inhibition de MLCK avec ML7 montrent un rôle plus important de MLCK au début de l'activation (pendant les ~ 20 premières min) que dans la suite de l'activation. À partir de ces observations, il paraît peu probable que MLCK agisse sur les myosines II immédiatement après le début de l'activation de Src. La contractilité MLCK-dépendante au début de l'activation de Src pourrait donc dépendre de l'activité d'autres myosines (Woolner & Bement, 2009; Dewerchin *et al.*, 2014).

5.4 L'activation de Src induit un flux de calcium

Nous avons montré que le gain en contractilité des cellules Src-activées nécessitait un flux de calcium provenant en partie du réticulum endoplasmique. Certaines études ont fait un lien entre l'activation de Src et l'activité calcique (Anguita & Villalobo, 2018; Kang *et al.*, 2019). Kang *et al.* ont montré que l'activation de Src engendre un flux de calcium dans la cellule *via* l'activation de Piezo 1 (Kang *et al.*, 2019). Ce résultat nous a poussé à inhiber les canaux ioniques, en particulier Piezo 1. De façon surprenante, l'inhibition de ces canaux calciques de la membrane plasmique ne modifie pas le gain en contractilité des cellules Src-activées. En revanche, la perte de force totale après l'activation est plus petite quand ils sont inhibés, suggérant un rôle des canaux ioniques dans la perte mécanique après l'activation transitoire de Src (Figure III.19 c,d).

Nous avons ensuite étudié le rôle de IP3, étant donné que plusieurs études ont relié ce récepteur du réticulum endoplasmique à l'activité de Src (Tokmakov *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2016). Nos expériences d'inhibition de IP3 montrent que le flux de calcium intracellulaire provient en partie du réticulum endoplasmique. Cependant, nous n'avons pas pu montrer que Src activait directement IP3. Certaines études viennent néanmoins soutenir cette hypothèse : Tokmakov *et al.* ont montré que l'activation de Src pouvait activer directement la production d'IP3 (Tokmakov *et al.*, 2002), et une autre étude a montré que Src pouvait directement phosphoryler IP3 (Cui *et al.*, 2004). L'activation directe de IP3 par Src pourrait être à la base du couplage entre Src et les voies de signalisation calcium-dépendantes. Notre étude a donc mis en évidence une nouvelle voie de signalisation (Src/Calcium/MLCK) qui pourrait avoir un rôle complémentaire à celui de la voie de contractilité classique (RhoA/ROCK).

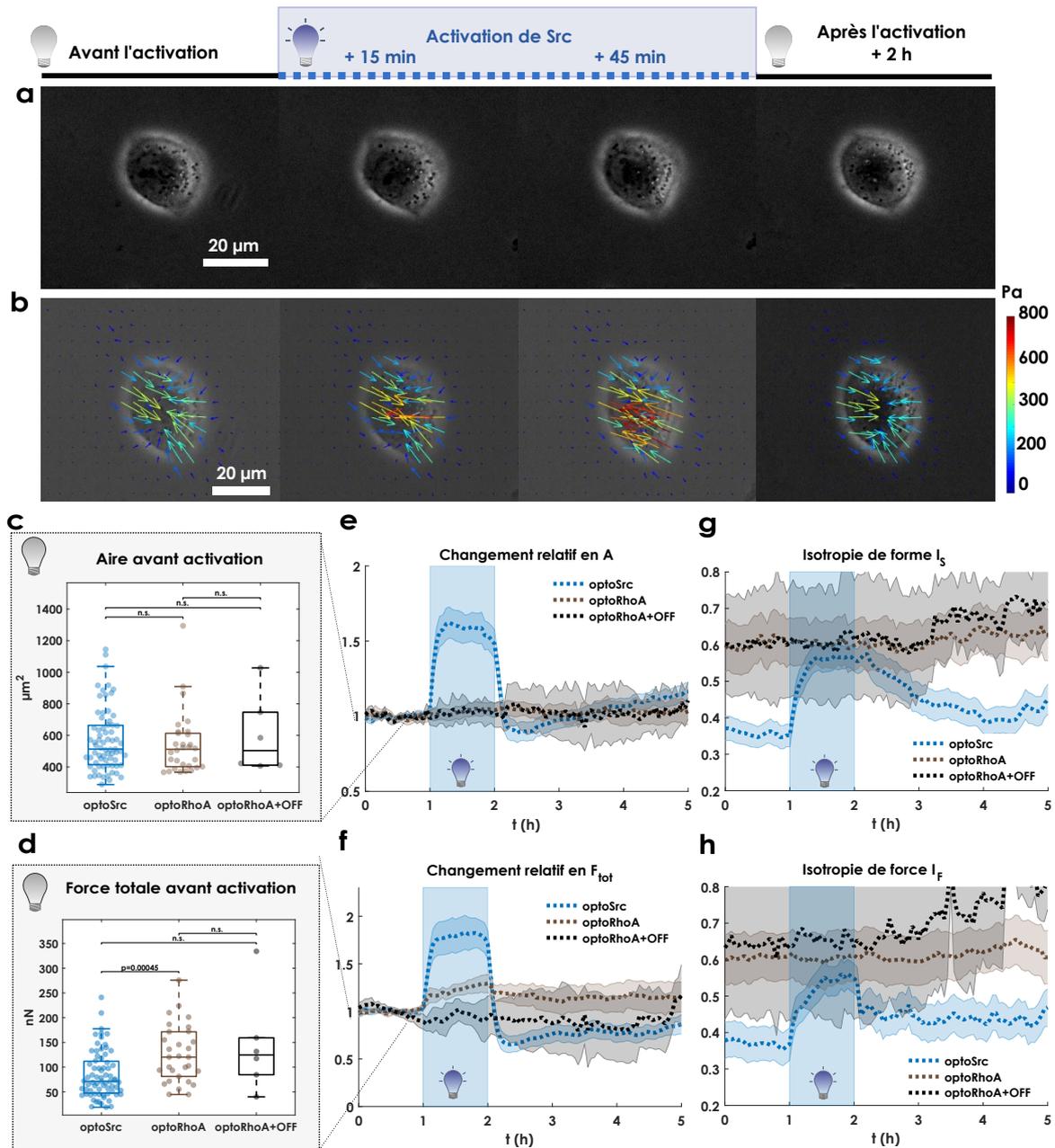


FIGURE III.34 – Activation de RhoA *vs.* activation de Src : des stratégies différentes pour accroître le gain en contractilité des cellules (a) Images en contraste de phase d'une cellule MDCK optoRhoA isolée soumise à une activation transitoire de RhoA de 1 h à quatre points de temps : avant l'activation, 15 min et 45 min après le début de l'activation et 2 h après la fin de l'activation de RhoA. (b) Images décrites en (a) avec les forces de traction superposées (flèches). Leur amplitude (en Pascal) est codée en couleur. (c-h) Comparaison du phénotype mécanique de cellules MDCK OS (bleu, optoSrc, $n=71$, $N=8$), MDCK optoRhoA (marron, optoRhoA, $n=30$, $N=3$) soumis à une activation transitoire de Src et de RhoA respectivement et MDCK optoRhoA non illuminées en lumière bleue (noir, optoRhoA+OFF, $n=6$, $N=1$). Avant activation : aire moyenne (c) et force totale moyenne (d). (e-h) Changement de phénotype mécanique au cours du temps : aire (e), force totale (f), isotropie de forme (g) et isotropie de force (h). L'aire et la force totale ont été normalisées par leur valeurs moyennes d'avant activation.

5.5 Ré-arrangement du cytosquelette des cellules Src-activées

Nous avons montré que la cellule Src-activée présente plus d'adhésions focales et que celles-ci sont plus grosses. Cela permet à la cellule de s'étaler sur son substrat et de générer plus de forces de traction. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Polackwich *et al.*, 2013; Karginov *et al.*, 2014). Polackwich *et al.* ont aussi montré que le temps de vie des adhésions augmente dans des cellules épithéliales Src-activées dans un gel de collagène 3D. Ils suggèrent qu'une telle augmentation du temps de vie permet une maturation plus importante des cellules et, est un élément clé pour expliquer le gain en contractilité des cellules Src-activées. De plus, l'augmentation du flux rétrograde d'actine que nous avons mesuré au début de l'activation de Src, participe certainement à la maturation des adhésions nouvellement formées dans les lamellipodes créés (Choi *et al.*, 2008; Gardel *et al.*, 2010). Les fibres de stress sont les structures de base permettant à la cellule de générer des forces : la réorganisation MLCK-dépendante des fibres de stress périphériques en une multitude de fibres de stress fines permet certainement d'augmenter la contractilité. Nous n'avons pas trouvé d'étude décrivant une telle réorganisation MLCK-dépendante des fibres de stress. Par ailleurs, cette réorganisation des fibres de stress périphériques pourrait modifier la rigidité cellulaire dans la région périphérique de la cellule. Sreenivasappa *et al.* ont mesuré une augmentation de rigidité significative lors de l'activation de Src dans des cellules de muscles lisses VSMC (mesure réalisée à mi-distance du noyau/de la périphérie cellulaire) (Sreenivasappa *et al.*, 2014). Pour notre part, nous n'avons pas mesuré de changement significatif de la rigidité dans la région lamellaire (voir paragraphe 1.3 de ce chapitre).

5.6 Phénotype mécanique des cellules Src-activées : un avantage sur les cellules normales ?

Revenons au contexte de la progression tumorale. Pour se disséminer, les cellules cancéreuses modifient leur phénotype afin de surmonter les différentes barrières physiques qu'elles rencontrent. Elles changent en particulier leur phénotype mécanique : elles sont souvent plus mobiles et plus déformables que leurs homologues normales (Stuelten *et al.*, 2018) et les forces de traction qu'elles exercent augmentent avec leur pouvoir métastatique. Ces caractéristiques leur permettent d'envahir plus facilement les tissus environnants. Cependant, les mécanismes moléculaires qui conduisent une cellule à modifier son phénotype mécanique en un phénotype plus agressif ne sont pas encore élucidés. Rappelons que la dérégulation de Src est associée à une altération des adhésions cellule-cellule et cellule-matrice (Playford & Schaller, 2004; Yeatman, 2004) ; ces altérations rendent la cellule plus mobile et plus invasive. Le lien entre Src et la progression tumorale et les métastases est clairement établi, mais les mécanismes moléculaires restent à élucider. En particulier, nous ne savons toujours pas pourquoi la suractivation de cette kinase est associée à des cellules cancéreuses de haute malignité. Nous avons montré ici que les cellules Src-activées étaient plus étalées et plus contractiles : des caractéristiques qui pourraient permettre à la cellule d'être plus invasive et plus motile. Nous avons également identifié les principaux acteurs sous-jacents à ce changement de phénotype mécanique. En ce sens, notre étude

a montré comment la signalisation orchestrée par Src peut être liée à la dissémination des cellules.

5.7 Arrondissement des cellules après l'activation transitoire de Src

Après l'activation transitoire de Src, nous observons que $\sim 40\%$ des cellules MDCK OS s'arrondissent puis se réétaient sur leur substrat après ~ 40 min. L'ajout de manganèse, un activateur d'intégrines, diminue le nombre de cellules s'arrondissant après l'activation de Src, ce qui permet montre que cet arrondissement est lié à la déstabilisation des adhésions lorsque les cellules se rétractent. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'autres exemples montrant un arrondissement "transitoire" des cellules après un étirement, ce qui suggère que l'arrondissement est lié à la désactivation de Src, et pas seulement à une déstabilisation suite à une rétraction de la cellule. Par ailleurs, des études ont montré que l'inhibition de Src par le Dasatinib² est responsable de l'arrondissement des cellules qu'elles soient seules ou en petits groupes (Pichot *et al.*, 2009; Nautiyal *et al.*, 2011; Schönholzer *et al.*, 2020) (Figure III.35) : ces observations suggèrent que l'"arrondissement" des cellules serait bien une conséquence de la désactivation de Src.

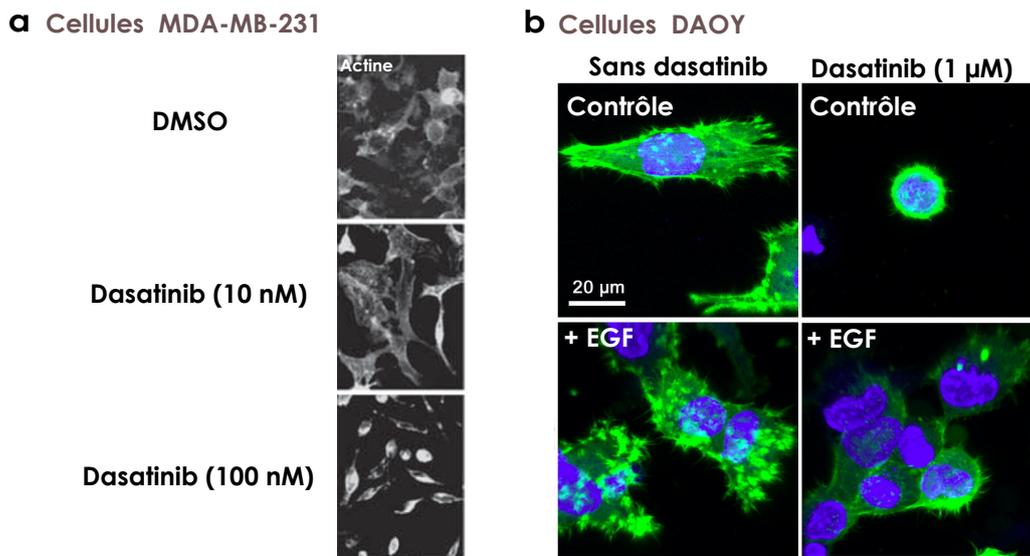


FIGURE III.35 – Arrondissement de cellules cancéreuses suites à l'inhibition de Src par le Dasatinib (a) (De haut en bas) Images en épifluorescence (marquage de l'actine) montrant des cellules cancéreuses MDA-MB-231 dans la situation contrôle (DMSO), en présence de 10 nM de Dasatinib, puis en présence de 100 nM de Dasatinib. Aucune barre d'échelle n'est donnée dans la publication. Adapté de (Pichot *et al.*, 2009). (b) Images de microscopie confocale montrant des cellules cancéreuses du cerveau humain (DAOY) sans ou en présence de Dasatinib (1 µM) (haut) et traitées avec de l'EGF, connu pour activer Src, sans ou en présence de Dasatinib (1 µM) (bas). L'actine des cellules est marquée en vert, le noyau en bleu. Adapté de (Schönholzer *et al.*, 2020).

Cependant, dans ces études, lorsque Src est inhibé par le Dasatinib, les cellules ne se réétaient pas sur leur substrat : elles restent rondes et prolifèrent (Nautiyal *et al.*, 2011), contrairement à ce que nous observons dans nos expériences. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait le dasatinib est un

2. Agent anticancéreux (voie orale) commercialisé par Sprycel, inhibiteur des kinases Src et Abl

puissant inhibiteur de Src pouvant également inhiber le Src endogène. Dans nos expériences, après la désactivation de l'optoSrc, la cellule a toujours du Src endogène qui doit lui permettre de se ré-étaler sur son substrat en formant de nouvelles adhésions.

5.8 Perte mécanique après l'activation

Après l'activation transitoire de Src, nous observons une perte en force des cellules MDCK OS, et ce, quelle que soit la puissance lumineuse ou la durée d'activation en lumière bleue. De plus, cette perte de force est visible même si nous ne considérons que les cellules ne s'arrondissant pas après l'activation de Src (Figure III.29). Des pertes mécaniques similaires ont été décrites dans le cas de cellules soumises à un étirement mécanique transitoire ou prolongé : après l'étirement, les cellules n'exercent plus les mêmes forces de traction qu'avant l'étirement (Gavara *et al.*, 2008; Cirka *et al.*, 2016; Rosowski *et al.*, 2018).

Gavara *et al.* ont montré que l'étirement de cellules épithéliales était responsable d'une diminution des forces de traction exercées par les cellules, juste après le relâchement de l'étirement (Gavara *et al.*, 2008) (Figure III.36 a,b). 10 min après l'étirement, certaines cellules qui exerçaient des forces de traction élevées avant l'activation ne retrouvent pas l'état mécanique qu'elles avaient avant l'étirement, alors que des cellules qui exerçaient des forces faibles retrouvent leur état mécanique. Plus récemment, Cirka *et al.* ont montré que la perte ou le gain en force de traction et en aire après un étirement mécanique prolongé (24 h) dépendait de l'état contractile de la cellule avant l'étirement : la cellule perd en force et en aire lorsqu'elle était contractile, mais gagne en force et en étalement lorsqu'elle était peu contractile (Cirka *et al.*, 2016) (Figure III.36 c,d). Dans le cas de nos expériences, nous n'avons pas vu de lien clair entre la contractilité des cellules avant l'activation et l'écart relatif ΔF après l'activation de Src (Figure III.31 b).

Dans un article publié en 2018, Rosowski *et al.* ont également montré que des fibroblastes MEF soumis à un étirement mécanique transitoire perdent en force après l'étirement (Rosowski *et al.*, 2018). Les auteurs ont suggéré que cette perte de force provenait d'une déformation plastique de la cellule sans en identifier l'origine : ils font l'hypothèse qu'elle est liée à une déformation plastique du cytosquelette ou bien à un "glissement" au niveau des adhésions focales. Des déformations plastiques du cytosquelette ont été décrites par Bonakdar *et al.* : ils montrent qu'une cellule soumise à une force, se déforme mais ne retrouve pas sa forme initiale lorsque la force est relâchée (Bonakdar *et al.*, 2016). En fixant les cellules avec du paraformaldéhyde, ils montrent que cette déformation plastique provient du "glissement" ou de rupture de filaments d'actine/d'adhésions dans le cytosquelette des cellules. Bonakdar *et al.* suggèrent qu'un rétablissement incomplet de la forme est un processus adaptatif qui permet de réduire les contraintes mécaniques de la cellule lors de déformations ultérieures, la protégeant ainsi de dommages mécaniques. La perte mécanique, observée pour les cellules MDCK après l'activation de Src, pourrait être liée à des déformations plastiques dans le cytosquelette des cellules.

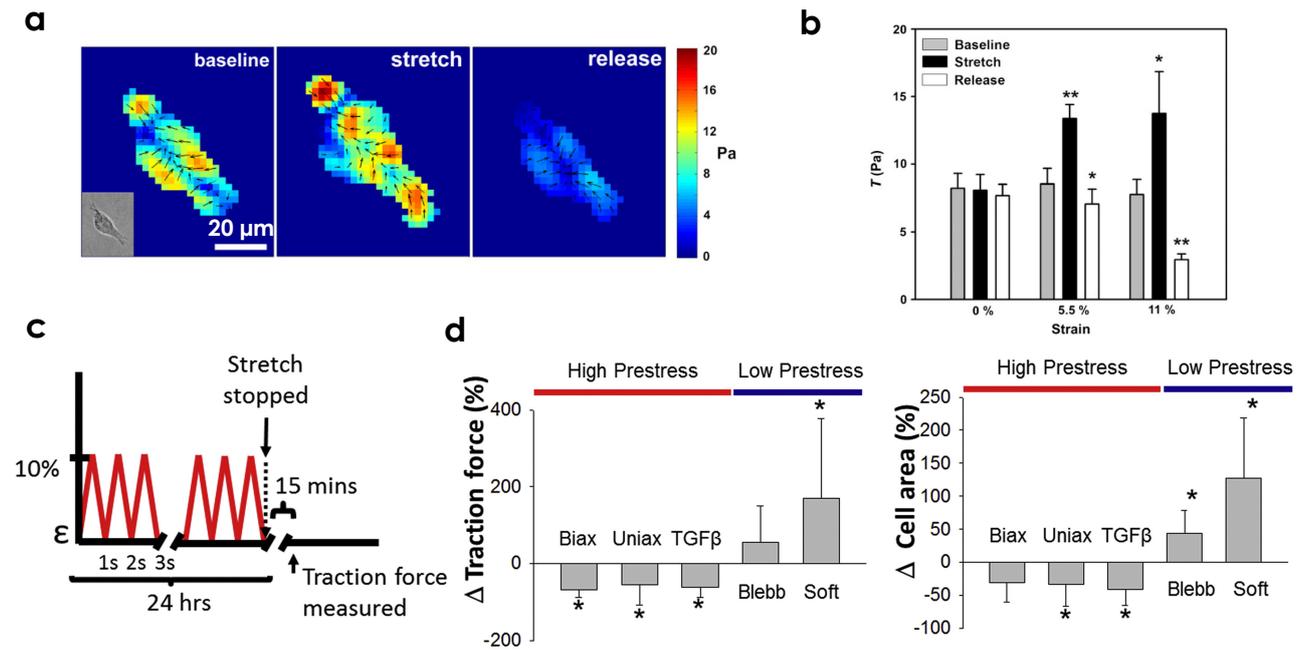


FIGURE III.36 – Perte de forces suite à l'étirement de cellules isolées (a) Effet de l'étirement sur les forces de traction d'une cellule épithéliale A549 déposée sur un gel de 23 Pa. Forces de traction exercées par une cellule adhérente avant l'étirement (gauche), pendant l'étirement (11 %) (milieu) et après le relâchement de l'étirement (droite). L'encart montre une image en contraste de phase de la cellule avant l'étirement. L'échelle de couleurs indique l'amplitude des forces de traction et les flèches décrivent la direction et l'amplitude relative de la force de traction. (b) Force de traction moyenne (T) mesurée avant (ligne de base, barres grises), pendant (barres noires) et après le relâchement de l'étirement (barres blanches). Les mesures ont été effectuées pour des cellules non déformées (0 % d'étirement, contrôle), soumises à un étirement de 5,5 % ou de 11 %. Adapté de (Gavara *et al.*, 2008). (c) Schéma du déroulement des expériences d'étirement de cellules VIC isolées de type fibroblaste. Une amplitude d'étirement de 10 % est utilisé dans les expériences. Après 24 h, l'étirement est arrêté et les forces de traction sont mesurées. (d) Changement de la force de traction (gauche) et de l'aire (droite) des cellules après un étirement cyclique de 24 h. La variation en pourcentage de la force de traction cellulaire a été normalisée par rapport à la situation contrôle sans étirement. La force de traction et l'aire diminuent après un étirement biaxial (Biax) ou un étirement uniaxial (Uniax) et un étirement uniaxial en présence de TGF- β 1 (TGF β) (qui augmente la contractilité des cellules) sur un substrat de 7,5 kPa. La force de traction et l'aire augmente légèrement avec l'étirement lorsque les cellules sont traitées avec de la blebbistatine 10 mM (Blebb) avant l'étirement et lorsque les cellules sont étirées sur un substrat mou (rigidité de 0,6 kPa). Adapté de (Cirka *et al.*, 2016).

5.9 Importance du temps d'activation de Src

À notre connaissance, il existe peu d'études comparant la réponse bio-mécanique des cellule en réponse à différents types d'activation (activation transitoire, activation soutenue, activation en "oscillations",...) d'une kinase. Par exemple, Klomp *et al.* ont montré qu'une activation courte de Src dans des cellules endothéliales augmente transitoirement l'accumulation de cadhérines VE au niveau des jonction adhérentes mais que l'activation soutenue de Src induit le phénotype inverse, une perméabilité de la barrière endothéliale (Klomp *et al.*, 2019). Ce résultat seul montre que le temps d'activation de la kinase est décisif dans la réponse cellulaire et montre le besoin de mener plus d'études sur l'évolution des phénotypes mécaniques, au cours du temps d'une part, et en réponse à différentes perturbations

d'autre part.

Nous avons observé que le gain en contractilité des cellules n'est pas maintenu lorsque l'activation de Src est maintenue dans le temps (Annexe C) : un mécanisme de régulation permettant à la cellule de retrouver son état contractile d'avant activation existe certainement. L'inhibiteur naturel de Src, Csk, ne peut agir dans notre système : Csk phosphoryle Y527, or dans l'OS, Y527 est muté empêchant l'action de Csk sur l'optoSrc. En revanche, les phosphatases comme PEP sont capables d'inhiber l'activité de Src (Ingley, 2008). La cinétique de réponse des phosphatases étant plus longue que celle des kinases ; elles pourraient donc être responsables de cette régulation négative (Ingley, 2008). Cela ne signifie pas que le phénotype mécanique des cellules Src-activées décrit dans ce manuscrit, n'est que transitoire et n'a qu'une durée de 1 h. En effet, des études suggèrent que la surexpression et la suractivation de Src dans les tissus néoplasiques s'expliquent par l'altération de plusieurs processus de régulation : réduction de l'activité inhibitrice de Csk (Frame, 2002), surexpression/mutation des RTK et modification de l'activité des phosphatases (Summy & Gallick, 2003).

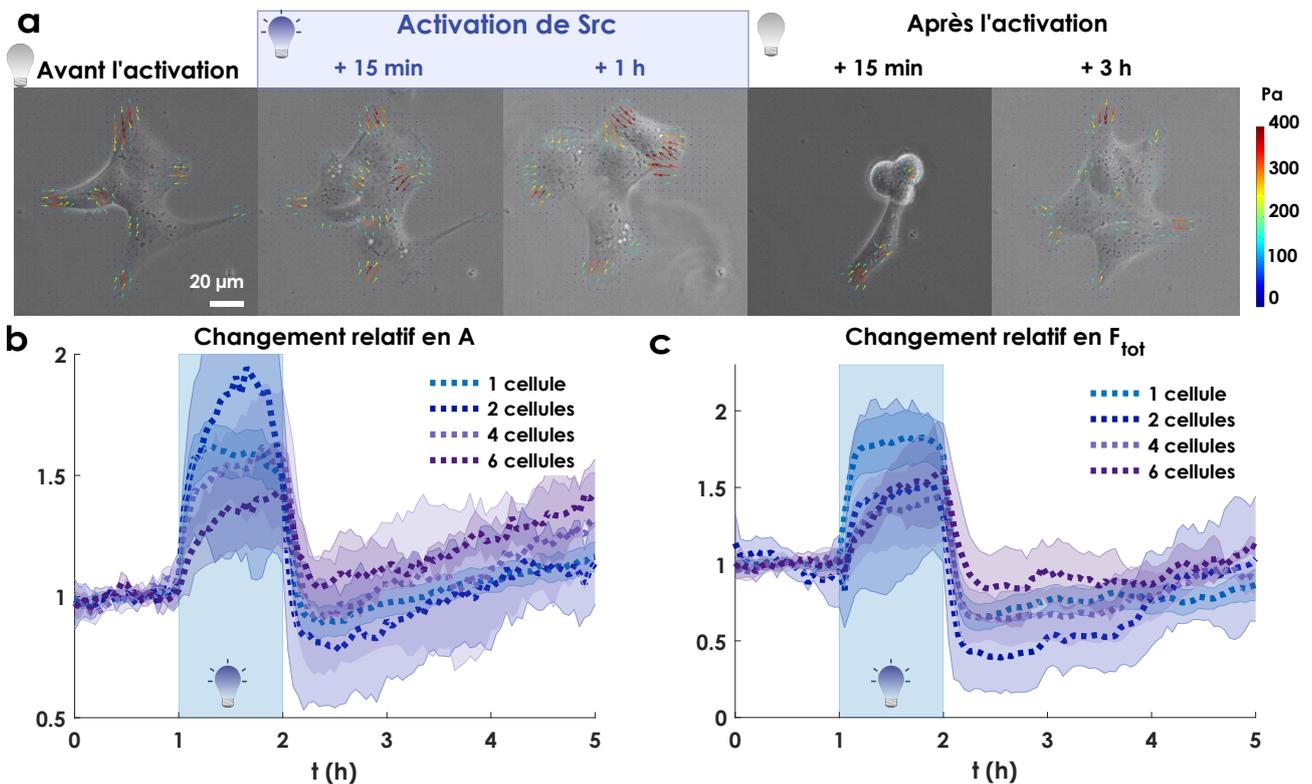


FIGURE III.37 – Réponse mécanique d'un groupe de cellules à une activation transitoire de Src (a) Images en contraste de phase d'un groupe de quatre cellules MDCK OS déposée sur un gel de rigidité 10 kPa et soumise à une activation transitoire de Src d' 1 h pour cinq points de temps : avant l'activation, pendant l'activation (15 min et 1 h après le début de l'activation) et après l'activation (15 min et 3 h après l'activation transitoire de Src) avec les forces de traction superposées (flèches). Leur amplitude en Pascal est codée en couleur. (b-c) Comparaison du phénotype mécanique de groupes de cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src d'1 h selon le nombre de cellules dans le groupe : 1 cellule (bleu clair, $n=71$, $N=8$), 2 cellules (bleu foncé, $n=5$, $N=2$), 4 cellules (violet clair, $n=6$, $N=2$) et 6 cellules (violet foncé, $n=5$, $N=2$). Changement de phénotype mécanique : aire (b) et force totale (c), normalisées par leur valeurs moyennes d'avant activation.

5.10 Phénotype mécanique d'un groupe de cellules Src-activées

Nous avons aussi caractérisé le phénotype mécanique associé à l'activation de Src pour des petits groupes de cellules (groupe de 2, 4 et 6 cellules). Le but était de savoir si le changement de phénotype mécanique décrit à l'échelle de la cellule unique était similaire lorsque la cellule est en interaction avec d'autres cellules. Pour cela, nous avons soumis des petits groupes de cellules déposées sur un gel de rigidité 10 kPa à une séquence d'activation transitoire de Src d'1 h (Figure III.37).

Lors de l'activation, nous observons que les groupes de cellules s'étalent et exercent plus de forces de traction sur leur substrat (Figure III.37). L'amplitude de la réponse semble dépendre du nombre de cellules, cependant ces résultats sont préliminaires et ne nous permettent pas de conclure. De façon intéressante, nous observons une perte mécanique (aire, force) pour les groupes de 2 et 4 cellules (Figure III.37 b,c). Cette perte mécanique semble moins importante pour des groupes de 6 cellules. Ce résultat suggère qu'à partir d'un certain nombre de cellules (ici 6 cellules), le groupe de cellules pourrait avoir une réponse "homéostatique" et retrouver son état mécanique d'avant activation. Enfin remarquons qu'après l'activation transitoire de Src, un arrondissement d'une partie des cellules du groupe est observé, similaire à celui observé à l'échelle de la cellule unique. Cette observation montre que l'arrondissement est une caractéristique de la désactivation de Src, qui intervient à l'échelle de la cellule mais aussi à l'échelle d'un petit nombre de cellules.

Chapitre IV

Mécanosensibilité des cellules Src-transformées

Table des matières

1	Influence de la rigidité du substrat sur le phénotype mécanique de la cellule normale et cancéreuse	122
1.1	Comment la cellule sent-elle la rigidité de son substrat ?	122
1.2	Adaptation du phénotype cellulaire à la rigidité du substrat	123
1.3	Mécanosensibilité des cellules cancéreuses à la rigidité du substrat	131
2	La réponse à l'activation de Src est mécanosensible	134
2.1	Mécanosensibilité des cellules MDCK OS avant activation	134
2.2	Mécanosensibilité des cellules MDCK Src-activées	135
2.3	Comparaison avec la mécanosensibilité des cellules normales	138
2.4	Mesures AFM des cellules Src-activées en fonction de la rigidité du substrat .	139
2.5	Étalement des cellules Src-activées sur le verre	142
3	Effet de la rigidité du substrat sur la réorganisation du cytosquelette des cellules Src-activées	142
3.1	Dynamique de l'actine filamenteuse	142
3.2	Réorganisation du système adhésif	144
3.3	Réorganisation du réseau de fibres de stress	146
3.4	Phénotype mécanique des cellules MDCK après l'activation transitoire de Src en fonction de la rigidité du substrat	149
3.5	Rôle des adhésions dans la réponse mécanosensible des cellules à l'activation transitoire de Src	151
4	Discussion	153
4.1	Mécanosensibilité des cellules MDCK avant activation	153
4.2	Mécanosensibilité des cellules Src-activées	156

Dans ce chapitre, nous caractérisons le phénotype bio-mécanique de cellules individuelles épithéliales MDCK, soumises à une activation transitoire de Src d'1 h en fonction de la rigidité de leur substrat, propriété essentielle de l'environnement, connue pour jouer un rôle important lors de nombreux processus physiologiques. En particulier, nous étudions la mécanosensibilité des cellules Src-activées, ainsi que l'influence de la rigidité du substrat sur les changements du cytosquelette associés à l'activation de Src. Nous nous intéressons ensuite à l'état mécanique post-activation, toujours en fonction de la rigidité du substrat. Pour commencer ce chapitre, nous nous sommes attachés à décrire des résultats issus de la littérature, mettant en lumière le rôle fondamental de la rigidité du substrat sur le phénotype mécanique et l'organisation du cytosquelette de la cellule normale et cancéreuse.

1 Influence de la rigidité du substrat sur le phénotype mécanique de la cellule normale et cancéreuse

1.1 Comment la cellule sent-elle la rigidité de son substrat ?

Plusieurs études ont révélé les mécanismes par lesquels une cellule peut sentir et répondre à la rigidité de son substrat. Wong *et al.* ont utilisé des substrats permettant de tester la détection de la rigidité loin du corps cellulaire (Figure IV.1 a) (Wong *et al.*, 2014). Les auteurs de cette étude ont montré que les cellules étaient capables de sentir la rigidité du substrat qui les entourent, en établissant des protrusions membranaires de type filopodes (Figure IV.1 c) (Wong *et al.*, 2014). De cette façon, la cellule adapte son comportement, notamment sa surface d'étalement, à la rigidité : la cellule initialement sur un substrat dur s'étend si le substrat adjacent est rigide mais restera confinée si le substrat adjacent est "mou" (Figure IV.1 b). Ce mécanisme qui permet de sonder la rigidité en dehors du corps cellulaire permet aux cellules de se déplacer efficacement, en détectant la rigidité du substrat avant de se déplacer, pour éviter un "retour en arrière" (Wong *et al.*, 2014).

Les adhésions focales sont les principaux mécano-détecteurs que la cellule utilise pour sentir la rigidité du substrat. La croissance et la maturation des ces adhésions dépend directement de la rigidité du substrat : sur des substrats rigides, la taille des adhésions tend à augmenter et celles-ci "maturent" ; au contraire sur des substrats peu rigides, les adhésions voient leur taille diminuer et disparaissent avant d'avoir eu le temps de murer (temps de vie court). Au niveau des adhésions focales (AF), les cellules génèrent des forces de traction oscillantes dans le temps qui leur permettent de sonder la rigidité du substrat (Plotnikov *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2017). Plotnikov *et al.* ont montré que la fluctuation de forces au niveau des AF individuelles d'une cellule fibroblaste MEF permet d'échantillonner la rigidité au cours du temps, avec une résolution spatiale correspondant à la densité des AF dans la cellule (1-5 μm d'espacement) (Plotnikov *et al.*, 2012) (Figure IV.1 e,f). Wu *et al.* ont montré que c'est la dynamique des fibres de stress qui permet l'oscillation du pic de traction au niveau des adhésions focales pour assurer une mécanosensibilité efficace des AF (Wu *et al.*, 2017).

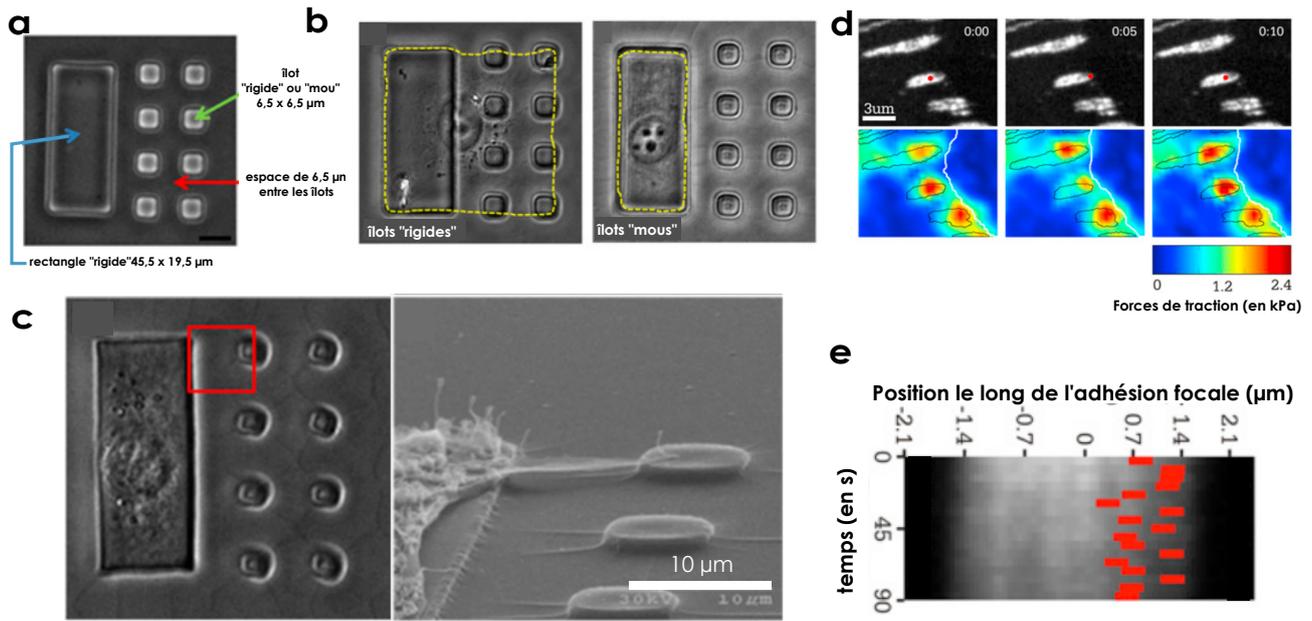


FIGURE IV.1 – Mécanismes pour sentir la rigidité du substrat (a-c) Étude des mécanismes utilisés par des cellules fibroblastes 3T3 pour sentir la rigidité du substrat. Adapté de (Wong *et al.*, 2014). (a) Schéma montrant les deux types de substrats utilisés dans cette étude. Le substrat "test", constitué d'un hydrogel mou (flèche rouge), greffé avec un grand îlot rectangulaire "rigide" (flèche bleue), et deux rangées de quatre îlots de $6,5 \times 6,5 \mu\text{m}$ (flèche verte). Les substrats contrôles sont préparés en greffant les mêmes motifs d'îlots et le grand rectangle rigide sur un hydrogel rigide. Les rigidités des hydrogels "mou" et "rigide" n'ont pas été précisées par les auteurs de l'article. (b) Images en contraste de phase montrant une cellule s'étendant sur les grands et les petits îlots 16 h après le dépôt sur un substrat de contrôle décrit en (a) (à gauche), et une cellule restant sur le grand îlot lorsqu'elle est placée sur un substrat "test" décrit en (a). Les contours des cellules sont indiqués par des lignes pointillées jaunes. (c) Images en contraste de phase d'une cellule sondant la rigidité du substrat d'un petit îlot *via* un filopode qui n'est pas visible sur l'image en contraste de phase (gauche) mais qui devient visible en microscopie électronique à balayage (droite, correspond à la zone encadrée en rouge sur l'image en contraste de phase) : un filopode s'étend en dehors du corps cellulaire au-dessus de l'hydrogel pour atterrir sur un îlot adjacent. (d-e) Fluctuations de forces de traction dans les adhésions focales (AF) pour sentir la rigidité du substrat. Adapté de (Plotnikov *et al.*, 2012) (d) (haut) Images en fluorescence des AF (marquage de la paxilline en GFP) d'une cellule fibroblaste MEF sur un substrat de 8,6 kPa (le temps est indiqué sur les images en min :s, point rouge : position du pic de force de traction pour les AF analysées) et, cartes des forces de traction reconstruites (bas). La couleur code pour l'amplitude des forces de traction (en Pa). Le contour des AF est indiqué en noir. (e) Kymographe le long de l'AF marquée par un point rouge en (d) (Rectangle rouge : position du pic de traction le long de l'AF en fonction du temps).

1.2 Adaptation du phénotype cellulaire à la rigidité du substrat

Étalement de la cellule De nombreuses études ont étudié l'influence de la rigidité du substrat sur l'étalement des cellules. Ces études ont montré que la majorité des cellules adaptent leur surface d'étalement à la rigidité du substrat : les cellules s'étalent plus sur un substrat "rigide" que sur un substrat "mou" (Peyton & Putnam, 2005; Janmey *et al.*, 2009). Peyton & Putnam ont montré que des cellules fibroblastes NIH3T3 ont une surface d'étalement 80 % plus petite sur un substrat de rigidité 1 kPa comparé à lorsqu'elles sont sur du plastique (polystyrène) (Figure IV.2 a). Ils ont aussi montré que

cette mécanosensibilité dépend de la densité de protéines adhésives recouvrant les substrats (Figure IV.2 a).

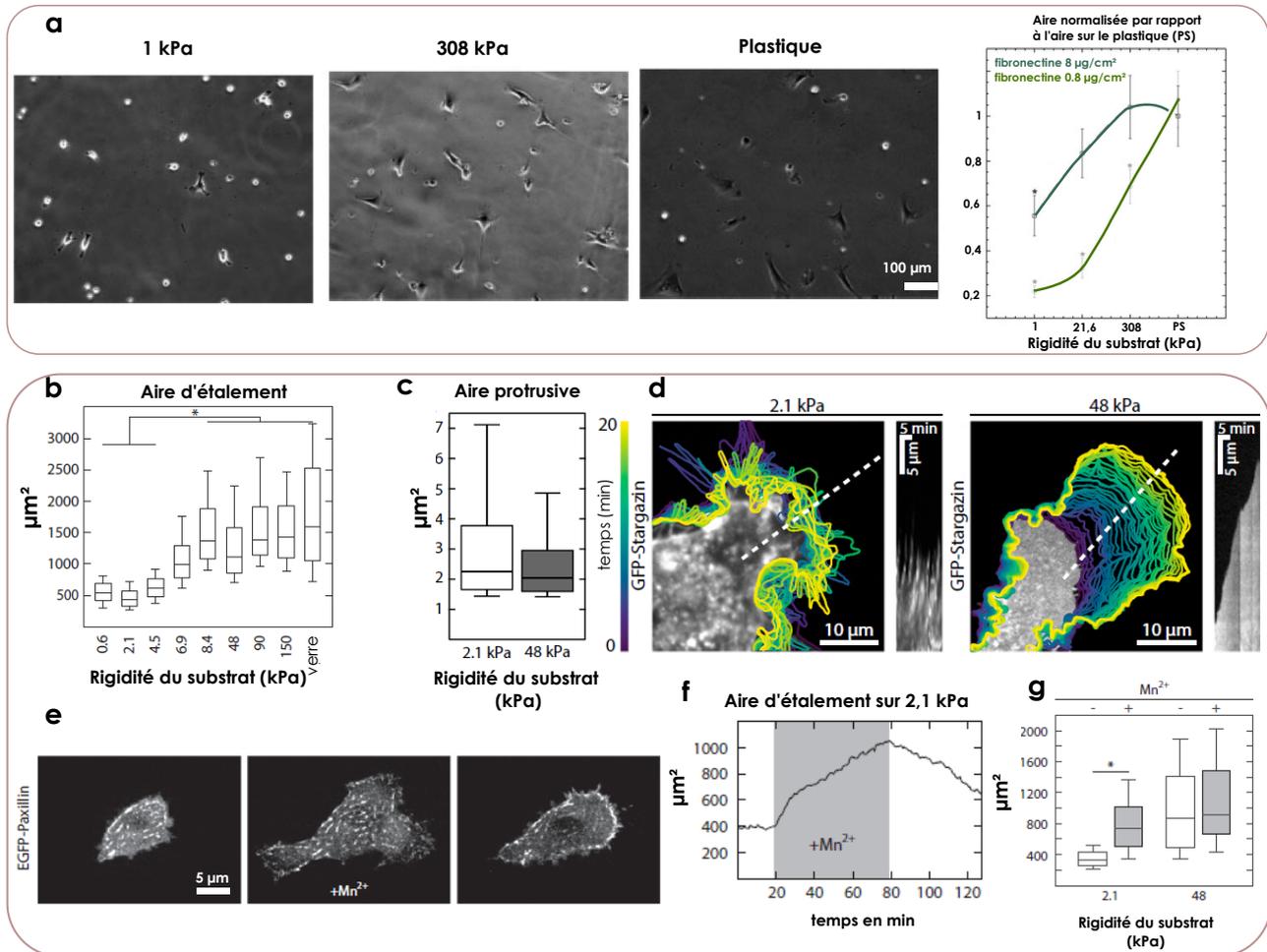


FIGURE IV.2 – Effet de la rigidité du substrat sur l'étalement des cellules (a) (gauche) Images en contraste de phase représentatives de la morphologie et de l'étalement des cellules de muscles lisses vasculaires (SMC) sur différents substrats (gel de polyacrylamide de 1 et 308 kPa, et polystyrène (PS)). (droite) Aire des cellules SMC, normalisée par leur aire moyenne sur du PS, pour des substrats de rigidité différentes : 1, 21, 308 kPa et polystyrène (PS) recouverts de fibronectine : densité de 0,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (vert clair) ou 8,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (vert foncé). Adapté de (Peyton & Putnam, 2005). (b-g) Cellules fibroblastes NIH3T3 déposées sur des gels de PAA recouverts de fibronectine et de rigidité variable (de 0,6 kPa à 150 kPa), et sur du verre. (b) Étalement des cellules en fonction de la rigidité. (c) Aire des protrusions individuelles, sur des substrats de 2 kPa et 48 kPa. (d) Contours d'une cellule exprimant un marqueur membranaire GFP déposée sur des substrats de 2,1 kPa (gauche) et 48 kPa (droite) à différents points de temps (0 à 20 min, contour violet à jaune) avec à droite de chacune, un kymographe, pris le long de ligne blanche pointillée, illustrant la dynamique des protrusions. (e) Images en épifluorescence (marquage de la paxilline, utilisée pour indiquer la position des adhésions focales) d'une cellule NIH3T3 sur un substrat de 2,1 kPa à trois points de temps : avant, après l'ajout de manganèse (3 μM) dans le milieu de culture puis après le lavage du manganèse. (f) Tracé de l'aire de la cellule en fonction du temps pour l'expérience décrite en (e) : ajout de manganèse 20 min après le début de l'expérience puis lavage du manganèse après 80 min d'expérience. (g) Aire d'étalement pour les cellules contrôles (blanc) et les cellules traitées avec du manganèse Mn²⁺ (3 μM) (gris) sur des substrats de 2,1 et 48 kPa. (b-g) adapté de (Oakes *et al.*, 2018).

En 2017, Oakes *et al.* ont montré en utilisant eux aussi des fibroblastes NIH3T3, que l'étalement des cellules est une fonction "biphasique" de la rigidité du substrat : l'étalement reste quasiment constant en dessous de 5 kPa, augmente pour des rigidités comprises entre 5 et 10 kPa, puis sature lorsque la rigidité est au-dessus de 10 kPa (Figure IV.2 b). Les auteurs de cette étude montrent que cette dépendance de l'étalement des cellules avec la rigidité repose sur le temps de vie des adhésions, qui dépend de la rigidité du substrat. Sur un substrat de 2 kPa, les cellules génèrent les mêmes protrusions membranaires que sur un substrat plus rigide mais ces protrusions ne sont pas stabilisées par les adhésions car elles ont un temps de vie plus court que sur les substrats plus rigides (Figure IV.2 c-d). En ajoutant du manganèse, un activateur des intégrines qui augmente le temps de vie des adhésions, Oakes *et al.* ont d'ailleurs montré que les cellules sur des substrats de 2 kPa s'étaient presque autant que sur un substrat de 48 kPa (Figure IV.2 e-g).

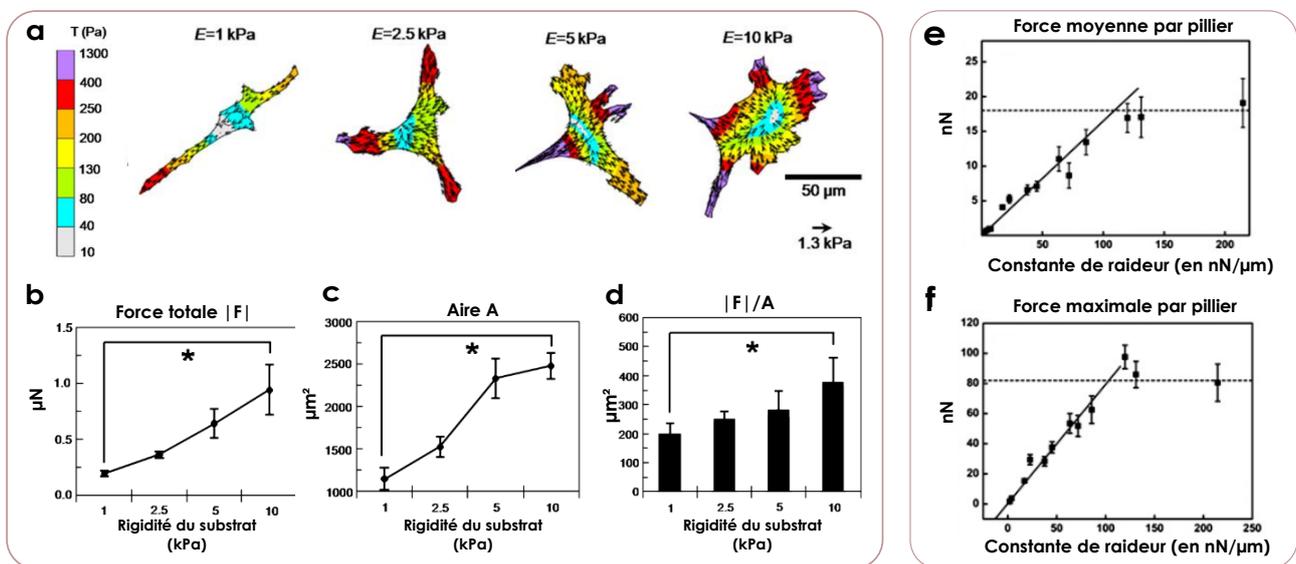


FIGURE IV.3 – Effet de la rigidité du substrat sur les forces de traction générées par les cellules (a) Images représentatives de la morphologie et forces de traction de cellules endothéliales déposées sur des gels de polyacrylamide de rigidité croissante ($E = 1$ à 10 kPa). La couleur et les flèches noires codent pour l'amplitude des forces (en Pa). (b-c) Force de traction totale $|F|$ (b) et aire d'étalement (c) en fonction de la rigidité du substrat (1-10 kPa) recouvert de collagène ($100 \mu\text{g/ml}$). (d) Moyenne de la force de traction totale d'une cellule $|F|$, normalisée par son aire A , en fonction de la rigidité du substrat. (a-d) adapté de (Califano & Reinhart-King, 2010). (e-f) Forces moyennes (e) et maximales (f) exercées par des îlots de cellules épithéliales MDCK sur des substrats composés de micro-piliers de différentes raideurs (0-200 $\text{nN}/\mu\text{m}$). Adapté de (Ghibaudo *et al.*, 2008).

Forces de traction Les forces de traction générées par les cellules augmentent également avec la rigidité du substrat (Ghibaudo *et al.*, 2008; Califano & Reinhart-King, 2010; Schiller & Fässler, 2013). Califano *et al.* ont montré que la force de traction totale ainsi que la force de traction moyenne (force totale normalisée par l'étalement des cellules) exercées par des cellules endothéliales augmentent linéairement avec la rigidité du substrat (Figure IV.3 a-d) (Califano & Reinhart-King, 2010). De même, en utilisant des substrats composés de micro-piliers de raideurs différentes, Ghibaudo *et al.* ont montré

que les forces moyennes et maximales exercées par des cellules épithéliales MDCK¹, augmentent avec la raideur des piliers avant de saturer au delà d'une certaine raideur (Ghibaudo *et al.*, 2008). La relation entre forces de traction et rigidité du substrat peut être plus complexe avec parfois l'existence d'une rigidité seuil, en-dessous de laquelle les forces de traction sont constantes (Elosegui-Artola *et al.*, 2014). Ainsi, Elosegui-Artola *et al.* ont montré que des cellules myoépithéliales n'ont pas la même mécanosensibilité à la rigidité du substrat selon leur composition en intégrines :

- des cellules ne surexprimant pas l'intégrine $\beta 6$ (cellules "myo ctrl") exercent des forces de traction qui augmentent de façon monotone, seulement au-dessus d'un seuil en force, autour de 10 kPa.
- des cellules surexprimant l'intégrine $\beta 6$ (cellules "myo $\beta 6$ ")² exercent des forces qui augmentent de façon monotone avec la rigidité du substrat.

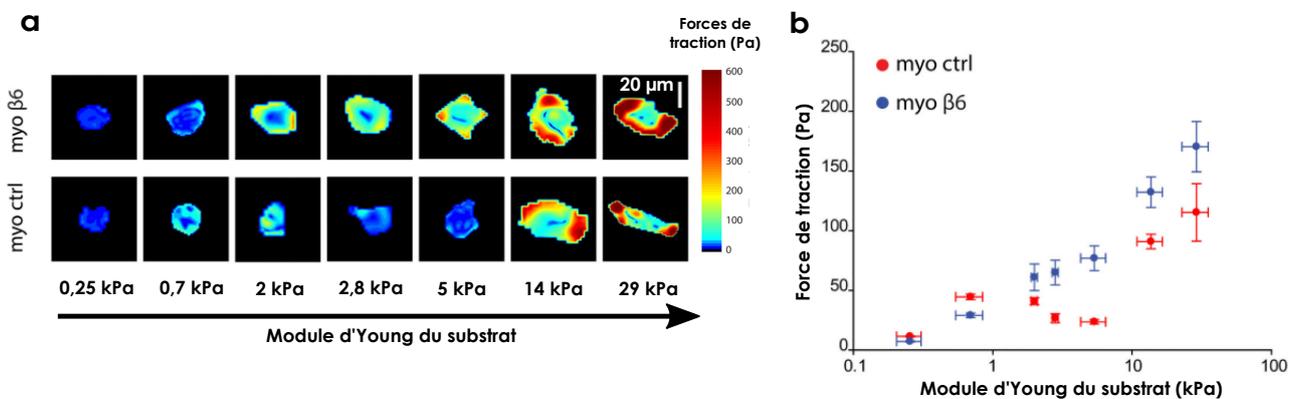


FIGURE IV.4 – Effet de la rigidité du substrat sur les forces de traction générées par les cellules (a) Cartographie des forces de traction exercées par des cellules myoépithéliales sur des gels de polyacrylamide de rigidité croissante, exprimant de manière constitutive l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, avec une surexpression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 6$ ("myo" $\beta 6$) ou sans surexpression de $\alpha 5 \beta 6$ ("myo ctrl"). La couleur code pour l'amplitude des forces (en Pa) (b) Force de traction moyenne en fonction de la rigidité pour les cellules myo ctrl (rouge) et les cellules myo $\beta 6$ (bleu). Adapté de (Elosegui-Artola *et al.*, 2014).

Rigidité corticale De nombreuses cellules adaptent aussi leur rigidité corticale à la rigidité de leur substrat, mais ce n'est pas le cas de toutes les cellules. En 2007, Solon *et al.* ont montré que des fibroblastes adaptent leur rigidité corticale pour s'approcher de celle de leur substrat (Figure IV.5 a) (Solon *et al.*, 2007). Engler *et al.* ont montré par des mesures AFM et par aspiration de micropipette que les cellules souches de moelle osseuse humaine adulte hMSC adaptaient aussi leur rigidité à celle de leur substrat (Engler *et al.*, 2006) (Figure IV.5 b). Les auteurs de cette étude ont d'ailleurs montré que cette réponse à la rigidité du substrat dépend de l'état contractile de la cellule : lorsque les myosines II sont inhibées (en utilisant de la blebbistatine), les cellules n'adaptent plus leur rigidité à

1. Un groupe de cellules exerce des forces principalement en périphérie, similaires à celles exercées par une cellule individuelle, comme si le groupe se comportait comme une seule cellule (Mertz *et al.*, 2012).

2. Intégrine qui se trouve surexprimée dans les cellules cancéreuses du sein

celle du substrat (Figure IV.5 b). En revanche, Poh *et al.* ont montré, par des mesures de cytométrie à torsion magnétique, que les cellules souches embryonnaires (ESC) de souris, contrairement aux cellules souches hMSC, n'adaptent pas leur rigidité à celle du substrat : celle-ci reste constante sur les différents substrats testés (Figure IV.5 b).

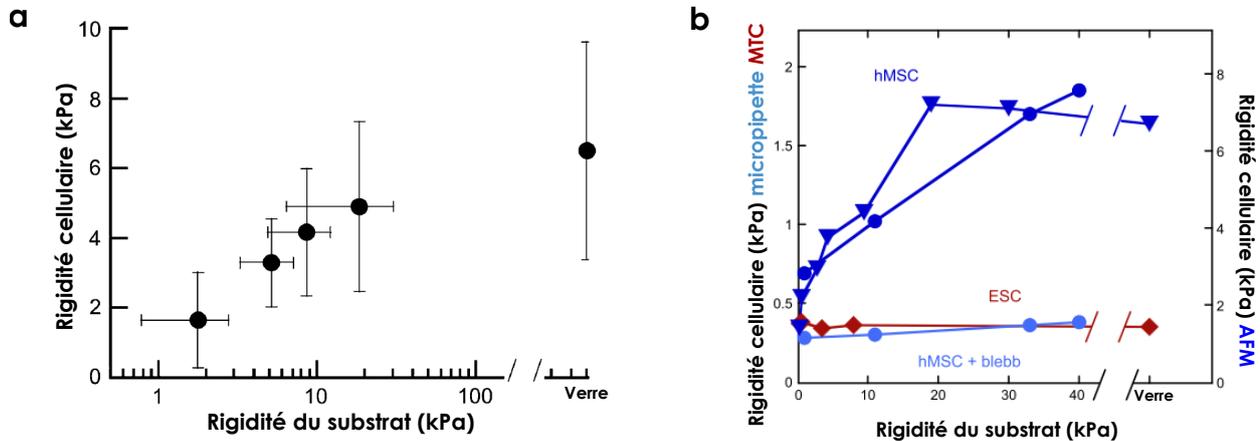


FIGURE IV.5 – Effet de la rigidité du substrat sur la rigidité corticale des cellules (a) Rigidité corticale de cellules fibroblastes 3T3 en fonction de la rigidité du substrat (échelle semi-logarithmique). Adapté de (Solon *et al.*, 2007). (b) Rigidité corticale de cellules souches mesurée par aspiration à l'aide d'une micropipette (cercles), par cytométrie à torsion de billes magnétiques (MTC; losanges) ou par microscopie à force atomique (AFM; triangles). La rigidité corticale des cellules souches de moëlle osseuse humaine adulte (hMSC; bleu foncé) s'adapte à la rigidité du substrat, contrairement à la rigidité des cellules souches embryonnaires murines (ESC; rouge). L'inhibition de la myosine par la blebbistatine supprime la réponse à la rigidité des hMSC (bleu clair). Adapté de (Janmey *et al.*, 2020) d'après (Engler *et al.*, 2006) et (Poh *et al.*, 2010).

Cytosquelette Les changements des propriétés morphologiques et mécaniques des cellules avec la rigidité du substrat s'accompagnent d'un changement de l'organisation du cytosquelette (Califano & Reinhart-King, 2010; Gupta *et al.*, 2015). Gupta *et al.* ont montré que l'organisation du cytosquelette de fibroblastes dépend fortement de la rigidité du substrat (Figure IV.6 a-d). Les auteurs décrivent deux états du cytosquelette d'actine : un état "visqueux" et un état "élastique" (Figure IV.6 a).

- **Pour des substrats de faibles rigidités**, le cytosquelette de la cellule est "fluide" (état "visqueux"). Il se caractérise par un flux rétrograde d'actine important, des adhésions peu stables (durée de vie courte) et peu ou pas de fibres de stress (Figure IV.6 a-d).
- **Pour des substrats de plus grande rigidité**, le cytosquelette de la cellule est plutôt "solide" (état "élastique"). Il est caractérisé par un flux rétrograde d'actine plus faible; des adhésions plus stables, qui ont le temps de mûrir, et un large réseau de fibres de stress contractiles, polarisées pour des substrats de rigidité élevée (Figure IV.6 a-d).

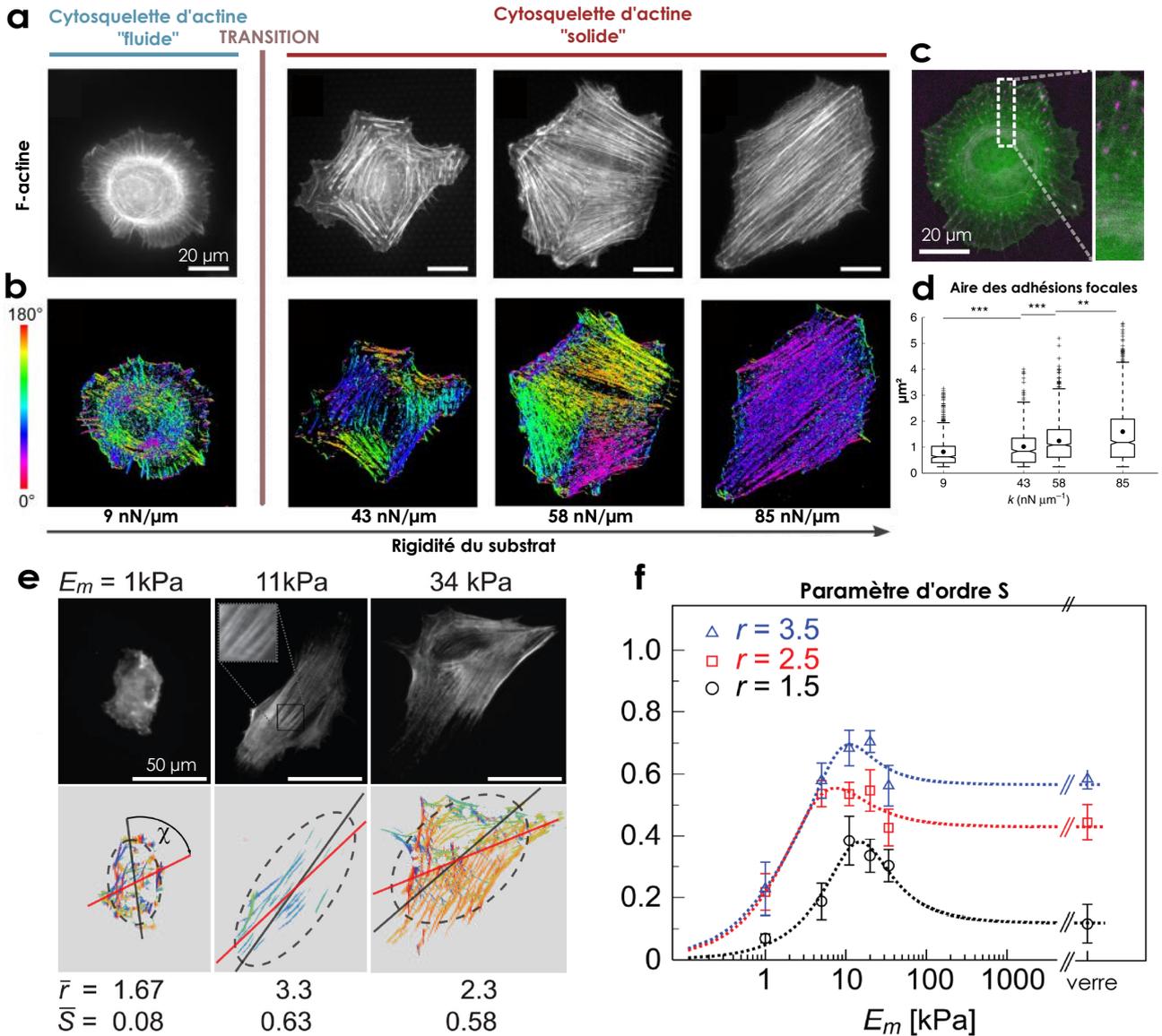


FIGURE IV.6 – **Effet de la rigidité du substrat sur le cytosquelette cellulaire** (a) Images en épifluorescence des filaments d'actine (marquage de la F-actine) de cellules fibroblastes REF-52 sur des substrats constitués de micropiliers de différentes raideurs (de gauche à droite) : 9, 43, 64 et 85 $\text{nN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$. (b) Orientation des filaments d'actine des images présentées en (a). Les couleurs codent pour les différentes orientations des filaments d'actine. Les micro-domaines de fibres d'actine peuvent ainsi être identifiés par les zones uniformément colorées dans les tracés d'orientation. (c) Image d'une cellule REF-52 transfectée avec RFP-Ftractin (vert) et YFP-Paxillin (magenta), sur un substrat "mou" ($9\text{ nN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$). (d) Aire des adhésions focales (AF) (marquage YFP-paxilline) des cellules présentées en (c) en fonction de la raideur des piliers du substrat. Adapté de (Gupta *et al.*, 2015). (e-f) Alignement des fibres de stress d'acto-myosine dans des cellules souches hMSC, déposées sur des substrats de différentes rigidités. (e) (Haut) Cellules hMSC immunomarquées pour la myosine IIa, 24 h après avoir été placées sur des substrats de rigidité E_m de 1 kPa, 11 kPa et 34 kPa. (Milieu) Tracés de l'orientation, codée en couleur, des filaments de myosine des cellules présentées au-dessus. Les ellipses en pointillés correspondent aux ellipses ajustées aux cellules et la ligne rouge indique l'orientation moyenne des fibres de stress. (Bas) Rapport d'aspect moyen r et paramètre d'ordre des fibres de stress $S = \langle \cos(2\theta) \rangle$ des cellules sur des substrats de 1, 11 et 34 kPa avec θ l'angle entre chaque fibre de stress et le grand axe de l'ellipse ajustée. (f) Paramètre d'ordre des fibres de stress S , 24 heures après le dépôt des cellules, pour trois groupes de cellules (de rapports d'aspect $r = 1,5$; $2,5$; $3,5$) en fonction de la rigidité du substrat E_m . Adapté de (Zemel *et al.*, 2010).

Avec l'augmentation de la rigidité du substrat, les cellules forment des adhésions larges et stables (durée de vie élevée) (Oakes *et al.*, 2018) et des fibres de stress apparaissent (Yeung *et al.*, 2005). Ces adhésions et ces fibres de stress permettent à la cellule de maintenir un étalement et d'exercer des forces de traction plus élevées sur leur substrat. Ces fibres de stress peuvent se "polariser" : Zemel *et al.* ont montré qu'il existe une rigidité optimale du substrat qui maximise la polarisation des fibres de stress dans des cellules souches (Zemel *et al.*, 2010) (Figure IV.6 e-f).

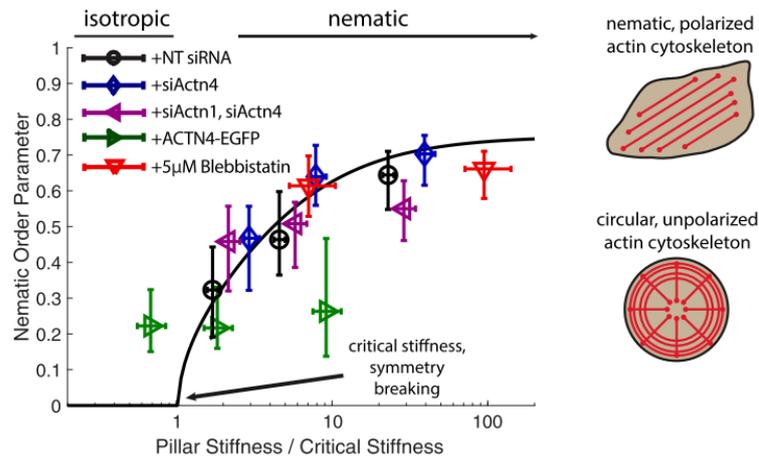


FIGURE IV.7 – **Transition isotrope-nématique du cytosquelette d'actine de fibroblastes en fonction de la rigidité du substrat** Paramètre d'ordre nématique S en fonction de la rigidité du substrat normalisée par la rigidité critique (rigidité de transition entre un état isotrope et un état nématique du cytosquelette d'actine) pour différentes conditions : la situation contrôle (NT siRNA, noir), ou avec *knockdown* de l'actinine 4 (siActn4, bleu), ou avec *knockdown* de l'actinine 1 et 4 (siActn1, siActn4, violet), ou avec surexpression de l'actinine 4 (ACTN4-EGFP, vert), ou en présence de blebbistatine (5 M) (5µM Blebbistatin, rouge), respectivement. Adapté de (Doss *et al.*, 2020).

Plus récemment, Doss *et al.* ont montré que le réseau d'actine de cellules fibroblastes (REF52) s'adapte à la rigidité du substrat. Dans cette article, les auteurs modélisent le cytosquelette d'actine comme un gel actif bidimensionnel qui peut subir une transition isotrope-nématique lors de l'augmentation de la densité ρ de filaments d'actine, transition analogue à celle observée pour des cristaux liquides. L'alignement des filaments d'actine peut être quantifié par le paramètre d'ordre nématique moyenné par cellule S^3 : proche de la transition isotrope-nématique $S \propto (\rho - \rho_c)^{1/2}$, pour $\rho > \rho_c$ tandis que $S = 0$ pour $\rho < \rho_c$, où ρ_c est la densité critique d'actine pour laquelle le cytosquelette d'actine subit une rupture de symétrie (Figure IV.7). De plus, la cellule exerce des contraintes passives considérées comme isotropes et élastiques, proportionnelles au module d'Young de la cellule et des contraintes actives qui dépendent de l'activité des myosines et de la densité de filament d'actine ρ . En considérant la continuité de la contrainte à l'interface cellule-substrat, les auteurs montrent que la densité de filaments d'actine ρ est une fonction du rapport du module d'Young de la cellule sur celui de son substrat, du coefficient de Poisson et de la forme de la cellule (Doss *et al.*, 2020). Les auteurs suggèrent qu'il existe une loi

3. $S = \langle \cos(2\theta) \rangle$ avec θ l'angle entre un filament d'actine et l'angle moyen des filaments d'actine de la cellule

universelle reliant le paramètre d'ordre du cytosquelette d'actine S au ratio de la rigidité de la cellule sur celle du substrat (Doss *et al.*, 2020). La rigidité du cytosquelette d'actine est contrôlée notamment par des protéines réticulantes "actives" comme les myosines II et des protéines réticulantes "passives" (comme l'actinine- α). En augmentant la rigidité du cytosquelette (en surexprimant de l'actinine- α) ou en la diminuant (par le *knock down* de l'actinine- α ou l'inhibition des myosines avec de la blebbistatine) de cellules fibroblastes REF52, Doss *et al.* confirment leurs prédictions théoriques (Figure IV.7).

Motilité cellulaire Plusieurs études ont montré que la vitesse de migration présente une dépendance biphasique à la rigidité du substrat (Stroka & Aranda-Espinoza, 2009; Plotnikov *et al.*, 2012; Bangasser *et al.*, 2017) : elles mettent en évidence l'existence d'une rigidité intermédiaire optimale pour laquelle la vitesse de migration est maximale (Figure IV.8 a,b). La rigidité du substrat peut aussi influencer la direction de migration des cellules : lorsqu'elles sont déposées sur un substrat présentant un gradient de rigidité, les cellule migrent vers les zones les plus rigides (Lo *et al.*, 2000) (Figure IV.8 c,d). Ce phénomène est appelé "durotaxie", et révèle que la cellule est capable de déterminer la rigidité locale de l'environnement ainsi que ses variations à l'échelle de sa taille.

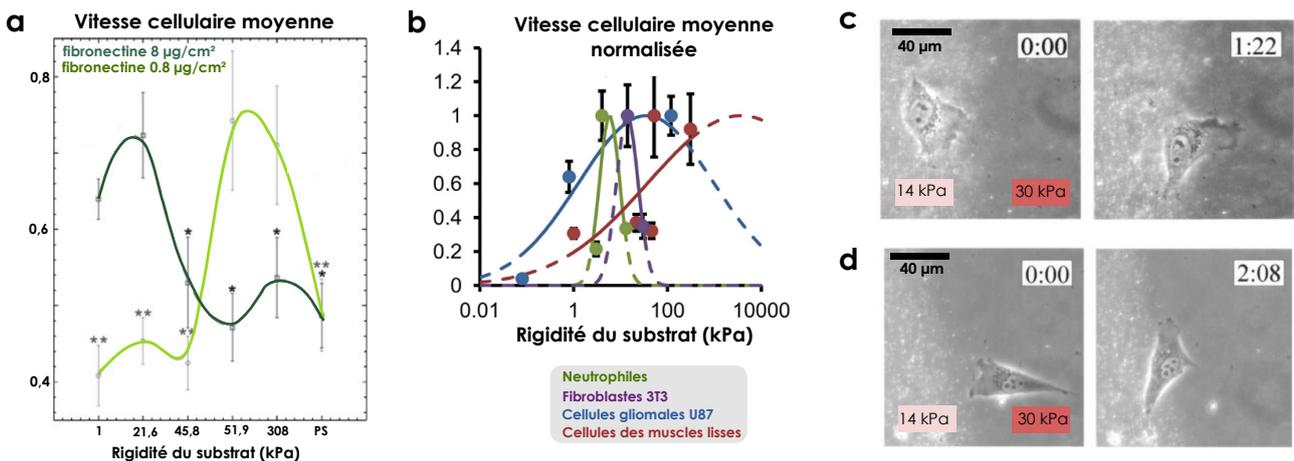


FIGURE IV.8 – **Effet de la rigidité du substrat sur la vitesse de migration des cellules** (a) Vitesses de migration moyennes de cellules musculaires lisses vasculaires déposées sur des substrats de différentes rigidités (de 1 à 308 kPa et polystyrène (PS)), recouverts de fibronectine à faible densité (0,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ou à densité élevée (8,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Adapté de (Peyton & Putnam, 2005). (b) Vitesses de migration cellulaire moyenne (normalisées par les vitesses maximales) pour des neutrophiles, des fibroblastes NIH3T3, des cellules de gliome U87, et des cellules de muscle lisse, en fonction de la rigidité du substrat. Des gaussiennes ont été ajustées aux données pour montrer les optima potentiels de rigidité. Adapté de (Bangasser *et al.*, 2013). (c-d) Images avec un éclairage simultané en contraste de phase (visualisation des cellules) et en fluorescence (visualisation des billes du gel) montrant la migration de cellules fibroblastes 3T3 sur des substrats présentant deux rigidités : 14 kPa à gauche, 30 kPa à droite (le changement de rigidité peut être visualisé par le changement de densité des billes fluorescentes incorporées). (c) Une cellule déposée au niveau d'une région de rigidité 14 kPa se déplace vers les régions de plus grande rigidité. (d) Une cellule déposée sur une région "dure" du substrat se déplace le long du gradient de rigidité, change de direction en arrivant au niveau du substrat de 14 kPa et se déplace le long de la frontière entre les deux substrats. Le temps est indiqué en heures sur les images. Adapté de (Lo *et al.*, 2000).

Autres fonctions : croissance, prolifération et différenciation La rigidité du substrat régule la croissance et la prolifération des cellules : croissance et prolifération sont inhibées sur des substrats de faible rigidité et sont réactivées lorsque la rigidité augmente (Janmey *et al.*, 2020). Enfin, la rigidité du substrat affecte la différenciation : des cellules souches cultivées sur des substrats de différentes rigidités vont se différencier différemment (Engler *et al.*, 2006; Saha *et al.*, 2008; Janmey *et al.*, 2020).

1.3 Mécanosensibilité des cellules cancéreuses à la rigidité du substrat

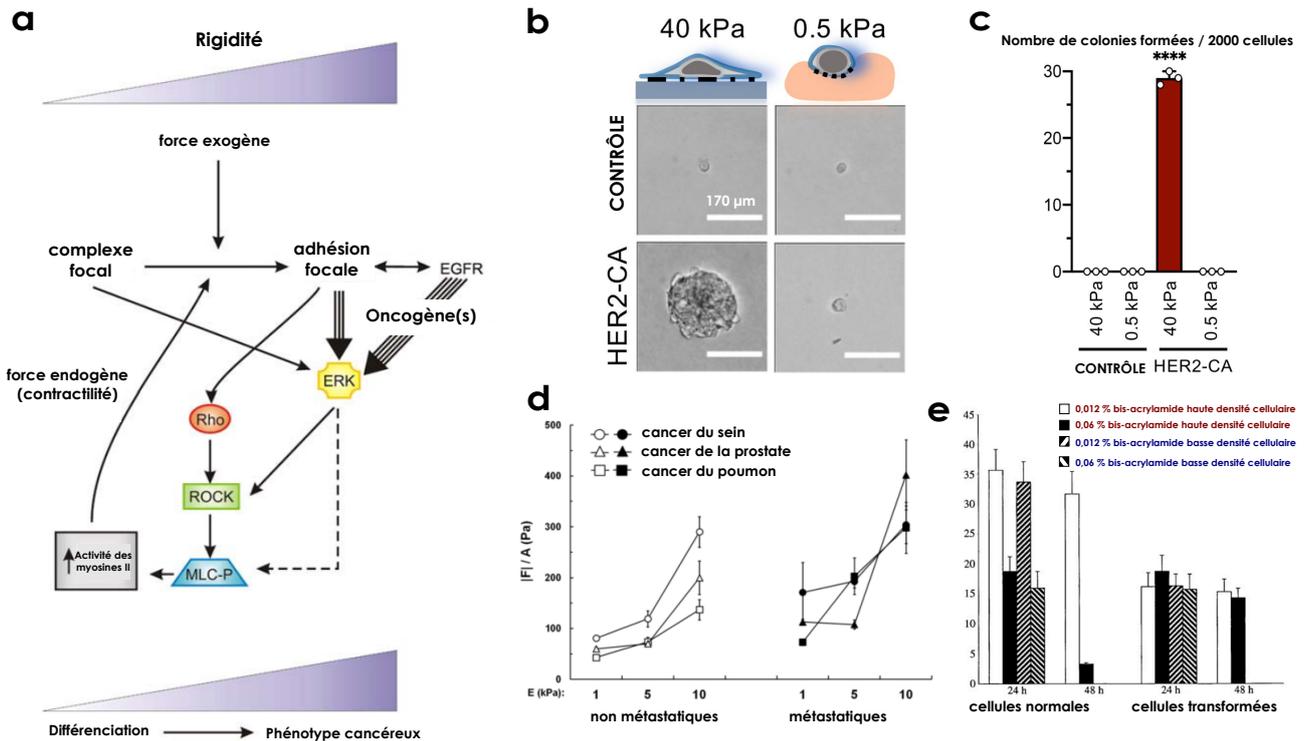


FIGURE IV.9 – Mécanosensibilité des cellules transformées et cancéreuses (a) Modèle d'homéostasie tensionnelle et de transformation maligne dépendant de la force extérieure, en particulier de celle exercée par la rigidité du substrat. Possible existence d'un circuit mécanorégulateur qui régulerait le phénotype des cellules et fonctionnerait sur l'intégration des signaux physiques provenant de la MEC (force "exogène") avec l'assemblage des AF par le biais de la contractilité du cytosquelette dépendante de ERK et de Rho. La rigidification de la MEC active différentes voies de signalisation, entraînant ainsi la transformation maligne du phénotype de la cellule. Adapté de (Paszek *et al.*, 2005). (b-c) Images représentatives (b) et quantifications (c) des colonies solides formées par les cellules mLD contrôles (haut) et transfectées avec HER-CA (oncoprotéine HER constitutivement active) (bas), cultivées sur des hydrogels de 40 kPa ou de 0,5 kPa. Adapté de (Panciera *et al.*, 2020). (d) Force de traction moyenne, mesurée en normalisant la force totale de chaque cellule par son aire d'étalement pour différents types de cellules cancéreuses, métastatiques (en noir) et non métastatiques (en blanc). Adapté de (Kraning-Rush *et al.*, 2012). (e) Effet de la rigidité du substrat sur le pourcentage de cellules apoptotiques dans des populations de cellules NIH3T3 normales, et transformées par l'oncogène H-Ras. Les cellules sont cultivées sur des gels de PAA souples (0,012 % bis-acrylamide) ou rigides (0,06 % bis-acrylamide). La proportion de cellules apoptotiques est mesurée 24 h (pour 2 densités cellulaires) et 48 h après l'ensemencement des cellules. Adapté de (Wang *et al.*, 2000).

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à la mécanosensibilité de cellules transformées par l'expression d'un oncogène. Nous présentons donc dans ce paragraphe quelques travaux étudiant la mécanosensibilité de cellules transformées par un oncogène, ou celle de cellules cancéreuses. La rigidité de la matrice extracellulaire entourant une tumeur se rigidifie au cours de la carcinogenèse (Levental *et al.*, 2009; Pickup *et al.*, 2014). De plus, au cours de la cascade métastatique, les cellules cancéreuses vont interagir avec des environnements dont la rigidité peut varier. Gensbittel *et al.* ont d'ailleurs proposé que la cellule adapte constamment sa rigidité pour faire face à ces changements (Gensbittel *et al.*, 2020). Dans ce contexte, comprendre comment les cellules cancéreuses s'adaptent à la rigidité de leur substrat *ie.* étudier leur mécanosensibilité et la comparer à celle des cellules saines est essentiel.

Effet de la rigidité sur la transformation oncogénique La rigidité du substrat affecte directement la transformation oncogénique. Paszek *et al.* ont montré que l'augmentation de la rigidité du substrat au cours du processus tumoral augmente la probabilité d'activer des oncogènes comme ERK dans des cellules épithéliales et donc favorise la tumorigenèse (Paszek *et al.*, 2005) : sur un substrat rigide, les protéines Erk et Rho sont activées et celles-ci ont un rôle important dans la transformation du phénotype des cellules en un phénotype malin (Figure IV.9 a). Panciera *et al.* ont également montré que dans le cas de l'oncogène HER, il existe une rigidité seuil au-dessus de laquelle la transformation oncogénique se fait : pour un substrat de 40 kPa, une cellule épithéliale du sein mLD (cellule luminale différenciée), transfectée avec un HER constitutivement actif, se transforme et se divise pour donner naissance à une colonie de cellules, alors qu'elle ne se transforme pas sur un substrat de 0,5 kPa (Panciera *et al.*, 2020)(Figure IV.9 b-c). Ainsi la rigidité de la matrice extracellulaire (MEC) joue un rôle régulateur : des MEC peu rigide peuvent empêcher la transformation des cellules et le développement de tumeurs.

Altération de la mécanosensibilité des cellules transformées ou cancéreuses De nombreuses cellules cancéreuses adaptent donc leur phénotype à la rigidité de leur substrat. Cependant cette adaptation diffère de celle des cellules normales. Kraning-Rush *et al.* ont montré que les cellules métastatiques provenant du cancer du sein, de la prostate et du poumon, ont une mécanosensibilité différente de celle des cellules non métastatiques : les cellules métastatiques exercent plus de forces de traction sur des substrats "mous" que les cellules non métastatiques. Cet accroissement de contractilité pourrait contribuer au pouvoir invasif des cellules métastatiques (Figure IV.9 d) (Kraning-Rush *et al.*, 2012). La rigidité du substrat joue aussi un rôle essentiel dans la prolifération de cellules normales, et transformées par des oncogènes comme H-Ras. Wang *et al.* ont montré que les fibroblastes NIH3T3 normales de souris voient leur prolifération, leur étalement et leurs forces de traction diminuer sur des substrats "mous" (Wang *et al.*, 2000). En revanche, les cellules NIH3T3 transformées par l'oncogène H-Ras parviennent à s'étaler, exercer des forces de traction et proliférer de façon anormale sur ces mêmes substrats mous. Cette mécanosensibilité altérée sur des substrats de faible rigidité pourrait donner un avantage aux cellules transformées comparé aux cellules saines voisines (Wang *et al.*, 2000)

(Figure IV.9 e). Certains comportements mécanosensibles tels que la migration ou la durotaxie sont également modifiés dans le contexte de la carcinogenèse. Certaines cellules cancéreuses du sein, du poumon et de la prostate, peu adhérentes, présentent une durotaxie dite "négative" : elles se déplacent dans le sens opposé au gradient de rigidité du substrat (Yeoman *et al.*, 2021). Les auteurs expliquent ce phénomène par des adhésions plus stables sur les substrats mous pour ces cellules cancéreuses. D'autres études ont montré que certaines cellules transformées ou cancéreuses perdent leur sensibilité à la rigidité du substrat. Par exemple, les fibroblastes NIH3T3, qui modifient leur rigidité corticale en fonction de la rigidité du substrat (Solon *et al.*, 2007), perdent cette capacité lorsque l'oncoprotéine H-Ras^{V12} est surexprimée dans ces cellules (Lin *et al.*, 2015). Cette étude montre également que les fibroblastes transformés par Ras retrouvent leur mécanosensibilité après les avoir traitées avec un inhibiteur de Ras, l'acide farnesylthiosalicylique. De même, Wolfenson *et al.* ont montré que les cellules métastatiques du sein perdent leur sensibilité à la rigidité du substrat, contrairement aux cellules normales MCF10. L'absence de tropomyosine dans le module de mécanodétection explique ce phénomène : lorsque la tropomyosine est transfectée dans ces cellules, les cellules MDA231 retrouvent leur mécanosensibilité au substrat en exerçant des contractions différentes sur des substrats de rigidités différentes (Wolfenson *et al.*, 2016).

Dans les figures de ce chapitre, sauf mention contraire :

- n indique le nombre de cellules considérées, N le nombre d'expériences indépendantes pour la condition considérée.
- dans ce chapitre, nous avons utilisé l'anisotropie de forme et l'anisotropie de force plutôt que l'isotropie de forme et l'isotropie de force pour faire apparaître des maximums de polarisation de forme et de force pour la cellule MDCK OS avant activation.
- les *boxplots* indiquent le premier quartile, la médiane et le troisième quartile. Les tests utilisés sont des tests-U de Mann-Whitney : n.s (non significatif) correspond à une valeur de p supérieure à 0,05, autrement la valeur de p est indiquée sur le graphe.
- pour les courbes de changement de phénotype mécanique : la courbe en pointillée correspond à la moyenne et la zone ombrée à 95 % de l'intervalle de confiance de la moyenne des quantités mesurées.
- les données correspondant aux MDCK OS soumises à une activation transitoires de Src de 1 h déposées sur les substrats de rigidité différentes sont dupliquées de nombreuses fois pour faciliter la comparaison avec les autres conditions.

2 La réponse à l'activation de Src est mécanosensible

Afin d'étudier la mécanosensibilité des cellules Src-activées, nous avons déposé des cellules MDCK OS isolées sur des gels de PAA de rigidité différente et nous les avons soumises à une activation transitoire de Src d'1 h (1h OFF/1h ON/OFF). Nous avons choisi d'utiliser les rigidités suivantes : 2, 10, 40 kPa et 100 kPa, qui correspondent globalement à des rigidités physiologiques : celles des tissus de cerveau (0,1-1 kPa), des muscles (8-17 kPa) et des os (25-100 kPa) (Engler *et al.*, 2006).

2.1 Mécanosensibilité des cellules MDCK OS avant activation

Nous avons d'abord caractérisé la mécanosensibilité des cellules MDCK OS avant activation. Pour cela, nous avons caractérisé le phénotype mécanique en fonction des différentes rigidités utilisées : l'étalement, la force totale, l'anisotropie de forme et l'anisotropie de force des cellules (Figure IV.10).

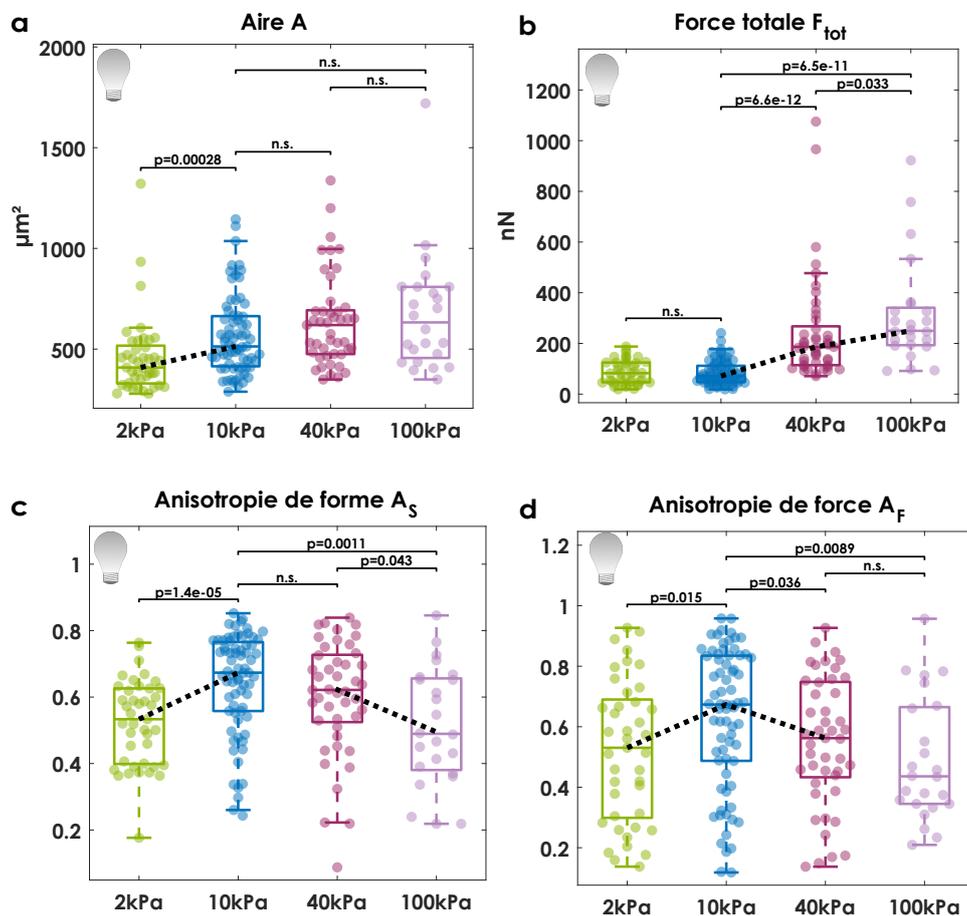


FIGURE IV.10 – Phénotype mécanique des cellules MDCK OS dans le noir 6 h après ensemencement, en fonction de la rigidité du substrat Aire d'étalement A (μm^2) (a), force totale F_{tot} (nN) (b), anisotropie de forme A_S (sans unité) (c) et anisotropie de force A_F (sans unité) (d) des cellules MDCK OS dans le noir sur des substrats de rigidité 2 kPa (vert, $n=41$, $N=4$), 10 kPa (bleu, $n=71$, $N=8$), 40 kPa (rose, $n=45$, $N=7$) et 100 kPa (violet, $n=24$, $N=2$). Les lignes noires pointillées passant par les médianes des distributions sont des tendances qui servent de guide pour l'œil.

Nous retrouvons les évolutions de l'aire et des forces de traction en fonction de la rigidité décrites

dans la littérature pour d'autres types cellulaires. L'étalement augmente entre 2 kPa et 10 kPa avec la rigidité du substrat puis semble saturer pour des rigidités supérieures à 10 kPa (Figure IV.10 a). La force, quant à elle, est la même pour les rigidités de 2 et 10 kPa puis augmente pour les rigidités supérieures à 10 kPa (Figure IV.10 b).

La rigidité de 10 kPa apparaît être une rigidité particulière pour les cellules MDCK OS normales, pour différentes raisons :

- 10 kPa est la rigidité qui maximise l'anisotropie de force et l'anisotropie de forme de la cellule : la forme de la cellule et la distribution de ses forces sont donc moins polarisées sur des substrats plus ou moins rigides (Figure IV.10 c,d)
- 10 kPa correspond à "une rigidité seuil" à partir de laquelle les forces exercées par les cellules augmentent avec la rigidité (Figure IV.10 b) alors que la cellule est bien étalée.

En résumé, 10 kPa est donc une rigidité particulière pour laquelle les cellules sont relativement étalées mais exercent des forces de traction relativement faibles (Figure IV.10 a,b).

2.2 Mécanosensibilité des cellules MDCK Src-activées

Nous avons ensuite mesuré le changement de phénotype mécanique au cours de l'activation transitoire de Src pour les différentes rigidités (Figure IV.11). Quelle que soit la rigidité du substrat, nous observons que les cellules Src-activées s'étalent, exercent plus de force de traction et ont une forme et une distribution de forces plus isotropes qu'avant activation. Cependant, l'amplitude et l'évolution temporelle de la réponse mécanique dépendent de la rigidité du substrat (Figure IV.11).

Amplitude Nous pouvons comparer l'amplitude des réponses en mesurant les gains maximaux en aire et en contractilité ainsi que les changements en isotropie de force et de forme des cellules Src-activées, sur les différents substrats (Figure IV.12) (voir paragraphe 7.5 pour plus de détail) :

- **Gain en étalement** (Figure IV.12 a) : il est plus faible sur un substrat de 2 kPa, il semble saturer pour les rigidités supérieures à 10 kPa.
- **Gain en contractilité** (Figure IV.12 b) : il est maximal à 10 kPa et à 100 kPa.
- **Changement en anisotropie de forme** (Figure IV.12 c) : il est maximum pour les rigidités de 10 et 40 kPa. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les cellules sur les substrats de 10 et 40 kPa sont plus polarisées ($A_s \sim 0,6 - 0,7$) que les cellules sur des substrats de 2 kPa et 100 kPa pour laquelle l'anisotropie de forme est $A_s \sim 0,5$. Lors de l'activation de Src, qui tend à rendre les cellules isotropes, les cellules déposées sur des substrats de 10 et 40 kPa ont donc davantage la possibilité de gagner en isotropie comparé aux cellules déposées sur des substrats de 2 ou 100 kPa.
- **Changement en anisotropie de force** (Figure IV.12 d) : il est minimal pour la rigidité de 2 kPa. Au dessus de 10 kPa, le changement en isotropie de force semble constant quelque soit la rigidité du substrat. Il est intéressant de noter que le changement en isotropie de force

ne suit pas la même tendance que celle du changement en isotropie de forme : les cellules sur des substrats de 100 kPa, bien que présentant déjà une distribution des forces isotropes avant activation, présentent tout de même un changement notable de l'isotropie de force pendant l'activation de Src.

Ici encore, 10 kPa apparaît donc comme une rigidité particulière pour les cellules Src-activées.

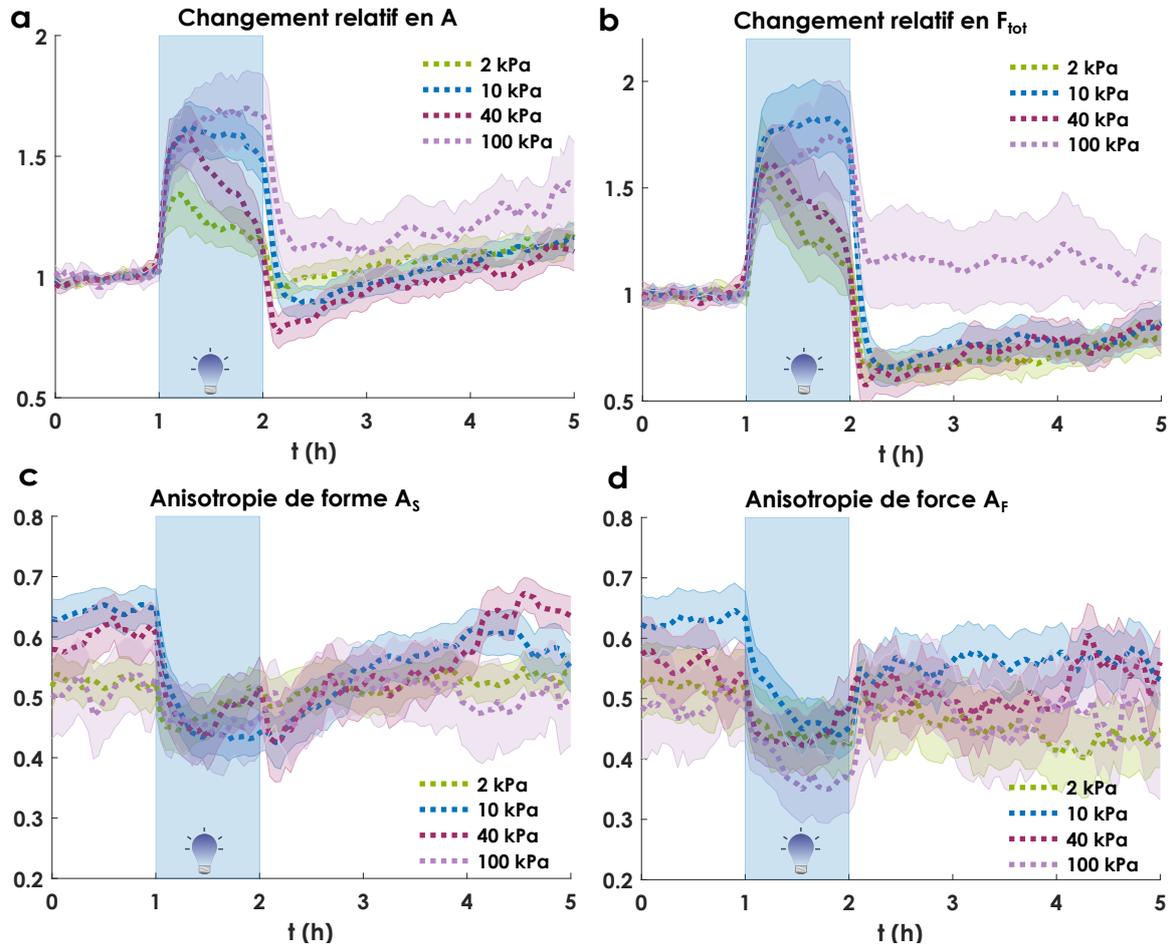


FIGURE IV.11 – Réponse mécanique des cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src de 1 h en fonction de la rigidité du substrat sur lequel les cellules sont déposées Sur un substrat de 2 kPa (vert, $n=41$, $N=4$), de 10 kPa (bleu, $n=71$, $N=8$), de 40 kPa (rose, $n=45$, $N=7$) et de 100 kPa (violet, $n=24$, $N=2$) : aire (a), force totale (b), anisotropie de forme (c) et anisotropie de force (d). L'aire et la force totale sont normalisées par leur valeur moyenne avant activation.

Évolution temporelle Durant l'activation de Src, les phénotypes mécaniques sont maintenus uniquement lorsque les cellules sont déposées sur des substrats de rigidité 10 kPa et 100 kPa. Sur les substrats de rigidité 2 kPa et 40 kPa, nous observons une baisse des gains en aire et en contractilité (Figure IV.11) : ces réponses en aire et en contractilité "non maintenues" sur les substrats de 2 et 40 kPa se rapprochent de la réponse mécanique que nous avons obtenue en inhibant les myosines II avec la para-nitro-blebbistatine (Figure III.15). Cette ressemblance pourrait suggérer un manque d'efficacité des myosines II pour ces deux rigidités.

État après l'activation Après l'activation de Src, les cellules présentent une perte en force comparé à l'état avant activation pour des rigidités de 2, 10 et 40 kPa, alors qu'elles présentent un petit gain en force pour une rigidité de 100 kPa. Nous reviendrons sur ce point dans la suite de ce chapitre (voir partie 3.4).

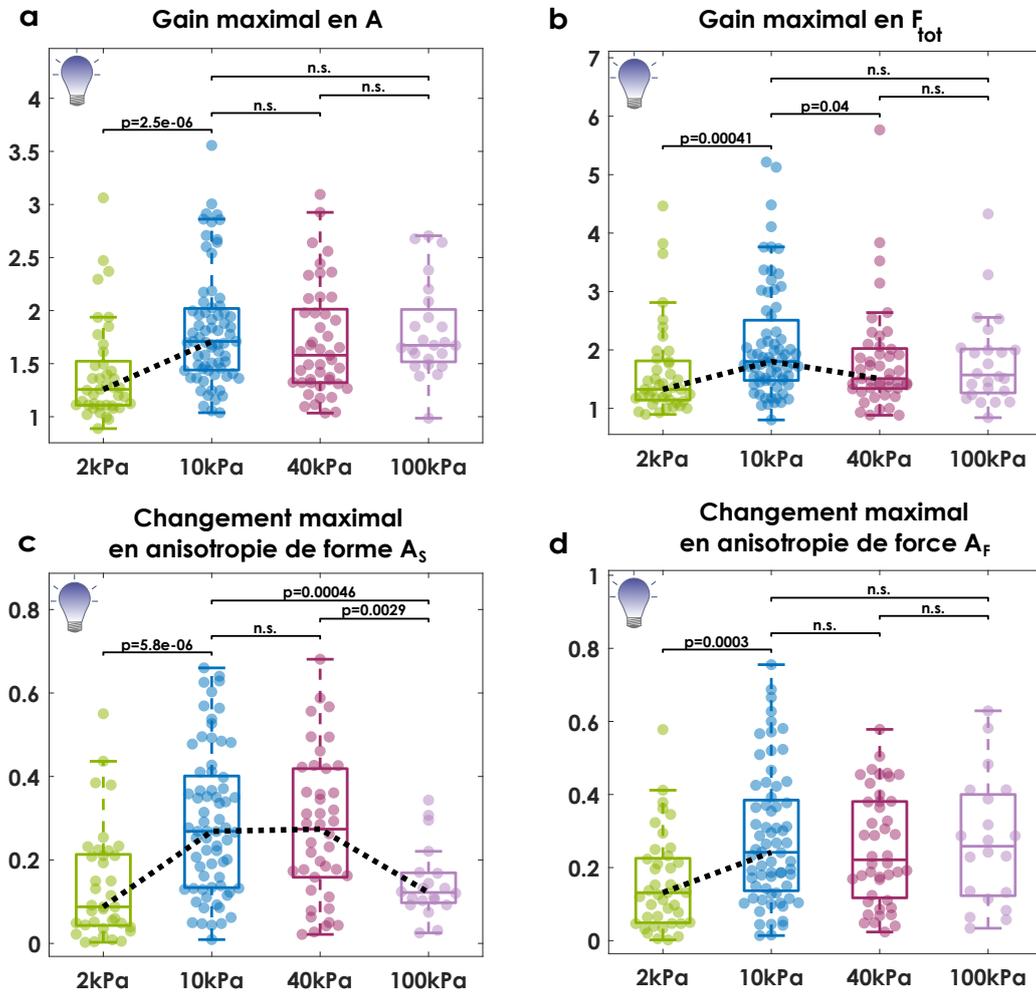


FIGURE IV.12 – Gain maximal en aire et en force totale, et changement maximal en anisotropie de forme et de force des cellules Src-activées, comparés à leur état avant activation. (a-b) Mesure du gain maximal en aire (a) et en force totale (b) des cellules Src-activées (activation de Src d'1h) sur un substrat de rigidité 2 kPa (vert, n=41, N=4), de 10 kPa (bleu, n=71, N=8), de 40 kPa (rose, n=45, N=7) et de 100 kPa (violet, n=24, N=2). (c-d) Pour les conditions décrites en (a,b), changement maximal, relatif à l'état avant activation, en anisotropie de forme (c) et anisotropie de force (d). Les lignes noires pointillées passant par les médianes des distributions sont des tendances qui servent de guide pour l'œil.

Expériences contrôles Nous avons vérifié que les cellules sur des substrats de 2, 10 et 40 kPa et laissées dans le noir ne présentent pas de changement de phénotype mécanique (Figure IV.13).

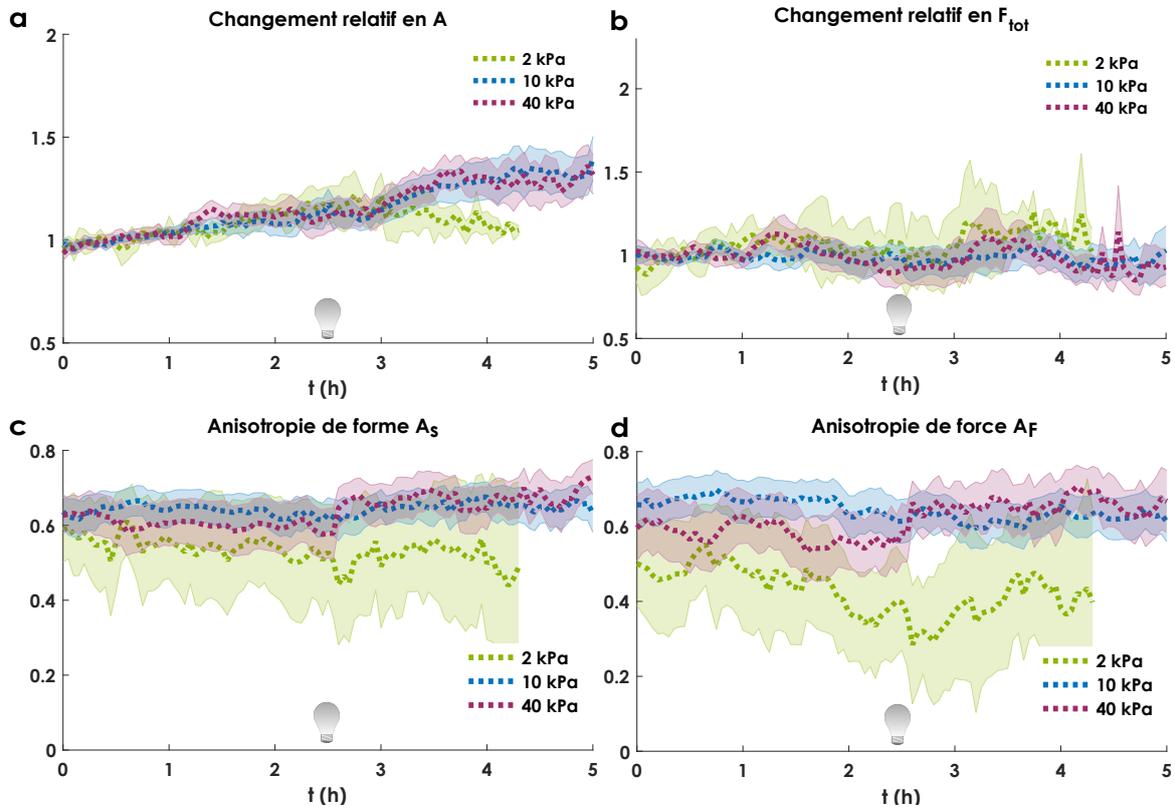


FIGURE IV.13 – Phénotype mécanique de cellules MDCK OS non illuminées en lumière bleue en fonction de la rigidité du substrat sur lequel elles sont déposées (a-d) Substrat de rigidité 2 kPa (vert, $n=7$, $N=2$), 10 kPa (bleu, $n=42$, $N=8$) et 40 kPa (rose, $n=30$, $N=6$) : aire (a), force totale (b), normalisées par leur valeur moyenne avant activation, anisotropie de forme (c), anisotropie de force (d).

2.3 Comparaison avec la mécanosensibilité des cellules normales

Pour comparer la mécanosensibilité des cellules Src-activées à celle des cellules dites "normales", nous avons tracé les quatre métriques du phénotype mécanique des cellules normales (avant activation) et des cellules Src-activées (pendant l'activation de Src) sur le même graphe en fonction de la rigidité du substrat (sans avoir normalisé l'aire et la force) (Figure IV.14). Nous remarquons que la mécanosensibilité des cellules Src-activées est altérée :

- **Contractilité** : la force totale augmente avec la rigidité du substrat, il n'y a plus de plateau en force entre 2 et 10 kPa pour les cellules Src-activées (Figure IV.14 b).
- **Anisotropie de forme** : il y a une "inversion" de la courbe, le maximum en anisotropie de forme à 10 kPa devient un "minimum" pour les cellules Src-activées (Figure IV.14 c).
- **Anisotropie de force** : le maximum à 10 kPa disparaît pour les cellules Src-activées, l'anisotropie semble diminuer avec la rigidité du substrat (Figure IV.14 d).

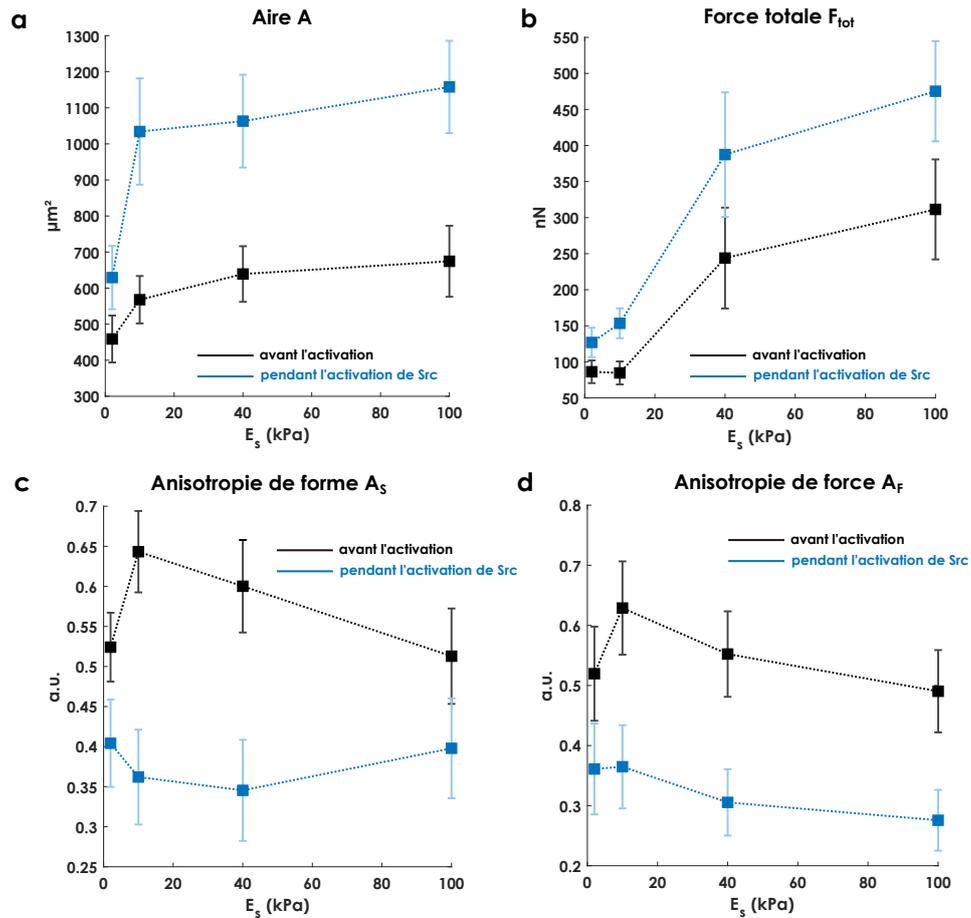


FIGURE IV.14 – Mécanosensibilité des cellules MDCK OS normales et Src-activées Phénotype mécanique des cellules MDCK OS normales (avant activation, noir) et des cellules Src-activées (pendant l'activation, bleu) en fonction de la rigidité du substrat E_s (2 kPa (n=41, N=4), 10 kPa (n=71, N=8), 40 kPa (n=45, N=7) et 100 kPa (n=24, N=2)) : aire (a), force totale (b), anisotropie de forme (c) et anisotropie de force (d). Les lignes pointillées correspondent aux valeurs moyennes, les barres d'erreur à 95 % de l'intervalle de confiance de la moyenne des quantités mesurées.

2.4 Mesures AFM des cellules Src-activées en fonction de la rigidité du substrat

Pour aller plus loin dans la caractérisation du phénotype mécanique, nous avons mesuré en utilisant un AFM, la rigidité et le volume des cellules avant et après ~ 10 min d'activation de Src pour des cellules MDCK OS déposées sur des substrats de rigidité 2, 10 et 40 kPa.

Rigidité cellulaire et volume Avant l'activation, nous n'observons pas de différence significative pour la rigidité (moyenne sur toute la cellule) sur ou le volume des cellules déposées sur les différents substrats (Figure IV.15 b,c). Nous n'avons pas analysé un nombre important de cellules, mais une tendance se dessine : une rigidité cellulaire maximale pour une rigidité de 10 kPa. Si cette tendance est confirmée, 10 kPa apparaîtra encore comme une rigidité particulière pour les cellules MDCK normales. Pendant l'activation de Src, nous n'observons pas de changement significatif pour la rigidité (gain ~ 1) (Figure IV.15 e). En revanche, nous observons un petit gain en volume de l'ordre de 5 %

pour des cellules déposées sur des substrats de rigidité 10 kPa (Figure IV.15 f).

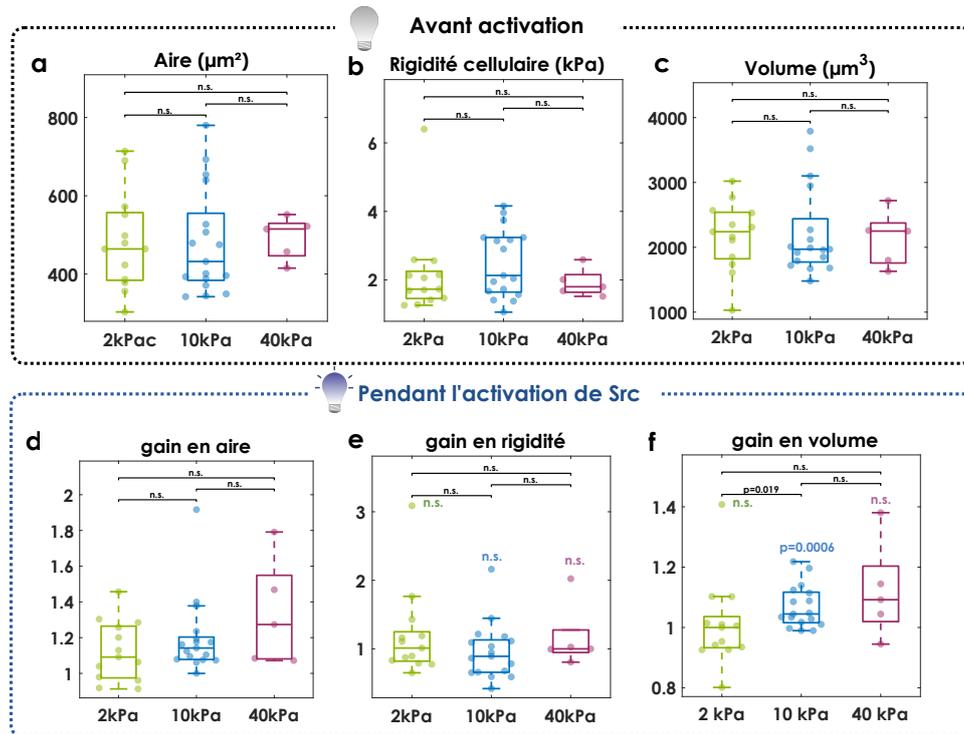


FIGURE IV.15 – Rigidité et volume des cellules MDCK OS normales et Src-activées, obtenues par mesure AFM, en fonction de la rigidité du substrat sur lequel elles sont déposées (a-c) Aire (a), rigidité corticale moyenne (b) et volume (c) avant activation sur un substrat de 2 kPa (vert, n=17, N=3), 10 kPa (bleu, n=13, N=4) et 40 kPa (rose, n=5, N=1). (d-f) Changement relatif d'aire (d), de rigidité (e) et de volume (f) comparé à l'état avant activation. 'n.s.' ou les valeurs de p noires correspondent aux résultats du test U de Mann-Whitney entre les distributions à 2, 10 et 40 kPa. 'n.s.' ou les valeurs de p colorées (vert, bleu, rose), au-dessus de chaque distribution, correspondent aux résultats du test U de Mann-Whitney entre cette distribution et une distribution de même taille ne contenant que des 1.

Nous avons mesuré l'aire des cellules sur les différentes rigidités avant l'activation et pendant l'activation. Dans les expériences d'AFM, nous n'obtenons pas le même étalement des cellules avant l'activation, que celui mesuré dans les expériences de TFM : les cellules sur un substrat de rigidité 2 kPa sont plus étalées et les cellules sur un substrat de rigidité 10 kPa légèrement moins étalées que dans les expériences de TFM (Figure IV.15 a). Plusieurs paramètres peuvent expliquer ces résultats :

- la méthode de mesure de l'aire est différente (somme des pixels pour lesquels la hauteur h de la cellule est supérieure à 0)
- les contacts répétés entre la pointe AFM et la cellule pourraient perturber la cellule

De plus, lors de l'activation de Src, nous obtenons des gains en aire plus faible que ceux obtenus pour les expériences de TFM (Figure IV.15 d). Ce résultat pourrait s'expliquer par les mesures successives de la cellule avec la pointe de l'AFM : cela pourrait perturber la réponse en étalement des cellules associée à l'activation de Src.

Rigidité dans la partie lamellaire Nous avons également mesuré la rigidité dans la partie lamellaire (hauteur $\leq 3 \mu\text{m}$) c'est-à-dire là où la rigidité de la cellule est maximale (Figure III.8). Une fois encore, nous n'avons pas pu mesurer beaucoup de cellules mais il semble que la rigidité lamellaire soit plus grande sur un substrat à 40 kPa que sur les autres substrats (Figure IV.16 a). Durant l'activation de Src, la rigidité dans la région lamellaire dans le noir des cellules augmente de façon significative uniquement pour la rigidité de 2 kPa (Figure IV.16 b,c).

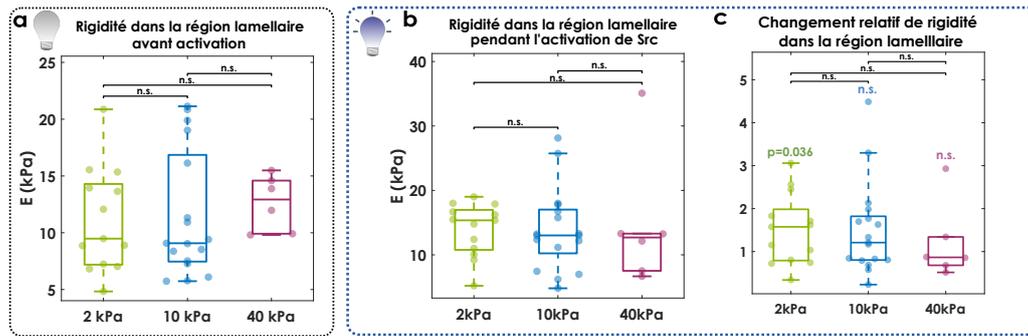


FIGURE IV.16 – **Rigidité dans la région lamellaire des cellules normales (avant activation) et des cellules Src-activées (a-b)** Rigidité dans la région lamellaire (hauteur $h \leq 3 \mu\text{m}$) avant activation (a) et pendant l'activation de Src (b) pour des cellules déposées sur des substrats de rigidité 2 kPa (vert, $n=17$, $N=3$), 10 kPa (bleu, $n=13$, $N=4$) et 40 kPa (rose, $n=7$, $N=2$). (c) Changement relatif de rigidité dans la région lamellaire, comparé à l'état avant activation pour les conditions décrites en (a-b). 'n.s.' ou les valeurs de p noires correspondent aux résultats du test U de Mann-Whitney entre les distributions à 2, 10 et 40 kPa. 'n.s.' ou les valeurs de p colorées (vert, bleu, rose), au-dessus de chaque distribution, correspondent aux résultats du test U de Mann-Whitney entre cette distribution et une distribution de même taille ne contenant que des 1.

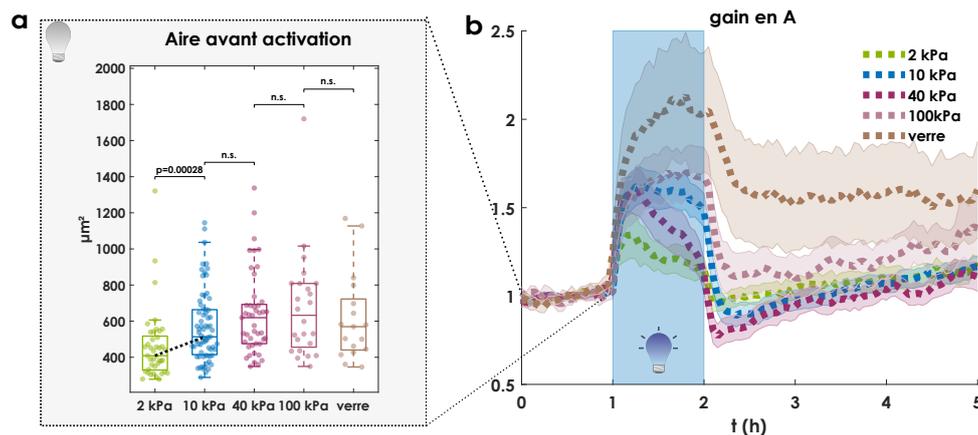


FIGURE IV.17 – **Étalement des cellules MDCK OS, soumises à une activation transitoire de Src sur du verre (a)** Étalement des cellules MDCK OS avant activation sur des substrats de 2 kPa (vert, $n=41$, $N=4$), de 10 kPa (bleu, $n=71$, $N=8$), de 40 kPa (rose, $n=45$, $N=7$), de 100 kPa (violet, $n=24$, $N=2$) et sur du verre (marron, $n=17$, $N=2$). (b) Aire normalisée par sa valeur moyenne avant activation des cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src de 1 h pour les conditions décrites en (a). Les données à 2, 10, 40 et 100 kPa correspondent aux mêmes données présentées en Figure IV.10 a et Figure IV.11 a.

2.5 Étalement des cellules Src-activées sur le verre

Nous avons également étudié le changement de phénotype des cellules Src-activées lorsqu'elles sont déposées sur du verre, dont la rigidité est bien plus grande (~ 60 GPa) (Figure IV.17). Sur le verre, l'étalement des cellules est similaire à celui obtenu pour 10, 40 et 100 kPa, confirmant la saturation de l'étalement au dessus de 10 kPa (Figure IV.17 a). Pendant l'activation de Src, la cellule s'étale avec un gain sensiblement plus grand que pour les autres rigidités (~ 2) et maintient son étalement pendant toute la durée d'activation (Figure IV.17 b). Après activation, l'aire des cellules diminue mais ne retrouve pas la valeur d'avant activation (Figure IV.17 b). Ce résultat suggère que les cellules qui subissent une activation de Src sur du verre adaptent leur phénotype après l'activation transitoire de Src. Malheureusement, la mesure des forces de traction sur le verre n'est pas possible.

3 Effet de la rigidité du substrat sur la réorganisation du cytosquelette des cellules Src-activées

La réponse mécanique des cellules à l'activation de Src étant sensible à la rigidité du substrat, nous avons ensuite voulu étudier les changements dans l'organisation du cytosquelette des cellules Src-activées, en fonction de la rigidité du substrat.

3.1 Dynamique de l'actine filamenteuse

Pour les 4 rigidités testées (2, 10, 40 et 100 kPa), l'activation de Src dans des cellules MDCK OS s'accompagne de la formation de protrusions membranaires. Pour visualiser le flux rétrograde d'actine au niveau de ces protrusions, nous avons utilisé les cellules MDCK OS LifeAct-iRFP que nous avons déposées sur des substrats de 2 kPa (substrat "mou"), 10 kPa (rigidité intermédiaire) et 100 kPa (substrat "rigide") (Figure IV.18 a-c). Le flux rétrograde d'actine est mesuré à partir de kymographes générés le long de segments perpendiculaires à la membrane (voir paragraphe 10.2 du Chapitre II pour la méthode).

Avant activation, le flux rétrograde d'actine est maximum pour le substrat de 2 kPa (vitesse moyenne de 100 nm/s) et est plus faible pour des rigidités de 10 kPa et 40 kPa (vitesse moyenne ~ 75 nm/s) (Figure IV.18 d). Cette observation a déjà été décrite pour des cellules MDCK : le flux rétrograde d'actine diminue lorsque la rigidité du substrat augmente (Balcioglu *et al.*, 2020)⁴. Après 12 min d'activation de Src, le flux rétrograde augmente de façon significative pour les rigidités supérieures à 10 kPa mais pas pour celle à 2 kPa (Figure IV.18 e-f). Cette observation confirme que pour des substrats de rigidité supérieure à 10 kPa, le changement de phénotype mécanique (étalement et contractilité) associé à l'activation de Src s'accompagne d'une augmentation du flux rétrograde

4. Notons que cette tendance n'est pas toujours observée : dans le cas des cônes de croissance, la vitesse du flux rétrograde d'actine est une fonction "biphasique" de la rigidité du substrat, elle est plus grande pour des substrats de rigidité élevé que pour des substrats de faible rigidité (Chan & Odde, 2008).

d'actine. Le flux rétrograde d'actine n'est pas modifié à 2 kPa qui correspond à un changement en étalement et en contractilité plus faible que sur les substrats plus rigides.

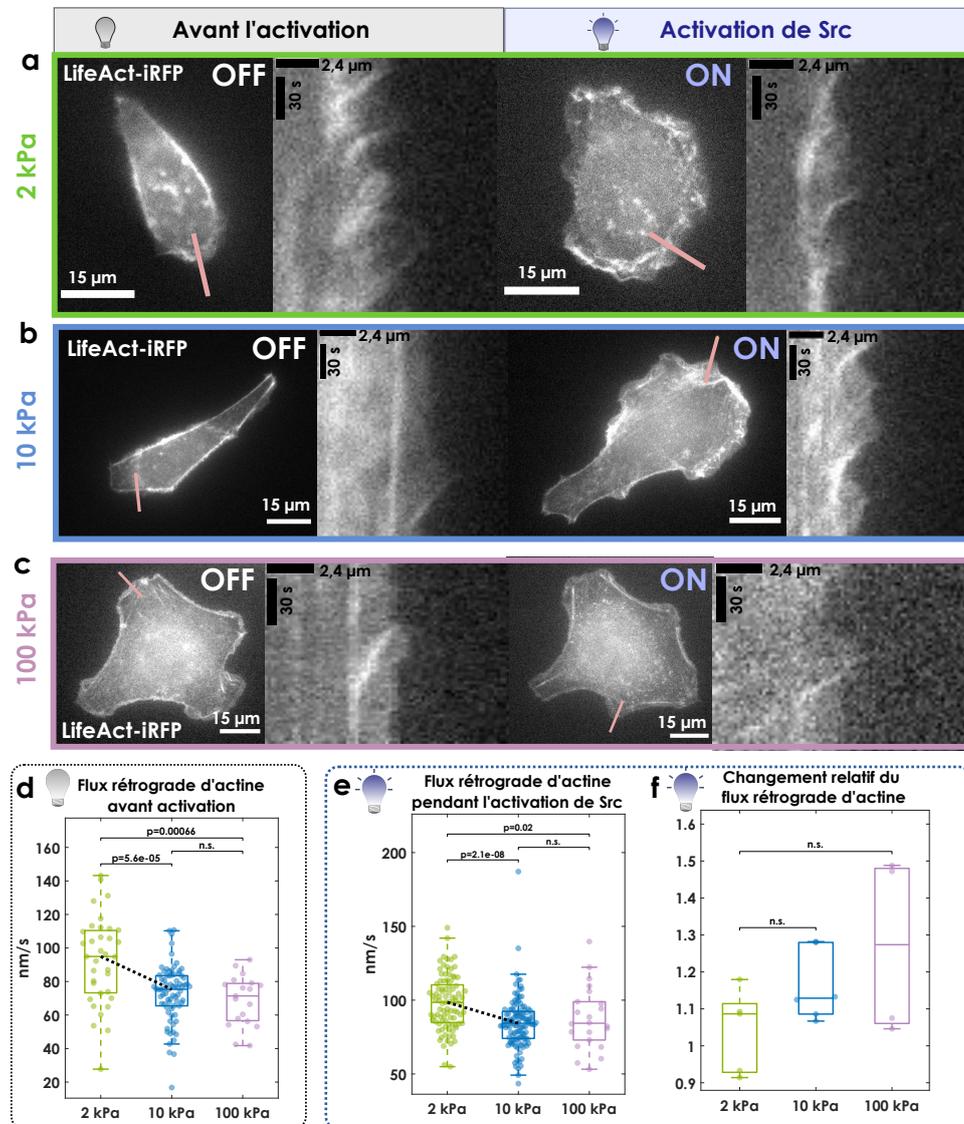


FIGURE IV.18 – Flux rétrograde d'actine des cellules MDCK OS avant et pendant l'activation de Src en fonction de la rigidité du substrat sur lequel elles sont déposées (a-c) Images représentatives en épifluorescence d'une cellule MDCK optoSrc isolée exprimant LifeAct-iRFP dans l'obscurité (à gauche, OFF) ou après 12 min d'activation de Src (à droite, ON) sur un substrat de 2 kPa (a), 10 kPa (b) et 100 kPa (c). Les lignes roses sont utilisées pour générer les kymographes montrés à droite des images. (d) Vitesse du flux rétrograde d'actine (en nm/s) dans les cellules MDCK OS dans le noir sur un substrat de rigidité 2 kPa (vert, n=35 traces, 5 cellules), 10 kPa (bleu, n=76 traces, 6 cellules) et 100 kPa (violet, n=19, 4 cellules). (e) Vitesse du flux rétrograde d'actine (en nm/s) dans les cellules MDCK OS après 12 min d'activation de Src sur un substrat de rigidité 2 kPa (vert, n=92 traces, 5 cellules), 10 kPa (bleu, n=118 traces, 6 cellules) et 100 kPa (violet, n=22, 22 cellules). (f) Changement relatif de la vitesse du flux rétrograde d'actine des cellules Src-activées par rapport à celle avant activation sur 2 kPa (n=5 cellules), 10 kPa (n=6 cellules) et 100 kPa (n=4 cellules). Les vitesses de flux rétrograde d'actine ont été moyennées par cellule. Les lignes noires pointillées passant par les médianes des distributions sont des tendances qui servent de guide pour l'œil.

3.2 Réorganisation du système adhésif

Nous avons ensuite étudié la réorganisation des adhésions focales en fonction de la rigidité du substrat. Pour cela, nous avons utilisé des cellules MDCK OS transfectées avec la vinculine-iRFP.

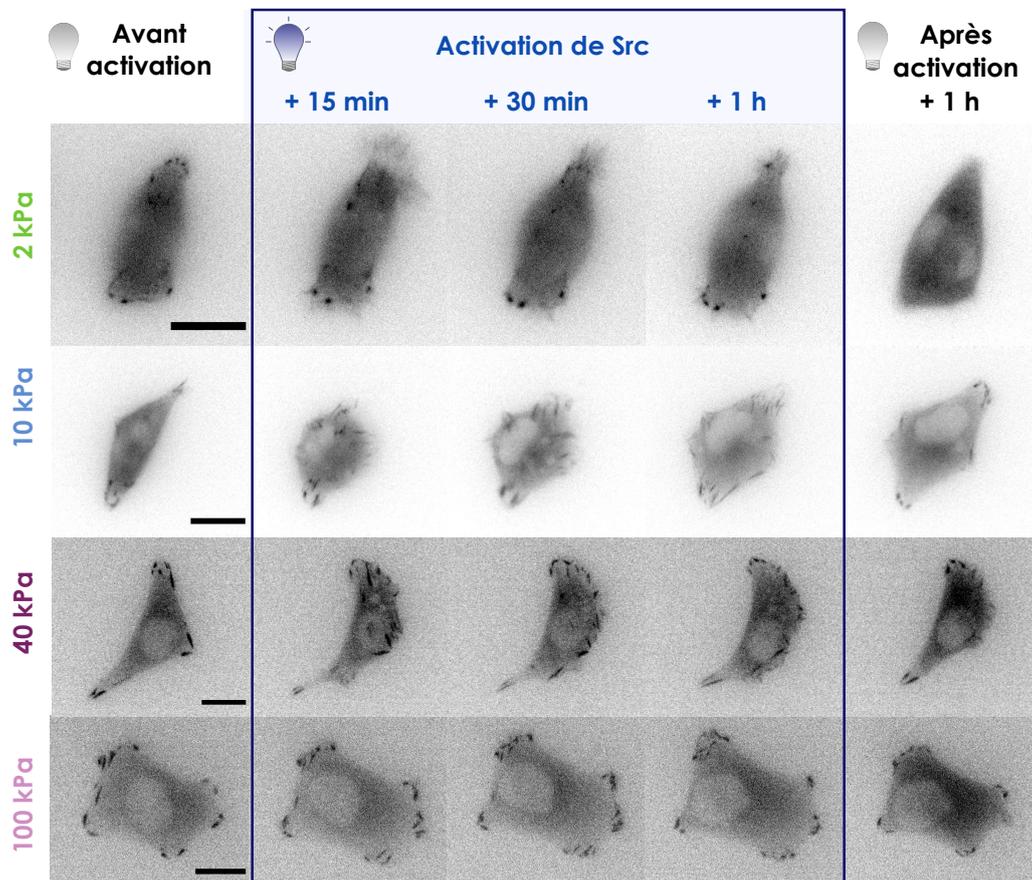


FIGURE IV.19 – Réorganisation du système adhésif des cellules MDCK OS lors de l'activation de Src en fonction de la rigidité du substrat Séquence temporelle d'images en épifluorescence des adhésions focales (vinculine-iRFP) dans des cellules MDCK optoSrc isolées, avant l'activation, pendant l'activation (15 min, 30 min et 1 h après le début de l'activation) et 1 h après l'activation de Src (de gauche à droite), sur des substrats de rigidité 2, 10, 40 et 100 kPa (de haut en bas). Barres d'échelle : 15 µm.

L'observation de la vinculine-iRFP révèle que le nombre et la taille des adhésions focales de cellules MDCK OS dans le noir dépendent de la rigidité du substrat (Figure IV.19). Sur des substrats "mous" (rigidité 2 kPa), les adhésions sont peu nombreuses (en moyenne 3 par cellule) et de petite taille (aire moyenne de $2 \mu\text{m}^2$) (Figure IV.20 a,b). Le nombre d'adhésions par cellule augmente de façon significative avec la rigidité du substrat et se stabilise pour les rigidités supérieures à 40 kPa (en moyenne 8 AF par cellule) (Figure IV.20 a). La taille des adhésions semble augmenter avec la rigidité du substrat, mais pas de façon significative (Figure IV.20 b). Ces observations sont en accord avec la littérature : l'augmentation de rigidité du substrat est associée à une augmentation du nombre et de la taille des adhésions focales (Gupta *et al.*, 2015).

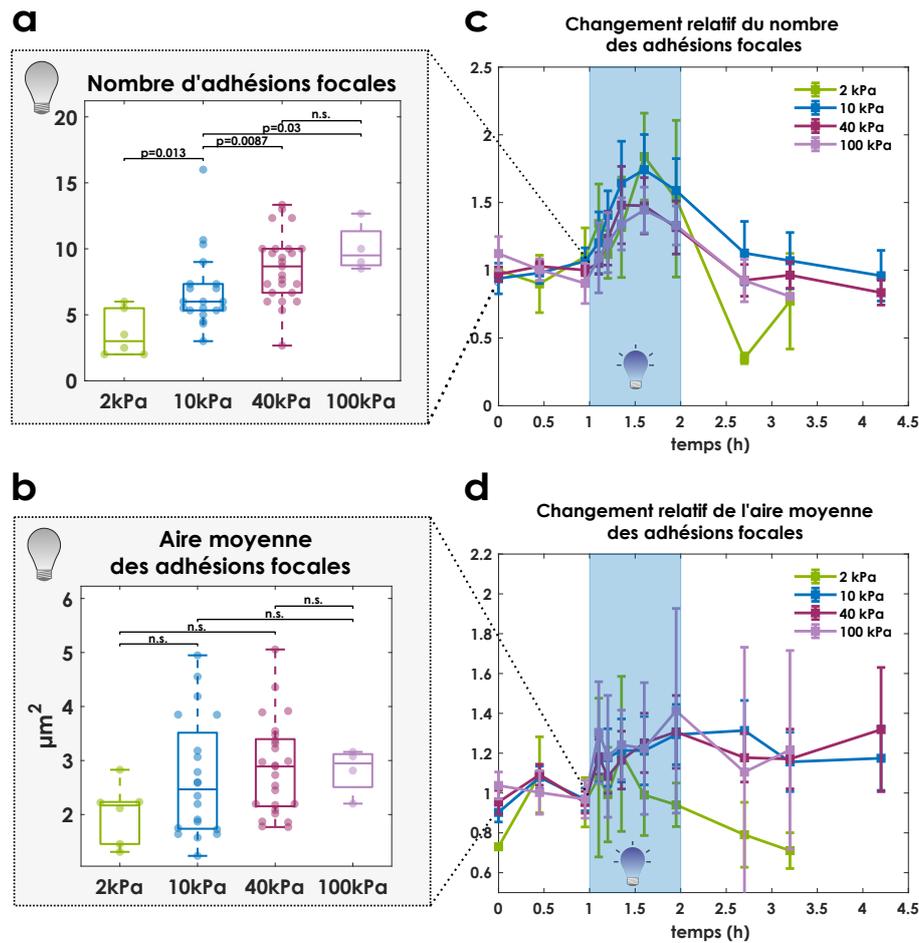


FIGURE IV.20 – Nombre et taille des adhésions focales des cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src en fonction de la rigidité du substrat sur lequel elles sont déposées (a-b) Nombre moyen d'adhésions focales par cellule (a) et aire moyenne des adhésions (b) avant activation sur un substrat de rigidité 2 kPa (vert, n=6 cellules), 10 kPa (bleu, n=20 cellules), 40 kPa (rose, n=25 cellules) et 100 kPa (violet, n=4 cellules). (c-d) Changement relatif du nombre d'adhésions (c) et de l'aire moyenne des adhésions (d) dans des cellules MDCK OS isolées soumises à une activation transitoire de Src d'1 h pour les conditions décrites en (a-b). Les marqueurs carrés indiquent la moyenne sur le nombre de cellules mesurées, les barres d'erreurs l'intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne.

Pour les quatre rigidités testées, l'activation de Src s'accompagne de la formation de nouvelles adhésions (augmentation d'un facteur $\sim 1,5$) (Figure IV.19, Figure IV.20 c). Cette augmentation du nombre d'AF permet certainement de soutenir l'ancrage des cellules Src-activées qui se sont étalées afin qu'elles puissent maintenir leur aire au cours de l'activation. Au début de l'activation de Src, l'aire des adhésions augmente (facteur $\sim 1,2$), ce qui est certainement une signature de la maturation des adhésions (Figure IV.20 d). L'aire des adhésions est maintenue pour les rigidités supérieures à 10 kPa, mais elle ne l'est pas sur un substrat à 2 kPa (Figure IV.20 d) : les AF ne parviennent certainement pas à maturer sur des substrats "mous" (temps de vie trop court) (Oakes *et al.*, 2018). Ce non-maintien de la taille des adhésions durant l'activation pourrait expliquer le fait que les cellules Src-activées ne maintiennent pas leur aire et leur contractilité à 2 kPa (Figure IV.11 a).

Sur les substrats de rigidité 40 kPa, nous observons que certaines adhésions qui s'allongent au début de

l'activation disparaissent sans être renouvelées (Figure IV.21). La disparition de ces adhésions après 30 min d'activation de Src pourrait être une autre explication du non-maintien du phénotype mécanique des cellules Src-activées sur un substrat de 40 kPa .

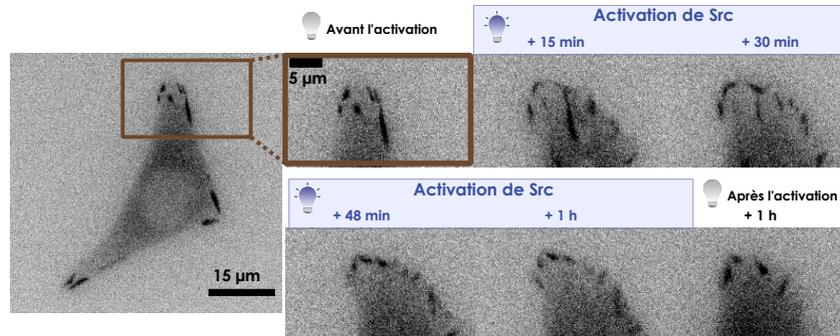


FIGURE IV.21 – Disparition d'adhésions dans des cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src sur un substrat de 40 kPa Séquence temporelle d'images en épifluorescence montrant les adhésions focales (marquage vinculine-iRFP) d'une cellule MDCK OS soumise à une activation transitoire de Src d'1 h sur un gel de 40 kPa, montrant la disparition d'adhésions focales au cours de l'activation.

3.3 Réorganisation du réseau de fibres de stress

Enfin, nous avons examiné l'organisation des fibres de stress (FS) en fonction de la rigidité du substrat. Pour cela, nous avons utilisé la lignée cellulaire MDCK OS avec la MRLC marquée en iRFP, permettant de visualiser le réseau de FS de la cellule. Pour des cellules normales (avant activation), l'organisation du réseau de fibres de stress dépend de la rigidité du substrat. Sur des substrats de rigidités supérieures à 10 kPa, les FS sont périphériques et orientées selon l'axe d'élongation de la cellule (Figure IV.22). En revanche, sur un substrat de 2 kPa, les FS sont plus centrales et plus fines (Figure IV.22).

Décrivons ci-dessous la réorganisation des FS lors de l'activation de Src en fonction de la rigidité du substrat :

- **Sur un substrat de 2 kPa**, après 15 min d'activation, nous observons que le signal MRLC "est concentré" au centre de la cellule, puis la cellule retrouve un réseau intérieur de FS semblable à celui qu'elle avait avant activation. 1 h après l'activation transitoire de Src, il n'y a plus beaucoup de FS visibles (Figure IV.22).
- **Sur un substrat de 10 kPa** (voir paragraphe 3.3 du Chapitre III), après 15 min d'activation de Src, pour une cellule polarisée ($A_s > 0,7$), le signal MRLC se concentre au centre des FS périphérique puis ces FS périphériques laissent la place à plusieurs FS de diamètre plus petit, au niveau des lamellipodes formées et qui gardent la même orientation que les FS initiales. Ces fibres sont également "entraînées" vers le centre par le flux rétrograde d'actine (Figure IV.22). Après activation de Src, les FS formées disparaissent et la cellule retrouve une organisation périphérique des FS. La réorganisation du réseau de FS est différente lorsque la cellule est "plus isotrope" ($A_s < 0,7$) : concentration du signal MRLC au centre de la cellule puis formation

d'un réseau intérieur dense de FS de petit diamètre (Figure III.23).

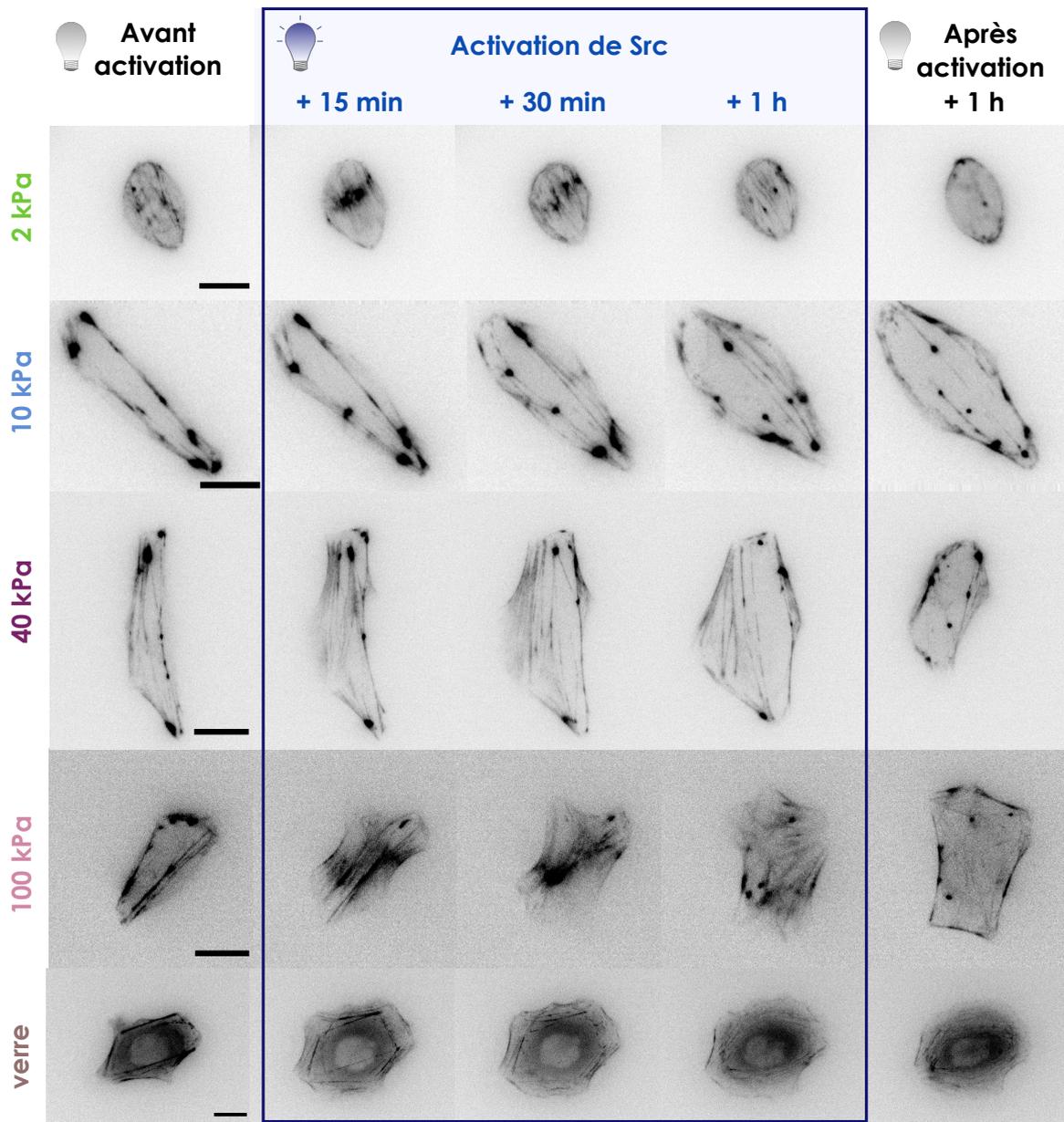


FIGURE IV.22 – Réorganisation du réseau de fibres de stress de cellules MDCK OS lors de l'activation de Src en fonction de la rigidité du substrat (De gauche à droite) Images en épifluorescence représentatives des fibres de stress (MRLC-iRFP) avant l'activation, pendant l'activation (15 min, 30 min et 1 h après le début de l'activation) et 1 h après l'activation de Src dans des cellules MDCK OS déposées sur des substrats de 2 kPa, 10 kPa, 40 kPa, 100 kPa et sur du verre (de haut en bas). Barres d'échelle : 15 μ m.

- **Sur un substrat de 40 kPa** La réorganisation du réseau de FS est similaire à celle observée sur un substrat de 10 kPa, mais elle se fait plus rapidement. Pour une cellule "polarisée" ($A_s > 0,7$), nous observons une concentration du signal MRLC le long des FS, et rapidement l'apparition de FS fines dans les lamellipodes formés, entraînées vers le centre par le flux rétrograde d'actine (Figure IV.22). Pour une "cellule plus isotrope" ($A_s < 0,7$), nous observons une concentration

du signal MRLC au centre de la cellule puis la formation de fibres de stress intérieures (Figure IV.23, haut). De plus, pour plusieurs cellules, nous avons observé que les fibres de stress formées au début de l'activation de Src, se "rétractent" ou "cassent" (Figure IV.23).

- **Sur un substrat de 100 kPa**, après 30 min d'activation de Src, le signal MRLC se "concentre" au centre de la cellule. Au bout d'1 h d'activation, la cellule arbore un réseau de fibres de stress intérieur dense et peu organisé. Après l'activation transitoire de Src, le réseau de FS disparaît peu à peu et la cellule retrouve une organisation périphérique des FS.
- **Sur du verre**, nous observons qu'après 15 min d'activation, les FS périphériques de gros diamètre ont laissé place à plusieurs FS plus fines, dans les lamellipodes formés. Cette réorganisation des FS est maintenue pendant et après l'activation de Src, tout comme l'est l'étalement des cellules (Figure IV.22).

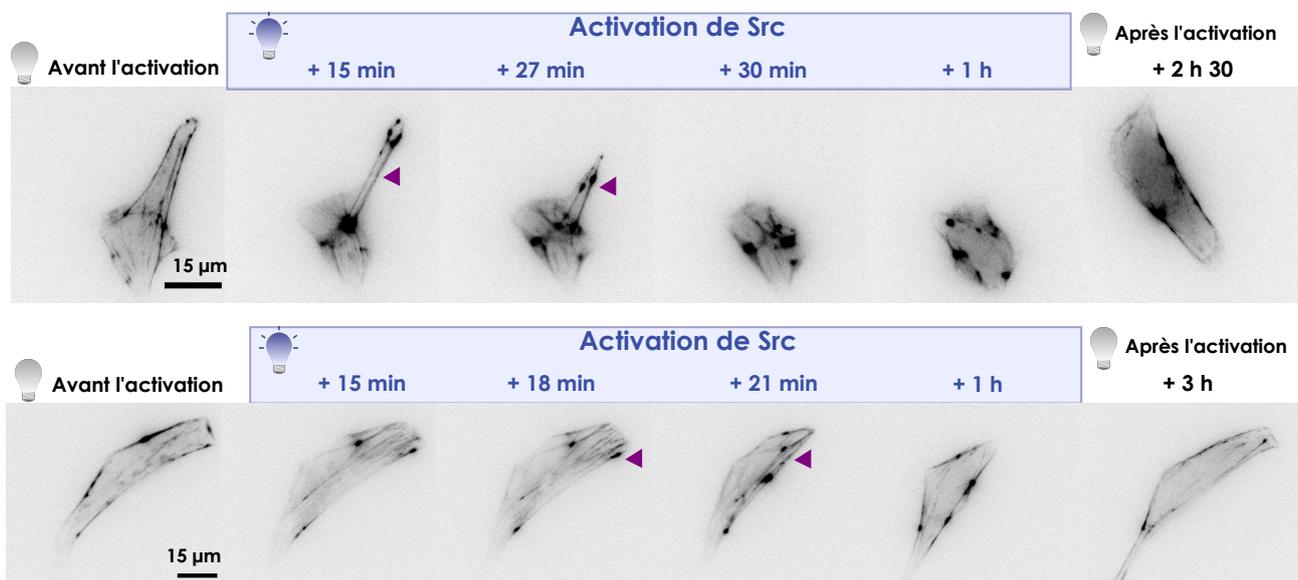


FIGURE IV.23 – Disparition des fibres de stress dans des cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src sur un substrat de 40 kPa (Haut et bas) Séquence temporelle d'images en épifluorescence montrant deux exemples de cellules dont les fibres de stress (marquage MRLC) se "rétractent" ou "cassent" pendant l'activation (flèches violettes).

Pendant l'activation de Src, nous mesurons une augmentation de l'aire totale et de l'intensité totale du réseau FS pour toutes les rigidités. Pour des rigidités de 2, 10 et 40 kPa, l'aire totale du réseau de FS augmente d'un facteur $\sim 1,7$ et l'intensité augmente d'un facteur $\sim 1,9$ par rapport à l'état avant activation (Figure IV.24). Pour une rigidité de 100 kPa, l'augmentation d'aire et d'intensité est plus importante (facteur ~ 2 pour l'aire et facteur de $\sim 2,7$ pour l'intensité). Ce nouvel arrangement des FS est probablement responsable des changements de contractilité des cellules Src-activées sur les différentes rigidités. Il serait donc intéressant de comprendre le lien entre les changements du réseau de FS au cours du temps et la réponse mécanique à l'activation de Src sur les différents substrats.

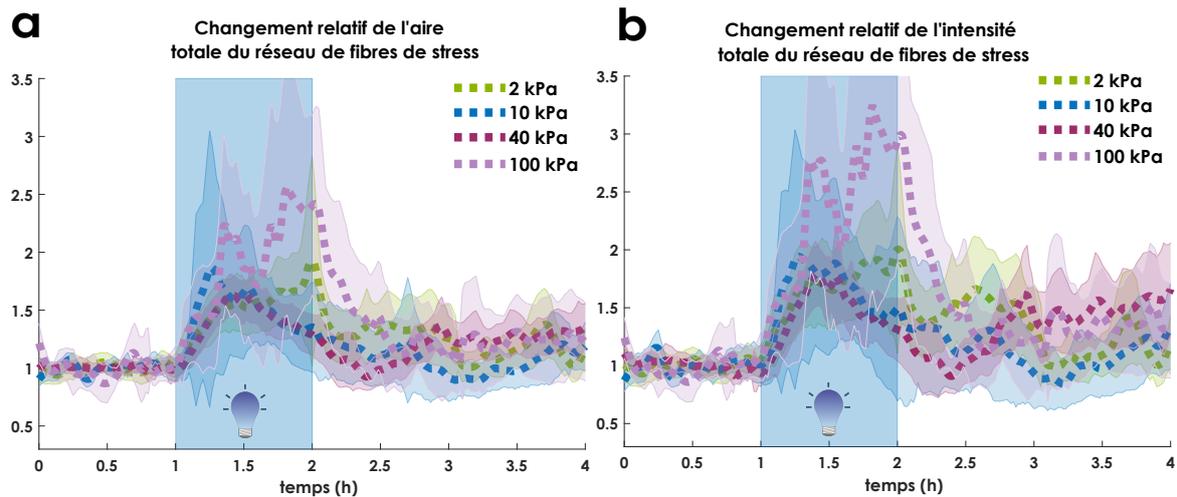


FIGURE IV.24 – Aire totale et intensité totale du réseau de fibres de stress de cellules MDCK OS lors de l'activation de Src en fonction de la rigidité du substrat Aire totale (a) et intensité totale (b) du réseau de fibres de stress de cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src d'1 h, normalisée par leur valeur moyenne avant activation sur des substrats de rigidité 2 kPa (vert, $n=36$, $N=5$), 10 kPa (bleu, $n=18$, $N=4$), 40 kPa (rose, $n=28$, $N=4$) et 100 kPa (violet, $n=11$, $N=1$).

3.4 Phénotype mécanique des cellules MDCK après l'activation transitoire de Src en fonction de la rigidité du substrat

Arrondissement Après l'activation transitoire de Src, certaines cellules se détachent partiellement du substrat, s'arrondissent pendant un certain temps puis se ré-étalent. La probabilité d'arrondissement après l'activation transitoire de Src dépend de la rigidité du substrat (Figure IV.25) : elle est maximale pour les rigidités "intermédiaires" : 40 % des cellules s'arrondissent après l'activation transitoire de Src sur un substrat à 10 kPa et près de 50 % sur un substrat à 40 kPa. Moins de cellules s'arrondissent après l'activation transitoire de Src sur des substrats "mous" à 2 kPa (18 %) ou sur des substrats rigides à 100 kPa (20 %) (Figure IV.25 a). Aucune cellule ne s'arrondit après l'activation sur du verre (Figure IV.25 a). La durée d'arrondissement semble dépendre, elle aussi de la rigidité du substrat : elle semble aussi maximale sur des substrats de rigidité intermédiaire (Figure IV.25 b). L'arrondissement des cellules après l'activation transitoire de Src est certainement lié à la déstabilisation des adhésions lorsque la cellule se rétracte. Sur un substrat de rigidité 40 kPa, les fibres de stress peuvent se "rétracter" ou "casser" lorsque la cellule s'arrondit après l'activation transitoire de Src (Figure IV.26). La faible probabilité d'arrondissement P_r sur 2 kPa est peut-être liée au fait que les adhésions ne sont pas assez matures à 2 kPa, et donc qu'elles sont facilement "détachables" lorsque la cellule se rétracte. En revanche, sur des substrats rigides (100 kPa), les adhésions seraient suffisamment matures pour ne pas être déstabilisées après l'activation transitoire de Src. D'ailleurs, sur 100 kPa, les cellules ont une aire plus grande après l'activation transitoire de Src que celle d'avant activation : certaines adhésions sont peut-être suffisamment matures pour pouvoir subsister même après l'activation transitoire de Src.

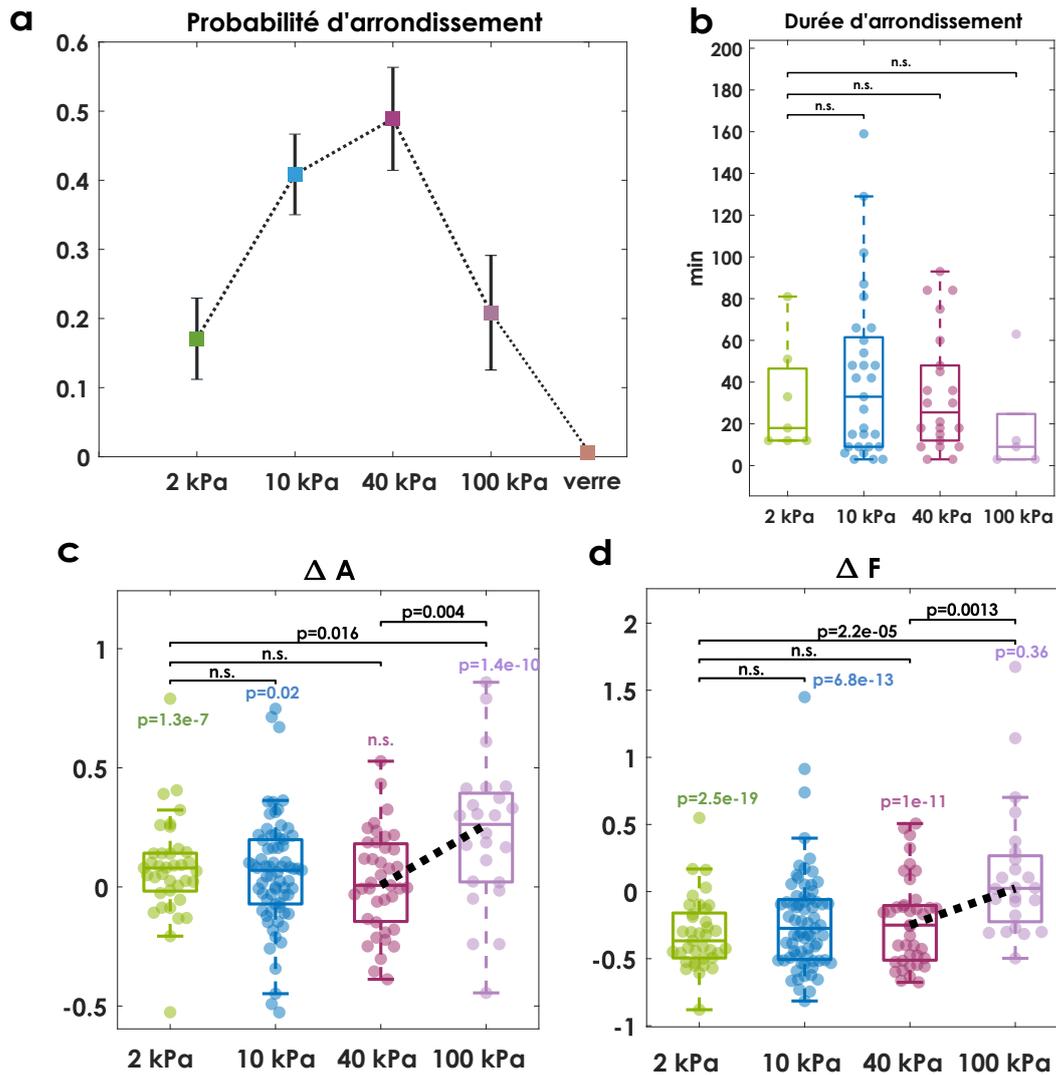


FIGURE IV.25 – État mécanique des cellules MDCK OS après l'activation transitoire de Src en fonction de la rigidité du substrat (a-b) Probabilité (a) et durée d'arrondissement (b) après l'activation transitoire de Src en fonction de la rigidité du substrat. (c-d) Écarts relatifs entre l'état avant et l'état après activation de l'aire ΔA (c) et de la force totale ΔF (d) sur des substrats de rigidité 2 kPa (vert, n=41, N=4), 10 kPa (bleu, n=71, N=8), 40 kPa (rose, n=45, N=7) et 100 kPa (violet, n=24, N=2) (voir Figure III.30 a, Chapitre III pour la mesure des écarts relatifs). Les lignes noires pointillées en (c) et (d) passant par les médianes des distributions sont des tendances qui servent de guide pour l'œil. Pour chaque distribution en (c) et (d) la mention p ou 'n.s.' colorée indique le résultat du test U de Mann-Whitney entre la distribution présentée et une distribution de même taille ne contenant que des 0. La mention p ou 'n.s.' noire indique le résultat du test U de Mann-Whitney entre les différentes distributions.

Aire et force après l'activation Sur des substrats de 2 kPa et 10 kPa, les cellules sont, en moyenne, légèrement plus étalées qu'avant l'activation et sur un substrat de 40 kPa les cellules retrouvent un étalement similaire à celui qu'elles avaient avant activation (Figure IV.25 c). Pour les rigidités de 2 kPa à 40 kPa, nous observons une perte en force après l'activation : elle est de $\sim 20-30\%$ en moyenne si l'on compare les états avant/après activation (Figure IV.25 d). En revanche, pour une rigidité de 100

kPa, après l'activation transitoire de Src, les cellules sont légèrement plus étalées et plus contractiles qu'avant l'activation de Src (Figure IV.25 c-d).

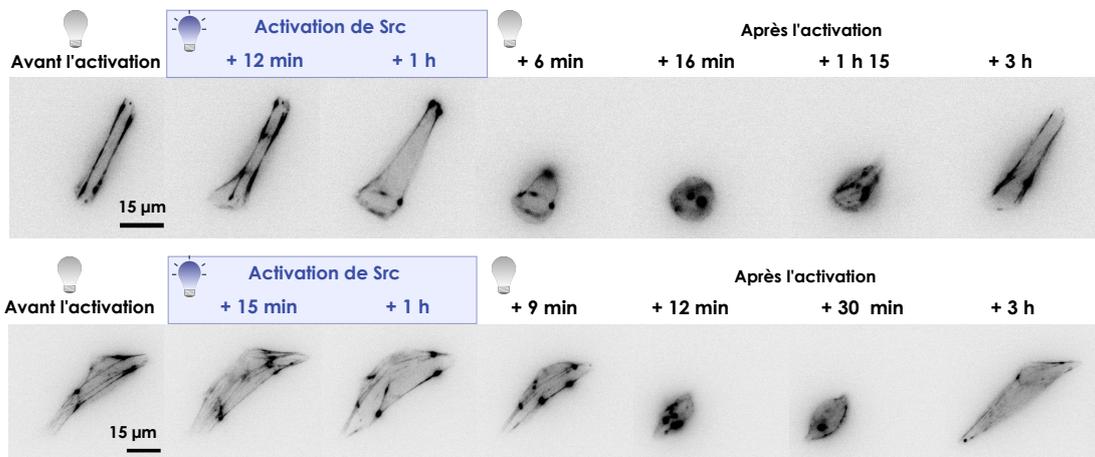


FIGURE IV.26 – "Arrondissement" d'une cellule après l'activation transitoire de Src (Haut et bas) Séquence temporelle d'images en épifluorescence montrant deux exemples de cellules dont les fibres de stress (marquage MRLC) se "cassent" ou se "rétractent" après l'activation transitoire de Src puis s'arrondissent et se ré-étalent ensuite sur leur substrat (arrondissement dans 50 % des cas sur un gel de 40 kPa).

3.5 Rôle des adhésions dans la réponse mécanosensible des cellules à l'activation transitoire de Src

Afin d'évaluer le rôle de la maturation des adhésions dans la réponse mécanique des cellules Src-activées sur des substrats de différentes rigidités, nous avons utilisé les ions manganèse Mn^{2+} qui, ajoutés au milieu de culture, activent les intégrines et renforcent ainsi l'accroche au substrat (Oakes *et al.*, 2018).

Avant activation L'ajout d'ions manganèse modifie le phénotype mécanique des cellules avant activation. Sur 2 et 10 kPa, l'ajout d'ions manganèse est responsable d'une augmentation de la contractilité des cellules mais ne modifie pas l'étalement des cellules (Figure IV.27 a,b). En revanche, sur 40 kPa, la contractilité n'est pas modifiée alors que l'étalement diminue (Figure IV.27 a,b). Ces résultats ne sont pas accord avec les observations de Oakes *et al.* (Oakes *et al.*, 2018) : sur un substrat de rigidité 2 kPa, ils observent un étalement de fibroblastes mais pas de modification des forces de traction. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que Oakes *et al.* utilisent des fibroblastes et non des cellules épithéliales.

Réponse mécanique à l'activation de Src En présence d'ions manganèse, la réponse mécanique des cellules à l'activation de Src est modifiée uniquement sur les substrats de 2 kPa et 40 kPa. L'ajout d'ions manganèse à 2 kPa et 40 kPa permet d'obtenir une réponse mécanique similaire à celle obtenue à 10 kPa dans la situation contrôle sans Mn^{2+} : phénotype mécanique (aire, force) maintenu et d'amplitude maximale (Figure IV.27 c-f). Activer les intégrines permet donc de stabiliser l'état mécanique des cellules durant l'activation de Src : la baisse en aire et en contractilité observées après 30 min

d'activation de Src à 2 kPa et 40 kPa pourrait donc être due à la faible stabilité des adhésions focales sur ces rigidités.

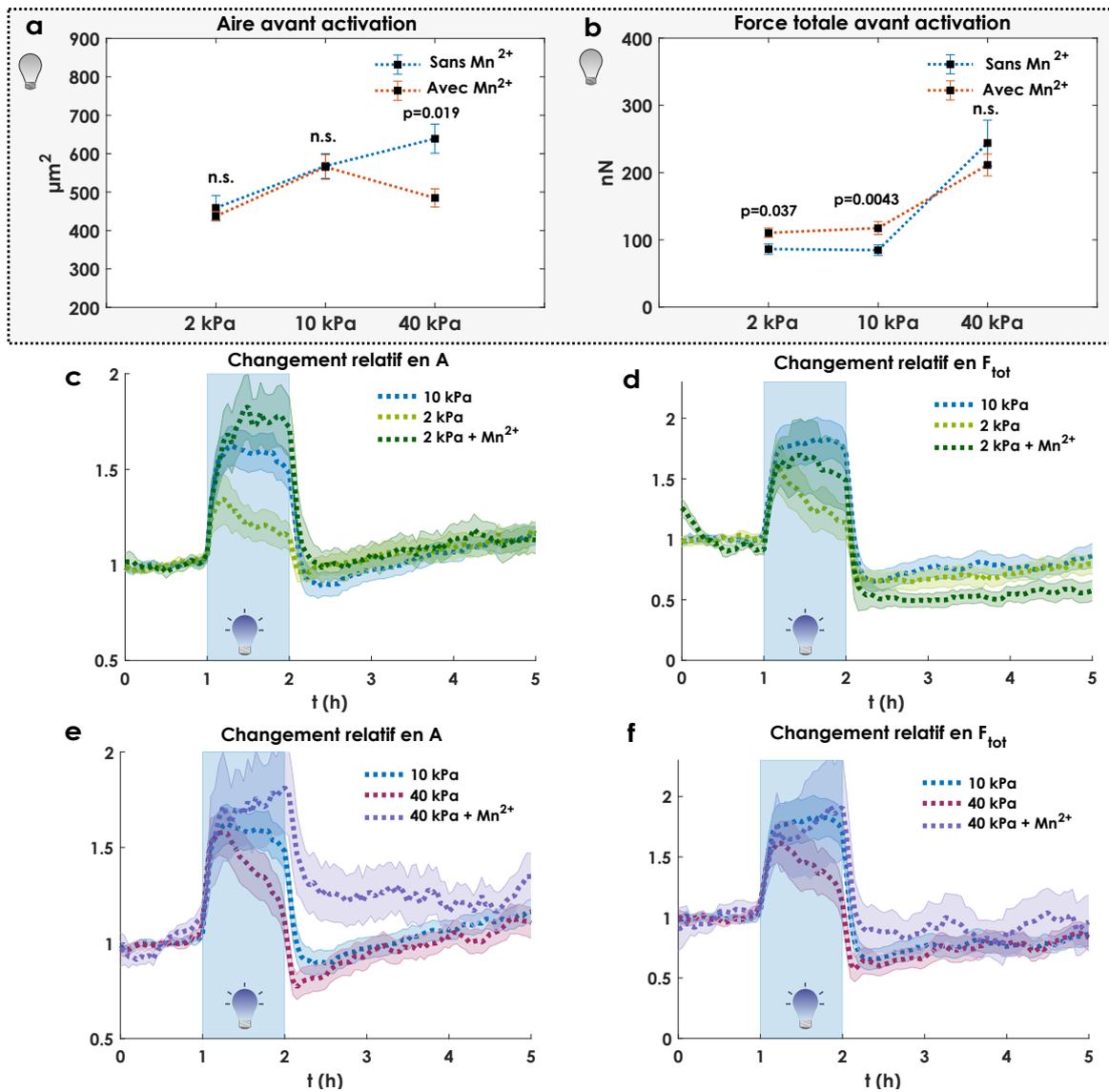


FIGURE IV.27 – Réponse mécanique des cellules MDCK OS en fonction de la rigidité du substrat, en présence d'ions manganèse (a-b) Phénotype mécanique des cellules MDCK OS avant activation dans un milieu de culture standard (courbes bleues) sur 2 kPa (n=41, N=4), 10 kPa (n=8, N=71) et 40 kPa (n=45, N=7) ; et en présence d'ions manganèse Mn^{2+} sur 2 kPa (n=27, N=2), 10 kPa (n=28, N=3) et 40 kPa (n=18, N=2) : aire (a) et force totale (b). Pour chaque rigidité, le résultat (valeur p ou 'n.s.') du test U de Mann-Whitney entre les données avec et sans manganèse, est indiqué. (c-d) Changement de phénotype mécanique de cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src dans un milieu de culture standard sur un substrat de rigidité 10 kPa (bleu, n=71, N=8) ou de rigidité 2 kPa (vert clair, n=17, N=3) ou sur un substrat de rigidité 2 kPa, en présence d'ions manganèse Mn^{2+} sur un substrat de rigidité 2 kPa (vert foncé, n=27, N=2) : aire (c) et force totale (d), normalisées par leur valeur moyenne avant activation. (e-f) Changement de phénotype mécanique de cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src dans un milieu de culture standard sur un substrat de rigidité 10 kPa (bleu, n=71, N=8) ou de rigidité 40 kPa (rose, n=45, N=7) ou sur un substrat de rigidité 40 kPa en présence d'ions manganèse Mn^{2+} (violet, n=18, N=2) : aire (e) et force totale (f), normalisées par leur valeur moyenne avant activation.

Arrondissement des cellules L'ajout de manganèse modifie aussi la probabilité que les cellules ont de s'arrondir après l'activation transitoire de Src : P_r diminue avec la rigidité du substrat en présence de manganèse alors qu'elle augmente en l'absence de manganèse (Figure IV.28 a). En présence de manganèse, le temps pendant lequel les cellules sont arrondies diminue significativement pour des substrats à 10 kPa et 40 kPa (Figure IV.28 b) : l'ajout de manganèse à 10 kPa et 40 kPa stabilise les adhésions, ce qui défavorise l'arrondissement des cellules après l'activation. En revanche, sur un substrat à 2 kPa, en présence de manganèse, l'aire et la force sont maintenues, et la probabilité d'arrondissement augmente : les adhésions sont stabilisées pendant l'activation pour maintenir le changement de phénotype mécanique, mais pas assez stables pour empêcher l'arrondissement après l'activation transitoire de Src. De plus, le fait que la cellule se déforme plus lors de l'activation de Src en présence de manganèse pourrait expliquer l'augmentation de P_r . Ces observations confirment notre hypothèse selon laquelle l'arrondissement des cellules résulte de la déstabilisation des adhésions.

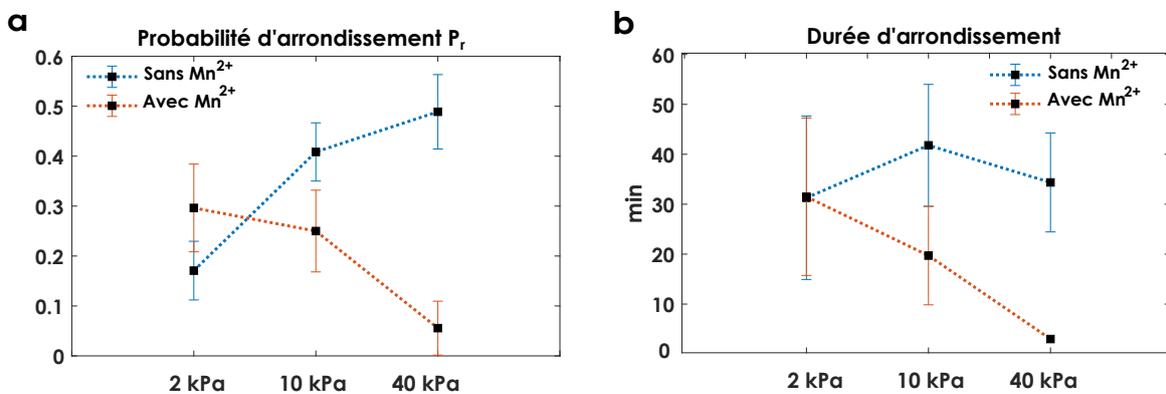


FIGURE IV.28 – Arrondissement des cellules MDCK OS après l'activation transitoire de Src, en fonction de la rigidité du substrat, en présence d'ions manganèse (a-b) Probabilité (a) et durée d'arrondissement (b) après l'activation transitoire de Src, en fonction de la rigidité du substrat dans un milieu de culture standard (courbes bleues), ou en présence d'ions manganèse Mn^{2+} (courbes oranges).

4 Discussion

4.1 Mécanosensibilité des cellules MDCK avant activation

Existence d'une rigidité particulière à 10 kPa 10 kPa semble représenter une rigidité particulière pour les cellules MDCK OS normales (avant activation) : les forces de traction sont faibles (similaires à celles mesurées sur un substrat de 2 kPa), alors que l'étalement est grand (similaire à celui obtenu pour des rigidités supérieures à 40 kPa). Balcioglu *et al.* ont mesuré la taille des adhésions focales pour des colonies de cellules MDCK, déposées sur des substrats de rigidités différentes (Balcioglu *et al.*, 2020) (Figure IV.29). Ils ont montré qu'en-dessous de 9,4 kPa, la taille des adhésions est petite. A partir de 9,6 kPa, la taille des adhésions commence à augmenter, signature d'un recrutement protéique permettant leur maturation. Sur des substrats de rigidité supérieure à 21 kPa, la taille des adhésions est maximale et reste constante. Cette étude montre qu'une rigidité aux alentours 10 kPa représente une rigidité particulière pour les cellules MDCK (Figure IV.29). Nous proposons

que les adhésions sur un substrat de 10 kPa sont suffisamment matures (*ie.* ayant un temps de vie suffisamment long) pour que les cellules Src-activées puissent maintenir un étalement élevé mais pas assez pour tirer fortement sur le substrat et générer ainsi des forces de traction importantes.

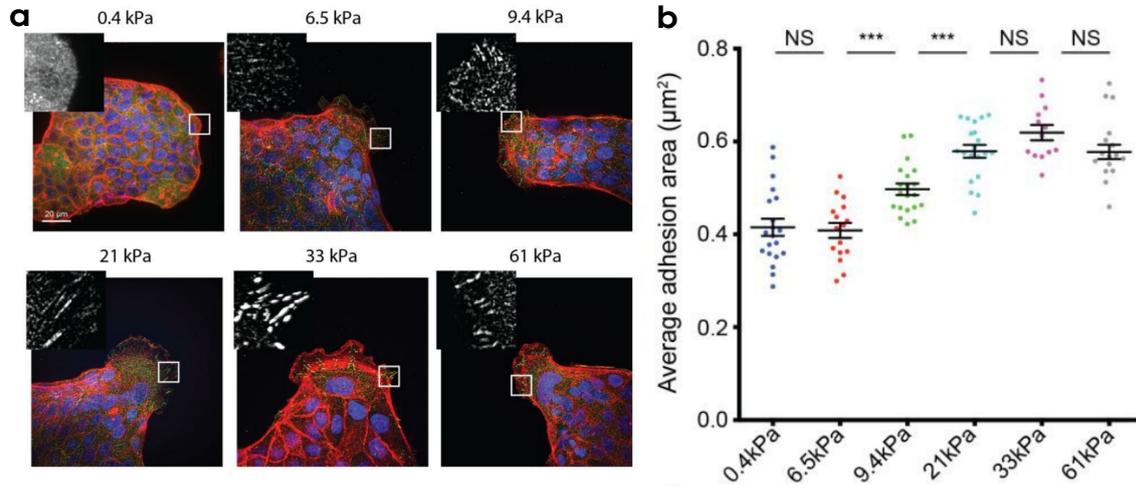


FIGURE IV.29 – Taille des adhésions focales dans un tissu de MDCK en fonction de la rigidité du substrat (a) Images en immunofluorescence de l'actine (rouge), de la paxilline (vert) et du noyau (bleu) dans un groupes de cellules MDCK sur des substrats de rigidité différente (0,4 kPa, 6,5 kPa, 9,4kPa, 21 kPa, 33 kPa et 61 kPa). Pour chaque image, agrandissement par 4 du carré blanc indiqué sur l'image, montrant la paxilline. (b) Aire moyenne des adhésions des cellules situées à la périphérie du groupe de cellules. Adapté de (Balcioglu *et al.*, 2020).

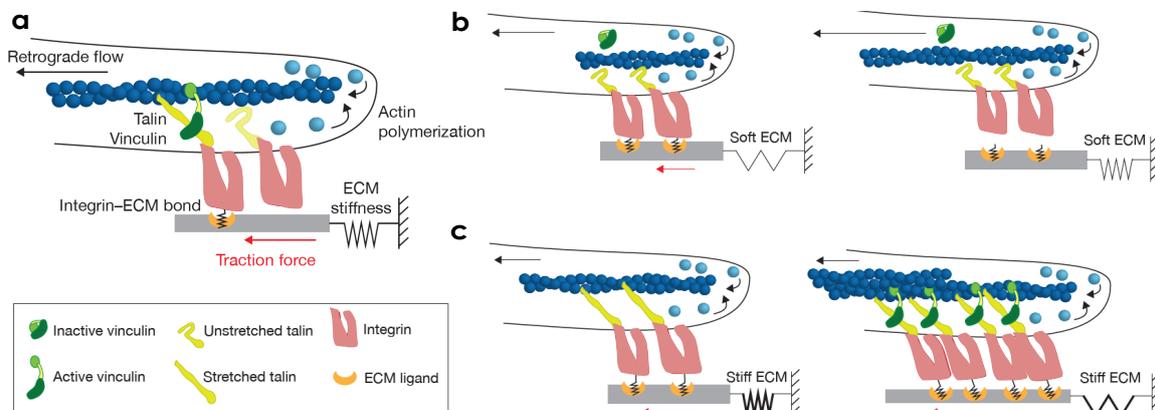


FIGURE IV.30 – Modèle de *molecular clutch* (a) Schéma explicatif des éléments composant le modèle de *molecular clutch* "embrayage moléculaire", décrivant la mécanosensibilité des cellules à la rigidité du substrat, développé dans (Elosegui-Artola *et al.*, 2016). (b) Sur les substrats mous, le temps de transmission de la force dans l'embrayage est plus grand que la durée de vie de la liaison intégrine-ECM, ce qui entraîne la dissociation de la liaison avant que la taline ne puisse se déplier ou que la vinculine ne puisse se lier. (c) Sur les substrats rigides, le temps de transmission de la force dans l'embrayage est plus grand que la durée de vie de la liaison intégrine-ECM ce qui entraîne le dépliement de la taline, le recrutement de la vinculine et le renforcement du lien entre les adhésions et le cytosquelette d'actine. Adapté de (Swaminathan & Waterman, 2016).

Par ailleurs, Elosegui-Artola *et al.* ont montré que pour des cellules fibroblastes MEF il existe un

seuil en rigidité du substrat (5 kPa) au-dessus duquel la taline peut se déplier, condition nécessaire pour renforcer les adhésions focales et les faire maturer (Elosegui-Artola *et al.*, 2016). Les auteurs de cette étude ont d'ailleurs développé un modèle de *molecular clutch* "embrayage moléculaire" (Figure IV.30). En-dessous de la rigidité seuil, le temps de transmission de la force est plus grand que le temps de vie des adhésions : les adhésions disparaissent avant que la taline ne puisse se déplier ou la vinculine ne puisse se lier. Au-dessus de la rigidité seuil, les adhésions ont un temps de vie suffisant pour que la force soit transmise dans l'"embrayage" permettant le dépliement de la taline et la liaison de la vinculine. Dans nos expériences, 10 kPa est une rigidité seuil au-dessus de laquelle les forces de traction générées par la cellule augmentent : un dépliement de la taline permettant le renforcement des adhésions survient peut-être pour une rigidité comprise entre 10 et 40 kPa pour les cellules MDCK. En étudiant l'organisation du cytosquelette d'actine de fibroblastes en fonction de la rigidité du substrat, Gupta *et al.* ont montré qu'il existe une rigidité particulière séparant deux régimes (Gupta *et al.*, 2015) :

- un régime visqueux (pour les rigidités inférieures à une rigidité seuil) : les structures d'actine ont un temps de vie de l'ordre de la minute, plus petit que le temps d'observation (30 min dans leurs expériences)
- un régime élastique (pour les rigidités supérieures à une rigidité seuil) : les structures d'actine ont un temps de vie supérieur au temps d'observation.

Sur un substrat de 2 kPa, nous avons mesuré une vitesse de flux rétrograde d'actine élevée, peu de fibres de stress et des adhésions de petite taille (ce qui sous-entend qu'elles n'ont pas eu le temps de maturer). En revanche, au-dessus de 10 kPa, nous avons mesuré un flux d'actine plus petit et nous avons observé que les adhésions étaient de taille plus importante, en plus des fibres de stress de gros diamètre à la périphérie de la cellule. Ces observations suggèrent que dans nos expériences la transition entre un cytosquelette "visqueux" et un cytosquelette "solide" pourrait se situer entre 2 et 10 kPa.

Évolution de l'aire et de la force en fonction de la rigidité Il y a un décalage entre les courbes d'aire et de force totale en fonction de la rigidité du substrat : l'aire augmente et atteint un plateau plus rapidement que la courbe en force. Un tel décalage entre l'aire et la force est présent dans plusieurs articles (Califano & Reinhart-King, 2010; Han *et al.*, 2012; Christina Müller & Tilo Pompe, 2015) mais est rarement commenté et aucune explication n'est avancée pour expliquer un tel décalage. Ce décalage pour des rigidités intermédiaires, pourrait s'expliquer par un système adhésif suffisamment mature pour permettre à la cellule de s'étaler mais pas assez pour permettre à la cellule de tirer fortement sur son substrat.

Existence d'une rigidité optimale pour l'anisotropie de forme Nous avons mesuré un maximum pour l'anisotropie de forme pour une rigidité de substrat intermédiaire de 10 kPa. Ce résultat confirme les observations faites dans plusieurs articles (Schwarz & Safran, 2013; Bangasser *et al.*, 2017; Zemel *et al.*, 2010). Zemel *et al.* a montré que la polarisation des cellules souches mésenchymateuses

hMSC est maximale sur des substrats de rigidités intermédiaires, autour de 10 kPa également (Zemel *et al.*, 2010). Les auteurs montrent que cette rigidité optimale est liée à un alignement maximal des fibres de stress pour cette rigidité. Zemel *et al.* ont développé un modèle pour expliquer l'existence de cette rigidité optimale : ils modélisent la cellule comme un objet actif et élastique inclus dans un milieu infini, homogène et isotrope en 2D ou 3D. La théorie développée inclut à la fois les forces passives qui résultent de l'élasticité de la cellule et de son substrat, mais aussi les forces actives générées et régulées par les cellules *via* l'activité des myosines. Zemel *et al.* montrent qu'une petite asymétrie dans la forme initiale d'une cellule adhérente entraîne une rupture de symétrie de la contrainte élastique dans la cellule qui, à son tour, peut induire la polarisation des fibres de stress de la cellule.

L'imagerie en épifluorescence que nous avons utilisée dans cette thèse ne permet pas de visualiser l'ensemble du réseau de fibres de stress des cellules MDCK ; nous observons principalement le réseau périphérique de FS. Il est donc impossible de quantifier l'alignement de toutes les FS des cellules dans notre système. Notons qu'à 10 kPa, la majorité des cellules possèdent au moins deux FS périphériques de gros diamètre, alignées avec l'axe d'élongation de la cellule. Sur des substrats de 2 kPa ou sur des substrats de rigidité supérieure à 40 kPa, les FS sont moins bien alignées (Figure IV.22). Bangasser *et al.* ont montré que des cellules de glioblastome U251 présentent aussi un maximum d'anisotropie de forme (maximum de "polarisation") sur des substrats de rigidité intermédiaire entre 10 et 100 kPa (Bangasser *et al.*, 2017). Ces observations montrent que l'existence d'une rigidité optimale pour l'anisotropie de forme n'est pas limitée aux cellules souches. La polarisation des cellules permet aux cellules de migrer sur leur substrat, et influence d'autres fonctions cellulaires comme la différenciation cellulaire (Vicente-Manzanares & Sanchez-Madrid, 2000).

4.2 Mécanosensibilité des cellules Src-activées

La réponse à l'activation de Src est mécanosensible Tout d'abord, nous avons montré que la cellule répond à l'activation de Src en changeant son phénotype mécanique quelle que soit la rigidité de son substrat. Cette réponse (amplitude, cinétique) dépend de la rigidité du substrat : la réponse à l'activation de Src est donc mécanosensible. L'amplitude de la réponse mécanique à l'activation de Src est minimale pour un substrat de 2 kPa et le phénotype mécanique des cellules n'est pas maintenu sur les substrats de rigidités 2 kPa et 40 kPa :

- **Sur un substrat de 2 kPa**, la réponse à l'activation de Src est limitée, par rapport aux autres rigidités : les cellules s'étalent peu et sont moins contractiles que sur les autres rigidités. De plus, nous observons que le phénotype mécanique n'est pas maintenu. Ce résultat s'explique notamment par le fait que les cellules forment des adhésions lors de l'activation mais que celles-ci ne parviennent pas à murer : après une légère augmentation de la taille des AF, la cellule retrouve, après 30 min d'activation de Src, des adhésions de la même taille qu'avant activation, observation en accord avec la littérature : le temps de vie des adhésions est petit sur des substrats "mous" (Walcott *et al.*, 2011; Oakes *et al.*, 2018). De même, nous observons que la réorganisation du réseau de FS lors de l'activation de Src n'est pas maintenue. Au début

de l'activation de Src, le réseau de FS se réorganise : concentration du signal MRLC au centre de la cellule et formation de fibres de stress, certainement à l'origine de gain en contractilité des cellules au début de l'activation. Cependant après 30 min d'activation, la cellule retrouve l'organisation des FS qu'elle avait avant activation. L'ajout d'ions manganèse, activateurs des intégrines, dans le milieu de culture modifie la réponse des cellules MDCK OS à l'activation de Src : les cellules s'étalent et deviennent plus contractiles et le phénotype mécanique est maintenu tout au long de l'activation de Src. La réponse mécanique observée est alors similaire à celle observée sur un substrat de rigidité 10 kPa dans des conditions standards. Ces résultats montrent que la stabilisation et la maturation des adhésions sont essentielles pour le maintien du phénotype mécanique au cours de l'activation de Src.

- **Sur un substrat de 40 kPa**, le changement de phénotype mécanique des cellules est aussi important que sur des substrats de rigidité 10 kPa et 100 kPa mais celui-ci n'est pas maintenu dans le temps. Nous avons montré que la stabilisation des adhésions focales par l'ajout d'ions manganèse permet aux cellules Src-activées de maintenir leur phénotype mécanique à 40 kPa. Ces expériences montrent que le non-maintien du phénotype mécanique lors de l'activation de Src sur un substrat de 40 kPa pourrait être lié à la déstabilisation des adhésions focales. Nous observons également qu'après 30 min d'activation, de nombreuses fibres de stress formées au début de l'activation se "cassent", certainement à cause d'une tension trop forte au niveau des FS. En présence d'ions manganèse, la réponse mécanique observée est similaire à celle observée sur un substrat de rigidité 10 kPa dans des conditions standards. Ce résultat confirme ici aussi que la stabilisation des adhésions permet de maintenir le changement de phénotype mécanique associé à l'activation de Src.

Sur les substrats de rigidité 10 kPa et 100 kPa, le changement de phénotype mécanique des cellules-activées est maximal et maintenu dans le temps. Pour ces deux rigidités, le maintien de la réorganisation du réseau de FS et des adhésions relativement stables pourraient expliquer le maintien du phénotype mécanique lors de l'activation de Src.

Une rigidité particulière à 10 kPa ? 10 kPa semble rassembler les conditions requises pour avoir un changement de phénotype maximal lorsque Src est activée : des cellules étalées, exerçant des forces faibles avant activation, de forme "polarisée" et caractérisée par une distribution polarisée des forces. Nous suggérons qu'une rigidité de 10 kPa est suffisante pour que les adhésions formées pendant l'activation de Src soient stables mais pas trop grande, ce qui pourrait déstabiliser les fibres de stress/adhésions formées, comme nous l'observons sur un substrat de 40 kPa : les forces développées restent supportables pour les adhésions et les fibres de stress. Notons que 10 kPa correspond à la rigidité physiologique des tissus issus du rein (Guimarães *et al.*, 2020), il est donc intéressant de trouver une réponse maximale à l'activation de Src pour cette rigidité.

État mécanique après l'activation de Src Après l'activation transitoire de Src, nous observons une perte en force d'environ 20 % sur des substrats de 2, 10 et 40 kPa, pertes qui pourraient être liées aux déformations de la cellule pendant l'activation. En revanche pour des rigidités de 100 kPa ou des rigidités supérieures (ex : verre), peu ou pas physiologiques, les cellules ne retrouvent pas leur phénotype mécanique d'avant activation : les cellules sont plus étalées et les cellules sont légèrement plus contractiles qu'avant l'activation de Src sur les substrats de rigidité 100 kPa. Après l'activation transitoire de Src, les cellules semblent avoir subi un changement de phénotype mécanique plastique, opposé à celui observé sur 2, 10 et 40 kPa. Sur ces rigidités "dures", après l'activation de Src, les cellules ont conservé en partie l'organisation des fibres de stress qu'elles ont acquises au cours de l'activation (Figure IV.22). Cela pourrait expliquer le fait que pour ces rigidités, les cellules ne retrouvent pas leur étalement d'avant activation : l'activation transitoire de Src est responsable d'un changement plastique du cytosquelette des cellules. Ces observations sont en accord avec la littérature (Klomp *et al.*, 2016; Shaaya *et al.*, 2020) : Klomp *et al.* ont montré que suite à une activation transitoire de Src (utilisation du système Rap-R, présenté dans le Chapitre I), les cellules déposées sur du verre sont plus étalées qu'avant l'activation (Klomp *et al.*, 2016). Suite à une activation transitoire de Src, Klomp *et al.* observent un nouvel étalement des cellules. Il explique ces changements morphologiques "secondaires" par l'activation de voies de signalisation telles que Rac1-Arp 2/3 et PI3/Akt. Ces deux voies de signalisation pourraient donc jouer un rôle dans l'étalement des cellules sur du verre observé après l'activation transitoire de Src.

Notons qu'en présence de manganèse, les cellules MDCK OS déposées sur un substrat de 40 kPa suite à l'activation de Src sont plus étalées qu'avant activation, semblable au phénotype observé sur des substrats de rigidité supérieure à 100 kPa. Ces cellules retrouvent d'ailleurs un état contractile similaire à celui d'avant activation. Ces résultats suggèrent que la stabilité des adhésions joue un rôle essentiel dans la perte de forces après l'activation : il n'y a pas de perte mécanique, lorsque les adhésions sont suffisamment stables.

Paramètres à étudier D'autres paramètres pourraient jouer un rôle dans les réponses mécaniques à l'activation de Src, observées sur les substrats de rigidité différente, et devraient être étudiés :

- **La densité de fibronectine recouvrant les substrats** : Le dépôt de fibronectine sur les substrats de différentes rigidité devrait être mesuré car il pourrait participer à la mécanosensibilité des cellules : pour un même temps d'incubation, la densité de fibronectine déposée pourrait dépendre de la rigidité du substrat. Or, de nombreuses études ont montré l'importance de la concentration de protéine adhésive sur l'état mécanique des cellules : les cellules exercent plus de forces lorsque la concentration de protéines qui recouvre le substrat augmente (Califano & Reinhart-King, 2010).
- **Les voies de signalisation** : Dans le Chapitre III de ce manuscrit, nous avons identifié les acteurs moléculaires à l'origine du changement de phénotype mécanique des cellules sur un substrat de rigidité 10 kPa. Les voies de signalisation activées lors de l'activation de Src dans

des cellules déposées sur des substrats de rigidité pourraient être différentes. Paszek *et al.* ont d'ailleurs montré que certaines protéines sont activées pour des rigidités élevées (~ 5 kPa) alors qu'elles ne le sont pas pour des rigidités plus faibles (~ 400 Pa) (Paszek *et al.*, 2005). Cependant, le fait d'observer un changement de phénotype mécanique (étalement, contractilité) "similaire" ainsi qu'une réorganisation du cytosquelette "similaire" pour toutes les rigidités suggèrent que les voies de signalisation activées pourraient être les mêmes que celles activées à 10 kPa.

- **Action des phosphatases** : Des cellules MDCK soumises à une activation prolongée de Src sur un substrat de 10 kPa, ne maintiennent pas leur contractilité au delà de 1 h d'activation, ce qui pourrait résulter de l'inhibition de Src par les phosphatases. Sur un substrat de 40 kPa, le gain en contractilité des cellules Src-activées n'est pas maintenu et diminue rapidement après 20 min d'activation de Src. L'inhibition des phosphatases pourrait dépendre de la rigidité du substrat : elles pourraient, par exemple, inhiber plus rapidement le changement de phénotype mécanique des cellules sur un substrat de rigidité 40 kPa que celui des cellules sur un substrat de rigidité 10 kPa.
- **Type cellulaire** : De nombreuses études ont montré que la mécanosensibilité du substrat dépendait du type cellulaire (Janmey *et al.*, 2020). Nous pourrions par exemple étudier la réponse mécanique des cellules MEF à l'activation de Src en fonction de la rigidité du substrat. Il serait intéressant de déterminer si pour ces cellules, 10 kPa est aussi une rigidité particulière pour la réponse à l'activation de Src.

Chapitre V

Conclusion & Perspectives

Table des matières

1	Principaux résultats	160
2	Bilan	162
2.1	Caractériser le phénotype mécanique des cellules transformées sur des substrats de rigidité physiologique...	162
2.2	...et dans le temps	163
2.3	Des outils adaptés à l'étude du phénotype mécanique dans le temps sur des substrats de rigidités physiologiques	163
2.4	Identifier des "marqueurs mécaniques"	164
3	Questions ouvertes	164
3.1	Trouver la cascade d'activation à l'origine du changement de phénotype mécanique des cellules Src-activées	164
3.2	Lier la réorganisation du réseau de fibres de stress au gain en contractilité des cellules Src-activées	165
3.3	Comprendre la perte de force après l'activation de Src	165
3.4	Modéliser la mécanosensibilité des cellules épithéliales MDCK normales et Src-activées	166
4	Perspectives	166
4.1	Des stratégies pour limiter le changement de phénotype mécanique des cellules Src-activées ?	166
4.2	Que se passe-t-il à l'échelle du tissu ?	167
4.3	Que se passe-t-il en 3D ?	168

1 Principaux résultats

Dans cette thèse, nous avons étudié la réponse biomécanique de cellules épithéliales à l'activation de l'oncoprotéine Src. L'utilisation de l'optogénétique nous a permis de contrôler dans le temps et de manière réversible l'activation de l'oncoprotéine Src dans des cellules épithéliales uniques, déposées sur

des gels de polyacrylamide de rigidité donnée. Les cellules ont été soumises à une activation transitoire de Src d'1 h et nous avons mesuré la réponse biomécanique des cellules en utilisant la TFM (mesure des forces de traction) et en observant les principaux composants de leur cytosquelette.

Nous avons d'abord caractérisé le changement de phénotype biomécanique associé à la suractivation de Src de cellules déposées sur un substrat de rigidité 10 kPa (Chapitre III).

Nous avons montré que :

- les cellules Src-activées s'étalent, exercent plus de force de traction, ont une forme plus isotrope et une distribution des forces plus isotrope que les cellules "normales".
- l'étalement des cellules Src-activées requiert l'activation de la voie de signalisation Rac1-Arp2/3.
- le gain en contractilité des cellules Src-activées est indépendant de la voie de contractilité classique Rho/ROCK et repose sur l'activation de la kinase MLCK. De plus, il nécessite un flux de calcium, provenant en partie du réticulum endoplasmique.
- l'activation de Src ne change pas la rigidité corticale des cellules mais est responsable d'une légère augmentation de leur volume.
- le changement de phénotype mécanique des cellules Src-activées s'accompagne d'une réorganisation du cytosquelette : augmentation du flux rétrograde d'actine, augmentation du nombre et de la taille des adhésions focales et réorganisation du réseau de fibres de stress périphériques ("concentration des myosines" sur les fibres de stress puis apparition de fibres de stress plus fines). Cette réorganisation du réseau de fibres de stress est d'ailleurs MLCK-dépendante.
- après l'activation transitoire de Src, 40% des cellules s'arrondissent. Cet arrondissement dure en moyenne 40 min avant que les cellules ne se ré-étalent sur leur substrat. Nous avons également montré que cet arrondissement était certainement lié à la déstabilisation des adhésions après l'activation transitoire de Src.
- Après l'activation transitoire de Src, la cellule ne retrouve pas son phénotype mécanique d'avant activation : il y a une perte mécanique (perte en force).
- des fibroblastes Src-activés ont une réponse similaire à celle des cellules épithéliales mais retrouvent après l'activation, leur état mécanique d'avant activation.

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux interactions des cellules Src-activées avec leur environnement. Nous avons choisi d'étudier un aspect de ces interactions : l'effet de la rigidité du substrat sur la réponse biomécanique des cellules à l'activation de Src (Chapitre IV). Nous avons montré que :

- les cellules Src-activées s'étalent et deviennent plus contractiles quelle que soit la rigidité du substrat.
- la réponse (amplitude, évolution temporelle) à l'activation de Src est mécano-sensible, elle dépend de la rigidité du substrat sur lequel les cellules sont déposées
- l'amplitude de la réponse est minimale sur un substrat peu rigide (2 kPa)
- le changement de phénotype mécanique (étalement, contractilité) n'est maintenu que sur des substrats de rigidité 10 kPa et 100 kPa. Il n'est pas maintenu sur des substrats de rigidité 2 kPa et 40 kPa. À 2 kPa, les adhésions et les fibres de stress disparaissent au cours de l'activation.

À 40 kPa, nous observons la déstabilisation de certaines adhésions/fibres de stress au cours de l'activation.

- 10 kPa est une rigidité intermédiaire particulière pour laquelle le changement de phénotype mécanique est maximal et maintenu pendant la durée de l'activation.
- la stabilisation des adhésions (*via* l'ajout d'ions manganèse) permet d'obtenir un changement de phénotype mécanique maximal et maintenu pendant 1 h sur les substrats de rigidité 2 et 40 kPa, similaire à celui observé sur un substrat de rigidité 10 kPa.
- le nombre de cellules s'arrondissant après l'activation transitoire de Src est maximal sur des substrats de rigidité intermédiaire de 10 et 40 kPa.
- après l'activation transitoire de Src, nous observons une perte de force pour des substrats de rigidité inférieure à 40 kPa (20 %) alors que pour un substrat de rigidité 100 kPa, les cellules sont légèrement plus étalées et contractiles qu'avant l'activation.

2 Bilan

2.1 Caractériser le phénotype mécanique des cellules transformées sur des substrats de rigidité physiologique...

Notre étude a montré que le phénotype mécanique des cellules normales et des cellules Src-transformées est mécanosensible : il dépend de la rigidité du substrat. De nombreuses études *in vitro* décrivent les changements de propriétés des cellules transformées et cancéreuses sur du verre (rigidité de ~ 60 GPa). Or les comportements des cellules peuvent être différents sur des substrats de rigidité physiologique (rigidité de 0,5 kPa à 100 kPa) et varier en fonction de ces rigidités. Panciera *et al.* ont par exemple montré que des cellules de sein surexprimant HER se transforment sur des substrats de rigidité élevée (40 kPa) alors qu'aucune transformation n'est observée sur des substrats de rigidité plus faible (Panciera *et al.*, 2020). Les changements de phénotype observés sur du verre ne sont pas forcément pertinents dans le contexte physiologique. En particulier, notre étude révèle que sur des rigidités peu ou pas physiologiques (100 kPa, verre), les cellules semblent subir un changement plastique de leur phénotype mécanique : après l'activation transitoire de Src, les cellules sont par exemple plus étalées qu'avant l'activation. Un tel changement n'est pas observé pour les rigidités physiologiques de 2, 10 et 40 kPa. Cela montre l'importance d'étudier les changements biomécaniques associés à l'activation d'oncogène sur des rigidités physiologiques. De plus, des études récentes montrent que les cellules cancéreuses ont une mécanosensibilité altérée comparé aux cellules normales, ce qui pourrait leur conférer un avantage sur les cellules normales pour proliférer et envahir les tissus environnants. Certaines cellules cancéreuses n'adaptent pas leur phénotype à la rigidité du substrat ou ont une durotaxie inversée. Étant donné que la rigidité de la MEC évolue dans le temps, comprendre comment une cellule cancéreuse adapte son phénotype mécanique à différentes rigidités permettra certainement de mieux comprendre la cascade métastastique (Gensbittel *et al.*, 2020).

2.2 ...et dans le temps

In vivo les cellules font face à de nombreuses perturbations qui affectent leur phénotype mécanique. Mesurer dans le temps le phénotype mécanique des cellules soumises à des perturbations (mécanique, oncogénique,...) permet d'étudier l'adaptation du phénotype mécanique de la cellule face à ces changements. Andersen *et al.* ont ainsi montré que des fibroblastes soumis à une activation courte de RhoA (durée de 100 ms), à l'origine d'une augmentation de contractilité, retrouvent leur état contractile initial quelques minutes après l'activation (Andersen *et al.*, 2022). Dans les cas pathologiques, les processus d'adaptation face à des perturbations peuvent être altérés (Paszek *et al.*, 2005). Il existe peu d'études mesurant les forces de traction des cellules transformées ou cancéreuses au cours du temps. Pourtant l'évolution temporelle des forces de traction pourrait être un marqueur du pouvoir invasif des cellules : Peschetola *et al.* ont montré que des cellules cancéreuses RT112 exercent des forces à peu près constantes sur une période de ~ 1 h alors que des cellules cancéreuses T24, plus invasives et motiles, présentent des forces de traction plus faibles qui varient au cours du temps (Peschetola *et al.*, 2013). Dans cette thèse, la mesure du phénotype mécanique de cellules MDCK soumises à une activation de Src montre que la réponse mécanique à l'activation de Src dépend de la rigidité : sur un substrat de 40 kPa, une mesure des forces de traction après 15 min d'activation Src donne une valeur plus élevée qu'après 1 h d'activation de Src : cet exemple montre l'importance de ne pas caractériser des phénotypes mécaniques pour un seul point de temps, mais au cours du temps.

2.3 Des outils adaptés à l'étude du phénotype mécanique dans le temps sur des substrats de rigidités physiologiques

Les outils (optogénétique, TFM, marquage du cytosquelette) que nous avons utilisés dans cette thèse permettent à la fois de réaliser des expériences sur des substrats de rigidités physiologiques et d'étudier dans le temps la réponse biomécanique à l'activation de Src. Ces outils ont permis de lier la transformation par une oncoprotéine à la réorganisation du cytosquelette et aux changements de propriétés morphologiques et mécaniques des cellules. La TFM permet de mesurer les propriétés mécaniques au cours du temps sans la perturber, de manière non invasive, sur des substrats de rigidités physiologiques et sur des temps longs. L'outil optogénétique permet, quant à lui, de contrôler l'activation de l'oncoprotéine Src dans le temps, et de manière réversible. Cela présente plusieurs avantages :

- **Étudier des réponses normalisées** : En mesurant le phénotype mécanique avant l'activation et pendant l'activation de Src, nous pouvons étudier des réponses mécaniques "normalisées". Une cellule est en quelque sorte son propre contrôle : la même cellule est mesurée dans son état "normal" et dans son état "transformé". Cela nous a permis d'observer l'effet de Src sur le phénotype mécanique indépendamment du phénotype mécanique des cellules avant l'activation.
- **Étudier les voies de signalisation** : L'optogénétique a également permis d'identifier les voies de signalisation liée à l'activation de Src. Couplé à d'autres méthodes (pharmacologiques, géné-

tiques), elle permet de décortiquer la cascade temporelle d'activation des voies de signalisation suite à l'activation de la protéine d'intérêt (Shaaya *et al.*, 2020).

- **Étudier l'adaptation/la plasticité du phénotype mécanique** : L'optogénétique permet d'activer des protéines de façon réversible. Cependant l'activation de cette protéine peut avoir, elle, des effets sur l'état mécanique irréversibles : elle pourrait être responsable de changements plastiques du phénotype mécanique des cellules. Des études ont montré que suite à des étirements mécaniques, les cellules ne retrouvent pas leur état mécanique initial, ce qui pourrait être lié à des changements plastiques dans le cytosquelette des cellules (Cirka *et al.*, 2016; Rosowski *et al.*, 2018). Ainsi, après l'activation transitoire de Src, nous avons montré que les cellules peuvent ne pas retrouver leur phénotype mécanique d'avant activation.

2.4 Identifier des "marqueurs mécaniques"

De nombreuses études se sont attachées à décrire les nouvelles propriétés biomécaniques acquises par les cellules cancéreuses au cours du processus tumoral. Ces caractéristiques pourraient permettre d'identifier le pouvoir invasif ou métastatique des cellules (Tseng *et al.*, 2011; Kraning-Rush *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017). Elles pourraient ainsi permettre de prédire le stade d'avancement d'un cancer, son agressivité ou encore de contrôler l'efficacité d'un traitement anti-cancéreux en observant l'évolution des propriétés des cellules au cours du traitement. Cependant, peu d'études portent sur l'évolution de ces propriétés mécaniques au stade précoce de la progression tumorale : lors de la transformation oncogénique. Notre étude apporte un nouvel éclairage sur le changement de phénotype biomécanique qui accompagne la transformation par une oncoprotéine. De manière spéculative, ces nouvelles caractéristiques pourraient servir de "marqueurs mécaniques" de la transformation des cellules par Src.

3 Questions ouvertes

3.1 Trouver la cascade d'activation à l'origine du changement de phénotype mécanique des cellules Src-activées

Les expériences de pharmacologie nous ont permis d'identifier les principales voies de signalisation impliquées dans le changement de phénotype mécanique des cellules Src-activées. Cependant de nombreux points restent à élucider, notamment sur la séquence temporelle d'activation des différentes voies de signalisation dans le temps. Nous avons identifié des acteurs moléculaires qui semblent agir plutôt au début de l'activation (MLCK) et des acteurs comme les myosines II agissant plutôt dans la deuxième partie de l'activation. Nos expériences ne nous ont pas permis de reconstituer une séquence temporelle d'activation claire des acteurs moléculaires. L'approche pharmacologique pourrait être en cause. En effet, les inhibiteurs utilisés ont une sélectivité limitée. De plus, nous nous sommes appuyés sur la littérature pour déterminer la concentration d'inhibiteur à utiliser, mais nous n'avons pas pu quantifier l'inhibition réelle ni sa durée. L'inhibition a pu être évaluée en comparant le phénotype mécanique des cellules en l'absence et en présence d'inhibiteurs dans le noir mais cela n'a pas toujours

suffi pour s'assurer de l'efficacité des drogues. Enfin, l'optogénétique peut aussi poser problème et induire des effets phototoxiques : la para-nitro blebbistatine (version non photo-toxique de la blebbistatine) n'a d'ailleurs pas pu être utilisée pour des concentrations supérieures à 1 μM : contrairement à ce qui est rapporté, cela pourrait être dû à l'utilisation de la lumière bleue dans nos expériences. À cette concentration, il est possible que l'activité des myosines II ne soit pas entièrement inhibée et cette inhibition partielle pourrait expliquer l'allure des courbes obtenues (Figure III.15). Enfin, nous ne pouvons pas exclure que les inhibiteurs ne modifient pas la cinétique de la réponse mécanique des cellules. Afin d'inhiber de façon plus spécifique un acteur moléculaire, des expériences utilisant des siARN pourraient s'avérer utiles. Elles permettraient certainement de mieux comprendre la séquence temporelle d'activation des acteurs moléculaires impliqués dans l'activation de Src.

3.2 Lier la réorganisation du réseau de fibres de stress au gain en contractilité des cellules Src-activées

La cellule Src-activée réorganise son réseau de fibres de stress. Nous avons observé que l'activation de Src est responsable d'une concentration des myosines II le long des fibres de stress. Il reste à savoir quel acteur moléculaire est responsable de ce phénomène et si cette "concentration" de myosines II peut être responsable du gain en contractilité des cellules au début de l'activation de Src. Nous avons aussi observé la formation de fibres de stress plus fines (arcs transverses ou fibres ventrales). Pour le moment, nous n'avons pas évalué le rôle de l'activité des myosines sur cette réorganisation des fibres de stress : pour cela, nous pourrions observer les fibres de stress lorsque les myosines II sont inhibées (en utilisant de la para-nitro blebbistatine). De plus, il serait intéressant de comprendre comment ce réseau de fibres de stress fines permet à la cellule épithéliale Src-activée d'être plus contractile qu'avant l'activation. Nous n'avons pas pu mesurer les forces de traction et observer la réorganisation des fibres de stress en même temps (en raison de notre système optogénétique qui limite les canaux de fluorescence utilisables). Cependant ces expériences s'avéreraient intéressantes pour relier finement la réorganisation du réseau de fibres de stress au gain en contractilité des cellules Src-activées.

3.3 Comprendre la perte de force après l'activation de Src

Après l'activation transitoire de Src, les cellules épithéliales MDCK déposées sur des substrats de rigidité inférieure à 40 kPa ne retrouvent pas leur état mécanique d'avant activation. La perte en force est en moyenne de $\sim 20\%$. Cependant, il existe plusieurs situations pour lesquelles nous n'observons pas de perte mécanique suite à l'activation de Src :

- cellules MDCK OS sur un substrat de rigidité 100 kPa
- cellules MDCK OS sur un substrat de rigidité 40 kPa, en présence d'ions manganèse
- cellules MDCK OS sur un substrat de rigidité 10 kPa lorsque les canaux calciques sont inhibés
- fibroblastes MEF sur un substrat de rigidité 10 kPa.

Nous n'avons pas identifié de paramètres morphologiques ou mécaniques (valeur avant activation, amplitude de changement pendant l'activation) permettant de prédire cette perte mécanique des cellules

après l'activation. D'autres paramètres devront donc être étudiés pour comprendre l'origine de cette perte mécanique.

3.4 Modéliser la mécanosensibilité des cellules épithéliales MDCK normales et Src-activées

Dans cette thèse, nous avons étudié la mécanosensibilité de cellules épithéliales MDCK et l'altération de cette mécanosensibilité lorsque Src est activée. Il serait intéressant de modéliser la réponse à la rigidité du substrat des cellules normales et celle des cellules Src-activées. Dans le cas des cellules MDCK "normales", nous avons montré que 10 kPa est une rigidité particulière : rigidité au-dessus de laquelle les forces de traction augmentent et rigidité qui maximise la polarisation de la forme et de la distribution des forces de traction. Dans le cas des cellules MDCK Src-activées, 10 kPa est aussi une rigidité particulière pour laquelle le changement de phénotype mécanique est maximal et maintenu pendant l'activation. La question est de savoir si l'on peut prédire cette réponse maximale à 10 kPa en considérant l'état mécanique des cellules avant l'activation. Pour cela, nous aimerions nous inspirer des modèles développés par Doss *et al.* et Zemel *et al.* (Zemel *et al.*, 2010; Doss *et al.*, 2020) : la cellule serait modélisée comme un gel actif, visqueux pour une rigidité de 2 kPa et élastique pour une rigidité plus élevée et caractérisée par une polarisation maximale de la forme et de la force sur un substrat de rigidité 10 kPa.

4 Perspectives

4.1 Des stratégies pour limiter le changement de phénotype mécanique des cellules Src-activées ?

Agir sur le changement de contractilité des cellules plutôt que sur Src De nombreuses études ont montré que la suractivation de Src dans les cellules augmentait le pouvoir invasif et métastatique des cellules. Cependant les agents anti-cancéreux visant l'inhibition de Src comme le dasatinib (Aleshin & Finn, 2010; Mayer & Krop, 2010) ont rencontré un succès limité. L'inhibition de Src peut être au désavantage du patient en raison du rôle de Src dans de nombreux processus physiologiques. Plutôt que d'inhiber Src, il pourrait être intéressant d'inhiber les changements de phénotype mécanique lié à l'activation de Src, en particulier l'augmentation de la contractilité des cellules. En effet Kraning-Rush *et al.* ont montré que l'accroissement des forces de traction était lié à une augmentation du pouvoir métastatique des cellules (Kraning-Rush *et al.*, 2012). Dans cette thèse, nous avons montré que le changement de contractilité des cellules repose en partie sur l'activation de la kinase MLCK et non sur l'activation de la voie de contractilité classique Rho/ROCK. Inhiber MLCK pourrait s'avérer utile pour diminuer le changement de contractilité des cellules Src-activées et donc potentiellement leur pouvoir invasif.

Agir sur la rigidité de la MEC En faisant varier la rigidité des gels de PAA, nous avons pu étudier les altérations de la mécanosensibilité des cellules transformées par Src. Nous avons montré que la réponse des cellules épithéliales à l'activation de Src était plus faible sur un substrat de 2 kPa que pour des rigidités plus élevées. Notre étude révèle également que 10 kPa est une rigidité particulière pour laquelle le changement de phénotype mécanique des cellules épithéliales à l'activation de Src est maximal. Au cours du processus tumoral, l'augmentation de rigidité de l'ECM pourrait favoriser un changement de phénotype mécanique important des cellules Src-activées. Une stratégie pour contrer les effets de l'activation de Src pourrait consister à limiter la rigidification de l'ECM qui peut avoir lieu au cours du processus tumoral (rigidité ≤ 2 kPa).

4.2 Que se passe-t-il à l'échelle du tissu ?

La cellule n'est pas isolée et interagit avec de nombreuses cellules. Src en particulier est essentiel dans la régulation des adhésions entre cellules au sein d'un tissu. Son activation est notamment responsable d'un relâchement de la tension des E-cadhérines (Gayrard *et al.*, 2018; Teo *et al.*, 2020a). En effet, nous observons que l'activation de Src dans des petits groupes de cellules MDCK OS déposées sur du verre est responsable d'une diminution de l'adhésion entre les cellules : après 3 h d'activation de Src, les cellules commencent à se détacher les unes des autres (Figure V.1). Notons que ce comportement est moins visible sur des gels de PAA de rigidité 10 kPa, ce qui montre l'importance d'étudier l'effet de l'activation sur des substrats de rigidités physiologiques.

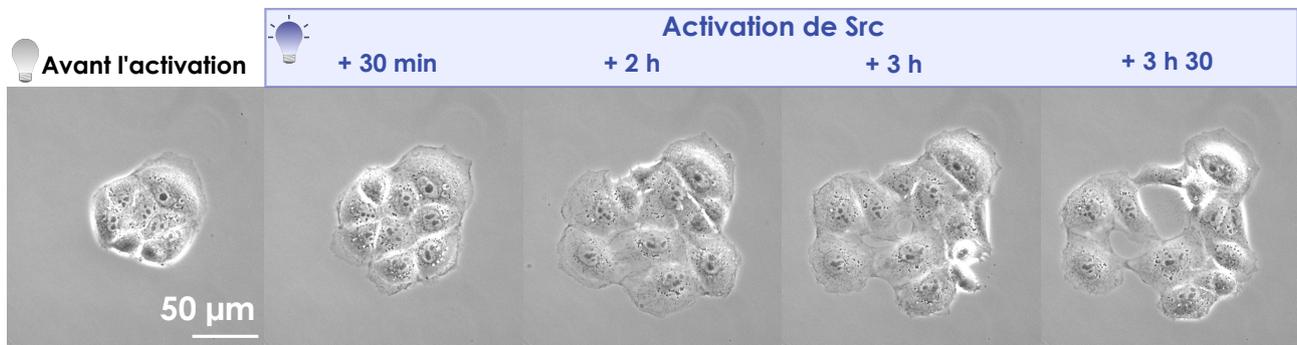


FIGURE V.1 – **Réponse mécanique d'un groupe de cellules déposé sur du verre à une activation prolongée de Src** Images en contraste de phase montrant un groupe de cellules MDCK OS déposées sur du verre, soumise à une activation prolongée de Src : les cellules commencent à se détacher les unes des autres au bout de 3 h d'activation.

Nous avons montré que la réponse mécanique d'un petit groupe de cellules à l'activation de Src était similaire à celui de cellules uniques. Nous avons caractérisé le changement de phénotype mécanique à l'échelle de la cellule unique et étudier son interaction avec son substrat. La question est de savoir ce qu'il se passe à l'échelle d'un tissu de cellules Src-activées : l'interaction avec les autres cellules modifie-t-elle la réponse biomécanique à l'activation décrite à l'échelle de la cellule unique ? Étant donné que Src agit à la fois sur le système adhésif avec la MEC et sur le système adhésif entre cellules, il serait intéressant d'étudier comment Src coordonne ces deux systèmes et quelles sont les conséquences sur

les propriétés mécaniques à l'échelle du tissu. *In vivo* et *in vitro*, des mouvements collectifs peuvent émerger, mouvements qui ont un rôle dans la cicatrisation, ou encore l'invasion tumorale (Ladoux & Mège, 2017). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet d'une suractivation de Src sur ces mouvements collectifs de cellules.

4.3 Que se passe-t-il en 3D ?

Dans cette thèse, toutes nos expériences ont été réalisées sur un substrat 2D. Cependant, une étude du phénotype mécanique des cellules Src-activées dans une matrice 3D permettrait de s'approcher d'une situation plus physiologique. Le changement de phénotype biomécanique est-il similaire dans une matrice 3D ? Polackwich *et al.* ont montré que des cellules épithéliales MDA-MB-231 Src-activées dans un gel de collagène 3D étaient plus volumineuses et exerçaient plus de forces de traction que des cellules wt (Polackwich *et al.*, 2013). De plus, ils ont montré une ré-organisation des adhésions focales associée à l'activation de Src, similaire à celle que nous avons décrite. Le phénotype mécanique des cellules Src-activées sur un substrat 2D semble similaire lorsque les cellules sont placées dans un environnement 3D. La question suivante serait donc de savoir si les voies de signalisation identifiées dans notre étude sont les mêmes dans un environnement 3D.

Annexes

Annexe A

Méthode de PIV

Historiquement, cette méthode a été introduite pour mesurer des vitesses d'écoulement hydrodynamique après incorporation de traceurs contrastés dans le fluide d'intérêt (Grant, 1997). De manière générale, pour des images de microscopie en niveaux de gris, la PIV consiste à calculer la corrélation de la matrice des niveaux de gris entre deux sous-fenêtres d'images successives pour obtenir le déplacement local puis le champ de vitesse locale (Figure A.1). La PIV fonctionne aussi pour mesurer des vitesses à partir d'images de cellules en contraste de phase.

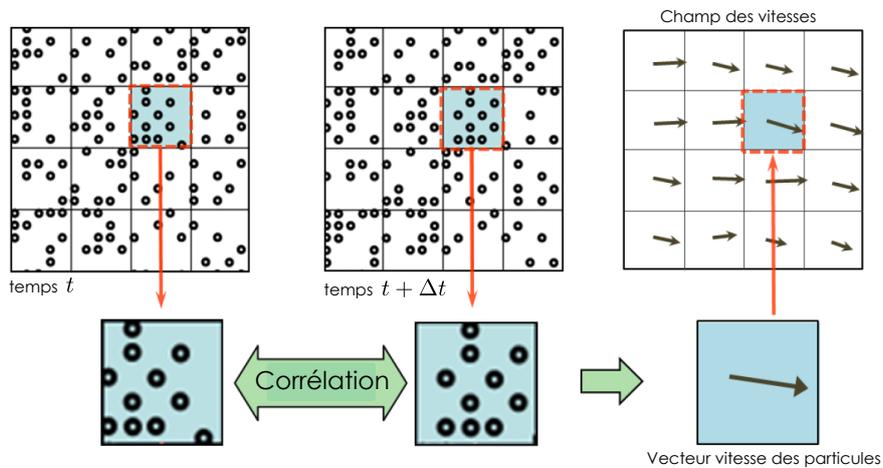


FIGURE A.1 – **Principe de la PIV (a)** L'image des particules est divisée en sous-fenêtres. Pour chaque sous-fenêtre, on calcule la corrélation entre son image à l'instant t et son image à l'instant $t + \Delta t$. La position du maximum de corrélation permet d'obtenir le déplacement moyen entre les deux sous-fenêtres et ainsi le vecteur vitesse des particules. En répétant cette procédure sur toutes les sous-fenêtres de l'image, on obtient le champ des vitesses locales dans l'image (représenté par les flèches). Adapté de (Min Choi *et al.*, 2011).

Annexe B

Reconstruction du champ de forces de traction

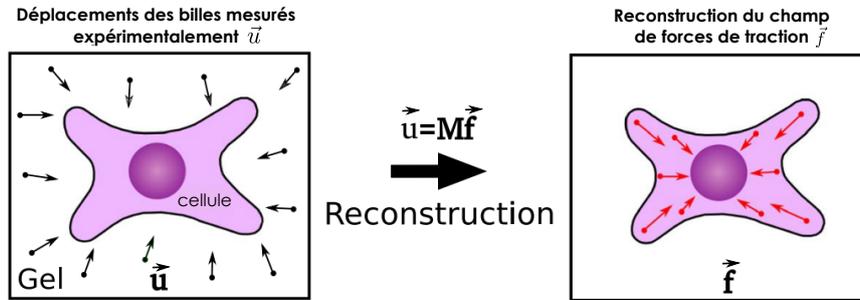


FIGURE B.1 – **Mesure des forces de traction en utilisant la TFM** Les cellules sont placées sur un gel contenant des billes. Le suivi des marqueurs permet de mesurer les déformations \vec{u} dans l’environnement de la cellule. Ces déformations sont linéairement liées aux forces de traction \vec{f} . Le calcul des forces \vec{f} à partir des déplacements \vec{u} est associé à l’inversion d’une matrice M , effectuée avec différentes méthodes de reconstruction. Adapté de (Huang *et al.*, 2019)

1 Procédure de régularisation

L’équation liant le déplacement des billes \vec{u} aux forces de traction \vec{f} est donnée par (Burton & Taylor, 1997) :

$$\vec{u}(\vec{r}) = \int_{\vec{r}' \in \Omega} \underline{\underline{G}}(\vec{r} - \vec{r}') \vec{f}(\vec{r}') d\vec{r}' \quad (\text{B.1})$$

où

- \vec{r} : vecteur position
- $\underline{\underline{G}}(\vec{r})$: fonction de Green qui dépend des propriétés du substrat (définie dans le Chapitre I de ce manuscrit)
- Ω : surface du substrat

L’intégrale de l’équation B.1 peut être convertie en un produit matriciel en discrétisant le champ de traction (voir (Soigné *et al.*, 2015) et (Huang *et al.*, 2019) pour plus de détails) et devient alors :

$$\vec{u} = M\vec{f} + \vec{s} \quad (\text{B.2})$$

où la matrice M représente les coefficients d'une intégration discrétisée et \vec{s} le bruit d'acquisition, présent dans les données expérimentales. L'inversion directe de l'équation B.2 peut induire des erreurs importantes dans la reconstruction des forces de traction. Pour limiter ces erreurs, une procédure de régularisation est employée : elle consiste à minimiser le résidu $(M\vec{f} - \vec{u})$ ainsi que la norme des forces. La procédure de régularisation consiste ainsi à résoudre un problème de minimisation de type :

$$\hat{\vec{f}} = \underset{\vec{f}}{\operatorname{argmin}} \left[\|M\vec{f} - \vec{u}\|_2^2 + \lambda_1 \|R_1\vec{f}\|_1 + \lambda_2 \|R_2\vec{f}\|_2^2 \right] \quad (\text{B.3})$$

où

- argmin donne la valeur de \vec{f} pour laquelle la fonction entre crochets atteint son minimum.
- les normes $\|\cdot\|_1$ et $\|\cdot\|_2$ sont données par : $\|\vec{x}\|_1 = \sum_k |x_k|$ et $\|\vec{x}\|_2 = \sqrt{\sum_k x_k^2}$ avec k la dimension du vecteur \vec{x} et x_k sa k -ième coordonnée.
- R_1 et R_2 sont les matrices identité $R_1 = R_2 = I$

Les procédures de régularisation les plus utilisées en TFM sont les suivantes :

- **la régularisation L1**, appelée également régularisation de Lasso (Tibshirani, 1996), est réalisée en prenant $\lambda_2 = 0$, $\lambda_1 > 0$ (Suñé-Auñón *et al.*, 2017). Elle est plus adaptée aux champs de forces plus éparées, mais ne permet pas d'obtenir de solution analytique pour le minimum global.
- **la régularisation L2**, appelée régularisation de Tikhonov (Tikhonov *et al.*, 1995), est réalisée en prenant $\lambda_2 > 0$ et $\lambda_1 = 0$. C'est la technique de régularisation la plus utilisée pour la TFM. Cette méthode est simple et est de plus robuste pour le problème d'inversion dans l'espace réel et également dans l'espace de Fourier. Elle permet de reconstruire un champ de forces de traction continu et lisse (Schwarz *et al.*, 2002; Sabass *et al.*, 2008).

2 Qualité de la reconstruction

La qualité de la reconstruction des forces de traction à partir du déplacement des billes du gel peut être évaluée en comparant la somme vectorielle des forces de traction \vec{T} (en Pa) de la cellule avec la force totale exercée par la cellule sur son substrat (somme de la norme des forces). En effet, la cellule étant isolée, la somme des forces de traction qu'elle exerce sur son substrat devrait être nulle. En raison du bruit expérimental et des erreurs liées à la reconstruction numérique des forces, cette somme n'est rigoureusement pas nulle. On définit alors le facteur de qualité Q de la reconstruction des forces de traction :

$$Q = 1 - \frac{\sum_{\text{masque}_d} \vec{T}}{\sum_{\text{masque}_d} \|\vec{T}\|} \quad (\text{B.4})$$

où masque_d correspond au masque dilaté de la cellule d'une distance de 32 pixels soit 7,68 μm . La dilatation du masque de cellule permet de prendre en compte toutes les forces exercées par la cellule sur son substrat (voir paragraphe 7.3 pour plus de détails). La reconstruction des forces est considérée comme acceptable lorsque ce facteur de qualité est supérieur à 0,85 (Maruthamuthu *et al.*, 2011) (Figure II.6 c) : 15 % des forces de traction de la cellule au maximum ne sont pas équilibrées.

3 Méthode BFTTC : choix de "stratégie" et influence de la rigidité du substrat

Pour reconstruire le champ de forces de traction à partir du déplacement des billes, nous pouvons utiliser la méthode BFTTC (*Bayesian Fourier Transform Traction Cytometry*), développée dans un article récent (Huang *et al.*, 2019; Huang, Gompper & Sabass, 2020). Cette méthode repose sur une approche bayésienne de la régularisation L2. Dans ce cas, nous avons $\lambda_1 = 0$, $\lambda_2 > 0$ dans l'équation B.3. La méthode permet de calculer automatiquement le paramètre de régularisation optimal λ_2 à partir du bruit de mesure. Ce bruit est estimé à partir de la variance du déplacement des billes dans une fenêtre en dehors de la cellule.

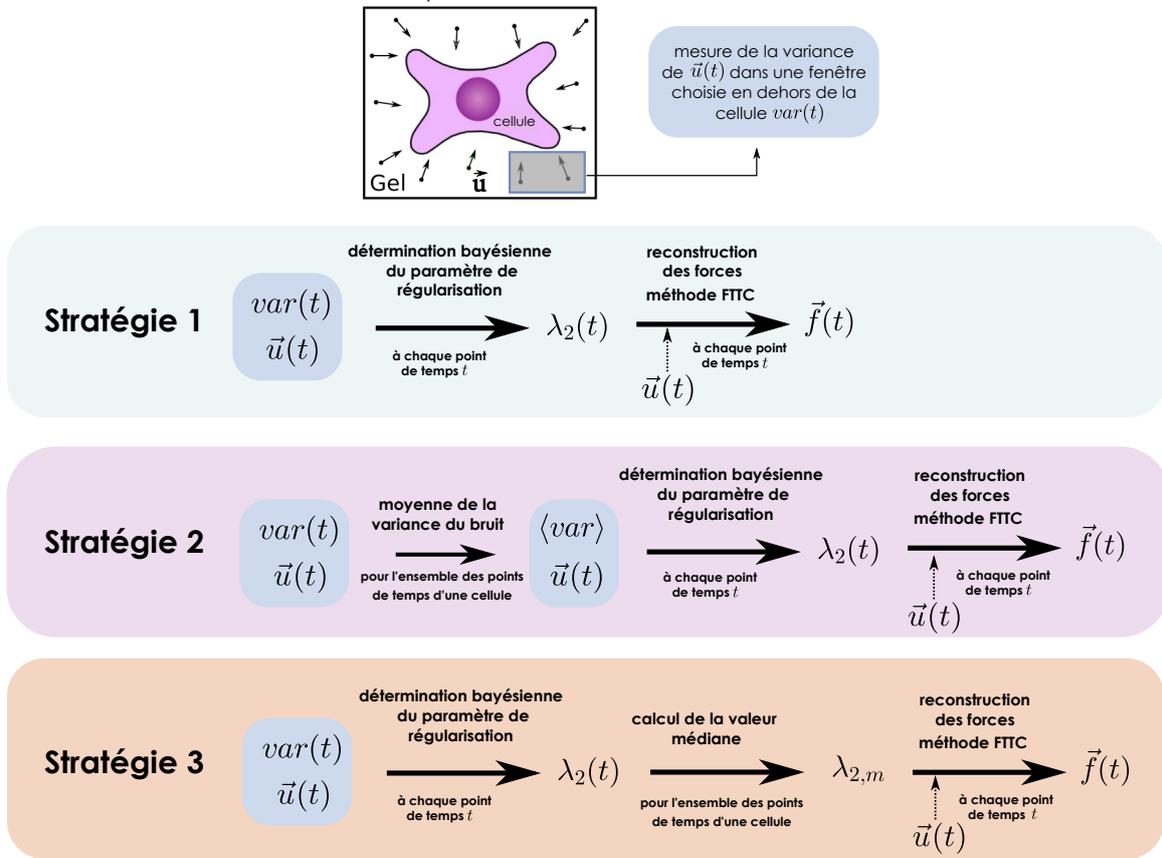


FIGURE B.2 – Présentation des trois stratégies de BFTTC qui peuvent être employées pour les forces de traction

3.1 "Stratégies" de reconstruction des forces de traction

En utilisant la méthode BFTTC, plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour la reconstruction des forces pour une cellule donnée (Figure B.2) :

Stratégie 1 La première stratégie consiste à calculer à chaque point de temps la variance du déplacement des billes dans la fenêtre de bruit $var(t)$ puis de déterminer automatiquement le facteur de régularisation $\lambda_2(t)$ à chaque point de temps pour reconstruire les forces de traction

Stratégie 2 La deuxième stratégie consiste à calculer à chaque point de temps la variance du

déplacement des billes dans la fenêtre de bruit $var(t)$ puis de calculer une variance moyenne $\langle var \rangle$ dans la fenêtre de bruit pour toute la durée de l'expérience. Puis à partir de cette variance moyenne et des déplacements des billes, d'en déduire un paramètre de régularisation $\lambda_2(t)$ à chaque point de temps pour reconstruire les forces de traction.

Stratégie 3 Enfin la dernière méthode consiste à calculer à chaque point de temps la variance dans la fenêtre de bruit puis de déterminer le facteur de régularisation $\lambda_2(t)$ à chaque point de temps. Le paramètre de régularisation varie beaucoup au cours du temps, parfois jusqu'à plusieurs ordres de grandeur. Afin de s'abstraire de ces variations, nous pouvons mesurer une valeur médiane du facteur de régularisation, $\lambda_{2,m}$ pour chaque cellule. Ce paramètre constant pour une cellule donnée (mais différent entre les cellules d'une même expérience) est utilisé pour la reconstruction des forces de traction.

Nous avons comparé ces trois stratégies pour plusieurs cellules en mesurant le facteur de qualité Q au cours du temps pour une cellule MDCK OS, soumise à une activation transitoire de Src de 1 h (un exemple est donné en Figure B.3). Il apparaît qu'il n'y a pas de différence entre les stratégies 2 et 3 : l'évolution du facteur de qualité est sensiblement la même au cours du temps. En revanche, la première méthode donne plus de fluctuations du facteur de qualité Q au cours du temps pour une cellule donnée. De plus étant donné que nous voulons comparer le phénotype mécanique des cellules pendant l'activation de Src à celui avant activation, il nous paraissait plus pertinent d'avoir un paramètre qui ne varie pas au cours du temps, donc constant pour une cellule donnée. Nous avons donc choisi pour la suite de notre étude la stratégie 3.

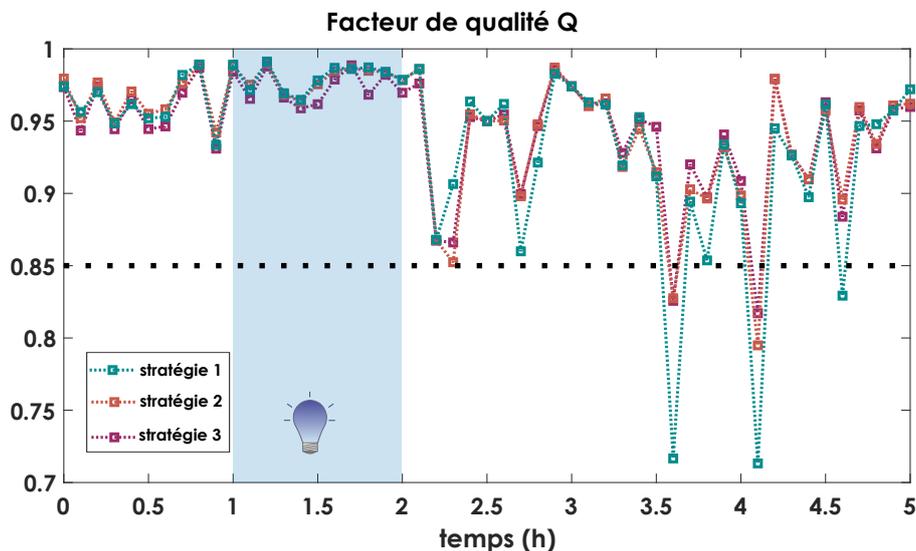


FIGURE B.3 – **Comparaison de stratégies pour la reconstruction des forces à partir de la méthode BFTTC** Évolution temporelle du facteur de qualité pour une cellule MDCK OS isolée (cellule "exemple", montrée en Figure II.6 a) déposée sur un gel de 10 kPa et soumise à une activation transitoire de Src, pour les trois "stratégies" d'utilisation de la méthode BFTTC décrite dans le texte : stratégie 1 (courbe verte), stratégie 2 (courbe orange) et stratégie 3 (courbe rose). Notons que pour cet exemple, nous observons une dégradation du facteur de qualité après l'activation. Cependant, cette tendance est propre à cet exemple et n'est pas représentative de ce que nous observons pour d'autres cellules.

3.2 Influence de la rigidité du substrat sur le facteur de régularisation

Le facteur de régularisation $\lambda_{2,m}$ utilisé pour la reconstruction des forces de traction dépend de la rigidité du substrat (Figure B.4 a) : il diminue avec la rigidité du substrat. La valeur médiane de $\lambda_{2,m}$ est de $5,6 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}^2/\text{Pa}^2$ pour 2 kPa, $2,1 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}^2/\text{Pa}^2$ pour 10 kPa et $1,3 \cdot 10^{-8} \mu\text{m}^2/\text{Pa}^2$ pour 40 kPa. Il apparaît de même que la qualité de la reconstruction des forces de traction diminue avec la rigidité du substrat (Figure B.4 b) : en moyenne 4 % des forces de traction ne sont pas équilibrées pour un substrat de 2 kPa alors que 10 % des forces ne sont pas équilibrées sur un substrat de 40 kPa. Ces résultats s'expliquent par le fait que le bruit expérimental est important sur des substrats de grande rigidité. En effet, le déplacement des billes varie comme $\frac{f}{Er}$ avec f l'amplitude de la force, E le module d'Young du substrat et r la distance du point d'application (Martiel *et al.*, 2015). Cela signifie que plus la rigidité est grande, plus les déplacements de billes mesurés sous la cellule sont petits et proches de ceux mesurés dans la fenêtre de bruit (en dehors de la cellule). Le facteur de régularisation doit donc être choisi plus petit sur 40 kPa pour minimiser le bruit expérimental.

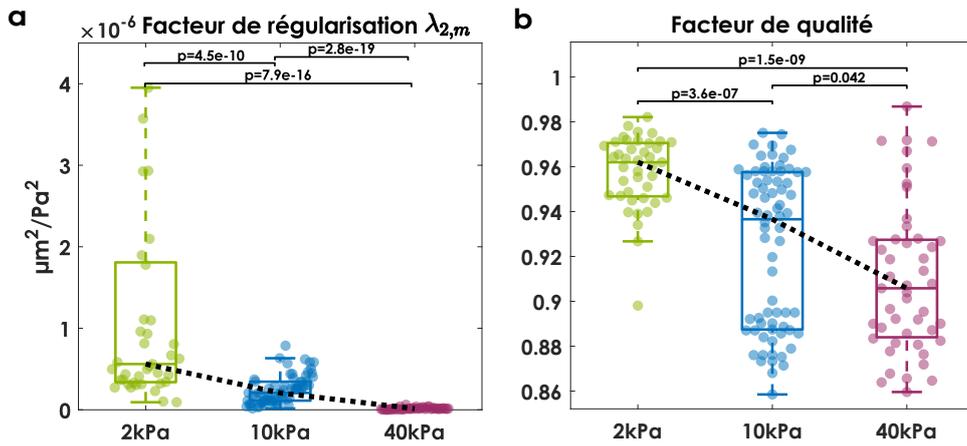


FIGURE B.4 – Paramètre de régularisation et facteur de qualité en fonction de la rigidité du substrat a-b Facteur de régularisation (a) et facteur de qualité (b) utilisé pour la reconstruction des forces de traction de cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src de 1 h sur un substrat de rigidité 2 kPa (vert, $n=41$, $N=4$), 10 kPa (bleu, $n=71$, $N=8$), 40 kPa (rose, $n=45$, $N=7$).

4 Comparaison des méthodes de reconstruction FTTC (plugin Fiji) et BFTTC

Nous avons également utilisé le plugin Fiji *FTTC* écrit par Q. Tseng pour reconstruire les forces de traction. Ce plugin repose également sur une régularisation de type L2 (Martiel *et al.*, 2015). Nous avons imposé un paramètre de régularisation $\lambda = 8 \times 10^{-11}$, choisi arbitrairement, pour toutes les conditions en s'inspirant de la littérature (Martiel *et al.*, 2015). Ce paramètre de régularisation est donné sans unité dans les articles présentant ce plugin (Tseng *et al.*, 2011; Martiel *et al.*, 2015). Le paramètre de régularisation donné est celui que nous avons utilisée en entrée de la fonction *FTTC* du plugin.

Nous voulons ici comparer cette méthode à la méthode BFTTC (stratégie 3) présentée dans le para-

graphe précédent. Pour cela, nous avons étudié la qualité des reconstructions Q ainsi que les réponses mécaniques obtenues à partir de ces deux méthodes, pour des expériences d'activation transitoire de Src de 1 h sur trois rigidités : 2 kPa, 10 kPa et 40 kPa.

Comparaison du facteur de qualité Nous observons que la qualité de la reconstruction diminue avec la rigidité du substrat quelque soit la méthode utilisée. Le facteur de qualité est meilleur pour la méthode FTTC que pour la méthode BFTTC sur les substrats de rigidité 2 kPa et 10 kPa mais il est moins bon sur un substrat de 40 kPa (Figure B.5 a,b,c). Pour être considérée dans l'analyse, les cellules doivent avoir un facteur de qualité médian supérieur à 0,85. Pour une rigidité de 2 kPa, toutes les cellules répondent à ce critère quelque soit la méthode utilisée (Figure B.5 a). En revanche, pour un substrat de 40 kPa, trois cellules ne respectent pas ce critère pour la méthode BFTTC alors que vingt cellules ne le respectent pas pour la méthode FTTC (Figure B.5 c). Le paramètre de régularisation choisi pour reconstruire les forces avec le plugin Fiji doit certainement être adapté pour la rigidité 40 kPa.

Comparaison des réponses mécaniques Nous pouvons comparer le phénotype mécanique des cellules en fonction de la rigidité du substrat pour les deux méthodes de reconstruction FTTC et BFTTC. Nous obtenons des valeurs de forces similaires pour les deux méthodes sur des substrats de 10 et 40 kPa (Figure B.5 e,f) ; mais des valeurs de forces plus grandes sont obtenues avec la méthode FTTC qu'avec la méthode BFTTC sur un substrat de 2 kPa (Figure B.5 d). Néanmoins, les réponses en force totale à l'activation de Src sont similaires pour les deux méthodes (Figure B.5 g-i). Sur un substrat de 40 kPa, le fait que l'amplitude de réponse ne soit pas la même pour les deux méthodes provient du nombre différent de cellules analysées pour les deux méthodes (45 cellules pour la méthode BFTTC et 28 cellules pour la méthode FTTC).

En conclusion, la comparaison des méthodes BFTTC et FTTC sur des substrats de rigidités différentes montre que la valeur du paramètre de régularisation doit être adaptée à la rigidité du substrat pour obtenir une reconstruction des forces correcte c'est-à-dire avec un facteur de qualité supérieur à 0,85. Cependant, le choix de la méthode n'influe quasiment pas sur la réponse mécanique normalisée des cellules. Au cours de cette thèse, nous avons réalisé toutes nos analyses en utilisant la méthode BFTTC (en choisissant la stratégie 3) car :

- elle évite le choix plus ou moins arbitraire d'un facteur de régularisation
- elle prend en compte le bruit expérimental pour chaque cellule : le bruit expérimental n'est pas le même d'un gel de TFM à l'autre et peut même varier au sein d'un même gel (lié à des inhomogénéités)

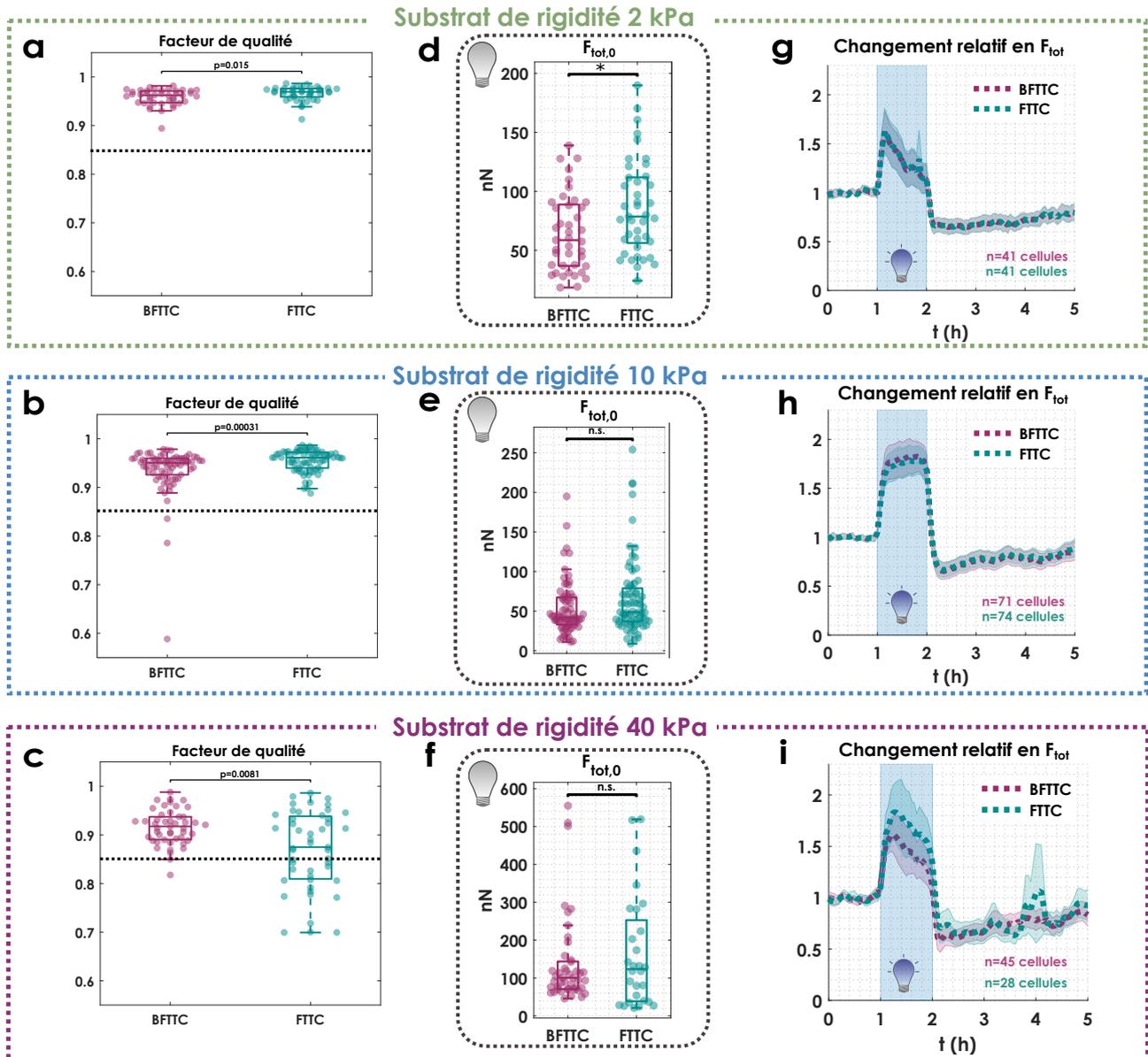


FIGURE B.5 – Comparaison de la reconstruction des forces en utilisant plugin FTTC Fiji et celle obtenue avec la méthode BFTTC. Pour chaque rigidité de substrat 2 kPa (haut), 10 kPa (milieu) et 40 kPa (bas) : facteur de qualité (a,b,c), force totale avant activation (d,e,f) et force totale normalisée par sa valeur moyenne avant activation (g,h,i), de cellules MDCK OS soumises à une activation transitoire de Src d'1 h en utilisant pour la reconstruction des forces la méthode BFTTC (BFTTC, rose) ou le plugin Fiji (FTTC, vert). Pour (a-c), toutes les cellules ont été considérées quelque soit la valeur du facteur de qualité (2 kPa : 41 cellules, 10 kPa : 74 cellules, 40 kPa : 48 cellules). Pour (d-i), seules les cellules dont le facteur de qualité est supérieur à 0,85 ont été considérées, le nombre de cellules considérées pour BFTTC (rose) et FTTC (vert) est indiqué en (g-i)

Annexe C

Autres séquences d'activation de Src

1 Réponse mécanique des cellules MDCK à l'activation soutenue de Src

Pour étudier l'adaptation des cellules Src-activées, nous avons soumis les cellules MDCK OS à une activation soutenue de Src (4 h d'activation). Suite à l'activation de Src, les cellules s'étalent avec un gain en aire valant initialement 1,35 et diminuant à 1,2 au bout de 4 h d'activation (Figure C.1 a). Les cellules Src-activées deviennent également plus contractiles avec un gain en contractilité de 1,5 au début, qui ne se maintient pas : la cellule revient à son état contractile de départ après 4 h d'activation (gain ~ 1) (Figure C.1 b). Ces résultats suggèrent qu'il existe un mécanisme d'adaptation inhibant principalement le gain en contractilité.

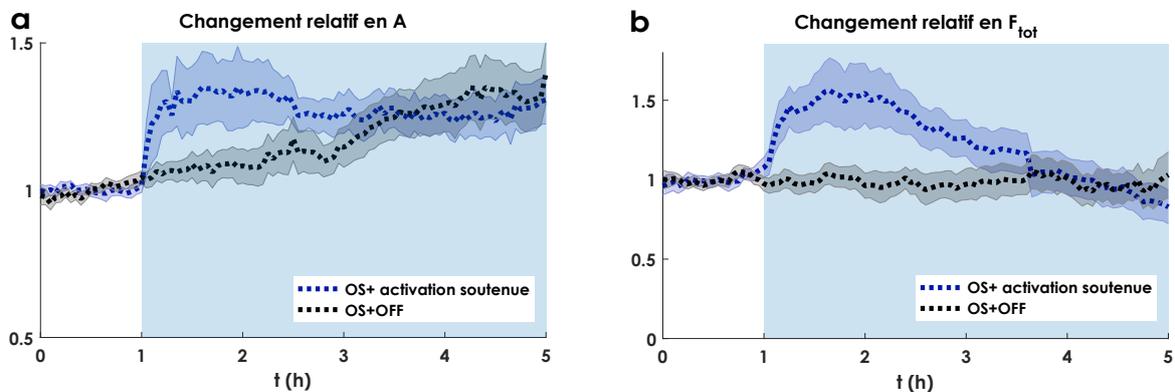


FIGURE C.1 – **Réponse mécanique des cellules MDCK OS soumises à une activation soutenue de Src**
Changement de phénotype mécanique de cellules MDCK OS soumises à une activation soutenue de Src (séquence en lumière bleue : 1h OFF puis ON) (bleu, OS+activation soutenue, $n=31$, $N=2$) ou sans illumination en lumière bleue (noir, OS+OFF, $n=42$, $N=8$) : aire (a) et force totale (b), normalisées par leur valeur moyenne avant activation.

2 Réponse mécanique des cellules MDCK à des cycles d'activation/désactivation de Src

In vivo, les cellules subissent de nombreuses cycles d'activation/désactivation de kinases (Hunter, 1995; Marshall, 1995). Nous avons donc étudié la réponse des cellules Src-activées à plusieurs cycles

d'activation/désactivation. Pour cela, nous avons soumis les cellules MDCK à deux types d'activation "oscillantes" de Src (Figure C.2) :

- Séquence d'illumination en lumière bleue A : des cycles d'activation/désactivation de 15 min (15 min ON/15 min OFF)
- Séquence d'illumination en lumière bleue B : deux périodes d'activation de 30 min espacées d'une période sans activation de 1h

Pour ces deux séquences d'illumination, nous observons que les cellules répondent à chaque période d'activation en s'étalant et en devenant plus contractiles (Figure C.2). Ces expériences sont préliminaires et méritent des analyses plus poussées pour conclure sur l'adaptation de la réponse en fonction du nombre de cycles d'activation/désactivation.

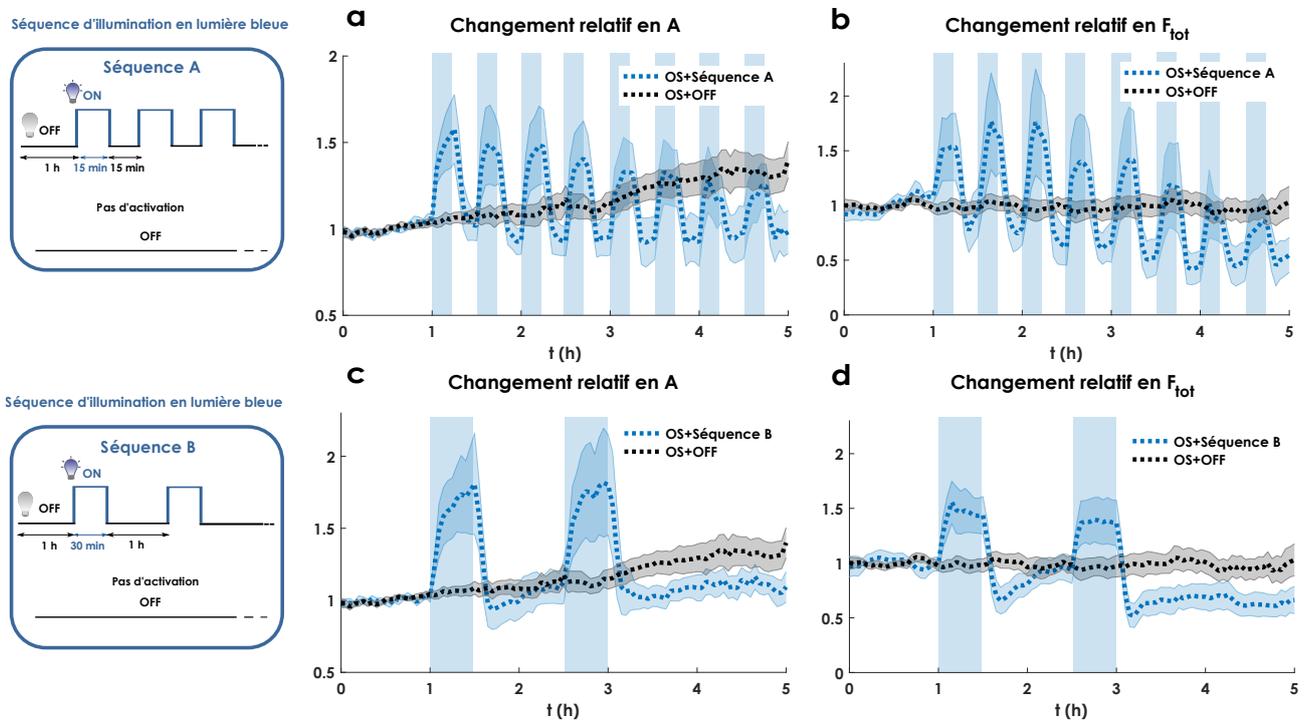


FIGURE C.2 – Réponse mécanique des cellules MDCK OS soumises à des cycles d'activation/désactivation de Src (a-b) Changement de phénotype mécanique de cellules MDCK OS soumises à la séquence d'activation A (décrite à gauche) (bleu, OS+séquence A, n=19, N=1) ou sans illumination en lumière bleue (noir, OS+OFF, n=42, N=8) : aire (a) et force totale (b), normalisées par leur valeur moyenne avant activation. (c-d) Changement de phénotype mécanique de cellules MDCK OS soumises à la séquence d'activation B (décrite à gauche) (bleu, OS+séquence B, n=19, N=2) ou sans illumination en lumière bleue (noir, OS+OFF, n=42, N=8) : aire (c) et force totale (d), normalisées par la valeur moyenne avant activation.

Bibliographie

- Abu-Ghazaleh, R., Kabir, J., Jia, H., Lobo, M. & Zachary, I. (2001), 'Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells', *Biochemical Journal* **360**(1), 255–264.
- Adli, M. (2018), 'The CRISPR tool kit for genome editing and beyond', *Nature Communications* **9**(1), 1–13.
- Agus, D. B., Alexander, Jenolyn F.,..., J. & Wu, P. H. (2013), 'A physical sciences network characterization of non-tumorigenic and metastatic cells', *Scientific Reports* **3**.
- Aktories, K., Braun, U., Rösener, S., Just, I. & Hall, A. (1989), 'The rho gene product expressed in E. coli is a substrate of botulinum ADP-ribosyltransferase C3', *Biochemical and Biophysical Research Communications* **158**(1), 209–213.
- Albert, P. J. & Schwarz, U. S. (2016), 'Dynamics of Cell Ensembles on Adhesive Micropatterns : Bridging the Gap between Single Cell Spreading and Collective Cell Migration', *PLOS Computational Biology* **12**(4), e1004863.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2017), *The Cytoskeleton*, W.W. Norton & Company.
- Aleshin, A. & Finn, R. S. (2010), 'SRC : A Century of Science Brought to the Clinic', *Neoplasia* **12**(8), 599.
- Alibert, C., Goud, B. & Manneville, J. B. (2017), 'Are cancer cells really softer than normal cells?', *Biology of the Cell* **109**(5), 167–189.
- Allgayer, H., Boyd, D. D., Heiss, M. M., Abdalla, E. K., Curley, S. A. & Gallick, G. E. (2002), 'Activation of Src kinase in primary colorectal carcinoma : an indicator of poor clinical prognosis', *Cancer* **94**(2), 344–351.
- Alonso, J. L., Goldmann, W. H., Alonso, J. L. & Goldmann, W. H. (2016), 'Cellular mechanotransduction', *AIMS Biophysics* **3**(1), 50–62.
- Andersen, T., Wörthmüller, D., Probst, D., Wang, I., Moreau, P., Fitzpatrick, V., Boudou, T., Schwarz, U. & Balland, M. (2022), 'Cell size and actin architecture determine force generation in optogenetically activated adherent cells', *bioRxiv* .
- Anguita, E. & Villalobo, A. (2018), 'Ca²⁺ signaling and Src-kinases-controlled cellular functions', *Archives of Biochemistry and Biophysics* **650**, 59–74.
- Aumailley, M. (2013), 'The laminin family', *Cell adhesion & Migration* **7**(1), 48–55.
- Avizienyte, E., Fincham, V. J., Brunton, V. G. & Frame, M. C. (2004), 'Src SH3/2 Domain-mediated Peripheral Accumulation of Src and Phospho-myosin Is Linked to Deregulation of E-cadherin and the Epithelial-Mesenchymal Transition', *Molecular Biology of the Cell* **15**(6), 2794.
- Avizienyte, E. & Frame, M. C. (2005), 'Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition', *Current Opinion in Cell Biology* **17**(5), 542–547.
- Avizienyte, E., Wyke, A. W., Jones, R. J., McLean, G. W., Westhoff, M. A., Brunton, V. G. & Frame, M. C. (2002), 'Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling', *Nature Cell Biology* **4**(8), 632–638.

- Ayala, Y. A., Pontes, B., Ether, D. S., Pires, L. B., Araujo, G. R., Frases, S., Romão, L. F., Farina, M., Moura-Neto, V., Viana, N. B. & Moysés Nussenzveig, H. (2016), 'Rheological properties of cells measured by optical tweezers', *BMC Biophysics* **9**(1), 1–11.
- Balcioglu, H. E., Balasubramaniam, L., Stirbat, T. V., Doss, B. L., Fardin, M. A., Mège, R. M. & Ladoux, B. (2020), 'A subtle relationship between substrate stiffness and collective migration of cell clusters', *Soft Matter* **16**(7), 1825–1839.
- Banan, M. (2020), 'Recent advances in CRISPR/Cas9-mediated knock-ins in mammalian cells', *Journal of Biotechnology* **308**, 1–9.
- Bangasser, B. L., Rosenfeld, S. S. & Odde, D. J. (2013), 'Determinants of Maximal Force Transmission in a Motor-Clutch Model of Cell Traction in a Compliant Microenvironment', *Biophysical Journal* **105**, 581–592.
- Bangasser, B. L., Shamsan, G. A., Chan, C. E., Opoku, K. N., Tüzel, E., Schlichtmann, B. W., Kasim, J. A., Fuller, B. J., McCullough, B. R., Rosenfeld, S. S. & Odde, D. J. (2017), 'Shifting the optimal stiffness for cell migration', *Nature Communications* **8**(1), 1–10.
- Bao, G. & Suresh, S. (2003), 'Cell and molecular mechanics of biological materials', *Nature materials* **2**(11), 715–725.
- Barfod, E. T., Moore, A. L., de Graaf, B. G. V. & Lidofsky, S. D. (2011), 'Myosin light chain kinase and Src control membrane dynamics in volume recovery from cell swelling', *Molecular Biology of the Cell* **22**(5), 634.
- Bausch, A. R. & Kroy, K. (2006), 'A bottom-up approach to cell mechanics', *Nature Physics* **2**(4), 231–238.
- Bausch, A. R., Möller, W. & Sackmann, E. (1999), 'Measurement of Local Viscoelasticity and Forces in Living Cells by Magnetic Tweezers', *Biophysical Journal* **76**(1), 573–579.
- Bear, J. E., Svitkina, T. M., Krause, M., Schafer, D. A., Loureiro, J. J., Strasser, G. A., Maly, I. V., Chaga, O. Y., Cooper, J. A., Borisy, G. G. & Gertler, F. B. (2002), 'Antagonism between Ena/VASP Proteins and Actin Filament Capping Regulates Fibroblast Motility', *Cell* **109**(4), 509–521.
- Behrens, J., Vakaet, L., Friis, R., Winterhager, E., Van Roy, F., Mareel, M. M. & Birchmeier, W. (1993), 'Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene.', *The Journal of Cell Biology* **120**(3), 757–66.
- Beningo, K. A., Hamao, K., Dembo, M., li Wang, Y. & Hosoya, H. (2006), 'Traction forces of fibroblasts are regulated by the Rho-dependent kinase but not by the myosin light chain kinase', *Archives of Biochemistry and Biophysics* **456**(2), 224–231.
- Beningo, K. A. & Wang, Y. L. (2002), 'Flexible substrata for the detection of cellular traction forces', *Trends in Cell Biology* **12**(2), 79–84.
- Berrier, A. L. & Yamada, K. M. (2007), 'Cell–matrix adhesion', *Journal of Cellular Physiology* **213**(3), 565–573.
- Bershadsky, A., Kozlov, M. & Geiger, B. (2006), 'Adhesion-mediated mechanosensitivity : a time to experiment, and a time to theorize', *Current Opinion in Cell Biology* **18**(5), 472–481.
- Birukov, K. G., Csontos, C., Marzilli, L., Dudek, S., Ma, S. F., Bresnick, A. R., Verin, A. D., Cotter, R. J. & Garcia, J. G. (2001), 'Differential regulation of alternatively spliced endothelial cell myosin light chain kinase isoforms by p60(Src)', *The Journal of Biological Chemistry* **276**(11), 8567–8573.
- Bissell, M. J., Hall, H. G. & Parry, G. (1982), 'How does the extracellular matrix direct gene expression?', *Journal of Theoretical Biology* **99**(1), 31–68.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. & Plastino, J. (2014), 'Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility', *Physiological Reviews* **94**(1), 235–263.
- Boateng, L. R. & Huttenlocher, A. (2012), 'Spatiotemporal regulation of Src and its substrates at invadosomes', *European Journal of Cell Biology* **91**(11-12), 878–888.
- Bonakdar, N., Gerum, R., Kuhn, M., Spörrer, M., Lippert, A., Schneider, W., Aifantis, K. E. & Fabry, B. (2016), 'Mechanical plasticity of cells', *Nature Materials* **15**(10), 1090–1094.

- Boudou, T., Andersen, T. & Balland, M. (2019), 'On the spatiotemporal regulation of cell tensional state', *Experimental Cell Research* **378**(1), 113–117.
- Bourne, G. W. & Trifaró, J. M. (1982), 'The gadolinium ion : A potent blocker of calcium channels and catecholamine release from cultured chromaffin cells', *Neuroscience* **7**(7), 1615–1622.
- Bouvard, D., Pouwels, J., De Franceschi, N. & Ivaska, J. (2013), 'Integrin inactivators : balancing cellular functions in vitro and in vivo', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**(7), 430–442.
- Boyer, B., Bourgeois, Y. & Poupon, M.-F. (2002), 'Src kinase contributes to the metastatic spread of carcinoma cells', *Oncogene* **21**(15), 2347–2356.
- Bromann, P. A., Korkaya, H. & Courtneidge, S. A. (2004), 'The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases', *Oncogene* **23**(48), 7957–7968.
- Brown, M. T. & Cooper, J. A. (1996), 'Regulation, substrates and functions of src', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1287**(2-3), 121–149.
- Burridge, K. & Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996), 'Focal adhesions, contractility, and signaling', *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **12**, 463–519.
- Burton, K., Park, J. H. & Taylor, D. L. (1999), 'Keratocytes Generate Traction Forces in Two Phases', *Molecular Biology of the Cell* **10**(11), 3745.
- Burton, K. & Taylor, D. L. (1997), 'Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata', *Nature* **385**(6615), 450–454.
- Butcher, D. T., Alliston, T. & Weaver, V. M. (2009), 'A tense situation : Forcing tumour progression', *Nature Reviews Cancer* **9**(2), 108–122.
- Butler, J. P., Tolic-Norrelykke, I. M., Fabry, B. & Fredberg, J. J. (2002), 'Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings', *American Journal Physiology Cell Physiology* **282**(3), 595–605.
- Calderwood, D. A., Zent, R., Grant, R., Rees, D. J. G., Hynes, R. O. & Ginsberg, M. H. (1999), 'The Talin Head Domain Binds to Integrin β Subunit Cytoplasmic Tails and Regulates Integrin Activation', *Journal of Biological Chemistry* **274**(40), 28071–28074.
- Califano, J. P. & Reinhart-King, C. A. (2010), 'Substrate stiffness and cell area predict cellular traction stresses in single cells and cells in contact', *Cellular and Molecular Bioengineering* **3**(1), 68–75.
- Case, L. B. & Waterman, C. M. (2015), 'Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch', *Nature Cell Biology* **17**(8), 955–963.
- Cavanaugh, K. E., Oakes, P. W. & Gardel, M. L. (2020), 'Optogenetic Control of RhoA to Probe Subcellular Mechanochemical Circuitry', *Current Protocols in Cell Biology* **86**(1).
- Chan, C. E. & Odde, D. J. (2008), 'Traction dynamics of filopodia on compliant substrates', *Science* **322**(5908), 1687–1691.
- Charras, G. & Sahai, E. (2014), 'Physical influences of the extracellular environment on cell migration', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**(12), 813–824.
- Choi, C. K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L. A., Mogilner, A. & Horwitz, A. R. (2008), 'Actin and α -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner', *Nature Cell Biology* **10**(9), 1039.
- Christina Müller & Tilo Pompe (2015), 'Distinct impacts of substrate elasticity and ligand affinity on traction force evolution', *Soft Matter* **12**(1), 272–280.
- Cirka, H., Monterosso, M., Diamantides, N., Favreau, J., Wen, Q. & Billiar, K. (2016), 'Active Traction Force Response to Long-Term Cyclic Stretch Is Dependent on Cell Pre-stress', *Biophysical Journal* **110**(8), 1845–1857.

- Clapham, D. E. (2007), 'Calcium Signaling', *Cell* **131**(6), 1047–1058.
- Cross, S. E., Jin, Y. S., Tondre, J., Wong, R., Rao, J. Y. & Gimzewski, J. K. (2008), 'AFM-based analysis of human metastatic cancer cells', *Nanotechnology* **19**(38), 384003.
- Crosson, S., Rajagopal, S. & Moffat, K. (2003), 'The LOV domain family : Photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains', *Biochemistry* **42**(1), 2–10.
- Cui, J., Matkovich, S. J., DeSouza, N., Li, S., Rosembli, N. & Marks, A. R. (2004), 'Regulation of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by phosphorylation at tyrosine 353', *The Journal of Biological Chemistry* **279**(16), 16311–16316.
- De Mets, R., Wang, I., Bolland, M., Oddou, C., Moreau, P., Fourcade, B., Albiges-Rizo, C., Delon, A. & Destaing, O. (2019), 'Cellular tension encodes local Src-dependent differential β_1 and β_3 integrin mobility', *Molecular Biology of the Cell* **30**(2), 181–190.
- De Rooij, J., Kerstens, A., Danuser, G., Schwartz, M. A. & Waterman-Storer, C. M. (2005), 'Integrin-dependent actomyosin contraction regulates epithelial cell scattering.', *The Journal of cell biology* **171**(1), 153–64.
- Deisseroth, K. (2011), 'Optogenetics', *Nature Methods* **8**(1), 26–29.
- Démoulin, D., Carlier, M. F., Bibette, J. & Baudry, J. (2014), 'Power transduction of actin filaments ratcheting in vitro against a load', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**(50), 17845–17850.
- Denisin, A. K. & Pruitt, B. L. (2016), 'Tuning the Range of Polyacrylamide Gel Stiffness for Mechanobiology Applications', *ACS Applied Materials and Interfaces* **8**(34), 21893–21902.
- Desprat, N., Richert, A., Simeon, J. & Asnacios, A. (2005), 'Creep function of a single living cell', *Biophysical Journal* **88**(3), 2224–2233.
- Dewerchin, H. L., Desmarests, L. M., Noppe, Y. & Nauwynck, H. J. (2014), 'Myosins 1 and 6, myosin light chain kinase, actin and microtubules cooperate during antibody-mediated internalisation and trafficking of membrane-expressed viral antigens in feline infectious peritonitis virus infected monocytes', *Veterinary Research* **45**(1), 1–13.
- Doss, B. L., Pan, M., Gupta, M., Greci, G., Mège, R. M., Lim, C. T., Sheetz, M. P., Voituriez, R. & Ladoux, B. (2020), 'Cell response to substrate rigidity is regulated by active and passive cytoskeletal stress', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**(23), 12817–12825.
- Douthwright, S. & Sluder, G. (2017), 'Live Cell Imaging : Assessing the Phototoxicity of 488 and 546 nm Light and Methods to Alleviate it', *Journal of Cellular Physiology* **232**(9), 2461–2468.
- du Roure, O., Saez, A., Buguin, A., Austin, R. H., Chavrier, P., Silberzan, P. & Ladoux, B. (2005), 'Force mapping in epithelial cell migration', *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**(7), 2390–2395.
- Dufort, C. C., Paszek, M. J. & Weaver, V. M. (2011), 'Balancing forces : architectural control of mechanotransduction', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**(5), 308.
- Dupire, J., Puech, P. H., Helfer, E. & Viallat, A. (2020), 'Mechanical adaptation of monocytes in model lung capillary networks', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**(26), 14798–14804.
- Elias, F. (2018), *Cours : Élasticité*.
- Elosegui-Artola, A., Bazellières, E., Allen, M. D., Andreu, I., Oria, R., Sunyer, R., Gomm, J. J., Marshall, J. F., Jones, J. L., Trepas, X. & Roca-Cusachs, P. (2014), 'Rigidity sensing and adaptation through regulation of integrin types', *Nature Materials* **13**(6), 631–637.
- Elosegui-Artola, A., Oria, R., Chen, Y., Kosmalska, A., Pérez-González, C., Castro, N., Zhu, C., Trepas, X. & Roca-Cusachs, P. (2016), 'Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity', *Nature Cell Biology* **18**(5), 540–548.
- Elsberger, B., Fullerton, R., Zino, S., Jordan, F., Mitchell, T. J., Brunton, V. G., Mallon, E. A., Shiels, P. G. & Edwards, J. (2010), 'Breast cancer patients' clinical outcome measures are associated with Src kinase family member expression', *British Journal of Cancer* **103**(6), 899–909.

- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. (2006), 'Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification', *Cell* **126**(4), 677–689.
- Féréol, S., Fodil, R., Laurent, V. M., Balland, M., Louis, B., Pelle, G., Hénon, S., Planus, E. & Isabey, D. (2009), 'Prestress and Adhesion Site Dynamics Control Cell Sensitivity to Extracellular Stiffness', *Biophysical Journal* **96**(5), 2009.
- Finer, J. T., Simmons, R. M. & Spudich, J. A. (1994), 'Single myosin molecule mechanics : piconewton forces and nanometre steps', *Nature* **368**(6467), 113–119.
- Forgacs, G., Foty, R. A., Shafirir, Y. & Steinberg, M. S. (1998), 'Viscoelastic properties of living embryonic tissues : a quantitative study.', *Biophysical Journal* **74**(5), 2227.
- Frame, M. C. (2002), 'Src in cancer : deregulation and consequences for cell behaviour', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1602**(2), 114–130.
- Frantz, C., Stewart, K. M. & Weaver, V. M. (2010), 'The extracellular matrix at a glance', *Journal of Cell Science* **123**(24), 4195.
- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E., Behrens, J., Sommer, T. & Birchmeier, W. (2002), 'Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex', *Nature Cell Biology* **4**(3), 222–231.
- Gafni, J., Munsch, J. A., Lam, T. H., Catlin, M. C., Costa, L. G., Molinski, T. F. & Pessah, I. N. (1997), 'Xestospongins : Potent Membrane Permeable Blockers of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor', *Neuron* **19**(3), 723–733.
- Galbraith, C. G., Yamada, K. M. & Galbraith, J. A. (2007), 'Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites', *Science* **315**(5814), 992–995.
- Gao, Y., Dickerson, J. B., Guo, F., Zheng, J. & Zheng, Y. (2004), 'Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(20), 7618.
- Garcia, J. G., Verin, A. D., Schaphorst, K., Siddiqui, R., Patterson, C. E., Csontos, C. & Natarajan, V. (1999), 'Regulation of endothelial cell myosin light chain kinase by Rho, cortactin, and p60(src)', *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **276**(6 20-6).
- Gardel, M. L., Sabass, B., Ji, L., Danuser, G., Schwarz, U. S. & Waterman, C. M. (2008), 'Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed', *Journal of Cell Biology* **183**(6), 999–1005.
- Gardel, M. L., Schneider, I. C., Aratyn-Schaus, Y. & Waterman, C. M. (2010), 'Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration', *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **26**, 315–333.
- Gavara, N., Roca-Cusachs, P., Sunyer, R., Farré, R. & Navajas, D. (2008), 'Mapping cell-matrix stresses during stretch reveals inelastic reorganization of the cytoskeleton', *Biophysical Journal* **95**(1), 464–471.
- Gayrard, C., Bernaudin, C., Déjardin, T., Seiler, C. & Borghi, N. (2018), 'Src- and confinement-dependent FAK activation causes E-cadherin relaxation and β -catenin activity', *Journal of Cell Biology* **217**(3), 1063–1077.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. & Yamada, K. M. (2001), 'Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**(11), 793–805.
- Geiger, B., Spatz, J. P. & Bershadsky, A. D. (2009), 'Environmental sensing through focal adhesions', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**(1), 21–33.
- Gensbittel, V., Kräter, M., Harlepp, S., Busnelli, I., Guck, J. & Goetz, J. G. (2020), 'Mechanical Adaptability of Tumor Cells in Metastasis', *Developmental Cell* **56**(2), 164–179.
- Gheldof, A. & Berx, G. (2013), 'Cadherins and Epithelial-to-Mesenchymal Transition', *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **116**, 317–336.
- Ghibaudo, M., Saez, A., Trichet, L., Xayaphoummine, A., Browaeys, J., Silberzan, P., Buguin, A. & Ladoux, B. (2008), 'Traction forces and rigidity sensing regulate cell functions', *Soft Matter* **4**(9), 1836–1843.

- Giannone, G., Dubin-Thaler, B. J., Döbereiner, H. G., Kieffer, N., Bresnick, A. R. & Sheetz, M. P. (2004), 'Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves', *Cell* **116**(3), 431–443.
- Gjorevski, N., Piotrowski, A. S., Varner, V. D. & Nelson, C. M. (2015), 'Dynamic tensile forces drive collective cell migration through three-dimensional extracellular matrices', *Scientific Reports* **5**(1), 1–13.
- Gnanasambandam, R., Ghatak, C., Yasmann, A., Nishizawa, K., Sachs, F., Ladokhin, A. S., Sukharev, S. I. & Suchyna, T. M. (2017), 'GsMTx4 : Mechanism of Inhibiting Mechanosensitive Ion Channels', *Biophysical Journal* **112**(1), 31.
- Grant, I. (1997), 'Particle image velocimetry : A review', *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part C : Journal of Mechanical Engineering Science*. **211**(1), 55–76.
- Greenman, C., Stephens, P. & ...Stratton, M. R. (2007), 'Patterns of somatic mutation in human cancer genomes', *Nature* **446**(7132), 153–158.
- Guarino (2010), 'Src signaling in cancer invasion', *Journal of Cellular Physiology* **223**(1), 14–26.
- Guck, J., Schinkinger, S., Lincoln, B., Wottawah, F., Ebert, S., Romeyke, M., Lenz, D., Erickson, H. M., Ananthkrishnan, R., Mitchell, D., Kas, J., Ulvick, S. & Bilby, C. (2005), 'Optical Deformability as an Inherent Cell Marker for Testing Malignant Transformation and Metastatic Competence', *Biophysical Journal* **88**(5), 3689.
- Guevorkian, K. & Maître, J. L. (2017), 'Micropipette aspiration : A unique tool for exploring cell and tissue mechanics in vivo', *Methods in Cell Biology* **139**, 187–201.
- Guglielmi, G., Falk, H. J. & De Renzis, S. (2016), 'Optogenetic Control of Protein Function : From Intracellular Processes to Tissue Morphogenesis', *Trends in Cell Biology* **26**(11), 864–874.
- Guimarães, C. F., Gasperini, L., Marques, A. P. & Reis, R. L. (2020), 'The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering'.
- Gunning, P. W., Hardeman, E. C., Lappalainen, P. & Mulvihill, D. P. (2015), 'Tropomyosin - master regulator of actin filament function in the cytoskeleton', *Journal of Cell Science* **128**(16), 2965–2974.
- Gupta, M., Sarangi, B. R., Deschamps, J., Nematbakhsh, Y., Callan-Jones, A., Margadant, F., Mège, R. M., Lim, C. T., Votaw, R. & Ladoux, B. (2015), 'Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing', *Nature Communications* **6**, 7525.
- Gupton, S. L. & Waterman-Storer, C. M. (2006), 'Spatiotemporal Feedback between Actomyosin and Focal-Adhesion Systems Optimizes Rapid Cell Migration', *Cell* **125**(7), 1361–1374.
- Hall, M. S., Long, R., Feng, X., Huang, Y. L., Hui, C. Y. & Wu, M. (2013), 'Towards Single Cell Traction Microscopy within 3D Collagen Matrices', *Experimental Cell Research* **319**(16), 2396.
- Hamadi, A., Deramautd, T. B., Takeda, K. & Rondé, P. (2009), 'Src activation and translocation from focal adhesions to membrane ruffles contribute to formation of new adhesion sites', *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**(2), 324–338.
- Han, S. J., Bielawski, K. S., Ting, L. H., Rodriguez, M. L. & Sniadecki, N. J. (2012), 'Decoupling substrate stiffness, spread area, and micropost density : A close spatial relationship between traction forces and focal adhesions', *Biophysical Journal* **103**(4), 640–648.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011), 'Hallmarks of cancer : The next generation', *Cell* **144**(5), 646–674.
- Hanke, J. H., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brissette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B. A. & Connelly, P. A. (1996), 'Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation', *The Journal of Biological Chemistry* **271**(2), 695–701.
- Hansen, P. C. (1992), 'Analysis of Discrete Ill-Posed Problems by Means of the L-Curve', *SIAM Review* **34**(4), 561–580.
- Hao, Y., Cheng, S., Tanaka, Y., Hosokawa, Y., Yalikun, Y. & Li, M. (2020), 'Mechanical properties of single cells : Measurement methods and applications', *Biotechnology Advances* **45**, 107648.

- Harris, A. K., Stopak, D. & Wild, P. (1981), 'Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis', *Nature* **290**(5803), 249–251.
- Harris, A. K., Wild, P. & Stopak, D. (1980), 'Silicone Rubber Substrata : A New Wrinkle in the Study of Cell Locomotion', *Science* **208**(4440), 177–179.
- Hartmann, J., Krueger, D. & De Renzis, S. (2020), 'Using optogenetics to tackle systems-level questions of multicellular morphogenesis', *Current Opinion in Cell Biology* **66**, 19–27.
- Helfer, E., Harlepp, S., Bourdieu, L., Robert, J., MacKintosh, F. C. & Chatenay, D. (2000), 'Microrheology of Biopolymer-Membrane Complexes', *Physical Review Letters* **85**(2), 457.
- Helfer, E., Harlepp, S., Bourdieu, L., Robert, J., MacKintosh, F. C. & Chatenay, D. (2001), 'Viscoelastic properties of actin-coated membranes', *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* **63**(2 I), 0219041–02190413.
- Hetrick, B., Han, M. S., Helgeson, L. A. & Nolen, B. J. (2013), 'Small Molecules CK-666 and CK-869 Inhibit Actin-Related Protein 2/3 Complex by Blocking an Activating Conformational Change', *Chemistry & Biology* **20**(5), 701–712.
- Hochmuth, R. M. (2000), 'Micropipette aspiration of living cells', *Journal of Biomechanics* **33**(1), 15–22.
- Hoffman, L. M., Jensen, C. C., Chaturvedi, A., Yoshigi, M. & Beckerle, M. C. (2012), 'Stretch-induced actin remodeling requires targeting of zyxin to stress fibers and recruitment of actin regulators', *Molecular Biology of the Cell* **23**(10), 1846–1859.
- Hong, L., Kenney, S. R., Phillips, G. K., Simpson, D., Schroeder, C. E., Nöth, J., Romero, E., Swanson, S., Waller, A., Strouse, J. J., Carter, M., Chigaev, A., Ursu, O., Oprea, T., Hjelle, B., Golden, J. E., Aubé, J., Hudson, L. G., Buranda, T., Sklar, L. A. & Wandering-Ness, A. (2013), 'Characterization of a Cdc42 protein inhibitor and its use as a molecular probe', *The Journal of Biological Chemistry* **288**(12), 8531–8543.
- Hotulainen, P. & Lappalainen, P. (2006), 'Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells', *Journal of Cell Biology* **173**(3), 383–394.
- Hu, J., Gong, X. & Stromblad, S. (2022), 'Local temporal Rac1-GTP nadirs and peaks restrict cell protrusions and retractions', *Science Advances* **8**(12).
- Huang, H., Dai, C., Shen, H., Gu, M., Wang, Y., Liu, J., Chen, L. & Sun, L. (2020), 'Recent Advances on the Model, Measurement Technique, and Application of Single Cell Mechanics', *International Journal of Molecular Sciences* **21**(17), 1–30.
- Huang, S. & Ingber, D. E. (2005), 'Cell tension, matrix mechanics, and cancer development', *Cancer Cell* **8**(3), 175–176.
- Huang, Y., Gompfer, G. & Sabass, B. (2020), 'A Bayesian traction force microscopy method with automated denoising in a user-friendly software package', *Computer Physics Communications* **256**, 107313.
- Huang, Y., Schell, C., Huber, T. B., Şimşek, A. N., Hersch, N., Merkel, R., Gompfer, G. & Sabass, B. (2019), 'Traction force microscopy with optimized regularization and automated Bayesian parameter selection for comparing cells', *Scientific Reports* **9**(1).
- Hui, K. L., Balagopalan, L., Samelson, L. E. & Upadhyaya, A. (2015), 'Cytoskeletal forces during signaling activation in Jurkat T-cells', *Molecular Biology of the Cell* **26**(4), 685–695.
- Humphrey, J. D. (2008), 'Vascular adaptation and mechanical homeostasis at tissue, cellular, and sub-cellular levels', *Cell Biochemistry and Biophysics* **50**(2), 53–78.
- Humphrey, J. D., Dufresne, E. R. & Schwartz, M. A. (2014), 'Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**(12), 802–812.
- Hunter, M. V., Willoughby, P. M., Bruce, A. E. & Fernandez-Gonzalez, R. (2018), 'Oxidative Stress Orchestrates Cell Polarity to Promote Embryonic Wound Healing', *Developmental Cell* **47**(3), 377–387.e4.
- Hunter, T. (1995), 'Protein Kinases and Phosphatases : The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling Review', *Cell* **80**, 225–236.

- Hur, S. S., Zhao, Y., Li, Y. S., Botvinick, E. & Chien, S. (2009), 'Live cells exert 3-dimensional traction forces on their Substrate', *Cellular and Molecular Bioengineering* **2**(3), 425–436.
- Huveneers, S. & Danen, E. H. (2009), 'Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho', *Journal of Cell Science* **122**(8), 1059–1069.
- Idevall-Hagren, O., Dickson, E. J., Hille, B., Toomre, D. K. & De Camilli, P. (2012), 'Optogenetic control of phosphoinositide metabolism', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(35), E2316–E2323.
- Iino, R., Kinbara, K. & Bryant, Z. (2020), 'Introduction : Molecular Motors', *Chemical Reviews* **120**(1), 1–4.
- Ingber, D. E., Prusty, D., Sun, Z., Betensky, H. & Wang, N. (1995), 'Cell shape, cytoskeletal mechanics, and cell cycle control in angiogenesis', *Journal of Biomechanics* **28**(12), 1471–1484.
- Ingle, E. (2008), 'Src family kinases : Regulation of their activities, levels and identification of new pathways', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1784**(1), 56–65.
- Iordan, A., Duperray, A., Gérard, A., Grichine, A. & Verdier, C. (2010), 'Breakdown of cell-collagen networks through collagen remodeling', *Biorheology* **47**(5-6), 277–295.
- Irby, R. B., Mao, W., Coppola, D., Kang, J., Loubeau, J. M., Trudeau, W., Karl, R., Fujita, D. J., Jove, R. & Yeatman, T. J. (1999), 'Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers', *Nature Genetics* **21**(2), 187–190.
- Irby, R. B. & Yeatman, T. J. (2000), 'Role of Src expression and activation in human cancer'.
- Irby, R. B. & Yeatman, T. J. (2002), 'Increased Src Activity Disrupts Cadherin/Catenin-mediated Homotypic Adhesion in Human Colon Cancer and Transformed Rodent Cells 1', *Cancer Research* **62**, 2669–2674.
- Ishibashi, A., Saga, K., Hisatomi, Y., Li, Y., Kaneda, Y. & Nimura, K. (2020), 'A simple method using CRISPR-Cas9 to knock-out genes in murine cancerous cell lines', *Scientific Reports* **10**(1), 1–10.
- Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M & Narumiya S (2000), 'Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases', *Molecular Pharmacology* .
- Janmey, P. A., Fletcher, D. A. & Reinhart-King, C. A. (2020), 'Stiffness sensing by cells', *Physiological Reviews* **100**(2), 695–724.
- Janmey, P. A., Winer, J. P., Murray, M. E. & Wen, Q. (2009), 'The Hard Life of Soft Cells', *Cell Motility and the Cytoskeleton* **66**(8), 597.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T. & Thun, M. J. (2008), 'Cancer statistics, 2008', *CA Cancer Journal for Clinicians* **58**(2), 71–96.
- Kajita, M., Hogan, C., Harris, A. R., Dupre-Crochet, S., Itasaki, N., Kawakami, K., Charras, G., Tada, M. & Fujita, Y. (2010), 'Interaction with surrounding normal epithelial cells influences signalling pathways and behaviour of Src-transformed cells', *Journal of Cell Science* **123**(2), 171–180.
- Kajiwara, K., Chen, P.-K., Kon, S., Fujita, Y. & Okada, M. (2021), 'Src activation in lipid rafts confers epithelial cells with invasive potential to escape from apical extrusion during cell competition', *bioRxiv* .
- Kandow, C. E., Georges, P. C., Janmey, P. A. & Beningo, K. A. (2007), 'Polyacrylamide Hydrogels for Cell Mechanics : Steps Toward Optimization and Alternative Uses', *Methods in Cell Biology* **83**, 29–46.
- Kang, H., Hong, Z., Zhong, M., Klomp, J., Bayless, K. J., Mehta, D., Karginov, A. V., Hu, G. & Malik, A. B. (2019), 'Piezo1 mediates angiogenesis through activation of MT1-MMP signaling', *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **316**(1), C92–C103.
- Karginov, A., Tsygankov, D., Berginski, M., Chu, P.-H., Trudeau, E., Yi, J., Gomez, S., Elston, T. & Hahn, K. (2014), 'Dissecting signaling through activation of specific Src-effector complexes in vivo', *Nature Chemical Biology* **10**(4), 286.
- Katoh, K., Kano, Y., Amano, M., Onishi, H., Kaibuchi, K. & Fujiwara, K. (2001), 'Rho-Kinase-Mediated Contraction of Isolated Stress Fibers', *Journal of Cell Biology* **153**(3), 569–584.

- Kelkar, M., Bohec, P. & Charras, G. (2020), 'Mechanics of the cellular actin cortex : From signalling to shape change', *Current Opinion in Cell Biology* **66**, 69–78.
- Kennedy, M. J., Hughes, R. M., Peteya, L. A., Schwartz, J. W., Ehlers, M. D. & Tucker, C. L. (2010), 'Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells.', *Nature Methods* **7**(12), 973–5.
- Kenry, Leong, M. C., Nai, M. H., Cheong, F. C. & Lim, C. T. (2015), 'Viscoelastic Effects of Silicone Gels at the Micro- and Nanoscale', *Procedia IUTAM* **12**, 20–30.
- Képiró, M., Várkuti, B. H., Végner, L., Vörös, G., Hegyi, G., Varga, M. & Málnási-Csizmadia, A. (2014), 'para-Nitroblebbistatin, the non-cytotoxic and photostable myosin II inhibitor', *Angewandte Chemie* **53**(31), 8211–8215.
- Kerjouan, A., Boyault, C., Oddou, C., Hiriart-Bryant, E., Grichine, A., Kraut, A., Pezet, M., Balland, M., Faurobert, E., Bonnet, I., Coute, Y., Fourcade, B., Albiges-Rizo, C. & Destaing, O. (2021), 'Control of SRC molecular dynamics encodes distinct cytoskeletal responses by specifying signaling pathway usage', *Journal of Cell Science* **134**(2).
- Khalilgharibi, N. & Mao, Y. (2021), 'To form and function : on the role of basement membrane mechanics in tissue development, homeostasis and disease', *Open Biology* **11**(2).
- Kholodenko, B. N. (2006), 'Cell signalling in time and space', *Nature Reviews Molecular Cell biology* **7**(3), 165.
- Kim, B. L., Bu, W., Wah, I. G., Koh, E., Siew, H. O., Pawson, T., Sudhaharan, T. & Ahmed, S. (2008), 'The Cdc42 Effector IRSp53 Generates Filopodia by Coupling Membrane Protrusion with Actin Dynamics', *Journal of Biological Chemistry* **283**(29), 20454–20472.
- Klinghoffer, R. A., Sachsenmaier, C., Cooper, J. A. & Soriano, P. (1999), 'Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction.', *The EMBO Journal* **18**(9), 2459.
- Klomp, J. E., Huyot, V., Ray, A. M., Collins, K. B., Malik, A. B. & Karginov, A. V. (2016), 'Mimicking transient activation of protein kinases in living cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**(52), 14976–14981.
- Klomp, J. E., Shaaya, M., Matsche, J., Rebiai, R., Aaron, J. S., Collins, K. B., Huyot, V., Gonzalez, A. M., Muller, W. A., Chew, T. L., Malik, A. B. & Karginov, A. V. (2019), 'Time-Variant SRC Kinase Activation Determines Endothelial Permeability Response', *Cell Chemical Biology* **26**(8), 1081–1094.
- Kneussel, M. & Wagner, W. (2013), 'Myosin motors at neuronal synapses : drivers of membrane transport and actin dynamics', *Nature Reviews Neuroscience* **14**(4), 233–247.
- Koudelková, L., Brábek, J. & Rosel, D. (2021), 'Src kinase : Key effector in mechanosignalling', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **131**, 105908.
- Kraning-Rush, C. M., Califano, J. P. & Reinhart-King, C. A. (2012), 'Cellular traction stresses increase with increasing metastatic potential', *PLoS ONE* **7**(2).
- Krieg, M., Fläschner, G., Alsteens, D., Gaub, B. M., Roos, W. H., Wuite, G. J., Gaub, H. E., Gerber, C., Dufrêne, Y. F. & Müller, D. J. (2018), 'Atomic force microscopy-based mechanobiology', *Nature Reviews Physics* **1**(1), 41–57.
- Krndija, D., Schmid, H., Eismann, J. L., Lothar, U., Adler, G., Oswald, F., Seufferlein, T. & Von Wichert, G. (2010), 'Substrate stiffness and the receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha regulate spreading of colon cancer cells through cytoskeletal contractility', *Oncogene* **29**(18), 2724–2738.
- Ladoux, B. & Mège, R. M. (2017), 'Mechanobiology of collective cell behaviours', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **18**(12), 743–757.
- Landau, L. D. L. D., Lifshits, E. M. E. M., Kosevich, A. M. A. M. & Pitaevskii, L. P. L. P. (1986), *Theory of Elasticity*, Butterworth-Heinemann.
- Latorre, E., Kale, S., Casares, L., Gómez-González, M., Uroz, M., Valon, L., Nair, R. V., Garreta, E., Montserrat, N., del Campo, A., Ladoux, B., Arroyo, M. & Trepast, X. (2018), 'Active superelasticity in three-dimensional epithelia of controlled shape', *Nature* **563**(7730), 203–208.

- Lee, J., Leonard, M., Oliver, T., Ishihara, A. & Jacobson, K. (1994), 'Traction forces generated by locomoting keratocytes', *The Journal of Cell Biology* **127**(6), 1957.
- Legant, W. R., Choi, C. K., Miller, J. S., Shao, L., Gao, L., Betzig, E. & Chen, C. S. (2013), 'Multidimensional traction force microscopy reveals out-of-plane rotational moments about focal adhesions', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(3), 881–886.
- Legant, W. R., Miller, J. S., Blakely, B. L., Cohen, D. M., Genin, G. M. & Chen, C. S. (2010), 'Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices.', *Nature Methods* **7**(12), 969–71.
- Lekka, M., Laidler, P., Gil, D., Lekki, J., Stachura, Z. & Hryniewicz, A. Z. (1999), 'Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy', *European Biophysics Journal* **28**(4), 312–316.
- Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Gasser, D. L. & Weaver, V. M. (2009), 'Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling', *Cell* **139**(5), 891–906.
- Li, Z., Persson, H., Adolfsson, K., Abariute, L., Borgström, M. T., Hessman, D., Åström, K., Oredsson, S. & Prinz, C. N. (2017), 'Cellular traction forces : A useful parameter in cancer research', *Nanoscale* **9**(48), 19039–19044.
- Lin, G. L., Cohen, D. M., Desai, R. A., Breckenridge, M. T., Gao, L., Humphries, M. J. & Chen, C. S. (2013), 'Activation of β_1 but not β_3 integrin increases cell traction forces', *FEBS Letters* **587**(6), 763–769.
- Lin, H. H., Lin, H. K., Lin, I. H., Chiou, Y. W., Chen, H. W., Liu, C. Y., Harn, H. I., Chiu, W. T., Wang, Y. K., Shen, M. R. & Tang, M. J. (2015), 'Mechanical phenotype of cancer cells : Cell softening and loss of stiffness sensing', *Oncotarget* **6**(25), 20946–20958.
- Liu, H., Yu, X., Li, K., Klejnot, J., Yang, H., Lisiero, D. & Lin, C. (2008), 'Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in Arabidopsis', *Science* **322**(5907), 1535–1539.
- Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M. & Wang, Y. L. (2000), 'Cell movement is guided by the rigidity of the substrate.', *Biophysical Journal* **79**(1), 144.
- Maa, M. C., Leu, T. H., Mccarley, D. J., Schatzman, R. C. & Parsons, S. J. (1995), 'Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src : implications for the etiology of multiple human cancers.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(15), 6981.
- Magidson, V. & Khodjakov, A. (2013), 'Circumventing photodamage in live-cell microscopy', *Methods in Cell Biology* **114**, 545–560.
- Mao, W., Irby, R., Coppola, D., Fu, L., Wloch, M., Turner, J., Yu, H., Garcia, R., Jove, R. & Yeatman, T. J. (1997), 'Activation of c-Src by receptor tyrosine kinases in human colon cancer cells with high metastatic potential', *Oncogene* **15**(25), 3083–3090.
- Marmottant, P., Mgharbel, A., Käfer, J., Audren, B., Rieu, J. P., Vial, J. C., Van Der Sanden, B., Marée, A. F., Graner, F. & Delanoë-Ayari, H. (2009), 'The role of fluctuations and stress on the effective viscosity of cell aggregates', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(41), 17271–17275.
- Marshall, C. J. (1995), 'Specificity of Receptor Tyrosine Kinase Signaling : Transient versus Sustained Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation Review', *Cell* **80**, 179–185.
- Martiel, J. L., Leal, A., Kurzawa, L., Baland, M., Wang, I., Vignaud, T., Tseng, Q. & Théry, M. (2015), 'Measurement of cell traction forces with ImageJ', *Methods in Cell Biology* **125**, 269–287.
- Martin-Belmonte, F. & Perez-Moreno, M. (2011), 'Epithelial cell polarity, stem cells and cancer', *Nature Reviews Cancer* **12**(1), 23–38.
- Martin, G. S. (1970), 'Rous sarcoma virus : A function required for the maintenance of the transformed state', *Nature* **227**(5262), 1021–1023.
- Martin, G. S. (2001), 'The hunting of the Src', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**(6), 467–475.

- Martino, F., Perestrelo, A. R., Vinarský, V., Pagliari, S. & Forte, G. (2018), 'Cellular mechanotransduction : From tension to function', *Frontiers in Physiology* **9**, 824.
- Maruthamuthu, V., Sabass, B., Schwarz, U. S. & Gardel, M. L. (2011), 'Cell-ECM traction force modulates endogenous tension at cell-cell contacts', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(12), 4708–4713.
- Maskarinec, S. A., Franck, C., Tirrell, D. A. & Ravichandran, G. (2009), 'Quantifying cellular traction forces in three dimensions', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(52), 22108–22113.
- Mayer, E. L. & Krop, I. E. (2010), 'Advances in targeting Src in the treatment of breast cancer and other solid malignancies', *Clinical Cancer Research* **16**(14), 3526–3532.
- Mellor, H. (2010), 'The role of formins in filopodia formation', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1803**(2), 191–200.
- Mertz, A. F., Banerjee, S., Che, Y., German, G. K., Xu, Y., Hyland, C., Marchetti, M. C., Horsley, V. & Dufresne, E. R. (2012), 'Scaling of traction forces with the size of cohesive cell colonies.', *Physical Review Letters* **108**(19), 198101.
- Meşe, G., Richard, G. & White, T. W. (2007), 'Gap Junctions : Basic Structure and Function', *Journal of Investigative Dermatology* **127**(11), 2516–2524.
- Min Choi, S., Han Kim, W., Côté, D. & ...Van Gemert, M. J. (2011), 'Blood cell assisted in vivo Particle Image Velocimetry using the confocal laser scanning microscope', *Optics Express* **19**(5), 4357–4368.
- Moitrier, S., Blanch-Mercader, C., Garcia, S., Sliogeryte, K., Martin, T., Camonis, J., Marcq, P., Silberzan, P. & Bonnet, I. (2019b), 'Collective stresses drive competition between monolayers of normal and Ras-transformed cells', *Soft Matter* **15**(4), 537–545.
- Moitrier, S., Pricoupenko, N., Kerjouan, A., Oddou, C., Destaing, O., Battistella, A., Silberzan, P. & Bonnet, I. (2019a), 'Local light-activation of the Src oncoprotein in an epithelial monolayer promotes collective extrusion', *Communications Physics* **2**(78), 1–11.
- Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R. S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J. & Kusumi, A. (2006), 'Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography', *Journal of Cell Biology* **174**(6), 851–862.
- Mould, A. P., Akiyama, S. K. & Humphries, M. J. (1995), 'Regulation of Integrin $\alpha 5 \beta 1$ -Fibronectin Interactions by Divalent Cations : evidence for distinct classes of binding sites Mn^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} ', *Journal of Biological Chemistry* **270**(44), 26270–26277.
- Nautiyal, J., Banerjee, S., Kanwar, S. S., Yu, Y., Patel, B. B., Sarkar, F. H. & Majumdar, A. P. (2011), 'Curcumin Enhances Dasatinib Induced Inhibition of Growth and Transformation of Colon Cancer Cells', *International Journal of Cancer* **128**(4), 951.
- Nehls, S., Nöding, H., Karsch, S., Ries, F. & Janshoff, A. (2019), 'Stiffness of MDCK II Cells Depends on Confluency and Cell Size', *Biophysical Journal* **116**(11), 2204.
- Oakes, P. W., Banerjee, S., Marchetti, M. C. & Gardel, M. L. (2014), 'Geometry regulates traction stresses in adherent cells.', *Biophysical Journal* **107**(4), 825–33.
- Oakes, P. W., Bidone, T. C., Beckham, Y., Skeeters, A. V., Ramirez-San Juan, G. R., Winter, S. P., Voth, G. A. & Gardel, M. L. (2018), 'Lamellipodium is a myosin-independent mechanosensor.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**(11), 2646–2651.
- Ohori, M., Kinoshita, T., Okubo, M., Sato, K., Yamazaki, A., Arakawa, H., Nishimura, S., Inamura, N., Nakajima, H., Neya, M., Miyake, H. & Fujii, T. (2005), 'Identification of a selective ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex', *Biochemical and Biophysical Research Communications* **336**(1), 357–363.
- Oliver, T., Jacobson, K. & Dembo, M. (1995), 'Traction forces in locomoting cells', *Cell Motility and the Cytoskeleton* **31**(3), 225–240.
- Ottenhoff-Kalff AE et al. (1992), 'Characterization of protein tyrosine kinases from human breast cancer : involvement of the c-src oncogene product.', *Cancer Research* **52**(17), 4773–4778.

- Pancier, T., Citron, A., Di Biagio, D., Battilana, G., Gandin, A., Giulitti, S., Forcato, M., Biciato, S., Panzetta, V., Fusco, S., Azzolin, L., Totaro, A., Dei Tos, A. P., Fassan, M., Vindigni, V., Bassetto, F., Rosato, A., Brusatin, G., Cordenonsi, M. & Piccolo, S. (2020), 'Reprogramming normal cells into tumor precursors requires ECM stiffness and oncogene-mediated changes of cell mechanical properties', *Nature Materials* **19**(7), 797.
- Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., Reinhart-King, C. A., Margulies, S. S., Dembo, M., Boettiger, D., Hammer, D. A. & Weaver, V. M. (2005), 'Tensional homeostasis and the malignant phenotype.', *Cancer Cell* **8**(3), 241–54.
- Pathak, G. P., Vrana, J. D. & Tucker, C. L. (2013), 'Optogenetic Control of Cell Function Using Engineered Photoreceptors', *Biology of the Cell* **105**(2), 59.
- Peschetola, V., Laurent, V. M., Duperray, A., Michel, R., Ambrosi, D., Preziosi, L. & Verdier, C. (2013), 'Time-dependent traction force microscopy for cancer cells as a measure of invasiveness', *Cytoskeleton* **70**(4), 201–214.
- Peyton, S. R. & Putnam, A. J. (2005), 'Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion', *Journal of Cellular Physiology* **204**(1), 198–209.
- Pfitzer, G. (2001), 'Invited review : regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle', *Journal of Applied Physiology* **91**(1), 497–503.
- Pichot, C. S., Hartig, S. M., Xia, L., Arvanitis, C., Monisvais, D., Lee, F. Y., Frost, J. A. & Corey, S. J. (2009), 'Dasatinib synergizes with doxorubicin to block growth, migration, and invasion of breast cancer cells', *British Journal of Cancer* **101**(1), 38–47.
- Pickup, M. W., Mouw, J. K. & Weaver, V. M. (2014), 'The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer', *EMBO Reports* **15**(12), 1243.
- Piwnica-Worms, H., Saunders, K. B., Roberts, T. M., Smith, A. E. & Cheng, S. H. (1987), 'Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60c-src', *Cell* **49**(1), 75–82.
- Playford, M. P. & Schaller, M. D. (2004), 'The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology', *Oncogene* **23**(48), 7928–7946.
- Plotnikov, S. V., Pasapera, A. M., Sabass, B. & Waterman, C. M. (2012), 'Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration', *Cell* **151**(7), 1513–1527.
- Poh, Y. C., Chowdhury, F., Tanaka, T. S. & Wangt, N. (2010), 'Embryonic stem cells do not stiffen on rigid substrates', *Biophysical Journal* **99**(2), L19–L21.
- Polackwich, R. J., Koch, D., Arevalo, R., Miermont, A. M., Jee, K. J., Lazar, J., Urbach, J., Mueller, S. C. & McAllister, R. G. (2013), 'A Novel 3D Fibril Force Assay Implicates Src in Tumor Cell Force Generation in Collagen Networks', *PLoS One* **8**(3).
- Pollard, T. D. & Borisy, G. G. (2003), 'Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments', *Cell* **112**(4), 453–465.
- Prior, I. A., Lewis, P. D. & Mattos, C. (2012), 'A comprehensive survey of Ras mutations in cancer', *Cancer Research* **72**(10), 2457.
- Puisieux, A., Pommier, R. M., Morel, A. P. & Laval, F. (2018), 'Cellular Pliancy and the Multistep Process of Tumorigenesis', *Cancer Cell* **33**(2), 164–172.
- Ridone, P., Vassalli, M. & Martinac, B. (2019), 'Piezo1 mechanosensitive channels : what are they and why are they important', *Biophysical Reviews* **11**(5), 795.
- Rizvi, S. A., Neidt, E. M., Cui, J., Feiger, Z., Skau, C. T., Gardel, M. L., Kozmin, S. A. & Kovar, D. R. (2009), 'Identification and Characterization of a Small Molecule Inhibitor of Formin-Mediated Actin Assembly', *Chemistry & Biology* **16**(11), 1158.
- Rosowski, K. A., Boltvanskiy, R., Xiang, Y., Van den Dries, K., Schwartz, M. A. & Dufresne, E. R. (2018), 'Vinculin and the mechanical response of adherent fibroblasts to matrix deformation', *Scientific Reports* **8**(1).

- Rous, P. (1911), 'A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells', *The Journal of Experimental Medicine* **13**(4), 397–411.
- Rubin, H. (1955), 'Quantitative relations between causative virus and cell in the Rous No. 1 chicken sarcoma', *Virology* **1**(5), 445–473.
- Ruprecht, V., Monzo, P., Ravasio, A., Yue, Z., Makhija, E., Strale, P. O., Gauthier, N., Shivashankar, G. V., Studer, V., Albiges-Rizo, C. & Viasnoff, V. (2017), 'How cells respond to environmental cues - insights from bio-functionalized substrates', *Journal of Cell Science* **130**(1), 51–61.
- Sabass, B., Gardel, M. L., Waterman, C. M. & Schwarz, U. S. (2008), 'High Resolution Traction Force Microscopy Based on Experimental and Computational Advances', *Biophysical Journal* **94**(1), 207.
- Sachdev, S., Bu, Y. & Gelman, I. H. (2009), 'Paxillin-Y118 phosphorylation contributes to the control of Src-induced anchorage-independent growth by FAK and adhesion', *BMC cancer* **9**(12).
- Saha, K., Keung, A. J., Irwin, E. F., Li, Y., Little, L., Schaffer, D. V. & Healy, K. E. (2008), 'Substrate Modulus Directs Neural Stem Cell Behavior', *Biophysical Journal* **95**(9), 4426–4438.
- Saitoh, M., Ishikawa, T., Matsushima, S., Naka, M. & Hidakas, H. (1987), 'Selective Inhibition of Catalytic Activity of Smooth Muscle Myosin Light Chain Kinase', *Journal of Biological Chemistry* **262**(16), 7796–7801.
- Schiller, H. B. & Fässler, R. (2013), 'Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell–matrix adhesions', *EMBO Reports* **14**(6), 509.
- Schillers, H., Medalsy, I., Hu, S., Slade, A. L. & Shaw, J. E. (2016), 'PeakForce Tapping resolves individual microvilli on living cells', *Journal of Molecular Recognition* **29**(2), 95.
- Schönholzer, M. T., Migliavacca, J., Alvarez, E., Santhana Kumar, K., Neve, A., Gries, A., Ma, M., Grotzer, M. A. & Baumgartner, M. (2020), 'Real-time sensing of MAPK signaling in medulloblastoma cells reveals cellular evasion mechanism counteracting dasatinib blockade of ERK activation during invasion', *Neoplasia* **22**(10), 470–483.
- Schultz, G. S., Davidson, J. M., Kirsner, R. S., Bornstein, P. & Herman, I. M. (2011), 'Dynamic Reciprocity in the Wound Microenvironment', *Official publication of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society* **19**(2), 134.
- Schultz, K. M., Kyburz, K. A. & Anseth, K. S. (2015), 'Measuring dynamic cell-material interactions and remodeling during 3D human mesenchymal stem cell migration in hydrogels', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**(29), E3757–E3764.
- Schwarz, U. S., Balaban, N. Q., Riveline, D., Bershadsky, A., Geiger, B. & Safran, S. A. (2002), 'Calculation of Forces at Focal Adhesions from Elastic Substrate Data : The Effect of Localized Force and the Need for Regularization', *Biophysical Journal* **83**(3), 1380–1394.
- Schwarz, U. S. & Gardel, M. L. (2012), 'United we stand - Integrating the actin cytoskeleton and cell-matrix adhesions in cellular mechanotransduction', *Journal of Cell Science* **125**(13), 3051–3060.
- Schwarz, U. S. & Safran, S. A. (2013), 'Physics of adherent cells', *Reviews of Modern Physics* **85**(3), 1327–1381.
- Schwarz, U. S. & Soiné, J. R. D. (2015), 'Traction force microscopy on soft elastic substrates : a guide to recent computational advances', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research* **1853**(11), 3095–3104.
- Sellers, J. R. (2000), 'Myosins : a diverse superfamily', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1496**(1), 3–22.
- Servitja, J. M., Marinissen, M. J., Sodhi, A., Bustelo, X. R. & Gutkind, J. S. (2003), 'Rac1 function is required for Src-induced transformation. Evidence of a role for Tiam1 and Vav2 in Rac activation by Src', *The Journal of Biological Chemistry* **278**(36), 34339–34346.
- Shaaya, M., Fauser, J. & Karginov, A. V. (2021), 'Optogenetics : The Art of Illuminating Complex Signaling Pathways', *Physiology* **36**(1), 52–60.

- Shaaya, M., Fauser, J., Zhurikhina, A., Conage-Pough, J. E., Huyot, V., Brennan, M., Flower, C. T., Matsche, J., Khan, S., Natarajan, V., Rehman, J., Kota, P., White, F. M., Tsygankov, D. & Karginov, A. V. (2020), 'Light-regulated allosteric switch enables temporal and subcellular control of enzyme activity', *eLife* **9** e60647.
- Shindo, M., Wada, H., Kaido, M., Tateno, M., Aigaki, T., Tsuda, L. & Hayashi, S. (2008), 'Dual function of Src in the maintenance of adherens junctions during tracheal epithelial morphogenesis', *Development* **135**(7), 1355–1364.
- Sirvent, A., Bénistant, C., Pannequin, J., Veracini, L., Simon, V., Bourgaux, J. F., Hollande, F., Cruzalegui, F. & Roche, S. (2009), 'Src family tyrosine kinases-driven colon cancer cell invasion is induced by Csk membrane delocalization', *Oncogene* **29**(9), 1303–1315.
- Sirvent, A., Benistant, C. & Roche, S. (2012), 'Oncogenic signaling by tyrosine kinases of the SRC family in advanced colorectal cancer.', *American Journal of Cancer Research* **2**(4), 357–371.
- Slack-Davis, J. K., Martin, K. H., Tilghman, R. W., Iwanicki, M., Ung, E. J., Autry, C., Luzzio, M. J., Cooper, B., Kath, J. C., Roberts, W. G. & Parsons, J. T. (2007), 'Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor', *The Journal of Biological Chemistry* **282**(20), 14845–14852.
- Smith, M. L., Gourdon, D., Little, W. C., Kubow, K. E., Eguiluz, R. A., Luna-Morris, S. & Vogel, V. (2007), 'Force-Induced Unfolding of Fibronectin in the Extracellular Matrix of Living Cells', *PLOS Biology* **5**(10), e268.
- Snijder, B. & Pelkmans, L. (2011), 'Origins of regulated cell-to-cell variability', *Nature Reviews Molecular Cell biology* **12**(2), 119–125.
- Soiné, J. R. D., Brand, C. A., Stricker, J., Oakes, P. W., Gardel, M. L. & Schwarz, U. S. (2015), 'Model-based traction force microscopy reveals differential tension in cellular actin bundles.', *PLoS Computational Biology* **11**(3), e1004076.
- Solon, J., Levental, I., Sengupta, K., Georges, P. C. & Janmey, P. A. (2007), 'Fibroblast Adaptation and Stiffness Matching to Soft Elastic Substrates', *Biophysical Journal* **93**(12), 4453.
- Sreenivasappa, H., Chaki, S. P., Lim, S.-M., Trzeciakowski, J. P., Davidson, M. W., Rivera, G. M. & Trache, A. (2014), 'Selective regulation of cytoskeletal tension and cell–matrix adhesion by RhoA and Src', *Integrative Biology* **6**(8), 743–754.
- Steeg, P. S. (2016), 'Targeting metastasis', *Nature Reviews Cancer* **16**(4), 201–218.
- Steffen, A., Koestler, S. A. & Rottner, K. (2014), 'Requirements for and consequences of Rac-dependent protrusion', *European Journal of Cell Biology* **93**(5-6), 184–193.
- Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M. & Vogt, P. K. (1976), 'DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA', *Nature* **260**(5547), 170–173.
- Stroka, K. M. & Aranda-Espinoza, H. (2009), 'Neutrophils display biphasic relationship between migration and substrate stiffness', *Cell Motility and the Cytoskeleton* **66**(6), 328–341.
- Stuelten, C. H., Parent, C. A. & Montell, D. J. (2018), 'Cell motility in cancer invasion and metastasis : insights from simple model organisms', *Nature Reviews Cancer* **18**(5), 296–312.
- Summy, J. M. & Gallick, G. E. (2003), 'Src family kinases in tumor progression and metastasis', *Cancer and Metastasis Reviews* **22**(4), 337–358.
- Suñé-Auñón, A., Jorge-Peñas, A., Aguilar-Cuenca, R., Vicente-Manzanares, M., Van Oosterwyck, H. & Muñoz-Barrutia, A. (2017), 'Full L1-regularized Traction Force Microscopy over whole cells', *BMC Bioinformatics* **18**(1), 1–14.
- Surviladze, Z., Waller, A., Strouse, J. J., Bologa, C., Ursu, O., Salas, V., Parkinson, J. F., Phillips, G. K., Romero, E., Wandinger-Ness, A., Sklar, L. A., Schroeder, C., Simpson, D., Nöth, J., Wang, J., Golden, J. & Aubé, J. (2010), 'A Potent and Selective Inhibitor of Cdc42 GTPase', *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program* .
- Svet-Moldavsky, G. J. (1957), 'Development of Multiple Cysts and of Hæmorrhagic Affections of Internal Organs in Albino Rats treated during the Embryonic or New-born Period with Rous Sarcoma Virus', *Nature* **180**(4597), 1299–1300.

- Svitkina, T. (2018), 'The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility.', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **10**(1).
- Svoboda, K. & Block, S. M. (1994), 'Biological Applications of Optical Forces', *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **23**, 247–285.
- Swaminathan, V. & Waterman, C. M. (2016), 'The molecular clutch model for mechanotransduction evolves', *Nature Cell Biology* **18**(5), 459–461.
- Syed, S., Schober, J., Blanco, A. & Zusiak, S. P. (2017), 'Morphological adaptations in breast cancer cells as a function of prolonged passaging on compliant substrates', *PLoS One* **12**(11), e0187853.
- Tadokoro, S., Shattil, S. J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R. C., De Pereda, J. M., Ginsberg, M. H. & Calderwood, D. A. (2003), 'Talin binding to integrin β tails : A final common step in integrin activation', *Science* **302**(5642), 103–106.
- Talamonti, M. S., Curley, S. A., Gallick, G. E., Talamonti, M. S., Roh, M. S., Curley, S. A. & Gallick, G. E. (1993), 'Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer. Increase in Activity and Level of pp60c-src in Progressive Stages of Human Colorectal Cancer', *Journal of Clinical Investigation* **91**(1), 53.
- Tan, J. L., Tien, J., Pirone, D. M., Gray, D. S., Bhadriraju, K. & Chen, C. S. (2003), 'Cells lying on a bed of microneedles : An approach to isolate mechanical force', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(4), 1484–1489.
- Tanase, M., Biaias, N. & Sheetz, M. (2007), 'Magnetic tweezers in cell biology', *Methods in Cell Biology* **83**, 473–493.
- Tansey, M. G., Luby-Phelps, K., Kamm, K. E. & Stullg, J. T. (1994), 'Ca²⁺-dependent Phosphorylation of Myosin Light Chain Kinase Decreases the Ca²⁺ Sensitivity of Light Chain Phosphorylation within Smooth Muscle Cells*', *Journal of Biological Chemistry* **269**(13), 9912–9920.
- Teo, J. L., Lim, C. T., Yap, A. S. & Saw, T. B. (2020b), 'A Biologist's Guide to Traction Force Microscopy Using Polydimethylsiloxane Substrate for Two-Dimensional Cell Cultures', *STAR Protocols* **1**(2), 100098.
- Teo, J. L., Tomatis, V. M., Coburn, L., Lagendijk, A. K., Schouwenaar, I. M., Budnar, S., Hall, T. E., Verma, S., McLachlan, R. W., Hogan, B. M., Parton, R. G., Yap, A. S. & Gomez, G. A. (2020a), 'Src kinases relax adherens junctions between the neighbors of apoptotic cells to permit apical extrusion', *Molecular Biology of the Cell* **31**(23), 2557–2569.
- Theriot, J. A. (2000), 'The Polymerization Motor', *Traffic* **1**(1), 19–28.
- Théry, M., Racine, V., Piel, M., Pé Pin §, A., Dimitrov, A., Chen, Y., Sibarita, J.-B. & Bornens, M. (2006), 'Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity', *Cell Biology* **103**, 19771–19776.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. & Nieto, M. A. (2009), 'Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease', *Cell* **139**(5), 871–890.
- Thomas, S. M. & Brugge, J. S. (1997), 'Cellular functions regulated by SRC family kinases', *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**(1), 513–609.
- Tibshirani, R. (1996), 'Regression Shrinkage and Selection Via the Lasso', *Journal of the Royal Statistical Society* **58**(1), 267–288.
- Tikhonov, A. N., Goncharsky, A. V., Stepanov, V. V. & Yagola, A. G. (1995), *Numerical methods for the solution of ill-posed problems*, Springer Netherlands.
- Tischer, D. & Weiner, O. D. (2014), 'Illuminating cell signalling with optogenetic tools', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**(8), 551–558.
- Toettcher, J. E., Voigt, C. A., Weiner, O. D. & Lim, W. A. (2010), 'The promise of optogenetics in cell biology : interrogating molecular circuits in space and time', *Nature Methods* **8**(1), 35–38.
- Toettcher, J. E., Weiner, O. D. & Lim, W. A. (2013), 'Using optogenetics to interrogate the dynamic control of signal transmission by the Ras/Erk module', *Cell* **155**(6), 1422–1434.

- Tokmakov, A. A., Sato, K. I., Iwasaki, T. & Fukami, Y. (2002), 'Src kinase induces calcium release in *Xenopus* egg extracts via PLC- γ and IP3-dependent mechanism', *Cell Calcium* **32**(1), 11–20.
- Totsukawa, G., Wu, Y., Sasaki, Y., Hartshorne, D. J., Yamakita, Y., Yamashiro, S. & Matsumura, F. (2004), 'Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts', *Journal of Cell Biology* **164**(3), 427–439.
- Tse, J. R. & Engler, A. J. (2010), 'Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties.', *Current Protocols in Cell Biology* **10**.
- Tseng, Q., Duchemin-Pelletier, E., Deshiere, A., Balland, M., Guillou, H., Filhol, O. & Thery, M. (2012), 'Spatial organization of the extracellular matrix regulates cell-cell junction positioning', *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**(5), 1506–1511.
- Tseng, Q., Wang, I., Duchemin-Pelletier, E., Azioune, A., Carpi, N., Gao, J., Filhol, O., Piel, M., Théry, M. & Balland, M. (2011), 'A new micropatterning method of soft substrates reveals that different tumorigenic signals can promote or reduce cell contraction levels', *Lab on a Chip* **11**(13), 2231–2240.
- Tymianski, M., Spigelman, I., Zhang, L., Carlen, P. L., Tator, C. H., Charlton, M. P. & Wallace, M. C. (1994), 'Mechanism of action and persistence of neuroprotection by cell-permeant Ca²⁺ chelators', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **14**(6), 911–923.
- Unbekandt, M., Belshaw, S., Bower, J., Clarke, M., Cordes, J., Crighton, D., Croft, D. R., Drysdale, M. J., Garnett, M. J., Gill, K., Gray, C., Greenhalgh, D. A., Hall, J. A. M., Konczal, J., Lilla, S., McArthur, D., McConnell, P., McDonald, L., McGarry, L., Mckinnon, H., Mcmenemy, C., Mezna, M., Morrice, N. A., Munro, J., Naylor, G., Rath, N., Uttelkopf, A. W., Sime, M. & Olson, M. F. (2018), 'Discovery of Potent and Selective MRCK Inhibitors with Therapeutic Effect on Skin Cancer', *Cancer Research* **78**(8).
- Urbanska, M., Muñoz, H. E., Shaw Bagnall, J., Otto, O., Manalis, S. R., Di Carlo, D. & Guck, J. (2020), 'A comparison of microfluidic methods for high-throughput cell deformability measurements', *Nature Methods* **17**(6), 587–593.
- Urbanski, M. M., Brendel, M. B. & Melendez-Vasquez, C. V. (2019), 'Acute and chronic demyelinated CNS lesions exhibit opposite elastic properties', *Scientific Reports* **9**(1), 1–13.
- Valon, L., Etoc, F., Remorino, A., di Pietro, F., Morin, X., Dahan, M. & Coppey, M. (2015), 'Predictive Spatiotemporal Manipulation of Signaling Perturbations Using Optogenetics', *Biophysical Journal* **109**(9), 1785–1797.
- Valon, L., Marín-Llauradó, A., Wyatt, T., Charras, G. & Trepatt, X. (2017), 'Optogenetic control of cellular forces and mechanotransduction', *Nature Communications* **8**, 14396.
- Vasilev, J. M., Omelchenko, T., Gelfand, I. M., Feder, H. H. & Bonder, E. M. (2004), 'Rho overexpression leads to mitosis-associated detachment of cells from epithelial sheets : A link to mechanism of cancer dissemination', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(34), 12526–12530.
- Versaevel, M., Grevesse, T. & Gabriele, S. (2012), 'Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells', *Nature Communications* **3**(1), 1–11.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. & Horwitz, A. R. (2009), 'Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**(11), 778–790.
- Vicente-Manzanares, M. & Sanchez-Madrid, F. (2000), 'Cell Polarization : A Comparative Cell Biology and Immunological View', *Developmental Immunology* **7**(2-4), 51.
- Vignaud, T., Ennomani, H. & Théry, M. (2014), Polyacrylamide Hydrogel Micropatterning, in 'Methods in Cell Biology', Vol. 120, Academic Press Inc., pp. 93–116.
- Vitiello, E., Moreau, P., Nunes, V., Mettouchi, A., Maiato, H., Ferreira, J. G., Wang, I. & Balland, M. (2019), 'Acto-myosin force organization modulates centriole separation and PLK4 recruitment to ensure centriole fidelity', *Nature Communications* **10**(1), 1–12.

- Vogel, V. & Sheetz, M. (2006), 'Local force and geometry sensing regulate cell functions', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**(4), 265–275.
- Walcott, S., Kim, D. H., Wirz, D. & Sun, S. X. (2011), 'Nucleation and Decay initiation are the stiffness-sensitive phases of focal adhesion maturation', *Biophysical Journal* **101**(12), 2919–2928.
- Walma, D. A. & Yamada, K. M. (2020), 'The extracellular matrix in development', *Development* **147**(10).
- Wang, H. B., Dembo, M. & Wang, Y. L. (2000), 'Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells', *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **279**(5), 1345–1350.
- Wang, J. H. & Lin, J. S. (2007), 'Cell traction force and measurement methods', *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* **6**(6), 361–371.
- Wang, N., Butler, J. & Ingber, D. (1993), 'Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton', *Science* **260**(5111), 1124–1127.
- Wang, N., Ostuni, E., Whitesides, G. M. & Ingber, D. E. (2002), 'Micropatterning Tractional Forces in Living Cells', *Cytoskeleton and Cell Motility* .
- Wang, N., Tytell, J. D. & Ingber, D. E. (2009), 'Mechanotransduction at a distance : mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**(1), 75–82.
- Wang, Y., Botvinick, E. L., Zhao, Y., Berns, M. W., Usami, S., Tsien, R. Y. & Chien, S. (2005), 'Visualizing the mechanical activation of Src', *Nature* **434**(7036), 1040–1045.
- Watanabe, T., Hosoya, H. & Yonemura, S. (2007), 'Regulation of myosin II dynamics by phosphorylation and dephosphorylation of its light chain in epithelial cells', *Molecular Biology of the Cell* **18**(2), 605–616.
- Webb, D. J., Donais, K., Whitmore, L. A., Thomas, S. M., Turner, C. E., Parsons, J. T. & Horwitz, A. F. (2004), 'FAK–Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly', *Nature Cell Biology* **6**(2), 154–161.
- Weder, G., Hendriks-Balk, M. C., Smajda, R., Rimoldi, D., Liley, M., Heinzemann, H., Meister, A. & Mariotti, A. (2014), 'Increased plasticity of the stiffness of melanoma cells correlates with their acquisition of metastatic properties', *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine* **10**(1), 141–148.
- Wipff, P. J., Rifkin, D. B., Meister, J. J. & Hinz, B. (2007), 'Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix', *The Journal of Cell Biology* **179**(6), 1311.
- Wirtz, D. (2009), 'Particle-Tracking Microrheology of Living Cells : Principles and Applications', *Annual Review of Biophysics* **38**(1), 301–326.
- Wirtz, D., Konstantopoulos, K. & Searson, P. C. (2011), 'The physics of cancer : the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis', *Nature Reviews Cancer* **11**(7), 512–522.
- Wolfenson, H., Meacci, G., Liu, S., Stachowiak, M. R., Iskratsch, T., Ghassemi, S., Roca-Cusachs, P., O'Shaughnessy, B., Hone, J. & Sheetz, M. P. (2016), 'Tropomyosin Controls Sarcomere-like Contractions for Rigidity Sensing and Suppressing Growth on Soft Matrices', *Nature Cell Biology* **18**(1), 33.
- Woll, K. A. & Van Petegem, F. (2022), 'Calcium-release channels : Structure and function of IP3 receptors and ryanodine receptors', *Physiological Reviews* **102**(1), 209–268.
- Wong, S., Guo, W. H. & Wang, Y. L. (2014), 'Fibroblasts probe substrate rigidity with filopodia extensions before occupying an area', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**(48), 17176–17181.
- Woolner, S. & Bement, W. M. (2009), 'Unconventional myosins acting unconventionally', *Trends in Cell Biology* **19**(6), 245.
- Wu, P. H., Aroush, D. R. B., Asnacios, A., Chen, W. C., Dokukin, M. E., Doss, B. L., Durand-Smet, P., Ekpenyong, A., Guck, J., Guz, N. V., Janmey, P. A., Lee, J. S., Moore, N. M., Ott, A., Poh, Y. C., Ros, R., Sander, M., Sokolov, I., Staunton, J. R., Wang, N., Whyte, G. & Wirtz, D. (2018), 'A comparison of methods to assess cell mechanical properties', *Nature Methods* **15**(7), 491–498.

- Wu, Y., Zhang, K., Seong, J., Fan, J., Chien, S., Wang, Y. & Lu, S. (2016), 'In-situ coupling between kinase activities and protein dynamics within single focal adhesions', *Scientific Reports* **6**(1), 1–13.
- Wu, Z., Plotnikov, S. V., Moalim, A. Y., Waterman, C. M. & Liu, J. (2017), 'Two Distinct Actin Networks Mediate Traction Oscillations to Confer Focal Adhesion Mechanosensing', *Biophysical Journal* **112**(4), 780–794.
- Xu, W., Liu, B., Liu, X., Chiang, M. Y., Li, B., Xu, Z. & Liao, X. (2016), 'Regulation of BMP2-induced intracellular calcium increases in osteoblasts', *Journal of Orthopaedic Research* **34**(10), 1725–1733.
- Xu, W., Mezencev, R., Kim, B., Wang, L., McDonald, J. & Sulchek, T. (2012), 'Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells', *PLoS One* **7**(10).
- Yamada, S., Wirtz, D. & Kuo, S. C. (2000), 'Mechanics of living cells measured by laser tracking microrheology.', *Biophysical Journal* **78**(4), 1736.
- Yang, B., Lieu, Z. Z., Wolfenson, H., Hameed, F. M., Bershadsky, A. D. & Sheetz, M. P. (2016), 'Mechanosensing Controlled Directly by Tyrosine Kinases', *Nano Letters* **16**(9), 5951.
- Yang, X. C. & Sachs, F. (1989), 'Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions', *Science* **243**(4894), 1068–1071.
- Yang, Y., Zeng, B., Sun, Z., Esfahani, A. M., Hou, J., Jiao, N. D., Liu, L., Chen, L., Basson, M. D., Dong, L., Yang, R. & Xi, N. (2019), 'Optimization of Protein-Protein Interaction Measurements for Drug Discovery Using AFM Force Spectroscopy', *IEEE Transactions on Nanotechnology* **18**, 509–517.
- Yeatman, T. J. (2004), 'A renaissance for SRC', *Nature Reviews Cancer* **4**(6), 470–480.
- Yeoman, B., Shatkin, G., Beri, P., Banisadr, A., Katira, P. & Engler, A. J. (2021), 'Adhesion strength and contractility enable metastatic cells to become adurotactic', *Cell Reports* **34**(10), 108816.
- Yeung, T., Georges, P. C., Flanagan, L. A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V. & Janmey, P. A. (2005), 'Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion', *Cell Motility and the Cytoskeleton* **60**(1), 24–34.
- Yonemura, S. (2014), 'Differential sensitivity of epithelial cells to extracellular matrix in polarity establishment', *PLoS One* **9**(11).
- Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z. & Geiger, B. (2003), 'Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells', *Journal of Cell Science* **116**(22), 4605–4613.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R. & Geiger, B. (2007), 'Functional atlas of the integrin adhesome', *Nature Cell Biology* **9**(8), 858–867.
- Zemel, A., Rehfeldt, F., Brown, A. E., Discher, D. E. & Safran, S. A. (2010), 'Optimal matrix rigidity for stress fiber polarization in stem cells', *Nature physics* **6**(6), 468.

RÉSUMÉ

Au cours de la progression tumorale, les cellules acquièrent de nouvelles caractéristiques biomécaniques qui affectent la façon dont elles interagissent avec leur environnement. Ces changements biomécaniques peuvent d'ailleurs leur conférer un avantage sur les cellules normales pour envahir les tissus environnants.

Nous nous sommes intéressés à l'oncoprotéine Src, suractivée dans de nombreux cancers et associée à la survenue de métastases. L'objectif de cette thèse a été de caractériser la réponse biomécanique de cellules uniques à l'activation de Src. Nous avons choisi l'optogénétique pour contrôler dans le temps et de façon réversible, l'activation de Src dans des cellules épithéliales en culture, déposées sur des gels de polyacrylamide. En parallèle, nous avons caractérisé le phénotype biomécanique des cellules transformées en utilisant, d'une part, la Microscopie de Force de Traction (TFM) et en observant, d'autre part, le cytosquelette des cellules.

Nous avons d'abord montré que des cellules isolées Src-activées réorganisent leur cytosquelette et changent leur phénotype mécanique : elles s'étalent et accroissent leur contractilité. Notre étude a également permis d'identifier différentes voies de signalisation impliquées dans ce changement de phénotype mécanique. De manière intéressante, l'augmentation de la contractilité des cellules Src-transformées ne repose pas sur l'activation de Rho mais sur l'activation de la kinase MLCK, et sur un flux de calcium provenant en partie du réticulum endoplasmique. Afin de mieux comprendre les interactions de cellules transformées avec leur environnement, nous avons ensuite étudié l'influence de la rigidité du substrat sur la réponse mécanique des cellules à l'activation de Src. Nous avons identifié une rigidité particulière, autour de 10 kPa, pour laquelle le changement de phénotype mécanique est maximal.

Notre étude apporte un nouvel éclairage sur les changements biomécaniques des cellules transformées au début de la tumorigenèse et révèle comment la mécanosensibilité cellulaire est altérée.

MOTS CLÉS

oncoprotéine Src, optogénétique, TFM, phénotype mécanique, contractilité, mécanosensibilité

ABSTRACT

During tumoral progression, cells acquire new biomechanical properties, which affect the way they interact with their environment. These biomechanical changes may give them an advantage over normal cells to invade surrounding tissues. We are interested on the Src oncoprotein, which is overactivated in many cancers and involved in their metastatic spread. The aim of this thesis was to characterize the biomechanical response of single cells to Src activation. We chose optogenetics to control in time and in a reversible way, the activation of Src in cultured epithelial cells, deposited on polyacrylamide gels. In parallel, we characterized the biomechanical phenotype of transformed cells by using Traction Force Microscopy (TFM) and by observing their cytoskeleton.

We first showed that isolated Src-activated cells reorganize their cytoskeleton and change their mechanical phenotype: they spread and increase their contractility. Our study also identified different signaling pathways involved in this change of mechanical phenotype. Interestingly, the increase in contractility of Src-transformed cells does not rely on Rho activation but on MLCK activation, and on a calcium influx coming in part from the endoplasmic reticulum. To better understand the interactions of transformed cells with their environment, we then studied the influence of substrate rigidity on the mechanical response of cells to Src activation. We identified a particular rigidity, around 10 kPa, for which the change in mechanical phenotype is maximal.

Our study sheds new light on the biomechanical changes of transformed cells in the early stage of cancer and reveals how cell mechanosensitivity is affected.

KEYWORDS

Src oncoprotein, optogenetics, TFM, mechanical phenotype, contractility, mechanosensitivity