



HAL
open science

Régulation du choix de migration par l'histoire environnementale de la cellule

Samuel Tettarasar

► **To cite this version:**

Samuel Tettarasar. Régulation du choix de migration par l'histoire environnementale de la cellule. Biologie cellulaire. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL154 . tel-04853907

HAL Id: tel-04853907

<https://theses.hal.science/tel-04853907v1>

Submitted on 23 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.

Régulation du choix de migration par l'histoire environnementale de la cellule

Regulation of migration choice by the environmental history of the cell.

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°582 : Cancérologie : Biologie-Médecine-Santé (CBMS),
Spécialité de doctorat : Sciences du cancer
Graduate School : Sciences de la vie et la santé.
Référént : Faculté de Médecine

Thèse préparée dans l'unité de recherche Dynamique des cellules Tumorales
(Université Paris-Saclay, Inserm)
Sous la direction de **Guillaume Montagnac**, DR Institut Gustave Roussy

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 21 Décembre 2023, par

Samuel TETTARASAR

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Olivier DESTAING DR, IAB (UMR 5309) Université Grenoble Alpes	Président
Sandrine ETIENNE-MANNEVILLE DR, Institut Pasteur (UMR 3691) Université Paris Cité	Rapportrice & Examinatrice
Renaud POINCLOUX IRHC, IPBS Université Toulouse	Rapporteur & Examinateur
Audrey DUSSUTOUR DR, CRCA (UMR 5169) Université Paul Sabatier	Examinatrice
Benoît LADOUX DR, Institut Jacques Monod Université Paris Cité	Examinateur

“Ever tried. Ever failed. No matter. Try again. Fail again. Fail better”

Samuel Beckett

“Il faut accepter de planter pour que d’autres récoltent ailleurs et plus tard”

La Révolution des fourmis - Bernard Werber

“L’humanité ne peut rien obtenir sans donner quelque chose en retour.
Pour chaque chose reçue, il faut en abandonner une autre de même valeur.”

Fullmetal Alchemist – Hiromu Arakawa

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier les membres de mon jury : Dr Sandrine Etienne-Manneville, Dr. Renaud Poincloux, Dr. Olivier Destaing, Dr. Audrey Dussutour et Dr. Benoît Ladoux d'avoir accepté d'examiner mon travail. Je suis reconnaissant du temps pris pour l'étude de mon manuscrit et de ma présentation.

Je souhaite remercier grandement Guillaume Montagnac, pour m'avoir offert la possibilité de travailler au sein de son équipe lors de mon master 2. Merci de m'avoir fait confiance pour continuer en thèse sur ce projet passionnant.

Merci à l'ensemble de l'équipe Montagnac : Francesco, Jean Phillippe, Nathalie, Nadia, Stéphane, Julie, Lucile, Léa, Lillia. Merci pour votre soutien et votre aide, tout au long de ma thèse. Merci pour l'ambiance exceptionnelle qui règne dans notre bureau. Travailler avec vous est un vrai plaisir, et je suis heureux d'avoir pu partager ces moments avec vous. Merci aussi à l'équipe Jaulin.

J'aimerais remercier mes amis qui m'ont toujours supporté et qui m'ont fait passer des moments de parenthèse au top ! Merci : Clément, Louis, Marion, Edwin, Anthony, Marin, Julien, Romane, Dylan, Manon, Simon, Juliette, Mathieu, Eva, Alban, Célia, Mélanie, Quentin, Claire, Estelle, Maëlys, Rocco, Éric, Mirouf, Camille et Eloïse. Je vous aime les copains <3.

Bien sûr, merci à ma famille. Merci, à mes parents Iroudayeradjou et Samira, merci pour tout ce que vous avez faits pour moi ! Merci à mon frère Stevy et ma sœur Léa, alias Pouni, je suis extrêmement fier de vous. Merci aussi à Carole, Rémy et Aubane pour toute leur aide et leur soutien au cours de ces 4 années. Et enfin un énorme merci à toi, Coline. Je ne sais pas dans quel état j'aurais fini sans ton soutien ! Merci pour ta patience et ta compréhension ! Je vous aime tous et encore merci.

Remerciements	4
Tables des figures	9
Abréviations	11
Introduction	14
I. Migration cellulaire	14
I.1. Types de migration	14
I.1.1. Migration cellulaire collective.....	14
I.1.2. Migration cellulaire individuelle	17
I.1.2.1. Migration amiboïde	17
I.1.2.2. Migration mésenchymateuse	19
I.2. Les acteurs de la migration mésenchymateuse.....	21
I.2.1. Dynamique du cytosquelette.....	21
I.2.1.1. Le cytosquelette d'actine	21
I.2.1.2. Les microtubules.....	27
I.2.1.3. Les filaments intermédiaires	28
I.2.2. Adhérences cellule-matrice	30
I.2.2.1. Adhérences focales.....	30
I.2.2.2. Les podosomes et les invadopodes	35
I.2.3. La matrice extracellulaire.....	36
I.2.3.1. Composants de la matrice extracellulaire	36
I.2.3.2. Structure de la matrice extracellulaire	37
I.2.3.3. Remodelage de la matrice extracellulaire dans la migration cellulaire	39
I.3. La migration dirigée.....	40
I.3.1. La chimiotaxie	41
I.3.2. L'haptotactisme	42
I.3.3. La galvanotaxie	43
I.3.4. La durotaxie	43
II. Mécanotransduction	46
II.1. La matrice extracellulaire dans la mécanotransduction.....	46
II.1.1. Les propriétés mécaniques de la MEC.....	46
II.1.2. L'influence de la rigidité sur les cellules.....	46
II.2. Les structures mécanosensibles.....	48
II.2.1. Les AFs dans la mécanosensation	48
II.2.2. Le cytosquelette d'actine dans la mécanotransduction.....	50

II.2.2.1.	Régulateur mécanosensible du cytosquelette d'actine	50
II.2.2.2.	La transmission des forces par le cytosquelette d'actine	52
II.2.3.	Le noyau dans la mécanotransduction	53
II.2.3.1.	Le complexe LINC connecte le nucléoplasme et le cytosquelette	53
II.2.3.2.	La lamina nucléaire.....	56
II.2.4.	Mécanotransduction : les forces transformées en signaux biochimiques.....	57
II.2.4.1.	Voie de signalisation par les intégrines	57
II.2.4.2.	La voie de signalisation Hippo et YAP/TAZ	58
II.2.4.3.	MRTF/SRF	60
II.2.4.4.	Les canaux ioniques.....	61
III.	La mémoire mécanique.....	64
III.1.	La mémoire mécanique dans la différenciation cellulaire.....	65
III.1.1.	La mémoire mécanique dans la fibrose	65
III.1.2.	La mémoire mécanique dans les cellules ostéogéniques.....	66
III.2.	Effets de la mémoire mécanique sur la migration cellulaire	68
III.3.	Les acteurs de la mémoire mécanique.....	69
III.3.1.	YAP/TAZ dans la mémoire mécanique.....	70
III.3.2.	Mir-21 dans la mémoire mécanique	71
III.3.3.	RUNX2 dans la mémoire mécanique.....	73
III.4.	Les modifications épigénétiques dans la mémoire mécanique.....	73
III.4.1.	L'effet de RUNX2 sur la conformation de la chromatine	74
III.4.2.	La mémoire mécanique et l'accessibilité à la chromatine.....	74
III.5.	Un modèle proposé pour la mémoire mécanique cellulaire.....	76
IV.	La mémoire associative.....	79
IV.1.	Apprentissage non-associatif	81
IV.1.1.	Définition de l'habituation	81
IV.1.2.	L'habituation dans les organismes non-neuronaux.....	83
IV.1.2.1.	L'habituation chez les plantes.....	83
IV.1.2.2.	L'habituation chez les organismes unicellulaires.....	84
IV.1.2.3.	L'habituation dans des lignées cellulaires.....	87
IV.2.	Apprentissage associatif.....	87
IV.2.1.	Le conditionnement classique dans les organismes non-neuronaux.....	89
IV.2.1.1.	Apprentissage associatif chez les plantes.....	89
IV.2.1.2.	Apprentissage associatif dans les organismes unicellulaires.....	91
	Objectifs de la thèse.....	97

Matériels et méthodes	98
I. Lignées cellulaires.....	98
II. Synthèse des gels de polyacrylamide	98
III. Synthèse des gradients de rigidité.....	99
IV. Fonctionnalisation des lamelles de verres.....	100
V. Méthode de conditionnement des cellules.....	100
VI. Test de migration sur le gradient de rigidité.....	100
VII. Anticorps, siRNA et shRNA	101
VIII. Transfection des siRNA et shRNA	101
IX. Immunofluorescence et microscopie à épifluorescence.....	102
X. Microscopie d'immunofluorescence indirecte et quantification de la fluorescence	102
XI. Microscopie en temps réel et quantification des essais de migration	103
XII. Séquençage de l'ARN et analyse	103
XIII. Terminologie.....	103
XIV. Analyses statistiques	104
Résultats	105
I. La mémoire mécanique module la durotaxie	105
I.1. La congélation/décongélation affecte la durotaxie	105
I.2. La durotaxie est acquise par un conditionnement sur un substrat dur.....	107
I.3. La mémoire mécanique régule l'acquisition de la durotaxie	109
I.4. Régulation de la durotaxie par le temps d'exposition du substrat	111
II. La concentration de sérum et la durotaxie	113
II.1. La concentration en sérum permet l'acquisition de la durotaxie	113
II.2. L'Association du sérum avec la rigidité du substrat	115
II.3. Modification de la durotaxie par un conditionnement associatif	117
II.4. Association de stimuli dans une lignée cancéreuse	120
III. Quels mécanismes supportent la modification du choix de migration ?	122
III.1. Modification de la rigidité préférentielle par le conditionnement.....	122
III.2. Impact de YAP sur la modification du choix de migration	124
III.3. Identification de gènes impliqués dans la molloxie	126
Conclusion	129
Discussion et perspectives	131
I. La durotaxie, conséquence d'une culture in vitro classique ?	131

II. La mémoire mécanique et la durotaxie	133
III. Une mémoire associative dans des cellules de mammifères en culture	133
IV. Quels sont les mécanismes permettant la modification du choix de migration ?	135
<i>Publication</i>	<i>173</i>
<i>Résumé de thèse</i> :	<i>184</i>
<i>Thesis summary</i> :	<i>186</i>

Tables des figures

Figure 1 : Schéma de l'organisation de la migration collective	16
Figure 2 : Schéma des différents modes de migration cellulaire collective et individuelle.	18
Figure 3 : Schéma des étapes de la migration mésenchymateuse de cellules individuelles ...	20
Figure 4 : Élongation de l'actine par l'hydrolyse de l'ATP.....	23
Figure 5 : Formation du réseau ramifié d'actine	24
Figure 6 : Schéma des différents types de structures d'actine impliqués dans la migration mésenchymateuse	26
Figure 7 : Organisation des différents réseaux de cytosquelettes dans la migration mésenchymateuse	30
Figure 8 : Schéma des différentes signalisations permettant l'activation des intégrines.	32
Figure 9 : Schéma représentant les différents états des AFs lors de leur développement.....	34
Figure 10 : Représentation simplifiée de l'organisation de la MEC.....	38
Figure 11 : Mode de migration dirigées des cellules en réponse à différents types de facteurs externes.....	41
Figure 12 : Schéma du mécanismes de la durotaxie	45
Figure 13 : La rigidité des différents tissus humains.	47
Figure 14 : Représentation de la transmission des forces par l'embrayage moléculaire selon la rigidité du substrat	49
Figure 15 : Schéma de l'effet des forces mécanique sur le cytosquelette d'actine.	51
Figure 16 : Représentation du complexe LINC. Le complexe LINC est situé dans l'espace péri- nucléaire dans l'enveloppe nucléaire	54
Figure 17 : Représentation de la voie Hippo.	59
Figure 18 : Représentation de la mécanotransduction.....	63
Figure 19 : Schéma d'une expérience sur la mémoire mécanique cellulaire.	65
Figure 20 : Résultats des tests de vitesse de migration dépendant du conditionnement.....	68
Figure 21 : Schéma de la migration dépendant de la mémoire mécanique	71
Figure 22 : Schéma représentant le modèle de la mémoire mécanique établit sur le dur, avec ses boucles de rétrocontrôle positif.)	77

Figure 23 : Habituation chez le <i>Stentor coeruleus</i>	85
Figure 24 : Représentation de l'expérience du chien de Pavlov.....	89
Figure 25 : Protocole d'entraînement et de test pour l'apprentissage associatif chez les plants de pois.....	91
Figure 26 : Modèle expérimental du conditionnement chez le <i>Paramecium</i>	93
Figure 27 : Conditionnement chez l' <i>Amoeba proteus</i>	95
Figure 28 : La congélation/décongélation affecte la durotaxie.....	106
Figure 29 : Acquisition de la durotaxie par la rigidité du substrat.....	108
Figure 30 : La rigidité passée affecte la durotaxie des ostéoblastes.....	110
Figure 31 : Effet-dose de la rigidité passé sur la durotaxie.....	112
Figure 32 : La concentration de sérum permet l'acquisition de la durotaxie.....	114
Figure 33 : L'environnement passé affecte la durotaxie.....	116
Figure 34 : Le conditionnement induit la « mollotaxie » des cellules.....	118
Figure 35 : Association de plusieurs stimuli par les cellules.....	119
Figure 36 : Apprentissage associatif par les MDA-MB-231.....	121
Figure 37 : Étalement et force de traction des cellules en fonction de leur conditionnement.....	123
Figure 38 : Rôle de YAP dans le conditionnement des cellules.....	125
Figure 39 : Identification de gènes impliqués dans la mollotaxie.....	127

Abréviations

- AF : Adhérences focales
- AMPc : Adénosate monophosphate cyclique
- APC : Adenomatous Polyposis Coli
- ASC : Cellules souches dérivées du tissu adipeux
- ATAC seq : Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing
- CR : Réponse conditionnée
- CS : Stimulus conditionné
- EGF : Facteur de croissance épidermique
- FAK : Focal Adhesion Kinase
- FGF : Facteur de croissance des fibroblastes
- FI : Filament intermédiaire
- GAG : Glycosaminoglycanes
- GEF : Guanine nucleotide exchange factor
- GPCR : Récepteurs couplés aux protéines G
- HDAC : Histone désacétylase
- hMSC : Cellules souche mésenchymateuse
- INM : Membrane nucléaire interne
- KASH : Klarsicht, ANC-1, Syne homology
- LBR : Récepteur de lamine B
- LIM : LIN-11, Isl-1 et MEC-3
- LINC : Linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton
- LPS : Lipopolysaccharides

- MAPK : Mitogen-activated protein kinase
- MEC : Matrice extracellulaire
- MMP : Métalloprotéinases de la matrice
- MRTF : Myocardin Related Transcription Factor
- MSC : Cellules souche mésenchymateuse
- MT : Microtubules
- MTOC : Centre organisateur des microtubules
- NE : Enveloppe nucléaire
- NPFs : Facteurs promoteurs de nucléation
- NS : Stimulus neutre
- ONM : Membrane nucléaire externe
- OSCC : Carcinome épidermoïde buccal
- Pa : Pascal
- PA : polyacrylamide
- PDGF : Platelet-derived growth factor
- PDMS : Polydimethylsiloxan
- PDX : Xénogreffes dérivées de patients
- PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
- PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
- PTEN : Phosphatase and Tensin homolog
- RPTP- α : Récepteur de type tyrosine-phosphatase α
- RTK : Récepteurs à activité tyrosine kinase
- SFKs : Kinases de la famille Src
- SRF : Serum Reponse Factor
- SUN : Sad1 et UNC-84
- TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
- TGF- β : Facteur de croissance transformant β
- TREK : TWIK related potassium

- TRP : Transient receptor potential
- UR : Réponse non conditionnée
- US : Stimulus non conditionné
- VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
- WASP : Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
- YAP : Yes-associated protein
- α SMA : α smooth muscle actin

Introduction

I. Migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus crucial dans de nombreux aspects physiologiques et pathologiques. Il en existe deux grands types, la migration en cellule individuelle et collective. La migration en cellule individuelle est centrée sur le mouvement autonome d'une cellule unique, tandis que la migration collective implique une coopération entre cellules du groupe en mouvement. La capacité des cellules à migrer collectivement est indispensable pour façonner les organismes lors des événements de morphogenèse, comme l'épibolie chez l'embryon¹ ou le renouvellement des tissus chez l'adulte. Quant à la migration de cellules individuelles, celle-ci permet le bon fonctionnement du système immunitaire avec le mouvement des leucocytes au niveau des sites d'inflammation². Ces déplacements cellulaires sont aussi impliqués dans des processus pathologiques, tels que la dissémination métastatique et les maladies inflammatoires, comme le psoriasis, dues à une augmentation de l'infiltration des leucocytes au niveau des tissus atteints.

I.1. Types de migration

Le processus de base de la migration cellulaire débute par la polarisation de la cellule pour définir un bord avant et une extrémité arrière. Chaque cellule et type de migration a sa variante qui peut changer en termes de morphologie, de vitesse de migration et de modalités d'interactions avec le substrat et/ou avec les autres cellules du groupe. Les différents types et sous-types de migration seront développés dans ce chapitre.

I.1.1. Migration cellulaire collective

Organisation du cluster cellulaire

La migration collective décrit les mouvements coordonnés d'un groupe de cellules dans la même direction et avec la même vitesse. Ce type de déplacement est plus persistant que la migration de cellules isolées. Un des aspects principaux de la migration cellulaire

collective est la présence de cellules leaders et suiveuses³. Les cellules leaders sont situées à l'avant du groupe et jouent un rôle moteur en guidant et en donnant le rythme au reste du cluster⁴. Elles montrent une plus grande mobilité, une plus grande capacité de polarisation et sont plus sensibles aux signaux d'orientation présents dans l'environnement. Les cellules suiveuses, maintiennent des interactions fortes avec les leaders⁵. Ce sont les cadhérines qui permettent la mise en place de ces connexions grâce à la formation de jonctions adhérentes. Ces adhérences attachent les cellules les unes aux autres, ce qui stabilise le groupe pendant le déplacement⁶. La dynamique de leadership peut changer au cours du temps, et il est possible que des cellules initialement suiveuses deviennent des leaders en réponse aux changements de l'environnement ou aux besoins du groupe⁷.

Mécanisme de la migration collective

Les cellules leaders jouent le rôle de senseur et de détecteur des facteurs orientant la migration, qui peuvent être solubles ou physiques. Les différents niveaux d'exposition aux signaux extracellulaires stimulent une distribution distinctive des protéines d'adhérence entre les cellules leaders et suiveuses. Au front d'invasion du groupe cellulaire, les cellules leaders ont une exposition asymétrique des protéines d'adhérence : à l'avant de nombreuses connexions avec la matrice par le biais des adhérences focales (AFs) et à l'arrière des connexions cellules-cellules grâce aux cadhérines. Les cellules suiveuses ont une distribution symétrique des adhérences cellules-cellules^{8,9}. De plus, les chimiokines sont captées par les cellules leaders et déclenchent des voies de signalisation médiées par les récepteurs de facteurs de croissance. Ceci conduit notamment au recrutement de la protéine SCRIB, au niveau du bord avant des cellules leaders^{10,11}. Cette protéine interagit avec RAC et Cdc42¹¹. C'est l'accumulation de Cdc42, au site du récepteur, qui définit la formation localisée du « front » de la cellule et donc sa polarité¹². RAC, lui, active la formation des protrusions contrôlée par la polymérisation des filaments d'actine.¹³ Pour ce qui est des facteurs physiques, ce sont les intégrines qui activent des voies de signalisation en réponse à la composition et à la rigidité de la matrice extracellulaire

(MEC)¹⁴. Les voies impliquées sont similaires à celles des récepteurs de facteur de croissance induisant de même la polarisation et la formation de protrusion par les cellules leaders^{14,15}.

Les cellules leaders explorent l'environnement de l'organisme, mais peuvent aussi communiquer les informations aux cellules suiveuses ce qui contribue à la migration du groupe entier. Les cellules leaders exercent des forces de traction générées par les fibres de stress au niveau du front de la cellule, et cela traîne les cellules situées à l'arrière¹⁶. Ces forces sont transmises par des câbles d'actomyosine longitudinaux transcellulaire incluant les cellules suiveuses¹⁷. Ces forces exercent un rétrocontrôle positif des jonctions adhérentes entre les cellules permettant une meilleure intégrité du groupe cellulaire¹⁸. Les cellules suiveuses participent activement aux déplacements du groupe, en formant des protrusions dites « cryptiques ». Ces protrusions sont formées à la surface basale des cellules et imitent les lamellipodes des cellules leaders en exerçant de petites forces de traction¹⁹.

Cette organisation leader/suiveuse n'est pas figée. En fonction de l'orientation des facteurs présents dans l'environnement, les cellules situées à l'arrière peuvent détecter des signaux entraînant ainsi leur polarisation et donc prendre le rôle de leader du groupe⁷.

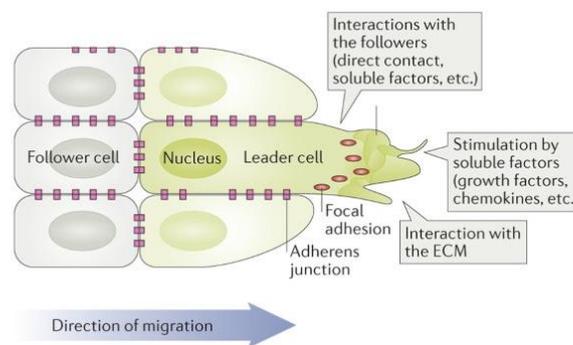


Figure 1 : Schéma de l'organisation de la migration collective avec les cellules leaders captant les différents facteurs de l'environnement de l'organisme, et les cellules suiveuses à l'arrière qui participent à la migration du groupe cellulaire. (R.Mayor and S. Etienne-Manneville. 2016)

1.1.2. Migration cellulaire individuelle

Les cellules qui migrent de façon individuelle utilisent deux modes principaux de migration : amiboïde ou mésenchymateuse. Certains types de cellules peuvent alterner entre ces modes de migration à différents moments lorsqu'elles se déplacent dans le microenvironnement. L'utilisation de l'un ou de l'autre de ces modes de migration est partiellement influencée par l'architecture, la composition et les propriétés mécaniques de la MEC.

1.1.2.1. Migration amiboïde

La migration cellulaire amiboïde est un type de locomotion semblable à celui utilisé par les amibes. Les cellules immunitaires comme les macrophages et les neutrophiles utilisent ce mode de déplacement pour répondre rapidement à une infection ou une lésion du tissu^{21,22}. Ce type de locomotion permet un passage rapide entre les différentes barrières environnementales complexes et variées telles que le sang, la lymphe et les tissus interstitiels. La migration amiboïde est aussi utilisée par les cellules cancéreuses métastatiques ce qui facilite leur migration, dissémination et leur survie^{22,23}.

La migration amiboïde se caractérise par des mouvements rapides, des adhérences faibles et la formation de courtes extensions sphériques de la membrane plasmique que l'on nomme "blebs"²⁴. Les cellules utilisant la migration amiboïde sont le plus souvent dépourvues d'AFs matures et de fibres de stress d'actine. Les cellules utilisant ce type de migration suivent un cycle d'expansion et de contraction ce qui leur permet de passer à travers de petites ouvertures de la MEC. Ce cycle commence par la formation d'un bleb qui est un détachement local de la membrane plasmique et de l'actine cortical²⁵. L'augmentation de la pression intracellulaire par confinement génère alors un afflux de cytosol au niveau de la membrane qui permet l'extension du bleb²⁶. Cette extension vers l'avant permet à la cellule de s'engouffrer à travers les pores de la MEC. Ensuite, la contraction des filaments d'actine contrôlée par la myosine II à l'arrière de la cellule²⁷

génère les forces de poussée nécessaires pour déplacer le reste du corps cellulaire vers l'avant.

Il existe une autre forme de migration amiboïde appelée migration amiboïde pseudopodale. Cette forme de migration emprunte quelques caractéristiques de la migration mésenchymateuse. Les cellules sont plus allongées, ont des filopodes riches en actine, mais présentent de faibles interactions cellules-MEC²⁸ tout comme les cellules amiboïdes formant des blebs. Dans la majorité des cas, la migration amiboïde est un mode de migration dit de « propulsion », alors que la migration mésenchymateuse utilise un mode de déplacement reposant sur des forces de « traction ».

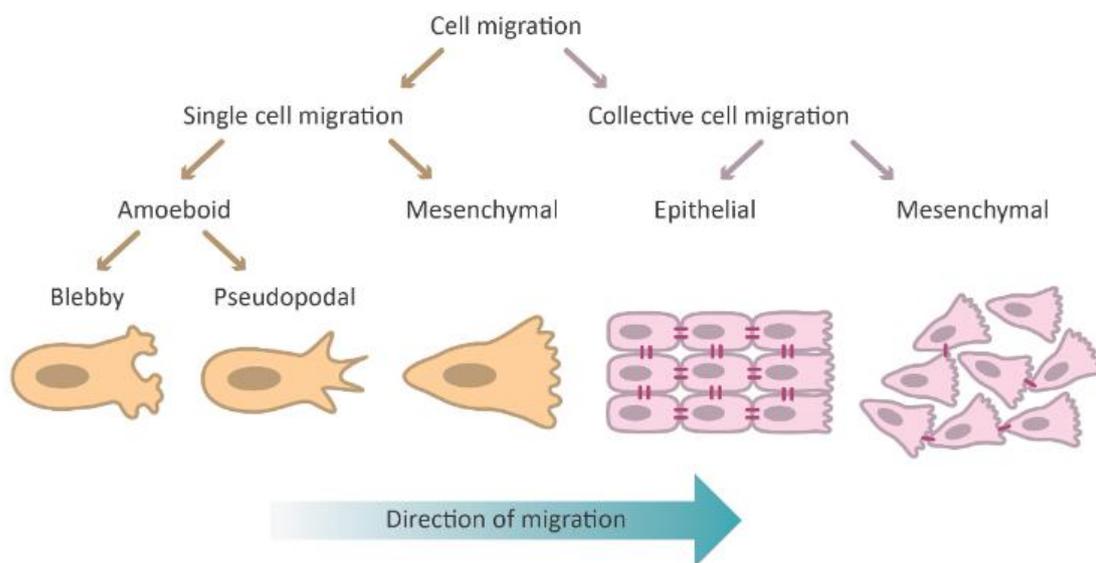


Figure 2 : Schéma des différents modes de migration cellulaire collective et individuelle. La migration cellulaire mésenchymateuse met en place des adhérences fortes ainsi que la contraction du cytosquelette pour permettre la traction de la cellule. La migration amiboïde ne nécessite pas d'adhérences, elle dépend de la contraction de la myosine à l'arrière de la cellule qui peut faire la transition entre ces différents modes de migration. (Mode of cell migration-Cytosmart)

I.1.2.2. Migration mésenchymateuse

La migration mésenchymateuse implique des interactions fortes avec la MEC. Contrairement à la migration amiboïde, il s'agit d'un mode de déplacement des cellules qui nécessite la formation de protrusions adhérentes à la MEC. Le processus de migration mésenchymateuse peut être divisé en plusieurs étapes : (1) La polymérisation d'actine à l'avant de la cellule qui engendre la formation de protrusions telles que les filopodes et les lamellipodes. (2) La formation de nouvelles AFs qui font le lien entre le cytosquelette d'actine de la cellule et la MEC. Ces connexions servent de point d'ancrage au (3) cytosquelette d'actine qui exerce des forces de traction induites par le flux rétrograde d'actine(4). Le désassemblage des adhérences à l'arrière de la cellule permet le mouvement vers l'avant de celle-ci.

La migration mésenchymateuse est aussi impliquée dans des processus tels que la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La TEM se caractérise par une perte de la polarité apico-basale des cellules épithéliales, une diminution des interactions cellule-cellule et l'acquisition d'une nouvelle polarité avant-arrière qui entraîne une augmentation des capacités de migration et d'invasion²⁹. Il existe trois grands types de TEM : (1) la TEM impliquée dans l'embryogénèse, avec par exemple les cellules du neuroectoderme qui se transforment en cellules migratrices permettant la formation de la crête neurale³⁰. (2) la TEM associée à la fibrose d'organe par les fibroblastes. Lors d'une lésion tissulaire, cela peut stimuler la TEM, provoquant une production aberrante de fibroblastes induisant la fibrose³¹. (3) La TEM associée aux cancers métastatiques, cela facilite la dissémination et l'invasion des cellules cancéreuses du site de la tumeur primaire vers les tissus voisins et autres organes^{32,33}.

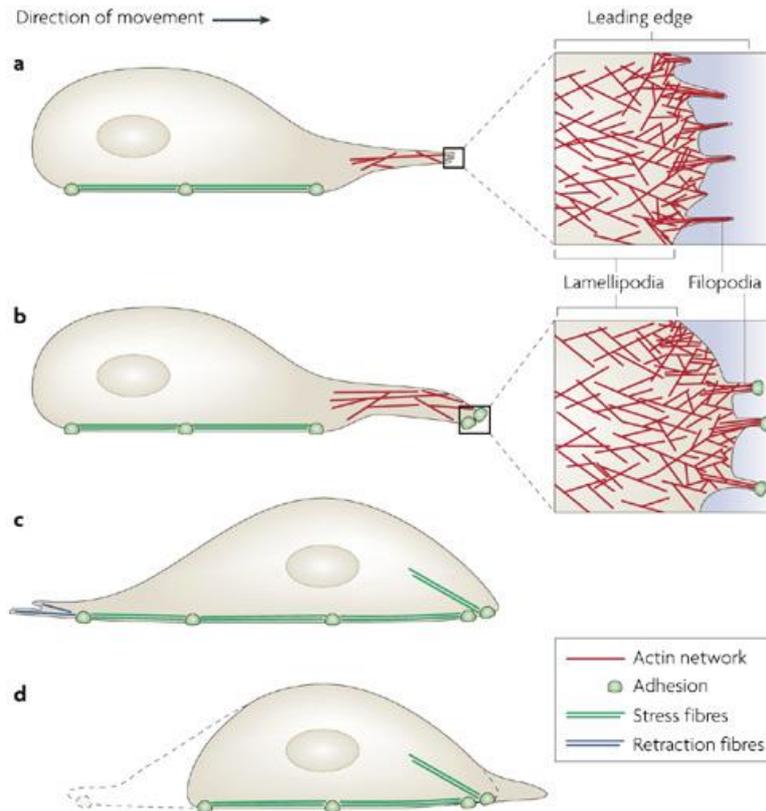


Figure 3 : Schéma des étapes de la migration mésenchymateuse de cellules individuelles. (a) Polarisation de la cellule avec la formation des protrusions telles que les filopodes et les lamellipodes. (b) La formation de nouvelles AFs lors de l'extension membranaire. (c) Le corps cellulaire se déplace vers l'avant grâce aux forces de traction générées par les fibres de stress ancrées sur les AFs. (d) Contraction du cytosquelette d'actine à l'arrière de la cellule et désassemblage des AFs. (P. K. Mattila and P. Lappalainen. 2008)

Je me suis intéressé à ce type de migration individuelle pour mon étude. Les différents acteurs et leurs implications dans ce mode de migration seront abordés en détails dans le prochain chapitre.

1.2. Les acteurs de la migration mésoenchymateuse

La migration mésoenchymateuse nécessite une coordination entre trois processus biophysiques pour interagir et migrer à travers l'environnement dans l'organisme : la dynamique du cytosquelette, l'adhérence et le remodelage de la MEC. Ces processus biophysiques seront développés dans cette partie.

1.2.1. Dynamique du cytosquelette

Afin de naviguer à travers la matrice et de surmonter les barrières physiques, les cellules peuvent remodeler leur cytosquelette. Le cytosquelette est un réseau dynamique de structures fibrillaires dans le cytoplasme de la cellule. Ce réseau permet aux cellules de moduler leurs formes afin de s'adapter à leur environnement. Le cytosquelette de la cellule comprend le cytosquelette d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Ces trois composants doivent travailler de manière coordonnée afin que la cellule migre de façon efficace.

1.2.1.1. Le cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine est l'acteur principal qui engendre les forces de migration cellulaire. Il peut produire des forces de poussée, grâce à la polymérisation coordonnée de plusieurs filaments d'actine donnant ainsi naissance aux protrusions, ou produire des forces de traction dites « contractiles » en faisant glisser les filaments d'actine le long des filaments de myosine II. Ces forces sont indispensables pour la migration cellulaire, mais aussi pour modifier la forme et les propriétés de la cellule en elle-même.

Dynamique des filaments d'actine

La formation des filaments d'actine est un processus dynamique qui implique plusieurs protéines régulatrices. Les étapes principales sont la nucléation, l'élongation, la dépolymérisation et le recyclage des monomères d'actine. Les filaments d'actine peuvent former des structures variées, comme des réseaux ramifiés, des faisceaux linéaires ou des filaments isolés, qui ont des fonctions différentes dans la cellule³⁵.

Les filaments d'actine, ou microfilaments, sont les éléments qui constituent la structure fibrillaire de base du cytosquelette d'actine. Ce sont des polymères polarisés composés de monomère d'actine globulaire (actine-G). L'actine G s'assemble de façon spontanée en une double hélice polarisée avec une extrémité barbue (+) et une extrémité pointue (-). L'extrémité barbue est plus favorable à la polymérisation, tandis que l'extrémité pointue est plus favorable à la dépolymérisation³⁶.

Pour initier la formation des filaments d'actine, il faut d'abord former un noyau de trois ou quatre monomères d'actine. Pour faciliter cette étape, les cellules utilisent des facteurs de nucléation, qui sont des protéines capables d'« imiter » un tétramère et de recruter des monomères supplémentaires. Il existe différents types de facteurs de nucléation, tels que le complexe Arp2/3, et les formines. Le complexe Arp2/3 se lie à un filament préexistant (filament mère) et initie la croissance d'un nouveau filament (filament fille), créant ainsi un réseau ramifié d'actine³⁷. Les formines sont des protéines qui possèdent un domaine FH2 qui stabilise un dimère d'actine et recrute des complexes profiline-actine pour l'élongation du filament. Les formines restent associées à l'extrémité barbue du filament et favorisent la formation de faisceaux linéaires d'actine comme ceux retrouvés dans les filopodes³⁸. Une fois le noyau formé, l'élongation du filament se fait par l'ajout de monomères d'actine chargés en ATP à l'extrémité barbue. L'ATP est ensuite hydrolysée en ADP le long du filament, ce qui diminue l'affinité des monomères entre eux et favorise la dépolymérisation à l'extrémité pointue. Ces échanges avec l'actine-G atteignent à un moment un état d'équilibre où le filament d'actine ressemble à un « tapis roulant ». On nomme en anglais ce phénomène de dynamique de filament d'actine : treadmilling.³⁹

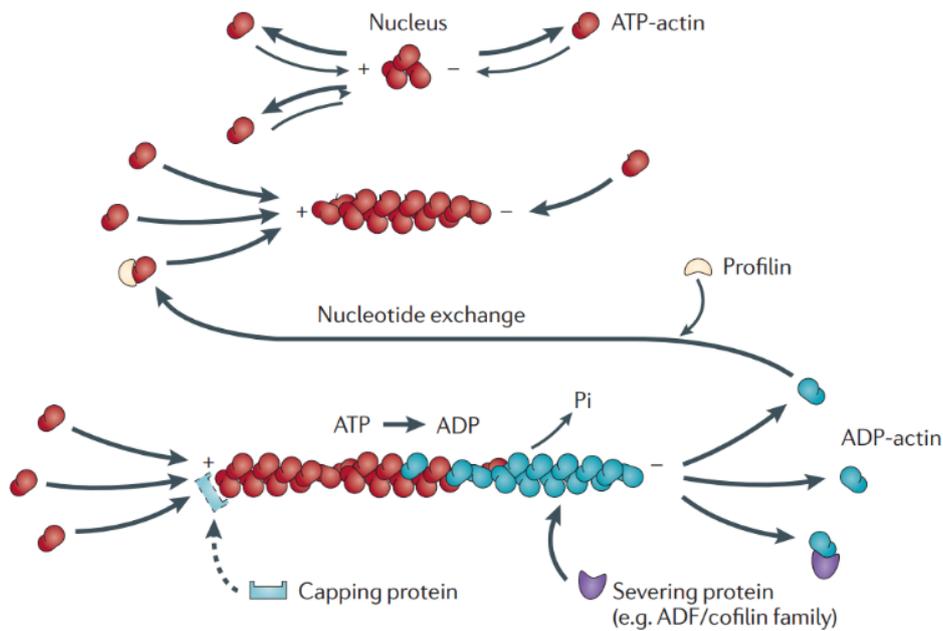


Figure 4 : Élongation de l'actine par l'hydrolyse de l'ATP. La polymérisation est plus rapide au niveau de l'extrémité barbue (+) et la dépolymérisation l'est plus du côté de l'extrémité pointue (-). (Nürnberg et al. 2011)

L'élongation du filament peut être régulée par différentes protéines, telles que les protéines de coiffe, qui bloquent l'extrémité barbue et empêchent l'ajout de nouveaux monomères, ou les protéines d'élongation, qui facilitent le recrutement de monomères à l'extrémité barbue. Parmi les protéines d'élongation, on trouve les formines, les protéines Ena/VASP ou les NPFs (facteurs promoteurs de nucléation), qui peuvent transférer des monomères d'actine aux extrémités barbues^{41,42}.

La dépolymérisation des filaments d'actine peut se faire par plusieurs mécanismes, impliquant des protéines comme la cofiline. La cofiline est une protéine qui se lie préférentiellement aux monomères d'actine chargés en ADP et provoque la fragmentation ou la dépolymérisation des filaments⁴³.

Les monomères d'actine libérés par la dépolymérisation peuvent être recyclés pour participer à de nouvelles réactions de polymérisation. Pour cela, ils doivent être rechargés en ATP, ce qui est assuré par des protéines comme la profiline. La profiline se lie à l'actine ADP et favorise l'échange de nucléotide avec de l'ATP. La protéine CAP se lie à l'actine ADP et facilite sa dissociation de la cofiline⁴⁴.

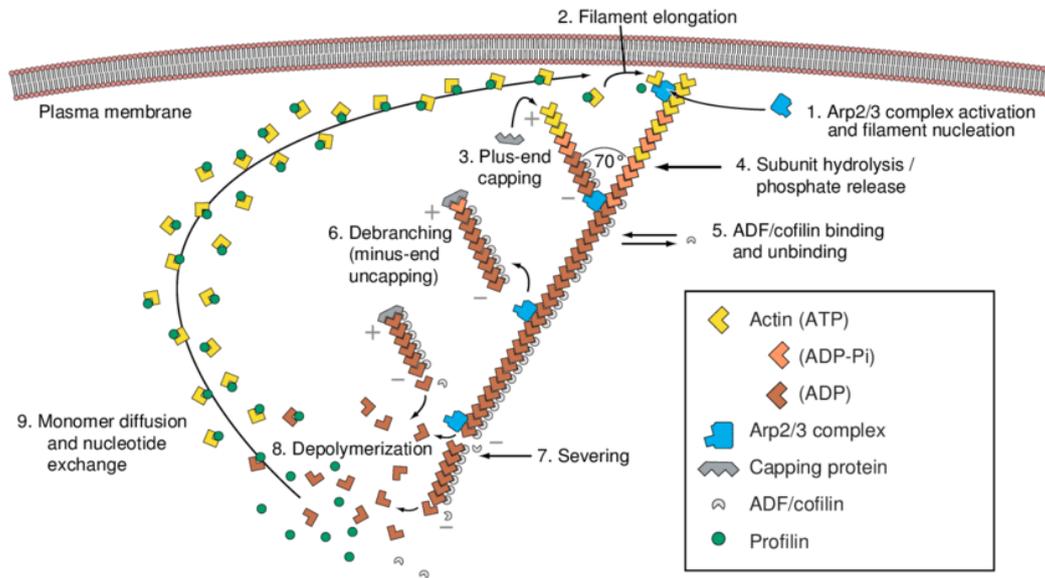


Figure 5 : Formation du réseau ramifié d'actine, avec ses régulateurs, au niveau du front d'invasion de la cellule donnant les lamellipodes. (Stuhrmann, 2009)

Les forces associées aux filaments d'actine

Les filaments d'actine peuvent s'organiser en différents réseaux subcellulaires impliqués dans la migration mésoenchymateuse. Ils peuvent former un réseau ramifié, comme celui retrouvé dans les lamellipodes, ou se rassembler en faisceaux, formant ainsi les filopodes ou les fibres de stress.

Les lamellipodes sont des protrusions plates situées à la bordure avant de la cellule. Ils sont le moteur principal du mouvement vers l'avant et servent aussi comme guide pour détecter les signaux de guidage soluble et les propriétés chimiques et mécaniques de l'environnement⁴⁵. Les lamellipodes sont des structures faites de réseaux d'actine en maille, dus à la ramification continue du réseau par l'action du complexe Arp2/3 sur

l'actine^{46,47}. Cette ramification est initiée par les GTPases RAC et Cdc42, qui respectivement activent WAVE⁴⁸ et N-WASP⁴⁹, ce qui induit la polymérisation de l'actine par Arp2/3. Plus le réseau est ramifié et plus il est dense, augmentant alors les forces de tension membranaire. Cela participe au mouvement vers l'avant de la membrane plasmique⁵⁰. Dans cette structure, la force vient de la polymérisation de l'actine⁵¹. Cependant, la polymérisation de l'actine ne suffit pas à elle seule pour pousser la membrane plasmique vers l'avant. En effet, en raison de la résistance que la membrane oppose aux filaments d'actine en croissance, ceux-ci sont poussés vers l'arrière en un flot rétrograde. Lorsque le cytosquelette d'actine est lié aux substrats par les AFs, cela ralentit le flot rétrograde et génère des forces de traction suffisantes pour que les filaments d'actine dépassent la tension membranaire et pousse la membrane vers l'avant⁵².

Les filaments peuvent aussi s'organiser en faisceaux en se regroupant. Selon l'orientation de la polarité des filaments d'actine groupés, les faisceaux seront soit parallèles, soit antiparallèles. Les faisceaux parallèles forment les filopodes alors que les antiparallèles sont notamment retrouvés au niveau des fibres de stress.

Les filopodes sont des protrusions en forme de doigt, formées au niveau du bord avant des cellules migrantes. Ces structures sont créées à partir de forces engagées vers la membrane par la polymérisation des filaments d'actine, mais cela est indépendant du complexe Arp2/3^{53,54}. La formation de ce type de faisceau est médiée par des facteurs d'élongation comme les protéines Ena/VASP et la formine⁵⁵. Ces protéines sont localisées au sommet du filopode et protègent la partie barbée des filaments d'actine⁵⁶.

Les fibres de stress sont des faisceaux d'actine antiparallèles, essentielles pour la migration mésenchymateuse, car elles permettent de faire le lien entre les AFs, le cytosquelette et le noyau. Elles participent aussi au changement morphologique des cellules, surtout au moment de la rétraction du corps cellulaire à l'arrière de la cellule en migration⁵⁷. Ces structures sont composées de l'actine et de la myosine II, ce qui permet de générer des forces de traction. L'assemblage des fibres de stress est régulé par une cascade de signalisation impliquant la GTPase RhoA⁵⁸. La forme liée au GTP de RhoA active la kinase

associée à Rho, qui inhibe la dépolymérisation des filaments d'actine, et induit la phosphorylation des chaînes légères de la myosine^{59,60}. Les fibres de stress sont intégrées dans un réseau cortical d'actine contractile⁶¹, permettant aux forces contractiles exercées de se propager dans toute la cellule, et contribuant ainsi activement à la transmission des forces de traction aux AFs qui permettent le développement de celles-ci⁶².

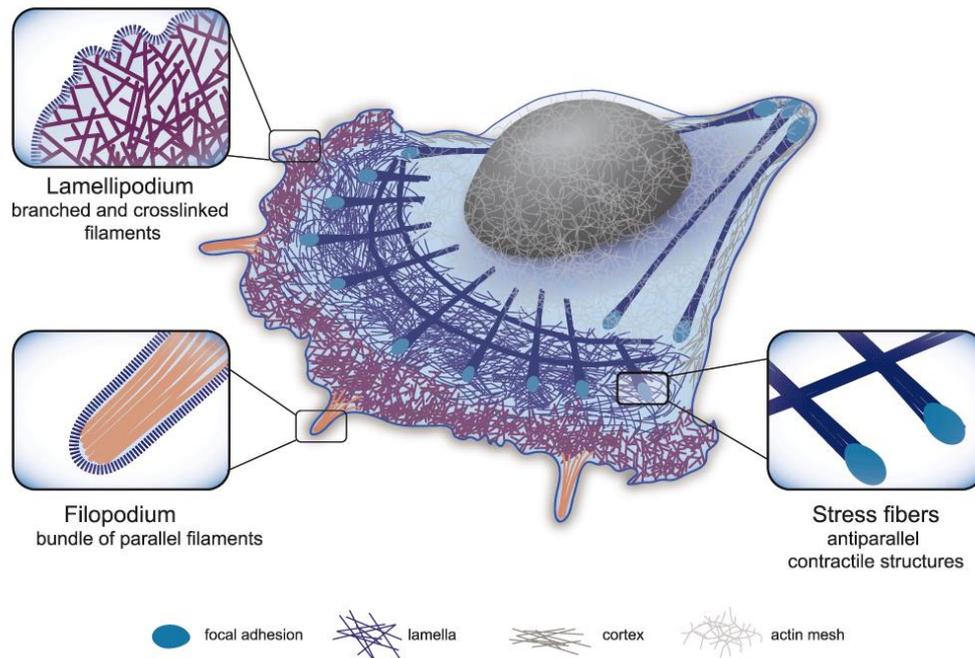


Figure 6 : Schéma des différents types de structures d'actine impliqués dans la migration mésoenchymateuse. Les lamellipodes sont organisés en réseaux ramifiés de filaments d'actine. Les filopodes et fibres de stress sont composés de faisceaux d'actine orientés respectivement parallèlement et antiparallèlement. (Blanchoin et al. 2015)

1.2.1.2. Les microtubules

Les microtubules sont impliqués dans le transport intercellulaire en retenant ou en délivrant des molécules de signalisation. Ils sont essentiels au bon déroulement du cycle cellulaire en participant à la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire. Ils participent également à la migration cellulaire.

Organisation des microtubules

Les microtubules (MTs) sont des structures cylindriques creuses de 25 nm de diamètre et composées de 13 protofilaments, eux-mêmes formés par l'assemblage de dimères de tubuline α et β liées au GTP. Les MTs sont polarisés, avec une extrémité (-) et (+), et sont organisés à partir d'un centre organisateur (MTOC) qui comprend notamment les centrosomes⁶⁴. De par la polarité du dimère $\alpha\beta$, les sous-unités α sont exposées à l'extrémité (-) des MTs, tandis que les sous-unités β sont exposées aux bouts (+). L'extrémité (+) possède une vitesse de polymérisation plus grande que l'extrémité (-). La dynamique de polymérisation et dépolymérisation dépend de l'hydrolyse du GTP⁶⁵ et de protéines associées aux microtubules (MAP) qui stabilisent et permettent la mise en place du réseau de MTs⁶⁶. Cette polarité est importante pour le transport intercellulaire, car des moteurs dépendants des MTs, tels que la dynéine et les kinésines, transportent des vésicules et des complexes protéiques vers l'extrémité (-) ou (+), respectivement⁶⁷.

Les microtubules dans la migration cellulaire

Les MTs, qui ont la capacité de résister à des charges de compression élevées, peuvent s'étendre vers les sites de protrusion et aider à pousser la membrane vers l'avant, ce qui favorise la migration des cellules tels que les astrocytes et les neurones.^{50,68} Les protéines de suivi de l'extrémité (+), telles que EB1 et EB3, ainsi que les facteurs de stabilisation comme APC (Adenomatous Polyposis Coli), facilitent l'élongation des MTs dans les protrusions^{69,70}. Les MTs peuvent également promouvoir le transport de vésicules membranaires essentielles à la protrusion cellulaire et transporter des molécules de signalisation associées à la membrane et promouvant la migration cellulaire. L'assemblage

et le désassemblage des MTs peuvent activer un grand nombre de Guanine nucleotide exchange factor (GEF) aux sites de protrusion, activant notamment Cdc42 et induisant la formation de lamellipodes⁷¹.

Les MTs sont aussi impliqués dans la dynamique des AFs. Ils facilitent l'assemblage des complexes focaux en périphérie cellulaire en contrôlant le recrutement d'intégrines à la membrane plasmique⁷². Les MTs interagissent également avec des protéines de liaison de l'actine, comme la fascine, pour contrôler la dynamique des AFs qui sera vue plus en détails dans le chapitre suivant⁷³. Les fibres de stress participent à la maturation des AFs en générant des forces de contraction sur ces complexes, et la fascine permet de réguler l'organisation de ces fibres de stress afin que les forces exercées sur les AFs ne soient pas trop fortes, ce qui pourrait entraîner un désassemblage de ces AFs⁷⁴.

La dynamique des MTs régule aussi la contraction cellulaire. Lorsque GEF-H1 (un Rho GEF associé aux MTs) est lié aux MTs, alors il est inactif. Mais quand les MTs se dépolymérisent, GEF-H1 devient libre, et peut ainsi activer RhoA, et donc la contractilité cellulaire^{75,76}. Cette contraction médiée par RhoA peut également favoriser la rétraction de l'arrière de la cellule pendant la migration. Les MTs déclenchent également le désassemblage des adhérences via la déstabilisation médiée par FAK (Focal Adhesion Kinase)⁷⁷, et via l'endocytose des intégrines médiée par la dynamine et la clathrine^{77,78,79}.

I.2.1.3. Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires (FIs) jouent un rôle important dans le renforcement de la structure cellulaire et l'organisation des cellules en tissus. Ils maintiennent l'intégrité mécanique du cytoplasme et régulent l'organisation des organites cellulaires⁸⁰. Bien que la structure des FIs soit hautement flexible, ils sont plus stables que les microfilaments d'actine et les microtubules⁸¹.

Organisation des filaments intermédiaires

Ces filaments sont des polymères non polarisés avec un diamètre de l'ordre de 12 nm, intermédiaire à celui des filaments d'actine (8 nm) et des MTs (25 nm). Les sous-unités qui

composent les FIs sont des protéines fibreuses contrairement à la G-actine et la tubuline qui sont globulaires⁸². Ces protéines présentent une grande hélice α centrale, ce qui permet la formation de dimères parallèles et de tétramères antiparallèles, pouvant s'associer en filaments non polarisés⁸³. Les principaux FIs sont les lamines nucléaires, la vimentine et les kératines.

Les filaments intermédiaires dans la migration cellulaire

Ces filaments peuvent être impliqués dans la régulation des AFs. La vimentine est recrutée au niveau des AFs à travers la plectine1, ce qui ralentit leur dynamique, augmente les forces d'adhérence et permet par conséquent le développement des AFs⁸⁴. Les filaments de vimentine peuvent aussi interagir avec les queues cytoplasmiques de l'intégrine $\beta 3$ ce qui augmente l'affinité des intégrines avec les ligands extracellulaires et le regroupement des intégrines entraînant la formation de nouvelles AFs⁸⁵. La phosphorylation de la vimentine peut modifier les interactions entre les filaments intermédiaires et les AFs. La phosphorylation de la vimentine par PKC ϵ augmente le recyclage des intégrines vers la membrane plasmique⁸⁶, tandis que la phosphorylation par Cdc2 induit l'activation de l'intégrine $\beta 1$ ⁸⁷.

Les FIs communiquent avec les autres réseaux de filaments du cytosquelette et ces interactions sont essentielles à la migration cellulaire. Il a été observé que le réseau de filaments de vimentine se forme le long des MTs polarisés de manière dépendante à l'APC⁸⁸. Ce réseau de vimentine plus stable sert de modèle pour la croissance future des MTs, favorisant ainsi la polarité cellulaire et la persistance directionnelle de la migration⁸⁹. Le réseau de vimentine peut aussi réguler le cytosquelette d'actine et la migration cellulaire. Comme mentionné plus tôt, la présence de l'activité des petites protéines G RAC et Cdc42 à l'avant de la cellule, entraîne la polymérisation de l'actine près de la membrane plasmique, ce qui forme les lamellipodes. Cdc42 et Rac induisent aussi la phosphorylation de la vimentine ce qui permet le désassemblage de ce réseau, favorisant ainsi la formation du lamellipode par l'actine⁹⁰. Il a été observé que lorsque la vimentine est présente au bord avant de la cellule, elle inhibe la formation du lamellipode⁹¹.

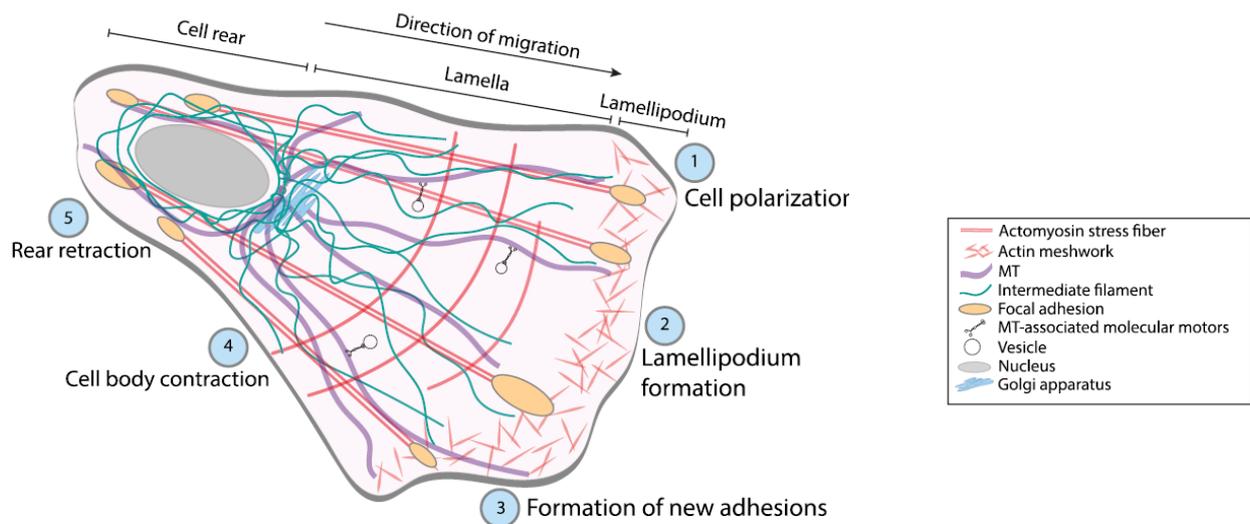


Figure 7 : Organisation des différents réseaux de cytosquelettes dans la migration mésenchymateuse. Les trois cytosquelettes d'actine, de microtubules et de filaments intermédiaires sont polarisés dans le sens de migration et participent à la migration cellulaire. (S. Seetharaman and S. Etienne-Manneville. 2020)

1.2.2. Adhérences cellule-matrice

Les adhérences cellulaires sont essentielles à de nombreuses fonctions cellulaires comme la migration, la différenciation et le cycle cellulaire. Les cellules adhèrent à la MEC via des complexes d'adhérence tels que les AFs et les podosomes qui servent de point d'ancrage à l'initiation de la migration mésenchymateuse.

1.2.2.1. Adhérences focales

Les AFs sont les principales adhérences utilisées par la cellule pour effectuer la migration mésenchymateuse. Ce sont des structures multiprotéiques contenant des intégrines qui forment des liens mécaniques entre les réseaux d'actine intracellulaires et la MEC dans de

nombreux types de cellules, comme par exemple les fibroblastes. La formation et la fonction des AFs peuvent être décrites en étapes définies qui incluent l'initiation, le regroupement, la croissance, la maturation et le désassemblage.

Les AFs sont composées de plusieurs types de protéines. Il y a les protéines transmembranaires, dont les intégrines sont la classe la plus importante, les protéines structurales, qui stabilisent à la fois l'AF et fournissent des fonctions d'échafaudage, et les protéines de signalisation. Ces protéines, telles que la vinculine, la taline, la paxilline, sont essentielles à la formation et à la dynamique des AFs.

Les Intégrines

Les intégrines sont les protéines les plus importantes des AFs. Ce sont des récepteurs transmembranaires qui jouent un rôle essentiel dans les interactions entre les cellules et la MEC. Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, tels que la migration, la prolifération, la différenciation, l'angiogenèse et l'inflammation. Les intégrines se lient à des ligands spécifiques présents dans la MEC, comme le collagène, la fibronectine ou la laminine, et transmettent des signaux bidirectionnels entre la MEC et le cytosquelette⁹³.

Les intégrines sont des hétérodimères constitués de deux sous-unités : une chaîne α (18 types différents) et une chaîne β (8 types), donnant 24 combinaisons uniques interagissant de manière non covalente⁹⁴. Cette diversité permet la liaison à une grande variété de composants de la MEC. Les sous-unités α et β des intégrines sont toutes deux des protéines transmembranaires de type I, composées d'un grand domaine extracellulaire, d'une hélice transmembranaire à passage unique et d'un court domaine cytoplasmique⁹⁵.

Les intégrines sont des récepteurs de protéines de la MEC qui peuvent être classés en fonction des sous-unités qui les constituent. En fonction de leurs compositions, les intégrines interagissent avec différents types de protéines. En exemple, toutes les intégrines se liant au collagène possèdent une chaîne $\beta 1$ et la majorité des intégrines qui

lient des peptides RGD, retrouvés notamment dans la fibronectine, ont en commun la chaîne αV ⁹⁶

Les intégrines peuvent être sous forme fermée « inactive » ou sous forme ouverte « active ». Sous forme fermée, les intégrines ont une faible affinité pour leur ligand. Il existe 2 voies de signalisation pour activer les intégrines : « inside-out » et « outside-in »⁹⁷. Lors de la signalisation « inside-out », un activateur intracellulaire, comme la taline et la kindline, se lie à la queue β de l'intégrine⁹⁸. Cela entraîne des changements de conformation induisant une augmentation d'affinité pour les ligands extracellulaires : l'intégrine est dite « active ». Cette activation permet d'augmenter l'affinité de l'intégrine pour des protéines de la MEC et ainsi transmettre les forces nécessaires à la migration cellulaire⁹⁹.

Les intégrines peuvent aussi agir comme de simples récepteurs de signalisation et transmettre les informations de l'extérieur, c'est la signalisation « outside-in »⁹⁷. La liaison des intégrines à leurs ligands extracellulaires induit la conformation « active » pouvant entraîner un regroupement d'intégrines qui, ensemble, forment les AFs.

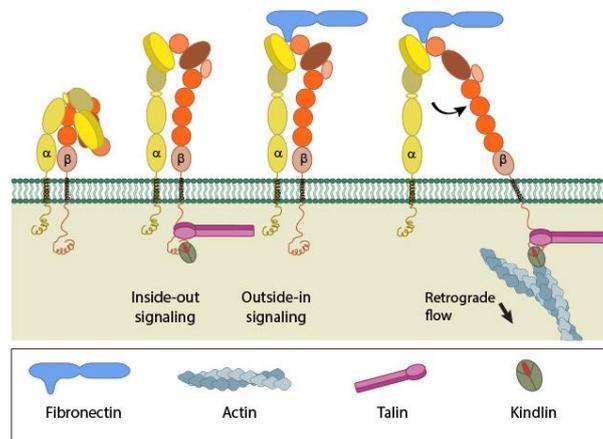


Figure 8 : Schéma des différentes signalisations permettant l'activation des intégrines. L'activation des intégrines de l'intérieur par des protéines cytoplasmiques ou de l'extérieur par des ligands de la MEC conduisent toutes deux à la conformation active de l'intégrine. (Defining Mechanobiology – Mbinfo)

Formation des AF

La formation des adhérences est un processus dynamique localisé au niveau du front de migration de la cellule. Plusieurs étapes sont nécessaires avant d'avoir une AF mature. La formation d'AF commence par l'apparition d'adhérences naissantes (nascent adhesion, cf. **Fig.9**) qui se développent en AF (focal adhesion, cf. **Fig.9**) grâce aux forces de traction, et pour finir peuvent évoluer vers des adhérences fibrillaires.

Les adhérences naissantes se forment initialement au niveau du lamellipode à l'avant de la cellule. Ce sont les intégrines qui sont à l'origine des AFs. Les intégrines actives jouent le rôle de plateforme, favorisant le recrutement d'autres intégrines et de protéines adaptatrices telles que FAK, paxilline, taline et la vinculine^{100,101}. Les filaments d'actine sont présents en grande quantité dans le lamellipode et se lient au complexe, grâce à la taline et la vinculine, formant ainsi les adhérences naissantes¹⁰². Ce sont de petites adhérences ponctiformes et transitoires avec des durées de vie relativement courtes.

Un facteur essentiel pour le développement de ces adhérences est l'activité de la myosine II. Les fibres de stress, composées d'actine et de myosine II, se lient à la taline. Celle-ci se déplie sous les forces exercées par ces fibres, exposant de nouveaux sites de liaison pour la vinculine. Cela augmente le nombre de molécules de vinculine pouvant se lier à la taline et produit encore plus de liaisons entre les intégrines et les filaments d'actine, ce qui aboutit à la formation des complexes focaux. Il a été observé que l'intégrine $\alpha V\beta 1$ modifie son état en réponse aux tensions générées par la myosine II, contrôlant de même l'affinité de liaison avec la fibronectine et les voies de signalisation dépendantes de la phosphorylation de FAK¹⁰³. Si les adhérences naissantes ne subissent pas de forces de tension, elles se désassemblent.

Les complexes focaux (focal complex, cf. **Fig.9**) sont la première étape de maturation. On les retrouve le plus fréquemment chez des cellules avec une forte contractilité, comme les fibroblastes¹⁰⁴. Les complexes focaux sont plus allongés et plus gros que les adhérences naissantes. Les complexes focaux sont une étape temporaire du développement, au fur et

à mesure que le lamellipode avance, ces structures s'allongent, grossissent et deviennent les AFs¹⁰⁵.

Les adhérences fibrillaires sont la dernière étape de développement des adhérences. Elles sont retrouvées derrière le lamellipode, au niveau du centre de la cellule. Ces adhérences sont dénuées de certaines protéines, telles que la paxiline et la vinculine, retrouvées dans les stades plus précoces des adhérences^{106,107}. D'autres protéines sont présentes, comme la tensine qui est une protéine qui permet la transmission des forces entre le substrat et la cellule. Dans les fibroblastes, il a été observé que la formation des adhérences fibrillaires augmente avec la rigidité du substrat par l'expression de la tensine-1¹⁰⁸.

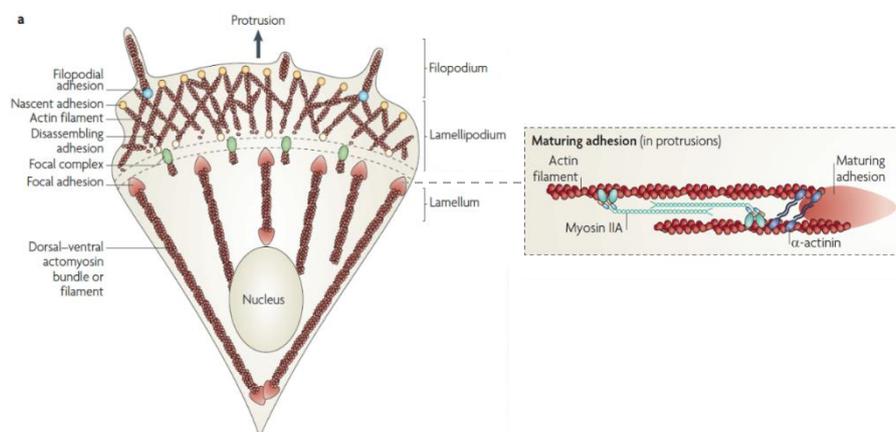


Figure 9 : Schéma représentant les différents états des AFs lors de leur développement. Les adhérences naissantes se forment dans le lamellipode. Les fibres de stress génèrent des forces de traction sur ces adhérences qui permettent leur stabilisation et leur développement en complexes focaux, puis en adhérences focales. (Adapté de Parsons et al. 2010)

Le désassemblage des adhérences

Cette étape est critique pour permettre la migration cellulaire, car elle permet la rétraction de l'arrière de la cellule et la formation de nouvelles adhérences au niveau de la protrusion à l'avant. Le désassemblage des adhérences est principalement médié par des événements

de phosphorylation de tyrosine sur la protéine FAK, et des changements de tension du cytosquelette¹¹⁰ qui sont contrôlés par des régulateurs tels que la calpaïne^{111,112} et les microtubules¹¹³.

Les microtubules sont connus pour réguler négativement la contractilité cellulaire et donc améliorer le désassemblage^{113,114}. Ils ont été observés ciblant les sites d'adhérence pour finalement provoquer le glissement ou la déstabilisation de ces structures. Cette régulation par les microtubules permet la mise en place d'un renouvellement asymétrique des adhérences à l'arrière de la cellule^{113,115}. Elle est associée au "glissement" des adhérences lorsque le bord arrière de la cellule se déplace vers le corps cellulaire. Cette asymétrie soutient la migration directionnelle^{116,117}.

1.2.2.2. Les podosomes et les invadopodes

Les podosomes et les invadopodes sont des micro-domaines d'adhérence qui sont formés au niveau de la membrane plasmique ventrale de la cellule¹¹⁸. Ces structures ont une organisation caractéristique, avec un cœur d'actine cylindrique entouré d'intégrines et de protéines des AFs comme la taline et la vinculine¹¹⁹. On retrouve aussi des protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine, telle que WASP (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein)¹²⁰. Ces structures sont très dynamiques avec une polymérisation / dépolymérisation continue des fibres d'actine les composants. Contrairement aux AFs, ces structures peuvent dégrader la MEC grâce à la présence de métalloprotéases^{121,122}. Les podosomes peuvent être retrouvés dans les cellules dendritiques immatures, les ostéoclastes et les macrophages. Les invadopodes sont présents dans certaines cellules tumorales très invasives. Elles possèdent une composition similaire aux podosomes, avec un noyau riche en actine entouré de protéines tels que la cofiline et WASP¹²³. Ces structures sont plus grandes, plus stables et sont plus efficaces pour remodeler la MEC, comparées aux podosomes^{124,125}.

1.2.3. La matrice extracellulaire

La MEC fournit un support structurel aux cellules ; sa composition et sa structure sont uniques pour chaque tissu. Elle influence de nombreux processus tels que la différenciation et la migration cellulaire^{126,127}. La MEC est produite, assemblée et modifiée par les cellules et, à son tour, elle modifie les fonctions et le comportement des cellules. Les molécules qui composent la matrice sont différentes en termes de structures et de fonctions, selon les tissus¹²⁸. Les composants majeurs de la MEC sont les collagènes, l'élastine, les glycoprotéines, avec la fibronectine et la laminine, et les protéoglycanes (GAG)¹²⁹.

1.2.3.1. Composants de la matrice extracellulaire

Le collagène est la protéine la plus abondante dans le corps et constitue la majeure partie de la MEC. Il existe 28 types de collagène, mais seuls les types I, II, III, V et XI sont arrangés en fibrilles pour fournir l'intégrité structurelle requise pour les tissus^{130,131}. Les fibrilles de collagène fournissent une résistance aux tissus conjonctifs, leur permettant de supporter différentes contraintes mécaniques telles que la tension, les forces de cisaillement et la pression. Le collagène de type I est la forme dominante trouvée dans presque tous les tissus. Le collagène est produit par des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules épithéliales¹³².

L'élastine est une protéine structurelle dont le rôle est étroitement lié au collagène¹³³. Elle permet à des tissus, tels que le derme de la peau, de récupérer leur forme après un étirement continu, en collaboration avec des glycoprotéines¹³⁴. Sa structure est composée de sous-unités de tropoélastine, liées par des microfibrilles de fibrilline pour former une fibre élastique.

La fibronectine est une glycoprotéine de la MEC qui joue un rôle clé dans l'adhérence cellulaire, la cicatrisation des tissus et lors de l'embryogenèse¹³⁵. Elle est présente dans la membrane basale et est produite par différents types de cellules comme les fibroblastes ou les myofibroblastes. La fibronectine est organisée en fibrilles et se lie aux intégrines¹³². Il existe deux formes de fibronectine, soit comme protéine plasmatique circulant dans le

sang, soit comme protéine cellulaire produite par les fibroblastes. L'intégrine $\alpha V\beta 1$ est le récepteur principal impliqué dans le processus d'assemblage de la matrice de fibronectine et favorise la liaison des cellules à la protéine¹³⁶. La formation de la matrice de fibronectine est dépendante de l'association du cytosquelette d'actine avec les intégrines¹³⁷.

Les laminines sont des glycoprotéines et des constituants majeurs de la membrane basale^{133,138}. Elles possèdent une structure trimérique, composée de trois chaînes différentes¹³⁹. Les laminines sont parmi les premières protéines de la MEC à être exprimée lors de l'embryogenèse et sont essentielles pour la différenciation¹⁴⁰.

Les protéoglycanes sont composés d'une protéine de base à laquelle sont attachées des chaînes latérales de glycosaminoglycanes (GAG). Les GAGs sont des macromolécules glucidiques, il en existe quatre groupes : l'acide hyaluronique, le kératane sulfate, la chondroïtine sulfate et l'héparine¹⁴¹. Les GAGs sont chargés négativement, ce qui confère aux protéoglycanes la capacité de séquestrer l'eau, et les cations permettent notamment de lubrifier la MEC¹⁴². Les protéoglycanes interagissent avec les facteurs de croissance et les récepteurs des facteurs de croissance, ils sont impliqués dans la signalisation cellulaire et dans des processus biologiques comme l'angiogenèse^{143,144}.

Il existe de nombreuses protéines associées à la MEC qui ne sont pas structurelles, mais qui sont néanmoins importantes dans le remodelage de celle-ci. La MEC est considérée comme un réservoir de facteurs de croissance impliqués dans divers processus tels que la cicatrisation des plaies et la différenciation des tissus. Certains composants de la MEC peuvent modifier les actions des facteurs de croissance dans les voies cellulaires¹³³, par exemple, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et le facteur de croissance transformant β (TGF- β)¹⁴⁴.

1.2.3.2. Structure de la matrice extracellulaire

Les différents composants de la MEC sont organisés dans une structure tridimensionnelle reconnaissable, qui peut être divisée en deux grands types : la membrane basale et la matrice interstitielle.

La membrane basale est la couche de la MEC sur laquelle reposent les cellules épithéliales et endothéliales¹³⁸. Elle agit comme un tampon de compression contre les forces exercées sur la MEC. Elle est composée principalement de collagène de type IV, qui s'associe en réseau de laminines et de fibronectines, ce dernier conférant une certaine résistance à la tension à la couche de tissu qui le recouvre¹⁴⁵. Cette partie de la MEC est plus dense et moins poreuse que la matrice interstitielle.

La matrice interstitielle se trouve en dessous de la membrane basale. Les principaux éléments qui forment cette matrice sont le collagène, l'élastine et la fibronectine, qui créent un « gel » dans lequel les cellules mésenchymateuses migrent¹⁴⁶. Le collagène de type I est le composant principal de cette matrice, dans ce cas il est sous forme fibrillaire¹⁴⁴.

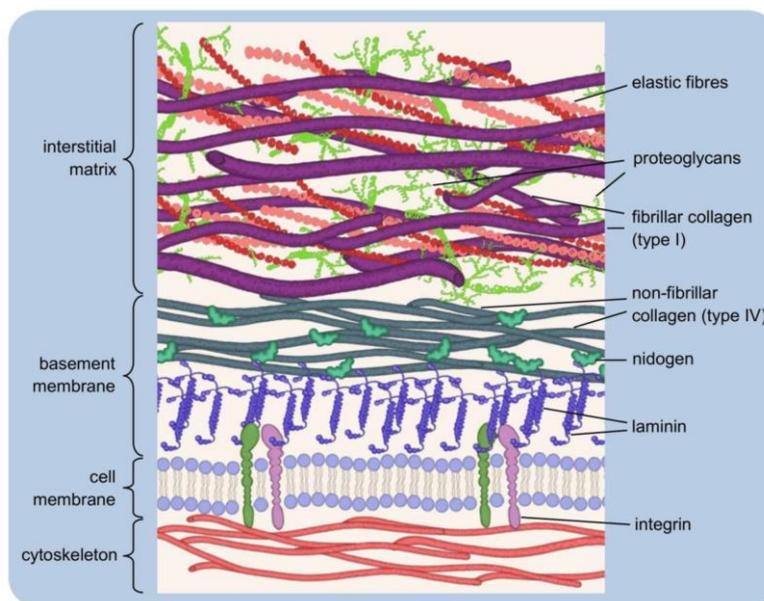


Figure 10 : Représentation simplifiée de l'organisation de la MEC avec la membrane basale composée de collagène type IV en réseau, et la matrice interstitielle composée de collagène de type I sous forme fibrillaire. (Burgstaller et al. 2010)

I.2.3.3. Remodelage de la matrice extracellulaire dans la migration cellulaire

Comme mentionné plus tôt, la MEC est une structure hautement dynamique, elle est constamment produite, remodelée ou dégradée. Cette dynamique est essentielle à la mise en place de l'architecture et à l'homéostasie du tissu. Le remodelage de la MEC peut s'effectuer grâce à la dégradation de ses composants, notamment en faisant appel à une grande famille d'enzymes : les metzincines. Cette famille comprend les métalloprotéinases de la matrice (MMP) et les ADAMs (une désintégrine et métalloprotéinase)^{147,148}.

Les MMPs sont produites sous forme de précurseurs et restent inactives jusqu'à leur activation. La plupart des 23 membres de la famille des MMPs sont sécrétés, mais il existe également des MMPs de type membranaire¹⁴⁹. L'activation des MMPs se produit principalement par clivage protéolytique (par des sérines protéases ou d'autres MMPs) ou par modification du groupe thiol par oxydation, comme les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) générés par les leucocytes¹⁴⁹. Les MMPs sont régulées à plusieurs niveaux : à la transcription en les maintenant dans un état quiescent, et par des inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMP) pour contrer les dégradations non justifiées de la matrice¹⁵⁰.

La famille des ADAMs comprend 12 membres. Les ADAMs peuvent cliver les ectodomains de protéines transmembranaires, libérant ainsi des cytokines, des facteurs de croissance, et des molécules d'adhérence retenues dans la MEC¹⁵¹. Les domaines désintégrines régulent les interactions cellules-matrice en se liant aux intégrines. ADAM10, ADAM12 et ADAM15 peuvent également cliver des protéines de la MEC telles que les collagènes¹⁵².

Les différents types de migration présentés plus tôt, sont influencés par la MEC qui est le microenvironnement cellulaire. Dans la migration individuelle et collective, la MEC joue un rôle crucial en fournissant des signaux mécaniques et chimiques aux cellules migrantes. Les intégrines et les récepteurs de la MEC permettent aux cellules de détecter les signaux environnementaux, et de répondre en conséquence¹⁴⁴. Contrairement à la migration mésenchymateuse, qui implique la dégradation de la matrice environnante, la migration amiboïde ne nécessite pas de remodelage important de la matrice²². De ce fait, ce type de

locomotion est plus rapide que la migration mésenchymateuse²³. Les cellules employant la migration mésenchymateuse dégradent la MEC à l'aide des MMPs et ADAMs, ce qui crée des chemins de migration et permet de franchir les obstacles, tels que la membrane basale. La dégradation de la MEC libère également de nombreuses protéines comme des facteurs de transcription et des chimiokines, qui sont captés par les cellules induisant et renforçant leurs polarisations^{18,33}. Cette polarisation donne une direction de migration qui est persistante avec la dégradation de la MEC⁴. Les différents types de migration dirigée, en fonction de la nature des facteurs environnementaux, seront abordés en détails dans le prochain chapitre.

1.3. La migration dirigée

Pour que la migration ait lieu, les cellules individuelles ou en groupes doivent être polarisées. Cette polarisation décide du sens de migration et est persistante par la distribution asymétrique des signaux externes présents dans l'environnement de l'organisme. Les cellules polarisées adoptent une morphologie asymétrique en envoyant des protrusions à l'avant dans le sens de migration. Cela permet la polarisation du cytosquelette de la cellule. Les cellules peuvent migrer vers plusieurs types de signaux externes comme les molécules solubles (chémotaxie), les molécules liées au substrat (haptotactisme), les courants électriques (galvanotaxie) et la rigidité du substrat (durotaxie).

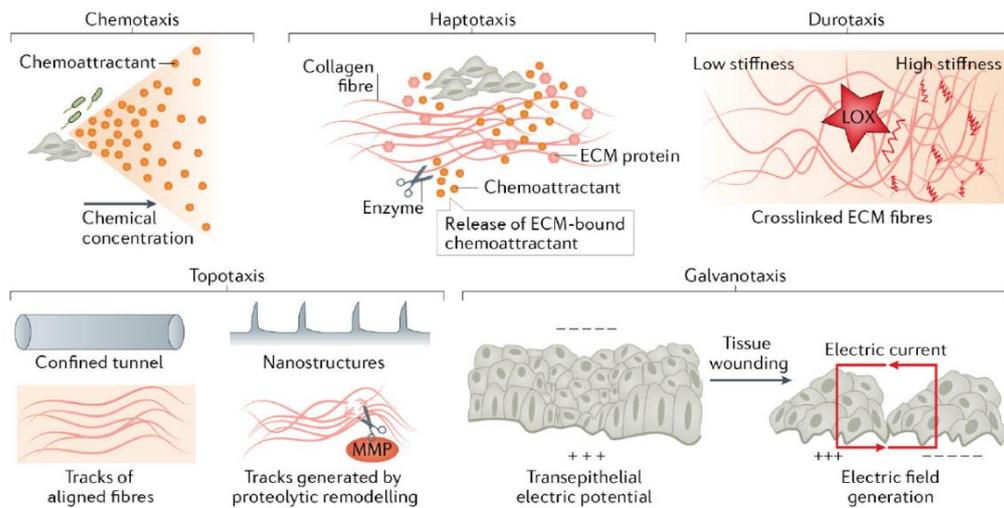


Figure 11 : Modes de migration dirigée des cellules en réponse à différents types de facteurs externes. Chimiotaxie (molécules solubles), Haptotactisme (molécules liées aux substrats), Galvanotaxie (champ électrique) et Durotaxie (rigidité du substrat). (SenGupta et al. 2021)

1.3.1. La chimiotaxie

Lorsque des signaux solubles sont répartis uniformément dans l'environnement, les cellules migrent de façon aléatoire, même si les facteurs présents augmentent parfois la vitesse de migration, c'est la chemokinésie¹⁵⁴. La chimiotaxie est décrite comme la migration vers des signaux solubles, tels que des facteurs de croissance, lorsque ceux-ci sont répartis sous forme de gradient. La chimiotaxie a longtemps été étudiée sur le modèle de l'amibe *Dictyostelium discoideum*¹⁵⁵. Cette « amibe sociale » peut s'organiser en structure multicellulaire suite à un manque de ressources dans l'environnement¹⁵⁶. Ce regroupement de cellules individuelles est sous le contrôle de la chimiotaxie. Les cellules sécrètent l'AMPc (Adénosate monophosphate cyclique) qui est un chimioattractant, ce qui entraîne une agrégation d'amibe et donc une plus grande production d'AMPc, qui sera

détectée plus loin par les cellules voisines¹⁵⁷. La locomotion de type amiboïde est aussi utilisée par les leucocytes, dans la réponse immunitaire, pour migrer vers le site de cicatrisation¹⁵⁸. Dans ces deux types de cellules, les facteurs chimiotactiques activent des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs)¹⁵⁹. Les cellules qui migrent de façon mésenchymateuse, comme les fibroblastes, sont aussi sensibles aux chimioattractants. Ces cellules expriment des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) spécifiques qui interagissent avec les facteurs de croissance, tels que l'EGF (Facteur de croissance épidermique), le FGF et le PDGF (platelet-derived growth factor)¹⁶⁰.

Les GPCRs et les RTK liés à leurs ligands, activent des voies de signalisation qui vont amplifier la régulation de l'actine et de la myosine. Ces récepteurs activent la voie de signalisation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). La PI3K produit le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3) qui active Ras et RAC, permettant la polymérisation de l'actine, vers le côté où se trouve la plus haute concentration du chimioattractant. De l'autre côté, il y a une augmentation de l'activité contractile par la myosine II^{161,162}. Tout cela permet la polarisation de la cellule et, donc, de définir son sens de migration¹⁶³.

En général, les cellules peuvent répondre à de très faibles gradients chimiotactiques, avec une différence de l'ordre de 10 % dans la concentration des chimioattractants entre l'avant et l'arrière de la cellule¹⁶³. Les cellules amplifient ce gradient avec un gradient intracellulaire afin de générer une polarisation de la cellule. Le gradient intracellulaire est contrôlé par le PIP3 qui est très polarisé dans la cellule. Il a été étudié dans *Dictyostelium discoideum* que PI3K produit du PIP3 à l'avant de la cellule permettant la formation de protrusions et que PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) s'accumule à l'arrière de l'amibe pour dégrader le PIP3, amplifiant ainsi la chimiotaxie de la cellule¹⁶⁴.

1.3.2. L'haptotactisme

L'haptotactisme est la capacité des cellules à détecter les signaux chimiques liés à un substrat. Les signaux haptotactiques sont fournis par les composants de la MEC, tels que

la fibronectine, la laminine et les collagènes¹⁶⁵. Contrairement aux signaux chimiotactiques diffusibles, les signaux haptotactiques de la MEC ont tendance à être relativement stables et durables¹⁶⁶. Ces signaux sont détectés par des récepteurs spécifiques à la surface de la cellule, en particulier les intégrines¹⁶⁷. La transmission des signaux haptotactiques et chimiotactiques est similaire, impliquant des voies de signalisation traditionnelles des GTPases de la famille Rho. Les intégrines liées à la fibronectine activent FAK et Src, qui déclenchent la formation de nouveaux complexes protéiques et l'activation de Rac, conduisant à la formation de nouveaux lamellipodes¹⁰². Ces protrusions rencontrent davantage de fibronectines de la MEC, auxquelles les intégrines se lient. Cela établit une boucle de rétroaction positive, qui est essentielle pour l'haptotactisme des fibroblastes sur les gradients de fibronectine¹⁶⁸. Pour la migration haptotactique sur des gradients de chimiokines liées au substrat, les voies de signalisation activées par les GPCR sont les mêmes que celles activées par chimiotaxie¹⁶⁹.

1.3.3. La galvanotaxie

La galvanotaxie est la migration dirigée en réponse à un gradient/champ électrique. Les tissus peuvent présenter des différences de potentiel électrique endogène de par les ions et les particules chargées présents dans le milieu extracellulaire. Par exemple, le potentiel électrique transépithélial est généré par les pompes actives N⁺/K⁺ et les canaux Cl⁻¹⁷⁰. Ces champs électriques sont impliqués dans des processus tels que la régénération des tissus¹⁷¹. Le mécanisme principal de la galvanotaxie est la redistribution des protéines chargées de la membrane, telles que les intégrines, EGFR et VEGFR¹⁷². La galvanotaxie utilise des voies similaires à la chimiotaxie et à l'haptotactisme ; cette redistribution selon le champ électrique, provoque une polarisation et une activation des molécules impliquées dans la formation de protrusions membranaires¹⁷³.

1.3.4. La durotaxie

Les cellules sont capables de sentir les propriétés mécaniques de leur environnement, comme le confinement, l'adhérence, la topologie (topotactisme) et la rigidité du substrat

sur lequel elles reposent¹⁷⁴. La capacité des cellules à migrer le long d'un gradient de rigidité est appelée durotaxie. Les fibroblastes ont été les premières cellules observées à migrer le long d'un gradient mou-dur¹⁷⁵ et, depuis, la durotaxie a été observée sur d'autres types de cellules comme les cellules immunitaires¹⁷⁶, cellules des muscles lisses¹⁷⁷ et cellules cancéreuses¹⁷⁸. La majorité des études faites sur la durotaxie ont été réalisées sur des substrats en 2D, le plus souvent des gels de polyacrylamide qui permettent de moduler facilement la rigidité du substrat. Récemment, il a été mis en évidence que des gradients de rigidité pouvaient être retrouvés *in vivo* lors de l'embryogenèse chez le xénope¹⁷⁹ et la souris¹⁸⁰. La génération d'un gradient de rigidité *in vivo* peut apparaître suite à des changements dans la composition de la MEC, par exemple, les enzymes lysyl oxydase (LOXL1-4) peuvent interagir avec le collagène pour rendre la matrice plus rigide¹⁸¹, et les MMP peuvent dégrader la matrice pour la rendre moins rigide¹⁸².

Les forces générées par les fibres de stress sont un mécanisme important pour la durotaxie. Comme vu précédemment, les fibres de stress sont ancrées à la MEC via les AFs, ce qui leur permet d'appliquer des forces et de sonder la rigidité du substrat¹⁸³. Les protrusions qui s'étalent sur des substrats durs, permettent aux petites adhérences de se développer en AFs, alors que, sur un substrat mou, elles restent à l'état d'adhérences naissantes et se désassemblent. Les AFs matures s'ancrent mieux à la matrice et donc transmettent plus de force du côté de la partie dure du gradient^{52,108}. La réorganisation du cytosquelette d'actine s'oriente dans la direction de la traction la plus forte par un rétrocontrôle positif. Le complexe Arp2/3 favorise la polymérisation de l'actine à l'avant, ce qui conduit à la formation du lamellipode au niveau de la partie dure du gradient. L'activité de la myosine est aussi régulée lors de la durotaxie. Sur la partie rigide, la myosine IIA est déphosphorylée et relocalisée au niveau des fibres de stress, alors que la myosine IIB se retrouve à l'arrière de la cellule pour permettre la contraction du corps cellulaire¹⁷⁹.

Outre les intégrines, des protéines mécanosensibles, comme le canal ionique Piezo1, peuvent également médier la réponse durotactique. Les régulateurs du cytosquelette d'actine sont indispensables pour la durotaxie, par exemple, la polymérisation de l'actine est renforcée au niveau des AFs par les membres de la famille Ena/VASP, ce qui favorise la mécanotransduction (cf chapitre mécanotransduction).

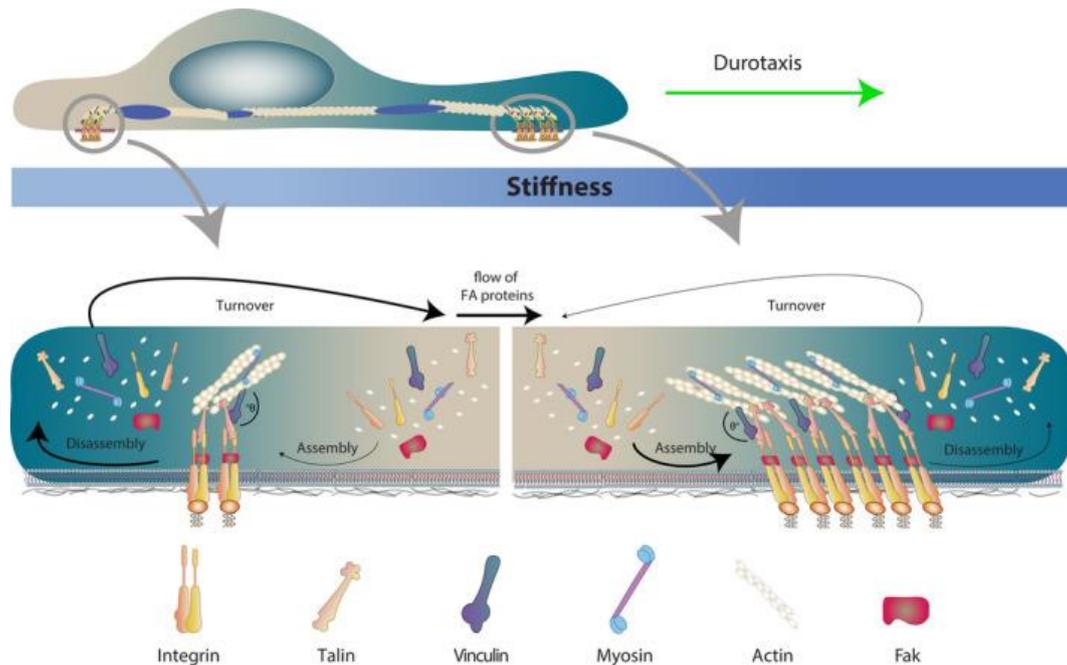


Figure 12 : Schéma du mécanisme de la durotaxie. À l'avant, avec une rigidité plus élevée, il y a un recrutement plus élevé de protéines des AFs, un taux d'assemblage plus élevé et donc des AFs plus grandes. A l'arrière de la cellule, le substrat plus mou induit un faible recrutement des protéines des AFs, avec une fréquence accrue de désassemblage de FA. Ainsi, les FA matures se forment principalement à l'avant pour favoriser l'extension de la protrusion, et établir la direction de migration vers les régions plus rigides du substrat. (Espina et al. 2022)

II. Mécanotransduction

La mécanotransduction est le processus cellulaire qui permet de transformer des signaux mécaniques en signaux biochimiques. Cela permet aux cellules de répondre aux stimuli mécaniques de leur micro-environnement, et d'y répondre par des changements phénotypiques. La mécanotransduction est essentielle pour le développement et le maintien des tissus par exemple dans des tissus avec de fortes contraintes mécaniques, comme le muscle, les vaisseaux sanguins et l'os. Certaines maladies sont associées à une mécanotransduction défectueuse, par exemple dans l'os, les ostéoblastes, peuvent provoquer de l'ostéoporose¹⁸⁵. De nombreux acteurs, qui seront abordés dans ce chapitre, sont impliqués dans ce processus à commencer par celui qui transmet les signaux mécaniques : la MEC.

II.1. La matrice extracellulaire dans la mécanotransduction

II.1.1. Les propriétés mécaniques de la MEC

Comme mentionné plus haut, la MEC joue un rôle fondamental dans la structure et la fonction des différents tissus. Selon la concentration des différents composants de la MEC, les propriétés mécaniques de celle-ci changent¹³². Les fibres élastiques, comme l'élastine et la fibrilline, permettent de rendre la MEC plus souple et déformable¹⁸⁶. Le collagène a une tendance à rendre la MEC plus rigide¹⁸⁷. Le module de Young est utilisé pour mesurer l'élasticité de la MEC, et il est mesuré en Pascal (Pa). Plus la valeur du module de Young est élevée, plus la matrice est rigide, car il faut plus de force pour la déformer.

II.1.2. L'influence de la rigidité sur les cellules

Les propriétés mécaniques de la MEC, par la mécanotransduction, dirigent le comportement des cellules ce qui leur permet de s'adapter à leur micro-environnement. Les propriétés du substrat sur lequel reposent les cellules peuvent réguler de nombreux processus cellulaires, tels que la différenciation¹⁸⁸, la prolifération¹⁸⁹ et la migration¹⁹⁰.

Les cellules testent la rigidité du substrat en appliquant des forces dessus, et cela est notamment connu pour influencer la différenciation des cellules-souches mésenchymateuses. Dans un environnement très rigide, ces cellules prennent des caractéristiques d'ostéoblastes (os \approx 1 - 3 GPa), alors que dans un environnement mou elles prennent les particularités des neurones (cerveau \approx 0,1 - 0,4 kPa)¹⁸⁸.

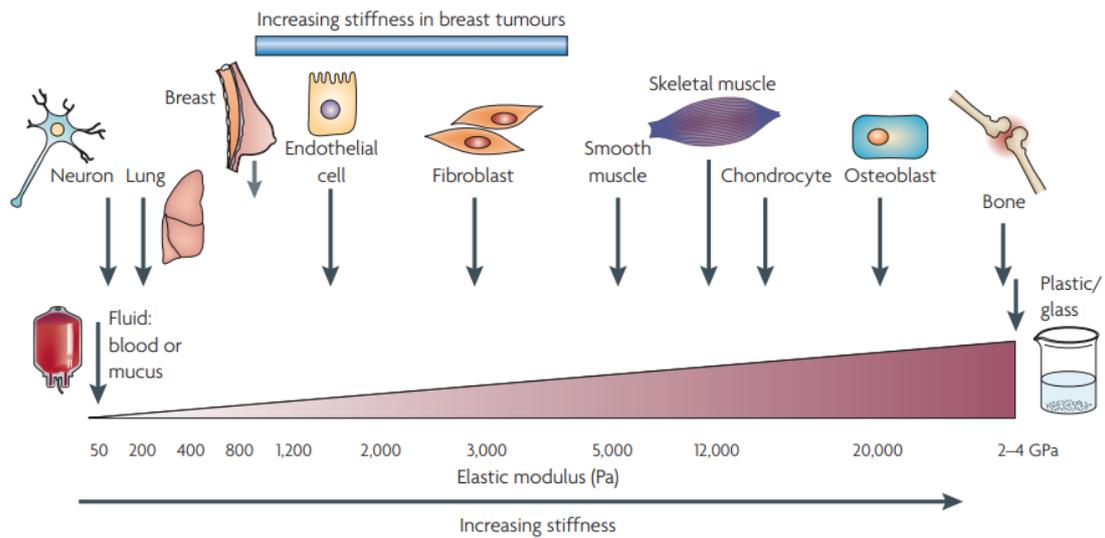


Figure 13 : La rigidité des différents tissus humains. Les propriétés biomécaniques varient selon les tissus. Le tissu le plus mou retrouvé chez l'homme est le cerveau et le tissu le plus dur est l'os. Les tissus mous, comme le cerveau et le sein, se densifient et deviennent plus rigides avec la progression tumorale. (Butcher et al. 2009)

De manière générale, les cellules sur un substrat plus dur ont tendance à plus s'étaler, à former plus d'adhérences cellule-matrice matures et à exercer plus de forces de traction¹⁹². On a pu voir plus tôt que la rigidité du substrat peut influencer la direction de migration, le plus souvent vers le côté le plus dur (durotaxie). Des études ont mis en évidence que les cellules peuvent avoir une rigidité préférentielle vers laquelle elles tendent à migrer^{192,193}. Ce substrat avec une rigidité optimale permet à la cellule de générer le maximum de forces

de traction. Cela met en jeu les différents éléments qui composent le modèle d’embrayage moléculaire (molecular clutch), qui sera décrit dans le chapitre suivant¹⁹³. La composition des AFs en intégrines et leur maturation, les protéines d’échafaudage des AFs et les connexions au flux rétrograde d’actine sont des éléments qui permettent la mise en place de cette rigidité préférentielle¹⁹⁴. Lorsque ces éléments sont modifiés, la rigidité optimale des cellules peut être elle aussi changée¹⁹⁵. Par exemple, une étude récente a mis en évidence une migration dirigée vers le côté mou d’un gradient de rigidité, en modifiant la rigidité préférentielle des cellules par la régulation de la taline¹⁹⁶.

La vitesse de migration est aussi régulée par les propriétés mécaniques de la MEC. La vitesse de migration augmente avec la rigidité du substrat jusqu’à atteindre un plateau qui correspond à la rigidité préférentielle du type cellulaire¹⁹⁶. Si la rigidité continue d’augmenter, dépassant le plateau, alors la vitesse de migration diminue. L’impact de la MEC sur la vitesse de migration cellulaire est important dans certains cas de cancer, car le développement de la tumeur s’accompagne d’un durcissement du microenvironnement tumorale¹⁹⁷.

II.2. Les structures mécanosensibles

Avant de pouvoir transformer un signal physique, il faut pouvoir le détecter. De nombreuses structures dites mécanosensibles sont impliquées dans la transmission des forces afin de sonder la rigidité de l’environnement. Nous verrons dans cette partie les principaux acteurs impliqués dans cette mécanosensation.

II.2.1. Les AFs dans la mécanosensation

Les AFs sont les structures qui font le lien mécanique entre la cellule et le microenvironnement, en établissant une connexion entre le cytosquelette et la MEC. Ce sont des structures mécanosensibles dont le développement et le désassemblage sont régulés par les forces mécaniques. Comme vu précédemment, les intégrines peuvent être activées lors de la liaison avec les protéines de la MEC, permettant le recrutement et le regroupement d’autres intégrines, ce qui génère la formation des AFs : il s’agit de la

signalisation « outside-in »⁹⁷. Le lien physique entre le substrat, via les intégrines, et le cytosquelette d'actine, via les protéines qui composent les AFs, a pour effet de ralentir le flux rétrograde d'actine. L'actine peut, en conséquence, pousser sur la membrane de façon plus efficace et les forces sont transférées au substrat par le biais des AFs : ce modèle est l'embrayage moléculaire (molecular clutch).

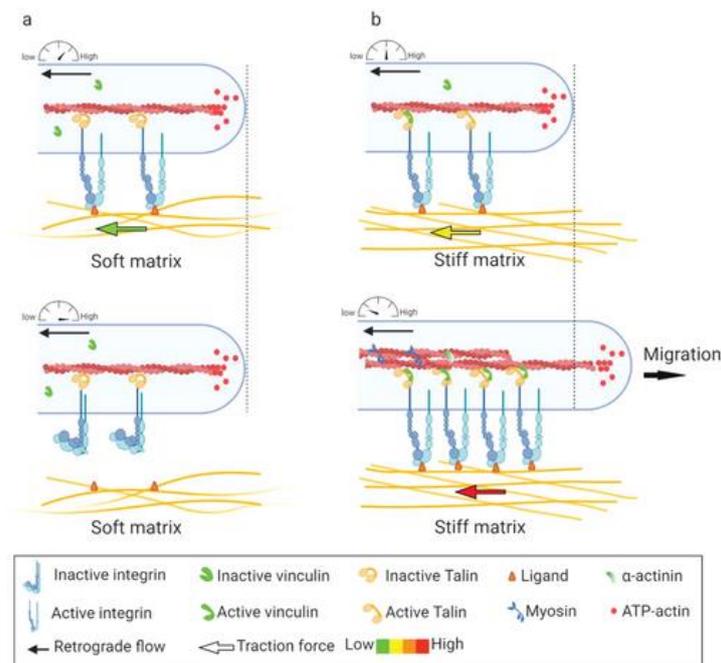


Figure 14 : Représentation de la transmission des forces par l'embrayage moléculaire selon la rigidité du substrat. (a) Sur un substrat mou, les forces de traction ne sont pas suffisantes pour déplier la taline, ce qui empêche le recrutement de la vinculine conduisant à une rupture du lien entre l'intégrine et son ligand de la MEC. (b) À l'inverse, sur un substrat dur, les forces de traction permettent le dépliement de la taline et le recrutement de la vinculine, renforçant l'embrayage moléculaire et permettant la transmission des forces à la cellule. (Xie et al. 2023)

La taline et la vinculine sont des protéines essentielles dans la transmission des forces, car elles permettent de faire la liaison entre les intégrines et le cytosquelette d'actine¹⁰¹. La taline est particulièrement impliquée dans ce modèle d'embrayage moléculaire. C'est une protéine mécanosensible et sa conformation change lorsque les forces exercées dépassent un certain seuil. Ce changement de conformation expose de nouveaux domaines de liaison pour la vinculine qui renforce l'embrayage moléculaire en établissant de nouvelles connexions avec le cytosquelette d'actine¹⁹⁹.

II.2.2. Le cytosquelette d'actine dans la mécanotransduction

La régulation des forces de traction au niveau des structures d'adhérence permet à la cellule de s'adapter à la rigidité du substrat sur lequel elle repose. Les cellules vont détecter la rigidité du substrat ce qui va activer des voies de signalisation afin de réguler le cytosquelette d'actine. Le cytosquelette d'actine permet de générer des forces avec les fibres de stress et de transmettre les forces au noyau via le complexe LINC.

II.2.2.1. Régulateur mécanosensible du cytosquelette d'actine

L'actine se polymérise en fibres de stress ce qui permet d'appliquer des forces sur le substrat. L'assemblage de ces fibres de stress est sous le contrôle des voies de signalisation de la GTPase RhoA⁵⁸. La voie de signalisation RhoA est activée lorsque les tensions mécaniques de la membrane plasmique augmentent, favorisant ainsi la polymérisation de l'actine par les protéines effectrices de RhoA, qui peuvent être des protéines de liaisons de l'actine²⁰⁰. Par exemple, lorsque les forces de tension augmentent, la formine favorise l'élongation du filament d'actine par l'extrémité barbue (+). Avec l'augmentation des forces, RhoA active une autre protéine effectrice, ROCK. ROCK réduit l'affinité de la cofiline avec l'actine, empêchant la dépolymérisation du filament d'actine²⁰¹. Dans le même temps, ROCK phosphoryle la chaîne légère de la myosine, ce qui augmente les forces de contraction dans la cellule par le réseau d'actomyosine²⁰².

La formation du réseau d'actine pour former le lamellipode est médiée par Arp2/3 par hydrolyse de l'ATP. Il a été récemment proposé que Arp2/3, liée à l'ATP, est plus sensible

aux forces que Arp2/3, lié à l'ADP. Cela pourrait expliquer la localisation de Arp2/3 lié à l'ATP, au niveau du front d'invasion, près de la membrane, pour permettre la formation de nouveaux réseaux ramifiés d'actine, en réponse à la tension mécanique de la membrane plasmique²⁰³.

Les protéines à domaine LIM (LIN-11, Isl-1 et MEC-3) FHL, paxilline et zyxine sont des protéines de liaison à l'actine et agissent comme des biosenseurs. Le recrutement des protéines LIM est médié par la contraction de la myosine II en réponse à des forces de tension²⁰⁴. Ces protéines peuvent être recrutées dans le noyau et agir comme coactivateurs de la transcription génique, contribuant ainsi à la mécanotransduction en tant qu'intermédiaire entre le cytosquelette et le noyau. Par exemple, la protéine FHL2 reste attachée aux filaments d'actine tendus et, en l'absence de tension, se déplace vers le noyau pour réguler la transcription génique²⁰⁵.

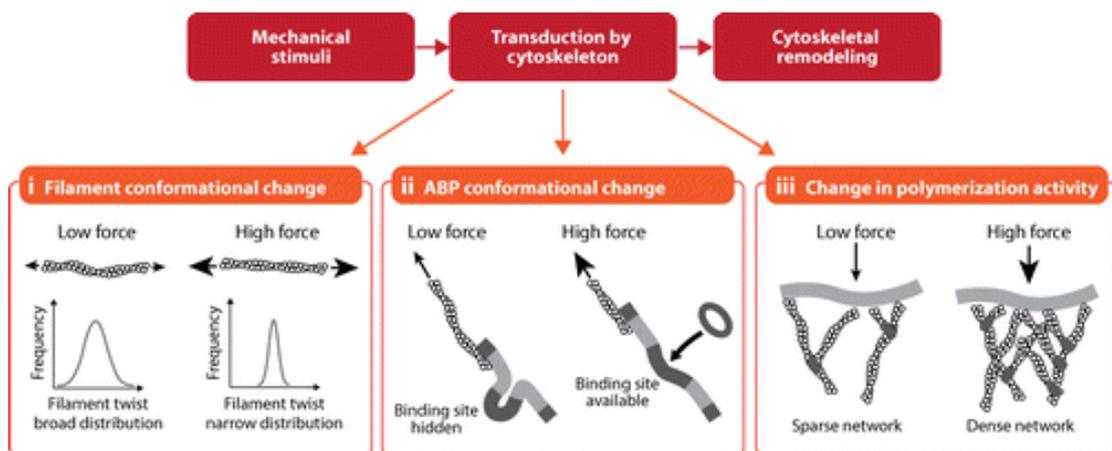


Figure 15 : Schéma de l'effet des forces mécaniques sur le cytosquelette d'actine. (i) les filaments d'actine peuvent changer d'état conformationnel. (ii) Les protéines de liaison à l'actine peuvent être dépliées par des forces et exposer des sites de liaison pour d'autres protéines. (iii) La polymérisation du réseau d'actine peut être influencée par les charges mécaniques. (Harris et al. 2016)

II.2.2.2. La transmission des forces par le cytosquelette d'actine

L'actine et son organisation en différents types de réseaux sont influencées par les forces mécaniques. Ces différentes structures sont associées à des charges mécaniques spécifiques pour la cellule. Lorsque les forces de tension augmentent au niveau de la membrane plasmique, le réseau ramifié d'actine se densifie afin de permettre la formation de protrusions. Il a été observé que les charges mécaniques peuvent modifier la conformation du filament d'actine, ce qui le décrit comme une structure mécanosensible²⁰⁷. La force de traction augmente la longueur de pas des filaments d'actine orientés parallèlement à la direction de la force, ce qui réduit l'affinité de la cofiline et augmente l'affinité de la myosine II aux filaments d'actine. Ainsi, le changement induit par la force de traction stabilise les filaments d'actine et facilite l'assemblage des fibres de stress, qui sont composées d'actine et de myosine II²⁰². Ce mécanisme est censé aider les cellules à contrer les forces de traction externes, en augmentant les forces de contractions du corps cellulaire avec l'augmentation de la rigidité du substrat. En revanche, lorsque les filaments d'actine sont détendus, la longueur de pas est réduite, ce qui favorise la liaison de la cofiline et conduit au désassemblage des filaments d'actine²⁰¹.

Les tensions mécaniques peuvent donc altérer la dynamique des filaments d'actine ce qui joue un rôle dans la régulation de l'expression génique. Lorsque les cellules adhèrent à un substrat rigide, ou sont soumises à une force de tension, les fibres de stress d'actine sont formées et transmettent ces forces. Cela entraîne la translocation nucléaire et l'activation du coactivateur de transcription YAP, un facteur central de la voie de signalisation Hippo, qui seront détaillées dans la suite de ce chapitre. Ainsi, le remodelage du cytosquelette d'actine par le stress mécanique peut moduler l'expression génique en transmettant des forces ; cela joue un rôle crucial dans la prolifération cellulaire, la différenciation, et la migration²⁰⁶.

II.2.3. Le noyau dans la mécanotransduction

Au cours des dernières années, la mécanotransduction nucléaire a été étudiée. Le noyau est le plus gros et le plus rigide organelle de la cellule, et il est mécanosensible. Les forces extracellulaires exercées sur le noyau régulent la composition de l'enveloppe nucléaire. La connexion cytosquelette d'actine/noyau par le complexe LINC permet au noyau de répondre aux différentes forces exercées en régulant sa morphologie et l'organisation de la chromatine. Ces mécanismes permettent l'adaptation des cellules à leur environnement mécanique en augmentant la rigidité du noyau en réponse à l'augmentation de la rigidité du substrat.

II.2.3.1. Le complexe LINC connecte le nucléoplasme et le cytosquelette

Organisation du complexe LINC

Le noyau cellulaire est entouré par l'enveloppe nucléaire (NE), qui sépare le nucléoplasme du cytoplasme. La NE se compose de deux membranes : la membrane nucléaire externe (ONM) faisant face au cytoplasme, et la membrane nucléaire interne (INM) faisant face au nucléoplasme. Le complexe LINC (linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton) relie l'ONM et l'INM²⁰⁸. Ce complexe est formé par deux types de protéines transmembranaires : les protéines KASH (Klarsicht, ANC-1, Syne homology), contenant un domaine à l'ONM, et les protéines SUN (Sad1 and UNC-84), contenant un domaine SUN. Les protéines KASH interagissent avec le cytosquelette, tandis que les protéines SUN interagissent avec la lamina nucléaire²⁰⁹. Chez les mammifères, les protéines KASH sont les nesprines. Il existe plusieurs isoformes de la nesprine qui interagissent de manière spécifique avec les différents éléments du cytosquelette. L'actine interagit directement avec les nesprines 1 et 2, les filaments intermédiaires avec la nesprines 3 et les microtubules avec la nesprine 4²¹⁰. Les nesprines se lient aux protéines SUN qui sont-elles mêmes liées à la lamina nucléaire. Ce sont les nesprines qui sont sujettes aux tensions mécaniques et qui transmettent les forces de tension au noyau.

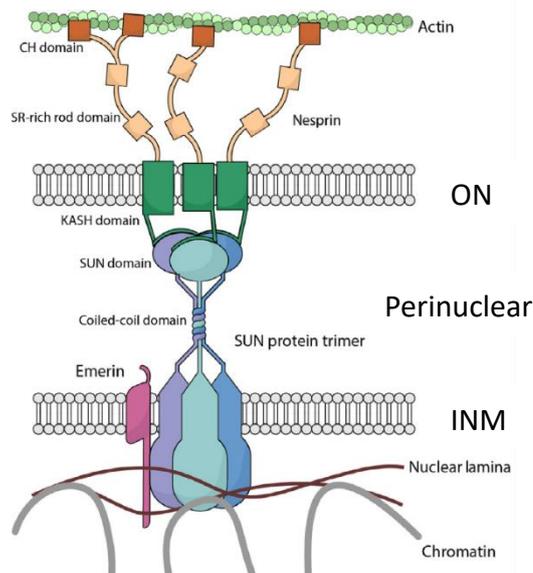


Figure 16 : Représentation du complexe LINC. Le complexe LINC est situé dans l'espace péri-nucléaire dans l'enveloppe nucléaire. Il fait la connexion entre le cytosquelette et le réseau de lamine, ce qui permet la transmission des forces au noyau. Adapté de Li et al. 2018

Implication du complexe LINC dans la mécanotransduction

Le complexe LINC fait le lien entre le cytosquelette et la lamina nucléaire. Le cytosquelette d'actine, et particulièrement l'actine périnucléaire, est un des principaux cytosquelettes impliqués dans la mécanotransduction. L'actine périnucléaire est constituée de filaments contractiles, qui s'orientent dans le sens de migration et s'étendent de l'arrière de la cellule vers le bord avant, en passant sur la partie dorsale du noyau. Sa fonction principale est de réguler la déformation du noyau sous le stress mécanique, en interagissant directement avec les nesprines du complexe LINC²¹². Ces fibres permettent aussi la connexion entre l'enveloppe nucléaire et les AFs. La régulation de l'actine périnucléaire est contrôlée par STEF, un facteur d'échange de GTP (GEF) pour Rac1, qui est colocalisé avec la nesprine 2, et la myosine IIB, ce qui permet la stabilisation de l'actine périnucléaire²¹³.

De récentes études ont mis en évidence que la nesprine 2 est une protéine mécanosensible, qui peut transférer les forces mécaniques produites par la myosine II au noyau, via le complexe LINC²¹⁴. La défaillance du complexe LINC empêche la transmission des forces au noyau et donc la régulation génique²¹⁵. Comme exemple, lorsque SUN2 est déplété cela entraîne une activation de la voie de signalisation MAPK/AKT, qui, activée par les forces mécaniques, engendre une hypertrophie dans des cas de cardiomyopathie chez la souris²¹⁵.

Le complexe LINC est le régulateur principal dans la mécanotransduction, mais la transmission des forces au noyau peut aussi s'effectuer sans ce complexe. Par exemple, quand des forces mécaniques sont appliquées sur la nesprine 1 dans un noyau isolé, cela induit une augmentation de la rigidité du noyau par la lamina nucléaire²¹⁶.

Le complexe LINC est crucial pour la réorganisation du cytosquelette, le positionnement du noyau et la migration cellulaire en réponse à une stimulation mécanique. La perturbation de ce complexe affecte la polarisation cellulaire lors de la cicatrisation des tissus en perturbant le positionnement du noyau et la formation de l'axe de polarité noyau/centrosome. La nesprine 1/2 et SUN1/2 créent un lien physique entre le noyau et le centrosome lors de la migration neuronale²¹⁷. La nesprine 2 est impliquée dans l'établissement de l'organisation du cytosquelette périnucléaire et son inhibition affecte la vitesse de migration des fibroblastes d'embryons de souris²¹⁸. Le complexe LINC agit sur la force de traction des adhérences. En effet, lorsque la nesprine 1 est déplétée, cela conduit à une augmentation à la fois du nombre d'AFs et de la traction cellulaire, ce qui entraîne finalement une diminution de la vitesse de migration²¹⁹. La déplétion de la nesprine 1 augmente également la largeur du noyau et sa déformation lors de contraintes du cycle cellulaire²²⁰.

Le complexe LINC régule également des gènes mécanosensibles à l'échelle du génome après une stimulation mécanique, SUN1L affectant différents niveaux d'ARNm du cytosquelette et des AFs, selon la rigidité du substrat sur lequel les cellules sont cultivées²²¹.

II.2.3.2. La lamina nucléaire

Le cortex principal de l'enveloppe nucléaire est la lamina nucléaire. La lamina nucléaire est un maillage fibrillaire dense, situé du côté nucléoplasmique de la INM de l'enveloppe nucléaire. Ce réseau est composé de différents types de lamine : lamine A, lamine B et lamine C. Ce maillage intranucléaire de lamine possède des capacités élastiques, ce qui lui permet d'absorber des chocs et de maintenir l'intégrité structurelle du noyau lorsque la cellule est sous des charges de tension, et ainsi de protéger le matériel génomique²²².

Les lamines peuvent être classées en deux sous-groupes : les lamines de type A avec la lamine A et C et les lamines de type C avec la lamine B. Les lamines de type A semblent avoir un rôle plus important dans la mécanotransduction, car, lorsqu'elles sont déplétées, l'expression des gènes mécanosensibles et la déformation du noyau sous des contraintes mécaniques sont altérées, alors que la déplétion de lamines de type B ne produit pas ces effets²²³.

L'expression des lamines A/C augmente avec la rigidité du substrat, permettant la différenciation cellulaire selon le substrat sur lequel repose les cellules, comme la différenciation ostéogénique sur un substrat rigide²²⁴. Le renouvellement des lamines A/C semble être régulé par la rigidité du substrat : sur un substrat mou, le renouvellement des lamines A/C par leur phosphorylation augmente, ce qui induit le désassemblage de la lamina nucléaire²²⁵.

La lamina est essentielle pour maintenir et localiser l'hétérochromatine à l'enveloppe nucléaire. Les lamines peuvent se lier à l'ADN via des protéines comme l'emerine et Lap2 β . Ce sont les lamines A/C et le récepteur de lamine B (LBR) qui ancrent l'hétérochromatine à la NE. Si les lamines A/C et LBR sont déplétées, l'hétérochromatine est relocalisée loin de la membrane nucléaire et la transcription des gènes est affectée²²⁶. L'emerine et Lap2 β sont des protéines associées aux lamines dans la INM qui recrutent l'histone désacétylase 3 (HDAC3) à la membrane nucléaire pour maintenir l'hétérochromatine²²⁷. Lorsque les tensions mécaniques augmentent, les forces transmises par le complexe LINC et les

lamines peuvent modifier la conformation de la chromatine pour passer de l'hétérochromatine à l'euchromatine, et donc permettre la transcription de gènes cibles^{228,229}.

II.2.4. Mécanotransduction : les forces transformées en signaux biochimiques

Les stimuli mécaniques peuvent avoir un impact significatif sur les cellules, entraînant des changements intracellulaires étroitement liés à l'expression des gènes et à la régulation du cytosquelette. Ces changements se produisent par l'impact mécanique sur le noyau et commencent le plus souvent par la régulation, l'expression et la translocation des facteurs de transcription. Le microenvironnement joue un rôle dans la différenciation et la migration de la cellule en influençant des voies de signalisation spécifiques en aval.

II.2.4.1. Voie de signalisation par les intégrines

La signalisation de l'intégrine joue un rôle crucial dans la survie, la prolifération et la migration des cellules adhérentes. Elle implique plusieurs voies entrelacées, régulées par l'activation de l'intégrine. Les deux éléments clés de la signalisation des intégrines sont le récepteur de type tyrosine-phosphatase α (RPTP- α) et FAK.

Le RPTP- α active les kinases de la famille Src (SFks) par déphosphorylation lors d'une activation mécanique²³⁰. Les SFks phosphorylent et activent ensuite les Rho GEFs, conduisant à l'activation des GTPases Rho, Rac1 et Cdc42²³¹. Ces GTPases régulent l'activation de la formine et Arp2/3, permettant la formation du lamellipode indispensable pour la migration dirigée comme la durotaxie⁶².

FAK agit comme un mécanosenseur et son activation augmente avec la rigidité du substrat²³². Lorsque les intégrines sont activées, FAK subit une phosphorylation, levant son état auto-inhibé, et est recrutée à la membrane plasmique. Il a été observé que lorsque la rigidité du substrat est faible, cela inhibe l'activation de l'intégrine β 1 et par la même occasion inhibe la phosphorylation de FAK sur la tyrosine (Y) 397. Lorsque la rigidité augmente, cela est corrélé avec une augmentation de la phosphorylation de FAK sur Y397²³³.

FAK activée et Src, peuvent activer et recruter des protéines pour le renouvellement des intégrines, comme la paxiline et des composants de la signalisation Rho²³⁴. L'activation de FAK et Rho par la rigidité du substrat régule d'autres voies comme celle des MAPK (Mitogen-activated protein kinase) et Pi3K/AKT, qui régulent la survie, la prolifération et la migration cellulaire. La rigidité du substrat et le regroupement des intégrines peuvent influencer l'activité de ces voies de signalisation. Comme exemple, l'augmentation du regroupement des intégrines observées avec la rigidification du substrat conduit à une augmentation de la signalisation MAPK avec Ras/ERK qui entraîne une augmentation de la contractilité générée par Rho¹⁹⁷. Il a également été démontré que la signalisation PI3K/AKT était renforcée avec la rigidité de la matrice au niveau des AFs²³⁵. Les différentes voies FAK/SRC/Pi3k peuvent aussi activer YAP/TAZ²³⁶.

II.2.4.2. La voie de signalisation Hippo et YAP/TAZ

YAP (Yes-associated protein) est un régulateur transcriptionnel mécanosensible de la voie Hippo qui agit comme un mécanotransducteur (Figure 16). Avec le coactivateur transcriptionnel TAZ, YAP détecte et répond aux signaux mécaniques, ce qui régule la transcription des gènes²³⁷. La localisation de YAP/TAZ dans le noyau ou le cytoplasme constitue son principal mécanisme de régulation. Sur des rigidités souples, une réduction du nombre d'adhésions et une moindre contractilité désactivent la voie YAP/TAZ, et YAP se localise davantage dans le cytoplasme. En revanche, sur des rigidités rigides, une augmentation de la contractilité dépendante de l'actomyosine, ainsi que des signaux chimiques, activent YAP, qui est alors transporté dans le noyau où elle peut se lier au facteur de transcription TEAD²³⁸.

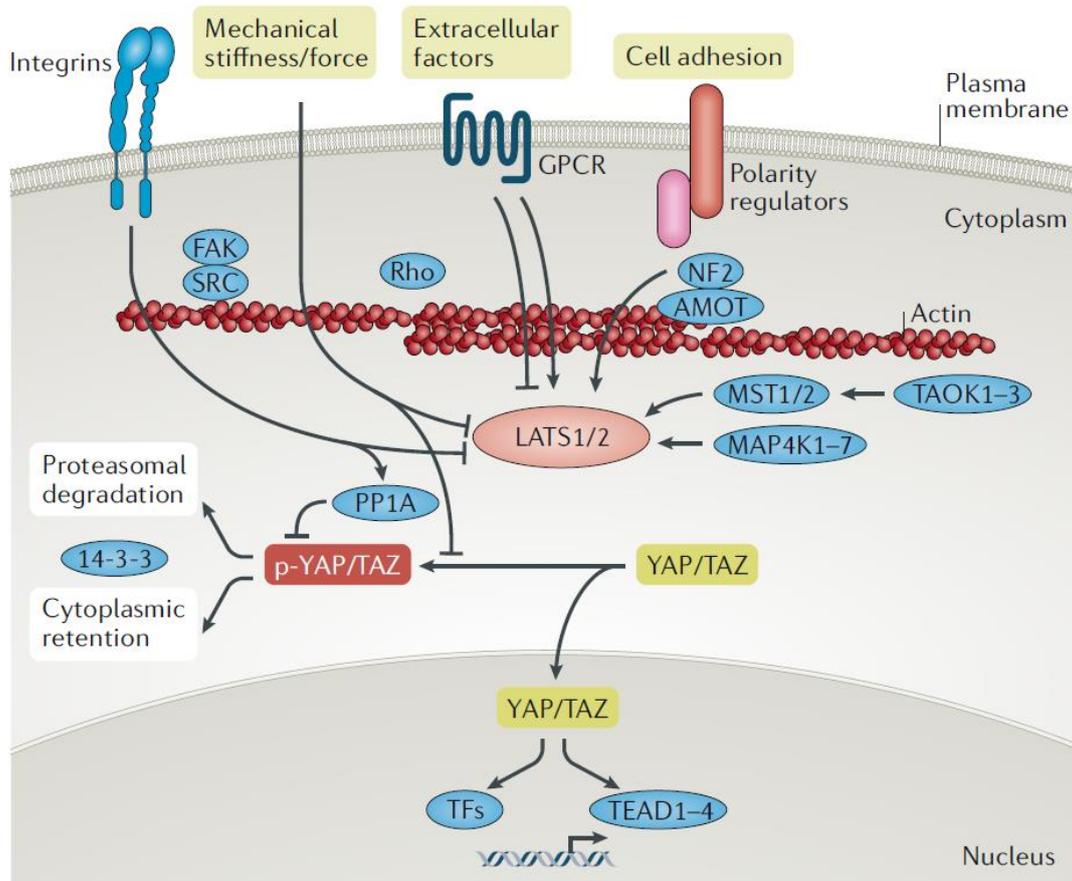


Figure 17 : Représentation de la voie Hippo. L'activité de YAP et TAZ est régulée par les kinases LATS1 et LATS2, qui phosphorylent YAP/TAZ. YAP/TAZ phosphorylés (p-YAP/TAZ) s'associent aux protéines 14-3-3 et sont retenues dans le cytoplasme et ensuite dégradées via le protéasome. Divers effecteurs en amont des kinases LATS1 et LATS2, comme MST, MAP4K et TAOK, phosphorylent et activent LATS1/2. Les signaux mécaniques et les signaux transmis par les intégrines via FAK/SRC peuvent inactiver LATS1/2 ou induire la déphosphorylation de YAP/TAZ via l'activation de PP1A. YAP/TAZ non phosphorylés s'accumulent dans le noyau, où ils peuvent se lier à TEAD, pour réguler la transcription de nombreux gènes. (Dey et al. 2020)

Plusieurs voies de signalisation, notamment la voie Hippo et la voie Wnt, ainsi que des protéines spécifiques, telles que les intégrines FAK, Rac1 et Src, peuvent réguler la mécanotransduction dépendante de YAP/TAZ²⁴⁰. Il a été observé que la régulation de YAP/TAZ par FAK était nécessaire pour la durotaxie²⁴¹. La translocation de YAP dépend également de la connexion cytosquelette/noyau via le complexe LINC. Les forces transmises via cette connexion entraînent l'ouverture des pores nucléaires en présence de contractilité sur un substrat rigide, facilitant ainsi le transport à l'intérieur du noyau et permettant l'accumulation nucléaire de YAP. Lorsque cette connexion est défaillante, la translocation de YAP dans le noyau, sur des substrats rigides, n'est plus observée²⁴². La translocation de YAP constitue un excellent indicateur pour déterminer si la cellule réagit aux différentes rigidités de l'environnement de l'organisme. La voie YAP/TAZ est liée à une autre voie de signalisation, celle de MRTF/SRF qui régule la densité et la dynamique du cytosquelette.

II.2.4.3. MRTF/SRF

L'activité des GTPases de la famille Rho est sensible à la rigidité du substrat, et ces protéines régulent l'expression de certains gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette, ce qui peut favoriser la translocation des facteurs de transcription du cytosquelette au noyau¹⁷. Un de ces facteurs de transcription est MRTF (Myocardin Related Transcription Factor), qui, lors de la polymérisation de l'actine, se déplace vers le noyau et se lie à son partenaire SRF (Serum Response Factor). Les voies MRTF/SRF et YAP/TAZ sont étroitement liées, la communication entre ces deux voies permet une accessibilité plus facile au noyau pour réguler la transcription de gènes²⁴³. Le complexe MRTF/SRF régule un grand nombre de gènes impliqués dans le remodelage du cytosquelette et la contractilité. Il a été observé que lorsque la rigidité du substrat augmente, cela induit une augmentation de l'activité de MRTF qui permet une formation accélérée des protrusions membranaires²⁴⁴.

II.2.4.4. Les canaux ioniques

Les canaux ioniques peuvent être des éléments mécanosensibles. Ce type de protéines répond au stress appliqué sur la cellule. Ces canaux ioniques mécanosensibles convertissent les signaux physiques en signaux électriques, permettant ainsi de répondre très rapidement aux stress mécaniques de l'ordre de quelques millisecondes. Ces canaux ioniques doivent répondre à plusieurs critères pour être qualifiés de mécanosensible : ils doivent être exprimés dans des cellules mécanosensibles, leur déplétion/modification entraînent une déplétion/altération de la réponse mécanique et ils doivent être activés par les forces mécaniques²⁴⁵. Des canaux ioniques mécanosensibles ont été identifiés, comme les Piezo, les TREK et les TRP.

Les Piezos sont des canaux cationiques dont l'activation dépend des forces et qui entraînent une entrée du Ca²⁺. Ils sont impliqués dans de nombreux processus tels que l'angiogenèse, la différenciation et la migration cellulaire^{246,247}. L'activation de Piezo1 et l'entrée du Ca²⁺ peuvent promouvoir la mitose par phosphorylation d'ERK1/2²⁴⁸. Chez les souris, Piezo 1 a été observé pour augmenter la migration et la prolifération des ostéoblastes²⁴⁹. Piezo 1 permet aussi aux ostéoblastes de s'adapter au stress généré par des forces de cisaillement, par l'expression du facteur de transcription RUNX2²⁵⁰.

Les TREK (TWIK related potassium) et les TRP (Transient receptor potential) sont impliqués dans la détection d'une grande variété de stimuli, y compris la lumière, la température et les forces mécaniques. Ils peuvent être activés suite à des modifications architecturales de la membrane cellulaire²⁵¹. Des études ont démontré que le stress mécanique induit une augmentation du Ca²⁺ dans les cellules endothéliales du poumon par l'intermédiaire de TRPV4^{252,253}. TREK 1 joue un rôle important dans la mécanotransduction au niveau du cœur, en régulant le potentiel électrique par les forces mécaniques²⁵⁴.

Outre la rigidité du substrat, les cellules peuvent répondre à d'autres signaux mécaniques tels que des forces de tensions, la pression hydrostatique ou des contraintes de cisaillement. Ces différents signaux peuvent activer plusieurs voies de signalisation de la mécanotransduction. Par exemple, il a été observé que la pression hydrostatique pouvait activer Piezo1 ce qui par la suite permet la cascade de signalisation de la voie p38 et MAPK, qui a pour effet de faciliter l'expression de BMP2 (Bone morphogenetic protein 2) impliqué dans la différenciation ostéoblastique des cellules souches mésenchymateuse²⁵⁵.

Les jonctions cellulaires permettent aussi la mécanotransduction dans des cellules organisées en tissu. Cela implique des protéines telles que l'E-cadhérine, la caténine et l'actine qui transmettent les forces mécaniques à l'intérieur de la cellule²⁵⁶. Le cytosquelette, composé de microtubules, de filaments d'actine et de filaments intermédiaires, est impliqué dans la transmission des forces mécaniques à l'intérieur de la cellule⁹². Les changements dans la tension et la distribution des composants du cytosquelette peuvent déclencher des signaux intracellulaires. Comme exemple, il a été observé que les forces mécaniques pouvaient activer RhoA en stimulant la GEF et en inhibant la guanosine triphosphatase activating protein (GAP). Cela régule l'activité de la myosine II en favorisant la phosphorylation de la chaîne légère régulatrice de la myosine par la kinase ROCK, augmentant ainsi la contractilité cellulaire²⁵⁷. La mécanotransduction par les cytosquelettes (actine, microtubule et filament intermédiaire) permet aussi de maintenir la forme de la cellule lors de la migration dans des espaces étroits^{258,259}.

Les forces mécaniques peuvent aussi stabiliser ou induire des changements dans la conformation des protéines qui peuvent provoquer diverses réponses biochimiques dans les molécules, telles que des modifications de l'activité enzymatique, l'exposition de sites de liaison cryptiques, la libération de leurs protéines de liaison, la phosphorylation ou la déphosphorylation, l'ouverture de canaux et des altérations de l'expression génique²⁶⁰.

Ces différents mécanismes de la mécanotransduction (canaux ioniques, voies de signalisation, cytosquelette, noyau et intégrines) interagissent de manière coordonnée pour permettre à la cellule de percevoir et de répondre aux forces mécaniques de leur

environnement en régulant des processus tels que la migration, la différenciation, l'apoptose, la prolifération et le métabolisme cellulaire. La mécanotransduction ne se restreint pas uniquement aux niveaux cellulaires, ce processus s'étend aussi au niveau de l'organisme entier, à l'embryogenèse, ainsi qu'aux organes et tissus²⁶⁰.

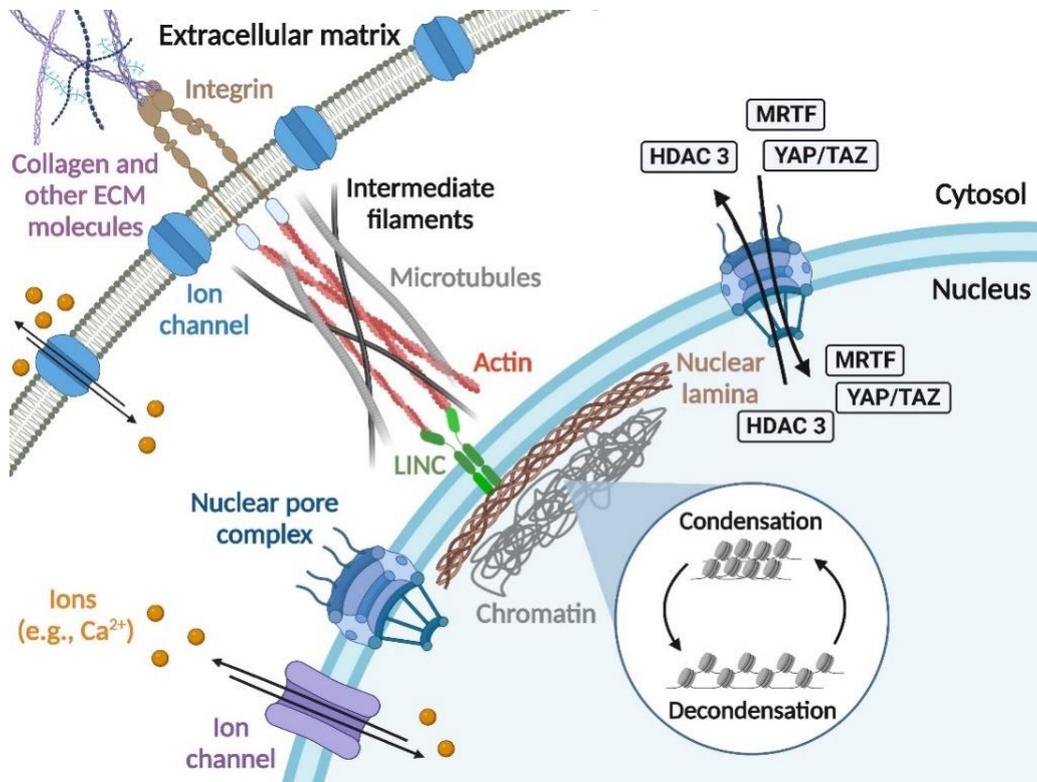


Figure 18 : Représentation de la mécanotransduction. Les signaux mécaniques provenant de la MEC peuvent être directement transmis par des structures via des liens physiques tels que les AFs avec les intégrines, les différents cytosquelettes et le complexe LINC. La mécanotransduction de ces signaux peut modifier la conformation de la chromatine et aussi activer des facteurs de transcription (YAP/TAZ, MRTF, ...) permettant la régulation des gènes. Les signaux mécaniques peuvent aussi agir sur l'expression des gènes de manière indirecte par exemple, via les translocations des facteurs de transcription mécanosensibles (YAP/TAZ, MRTF) et les différents canaux ioniques mécanosensibles. (Alisafaei et al. 2023)

III. La mémoire mécanique

La mémoire mécanique cellulaire est un phénomène biologique qui fait référence au fait que la cellule n'est pas seulement sensible aux conditions mécaniques de son environnement à l'instant T, mais que sa réponse est également influencée par les conditions mécaniques rencontrées dans son passé. Les modifications phénotypiques attribuées à des signaux physiques spécifiques peuvent persister pendant un certain temps, même après la disparition de ces signaux mécaniques. La mémoire mécanique est donc la capacité des cellules à conserver l'effet de contraintes mécaniques passées et à y répondre sur un nouvel environnement.

La mémoire mécanique cellulaire implique plusieurs processus moléculaires et cellulaires interconnectés. Parmi eux, on trouve la mécanotransduction, l'épigénétique et la dynamique du cytosquelette. Les signaux convertis par la mécanotransduction entraînent des modifications épigénétiques. Enfin, le cytosquelette, joue un rôle central dans l'adaptation des cellules aux forces mécaniques en modifiant sa conformation et sa dynamique.

La mémoire mécanique cellulaire joue un rôle important pour de nombreux processus cellulaires, notamment la différenciation, la migration et la morphologie. Par exemple, il a été observé que des cellules souches mésenchymateuses intègrent des signaux mécaniques pour diriger leur différenciation vers différents types cellulaires. De plus, la mémoire mécanique cellulaire pourrait également jouer un rôle dans des maladies telles que le cancer, où les forces mécaniques sont plus fortes dans le microenvironnement tumoral, ce qui peut contribuer à la progression métastatique.

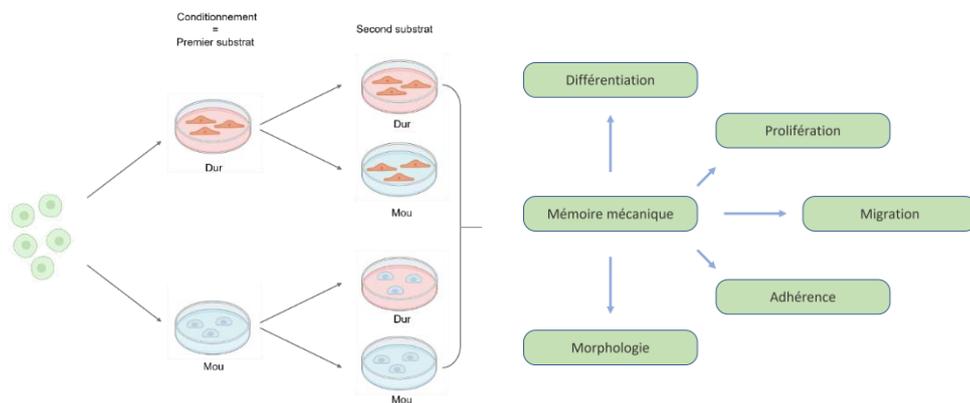


Figure 19 : Schéma d'une expérience sur la mémoire mécanique cellulaire. La mémoire mécanique fait référence à la capacité des cellules à conserver des caractéristiques phénotypiques associées à un substrat spécifique, même après avoir été transférées sur un autre substrat. Ce phénomène a été observé à la fois chez les cellules conditionnées sur un substrat rigide et sur celles conditionnées sur un substrat mou. Les cellules conditionnées sur un substrat rigide conservent des caractéristiques associées à la rigidité même lorsqu'elles sont transférées sur un substrat secondaire mou. De même, les cellules conditionnées sur un substrat mou conservent des caractéristiques associées à ce substrat lorsqu'elles sont transférées sur un substrat secondaire rigide. La mémoire mécanique a un impact sur divers processus cellulaires, y compris l'adhésion, la morphologie, la migration, la prolifération et la différenciation. Cette mémoire mécanique joue un rôle significatif dans l'influence du comportement et de la fonction cellulaire.

III.1. La mémoire mécanique dans la différenciation cellulaire

III.1.1. La mémoire mécanique dans la fibrose

La mémoire mécanique a été observée pour la première fois sur des myofibroblastes²⁶². L'étude montre que les fibroblastes pulmonaires peuvent se transformer en

myofibroblastes, une caractéristique de la fibrose, lorsqu'ils sont exposés à des substrats ayant une rigidité correspondant à un tissu fibrotique pathologiquement rigide. Ils ont utilisé une approche consistant à cultiver les fibroblastes sur des substrats en silicone (PDMS) présentant des rigidités à différents états du tissu pulmonaire pour déterminer les effets durables sur le comportement fibrotique. Les fibroblastes de poumon de souris sur un substrat dur se différencient en myofibroblastes contractiles, associés à une augmentation de l'expression α SMA (smooth muscle actin). Lorsque ces myofibroblastes sont sur un substrat plus mou, cela annule l'activation des myofibroblastes. D'autres résultats indiquent que l'exposition des fibroblastes pulmonaires pendant 3 semaines (conditionnement), sur des substrats pathologiquement rigides, entraîne une activité myofibroblastique qui est soutenue même après que les cellules aient été transférées sur un substrat mou pendant 2 semaines. Inversement, un conditionnement suffisamment long sur un substrat mou, empêche la différenciation en myofibroblastes une fois les cellules transférées sur un substrat dur. Les auteurs ont mis en évidence la mémoire mécanique en observant qu'un phénotype obtenu par des signaux mécaniques pouvait être stocké et maintenu dans le temps.

Une autre étude, impliquant la fibrose, a présenté des résultats similaires en utilisant des cellules souches dérivées du tissu adipeux (ASC) de rats. Cette étude a démontré que les ASC présentent une mémoire mécanique, car leur différenciation en un phénotype profibrotique est affectée par les signaux mécaniques passés. Les cellules, initialement cultivées sur un substrat mou avant d'être placées sur une matrice rigide, présentaient une diminution de la taille des cellules, de l'expression de l' α SMA et de la sécrétion de la matrice extracellulaire par rapport aux cellules qui avaient toujours été cultivées sur un substrat rigide²⁶³.

III.1.2. La mémoire mécanique dans les cellules ostéogéniques

Il a été observé que le destin cellulaire des cellules souches mésenchymateuses (MSC) peut être impacté par la mémoire mécanique. Dans cette étude, les auteurs ont développé un matériau dont la rigidité peut être contrôlée par la lumière de façon à changer un substrat

dur (10 kPa) en un substrat mou (2 kPa)²⁶⁴. Les MSC humaines (hMSC), isolées de la moelle osseuse, ont été exposées à un substrat rigide pendant une période de un à dix jours avant que le gel ne soit ramolli. Les cellules ont ensuite été maintenues pendant une période supplémentaire de un à dix jours sur le gel ramolli. Les résultats ont montré que plus les cellules étaient exposées à un substrat rigide longtemps, plus l'expression du facteur de transcription pré-ostéogénique RUNX2 augmentait. Les auteurs ont également observé un effet-dose avec le temps d'exposition : plus les cellules étaient exposées à un substrat rigide, plus l'expression de RUNX2 était élevée après trois jours sur un substrat mou. Ces résultats suggèrent que la mémoire mécanique est un processus graduel et dépendant du temps d'exposition aux signaux mécaniques. L'étude a également montré que la mémoire mécanique peut être transitoire ou irréversible en fonction de la durée de l'exposition aux signaux mécaniques.

Une étude similaire a montré que les propriétés mécaniques des niches cellulaires dirigent la différenciation des hMSC ²⁶⁵. Les auteurs ont construit un modèle de niche mécanique dynamique avec un hydrogel à base d'alginate, où le changement mécanique dynamique peut être facilement réalisé par l'introduction ou l'enlèvement de Ca²⁺. Les résultats ont montré que le durcissement de l'hydrogel (de mou à dur) supprime la différenciation ostéogénique des hMSC au début, puis entraîne finalement la différenciation ostéogénique sur une longue période. En revanche, l'assouplissement de l'hydrogel (de dur à mou) permet aux hMSC de conserver une forte différenciation ostéogénique au début, puis, sur une longue période, le niveau de différenciation ostéogénique atteint des niveaux inférieurs, comparés à ceux sur l'hydrogel rigide.

Ces différentes études permettent d'identifier la mémoire mécanique comme un phénomène transitoire et suggèrent que cette mémoire peut ralentir l'adaptation des cellules à des signaux physiques immédiats.

III.2. Effets de la mémoire mécanique sur la migration cellulaire

Dans une étude, les auteurs ont développé un substrat de polyacrylamide modulaire pour étudier l'effet de la rigidité de la matrice, ce qui leur permet de contrôler précisément le temps que les cellules passent sur une rigidité. Ils ont découvert que les cellules épithéliales (MCF7, MCF10A et A412) préalablement exposées à une matrice rigide pendant 3 jours migrent plus rapidement, présentent une expression accrue d'actomyosine, forment de plus grandes adhérences focales et conservent YAP nucléaire, même après leur arrivée sur une matrice secondaire plus molle. À l'inverse, une exposition préalable à un substrat mou a un effet inverse. Les résultats révèlent une régulation mécanosensible de la migration cellulaire collective par la rigidité de la MEC rencontrée dans le passé ²⁶⁶.

Ils ont aussi observé que l'effet du conditionnement sur la première rigidité était diminué lorsque la période d'exposition était inférieure à une journée. Cela indique que la mémoire mécanique se met en place en fonction de la durée d'exposition lors du conditionnement. En étudiant cette mémoire mécanique, ils ont remarqué que quand YAP est déplété cela réduit considérablement la migration dépendante de la mémoire. L'implication de YAP sur la mémoire mécanique sera développée dans la partie suivante.

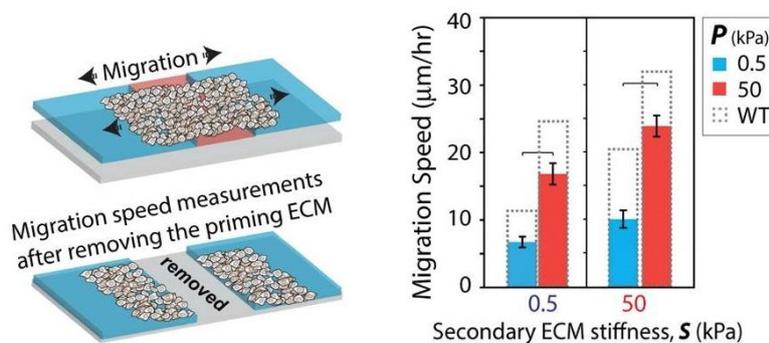


Figure 20: Résultats des tests de vitesse de migration dépendants du conditionnement. Les cellules conditionnées (**P**) sur le substrat mou (0,5 kPa) ont des vitesses de migration (sur substrat mou et dur) plus faibles que les cellules conditionnées sur un substrat dur (50 kPa). (Nasrollahi et al. 2017)

Une autre étude utilisant des cellules cancéreuses pancréatiques, décrit leur capacité à s'adapter mécaniquement à leur environnement, ce qui leur permet de migrer avec succès vers des sites métastatiques plus mous²⁶⁷. Les chercheurs ont utilisé la microscopie à force de traction pour montrer que les cellules cancéreuses pancréatiques conditionnées mécaniquement sur une matrice rigide exercent des forces de traction plus élevées, même lorsqu'elles sont transférées vers une matrice secondaire plus molle, par rapport aux cellules qui ont toujours été cultivées sur un substrat mou.

Le durcissement de la matrice est courant dans les tumeurs solides, il peut induire la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et la migration des cellules cancéreuses. Des chercheurs ont étudié les mécanismes et la durabilité de la mémoire mécanique acquise dans le cas du carcinome épidermoïde buccal (OSCC)²⁶⁸. Ils ont découvert que la contractilité cellulaire est requise pour l'acquisition de la mémoire mécanique. Les cellules OSCC invasives (SSC25) sur-expriment la myosine II par rapport aux cellules non invasives (Cal27). Cependant, l'exposition prolongée des cellules Cal27 à un environnement rigide a entraîné une augmentation de la myosine et des marqueurs de TEM, leur permettant de migrer aussi rapidement que les cellules SSC25. Ce phénomène persiste même lorsque l'environnement devient moins rigide, suggérant une mémoire de leur environnement précédent. L'acquisition du phénotype mésenchymateux induit est contrôlée par des cascades de signalisation. La durabilité du phénotype a été étudiée en examinant les différences transcriptomiques entre les cellules Cal27 préconditionnées, cultivées avec ou sans drogues inhibant les kinases FAK ou AKT. Les résultats suggèrent que la mémoire mécanique, médiée par la contractilité via des voies de signalisation distinctes, pourrait être nécessaire pour la dissémination de l'OSCC.

III.3. Les acteurs de la mémoire mécanique

Les mécanismes impliqués dans la configuration de la mémoire mécanique sont encore peu compris. Bien que certains acteurs, notamment YAP/TAZ, RUNX2 et miR-21, aient été identifiés, leur fonctionnement dans le stockage de l'information mécanique passée n'est pas encore décrit.

III.3.1. YAP/TAZ dans la mémoire mécanique

Dans l'étude rapportant l'effet de la mémoire mécanique sur la différenciation ostéogénique, les auteurs ont notamment étudié l'activation de YAP/TAZ, qui est un intégrateur majeur de la mécanotransduction et représente donc un candidat légitime pour jouer un rôle central dans l'établissement de la mémoire mécanique²⁶⁴. Leurs résultats révèlent que la localisation nucléaire et l'activation de YAP/TAZ augmentaient en fonction du temps passé sur un substrat dur. Après le conditionnement sur un substrat dur, les cellules transférées sur un substrat mou montrent une persistance de l'activité de YAP/TAZ. Plus les cellules sont conditionnées sur un substrat rigide pendant de longues périodes, plus YAP/TAZ est activé avec une localisation dans le noyau sur le substrat secondaire mou, et plus cette activation perdure dans le temps.

L'étude sur l'impact de la mémoire mécanique sur la migration, a également établi un lien entre la mémoire mécanique et les facteurs de transcription YAP/TAZ²⁶⁶. Ces auteurs ont confirmé que la localisation de YAP/TAZ sur un substrat secondaire est dépendante de la rigidité du substrat de conditionnement. Les cellules qui ont été conditionnées sur un substrat mou, puis placées sur un substrat dur, ont une localisation nucléaire de YAP/TAZ moins importante que les cellules qui ont toujours expérimenté un substrat dur. À l'inverse, les cellules conditionnées sur un substrat dur, puis placées sur un substrat mou, ont des niveaux plus élevés de YAP/TAZ nucléaire par rapport à des cellules cultivées en permanence sur une matrice souple. Lorsque YAP/TAZ est déplété pendant la période de conditionnement, les cellules sont toujours capables de détecter la rigidité du substrat, mais la mémoire mécanique est altérée. Les auteurs proposent que YAP/TAZ serve de voie de stockage de l'information pour la mémoire mécanique, tout en préservant la capacité de la cellule à effectuer la mécanotransduction.

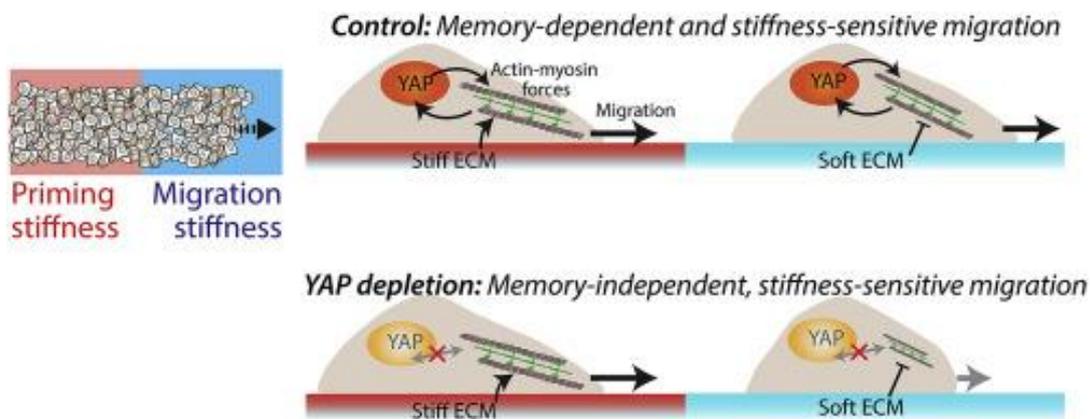


Figure 21 : Schéma de la migration dépendant de la mémoire mécanique. L'activité de YAP est dépendante de la rigidité du conditionnement, ce qui régule les forces cellulaires et dicte la migration dépendante de la mémoire. La suppression de YAP élimine cette mémoire, sans altérer les capacités mécanosensibles de la cellule. (Nasrollahi et al. 2017)

Des résultats similaires ont été observés dans les cellules cancéreuses du pancréas. Les cellules conditionnées sur un substrat mou ont une plus faible translocation nucléaire de YAP lorsqu'elles sont transférées vers une matrice secondaire rigide par rapport aux cellules conditionnées sur du dur. Cette adaptation mécanique est médiée par YAP et le microARN-21 (miR-21). Mir-21 sera vu plus en détail dans la partie suivante.

III.3.2. *Mir-21 dans la mémoire mécanique*

Dans l'étude réalisée avec des cellules cancéreuses du pancréas, les cellules conditionnées sur une matrice molle ont une expression augmentée de miR-21 qui est conservée lorsque les cellules sont transférées sur un substrat secondaire dur²⁶⁷. Les chercheurs ont découvert que la mémoire mécanique conservée par miR-21 conduit à une meilleure résistance aux traitements anti-cancéreux. Les cellules cancéreuses du pancréas se développent dans un environnement dense et rigide à leur site primaire. Ces cellules métastasent surtout dans le foie, qui est caractérisé par un microenvironnement plus mou.

Les chercheurs ont constaté que les cellules cancéreuses du pancréas acquièrent un phénotype plus agressif et résistant au traitement après une adaptation mécanique à long terme à un microenvironnement plus mou. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que la résistance des métastases hépatiques à la gemcitabine pourrait être due à cette adaptation mécanique des cellules cancéreuses du pancréas. En effet, l'expression plus élevée de miR-21 dans les cellules conditionnées sur mou a été corrélée à une résistance accrue à la gemcitabine, par rapport aux cellules cancéreuses pancréatiques non conditionnées ou conditionnées sur un substrat dur.

Une autre étude sur l'activation de la fibrogénèse des MSC permet de confirmer l'implication de mir21 dans la mémoire mécanique²⁶⁹. Les MSC sont des cellules prometteuses pour la thérapie tissulaire. Lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions standards (en flask), cela augmente le caractère pro-fibrotique de ces cellules en augmentant l'expression α -SMA, leur faisant perdre leur potentiel thérapeutique. Les chercheurs ont découvert que les cellules conditionnées sur des substrats mous pendant 3 semaines présentent une fibrogénèse réduite, ainsi qu'une désensibilisation contre l'activation mécanique induite par un substrat dur. Les auteurs ont identifié le microARN miR-21 comme un gardien de la mémoire à long terme dans les MSC. L'expression de miR-21, régulée par le facteur de transcription MRTF-A/MLK-1, augmente pendant le conditionnement sur une matrice rigide, et reste élevée plus de 2 semaines après le retrait du stimulus mécanique. La suppression de miR-21 à la fin de la période de conditionnement sur le dur permet d'effacer la mémoire mécanique, et donc d'empêcher la différenciation en myofibroblastes une fois les cellules placées sur un substrat mou. Il est intéressant de noter qu'en comparaison avec les cellules souches mésenchymateuses, il y a régulation positive de miR-21 sur les substrats mous par rapport aux substrats durs pour les cellules du cancer du pancréas, indiquant que la régulation de par la rigidité du substrat peut dépendre de la lignée cellulaire.

III.3.3. RUNX2 dans la mémoire mécanique

L'étude liant la mémoire mécanique et la différenciation ostéogénique propose un autre mécanisme pour la mémoire mécanique, qui est médiée par le facteur de transcription RUNX2²⁷⁰. Les auteurs ont conditionné des cellules de cancer du sein et des xénogreffes dérivées de patients (PDX) sur un substrat primaire avant de les transférer sur un substrat secondaire ou de les injecter dans des souris. Ils ont observé que la mémoire mécanique affecte l'invasion de ces cellules et ont identifié RUNX2 comme une cible potentielle dans ce type de mémoire. RUNX2 est un bon candidat puisqu'il est impliqué dans l'invasion, la métastase osseuse et la conservation de la chromatine qui sera développée plus loin dans ce chapitre. L'expression de RUNX2 est mécanosensible et sa localisation dans le noyau par phosphorylation est affectée par le conditionnement mécanique. Les cellules conditionnées sur un substrat mou, puis placées sur un substrat dur, présentent RUNX2 dans le cytoplasme, alors que, les cellules qui ont toujours été sur un substrat dur présentent RUNX2 dans le noyau.

Les chercheurs ont ensuite artificiellement modulé l'expression de RUNX2, et, dans le cas de la surexpression de RUNX2, ils ont observé une augmentation de l'invasion cellulaire chez les cellules conditionnées sur un substrat mou, tandis que l'inhibition de RUNX2 réduit l'invasion chez les cellules conditionnées sur un substrat rigide. Ces résultats sont aussi retrouvés dans la formation des métastases, ce qui suggère que RUNX2 agit comme une voie de stockage du caractère invasif dans ces cellules.

III.4. Les modifications épigénétiques dans la mémoire mécanique

La capacité des cellules à retenir des informations de leur environnement passé n'est possible que si l'information acquise peut être conservée et continuer à moduler le phénotype cellulaire après changement d'environnement. Toutefois, l'intensité de l'influence de l'environnement passé décroît dans le temps, si bien que la mémoire mécanique a un caractère transitoire et ne correspond pas à une activation ou à un engagement dans une voie de différenciation. La forme que prend le stockage

d'information dans le cadre de la mémoire mécanique n'est pas encore clairement établie. Une hypothèse, appuyée par les données sur YAP, RUNX2 et Mir21, suggère que les niveaux d'expression des régulateurs de l'expression génique sont impliqués. Toutefois, il ne s'agit vraisemblablement que d'une vision partielle des mécanismes soutenant l'acquisition de la mémoire mécanique. Une hypothèse attractive implique une régulation épigénétique de la mémoire mécanique. En effet, les modulations épigénétiques autorisent des changements rapides et persistants, mais aussi réversibles, de l'expression génique, qui correspondent aux critères de la mémoire mécanique.

III.4.1. L'effet de RUNX2 sur la conformation de la chromatine

Le facteur de transcription RUNX2 a été identifié comme jouant un rôle dans le maintien de l'organisation de la chromatine²⁷⁰. Les auteurs de cette étude ont conditionné des lignées de cellules cancéreuses du sein sur un substrat primaire avant de les transférer sur un substrat secondaire. Ils ont ensuite réalisé un séquençage ARN pour établir les gènes différemment régulés entre les substrats rigides et mous, et ont identifié RUNX2, le candidat le plus fortement exprimé sur le substrat rigide. Les chercheurs ont réalisé des essais ATAC seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing) pour identifier des sites de "fermeture différée", dont l'accessibilité n'a pas été immédiatement modifiée lors de la transition d'un environnement rigide à un environnement mou. Ces sites de « fermeture différée » sur la chromatine peuvent rester accessibles 2 jours, pour un conditionnement de 7 jours. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ces différents sites avec une « fermeture différée » peuvent fonctionner comme des sites de régulation de la mémoire mécanique et que RUNX2 peut agir comme un stabilisateur de la chromatine. En effet, lorsque RUNX2 est déplété pendant le conditionnement, les sites à « fermeture différée » ne restent accessibles que 12 heures sur le substrat secondaire.

III.4.2. La mémoire mécanique et l'accessibilité à la chromatine

Une autre étude a exploré la théorie de la mémoire mécanique en utilisant des hMSC cultivées sur des hydrogels dont la rigidité est modifiable par les UV²⁷¹. Les auteurs ont

constaté que la rigidité du substrat affectait l'activation de YAP/TAZ, l'acétylation des histones et la morphologie nucléaire. Les cellules cultivées sur des substrats rigides présentent des noyaux moins sphériques, une condensation de la chromatine plus faible et des niveaux d'expression plus faibles de HDAC (histone déacétylase), par rapport aux cellules cultivées sur des substrats mous.

Les auteurs de cette étude ont ensuite étudié l'impact du conditionnement mécanique sur ces paramètres. Ils ont conditionné les cellules sur une rigidité spécifique allant jusqu'à dix jours avant d'induire un ramollissement du gel et de maintenir les cellules pendant dix jours supplémentaires. Ils ont découvert que la mémoire mécanique influence la morphologie nucléaire, la condensation chromatiniennne et les niveaux d'acétylation, et que la durée de la période de conditionnement a un impact sur l'intensité et la durée de ces effets. L'étude suggère que la mémoire mécanique peut être stockée sous forme de modifications épigénétiques, car la condensation de la chromatine et les niveaux d'acétylation sont connus pour réguler l'expression des gènes.

Une autre étude a observé l'effet de la mémoire mécanique sur l'organisation de la chromatine²⁷². Ils ont appliqué des forces de tension à des CSM, pendant 6 heures, et ont observé que cela affectait la rigidité nucléaire et induisait une condensation rapide de la chromatine médiée par la myosine II. Les auteurs ont constaté l'implication de la méthylation de l'histone dans le processus, car la condensation rapide de la chromatine pouvait être empêchée en inhibant le complexe PRC2 impliqué dans la méthylation de H3K27. Ils ont également établi que cette condensation de la chromatine dépendait de la signalisation du calcium.

Les auteurs ont aussi observé que les effets de la charge dynamique sur le noyau étaient maintenus dans le temps, suggérant la présence d'une mémoire mécanique. Après avoir mis les cellules en culture, en alternant les périodes de charges (3h), et les périodes de repos sans charges (2 jours), ils ont constaté que les niveaux de condensation de la chromatine étaient plus élevés après la deuxième période de charge, par rapport à la première. Ils ont également observé que les niveaux de condensation de la chromatine

diminuaient au fil du temps pendant la première période de repos, mais pas pendant la deuxième. Cette étude suggère que la mémoire mécanique pourrait être stockée par des modifications épigénétiques, notamment par la méthylation des histones.

III.5. Un modèle proposé pour la mémoire mécanique cellulaire

Afin de comprendre les mécanismes de la mémoire mécanique, un modèle mathématique a été proposé²⁷³.

La mémoire mécanique est un processus clé dans la régulation de l'état de mécanoactivation des cellules. Ce processus est basé sur le maintien des effets des signaux mécaniques passés, qui façonnent le phénotype des cellules²⁷³. Dans ce modèle, la relation entre la rigidité de la MEC et le phénotype des cellules est définie par l'état de mécanoactivation des cellules. La mécanoactivation est l'activation des protéines sensibles à la rigidité, telles que les composants cytosquelettiques et des AF (vinculine, taline et intégrines), les facteurs de transcription (RUNX2 et YAP/TAZ) et les modulateurs épigénétiques (HDAC, HAT et miARN).

Cependant, les modèles de mécanotransduction existants ne prennent pas en compte l'effet mémoire, car ils décrivent un phénomène de type action/réaction, dans lequel les adhérences et la dynamique du cytosquelette répondent au stimulus mécanique en quelques secondes ou minutes. Dans le modèle mathématique de la mémoire mécanique, les auteurs proposent que les cellules placées sur une matrice rigide s'adaptent à cet environnement en modulant l'expression de certains gènes, notamment ceux associés au cytosquelette²⁷⁴. Lorsque ces cellules sont transférées sur une matrice souple, une latence épigénétique ralentit les changements transcriptionnels nécessaires pour l'adaptation cellulaire à la nouvelle matrice, et ce délai dans la réponse donne lieu à la mémoire.

L'un des éléments clés de la mémoire mécanique dans ce modèle est la rétroaction positive que les facteurs mécanosensibles ont sur l'activité transcriptionnelle et la modulation épigénétique associée qui permet la persistance de l'information relative aux signaux physiques passés. Par exemple, la contractilité cellulaire et le développement des AFs

augmentent l'activation de YAP/TAZ, qui à son tour augmente la stabilité des FA et la contractilité cellulaire via son activité transcriptionnelle. Les auteurs ont considéré l'existence de deux types de boucles de rétroaction positive, une boucle de rétroaction positive à action rapide et une boucle de rétroaction positive à action lente, pour rendre compte de l'échelle de temps de la mémoire mécanique. Ils ont considéré que la boucle de rétroaction positive à action lente était entraînée par des modificateurs épigénétiques, tels que HDAC/HAT et Mir-21, qui agissent notamment sur la conformation de la chromatine. La boucle de rétroaction positive à action rapide est, par contre, déterminée par des voies de signalisation qui régulent l'activation de YAP/TAZ et RUNX2.

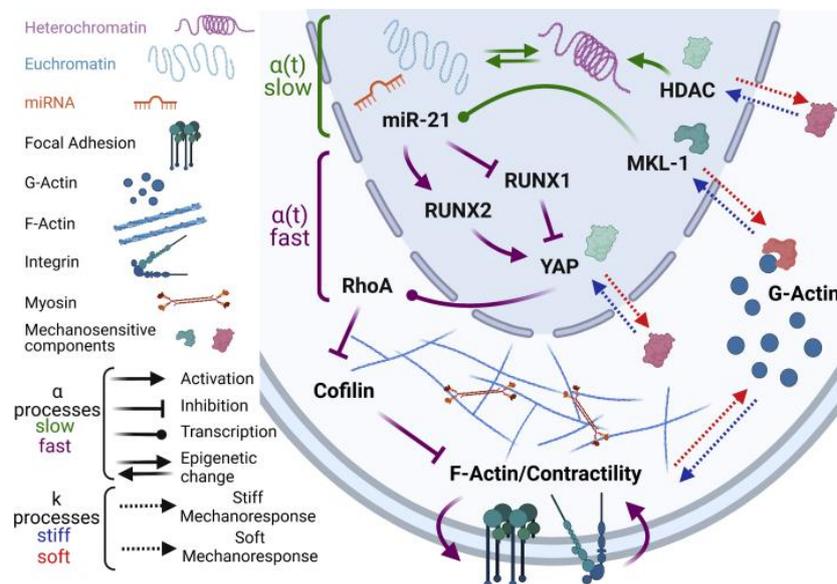


Figure 22 : Schéma représentant le modèle de la mémoire mécanique établie sur le dur, avec ses boucles de rétrocontrôle positif. Dans ce modèle, le renforcement α est influencé par les 2 types de boucles de rétrocontrôle : rapides et lentes. Le niveau de renforcement est contrôlé par l'intensité des signaux mécaniques, qui a pour effet de concentrer les protéines de mécanoactivation qui modulent la réponse mécanique, et donc la mémoire mécanique cellulaire. (Price et al. 2021)

Les auteurs ont proposé que la mémoire mécanique est influencée par la cinétique des facteurs mécanoactivants et leur capacité à générer une boucle de rétroaction, ce qui permet le maintien de la mécanoactivation dans les cellules, même après un changement de rigidité de la MEC. Sans la mémoire mécanique, la mécanoactivation cellulaire est considérée comme faible sur un substrat mou et élevée sur un substrat dur. Cependant, dans le cas de la mémoire mécanique, la mécanoactivation n'est plus uniquement dictée par la rigidité de la matrice sur laquelle la cellule repose, mais également par l'historique environnemental des cellules. Lorsque le conditionnement mécanique est insuffisant, que ce soit en durée ou en intensité de signal, ces facteurs ne fournissent pas un renforcement positif suffisant pour maintenir une mécanoactivation élevée sur un substrat souple. Cependant, lorsque les cellules sont conditionnées pendant une période suffisante sur un substrat rigide, des facteurs mécanoactivants sont générés et s'accumulent, créant un stockage, fournissant un renforcement positif et maintenant ainsi une haute mécanoactivation sur un substrat secondaire souple.

Les auteurs ont également suggéré que le conditionnement prolongé pourrait conduire à une mémoire mécanique permanente, qui pourrait être associée à la différenciation cellulaire sous des signaux mécaniques. Cette hypothèse a été soutenue par des études antérieures, montrant que, les cellules exposées à une contrainte mécanique prolongée subissent des changements phénotypiques permanents^{263,269,270}. La mémoire mécanique se distingue de la différenciation cellulaire, car il s'agit du même type cellulaire qui conserve des adaptations phénotypiques de son environnement passé sur son environnement immédiat pendant un certain temps.

IV. La mémoire associative

La mémoire mécanique est caractérisée par la latence de la réponse cellulaire à un signal mécanique passé, sur la réponse cellulaire à un nouvel environnement. Dans ce cadre, la notion de mémoire répond à une définition assez large impliquant une influence d'une expérience passée sur la réponse cellulaire à l'instant « t ». De façon générale, la notion de mémoire renvoie à différents concepts en fonction du domaine d'étude. En sciences cognitives, la notion de mémoire est intimement liée à la notion d'apprentissage. Différents types de mémoires/apprentissages ont été définis dans ce contexte. Cependant, il est clairement admis que certaines formes d'apprentissages historiquement identifiés et définis dans des organismes possédant un système nerveux central complexe peuvent également être retrouvées dans des organismes ne possédant pas de système nerveux. Ainsi, le support de certaines formes de mémoire n'est pas nécessairement supporté par des réseaux de neurones. Il reste toutefois difficile de faire des comparaisons entre des systèmes très différents, chez lesquels les mécanismes de l'apprentissage sont supportés par différentes structures, ou types de réseaux, et dont certaines caractéristiques sont potentiellement différentes entre elles. Il est donc important de bien définir les différents types d'apprentissages/mémoires avant d'en étudier l'existence et les mécanismes dans de nouveaux modèles.

L'apprentissage fait référence à des modifications persistantes et adaptatives du comportement d'un organisme en fonction de son expérience²⁷⁵. Cependant, la majorité des études faites sur l'apprentissage, afin de comprendre son origine et son fonctionnement, ont été réalisées sur des organismes multicellulaires, le plus souvent sur des vertébrés dotés d'un système nerveux. Ces études ont permis la mise en place d'un modèle biologique de l'apprentissage basé sur la plasticité synaptique. Ce modèle a été proposé par le neuroscientifique Donald Hebb, avec comme principe que les modifications synaptiques à long terme, dépendantes de l'activité, organisent les neurones en réseaux fonctionnels, appelés ensembles cellulaires. L'activation d'un ensemble cellulaire peut activer d'autres ensembles cellulaires qui ont été associés par l'apprentissage, c'est-à-dire,

par le renforcement synaptique inter-ensemble. L'activation séquentielle des ensembles cellulaires est ce qui constitue le mode de l'intégration neuronale de l'information. Cette organisation permet au cerveau de répondre à des situations complexes, en adoptant des comportements flexibles et appropriés²⁷⁶. Cette définition de l'apprentissage, proposée par Donald Hebb, peut se résumer en une de ces citations : « Neurons that fire together, wire together », expliquant que quand notre cerveau apprend quelque chose de nouveau, des neurones établissent de nouvelles connexions, et ces connexions se renforcent à chaque fois que le stimulus est répété, produisant ainsi une réponse plus robuste et/ou plus rapide.

Cependant, si l'on se tient à cette définition, cela sous-entend que l'apprentissage est un processus qui est limité aux organismes possédant un système nerveux, ce qui exclut les organismes non-neuronaux, tels que les plantes et les organismes unicellulaires.

Des recherches récentes ont montré que les plantes et les organismes unicellulaires sont également capables d'apprendre, remettant en question ce dogme sur la capacité d'apprentissage. Un cadre théorique récent propose une conceptualisation de l'apprentissage qui englobe une variété de phénomènes apparentés à l'apprentissage observé dans différents domaines de recherche. Ce cadre aborde l'apprentissage comme « une mise à jour structurée des propriétés du système basée sur le traitement de nouvelles informations ». ²⁷⁷ Ce cadre théorique ne restreint pas l'apprentissage aux processus cognitifs/neuronaux, et suggère que l'apprentissage peut être médié par des mécanismes moléculaires. Les organismes unicellulaires, bien qu'ils n'aient pas de cerveau complexe, ont des capacités comportementales similaires à celles des animaux plus complexes et peuvent répondre et s'adapter à leur environnement.

Pour répondre à cette définition de mémoire/apprentissage, un organisme doit être capable de produire une réponse adaptée à un stimulus, de conserver une trace de la relation stimulus-réponse, et d'utiliser cette information stockée pour produire plus tard une réponse adaptée plus (sensibilisation) ou moins (habituation) intense/rapide²⁷⁸. De

nombreuses études ont été menées sur l'apprentissage chez les organismes unicellulaires et les plantes.

Il existe deux grandes formes d'apprentissage : l'apprentissage non-associatif qui se base sur l'expérience d'un seul stimulus, et l'apprentissage associatif qui implique deux stimuli²⁷⁹.

IV.1. Apprentissage non-associatif

L'apprentissage non-associatif est la forme d'apprentissage la plus simple, dans laquelle l'organisme répond à un seul stimulus. Cette réponse comportementale peut être atténuée ou augmentée après un stimulus prolongé ou répété. Ces deux types de réponses, aux conséquences opposées sont respectivement nommés habituation et sensibilisation et sont les deux grands types d'apprentissage non-associatif. L'habituation est le type d'apprentissage non-associatif le plus étudié chez les organismes unicellulaires car elle est considérée comme la forme d'apprentissage la plus simple. L'apprentissage non-associatif est considéré comme la première forme d'apprentissage apparue au cours de l'évolution²⁸⁰.

IV.1.1. Définition de l'habituation

L'habituation est un processus essentiel pour un organisme, lui permettant de filtrer les nombreuses informations dans l'environnement et de ne répondre qu'aux signaux importants pour sa survie. Cela permet à l'organisme d'économiser ses ressources pour accomplir d'autres tâches, ce qui lui donne un certain avantage pour explorer efficacement son environnement. L'habituation permet de diminuer la réponse comportementale à la présentation continue ou répétée d'un même stimulus. À la base, la réponse initiale est forte, puis elle diminue jusqu'à éventuellement disparaître avec la répétition de la stimulation. L'habituation a largement été étudiée chez les organismes neuronaux, ce qui a permis d'établir dix propriétés caractéristiques de ce type d'apprentissage retrouvé chez les organismes capables d'habituation^{281,282} (Figure 22). Ces dix marqueurs de l'habituation

peuvent être appliqués à tout organisme ayant la capacité de répondre transitoirement à des stimuli individuels.

La réduction de la réponse n'est pas le résultat d'une fatigue sensorielle/motrice, ou d'une altération d'un mécanisme cellulaire, mais résulte au contraire d'un processus actif visant à réduire la réponse. Cette réponse peut être perturbée lorsqu'un autre stimulus fort apparaît, c'est la déshabituatation. D'autres facteurs influencent l'habituatation, notamment la répétition du stimulus, l'intervalle inter-stimulus et l'intensité du stimulus. Ces facteurs déterminent si l'habituatation à court terme ou à long terme se produit. L'habituatation à court terme est caractérisée par des stimulations rapides avec de courts intervalles de temps entre elles ; dans ce cas, l'habituatation est observée rapidement, mais elle n'est pas maintenue dans le temps après cessation des présentations. En revanche, l'habituatation à long terme est caractérisée par moins de stimulations sur des périodes plus longues. L'habituatation est alors plus lente, mais ses effets sont durables, car la récupération est retardée.

Cette forme d'apprentissage est simple et peut être adoptée par tous types d'organismes. C'est un phénomène automatisé, qui se produit dans le système nerveux central de tout animal, mais aussi chez des organismes non-neuronaux, tels que chez les plantes et les protozoaires unicellulaires.

Numéro	Nom	Description
1	Habituatation	L'application répétée d'un stimulus entraîne une diminution progressive de certains paramètres d'une réponse jusqu'à un niveau asymptotique.
2	Récupération spontanée	Si le stimulus est retenu après une diminution de la réponse, la réponse se rétablit au moins partiellement pendant la durée de l'observation.
3	Potentialisation de l'habituatation	Après plusieurs séries de répétitions de stimuli et de récupérations spontanées, la décroissance de la réponse devient de plus en plus rapide et/ou plus prononcée.
4	Fréquence du stimulus	Toutes choses étant égales par ailleurs, une stimulation plus fréquente entraîne une diminution de la réponse plus rapide et/ou

		plus prononcée, ainsi qu'une récupération spontanée plus rapide (si la diminution a atteint des niveaux asymptotiques).
5	Intensité du stimulus	Au sein d'une modalité de stimulus, plus le stimulus est faible, plus la décroissance de la réponse comportementale est rapide et/ou prononcée. Des stimuli très intenses peuvent ne pas entraîner de décroissance significative de la réponse.
6	Potentialisation en dessous de zéro	Les effets d'une stimulation répétée peuvent continuer à s'accumuler même après que la réponse ait atteint un niveau asymptotique [...]. Cet effet de stimulation au-delà des niveaux asymptotiques peut altérer le comportement ultérieur, par exemple en retardant l'apparition de la récupération spontanée.
7	Stimulus spécifique	Dans la même modalité de stimulus, la diminution de la réponse montre une certaine spécificité du stimulus.
8	Déshabituaiton	La présentation d'un stimulus différent entraîne une augmentation de la réponse diminuée au stimulus original.
9	Habituation déshabituaiton	Après une application répétée du stimulus de déshabituaiton, la quantité de déshabituaiton produite diminue.
10	Habituation à long terme	Certains protocoles de répétition de stimulus peuvent entraîner une diminution des propriétés de la réponse.

Tableau 1 : Critères de l'habituation établis par Thompson and Spencer (1966), et mis à jour par Rankin et al. (2009)

IV.1.2. L'habituation dans les organismes non-neuronaux

IV.1.2.1. L'habituation chez les plantes

La première étude sur l'apprentissage chez les plantes a été menée en 1873 avec la plante sensible *Mimosa*, qui ferme ses feuilles après une stimulation mécanique. La présentation répétée des stimuli entraîne une baisse de la réponse par la plante, il s'agit des premiers résultats sur l'habituation dans des organismes non neuronaux²⁸³. Des expériences d'habituation ont été menées sur ce modèle afin de déterminer si le modèle peut différencier deux stimuli²⁸⁴⁻²⁸⁶. L'expérience comprenait une goutte d'eau et un toucher du doigt comme stimuli. Après que la plante se soit habituée aux gouttes d'eau, la feuille a été

touchée avec un doigt. Le toucher du doigt a provoqué la fermeture de la feuille, alors que la goutte d'eau ne déclenchait plus de réponse. Cette expérience est importante pour deux raisons. Premièrement, elle fournit des données montrant que l'habituation de la fermeture de la feuille n'est pas due à la fatigue. Deuxièmement, les résultats suggèrent que *Mimosa* peut trier les différents stimuli.

Gagliano et al. ont confirmé que le *Mimosa pudica* est un organisme capable d'habituation. Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'habituation au repli des feuilles est plus prononcée et persistante chez les plantes qui poussent dans des environnements énergétiquement coûteux. Le *Mimosa* peut afficher la réponse apprise même lorsqu'elle est laissée sans perturbations dans un environnement plus favorable pendant un mois. Lorsque ce modèle est présenté à un nouveau stimulus plus intense, cela permet la déshabitude du *Mimosa*, confirmant une des caractéristiques de l'apprentissage par habitude. Dans les organismes neuronaux, le mécanisme d'apprentissage est basé sur les canaux ioniques dépendants du voltage, les neurotransmetteurs et les changements dans la synthèse de protéines^{288,289}. Dans le modèle *Mimosa*, l'une des hypothèses concernant le mécanisme de l'habituation est l'implication des voies de signalisation aux Ca²⁺ qui jouent un rôle important dans le processus de fermeture des feuilles.

IV.1.2.2. L'habituation chez les organismes unicellulaires

L'habituation a aussi été observée dans plusieurs organismes unicellulaires, tels que chez les ciliés *Stentor roeseli* et *Stentor coeruleus*, ainsi que chez le « blob » *Physarum polycephalum*.

Habituation chez les ciliés

L'habituation chez les ciliés a été observée pour la première fois en 1902 par Jennings, qui a découvert que le *Stentor roeseli* devenait progressivement moins sensible à une stimulation mécanique répétée avec une baguette en verre. Plusieurs études faites dans les années 90, ont démontré que d'autres espèces de ciliés pouvaient être capables d'habituation suite à une stimulation répétée. A l'époque, les recherches sur l'habituation

dans ce type d'organisme se sont arrêtées en raison des difficultés à reproduire certains résultats. Aujourd'hui, plusieurs études s'intéressent au changement de comportement des organismes unicellulaires, remettant en lumière les travaux de Jennings²⁹¹. Récemment, une équipe a étudié le comportement du *Stentor coeruleus*²⁹². Lorsque le cilié rencontre un stimulus mécanique, il se rétracte, probablement sous l'effet d'un mécanisme de défense. Le modèle expérimental permet d'appliquer de façon répétée un stimulus d'une intensité constante, ce qui a permis d'observer un phénomène d'habituation. Cependant, le cilié est tout de même capable de répondre lorsque ce stimulus est d'une intensité plus forte.

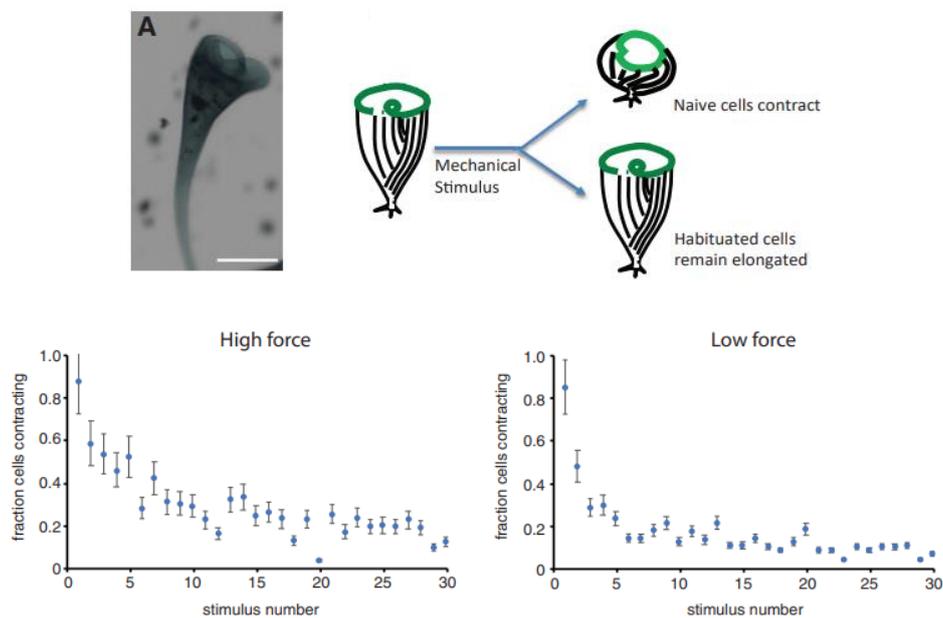


Figure 23 : Habituation chez le *Stentor coeruleus*. Lorsque le *Stentor* est stimulé mécaniquement, par exemple, par contact avec un prédateur, la cellule se contracte en une boule. Si une cellule a été stimulée de manière répétée et donc habituée, elle ignorera le stimulus et restera dans sa forme allongée. Les résultats montrent qu'après 30 stimuli (intenses ou non) appliqués à des intervalles de 1 minute, le *Stentor* décrit une habituation se traduisant par la réduction progressive de la contractilité des cellules. (Rajan et al. 2023)

Dans plusieurs études sur la capacité des ciliés à effectuer de l'habituation, les chercheurs ont constaté que la mémoire de l'habituation est distribuée dans toute la cellule, plutôt que d'être localisée dans une zone spécifique. En effet, couper un cilié en deux n'affecte pas la mémoire de l'habituation car les deux moitiés conservent l'information apprise et restent habituées. De plus, cette mémoire peut être partagée : si un seul cilié au sein d'une colonie est stimulé de manière répétitive, alors toute la colonie présente une forme d'habituation.^{292,293}

Des études ont montré que le « blob » répond à différents signaux environnementaux, tels que des facteurs solubles, la lumière, la température et la déformation du substrat sur lequel il repose. Le blob est un modèle utilisé pour étudier la résolution de problèmes dans des systèmes biologiques sans système nerveux. Ce modèle est capable de trouver le chemin le plus court lorsqu'il est placé dans un labyrinthe, d'anticiper des événements périodiques et d'utiliser des informations provenant d'autres blobs²⁷⁸.

Habituation chez le blob

Récemment, l'habituation chez le *Physarum polycephalum* a été étudiée²⁹⁴. Les chercheurs ont utilisé la chimiotaxie comme réponse comportementale, et la quinine ou la caféine comme stimulus, pour montrer que le blob apprend à ignorer ces stimuli lorsqu'ils sont répétés, mais y répond à nouveau après une certaine période d'abstinence. Ces résultats répondent aux critères d'habituation et permettent également de confirmer la spécificité du stimulus, en excluant la fatigue sensorielle et motrice du blob. Les observations ont aussi permis de confirmer une hypothèse selon laquelle la vitesse de migration du blob ne reflète pas directement les conditions environnementales, mais la relation entre la mémoire de l'environnement précédent et l'environnement actuel²⁹⁵.

Comme les ciliés, lorsque le blob habitué est découpé, ses plus petites parties montrent aussi des capacités d'habituation confirmant que la mémoire est stockée dans tout l'organisme, et non dans une zone spécifique²⁹⁶. Le blob peut aussi transmettre la réponse comportementale d'habituation à un autre blob, qui n'a pas été conditionné, en fusionnant son cytoplasme avec celui-ci²⁹⁷.

IV.1.2.3. L'habituation dans des lignées cellulaires

Les cellules d'organismes pluricellulaires doivent également détecter et répondre à plusieurs signaux présents dans leur environnement, qui peuvent être changeants en termes de composition et de structure. Les cellules PC12 en culture, dérivées d'une tumeur médullaire surrénalienne de rat, ont été utilisées afin d'étudier les capacités d'habituation chez des lignées cellulaires en culture²⁹⁸. Il a été démontré que ces cellules présentent une habituation en réponse à une stimulation répétée par l'acétylcholine, ou des impulsions d'ions potassium K+, qui se traduit par un arrêt de la sécrétion de neurotransmetteurs. Cette sécrétion est retrouvée après une période de repos, ce qui est une caractéristique de l'habituation. En complément, d'autres études ont éliminé la possibilité qu'un phénomène d'épuisement soit à l'origine de l'habituation des PC12^{299,300}. De plus, les cellules PC12 présentent une spécificité, un effet de fréquence, un effet d'intensité, une habituation à court terme, une habituation à long terme et une déshabitude³⁰¹.

Une expérience menée sur des macrophages, a montré une décroissance progressive de la sécrétion d'interleukine 6 (IL-6) suite à une exposition répétée à du lipopolysaccharide bactérien (LPS), ce qui pourrait indiquer une forme d'habituation chez ces cellules³⁰².

IV.2. Apprentissage associatif

Les différentes études réalisées sur les organismes non-neuronaux, ont permis de remettre en cause l'exclusivité de la capacité d'apprentissage non-associatif à des organismes possédant un système nerveux. Une autre question se pose, ces organismes sont-ils aussi doués d'apprentissage associatif ?

La mémoire associative est définie comme un changement comportemental suite à l'association entre différents stimuli, à l'inverse de l'apprentissage non-associatif qui ne nécessite qu'un seul stimulus. Il existe plusieurs types d'apprentissage associatif, selon les événements associés : le conditionnement classique et le conditionnement opérant.³⁰³

Le conditionnement opérant (ou conditionnement instrumental) est une forme d'apprentissage associatif dans laquelle un comportement est renforcé, ou puni, en fonction de ses conséquences³⁰⁴. Dans le conditionnement opérant, l'organisme apprend à associer un comportement volontaire avec une conséquence. Si la conséquence est positive (renforcement), le comportement est plus susceptible de se reproduire à l'avenir. Si la conséquence est négative (punition), le comportement est moins susceptible de se reproduire à l'avenir. Le conditionnement opérant est utilisé pour entraîner les animaux à effectuer des tâches spécifiques, comme appuyer sur un levier pour obtenir de la nourriture.

Le conditionnement classique est l'une des formes d'apprentissage associatif la plus étudiée. Il peut aussi se nommer conditionnement pavlovien, en référence au physiologiste qui a mis en évidence cette forme d'apprentissage, Ivan Pavlov³⁰⁵. Dans le conditionnement de Pavlov, deux stimuli sont mis en jeu : un stimulus non conditionné (US) et un stimulus conditionné (CS). Le US provoque une réponse non conditionnée (UR) chez l'organisme, alors que le CS est d'abord un stimulus neutre (NS) avant conditionnement et ne provoque pas de réponse. Après une phase de conditionnement/entraînement, le NS devient un CS qui est associé au US, provoquant alors une réponse conditionnée (CR) sans la présentation du US.

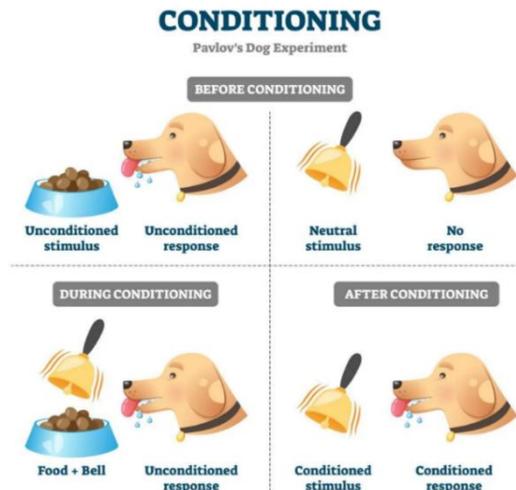


Figure 24 : Représentation de l'expérience du chien de Pavlov. Lorsque de la nourriture (US) est présentée au chien, celui-ci se met à saliver (UR). Avant le conditionnement, le son de la cloche (NS) ne provoque pas de réponse chez le chien. Pendant la phase d'entraînement, Pavlov a associé le son d'une cloche (NS), avec l'arrivée de nourriture (US). À la suite de ce conditionnement, lorsque la cloche sonne (CS), cela provoque la salivation (CR) sans présentation de nourriture (US). Logan 2002

IV.2.1. Le conditionnement classique dans les organismes non-neuronaux

Plus encore que l'habituation, l'apprentissage associatif est considéré comme exclusif aux organismes possédant un système nerveux central. Cependant, plusieurs chercheurs se sont intéressés à la capacité des organismes non-neuronaux à associer différents stimuli.

IV.2.1.1. Apprentissage associatif chez les plantes

Dans l'étude menée par Monica Gagliano et son équipe, les auteurs ont exposé des plants de pois, *Pisum sativum*, à deux stimuli différents : le vent et la lumière³⁰⁷. Les plantes ont été placées dans un labyrinthe en Y et ont subi différents conditionnements. Dans un des conditionnements, le vent et la lumière sont placés dans la même branche du tube en Y (V+L ; Fig 23 i), et dans l'autre, les stimuli sont présentés séparément, chacun dans une des deux branches (V vs L ; Fig 23 ii). L'objectif était de déterminer la possibilité d'une

association positive (croissance vers le vent) entre les stimuli, ou une association négative (éviter le vent). Après cette étape d'entraînement, les plants ont été placés dans un autre labyrinthe en Y, avec cette fois-ci le vent comme seul stimulus. Les résultats décrivent une association positive pour le groupe où les stimuli étaient placés dans la même branche (V+L), avec les plantes poussant en direction du vent. Dans le groupe où les stimuli étaient opposés (V vs L), les plants de pois poussent dans la branche opposée au vent, traduisant une association négative entre les deux stimuli. Ces résultats suggèrent une capacité des plantes à effectuer un apprentissage associatif.

Toutefois, ces résultats surprenants n'ont pas pu être reproduits³⁰⁸. Les plants de pois de cette étude n'ont montré qu'une légère tendance à la croissance directionnelle vers la lumière précédemment présentée, plutôt qu'une réponse fiable. Cependant, cette étude n'a pas reproduit les expériences dans les mêmes conditions, en utilisant une espèce de pois différente de l'étude initiale, et en utilisant une source de lumière LED différente, ce qui pourrait avoir un impact sur l'association des stimuli³⁰⁹. Des études complémentaires devront être réalisées pour déterminer si des plantes peuvent être capables d'apprentissage associatif.

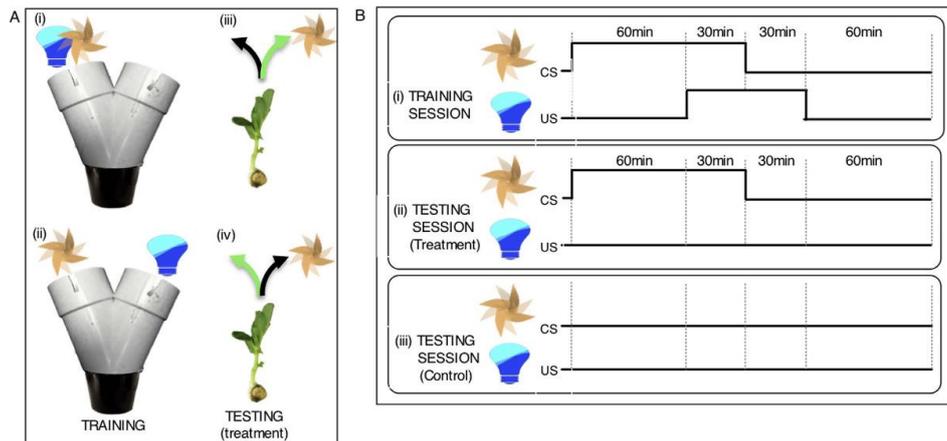


Figure 25 : Protocole d'entraînement et de test pour l'apprentissage associatif chez les plants de pois. (A) Pendant l'entraînement, les plants ont été exposés au ventilateur [V] et à la lumière [L], soit sur le même bras (i), soit sur le bras opposé (ii) du labyrinthe en Y. Le ventilateur a servi de stimulus conditionné (CS), la lumière de stimulus non conditionné (US). Lors des tests avec exposition au ventilateur seul, deux réponses ont été distinguées. Réponse prédictive : Les plants de pois ont poussé dans le bras du labyrinthe où la lumière était "prédite" par le ventilateur pour croître [flèche verte ; iii (correspondant au scénario i) et iv (correspondant au scénario ii)] ; Réponse non prédictive : Les plants de pois ont poussé dans le bras du labyrinthe où la lumière n'était pas "prédite" par le ventilateur pour croître (flèche noire). (B) Les plants de pois ont été entraînés pendant trois jours consécutifs avant les tests. (i). Pendant la session de tests d'une journée, les plants de pois ont été exposés au ventilateur seul pendant trois sessions de 90 minutes (ii). Gagliano et al. 2016

IV.2.1.2. Apprentissage associatif dans les organismes unicellulaires

Conditionnement chez les ciliés

L'étude de la capacité des organismes unicellulaires à effectuer de l'apprentissage associatif a débuté dans les années 40 avec les recherches de Beatrice Gelber³¹⁰. Dans son travail,

elle s'est posé la question de savoir si *Paramecia*, qui se nourrit de bactéries, est capable d'approcher un fil qui a régulièrement été enduit de bactéries. Dans son modèle expérimental, les bactéries constituent le US, le fil est le CS, et le mouvement vers le fil, le CR. L'étape d'entraînement consiste à présenter à *Paramecia* un fil enduit de bactéries de manière répétée (40 fois). A la suite de ce conditionnement, lorsqu'un fil nu est présenté au *Paramecium*, cela déclenche le mouvement vers le fil, car l'organisme a associé le fil avec la présence de nourriture. Un conditionnement contrôle a été effectué, où le fil présenté n'était pas enduit de bactéries, et, lors du test, les *Paramecia* ne se déplaçaient pas vers le fil. Gelber a émis l'hypothèse que la mémoire associative pouvait être stockée dans le noyau. Afin d'éviter toute réorganisation du matériel nucléaire lors de la reproduction sexuée (conjugaison) et de l'auto-fécondation (autogamie), elle a utilisé un seul type de reproduction et de faibles quantités de bactéries pour respectivement diminuer ces processus. Dans d'autres travaux, elle a observé que les *Paramecia* conservaient leur mémoire jusqu'à 3 heures après un entraînement espacé, mais pas après un entraînement plus dense^{311,312}. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet de rétention, et est observé chez de nombreuses espèces animales. Enfin, Gelber a observé un phénomène appelé réminiscence, où l'intensité de la réponse augmente avec des intervalles de rétention modérés, avant de diminuer à nouveau³¹³. Ces résultats suggèrent que l'apprentissage des cellules uniques pourrait être plus répandu et fondamental que ce qui était précédemment pensé.

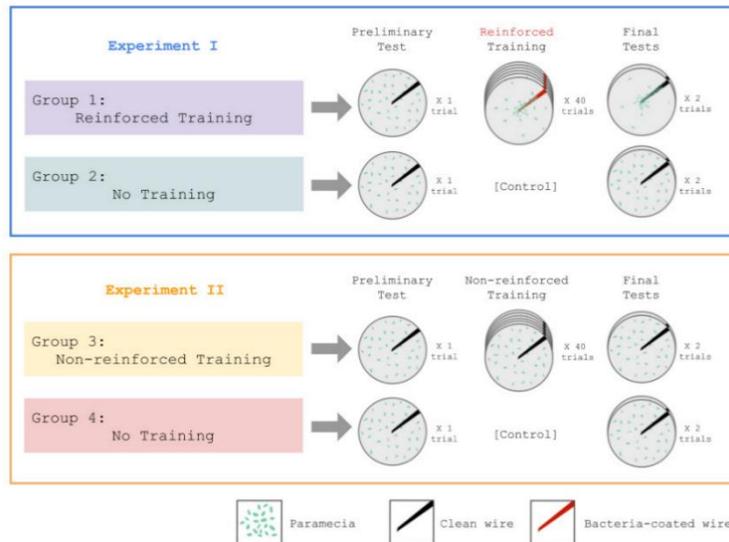


Figure 26 : Modèle expérimental du conditionnement chez le *Paramecium*. Dans l'expérience 1, un groupe de *Paramecia* a été exposé à des essais d'entraînement intermittents, au cours desquels un fil métallique était enduit de bactéries. Ce groupe a acquis une réponse conditionnée, même face à un fil propre, mesurée par l'adhérence au fil dans les essais de tests finaux. Le groupe non entraîné n'a pas montré de réponse conditionnée. L'expérience 2 a démontré que le fil métallique par lui-même n'entraînait pas de réponse conditionnée. (Gershman et al. 2021)

Ces résultats sont les premiers décrivant un apprentissage associatif chez un organisme non neuronal, mais ils ont été controversés par leur manque de réplicabilité. Cependant, d'autres études sur le *Paramecium* confirment l'hypothèse que cet organisme est capable d'association. Dans une expérience menée par Hennessey, il a été démontré que les *Paramecium caudatum* pouvaient être conditionnés. Le fait d'associer un choc électrique avec une vibration d'une fréquence spécifique provoquait, par la suite, une réponse défensive à la vibration seule³¹⁵. Dans les années 2000, une série d'études a été menée en utilisant un choc électrique doux comme US et la lumière comme CS³¹⁶. Les ciliés devaient choisir entre un compartiment sombre et un compartiment lumineux, avec le côté sombre

parfois à gauche, parfois à droite. Les ciliés ont reçu un choc électrique attractif dans le compartiment lumineux, et aucun choc dans le compartiment sombre (ou l'inverse). Lors de la phase de test, les ciliés ont appris à entrer dans le compartiment lumineux (ou sombre) indépendamment de son emplacement, mais en lien avec le choc électrique associé dans le passé.

Conditionnement chez les amibes.

Plus récemment, une étude a investigué si des amibes pouvaient avoir un comportement conditionné³¹⁷. L'amibe *amoeba proteus* a été utilisée comme modèle. Cet organisme réalise une forte galvanotaxie en se déplaçant vers la cathode dans un champ électrique. Les auteurs ont exposé les amibes à un champ électrique et à un peptide attractif simultanément, avec le peptide localisé au niveau de l'anode. À la fin de ce conditionnement, la plupart des amibes ont associé l'anode avec la présence du peptide et ont ainsi modifié leur galvanotaxie, en se dirigeant cette fois-ci vers l'anode. Les auteurs ont testé la robustesse et la durée de ce comportement conditionné en soumettant les amibes à différentes perturbations, comme l'inversion du champ électrique ou l'absence de stimulus pendant un certain temps. De plus, ils ont également confirmé un comportement similaire chez une autre espèce d'amibe, *Metamoeba leningradensis*. Ces résultats suggèrent que ce comportement conditionné est la manifestation d'une mémoire associative primitive chez les organismes unicellulaires, qui leur permet de s'adapter à des environnements changeants.

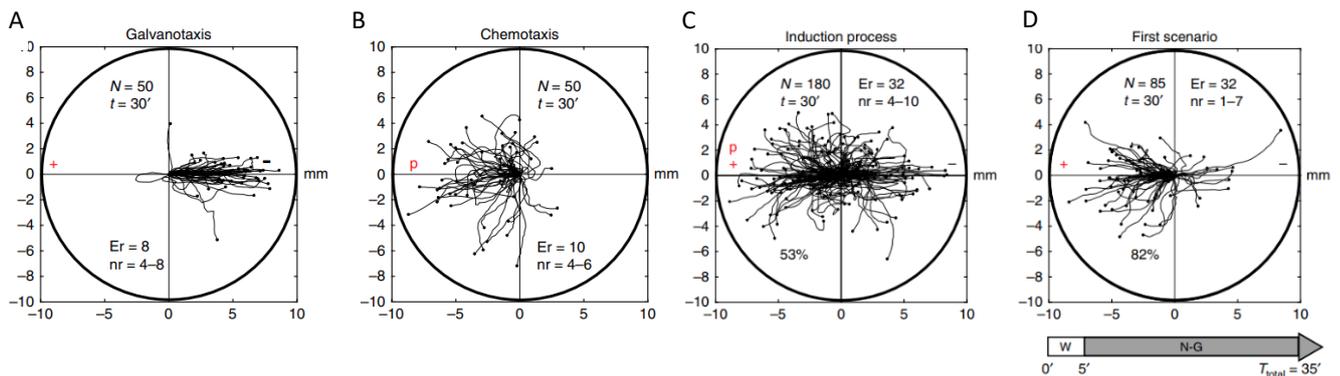


Figure 27 : Conditionnement chez l'*Amoeba proteus*. **(a)** Sous des conditions de galvanotaxie, pratiquement toutes les amibes migrent vers la cathode. **(b)** Dans le deuxième résultat, sous des conditions de chimiotaxie, 86% des cellules migrent vers le gradient chimiotactique. **(c)** Conditionnement des amibes en associant la présence du peptide avec l'anode. **(d)** 82% des amibes présentent une migration dirigée vers l'anode qui a été associée avec la présence du peptide. Le comportement de migration conditionné observé chez l'*Amoeba proteus* est une preuve d'un type primitif de mémoire associative chez les organismes unicellulaires. (la Fuente et al. 2019)

Conditionnement dans les lignées cellulaires

Une étude réalisée sur les macrophages, a investigué la capacité de ces cellules immunitaires à faire de l'apprentissage associatif³⁰². Les macrophages en culture ont subi une phase de conditionnement afin d'associer le LPS (US) et la streptomycine (CS). Le niveau de sécrétion d'interleukine-6 (IL-6) a été utilisé comme mesure de réponse prédictive (CR). Lors de la phase de test, l'ajout de LPS n'a pas provoqué la réponse conditionnée. Cependant, l'habituation a été observée chez ces cellules, avec une diminution de la sécrétion d'IL-6 de 62% après trois présentations de LPS. À ce jour, il s'agit de la seule étude ayant testé la capacité de cellules en culture à faire de l'apprentissage associatif. L'absence de réponse conditionnée doit cependant être interprétée avec précaution car les auteurs, en essayant de transposer le modèle cognitif classique, ont

choisi un CS le plus neutre possible et qui ne provoque pas de réponse chez les cellules. Or, il est difficile de savoir si les cellules peuvent effectivement détecter un tel CS si aucune réponse n'est observable. Nous touchons ici aux limites de la transposition de concepts développés dans un cadre cognitif : la cloche n'induit normalement pas de réponse spécifique chez le chien, mais nous savons, pour sûr, que le chien peut l'entendre. De plus, l'absence de réponse à la cloche n'est vraie qu'au niveau comportemental ; mais si nous devions considérer l'activation des nerfs auditifs, une réponse serait observée. Ainsi, il est important de considérer que les concepts développés chez des organismes pourvus d'un cerveau ne sont pas directement transposables à des organismes plus simples.

Objectifs de la thèse

La mémoire mécanique est un phénomène relativement bien décrit dans des cellules de mammifères en culture. Son impact sur la vitesse de migration, l'invasion et la différenciation sont bien établies. D'un autre côté, des types de mémoire plus classiques, comme l'habituation, sont également possibles chez des lignées cellulaires en culture. L'intérêt de la mémoire, quelle qu'en soit le type ou la définition, est de permettre une meilleure adaptabilité à des conditions environnementales changeantes.

Le premier objectif de ma thèse a été de tester l'impact de la mémoire mécanique sur la durotaxie en utilisant comme modèle des ostéoblastes murins, ainsi qu'une lignée de cancer du sein humaine (MDA-MB-231). L'idée sous-jacente étant qu'un conditionnement sur un substrat présentant une rigidité définie pourrait moduler la rigidité préférentielle des cellules, et donc moduler leur capacité durotactique.

Ensuite, en cherchant à complexifier l'histoire environnementale des cellules, au-delà de l'unique variable de rigidité, j'ai voulu tester la possibilité que des cellules de mammifères en culture soient capables d'associer des stimuli co-présentés dans leur passé pour orienter leur choix de migration. En d'autres termes, notre objectif était de déterminer si les cellules sont capables d'adaptations complexes, évoquant un phénomène de mémoire associative. J'ai pour cela conditionné les cellules sur substrat dur ou mou, en présence ou en carence de sérum, avant de tester leur comportement migratoire sur le gradient de rigidité.

Enfin, le dernier objectif de ma thèse a été d'étudier les mécanismes par lesquels les cellules s'adaptent à un tel protocole d'apprentissage, et comment cela leur permet de changer de comportement migratoire sur le gradient de rigidité.

Matériels et méthodes

I. Lignées cellulaires

Les ostéoblastes de souris immortalisés ont été offerts par C. Albiges-Rizo (IAB, Grenoble, France) et les cellules cancéreuses du sein humain MDA-MB-231 ont été offertes respectivement par P. Chavrier (Institut Curie, Paris, France). Les deux lignées cellulaires ont été cultivées dans du DMEM Glutamax (Gibco) supplémenté de 10% (v/v) de sérum de veau foetal (FBS - Sigma-Aldrich), dans une atmosphère à 10% de CO₂ et à humidité contrôlée.

II. Synthèse des gels de polyacrylamide

Les gels de polyacrylamide (PA) ont été synthétisés sur des lamelles en verre carré (22 mm-Marienfeld) ou des plaques à fond de verre (plaques à puits noirs 12-24 1.5P - IBL). Les surfaces en verre ont d'abord été incubées pendant 15 minutes à température ambiante (RT) avec un mélange de 2/3 de volume d'eau miliQ et 1/3 de volume de 3-aminopropyltriméthoxysilane (APTMS - Sigma-Aldrich), puis rincées à l'eau miliQ. La surface en verre a ensuite été incubée pendant 30 minutes à RT avec du glutaraldéhyde à 0,5 % dans du PBS, puis à nouveau rincée à l'eau miliQ et séchée à l'air comprimé ou à l'air libre. Une goutte de 22 µl de solution de PA a été déposée soit sur une surface en verre rincée et aplanie à l'aide de la lamelle préalablement traitée, soit au fond du puit des plaques à fond de verre et aplanie avec une lamelle non traitée. Les solutions de PA ont été polymérisées pendant 90 minutes avant d'être hydratées avec du PBS (Gibco) pendant 15 à 20 minutes. Les lamelles ont ensuite été retirées et rincées dans du PBS. Les gels de PA ont ensuite été traités pour permettre la réticulation d'une protéine de la matrice extracellulaire à la surface du gel. Les gels ont été incubés pendant 30 minutes sous une agitation lente avec un mélange de 3/5 de volume de HEPES à 50 mM (Sigma-Aldrich) pH 7,5, 1/5 de volume de Sulfo-Sampah (Thermo-Fisher - 1 mg/ml dans du HEPES à 50 mM pH 7,5) et 1/5 de volume de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide

hydrochloride (EDC - Sigma-Aldrich - 10 mg/ml dans du Hepes à 50 mM pH 7,5). Les gels ont ensuite été réticulés sous une lumière UV pendant 10 minutes avant d'être lavés avec du PBS stérile. Enfin, les gels de PA ont été incubés pendant la nuit à 37°C avec soit 50 µg/ml de collagène de queue de rat de type I (Gibco) dans de l'acide acétique (0,02M - VWR).

Les solutions de PA de différentes rigidités ont été préparées, comme indiqué dans le tableau, en utilisant de l'acrylamide à 40% (BioRad), du bisacrylamide à 2% (BioRad), du persulfate d'ammonium (APS - Sigma-Aldrich) et de la tétraméthyléthylènediamine (TEMED - Invitrogen). La solution de PA a été vortexée et immédiatement déposée sur la surface en verre appropriée. L'élasticité des différents gels a été contrôlée par microscopie à force atomique.

Rigidité (kPa)	PBS	Acrylamide 40%	Bis-acrylamide 2%	APS	TEMED
0,1	83.3%	13.4%	2%	1%	0.3%
5	77.2%	18.5%	3%	1%	0.3%
18	8.5%	20.5%	70.5%	1%	0.3%
30	34%	45%	20%	1%	0.3%
80	6%	40%	52.7%	1%	0.3%

Tableau 2 : Composition en PA pour obtenir des rigidités de gels variables

III. Synthèse des gradients de rigidité

Les gradients de rigidité ont été fabriqués selon la méthode employée par Barber-Pérez et al. (2020). Deux gouttes de 4,5 µL de solution de polyacrylamide (PA), représentant les extrémités du gradient de rigidité, ont été placées dans un puit d'une plaque à fond de verre (plaques à puits noirs 12-24 1.5P - IBL). Afin de visualiser le gradient à l'épifluorescence, la solution de PA donnant la rigidité la plus forte a été complétée avec 1,5 µL de billes fluorescentes (0.2 µm - 660/680 nm - Invitrogen). Une fois les gouttes déposées, une lamelle de verre (diamètre de 18 mm, n°1 – Marienfeld) a été déposée pour

aplanir et mélanger les deux solutions. La suite du protocole reprend celui de la fabrication des gels de Polyacrylamide classique.

IV. Fonctionnalisation des lamelles de verres

Les lamelles de verre stérilisées ont été incubées pendant 1 heure à 37°C avec 50 µg/ml de collagène de queue de rat de type I dans de l'acide acétique (0,02 M).

V. Méthode de conditionnement des cellules

Les cellules ont été décongelées puis directement placées en condition de culture classique (Plastique TCIP, 10 % sérum de veau fœtal dans du DMEM) pendant une nuit pour récupérer. Le lendemain, les cellules ont été décollées de la surface TCIP par ajout de Trypsine EDTA (0,25%)-Gibco. Les cellules une fois en suspension, 50 000 cellules ont été déposées ou sur un substrat mou (gel de PA de rigidité 0,1kPa recouvert de collagène de type I) ou sur substrat dur (verre ou gel de PA de rigidité 2kPa, les deux recouverts de collagène de type I) avec 2% ou 10% de SVF pendant 3 jours. Après 3 jours sur ces substrats, les cellules ont été mises en suspension par ajout de trypsine. 50 000 cellules ont été récupérées de cette suspension puis ont été placées ou sur un substrat mou (0,1 kPa) ou sur un substrat dur (verre ou 2 kPa) avec 2% ou 10% de SVF pendant 3 jours. A la fin de ces 3 jours, les cellules ont été suspendus par la trypsine et 20 000 de ces cellules ont été récupérées et placées et sur le gradient de rigidité (0,1/80 ou 0,1/2 kPa avec 10% de SVF recouvert de collagène de type I) pendant 5h afin de les laisser adhérer. A la suite de ces 5h, le test de migration a été lancé.

VI. Test de migration sur le gradient de rigidité

Les cellules, à la fin du conditionnement, ont été transférées pendant 5 heures sur le gradient de rigidité recouvert de Col I, pour leur permettre d'adhérer, avant d'être observées en champ clair ou en contraste de phase, avec une image toutes les 20 minutes pendant 16 heures.

Les cellules ont été choisies sur une région de travail sur le gradient de rigidité. Cette zone est de 300-400 μm de hauteur sur 1 330 μm de largeur (notre champ étant de 1330x1330 μm). La zone de travail a été placée de façon que le milieu de la hauteur de cette zone soit sur la limite de visibilité des billes fluorescentes de la partie dure du gradient. Les cellules ont été suivies manuellement en utilisant le plugin "Manual Tracking" de FIJI. Les données du tracking manuel ont été analysées avec le plugin de Ibbidi « Chemotaxis and Migration Tool » dans FIJI. L'analyse de ces tracking ont permis d'obtenir comme données, les indices de migration de la population cellulaire sur l'axe du gradient de rigidité (FMI) ainsi que les vitesses moyennes de la population cellulaire (distance accumulée sur le gradient en $\mu\text{m}/16\text{h}$). Pour chaque condition, 80-100 cellules ont été suivies manuellement. Nous considérons que les cellules sortant d'un conditionnement comprenant un seul type de rigidité (dur ou mou) font de la durotaxie avec une FMI $\geq 0,5$. Les cellules sortant d'un conditionnement comprenant les 2 types de rigidité (dur et mou), font de la durotaxie FMI $\geq 0,35$.

VII. Anticorps, siRNA et shRNA

L'anticorps monoclonal de souris YAP a été acheté chez Santa-Cruz (sc-101199), et l'anticorps d'Alexa fluor 633 phalloïdine a été acheté chez Molecular Probes (A22284). Le siRNA de contrôle et les SMARTpool siRNA contre Itg α 4 et Itg α 6 ont été achetés chez Dharmacon. Les shYAP contre YAP ont été construits et achetés chez VectorBuilder.

VIII. Transfection des siRNA et shRNA

Les ostéoblastes ont été transfectés avec des siRNA (à 30nM) contre l'intégrine α 4 et l'intégrine α 6 en utilisant le réactif Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Dans une expérience contrôle en parallèle, les ostéoblastes ont été transfectés avec un siRNA de contrôle non ciblé. La transfection des shRNA contre YAP a été réalisée selon les instructions du fabricant (VectorBuilder)

IX. Immunofluorescence et microscopie à épifluorescence

Les gels de PA ont été revêtus de 50 µg/ml de collagène de queue de rat de type I dans 0,02 M d'acide acétique pendant 1 heure à température ambiante, avant d'être lavés avec du PBS. Les cellules préalablement préparées ont été transférées sur le gel fonctionnalisé avec du Col I (substrat rigide secondaire) et ont été incubées à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 24 heures.

Les cellules ont été laissées 5h sur les gels pour les laisser adhérer. Après trois lavages rapides avec du PBS, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 4% (PFA - ThermoFischer) pendant 15 minutes à température ambiante avant d'être lavées avec du PBS. Les cellules ont ensuite été incubées avec des anticorps primaires (1 :200) pendant 1h30 à température ambiante avant d'être lavées avec du PBS. Enfin, les cellules ont été incubées avec des anticorps secondaires (1:200) et de la phalloïdine Alexa fluor 633 pendant 1 heure à température ambiante et lavées avec du PBS avant d'être montées avec Fluoromount-G avec DAPI (Invitrogen)

X. Microscopie d'immunofluorescence indirecte et quantification de la fluorescence

Les images d'immunofluorescence ont été acquises 24 heures après que les cellules aient été placées et fixées sur les différents gels de PA, sur un microscope à épifluorescence Leica (Leica Microsystems Ltd., Wetzlar, Allemagne) à travers un objectif 63x (N.A. 1.40). Le microscope a été piloté par le logiciel dédié LasX® de Leica.

Pour quantifier la surface cellulaire et l'aire du noyau, les zones d'intérêt ont été sélectionnées manuellement en utilisant respectivement la coloration de la phalloïdine et du DAPI. Pour chaque condition, des mesures ont été effectuées sur 30 à 40 cellules dans 1 à 2 expériences. Toutes les quantifications sur les images d'immunofluorescence ont été effectuées avec FIJI, après soustraction de l'arrière-plan.

XI. Microscopie en temps réel et quantification des essais de migration

Les vidéos en temps réel ont été acquises sur un microscope épifluorescence Leica (Leica Microsystems Ltd., Wetzlar, Allemagne) à travers un objectif 10x (Fluotar N.A. 0,32 PH1). Une chambre PeCon i8 a été installée sur le microscope pour effectuer des observations en direct à 37°C avec 5% de CO₂. Le microscope a été piloté par le logiciel dédié LasX® de Leica.

XII. Séquençage de l'ARN et analyse

Des ostéoblastes ont été conditionnés pour obtenir des cellules durotactiques (St10) et des cellules molloctactiques (So10/St2). A la fin du conditionnement, les cellules ont été collectées. Le séquençage de l'ARN a été réalisé sur l'ARN sélectionné par poly(A) extrait de 250 000 cellules de lignée cellulaire d'ostéoblastes de souris, en utilisant le kit RNeasy Plus Mini (Qiagen) en suivant le protocole du fabricant. Des bibliothèques Illumina de brins poly-(A) sélectionnés ont été préparées avec un protocole TruSeq modifié en utilisant la méthode dUTP368. Trois répliques biologiques par condition ont été préparés. Les bibliothèques ont été sélectionnées par taille en utilisant des billes AMPure XP SPRI, ont été amplifiées par PCR (maximum 16 cycles) et purifiées avec des billes AMPure XP, puis séquencées en mode paired-end (75 pb) sur le séquenceur Illumina NextSeq 500.

Les lectures de séquençage ont été pseudo-alignées au génome de souris ENSEMBL GRCm38 et l'abondance a été quantifiée en utilisant Kallisto369. L'analyse d'expression différentielle a été effectuée à l'aide du package R Sleuth370. Les graphiques de heatmap ont été tracés à l'aide des packages R ggplot2 et pheatmap.

XIII. Terminologie

L'adaptation consiste en la capacité d'intégrer un ou plusieurs stimuli de l'environnement, ce qui confère un avantage pour un organisme. Le terme de « mémoire » fait référence à la capacité de conserver une adaptation acquise d'un environnement passé, pendant un certain temps, sur un nouvel environnement. La mémoire mécanique cellulaire peut faire écho à la

différentiation cellulaire en réponse à un signal mécanique, mais sans modification du type cellulaire. Cette différenciation peut être maintenue (forme de « mémoire ») ou perdue (dédiﬀérenciation / perte de « mémoire »).

XIV. Analyses statistiques

Les données de FMI sont présentées avec la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM) d'au moins, ou spécié, 3 expériences indépendantes avec 80-100 cellules par expérience. Les données de vitesse de migration sont présentées avec la vitesse moyenne de la population cellulaire et la SEM d'au moins, ou spécié, 3 expériences indépendantes avec 80-100 cellules par expérience. Les différences statistiques entre les conditions ont été évaluées à l'aide d'un test t de Student. L'analyse a été réalisée sur le logiciel GraphPad Prism 8.0. La non-signiﬁcativité (valeur de $p > 0,05$) est supposée lors de l'absence de crochet, la signiﬁcation des valeurs de p est indiquée sous la forme « * » : $p < 0,05$; « ** » : $p < 0,01$; « *** » : $p < 0,001$.

Résultats

I. La mémoire mécanique module la durotaxie

I.1. La congélation/décongélation affecte la durotaxie

Mon premier objectif a été de déterminer si la mémoire mécanique régule les capacités durotactiques des cellules. J'ai tout d'abord réalisé des essais de migration sur un gradient de rigidité allant de 0.1 à 80 kPa et fonctionnalisé par du collagène de type I. J'ai pour cela utilisé des ostéoblastes murins immortalisés par transduction avec un rétrovirus exprimant le grand antigène T de SV40 (Brunner et al. 2011), et maintenus dans des conditions classiques de culture (Plastique TCIP, 10 % sérum de veau fœtal dans du DMEM).

J'ai observé que ces cellules (CTR) durotaxent efficacement sur le gradient (**Fig. 28.Ai** et **Fig. 28.B**). J'ai ensuite conditionné des ostéoblastes sur un substrat mou (0.1 kPa, recouvert de collagène-I) pendant 3 jours (Mou), avant de transférer les cellules sur le gradient de rigidité. J'ai observé que les ostéoblastes conditionnés pendant 3 jours sur un substrat mou durotaxent aussi bien que les ostéoblastes contrôle (**Fig. 28.Aii** et **Fig. 28B**). On peut aussi observer que la vitesse de migration est similaire entre ces deux conditions (**Fig. 28.C**).

Ces premiers résultats suggèrent que la mémoire mécanique ne régule pas la durotaxie. Toutefois, les cellules utilisées lors de ces tests étaient auparavant maintenues en culture pendant au moins une semaine sur un substrat très dur (plastique). Pour vérifier si le temps passé en culture sur plastique impacte la durotaxie, j'ai décidé de décongeler des ostéoblastes et de les laisser récupérer sur une nuit en condition de culture classique (J-1). Le lendemain, les cellules ont été transférées sur le gradient de rigidité et j'ai observé qu'elles ne réalisaient pas la durotaxie mais migraient aléatoirement (**Fig. 28.Biii**). J'ai obtenu le même résultat en mettant en culture des cellules congelées directement sur le gradient (J-0) (**Fig. 29B.iv**). Il est important de noter que la vitesse moyenne de migration des cellules est similaire, quel que soit le temps passé en culture avant l'essai de migration (**Fig. 28.C**). Ceci suggère que les cellules fraîchement décongelées ne souffrent pas et n'ont

pas de difficultés particulières pour migrer. En revanche, les cellules fraîchement décongelées ne migrent pas vers la région dure du gradient, alors que des cellules ayant été en culture au moins une semaine sur du plastique réalisent la durotaxie.

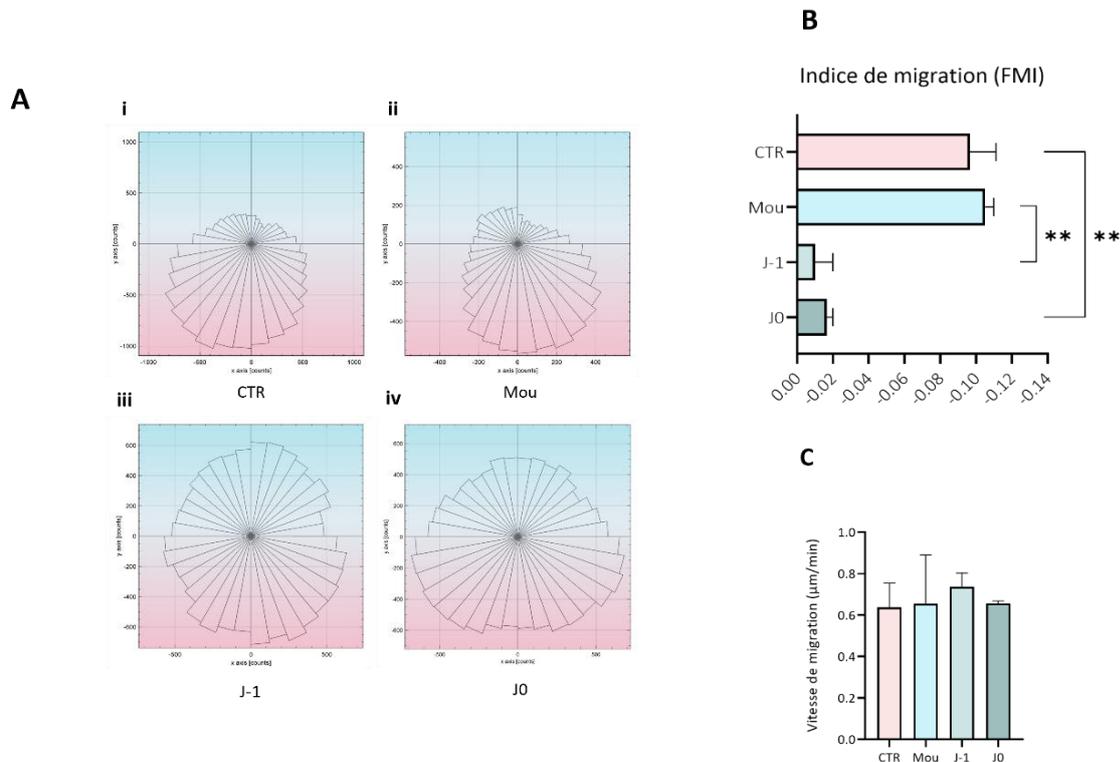


Figure 28 : La congélation/décongélation affecte la durotaxie. **A)** Représentation de la migration des ostéoblastes sur le gradient de rigidité (avec la partie dure du gradient en rouge et la partie molle en bleu). Dans la condition **CTR(i)** et **MOU(ii)**, les cellules migrent vers la partie rigide du gradient, ces cellules font de la durotaxie. Dans la condition **J-1(iii)** et **JO(iv)**, les cellules migrent aléatoirement. $2 < N < 3$, ≈ 100 cellules par N. **B)** Indice de migration (FMI) de la population cellulaire le long du gradient de rigidité. Ici, le gradient se rigidifie de haut en bas (axe Y). Plus la valeur est négative et plus les cellules performant une forte durotaxie. Si la valeur se rapproche de 0, les cellules migrent aléatoirement. $2 < N < 3$, ≈ 100 cellules par N. **C)** Vitesse de migration moyenne des ostéoblastes sur le gradient de rigidité pendant 16 heures. Barre d'erreur = SEM. Absence de crochet carré : non statistiquement significatif. Les crochets carrés indiquent un résultat statistiquement significatif : $** p < 0,01$.

1.2. La durotaxie est acquise par un conditionnement sur un substrat dur

Ces derniers résultats suggèrent que i) la congélation/décongélation des cellules affecte leur capacité à durotaxer, et ii) le temps de culture sur plastique après décongélation conduit les ostéoblastes à réaliser de la durotaxie. De façon à tester plus directement l'impact de la rigidité du substrat passé sur les capacités durotactiques, j'ai ensuite utilisé systématiquement, et pour le reste du projet, le même protocole : décongélation et mise en culture des cellules sur plastique TCIP pour 16h, puis conditionnement pour le temps indiqué sur les différents substrats. Pour tester le rôle de la rigidité passée sur l'acquisition du phénotype durotactique, les cellules ont subi un conditionnement sur substrat mou (0.1 kPa - So3 et So6) ou dur (verre - St3 et St6) pendant 3 ou 6 jours (**Fig. 29.A**). J'ai ainsi observé que les cellules ayant été conditionnées sur un substrat dur (3j ou 6j) sont capables de réaliser la durotaxie sur le gradient (**Fig. 29.Bi, ii** et **Fig. 29.C**). En revanche, les cellules conditionnées sur un gel de 0.1 kPa pendant 3 ou 6 jours ne sont pas capables de réaliser la durotaxie et migrent de façon aléatoire sur le gradient (**Fig. 29.Biii, iv** et **Fig. 29.C**). La vitesse de migration est similaire entre les différents conditionnements, ce qui indique que les cellules n'ont pas de difficultés à migrer après ces conditionnements (**Fig. 29.D**). Ces résultats suggèrent que la durotaxie est acquise par les cellules lors d'un conditionnement d'au moins 3 jours sur un substrat rigide.

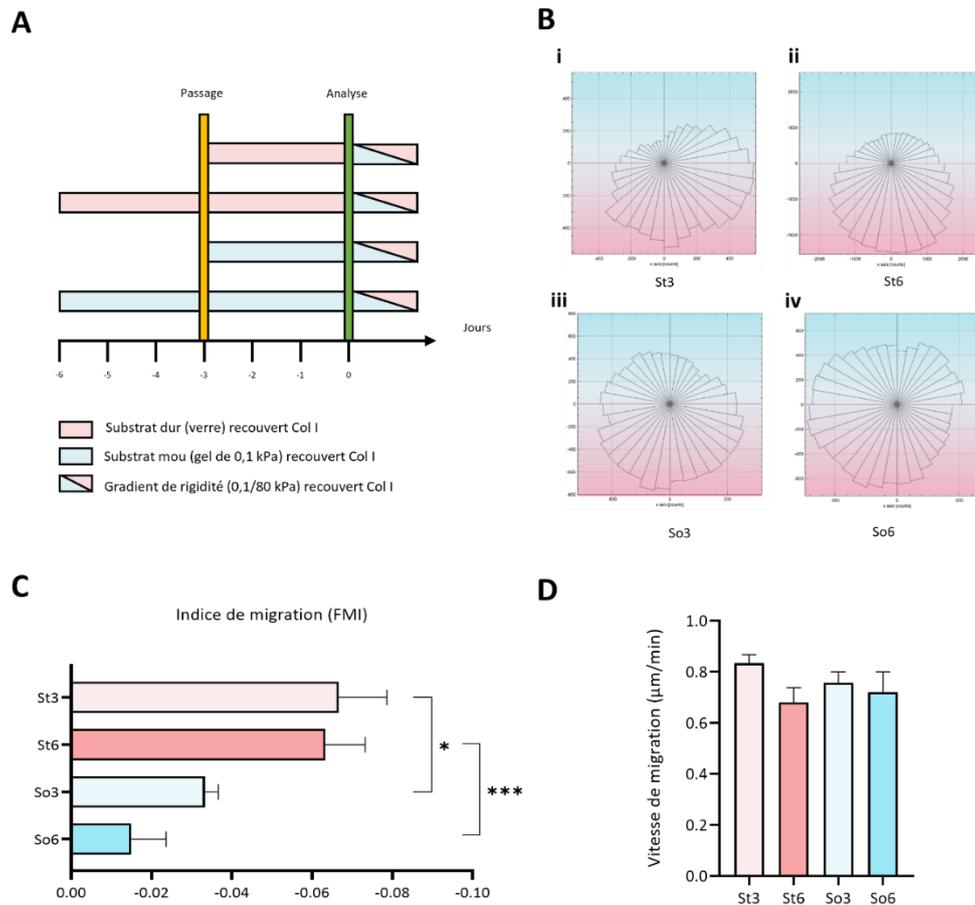


Figure 29 : Acquisition de la durotaxie par la rigidité du substrat. **A)** Les ostéoblastes ont été conditionnés mécaniquement soit sur un substrat dur (verre) ou un substrat mou (gel de 0,1 kPa) pendant 3 ou 6 jours. Les cellules ont ensuite été transférées sur le gradient de rigidité (0,1/80 kPa) pour analyser leurs migrations. **B)** Représentation de la migration des ostéoblastes sur le gradient de rigidité (avec la partie dure du gradient en rouge et la partie molle en bleu). Dans les conditions **St3** et **St6**, les cellules durotaxent. Dans les conditions **So3** et **So6**, les cellules migrent aléatoirement ; $2 < N < 6$, ≈ 100 cellules par N. **C)** Indice de migration (FMI) de la population cellulaire le long du gradient de rigidité. Plus la valeur est négative et plus les cellules performant une forte durotaxie. Si la valeur se rapproche de 0, les cellules migrent aléatoirement. $2 < N < 6$, ≈ 100 cellules par N. **D)** Vitesse de migration moyenne des ostéoblastes sur le gradient de rigidité pendant 16 heures. $2 < N < 6$, ≈ 100 cellules par N. Barre d'erreur = SEM. Absence de crochet carré : non statistiquement significatif. Les crochets carrés indiquent un résultat statistiquement significatif : * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

1.3. La mémoire mécanique régule l'acquisition de la durotaxie

Dans l'objectif de tester l'impact de la mémoire mécanique sur la durotaxie, j'ai ensuite conditionné les ostéoblastes sur un substrat dur (verre) pendant 3 jours, puis sur un gel de 0,1 kPa pendant 3 jours (St3-So3) (**Fig. 30A**). J'ai observé que les cellules n'étaient plus capables de réaliser la durotaxie au terme de ce conditionnement (**Fig. 30B**). Ces résultats montrent que l'acquisition de la durotaxie au cours des 3 premiers jours sur substrat dur peut être perdue si par la suite les cellules sont cultivées sur substrat mou. Il y a donc bien un effet de type mémoire mécanique régulant les capacités durotactiques des cellules.

J'ai ensuite testé le même conditionnement, mais en inversant l'ordre de présentation des substrats durs et mous. Les cellules ont donc été conditionnées 3 jours sur un substrat mou avant d'être placées sur un substrat dur pendant 3 jours (So3-St3) (**Fig. 30A**). Comme pour le conditionnement précédent (St3-So3), les cellules migrent de façon aléatoire sur le gradient et à des vitesses comparables (**Fig. 30B et C**). Ces résultats montrent que le dernier épisode de rigidité rencontré par la cellule ne domine pas sur le phénotype des cellules sur le gradient de rigidité. En effet, 3 jours sur substrat dur sont suffisants pour acquérir la durotaxie (**Fig.29.C**), mais pas si les cellules ont auparavant connu un substrat mou. Ces résultats suggèrent que les cellules intègrent des doses de rigidité distribuées dans le temps et qui régulent l'acquisition du phénotype durotactique.

Pour tester cette hypothèse, j'ai ensuite analysé l'effet de la durée d'exposition sur les différents substrats au cours d'un conditionnement plus complexe.

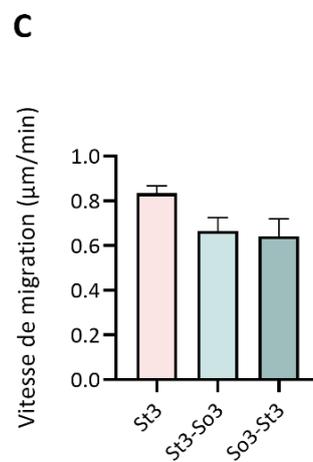
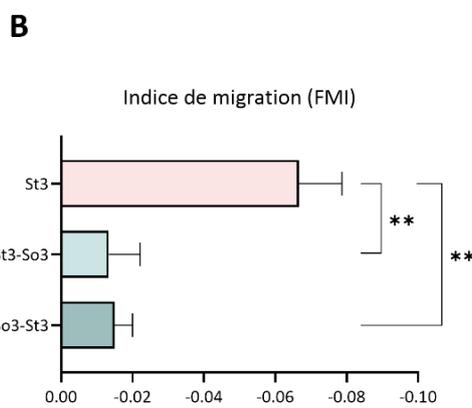
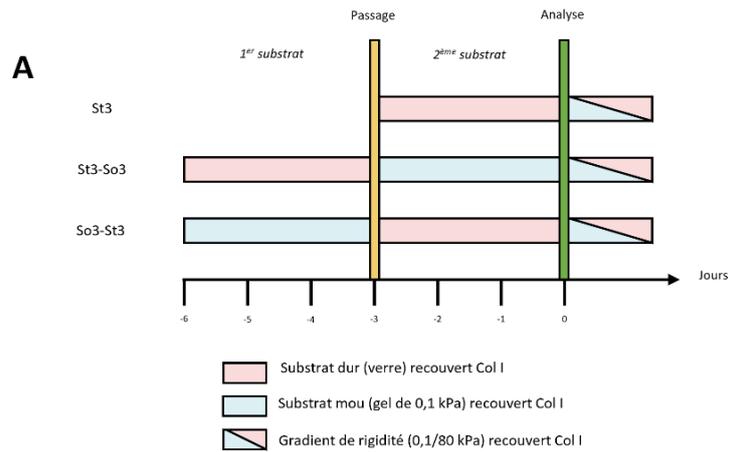


Figure 30 : La rigidité passée affecte la durotaxie des ostéoblastes. **A)** Les ostéoblastes ont été conditionnés mécaniquement sur un substrat dur (verre) pendant 3 jours, puis sur un second substrat mou (gel de 0,1 kPa) pendant 3 jours, ou inversement. Les cellules ont ensuite été transférées sur le gradient de rigidité (0,1/80 kPa) pour analyser leurs migrations. **B)** Indice de migration (FMI) de la population cellulaire le long du gradient de rigidité. Plus la valeur est négative et plus les cellules performant une forte durotaxie. Si la valeur se rapproche de 0, les cellules migrent aléatoirement. Dans la condition **St3**, les cellules durotaxent. Dans les conditions **St3-So3** et **So3-St3**, les cellules migrent aléatoirement. $2 < N < 6$, ≈ 100 cellules par N. **C)** Vitesse de migration moyenne des ostéoblastes sur le gradient de rigidité pendant 16 heures ; $2 < N < 6$, ≈ 100 cellules par N. Barre d'erreur = SEM. Absence de crochet carré : non statistiquement significatif. Les crochets carrés indiquent un résultat statistiquement significatif : ** $p < 0,01$.

1.4. Régulation de la durotaxie par le temps d'exposition du substrat

J'ai ainsi conditionné les cellules 3 jours sur un substrat mou (0,1 kPa) avant de les exposer à un substrat dur (verre) pendant 6 jours (So3-St6) (**Fig. 31A**). J'ai observé que ces cellules réalisent de la durotaxie sur le gradient de rigidité (**Fig. 31Bi et C**). On peut noter que cette durotaxie est moins importante que chez des cellules conditionnées uniquement sur du dur. J'ai aussi modifié l'ordre de présentation des substrats pour ce conditionnement (St6-So3), et les résultats sont similaires avec des vitesses de migration équivalentes (**Fig. 31C et D**).

Inversement, j'ai conditionné les cellules 3 jours sur un substrat dur puis les ai exposées 6 jours à un substrat mou (St3-So6) (Fig. 31A). Ces cellules migrent aléatoirement sur le gradient (**Fig. 31Bii et C**). L'ordre de présentation des différentes rigidités ne modifie pas les vitesses de migration (**Fig. 31D**). Ces différents résultats suggèrent une régulation de la durotaxie par une intégration des doses temporelles de différentes rigidités ressenties dans le passé.

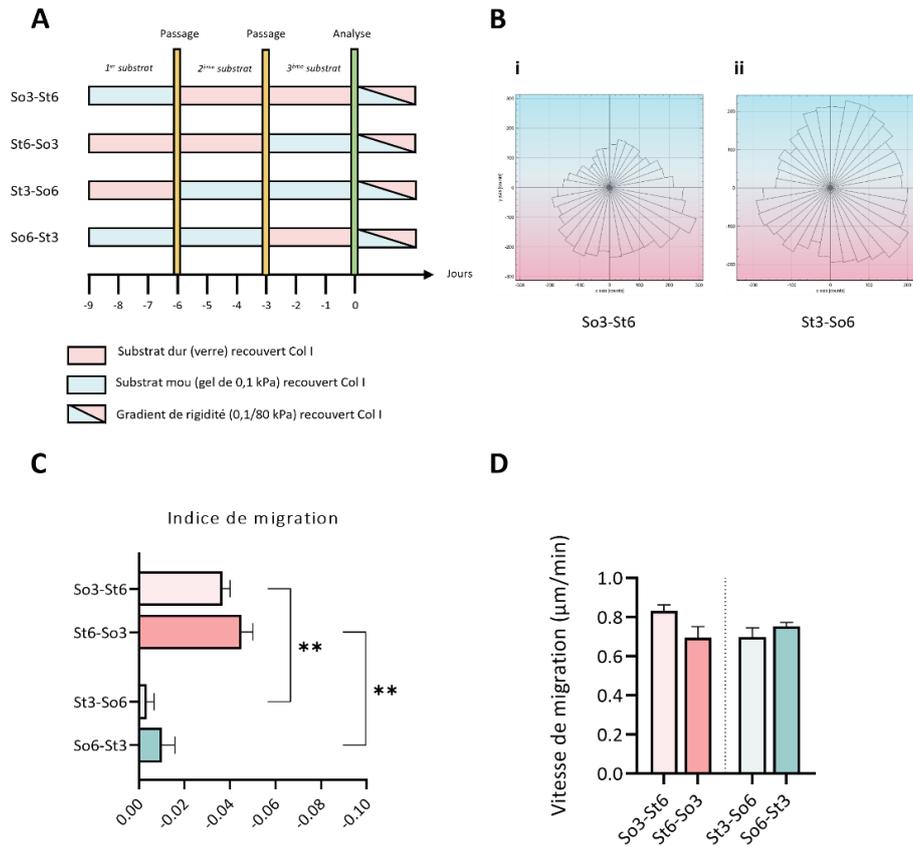


Figure 31 : Effet-dose de la rigidité passée sur la durotaxie. A) Les ostéoblastes ont été conditionnés mécaniquement sur un substrat dur (verre) puis sur un substrat mou (0,1 kPa) et inversement, avec un temps d'exposition plus long sur une des rigidités du conditionnement. Les cellules ont ensuite été transférées sur le gradient de rigidité (0,1/80 kPa) pour analyser leurs migrations. **B)** Représentation de la migration des ostéoblastes sur le gradient de rigidité (avec la partie dure du gradient en rouge et la partie molle en bleu). Dans les conditions **So3-St6** et **St6-So3**, les cellules durotaxent. Dans les conditions **St3-So6** et **So6-St3** les cellules migrent aléatoirement. $2 < N < 4$, ≈ 100 cellules par N. **C)** Indice de migration (FMI) de la population cellulaire le long du gradient de rigidité. Plus la valeur est négative et plus les cellules performant une forte durotaxie. Si la valeur se rapproche de 0, les cellules migrent aléatoirement. $2 < N < 4$, ≈ 100 cellules par N. **D)** Vitesse de migration moyenne des ostéoblastes sur le gradient de rigidité pendant 16 heures ; $2 < N < 4$, ≈ 100 cellules par N. Barre d'erreur = SEM. Absence de crochet carré : non statistiquement significatif. Les crochets carrés indiquent un résultat statistiquement significatif : ** $p < 0,01$.

II. La concentration de sérum et la durotaxie

II.1. La concentration en sérum permet l'acquisition de la durotaxie

Les différents résultats obtenus suggèrent que la durotaxie est acquise par un conditionnement sur un substrat rigide, et que la mémoire mécanique peut modifier la capacité des cellules à effectuer cette durotaxie. En se basant sur l'hypothèse que la plupart des études sur la durotaxie ont été faites sur des cellules placées en condition classique de culture, je me suis intéressé aux signaux qui composent l'environnement global des cellules lors de cette culture. Je me suis arrêté sur un élément essentiel de cette culture classique : le sérum présent le milieu de culture.

Les expériences précédentes ont été réalisées avec une concentration de 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Afin d'étudier l'effet du sérum sur la durotaxie, les cellules ont subi un conditionnement sur substrat mou (0.1 kPa) ou dur (verre) pendant 3 ou 6 jours en présence de 2% de SVF (**Fig. 32A**). La migration sur le gradient de rigidité a été effectuée en présence de 10% de SVF. J'ai observé que les cellules conditionnées 3 jours avec 2% de sérum, que ce soit sur un substrat mou ou dur, n'étaient pas capables de réaliser la durotaxie (**Fig. 32B**). De même, un conditionnement de 6 jours sur un substrat dur avec 2% de SVF ne permet pas aux cellules de durotaxer. A noter que les cellules n'ont pas survécu à un conditionnement de 6 jours sur un substrat mou avec 2% de SVF, ce qui peut s'expliquer par la durée du conditionnement sur une rigidité non-optimale pour les cellules.

On peut notamment observer que la vitesse de migration de ces cellules est plus faible que les cellules conditionnées sur les mêmes substrats avec 10% de SVF (**Fig. 29A** et **Fig.32A**). Ces résultats indiquent que la concentration du sérum dans l'environnement passé de la cellule impacte la vitesse de migration et l'acquisition de la durotaxie.

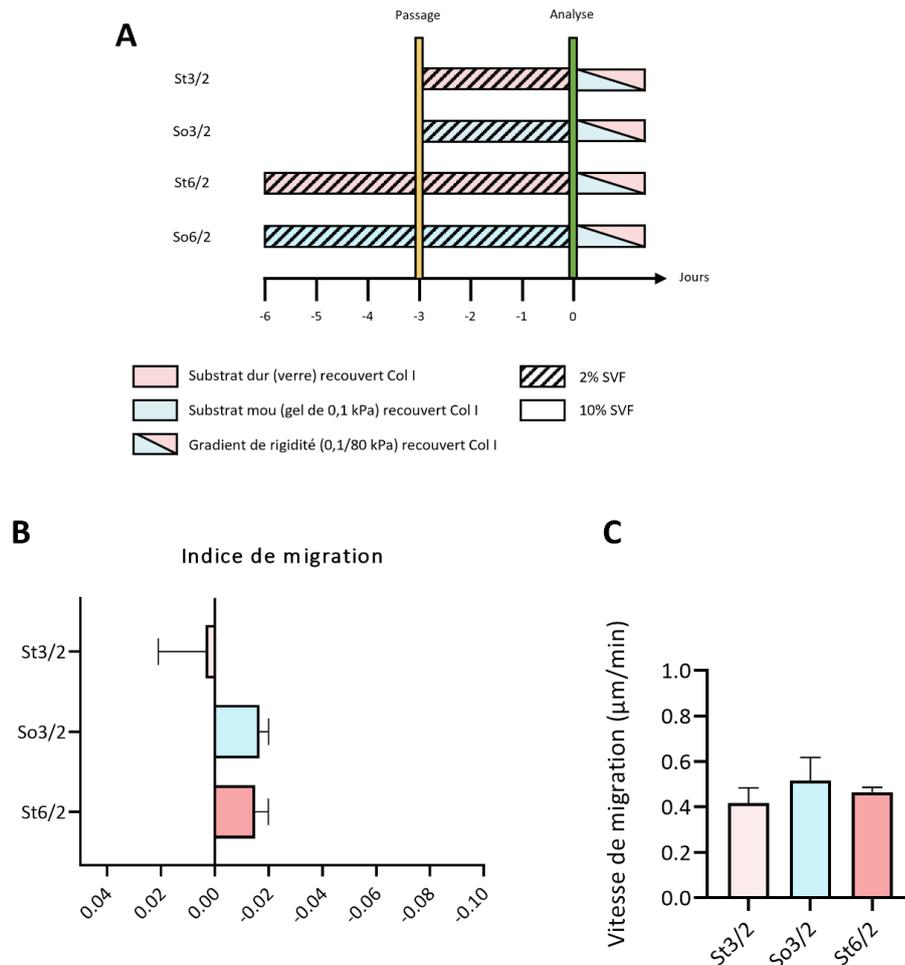


Figure 32 : La concentration de sérum permet l'acquisition de la durotaxie. **A)** Les ostéoblastes ont été conditionnés mécaniquement sur un substrat dur (verre) puis sur un substrat mou (0,1 kPa) pendant 3 ou 6 jours en présence de 2% de SVF. Les cellules ont ensuite été transférées sur le gradient de rigidité (0,1/80 kPa) pour analyser leurs migrations avec une concentration de 10% de SVF. **C)** Indice de migration (FMI) de la population cellulaire le long du gradient de rigidité. Plus la valeur est négative et plus les cellules performant une forte durotaxie. Si la valeur se rapproche de 0, les cellules migrent aléatoirement. $2 < N < 3$, ≈ 100 cellules par N. **D)** Vitesse de migration moyenne des ostéoblastes sur le gradient de rigidité pendant 16 heures ; $2 < N < 3$, ≈ 100 cellules par N. Barre d'erreur = SEM. Absence de crochet carré : non statistiquement significatif.

II.2. *L'Association du sérum avec la rigidité du substrat*

En modifiant la concentration du sérum, j'ai pu observer que la durotaxie n'était pas modifiée uniquement par la rigidité passée, mais également par un autre facteur de l'environnement des cellules. En prenant en compte la concentration en sérum, j'ai ensuite souhaité complexifier l'histoire environnementale des cellules afin d'en observer les conséquences sur la durotaxie. Dans le conditionnement 3 jours sur un substrat dur puis 3 jours sur un substrat mou, les cellules migrent de façon aléatoire (**Fig. 33Bi**). J'ai ensuite modifié la concentration de SVF sur les différentes rigidités lors du conditionnement et observé les conséquences sur le comportement des cellules sur le gradient.

J'ai tout d'abord conditionné des ostéoblastes pendant 3 jours sur un substrat mou (0,1 kPa) en présence de 2% de SVF, puis 3 jours sur un substrat dur en présence de 10% de sérum (**Fig. 33A**). J'ai pu observer que les cellules placées dans ce conditionnement présentaient des capacités durotactiques modérées (**Fig. 33Bii et C**). Afin de s'assurer que l'ordre de présentation des substrats n'a aucun effet, le même conditionnement a été réalisé mais en commençant par le substrat dur (verre) avec 10% de SVF et en finissant par le substrat mou (0,1 kPa) avec 2% de SVF (**Fig. 33A**). Ce conditionnement conduit les cellules à réaliser une durotaxie modérée (**Fig. 33B et C**). Ainsi, lorsque les cellules reçoivent une même dose temporelle de rigidité dure et molle, le fait d'associer la période sur substrat mou avec une carence en SVF conduit les cellules à durotaxer. Ces résultats suggèrent que la période sur mou ne peut contrecarrer les effets de la période sur dur que si le SVF est présent pendant cette période sur mou.

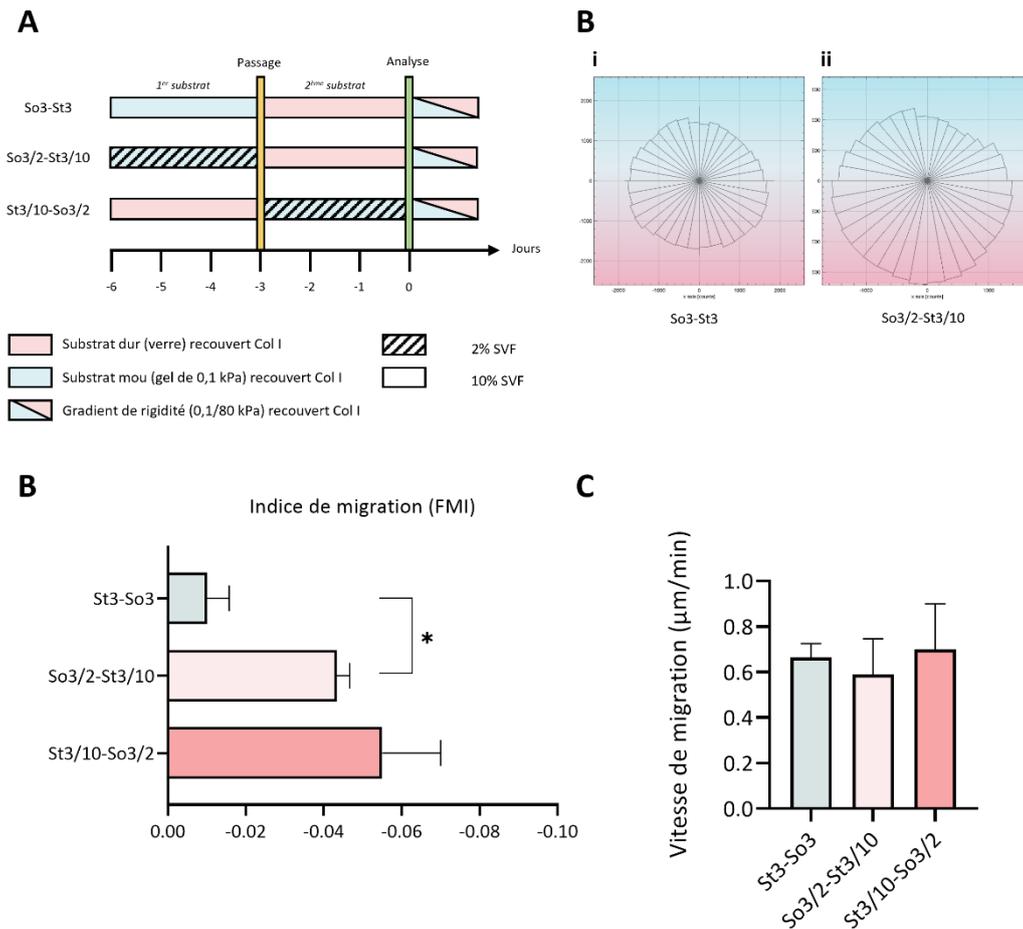


Figure 33 : L'environnement passé affecte la durotaxie. **A**) Les ostéoblastes ont été conditionnés mécaniquement sur un substrat mou (0,1 kPa) avec 2% de SVF puis sur un substrat dur (verre) avec 10% de SVF. Les cellules ont ensuite été transférées sur le gradient de rigidité (0,1/80 kPa) avec 10% de SVF pour analyser leurs migrations. **B**) Représentation de la migration des ostéoblastes sur le gradient de rigidité (avec la partie dure du gradient en rouge et la partie molle en bleu). $2 < N < 3$, ≈ 100 cellules par N. **C**) Indice de migration (FMI) de la population cellulaire le long du gradient de rigidité. Plus la valeur est négative et plus les cellules performant une forte durotaxie. Si la valeur se rapproche de 0, les cellules migrent aléatoirement. $2 < N < 3$, ≈ 100 cellules par N. **D**) Vitesse de migration moyenne des ostéoblastes sur le gradient de rigidité pendant 16 heures. $2 < N < 3$, ≈ 100 cellules par N. Barre d'erreur = SEM. Absence de crochet carré : non statistiquement significatif. Les crochets carrés indiquent un résultat statistiquement significatif : * $p < 0,05$.

II.3. Modification de la durotaxie par un conditionnement associatif

J'ai ensuite voulu associer le substrat dur avec une carence en sérum, et observer la migration des cellules sur le gradient. Les cellules ont donc été conditionnées sur un substrat mou (0,1 kPa) avec 10% de SVF, puis placées sur un substrat dur (verre) avec 2% de sérum (**Fig. 34A**). J'ai observé que ces cellules migrent vers la partie molle du gradient, et cela, sans modification de la vitesse de migration (**Fig. 34B et D**). Nous avons nommé ce type de migration : la « mollotaxie ». J'ai aussi effectué ce conditionnement en inversant l'ordre de présentation des différents substrats et le résultat reste le même, les cellules migrent vers la partie molle du gradient (**Fig. 34C**).

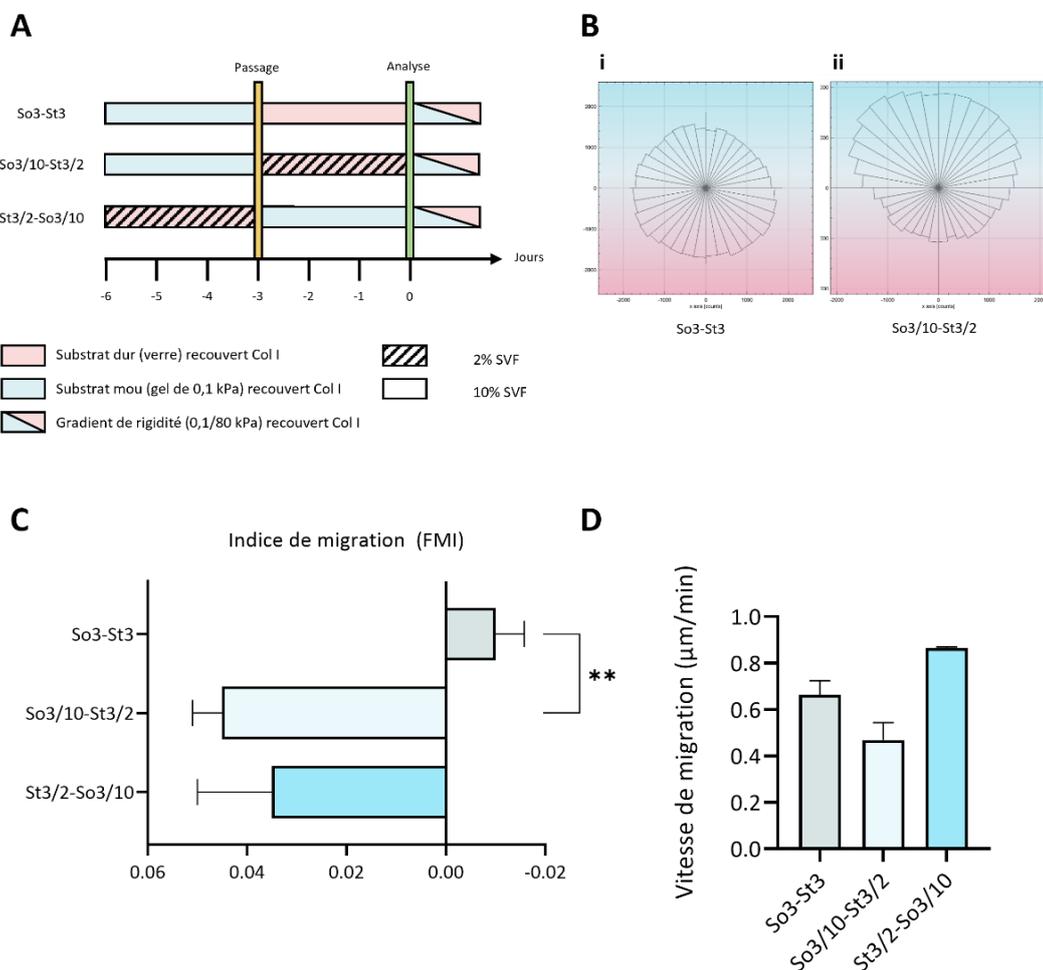


Figure 34 : Le conditionnement induit la « mollostaxie » des cellules **A)** Les ostéoblastes ont été conditionnés mécaniquement sur un substrat mou (0,1 kPa) avec 10% de SVF puis sur un substrat dur (verre) avec 2% de SVF. Les cellules ont ensuite été transférées sur le gradient de rigidité (0,1/80 kPa) avec 10% de SVF pour analyser leurs migrations. **B)** Représentation de la migration des ostéoblastes sur le gradient de rigidité (avec la partie dure du gradient en rouge et la partie molle en bleu). $2 < N < 8$, ≈ 100 cellules par N. **C)** Indice de migration (FMI) de la population cellulaire le long du gradient de rigidité. Plus la valeur est positive et plus les cellules performant une forte « mollostaxie ». Si la valeur se rapproche de 0, les cellules migrent aléatoirement. $2 < N < 8$, ≈ 100 cellules par N. **D)** Vitesse de migration moyenne des ostéoblastes sur le gradient de rigidité pendant 16 heures. $2 < N < 8$, ≈ 100 cellules par N. Barre d'erreur = SEM. Absence de crochet carré : non statistiquement significatif. Les crochets carrés indiquent un résultat statistiquement significatif : ** $p < 0,01$.

Ainsi, une carence en sérum associée à une période sur substrat dur conduit les cellules à faire de la mollostaxie. En revanche, cela n'est vrai que si les cellules ont également été en présence d'un substrat mou avec 10% de SVF. En effet, une carence en SVF pendant 6 jours sur substrat dur conduit les cellules à migrer de façon aléatoire sur le gradient. Ceci indique donc que les cellules sont capables d'intégrer des informations complexes, reçues à différents moments, pour réguler leur choix de migration sur le gradient. Ce type de phénomène peut s'apparenter à de l'apprentissage associatif, où la cellule associe la concentration de sérum avec la rigidité du substrat, lui permettant de faire un choix adapté pour sa survie.

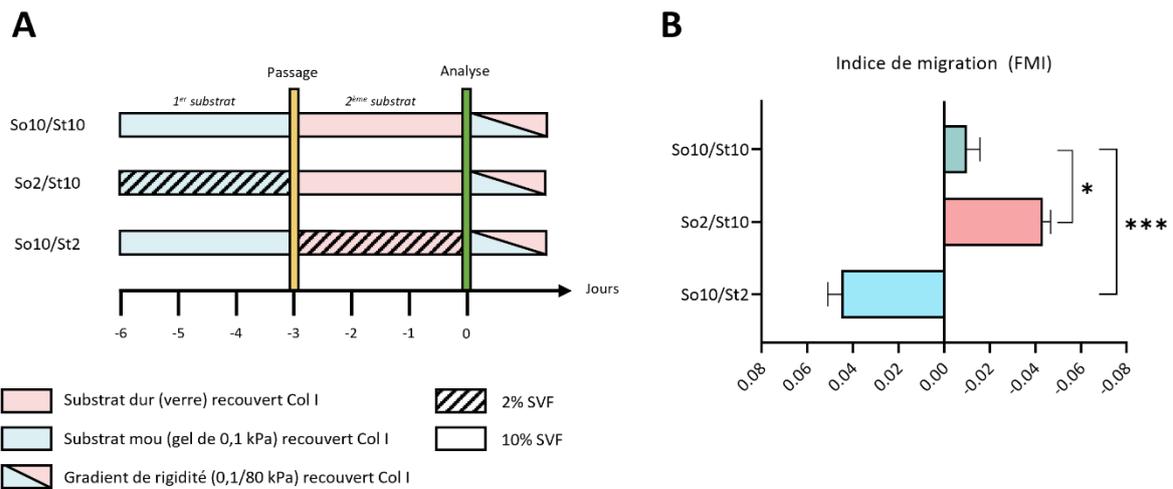


Figure 35 : Association de plusieurs stimuli par les cellules **A)** Les ostéoblastes ont été conditionnés mécaniquement sur un substrat mou (0,1 kPa) avec 2% ou 10% de SVF puis sur un substrat dur (verre) avec 2% ou 10% de SVF. Les cellules ont ensuite été transférées sur le gradient de rigidité (0,1/80 kPa) avec 10% de SVF pour analyser leurs migrations. **B)** Indice de migration (FMI) de la population cellulaire le long du gradient de rigidité. Si la valeur se rapproche de 0, les cellules migrent aléatoirement. Plus la valeur est négative et plus les cellules performement une forte durotaxie. Plus la valeur est positive et plus les cellules performement une forte « mollotaxie ». $2 < N < 8$, ≈ 100 cellules par N. Barre d'erreur = SEM. Absence de crochet carré : non statistiquement significatif. Les crochets carrés indiquent un résultat statistiquement significatif : * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

II.4. Association de stimuli dans une lignée cancéreuse

Afin de conforter nos résultats, j'ai souhaité reproduire ces résultats sur une autre lignée cellulaire. Pour cela, j'ai utilisé une lignée cellulaire issue du cancer du sein humain, les MDA-MB-231. Nous avons auparavant observé que les MDA-MB-231 ne font pas de durotaxie sur un gradient de 0.1 à 80 kPa (Baschieri et al. 2023), mais la littérature indique que ces cellules sont douées de durotaxie sur des gradients de plus faible rigidité. Ainsi, je me suis tout d'abord assuré que ces cellules, en conditions de culture classique (TCIP, 10%SVF), durotaxent sur un gradient de rigidité allant de 0,1 à 2 kPa en présence de 10% de SVF (St10) (**Fig. 36Bi et C**).

Ensuite, j'ai testé mes différents conditionnements sur ces cellules, en commençant par un conditionnement de 3 jours sur un substrat mou (0,1 kPa) et 3 jours sur un substrat considéré comme dur pour ces cellules (2 kPa) en présence de 10% de SVF (So10/St10) (**Fig. 36A**). Comme pour les ostéoblastes, les MDA-MB-231 migrent aléatoirement sur le gradient (**Fig. 36Bii et C**). Un conditionnement de 3 jours sur un substrat mou (0,1 kPa) avec 2%, suivi de 3 jours sur un substrat dur (2 kPa) avec 10% (So2/St10), permet aux MDA-MB-231 de retrouver leur capacité durotactique (**Fig. 36Biii et C**). De la même façon que les ostéoblastes, les MDA-MB-231 placées dans un conditionnement de 3 jours sur mou avec 10% de SVF, suivi de 3 jours sur dur avec 2% SVF (So10/St2), réalisent de la « molloxie » sur le gradient (**Fig. 36Biii et C**). Les différents conditionnements n'affectent pas la vitesse de migration des cellules (**Fig. 36D**).

Ces résultats semblent confirmer la capacité des cellules à associer plusieurs stimuli présentés dans leur passé, leur permettant ainsi de modifier leurs choix de migration.

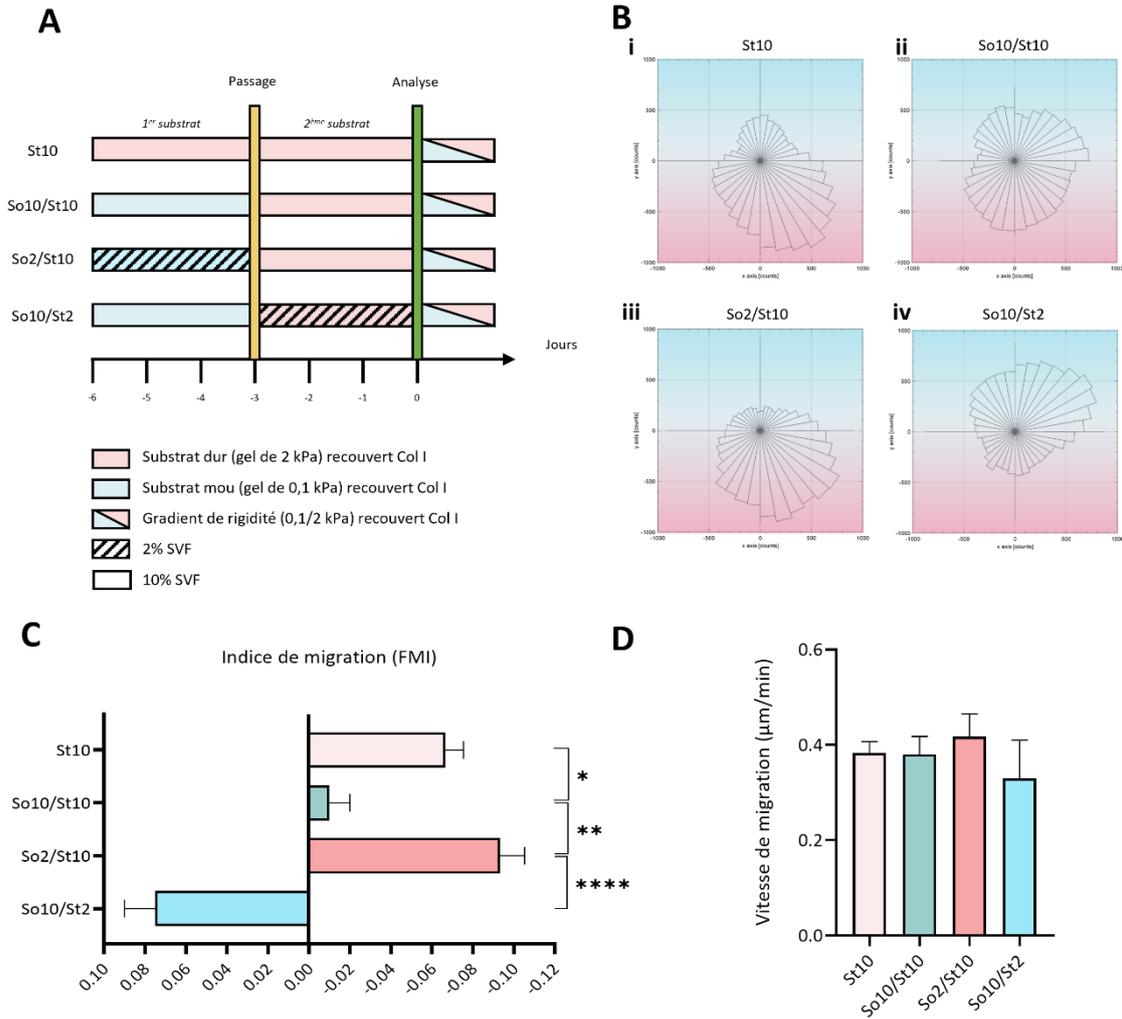


Figure 36 : Apprentissage associatif par les MDA-MB-231 **A)** Les MDA-MB-231 ont été conditionnés mécaniquement sur un substrat mou (0,1 kPa) avec 2% ou 10% de SVF puis sur un substrat dur (2 kPa) avec 2% ou 10% de SVF. Les cellules ont ensuite été transférées sur le gradient de rigidité (0,1/2 kPa) avec 10% de SVF pour analyser leurs migrations. **B)** Indice de migration (FMI) de la population cellulaire le long du gradient de rigidité. Si la valeur se rapproche de 0, les cellules migrent aléatoirement. Plus la valeur est négative et plus les cellules performant une forte durotaxie. Plus la valeur est positive et plus les cellules performant une forte « mollotaxie ». $2 < N < 3$, ≈ 100 cellules par N. Barre d'erreur = SEM. Absence de crochet carré : non statistiquement significatif. Les crochets carrés indiquent un résultat statistiquement significatif : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

III. *Quels mécanismes supportent la modification du choix de migration ?*

III.1. *Modification de la rigidité préférentielle par le conditionnement*

La régulation de la durotaxie par l'histoire environnementale des cellules soulève la question des mécanismes sous-jacents. La durotaxie reflète en réalité la propension des cellules à migrer vers une rigidité optimale, différente pour chaque type cellulaire, et qui entraîne un maximum de forces de traction (Isomursu et al. 2022). De plus, cette rigidité optimale peut être modulée en fonction des propriétés des récepteurs à la matrice impliqués, ainsi que du couplage entre actine et adhésions focales (Isomursu et al. 2022). Par exemple, une modulation de l'expression de la Taline, un composant de l'embrayage moléculaire nécessaire à la migration, modifie la rigidité optimale des cellules et donc leurs capacités durotactiques. Il est alors possible que notre conditionnement modifie la rigidité préférentielle de nos cellules, les amenant à faire de la mollotaxie. La rigidité préférentielle est décrite comme la rigidité du substrat permettant le maximum de forces de traction et donc par conséquent le plus grand degré d'étalement de la cellule.

Afin de vérifier notre hypothèse, j'ai récupéré les ostéoblastes à la fin de leur conditionnement et les ai placés sur des substrats de différentes rigidités (0,1, 2, 5, 18, 30, 80 kPa et verre) pour observer par immunofluorescence l'étalement cellulaire (**Fig. 37A**). Les ostéoblastes en conditions de culture classique (St10) sont moins étalés que les cellules faisant de la mollotaxie (So10/St2) sur une rigidité de 2 kPa (**Fig. 37B**). Sur les autres rigidités, l'étalement des cellules est corrélé à la rigidité du substrat sans aucune différence significative entre les deux conditions. Les forces de traction des cellules durotactiques (So2/St10) et mollotactiques (So10/St10) ont ensuite été évaluées sur différentes rigidités (2, 5, 11, 18 et 30 kPa) par microscopie à force de traction. Les cellules durotactiques exercent plus de forces sur une rigidité de 18 kPa, comparativement aux cellules mollotactiques (**Fig. 37C**). Ces premiers résultats suggèrent que notre conditionnement n'affecte pas la rigidité préférentielle des ostéoblastes de façon dramatique ; d'autres expériences seront réalisées afin de confirmer ces résultats préliminaires.

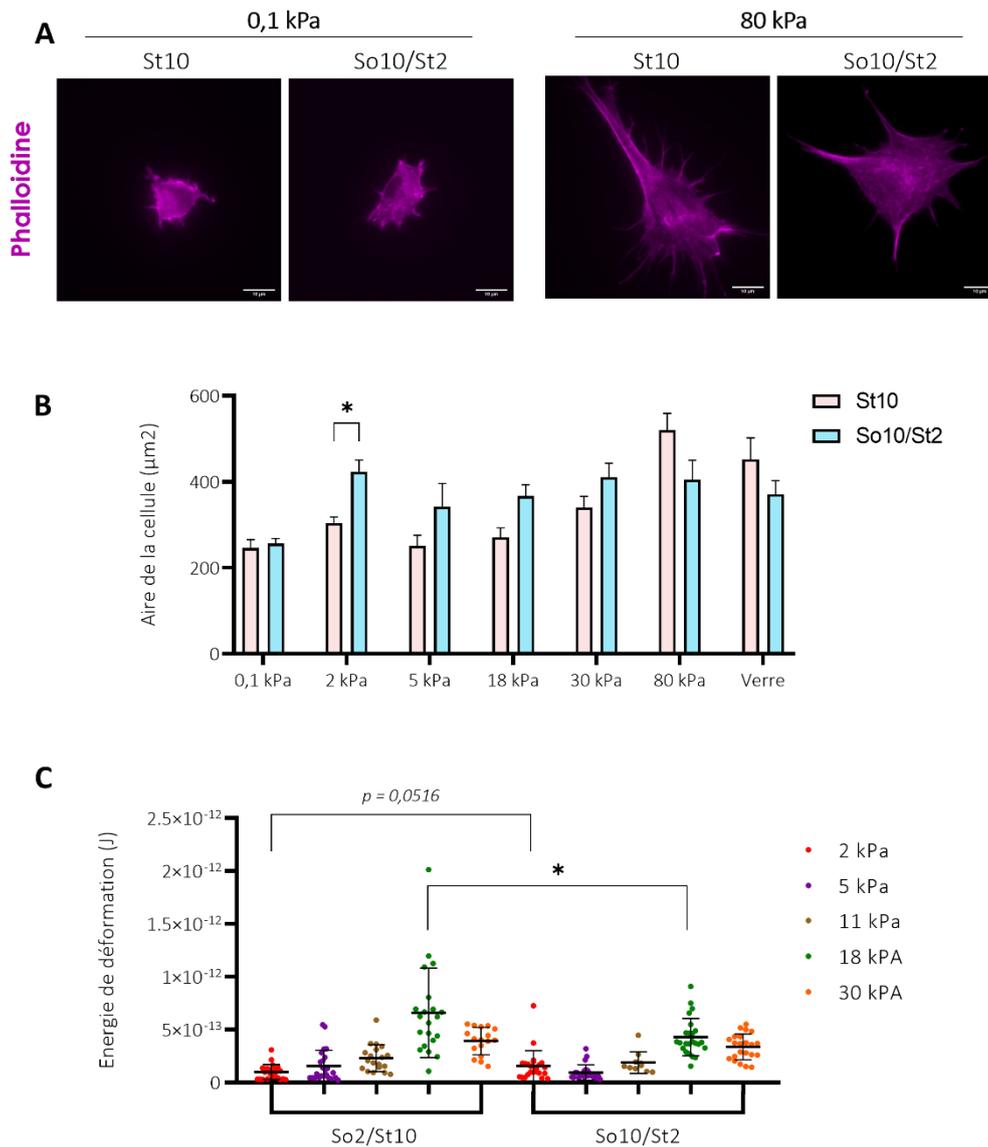


Figure 37 : Étalement et forces de traction des cellules en fonction de leur conditionnement. **A)** Image d'immunofluorescence des ostéoblastes St10 et So10/St2 sur 0,1 et 80 kPa, avec la phalloïdine (violet). **B)** Quantification de la surface cellulaire des ostéoblastes St10 et So10/St2 sur des gels de 0.1, 2, 5, 18, 30, 80 kPa et verre. N = 2, 20 cellules< par N. **C)** Forces exercées par les cellules So2/St10 et So10/St2 sur des gels de 2,5,11,18 et 30 kPa. N=1, >10 cellules par N. Echelle : 10 µm. Barre d'erreur = SEM. Absence de crochet carré : non statistiquement significatif. Les crochets carrés indiquent un résultat statistiquement significatif : *p<0,05.

III.2. Impact de YAP sur la modification du choix de migration

Une autre cible potentielle pouvant être impliquée dans la modification du choix de migration est le facteur de transcription YAP. Dans l'étude de Nasrollahi et al. 2017, YAP a été identifié comme un élément central permettant le stockage de la mémoire mécanique en étant maintenu dans le noyau après que des cellules aient été conditionnées sur un substrat dur.

Afin d'étudier le rôle de YAP, j'ai récupéré les ostéoblastes à la fin de leur conditionnement et les ai placés sur des substrats de rigidités différentes (0,1, 5 et 30 kPa) pour imager par immunofluorescence la localisation de YAP.

De façon surprenante, YAP est localisé dans le noyau des cellules durotactiques (St10) et molloctactiques (So10/St2) placées sur un substrat mou (0,1 kPa) (**Fig. 38A et B**). Sur un substrat plus dur (80 kPa), YAP est localisé dans le noyau pour les deux conditions sans différences significatives.

Pour confirmer que YAP n'agit pas sur la durotaxie des ostéoblastes, j'ai conditionné des ostéoblastes déplétés pour YAP pendant 6 jours sur un substrat dur (verre) et observé leurs migrations. Les ostéoblastes déplétés pour YAP durotaxent de la même façon que les ostéoblastes contrôle (**Fig. 38C et D**). Ces résultats préliminaires semblent indiquer que YAP n'est pas impliqué dans la modification du choix de migration, d'autres expériences devront être réalisées pour confirmer cette tendance.

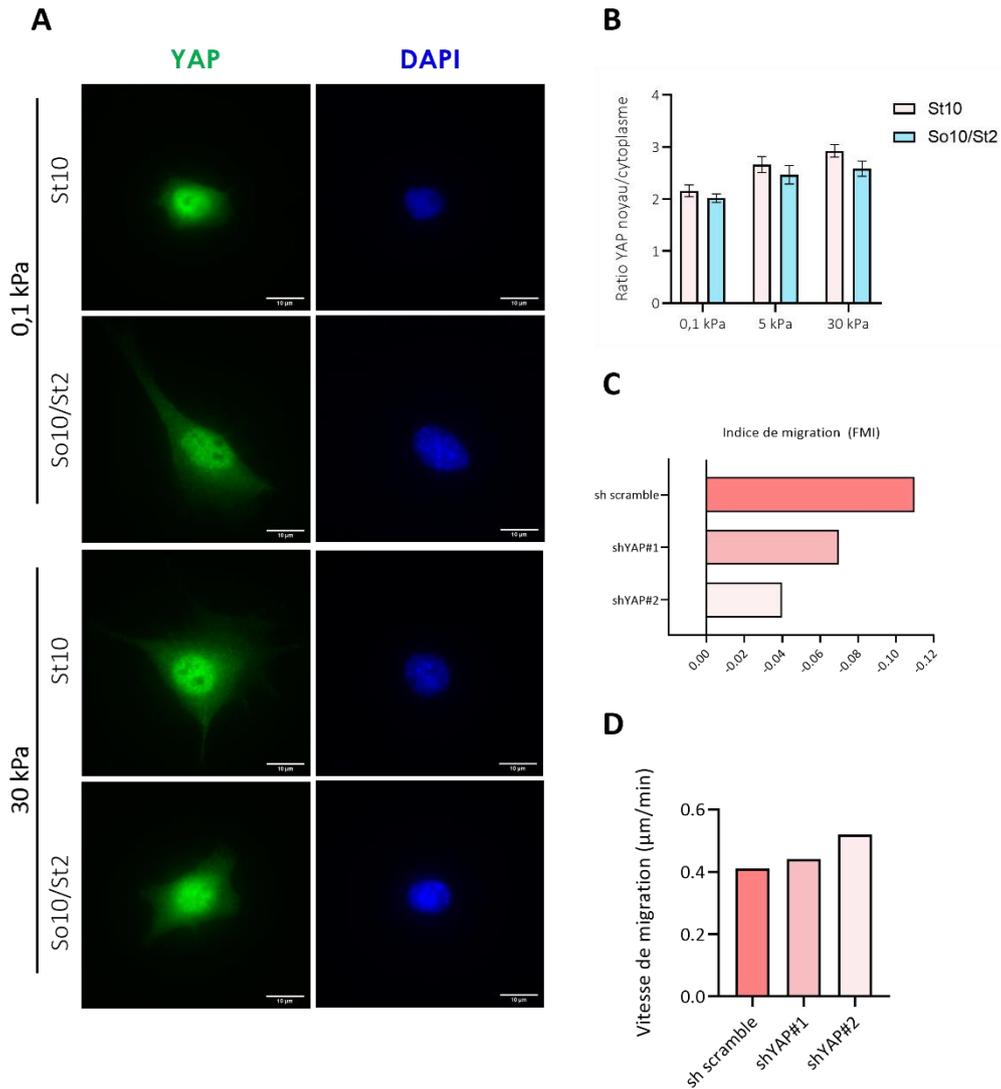


Figure 38 : Rôle de YAP dans le conditionnement des cellules **A)** Image d'immunofluorescence des ostéoblastes St10 et So10/St2 sur 0,1 et 30 kPa, avec YAP (vert) et le DAPI (bleu). **B)** Quantification du ratio YAP noyau/cytoplasme des ostéoblastes St10 et St10/St2 sur des gels de 0.1, 5, et 30 kPa. $N=1$, 20 cellules \llcorner par N . **C)** Indice de migration (FMI) de la population cellulaire le long du gradient de rigidité. Plus la valeur est négative et plus les cellules performant une forte durotaxie. $N=1$, ≈ 100 cellules par N . **D)** Vitesse de migration moyenne des ostéoblastes sur le gradient de rigidité pendant 16 heures. $N=1$, ≈ 100 cellules par N . Echelle : 10 μm . Barre d'erreur = SEM. Absence de crochet carré : non statistiquement significatif.

III.3. Identification de gènes impliqués dans la mollostaxie

Dans le but d'identifier des cibles impliquées dans la mise en place de la mollostaxie, un séquençage de l'ARN sur des ostéoblastes conditionnés pour donner des cellules mollostactiques (So10/St2) et sur des ostéoblastes durotactiques (St10) a été réalisé. Les cellules ont été conditionnées, puis collectées pour l'extraction et le séquençage de l'ARN (**Fig. 39A**). Parmi les gènes identifiés comme régulés de manière différentielle entre les cellules So10/St2 et St10, on retrouve des gènes impliqués dans les adhérences focales et la composition de la matrice extracellulaire. Deux cibles ont été identifiées : l'intégrine alpha4 et l'intégrine alpha6 qui se retrouvent sous-exprimées dans les cellules mollostactiques (**Fig. 39B**).

Dans l'objectif d'étudier ces cibles, j'ai conditionné les ostéoblastes 3 jours sur un substrat dur (verre), puis j'ai déplété soit l'intégrine $\alpha 4$, soit l'intégrine $\alpha 6$ par siRNA pendant 3 jours sur un substrat dur (verre) (**Fig. 39C**). A la fin de cette période, j'ai observé la migration des cellules.

Les cellules siCTR durotaxent, alors que les cellules déplétées pour l'intégrine $\alpha 4$ et l'intégrine $\alpha 6$ migrent aléatoirement (**Fig. 39D**). La déplétion n'a pas affecté la capacité de migration des cellules, la vitesse de migration est similaire entre les différentes conditions (**Fig. 39E**). Ces résultats suggèrent une régulation de la durotaxie par les intégrines. De prochaines expériences seront nécessaires pour confirmer ces données préliminaires et établir si une déplétion concomitante des deux intégrines conduit à une plus grande modulation de la durotaxie.

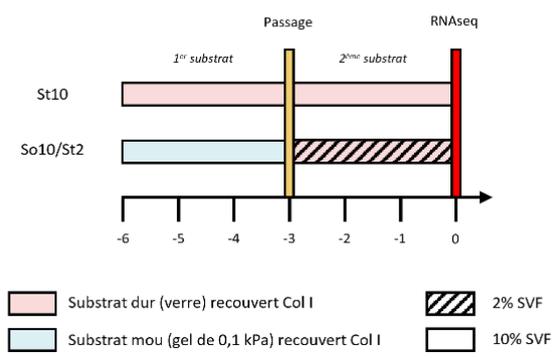
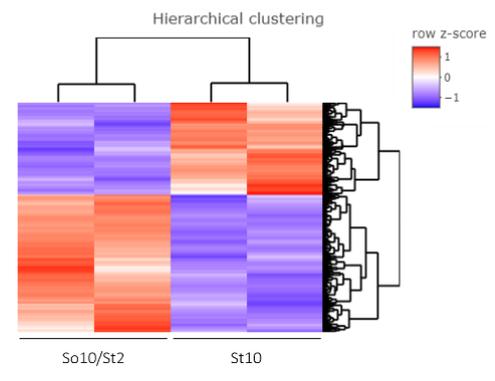
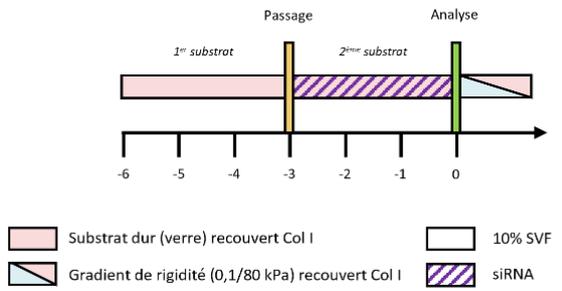
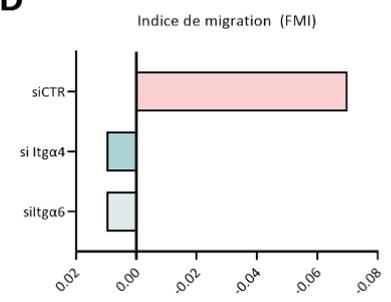
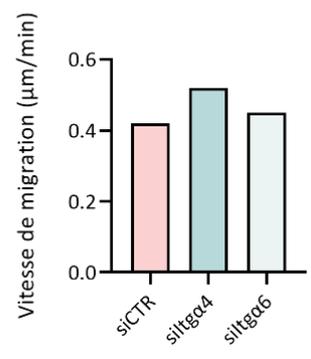
A**B****C****D****E**

Figure 39 : Identification de gènes impliqués dans la molliotaxie **A)** Les ostéoblastes ont été conditionnés mécaniquement pour obtenir des cellules St10 et So10/St2. A la fin du conditionnement, les cellules ont été récupérées pour séquençage de l'ARN. **B)** Le séquençage de l'ARN a été réalisé sur un duplicata. Cette heatmap présente les gènes avec une expression différente dans les ostéoblastes St10 et So10/St2. **C)** Les ostéoblastes ont été conditionnés mécaniquement sur un substrat dur (verre) avec 10% de SVF pendant 3 jours, puis déplétés pour l'intégrine $\alpha 4$ ou l'intégrine $\alpha 6$ par siRNA sur un substrat dur avec 10% de SVF. Les cellules ont ensuite été transférées sur le gradient de rigidité (0,1/80 kPa) avec 10% de SVF pour analyser leurs migrations. **D)** Indice de migration (FMI) de la population cellulaire le long du gradient de rigidité. Plus la valeur est négative et plus les cellules performant une forte durotaxie. N=1, ≈ 100 cellules par N. **E)** Vitesse de migration moyenne des ostéoblastes sur le gradient de rigidité pendant 16 heures. N=1, ≈ 100 cellules par N. Barre d'erreur = SEM. Absence de crochet carré : non statistiquement significatif.

Conclusion

Les cellules sont capables de sentir et de s'adapter aux propriétés mécaniques de leur environnement immédiat. Récemment, il a été démontré que certaines cellules pouvaient être capables de retenir des informations de leur environnement passé. Cette mémoire mécanique peut modifier la migration cellulaire et l'objectif a été de tester l'impact de cette mémoire mécanique sur la capacité des cellules à faire de la durotaxie.

Mes premières observations ont permis de mettre en évidence que la congélation/décongélation des ostéoblastes pouvait modifier leur durotaxie. De plus, j'ai pu observer qu'un conditionnement sur un substrat dur d'au moins 3 jours était nécessaire à l'acquisition de ce mode de migration. En effet, une période d'exposition de 3 jours sur un substrat mou, ne permet pas d'obtenir des cellules durotactiques, cependant, elle peut empêcher l'acquisition de la durotaxie une fois les cellules placées sur un substrat dur. En modifiant les temps d'exposition sur les différentes rigidités, j'ai identifié une régulation de la durotaxie par un effet dose d'exposition.

En modifiant les éléments présents dans l'environnement des cellules, comme par exemple la concentration en sérum, j'ai observé que la durotaxie n'était acquise que lorsque la concentration en sérum était de 10%. Par la suite, j'ai complexifié l'histoire environnementale des cellules en voulant associer 2 stimuli : la rigidité et la concentration en sérum. De manière surprenante, les cellules ont associé ces 2 stimuli, donnant ainsi des cellules capables de migrer vers des environnements mous : migration que nous avons nommée « mollostaxie ». J'ai aussi pu observer cette association dans une autre lignée cellulaire, les MDA-MB-231. Ces résultats ont mis en évidence une capacité d'association qui ressemble à de l'apprentissage associatif.

L'association observée, j'ai voulu identifier les mécanismes permettant ce changement de mode de migration. L'hypothèse principale, est que le protocole de conditionnement modifie la rigidité préférentielle des cellules. Les premiers résultats ne semblent pas valider cette hypothèse mais d'autres expériences doivent être réalisées pour confirmer ces

résultats. Des analyses de séquençage sur l'ARN des cellules durotactiques et molloctactiques ont été effectuées, afin d'identifier de potentiels gènes impliqués dans ce changement de mode de migration. Deux cibles ont été testées : l'intégrine $\alpha 4$ et l'intégrine $\alpha 6$. Leurs expressions semblent réguler la durotaxie, mais d'autres expériences seront nécessaires pour comprendre les facteurs régulant la migration des cellules vers un substrat mou.

Discussion et perspectives

De récentes études ont mis en évidence la capacité des cellules à conserver des informations de leurs environnements passés par un processus appelé mémoire mécanique. Cette mémoire mécanique modifie de nombreux processus cellulaires, tels que la différenciation et la migration cellulaire. En voulant étudier l'effet de la mémoire mécanique sur la durotaxie, j'ai observé un comportement qui fait écho à un processus de mémoire associative. La mémoire associative est d'un grand intérêt pour un organisme unicellulaire qui doit évoluer dans un environnement complexe, apprendre à trouver des sources de nourriture, échapper à des prédateurs ou éviter d'autres dangers. Dans un organisme pluricellulaire, le milieu intérieur est à priori plus stable et il n'est pas immédiatement intuitif de savoir quel type d'avantage une mémoire associative peut apporter à un fibroblaste ou un hépatocyte, par exemple.

I. La durotaxie, conséquence d'une culture in vitro classique ?

De nombreuses études ont décrit la durotaxie comme un mécanisme de migration basé sur une distribution asymétrique des forces, et caractérisé par la génération de forces via des fibres de stress, ainsi qu'un développement des adhérences focales plus important sur un substrat dur que sur un substrat mou⁵². Cependant, en étudiant la durotaxie d'ostéoblastes murins, j'ai pu observer que, 24h après leur décongélation, ces cellules migrent aléatoirement, contrairement à des ostéoblastes placés dans des conditions de culture classique depuis au moins 6 jours. Il est connu que les étapes de congélation/décongélation sont stressantes pour les cellules, mais les cellules à 24h post-décongélation migrent à la même vitesse que des cellules contrôles. De plus, ces mêmes cellules ont été maintenues en culture classique pendant plusieurs jours/semaines avant d'être congelées. Cela suggère une réinitialisation de la durotaxie des ostéoblastes par une étape de congélation/décongélation. En contrôlant le temps d'exposition des cellules sur un substrat mou et dur, j'ai remarqué qu'elles ne durotaxent qu'après un conditionnement

d'au moins 3 jours sur un substrat dur, tandis que, sur substrat mou, des durées de conditionnement de 3 et 6 jours ne permettent pas d'obtenir des cellules durotactiques.

De plus, en voulant étudier la durotaxie des MDA-MB-231, une lignée issue d'un cancer du sein, j'ai pu observer que ces cellules ne durotaxent que sur un faible gradient de rigidité. Les MDA-MB-231 durotaxent sur un gradient allant de 0,1 à 2 kPa, mais ne durotaxent pas sur un gradient de 0,1 à 80 kPa, contrairement aux ostéoblastes.

Il est possible que les cellules migrent vers leur rigidité optimale¹⁹⁵, correspondant à la rigidité de l'organe dont elles sont issues : l'os (dur) pour les ostéoblastes, et le sein (mou) pour les MDA-MB-231.

Ces résultats peuvent suggérer que les cellules durotaxent en raison d'une adaptation à des conditions classiques de culture *in vitro*. Dans ces conditions, les cellules peuvent associer la rigidité du substrat très dur (TCP) avec une concentration en sérum importante. Une fois placées sur un gradient de rigidité correspondant à la plage de rigidité pouvant être ressentie par les cellules, celles-ci migrent vers un environnement dur qui a été associé à une forte concentration en sérum. Une question se pose alors : Est-ce que la durotaxie est une conséquence de la culture *in vitro* ?

J'ai donc effectué des tests préliminaires lors desquels j'ai récupéré des fibroblastes primaires (connus pour avoir une forte durotaxie), issus de l'intestin de souris, et les ai placés sur un gradient de rigidité de 0,1 à 80 kPa. Cependant, ces essais n'ont pas été concluants en raison du clustering des cellules formant des sphéroïdes et d'un manque d'adhérence des cellules sur les gels. Tester d'autres protocoles d'isolation de cellules issues d'organes est envisageable afin de confirmer si des cellules qui n'ont jamais été en culture *in vitro* durotaxent ou non.

II. La mémoire mécanique et la durotaxie

En étudiant l'effet de la mémoire mécanique sur la durotaxie, j'ai observé que lorsque les ostéoblastes sont conditionnés sur un substrat mou, puis un substrat dur (ou inversement) pendant une période équivalente, cela bloque l'acquisition de la durotaxie. Cela peut suggérer une adaptation sur un substrat mou qui freine l'acquisition de la durotaxie par le conditionnement sur du dur, il s'agirait donc d'un effet de la mémoire mécanique sur un substrat dur.

Cependant, si la période de conditionnement sur un substrat dur est plus longue que la période de conditionnement sur du mou, alors les cellules durotaxent. Cette durotaxie est cependant plus faible que celle de cellules ayant été exposées exclusivement à un substrat dur, ce qui est probablement dû à la période d'exposition sur un substrat mou. Ces informations mettent en évidence une intégration temporelle de la rigidité du substrat par les ostéoblastes. Il serait intéressant d'augmenter les temps d'exposition sur un substrat mou, et d'observer à partir de combien de temps sur un substrat dur, les cellules peuvent acquérir la durotaxie, si elles en sont capables. Il est possible qu'un conditionnement d'une très longue période (3-4 semaines), sur un substrat mou, soit irréversible et bloque l'acquisition de la durotaxie.

III. Une mémoire associative dans des cellules de mammifères en culture.

Le conditionnement classique, ou apprentissage associatif, permet à un organisme d'associer plusieurs stimuli de son environnement, ce qui entraîne une réponse prédictive et donne donc un avantage pour la survie de l'organisme. Pendant longtemps, les études sur l'apprentissage associatif ont été limitées aux organismes neuronaux, mais de récentes études présentent des résultats dans des organismes non-neuronaux, tels que des plantes³⁰⁷ et des organismes unicellulaires³²⁰, capables d'associer plusieurs stimuli.

En modifiant l'historique environnemental de la cellule, j'ai associé un environnement dur avec la présence de ressources, donnant ainsi des ostéoblastes capables de faire de la durotaxie alors qu'auparavant ces cellules migraient aléatoirement. En voulant tester la capacité d'association des ostéoblastes, j'ai essayé d'associer un environnement mou avec une forte concentration en sérum et un environnement dur avec une carence en sérum et, de manière surprenante, les ostéoblastes migrent vers un environnement mou. Les cellules MDA-MB-231 présentent, elles aussi, des capacités d'association. Les cellules éduquées migrent donc vers la rigidité qui était associée à une forte concentration en sérum. Dans un environnement fluctuant, où rigidité et ressources sont associés, cette capacité représente un avantage adaptatif pour ces cellules.

Il est possible que notre conditionnement sélectionne une sous-population de cellules qui migrent vers des environnements mous. Afin de d'infirmer cette possibilité, des analyses de bar-coding ont été réalisées, dans l'objectif de savoir s'il s'agit d'une sélection clonale ou bien une réelle capacité d'association par les cellules. A noter que c'est peu probable car une sélection clonale se fait sur plusieurs générations alors que notre période de conditionnement est assez courte (6 jours).

Plusieurs études présentent des modèles mathématiques qui supportent la capacité des cellules individuelles à associer des stimuli présents dans leur environnement³²¹⁻³²⁴. Dans l'étude de Fernando et al. 2009, les auteurs proposent un modèle mathématique de régulation génétique, capable de réaliser un apprentissage associatif à l'intérieur d'une seule cellule. Ils ont développé un réseau de régulation génétique qui peut apprendre de manière associative entre n'importe quel ensemble spécifié de signaux chimiques, de manière Hebbienne. Ce modèle utilise des équations différentielles pour simuler le comportement du circuit, et les simulations montrent une réponse apprise claire.

Il serait aussi intéressant de tester la capacité d'association des ostéoblastes, en associant des stimuli de natures différentes : associer l'hypoxie avec la présence de ressources, ou encore la présence de glucoses avec la rigidité.

A noter que la composition de la matrice semble importante dans le cas de notre processus d'apprentissage. J'ai effectué le conditionnement avec des substrats fonctionnalisés avec du collagène de type I. Mais, lorsque le gradient de rigidité est fonctionnalisé avec une autre protéine, comme la fibronectine ou du collagène de type IV, les cellules, normalement molloctactiques, migrent aléatoirement (résultats non présentés). D'autres expériences doivent être réalisées afin d'investiguer l'impact de la matrice sur notre conditionnement.

IV. Quels sont les mécanismes permettant la modification du choix de migration ?

Plusieurs hypothèses supportent la modification du choix de migration par l'apprentissage. La piste la plus prometteuse est la modification de la rigidité préférentielle par le conditionnement.

Il a été proposé que les cellules aient une rigidité optimale vers laquelle elles tendent à migrer. Cette rigidité optimale permettrait le maximum de forces de traction par les cellules. Des études ont montré que la régulation des composants des adhérences focales, tels que les intégrines, pouvait modifier cette rigidité optimale^{194,195}. Dans l'étude Isomursu et al. 2022, les auteurs ont modifié la durotaxie de cellules de gliomes en sous-exprimant la taline, ce qui permet aux cellules de migrer vers des environnements plus mous.

En se basant sur cette étude, j'ai analysé le degré d'étalement, ainsi que les forces de traction des cellules molloctactiques et des cellules duroctactiques. Les premiers résultats montrent une tendance dans laquelle les cellules molloctactiques sont plus étalées et exercent plus de forces sur un substrat mou (2 kPa), alors que les cellules duroctactiques

exercent plus de forces sur un substrat plus dur (18 kPa). D'autres expériences d'immunofluorescence, afin d'observer les adhérences focales et l'étalement cellulaire, ainsi que de la microscopie à force de traction seront réalisées pour confirmer cette tendance.

L'ARNm des cellules molloctiques et duroctiques a été séquencé, afin d'identifier des gènes pouvant être impliqués dans la modification du choix de migration. Les résultats ont permis d'identifier des gènes impliqués dans les adhérences focales et la composition de la matrice. Je me suis arrêté sur deux candidates : l'intégrine $\alpha 4$, qui est un récepteur de la fibronectine³²⁵, et l'intégrine $\alpha 6$, qui est un récepteur de la laminine³²⁶. Ces intégrines se retrouvent sous-exprimées dans les cellules molloctiques. Ces cibles sont prometteuses, car leurs régulations concordent avec l'hypothèse de la modification de la rigidité préférentielle par les composants des adhérences focales.

Les premiers résultats montrent une perte de durotaxie lorsque ces intégrines sont déplétées par siRNA. Cela valide une régulation de la durotaxie par les composants des adhérences focales. Cependant, cette régulation n'est pas suffisante pour obtenir des cellules molloctiques. Une double déplétion de ces intégrines pourrait être envisagée, afin de se rapprocher au plus du profil des cellules molloctiques. Des expériences d'immunofluorescence seront également réalisées afin de confirmer une sous-expression de ces intégrines dans les cellules molloctiques.

Les résultats du RNAseq ont permis d'identifier une cible, actuellement en cours de test : il s'agit de l'intégrine $\alpha 11$, un récepteur pour le collagène de type I³²⁷, qui est surexprimé dans les cellules molloctiques. J'ai donc essayé de sur-exprimer cette intégrine dans des cellules parentales et d'observer la migration sur un gradient de rigidité. Les premiers résultats montrent une migration aléatoire pour les cellules sur-exprimant l'intégrine $\alpha 11$. D'autres expériences seront réalisées pour confirmer ces résultats préliminaires.

Un autre acteur pouvant être impliqué dans la modification du choix de migration est le facteur de transcription YAP. Des études ont mis en évidence le rôle de YAP comme stockage de l'information de l'environnement passé^{238,241,266}. Cependant, nos résultats préliminaires suggèrent que YAP n'est pas impliqué dans notre conditionnement associatif. Des expériences complémentaires seront réalisées pour confirmer ou non cette tendance.

Une autre piste qui reste à étudier est celle des modifications épigénétiques. Au sein du laboratoire, le Dr. Gauchoux—Bruna a pu observer une régulation du niveau de méthylation de H3K9 et H3K27 par la rigidité du substrat. L'inhibition de la méthylation sur H3K27 affecte la mémoire mécanique associée à un substrat dur. Il serait donc intéressant d'étudier l'implication des modifications épigénétiques sur nos cellules conditionnées.

En conclusion, mes travaux de thèse suggèrent que les cellules sont capables d'intégrer des informations associées entre elles et distribuées dans le temps, et qu'une des conséquences de cette intégration est la régulation de la direction de migration des cellules vis-à-vis d'indices physiques de l'environnement. D'un point de vue conceptuel, ces travaux démontrent que l'histoire environnementale des cellules joue un rôle majeur dans leur capacité d'adaptation à un nouvel environnement. Ces travaux devront être poursuivis afin de valider définitivement ces hypothèses, mais aussi élargis à d'autres stimuli et d'autres types de réponses cellulaires, afin de déterminer si un tel phénomène d'adaptation associative est généralisable au-delà de l'association sérum/rigidité.

1. Weijer CJ. Collective cell migration in development. *J Cell Sci.* 2009;122(18):3215-3223. doi:10.1242/JCS.036517
2. Redd MJ, Kelly G, Dunn G, Way M, Martin P. Imaging macrophage chemotaxis in vivo: studies of microtubule function in zebrafish wound inflammation. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2006;63(7):415-422. doi:10.1002/CM.20133
3. Poujade M, Grasland-Mongrain E, Hertzog A, et al. Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(41):15988-15993. doi:10.1073/PNAS.0705062104/SUPPL_FILE/05062FIG9.JPG
4. Reffay M, Petitjean L, Coscoy S, et al. Orientation and Polarity in Collectively Migrating Cell Structures: Statics and Dynamics. *Biophys J.* 2011;100(11):2566. doi:10.1016/J.BPJ.2011.04.047
5. Omelchenko T, Vasiliev JM, Gelfand IM, Feder HH, Bonder EM. Rho-dependent formation of epithelial “leader” cells during wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10788. doi:10.1073/PNAS.1834401100
6. Poujade M, Grasland-Mongrain E, Hertzog A, et al. From the Cover: Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(41):15988. doi:10.1073/PNAS.0705062104
7. Inaki M, Vishnu S, Cliffe A, Rørth P. Effective guidance of collective migration based on differences in cell states. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(6):2027-2032. doi:10.1073/PNAS.1115260109/-/DCSUPPLEMENTAL
8. Yamaguchi N, Mizutani T, Kawabata K, Haga H. Leader cells regulate collective cell migration via Rac activation in the downstream signaling of integrin β 1 and PI3K. *Sci Rep.* 2015;5. doi:10.1038/SREP07656
9. Rørth P. Collective cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:407-429. doi:10.1146/ANNUREV.CELLBIO.042308.113231

10. Kapil S, Sharma BK, Patil M, et al. The cell polarity protein Scrib functions as a tumor suppressor in liver cancer. *Oncotarget*. 2017;8(16):26515. doi:10.18632/ONCOTARGET.15713
11. Osmani N, Vitale N, Borg JP, Etienne-Manneville S. Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration. *Curr Biol*. 2006;16(24):2395-2405. doi:10.1016/J.CUB.2006.10.026
12. Woods B, Lew DJ. Polarity establishment by Cdc42: Key roles for positive feedback and differential mobility. *Small GTPases*. 2019;10(2):130. doi:10.1080/21541248.2016.1275370
13. Wozniak MA, Kwong L, Chodniewicz D, Klemke RL, Keely PJ. R-Ras Controls Membrane Protrusion and Cell Migration through the Spatial Regulation of Rac and Rho. *Mol Biol Cell*. 2005;16(1):84. doi:10.1091/MBC.E04-04-0277
14. Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM. Activation of Rac and Cdc42 by Integrins Mediates Cell Spreading. *Mol Biol Cell*. 1998;9(7):1863. doi:10.1091/MBC.9.7.1863
15. Etienne-Manneville S, Hall A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell*. 2001;106(4):489-498. doi:10.1016/S0092-8674(01)00471-8
16. Caussinus E, Colombelli J, Affolter M. Tip-cell migration controls stalk-cell intercalation during *Drosophila* tracheal tube elongation. *Curr Biol*. 2008;18(22):1727-1734. doi:10.1016/J.CUB.2008.10.062
17. Reffay M, Parrini MC, Cochet-Escartin O, et al. Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells. *Nat Cell Biol*. 2014;16(3):217-223. doi:10.1038/NCB2917
18. Weber GF, Bjerke MA, DeSimone DW. A mechanoresponsive cadherin-keratin complex directs polarized protrusive behavior and collective cell migration. *Dev Cell*. 2012;22(1):104-115. doi:10.1016/J.DEVCEL.2011.10.013

19. Farooqui R, Fenteany G. Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 1):51-63. doi:10.1242/JCS.01577
20. Mayor R, Etienne-Manneville S. The front and rear of collective cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2016 17:2. 2016;17(2):97-109. doi:10.1038/nrm.2015.14
21. Chaplin DD. Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S3. doi:10.1016/J.JACI.2009.12.980
22. George S, Martin JAJ, Graziani V, Sanz-Moreno V. Amoeboid migration in health and disease: Immune responses versus cancer dissemination. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10. doi:10.3389/FCELL.2022.1091801
23. Liu YJ, Le Berre M, Lautenschlaeger F, et al. Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. *Cell.* 2015;160(4):659-672. doi:10.1016/J.CELL.2015.01.007
24. Paňková K, Rösel D, Novotný M, Brábek J. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2010;67(1):63. doi:10.1007/S00018-009-0132-1
25. Cunningham CC. Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J Cell Biol.* 1995;129(6):1589. doi:10.1083/JCB.129.6.1589
26. Schick J, Raz E. Blebs—Formation, Regulation, Positioning, and Role in Amoeboid Cell Migration. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10. doi:10.3389/FCELL.2022.926394
27. Yumura S, Mori H, Fukui Y. Localization of actin and myosin for the study of amoeboid movement in Dictyostelium using improved immunofluorescence. *J Cell Biol.* 1984;99(3):894. doi:10.1083/JCB.99.3.894
28. Miao L, Vanderlinde O, Liu J, et al. The role of filament-packing dynamics in powering amoeboid cell motility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(14):5390. doi:10.1073/PNAS.0708416105

29. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(12):1776. doi:10.1172/JCI20530
30. Kim DH, Xing T, Yang Z, Dudek R, Lu Q, Chen YH. Epithelial Mesenchymal Transition in Embryonic Development, Tissue Repair and Cancer: A Comprehensive Overview. *J Clin Med*. 2018;7(1). doi:10.3390/JCM7010001
31. Grande MT, Sánchez-Laorden B, López-Blau C, et al. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nature Medicine* 2015 21:9. 2015;21(9):989-997. doi:10.1038/nm.3901
32. Mittal V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu Rev Pathol*. 2018;13:395-412. doi:10.1146/ANNUREV-PATHOL-020117-043854
33. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420. doi:10.1172/JCI39104
34. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008 9:6. 2008;9(6):446-454. doi:10.1038/nrm2406
35. Henderson E, Haydon PG, Sakaguchi DS. Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science*. 1992;257(5078):1944-1946. doi:10.1126/SCIENCE.1411511
36. Hayashi T, Rosenbluth R. Actin polymerization by direct transphosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1962;8(1-2):20-23. doi:10.1016/0006-291X(62)90227-9
37. Mullins RD, Pollard TD. Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol*. 1999;9(2):244-249. doi:10.1016/S0959-440X(99)80034-7
38. Evangelista M, Zigmond S, Boone C. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci*. 2003;116(13):2603-2611. doi:10.1242/JCS.00611

39. Wegner A. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol.* 1976;108(1):139-150. doi:10.1016/S0022-2836(76)80100-3
40. Nürnberg A, Kitzing T, Grosse R. Nucleating actin for invasion. *Nature Reviews Cancer* 2011 11:3. 2011;11(3):177-187. doi:10.1038/nrc3003
41. Ferron F, Rebowski G, Lee SH, Dominguez R. Structural basis for the recruitment of profilin–actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J.* 2007;26(21):4597. doi:10.1038/SJ.EMBOJ.7601874
42. Chesarone MA, Goode BL. Actin Nucleation and Elongation Factors: Mechanisms and Interplay. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(1):28. doi:10.1016/J.CEB.2008.12.001
43. Wriggers W, Tang JX, Azuma T, Marks PW, Janmey PA. Cofilin and gelsolin segment-1: molecular dynamics simulation and biochemical analysis predict a similar actin binding mode. *J Mol Biol.* 1998;282(5):921-932. doi:10.1006/JMBI.1998.2048
44. Goldschmidt-Clermont PJ, Furman MI, Wachsstock D, Safer D, Nachmias VT, Pollard TD. The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol Biol Cell.* 1992;3(9):1015. doi:10.1091/MBC.3.9.1015
45. Petrie RJ, Yamada KM. At the leading edge of three-dimensional cell migration. *J Cell Sci.* 2012;125(24):5917-5926. doi:10.1242/jcs.093732
46. Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(11):6181. doi:10.1073/PNAS.95.11.6181
47. Yang C, Svitkina T. Visualizing branched actin filaments in lamellipodia by electron tomography. *Nat Cell Biol.* 2011;13(9):1012. doi:10.1038/NCB2321
48. Lebensohn AM, Kirschner MW. Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol Cell.* 2009;36(3):512. doi:10.1016/J.MOLCEL.2009.10.024

49. Tang H, Li A, Bi J, et al. Loss of Scar/WAVE complex promotes N-WASP- and FAK-dependent invasion. *Curr Biol.* 2013;23(2):107-117. doi:10.1016/J.CUB.2012.11.059
50. Raucher D, Sheetz MP. Cell Spreading and Lamellipodial Extension Rate Is Regulated by Membrane Tension. *J Cell Biol.* 2000;148(1):127. doi:10.1083/JCB.148.1.127
51. Oakes PW, Bidone TC, Beckham Y, et al. Lamellipodium is a myosin-independent mechanosensor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(11):2646-2651. doi:10.1073/PNAS.1715869115/-/DCSUPPLEMENTAL
52. Alexandrova AY, Arnold K, Schaub S, et al. Comparative Dynamics of Retrograde Actin Flow and Focal Adhesions: Formation of Nascent Adhesions Triggers Transition from Fast to Slow Flow. *PLoS One.* 2008;3(9):3234. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0003234
53. Suraneni P, Fogelson B, Rubinstein B, et al. A mechanism of leading-edge protrusion in the absence of Arp2/3 complex. *Mol Biol Cell.* 2015;26(5):901. doi:10.1091/MBC.E14-07-1250
54. Steffen A, Faix J, Resch GP, et al. Filopodia Formation in the Absence of Functional WAVE- and Arp2/3-Complexes. *Mol Biol Cell.* 2006;17(6):2581. doi:10.1091/MBC.E05-11-1088
55. Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, et al. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol.* 2003;160(3):409. doi:10.1083/JCB.200210174
56. Yang C, Czech L, Gerboth S, Kojima SI, Scita G, Svitkina T. Novel Roles of Formin mDia2 in Lamellipodia and Filopodia Formation in Motile Cells. *PLoS Biol.* 2007;5(11):2624-2645. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.0050317
57. Cramer LP, Siebert M, Mitchison TJ. Identification of Novel Graded Polarity Actin Filament Bundles in Locomoting Heart Fibroblasts: Implications for the Generation of Motile Force. *J Cell Biol.* 1997;136(6):1287. doi:10.1083/JCB.136.6.1287
58. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 1992;70(3):389-399. doi:10.1016/0092-8674(92)90163-7

59. Roovers K, Assoian RK. Effects of Rho Kinase and Actin Stress Fibers on Sustained Extracellular Signal-Regulated Kinase Activity and Activation of G1 Phase Cyclin-Dependent Kinases. *Mol Cell Biol.* 2003;23(12):4283. doi:10.1128/MCB.23.12.4283-4294.2003
60. Hotulainen P, Lappalainen P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol.* 2006;173(3):383. doi:10.1083/JCB.200511093
61. Vignaud T, Copos C, Leterrier C, et al. Stress fibers are embedded in a contractile cortical network. *Nat Mater.* 2021;20(3):410. doi:10.1038/S41563-020-00825-Z
62. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 1995;81(1):53-62. doi:10.1016/0092-8674(95)90370-4
63. Blanchoin L, Letort G, Ennomani H, Gressin L, Théry M. Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton. *F1000Res.* 2015;4. doi:10.12688/F1000RESEARCH.6374.1
64. Moritz M, Agard DA. γ -Tubulin complexes and microtubule nucleation. *Curr Opin Struct Biol.* 2001;11(2):174-181. doi:10.1016/S0959-440X(00)00187-1
65. Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 1984 312:5991. 1984;312(5991):237-242. doi:10.1038/312237a0
66. Schuyler SC, Pellman D. Microtubule “plus-end-tracking proteins”: The end is just the beginning. *Cell.* 2001;105(4):421-424. doi:10.1016/S0092-8674(01)00364-6
67. Vale RD, Malik F, Brown D. Directional instability of microtubule transport in the presence of kinesin and dynein, two opposite polarity motor proteins. *J Cell Biol.* 1992;119(6):1589-1596. doi:10.1083/JCB.119.6.1589
68. Brangwynne CP, MacKintosh FC, Weitz DA. Force fluctuations and polymerization dynamics of intracellular microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(41):16128. doi:10.1073/PNAS.0703094104

69. Nakamura M, Zhou XZ, Lu KP. Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Curr Biol.* 2001;11(13):1062-1067. doi:10.1016/S0960-9822(01)00297-4
70. Straube A, Merdes A. EB3 regulates microtubule dynamics at the cell cortex and is required for myoblast elongation and fusion. *Curr Biol.* 2007;17(15):1318-1325. doi:10.1016/J.CUB.2007.06.058
71. Osmani N, Peglion F, Chavrier P, Etienne-Manneville S. Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *J Cell Biol.* 2010;191(7):1261-1269. doi:10.1083/JCB.201003091
72. Gu Z, Noss EH, Hsu VW, Brenner MB. Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *J Cell Biol.* 2011;193(1):61-70. doi:10.1083/JCB.201007003
73. Villari G, Jayo A, Zanet J, et al. A direct interaction between fascin and microtubules contributes to adhesion dynamics and cell migration. *J Cell Sci.* 2015;128(24):4601-4614. doi:10.1242/JCS.175760/-/DC1
74. Elkhatib N, Neu MB, Zensen C, et al. Fascin plays a role in stress fiber organization and focal adhesion disassembly. *Curr Biol.* 2014;24(13):1492-1499. doi:10.1016/J.CUB.2014.05.023
75. Kaverina I, Rottner K, Small JV. Targeting, Capture, and Stabilization of Microtubules at Early Focal Adhesions. *J Cell Biol.* 1998;142(1):181. doi:10.1083/JCB.142.1.181
76. Krendel M, Zenke FT, Bokoch GM. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nature Cell Biology* 2002 4:4. 2002;4(4):294-301. doi:10.1038/ncb773
77. Shpetner HS, Vallee RB. Dynamamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules. *Nature.* 1992;355(6362):733-735. doi:10.1038/355733A0

78. Yue J, Xie M, Gou X, Lee P, Schneider MD, Wu X. Microtubules Regulate Focal Adhesion Dynamics through MAP4K4. *Dev Cell*. 2014;31(5):572. doi:10.1016/J.DEVCEL.2014.10.025
79. Ezratty EJ, Partridge MA, Gundersen GG. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nature Cell Biology* 2005 7:6. 2005;7(6):581-590. doi:10.1038/ncb1262
80. Lazarides E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*. 1980;283(5744):249-255. doi:10.1038/283249A0
81. Goldman RD, Khuon S, Chou YH, Opal P, Steinert PM. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol*. 1996;134(4):971-983. doi:10.1083/JCB.134.4.971
82. Herrmann H, Bär H, Kreplak L, Strelkov S V., Aebi U. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007 8:7. 2007;8(7):562-573. doi:10.1038/nrm2197
83. Quinlan RA, Cohlberg JA, Schiller DL, Hatzfeld M, Franke WW. Heterotypic tetramer (A2D2) complexes of non-epidermal keratins isolated from cytoskeletons of rat hepatocytes and hepatoma cells. *J Mol Biol*. 1984;178(2):365-388. doi:10.1016/0022-2836(84)90149-9
84. Burgstaller G, Gregor M, Winter L, Wiche G. Keeping the Vimentin Network under Control: Cell–Matrix Adhesion–associated Plectin 1f Affects Cell Shape and Polarity of Fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2010;21(19):3362. doi:10.1091/MBC.E10-02-0094
85. Kim J, Yang C, Kim EJ, et al. Vimentin filaments regulate integrin-ligand interactions by binding to the cytoplasmic tail of integrin β 3. *J Cell Sci*. 2016;129(10):2030-2042. doi:10.1242/JCS.180315/260303/AM/VIMENTIN-FILAMENTS-REGULATE-INTEGRIN-LIGAND

86. Ivaska J, Vuoriluoto K, Huovinen T, Izawa I, Inagaki M, Parker PJ. PKC ϵ -mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J.* 2005;24(22):3834. doi:10.1038/SJ.EMBOJ.7600847
87. Chang IA, Oh MJ, Kim MH, Park SK, Kim BG, Namgung U. Vimentin phosphorylation by Cdc2 in Schwann cell controls axon growth via β 1-integrin activation. *The FASEB Journal.* 2012;26(6):2401-2413. doi:10.1096/FJ.11-199018
88. Sakamoto Y, Boëda B, Etienne-Manneville S. APC binds intermediate filaments and is required for their reorganization during cell migration. *J Cell Biol.* 2013;200(3):249. doi:10.1083/JCB.201206010
89. Gan Z, Ding L, Burckhardt CJ, et al. Vimentin Intermediate Filaments Template Microtubule Networks to Enhance Persistence in Cell Polarity and Directed Migration. *Cell Syst.* 2016;3(3):252-263.e8. doi:10.1016/J.CELS.2016.08.007
90. Meriane M, Mary S, Comunale F, Vignal E, Fort P, Gauthier-Rouviere C. Cdc42Hs and Rac1 GTPases induce the collapse of the vimentin intermediate filament network. *J Biol Chem.* 2000;275(42):33046-33052. doi:10.1074/JBC.M001566200
91. Helfand BT, Mendez MG, Murthy SNP, et al. Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia. *Mol Biol Cell.* 2011;22(8):1274. doi:10.1091/MBC.E10-08-0699
92. Seetharaman S, Etienne-Manneville S. Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends Cell Biol.* 2020;30(9):720-735. doi:10.1016/J.TCB.2020.06.004
93. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 19):3901-3903. doi:10.1242/JCS.03098
94. Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, et al. Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin α V β 3. *Science.* 2001;294(5541):339. doi:10.1126/SCIENCE.1064535
95. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol.* 2007;8(5). doi:10.1186/GB-2007-8-5-215

96. Mezu-Ndubuisi OJ, Maheshwari A. The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatric Research* 2020 89:7. 2020;89(7):1619-1626. doi:10.1038/s41390-020-01177-9
97. Qin J, Vinogradova O, Plow EF. Integrin Bidirectional Signaling: A Molecular View. *PLoS Biol.* 2004;2(6). doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.0020169
98. Calderwood DA, Yan B, De Pereda JM, et al. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem.* 2002;277(24):21749-21758. doi:10.1074/JBC.M111996200
99. Wegener KL, Partridge AW, Han J, et al. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell.* 2007;128(1):171-182. doi:10.1016/J.CELL.2006.10.048
100. Laukaitis CM, Webb DJ, Donais K, Horwitz AF. Differential Dynamics of $\alpha 5$ Integrin, Paxillin, and α -Actinin during Formation and Disassembly of Adhesions in Migrating Cells. *J Cell Biol.* 2001;153(7):1427. doi:10.1083/JCB.153.7.1427
101. Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol.* 2007;179(5):1043. doi:10.1083/JCB.200703036
102. Giannone G, Dubin-Thaler BJ, Rossier O, et al. Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion site formation. *Cell.* 2007;128(3):561. doi:10.1016/J.CELL.2006.12.039
103. Friedland JC, Lee MH, Boettiger D. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science.* 2009;323(5914):642-644. doi:10.1126/SCIENCE.1168441
104. Rottner K, Hall A, Small J V. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol.* 1999;9(12):640-648. doi:10.1016/S0960-9822(99)80286-3
105. Burnette DT, Manley S, Sengupta P, et al. A role for actin arcs in the leading edge advance of migrating cells. *Nat Cell Biol.* 2011;13(4):371. doi:10.1038/NCB2205

106. Katz BZ, Zamir E, Bershadsky A, Kam Z, Yamada KM, Geiger B. Physical State of the Extracellular Matrix Regulates the Structure and Molecular Composition of Cell-Matrix Adhesions. *Mol Biol Cell*. 2000;11(3):1047. doi:10.1091/MBC.11.3.1047
107. Chen WT, Hasegawa E, Hasegawa T, Weinstock C, Yamada KM. Development of cell surface linkage complexes in cultured fibroblasts. *J Cell Biol*. 1985;100(4):1103. doi:10.1083/JCB.100.4.1103
108. Barber-Pérez N, Georgiadou M, Guzmán C, Isomursu A, Hamidi H, Ivaska J. Mechano-responsiveness of fibrillar adhesions on stiffness-gradient gels. *J Cell Sci*. 2020;133(12). doi:10.1242/JCS.242909/266402/AM/MECHANO-RESPONSIVENESS-OF-FIBRILLAR-ADHESIONS-ON
109. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(9):633. doi:10.1038/NRM2957
110. Crowley E, Horwitz AF. Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal tension regulate the release of fibroblast adhesions. *J Cell Biol*. 1995;131(2):525. doi:10.1083/JCB.131.2.525
111. Franco SJ, Rodgers MA, Perrin BJ, et al. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol*. 2004;6(10):977-983. doi:10.1038/NCB1175
112. Bhatt A, Kaverina I, Otey C, Huttenlocher A. Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 17):3415-3425. doi:10.1242/JCS.115.17.3415
113. Kaverina I, Krylyshkina O, Small JV. Microtubule Targeting of Substrate Contacts Promotes Their Relaxation and Dissociation. *J Cell Biol*. 1999;146(5):1033. doi:10.1083/JCB.146.5.1033
114. Ezratty EJ, Partridge MA, Gundersen GG. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol*. 2005;7(6):581-590. doi:10.1038/NCB1262

115. Waterman-Storer CM, Worthylake RA, Liu BP, Burridge K, Salmon ED. Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nature Cell Biology* 1999 1:1. 1999;1(1):45-50. doi:10.1038/9018
116. Ballestrem C, Hinz B, Imhof BA, Wehrle-Haller B. Marching at the front and dragging behind: differential $\alpha V\beta 3$ -integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol.* 2001;155(7):1319. doi:10.1083/JCB.200107107
117. Kaverina I, Krylyshkina O, Gimona M, Beningo K, Wang YL, Small JV. Enforced polarisation and locomotion of fibroblasts lacking microtubules. *Curr Biol.* 2000;10(12):739-742. doi:10.1016/S0960-9822(00)00544-3
118. Albiges-Rizo C, Destaing O, Fourcade B, Planus E, Block MR. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 17):3037. doi:10.1242/JCS.052704
119. Badowski C, Pawlak G, Grichine A, et al. Paxillin Phosphorylation Controls Invadopodia/Podosomes Spatiotemporal Organization. *Mol Biol Cell.* 2008;19(2):633. doi:10.1091/MBC.E06-01-0088
120. Weaver AM, Heuser JE, Karginov A V., Lee W lih, Parsons JT, Cooper JA. Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex. *Curr Biol.* 2002;12(15):1270-1278. doi:10.1016/S0960-9822(02)01035-7
121. Burgstaller G, Gimona M. Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(6). doi:10.1152/AJPHEART.01002.2004
122. Yamaguchi H, Lorenz M, Kempiak S, et al. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP–Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol.* 2005;168(3):441. doi:10.1083/JCB.200407076
123. Destaing O, Planus E, Bouvard D, et al. $\beta 1A$ Integrin Is a Master Regulator of Invadosome Organization and Function. *Mol Biol Cell.* 2010;21(23):4108. doi:10.1091/MBC.E10-07-0580

124. Baldassarre M, Pompeo A, Beznoussenko G, et al. Dynamin Participates in Focal Extracellular Matrix Degradation by Invasive Cells. *Mol Biol Cell*. 2003;14(3):1074. doi:10.1091/MBC.E02-05-0308
125. Mueller SC, Chen WT. Cellular invasion into matrix beads: localization of beta 1 integrins and fibronectin to the invadopodia. *J Cell Sci*. 1991;99 (Pt 2)(2):213-225. doi:10.1242/JCS.99.2.213
126. Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:287-309. doi:10.1146/ANNUREV.CELLBIO.22.010305.104315
127. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol*. 2010;341(1):126-140. doi:10.1016/J.YDBIO.2009.10.026
128. Mecham RP. Overview of Extracellular Matrix. *Curr Protoc Cell Biol*. 2012;57(1):10.1.1-10.1.16. doi:10.1002/0471143030.CB1001S57
129. Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2009;61(2):198. doi:10.1124/PR.109.001289
130. Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):1-19. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A004978
131. Heino J. The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bioessays*. 2007;29(10):1001-1010. doi:10.1002/BIES.20636
132. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. 2003;200(4):423-428. doi:10.1002/PATH.1437
133. Eckes B, Nischt R, Krieg T. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2010;3(1):4. doi:10.1186/1755-1536-3-4

134. Curran ME, Atkinson DL, Ewart AK, Morris CA, Leppert MF, Keating MT. The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supravalvular aortic stenosis. *Cell*. 1993;73(1):159-168. doi:10.1016/0092-8674(93)90168-P
135. Mao Y, Schwarzbauer JE. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol*. 2005;24(6):389-399. doi:10.1016/J.MATBIO.2005.06.008
136. Fogerty FJ, Akiyama SK, Yamada KM, Mosher DF. Inhibition of binding of fibronectin to matrix assembly sites by anti- integrin (alpha 5 beta 1) antibodies. *J Cell Biol*. 1990;111(2):699. doi:10.1083/JCB.111.2.699
137. Wu C, Keivens VM, Otoole TE, Mcdonald JA, Ginsberg+ MH. Integrin Activation and Cytoskeletal Interaction Are Essential for the Assembly of a Fibronectin Matrix. *Cell*. 1995;83:715-724.
138. Paulson M. Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1992;27(1-2):93-127. doi:10.3109/10409239209082560
139. Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, et al. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biology*. 2005;24(5):326-332. doi:10.1016/J.MATBIO.2005.05.006
140. Domogatskaya A, Rodin S, Tryggvason K. Functional diversity of laminins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:523-553. doi:10.1146/ANNUREV-CELLBIO-101011-155750
141. Ruoslahti E. Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 1988;4:229-255. doi:10.1146/ANNUREV.CB.04.110188.001305
142. Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *The FASEB Journal*. 1992;6(3):861-870. doi:10.1096/FASEBJ.6.3.1740236
143. Gubbiotti MA, Buraschi S, Kapoor A, Iozzo R V. Proteoglycan signaling in tumor angiogenesis and endothelial cell autophagy. *Semin Cancer Biol*. 2020;62:1. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2019.05.003

144. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol.* 2011;209(2):139-151. doi:10.1530/JOE-10-0377
145. Martin GR, Timpl R. Laminin and other basement membrane components. *Annu Rev Cell Biol.* 1987;3:57-85. doi:10.1146/ANNUREV.CB.03.110187.000421
146. Schmidt S, Friedl P. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res.* 2010;339(1):83. doi:10.1007/S00441-009-0892-9
147. Bode W, Grams F, Reinemer P, et al. The metzincin-superfamily of zinc-peptidases. *Adv Exp Med Biol.* 1996;389:1-11. doi:10.1007/978-1-4613-0335-0_1/COVER
148. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):221. doi:10.1038/NRM2125
149. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(12). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A005058
150. Clark IM, Swingle TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(6-7):1362-1378. doi:10.1016/J.BIOCEL.2007.12.006
151. Hite LA, Shannon JD, Fox JW, Bjarnason JB. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structures. *Biochemistry.* 1992;31(27):6203-6211. doi:10.1021/BI00142A005
152. Apte SS. A Disintegrin-like and Metalloprotease (Reprolysin-type) with Thrombospondin Type 1 Motif (ADAMTS) Superfamily: Functions and Mechanisms. *J Biol Chem.* 2009;284(46):31493. doi:10.1074/JBC.R109.052340
153. SenGupta S, Parent CA, Bear JE. The principles of directed cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(8):529. doi:10.1038/S41580-021-00366-6

154. Wilkinson PC. Random locomotion; chemotaxis and chemokinesis. A guide to terms defining cell locomotion. *Immunol Today*. 1985;6(9):273-278. doi:10.1016/0167-5699(85)90066-0
155. Klein PS, Sun TJ, Saxe CL, Kimmel AR, Johnson RL, Devreotes PN. A chemoattractant receptor controls development in *Dictyostelium discoideum*. *Science*. 1988;241(4872):1467-1472. doi:10.1126/SCIENCE.3047871
156. Robertson ADJ, Grutsch JF. Aggregation in *Dictyostelium discoideum*. *Cell*. 1981;24(3):603-611. doi:10.1016/0092-8674(81)90087-8
157. Insall R, Andrew N. Chemotaxis in *Dictyostelium*: how to walk straight using parallel pathways. *Curr Opin Microbiol*. 2007;10(6):578-581. doi:10.1016/J.MIB.2007.10.004
158. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-127. doi:10.1016/S1074-7613(00)80165-X
159. Janetopoulos C, Jin T, Devreotes P. Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells. *Science*. 2001;291(5512):2408-2411. doi:10.1126/SCIENCE.1055835
160. Bear JE, Haugh JM. Directed migration of mesenchymal cells: where signaling and the cytoskeleton meet. *Curr Opin Cell Biol*. 2014;0(1):74. doi:10.1016/J.CEB.2014.06.005
161. Consalvo KM, Rijal R, Tang YU, Kirolos SA, Smith MR, Gomer RH. Extracellular signaling in *Dictyostelium*. *Int J Dev Biol*. 2019;63(8-9-10):395. doi:10.1387/IJDB.190259RG
162. Lam P ying, Huttenlocher A. Interstitial leukocyte migration in vivo. *Curr Opin Cell Biol*. 2013;25(5):650. doi:10.1016/J.CEB.2013.05.007
163. Devreotes P, Janetopoulos C. Eukaryotic chemotaxis: distinctions between directional sensing and polarization. *J Biol Chem*. 2003;278(23):20445-20448. doi:10.1074/JBC.R300010200

164. Merlot S, Firtel RA. Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 17):3471-3478. doi:10.1242/JCS.00703
165. Carter SB. Principles of cell motility: the direction of cell movement and cancer invasion. *Nature.* 1965;208(5016):1183-1187. doi:10.1038/2081183A0
166. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2009;17(2):153-162. doi:10.1111/J.1524-475X.2009.00466.X
167. Huttenlocher A, Horwitz AR. Integrins in Cell Migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(9):1-16. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A005074
168. King SJ, Asokan SB, Haynes EM, et al. Lamellipodia are crucial for haptotactic sensing and response. *J Cell Sci.* 2016;129(12):2329. doi:10.1242/JCS.184507
169. Aznavoorian S, Stracke ML, Krutzsch H, Schiffmann E, Liotta LA. Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells. *J Cell Biol.* 1990;110(4):1427. doi:10.1083/JCB.110.4.1427
170. Franke K, Gruler H. Galvanotaxis of human granulocytes: electric field jump studies. *European Biophysics Journal.* 1990;18(6):334-346. doi:10.1007/BF00196924
171. Zhao M. Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(6):674-682. doi:10.1016/J.SEMCDB.2008.12.009
172. Zhao M, Bai H, Wang E, Forrester J V., McCaig CD. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 3):397. doi:10.1242/JCS.00868
173. Allen GM, Mogilner A, Theriot JA. Electrophoresis of Cellular Membrane Components Creates the Directional Cue Guiding Keratocyte Galvanotaxis. *Current Biology.* 2013;23(7):560-568. doi:10.1016/J.CUB.2013.02.047

174. Charras G, Sahai E. Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(12):813-824. doi:10.1038/NRM3897
175. Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J.* 2000;79(1):144. doi:10.1016/S0006-3495(00)76279-5
176. Bollmann L, Koser DE, Shahapure R, et al. Microglia mechanics: immune activation alters traction forces and durotaxis. *Front Cell Neurosci.* 2015;9(September):1-16. doi:10.3389/FNCEL.2015.00363
177. Wong JY, Velasco A, Rajagopalan P, Pham Q. Directed Movement of Vascular Smooth Muscle Cells on Gradient-Compliant Hydrogels†. *Langmuir.* 2003;19(5):1908-1913. doi:10.1021/LA026403P
178. DuChez BJ, Doyle AD, Dimitriadis EK, Yamada KM. Durotaxis by Human Cancer Cells. *Biophys J.* 2019;116(4):670-683. doi:10.1016/j.bpj.2019.01.009
179. Shellard A, Mayor R. Collective durotaxis along a self-generated stiffness gradient in vivo. *Nature 2021 600:7890.* 2021;600(7890):690-694. doi:10.1038/s41586-021-04210-x
180. Zhu M, Tao H, Samani M, et al. Spatial mapping of tissue properties in vivo reveals a 3D stiffness gradient in the mouse limb bud. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(9):4781-4791. doi:10.1073/PNAS.1912656117/-/DCSUPPLEMENTAL
181. Pfeiffer BJ, Franklin CL, Hsieh FH, Bank RA, Phillips CL. Alpha 2(I) collagen deficient oim mice have altered biomechanical integrity, collagen content, and collagen crosslinking of their thoracic aorta. *Matrix Biol.* 2005;24(7):451-458. doi:10.1016/J.MATBIO.2005.07.001
182. Quintero-Fabián S, Arreola R, Becerril-Villanueva E, et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Front Oncol.* 2019;9:1370. doi:10.3389/FONC.2019.01370

183. Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2009 10:1. 2009;10(1):21-33. doi:10.1038/nrm2593
184. Espina JA, Marchant CL, Barriga EH. Durotaxis: the mechanical control of directed cell migration. *FEBS J.* 2022;289(10):2736. doi:10.1111/FEBS.15862
185. Spyropoulou A, Karamesinis K, Basdra EK. Mechanotransduction pathways in bone pathobiology. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(9):1700-1708. doi:10.1016/J.BBADIS.2015.05.010
186. Halper J, Kjaer M. Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Elastin, Fibrillin, Fibulins, Fibrinogen, Fibronectin, Laminin, Tenascins and Thrombospondins. Published online 2014:31-47. doi:10.1007/978-94-007-7893-1_3/COVER
187. Carey SP, Martin KE, Reinhart-King CA. Three-dimensional collagen matrix induces a mechanosensitive invasive epithelial phenotype. *Scientific Reports* 2017 7:1. 2017;7(1):1-14. doi:10.1038/srep42088
188. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006;126(4):677-689. doi:10.1016/J.CELL.2006.06.044
189. Schrader J, Gordon-Walker TT, Aucott RL, et al. Matrix Stiffness Modulates Proliferation, Chemotherapeutic Response and Dormancy in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Hepatology.* 2011;53(4):1192. doi:10.1002/HEP.24108
190. Ehrbar M, Sala A, Lienemann P, et al. Elucidating the Role of Matrix Stiffness in 3D Cell Migration and Remodeling. *Biophys J.* 2011;100(2):284. doi:10.1016/J.BPJ.2010.11.082
191. Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: forcing tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2009 9:2. 2009;9(2):108-122. doi:10.1038/nrc2544
192. Chan CE, Odde DJ. Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science.* 2008;322(5908):1687-1691. doi:10.1126/SCIENCE.1163595

193. Bangasser BL, Rosenfeld SS, Odde DJ. Determinants of Maximal Force Transmission in a Motor-Clutch Model of Cell Traction in a Compliant Microenvironment. *Biophys J*. 2013;105(3):581. doi:10.1016/J.BPJ.2013.06.027
194. Elosegui-Artola A, Oria R, Chen Y, et al. Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity. *Nat Cell Biol*. 2016;18(5):540-548. doi:10.1038/NCB3336
195. Bangasser BL, Shamsan GA, Chan CE, et al. Shifting the optimal stiffness for cell migration. *Nat Commun*. 2017;8. doi:10.1038/NCOMMS15313
196. Isomursu A, Park KY, Hou J, et al. Directed cell migration towards softer environments. *Nat Mater*. 2022;21(9). doi:10.1038/S41563-022-01294-2
197. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*. 2005;8(3):241-254. doi:10.1016/J.CCR.2005.08.010
198. Xie W, Wei X, Kang H, et al. Static and Dynamic: Evolving Biomaterial Mechanical Properties to Control Cellular Mechanotransduction. *Advanced Science*. 2023;10(9):2204594. doi:10.1002/ADVS.202204594
199. Haining AWM, Von Essen M, Attwood SJ, Hytönen VP, Del Río Hernández A. All Subdomains of the Talin Rod Are Mechanically Vulnerable and May Contribute to Cellular Mechanosensing. *ACS Nano*. 2016;10(7):6648-6658. doi:10.1021/ACSNANO.6B01658/SUPPL_FILE/NN6B01658_SI_001.PDF
200. Hoon JL, Tan MH, Koh CG. The Regulation of Cellular Responses to Mechanical Cues by Rho GTPases. *Cells*. 2016;5(2). doi:10.3390/CELLS5020017
201. Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M. Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament. *J Cell Biol*. 2011;195(5):721. doi:10.1083/JCB.201102039
202. Uyeda TQP, Iwadate Y, Umeki N, Nagasaki A, Yumura S. Stretching Actin Filaments within Cells Enhances their Affinity for the Myosin II Motor Domain. *PLoS One*. 2011;6(10):e26200. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0026200

203. Pandit NG, Cao W, Bibeau J, et al. Force and phosphate release from Arp2/3 complex promote dissociation of actin filament branches. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(24):13519-13528. doi:10.1073/PNAS.1911183117/-/DCSUPPLEMENTAL
204. Sun X, Phua DYZ, Axiotakis L, et al. Mechanosensing through direct binding of tensed F-actin by LIM domains. *Dev Cell*. 2020;55(4):468. doi:10.1016/J.DEVCEL.2020.09.022
205. Kadrmas JL, Beckerle MC. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(11):920-931. doi:10.1038/NRM1499
206. Harris AR, Jreij P, Fletcher DA. Mechanotransduction by the Actin Cytoskeleton: Converting Mechanical Stimuli into Biochemical Signals. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070816-033547>. 2016;47:617-631. doi:10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-070816-033547
207. Shimozawa T, Ishiwata SNI. Mechanical Distortion of Single Actin Filaments Induced by External Force: Detection by Fluorescence Imaging. *Biophys J*. 2009;96(3):1036. doi:10.1016/J.BPJ.2008.09.056
208. Cain NE, Starr DA. SUN proteins and nuclear envelope spacing. <http://dx.doi.org/10.4161/194910342014990857>. 2015;6(1):2-7. doi:10.4161/19491034.2014.990857
209. Starr DA, Fridolfsson HN. Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2010;26:421-444. doi:10.1146/ANNUREV-CELLBIO-100109-104037
210. Mellad JA, Warren DT, Shanahan CM. Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23(1):47-54. doi:10.1016/J.CEB.2010.11.006
211. Li EW, McKee-Muir OC, Gilbert PM. Cellular Biomechanics in Skeletal Muscle Regeneration. *Curr Top Dev Biol*. 2018;126:125-176. doi:10.1016/BS.CTDB.2017.08.007
212. Kim DH, Chambliss AB, Wirtz D. The multi-faceted role of the actin cap in cellular mechanosensation and mechanotransduction. *Soft Matter*. 2013;9(23):5516. doi:10.1039/C3SM50798J

213. Woroniuk A, Porter A, White G, et al. STEF/TIAM2-mediated Rac1 activity at the nuclear envelope regulates the perinuclear actin cap. *Nature Communications* 2018 9:1. 2018;9(1):1-15. doi:10.1038/s41467-018-04404-4
214. Arsenovic PT, Ramachandran I, Bathula K, et al. Nesprin-2G, a Component of the Nuclear LINC Complex, Is Subject to Myosin-Dependent Tension. *Biophys J*. 2016;110(1):34-43. doi:10.1016/J.BPJ.2015.11.014
215. Lombardi ML, Jaalouk DE, Shanahan CM, Burke B, Roux KJ, Lammerding J. The Interaction between Nesprins and Sun Proteins at the Nuclear Envelope Is Critical for Force Transmission between the Nucleus and Cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(30):26743-26753. doi:10.1074/JBC.M111.233700
216. Guilluy C, Osborne LD, Van Landeghem L, et al. Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat Cell Biol*. 2014;16(4):376-381. doi:10.1038/NCB2927
217. Zhang X, Lei K, Yuan X, et al. SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 Complexes Connect Centrosome to the Nucleus during Neurogenesis and Neuronal Migration in Mice. *Neuron*. 2009;64(2):173-187. doi:10.1016/j.neuron.2009.08.018
218. Lombardi ML, Jaalouk DE, Shanahan CM, Burke B, Roux KJ, Lammerding J. The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2011;286(30):26743-26753. doi:10.1074/JBC.M111.233700
219. Chancellory TJ, Lee J, Thodeti CK, Lele T. Actomyosin Tension Exerted on the Nucleus through Nesprin-1 Connections Influences Endothelial Cell Adhesion, Migration, and Cyclic Strain-Induced Reorientation. *Biophys J*. 2010;99(1):115. doi:10.1016/J.BPJ.2010.04.011
220. Anno T, Sakamoto N, Sato M. Role of nesprin-1 in nuclear deformation in endothelial cells under static and uniaxial stretching conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;424(1):94-99. doi:10.1016/J.BBRC.2012.06.073

221. Alam SG, Zhang Q, Prasad N, et al. The mammalian LINC complex regulates genome transcriptional responses to substrate rigidity. *Sci Rep.* 2016;6. doi:10.1038/SREP38063
222. Dahl KN, Kahn SM, Wilson KL, Discher DE. The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 20):4779-4786. doi:10.1242/JCS.01357
223. Lammerding J, Schulze PC, Takahashi T, et al. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *Journal of Clinical Investigation.* 2004;113(3):370. doi:10.1172/JCI19670
224. Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, et al. Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation. *Science.* 2013;341(6149):1240104. doi:10.1126/SCIENCE.1240104
225. Buxboim A, Swift J, Irianto J, et al. Matrix elasticity regulates lamin-A,C phosphorylation and turnover with feedback to actomyosin. *Curr Biol.* 2014;24(16):1909. doi:10.1016/J.CUB.2014.07.001
226. Solovei I, Wang AS, Thanisch K, et al. LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell.* 2013;152(3):584-598. doi:10.1016/J.CELL.2013.01.009
227. Demmerle J, Koch AJ, Holaska JM. The Nuclear Envelope Protein Emerin Binds Directly to Histone Deacetylase 3 (HDAC3) and Activates HDAC3 Activity. *J Biol Chem.* 2012;287(26):22080. doi:10.1074/JBC.M111.325308
228. Tajik A, Zhang Y, Wei F, et al. Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin. *Nat Mater.* 2016;15(12):1287. doi:10.1038/NMAT4729
229. Iyer KV, Pulford S, Mogilner A, Shivashankar G V. Mechanical Activation of Cells Induces Chromatin Remodeling Preceding MKL Nuclear Transport. *Biophys J.* 2012;103(7):1416. doi:10.1016/J.BPJ.2012.08.041

230. Von Wichert G, Jiang G, Kostic A, De Vos K, Sap J, Sheetz MP. RPTP- α acts as a transducer of mechanical force on α v/ β 3-integrin–cytoskeleton linkages. *J Cell Biol.* 2003;161(1):143. doi:10.1083/JCB.200211061
231. Abreu MTH, Penton PC, Kwok V, et al. Tyrosine phosphatase PTPalpha regulates focal adhesion remodeling through Rac1 activation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;294(4). doi:10.1152/AJPCELL.00359.2007
232. Wang HB, Dembo M, Hanks SK, Wang YL. Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(20):11295-11300. doi:10.1073/pnas.201201198
233. Craig DH, Haimovich B, Basson MD. Alpha-actinin-1 phosphorylation modulates pressure-induced colon cancer cell adhesion through regulation of focal adhesion kinase-Src interaction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;293(6). doi:10.1152/AJPCELL.00118.2007
234. Brown MC, Cary LA, Jamieson JS, Cooper JA, Turner CE. Src and FAK Kinases Cooperate to Phosphorylate Paxillin Kinase Linker, Stimulate Its Focal Adhesion Localization, and Regulate Cell Spreading and Protrusiveness. *Mol Biol Cell.* 2005;16(9):4316. doi:10.1091/MBC.E05-02-0131
235. Rubashkin MG, Cassereau L, Bainer R, et al. Force engages vinculin and promotes tumor progression by enhancing PI3K activation of phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate. *Cancer Res.* 2014;74(17):4597-4611. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3698
236. Kim NG, Gumbiner BM. Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK-Src-PI3K pathway. *J Cell Biol.* 2015;210(3):503-515. doi:10.1083/JCB.201501025
237. Totaro A, Panciera T, Piccolo S. YAP/TAZ upstream signals and downstream responses. *Nature Cell Biology* 2018 20:8. 2018;20(8):888-899. doi:10.1038/s41556-018-0142-z
238. Dupont S, Morsut L, Aragona M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature.* 2011;474(7350):179-184. doi:10.1038/NATURE10137

239. Dey A, Varelas X, Guan KL. Targeting the Hippo pathway in cancer, fibrosis, wound healing and regenerative medicine. *Nature Reviews Drug Discovery* 2020 19:7. 2020;19(7):480-494. doi:10.1038/s41573-020-0070-z
240. Aragona M, Panciera T, Manfrin A, et al. A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell*. 2013;154(5):1047-1059. doi:10.1016/J.CELL.2013.07.042
241. Lachowski D, Cortes E, Robinson B, Rice A, Rombouts K, Del Río Hernández AE. FAK controls the mechanical activation of YAP, a transcriptional regulator required for durotaxis. *FASEB Journal*. 2018;32(2):1099-1107. doi:10.1096/fj.201700721R
242. Elosegui-Artola A, Andreu I, Beedle AEM, et al. Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell*. 2017;171(6):1397-1410.e14. doi:10.1016/J.CELL.2017.10.008
243. Fearing B V., Jing L, Barcellona MN, et al. Mechanosensitive transcriptional coactivators MRTF-A and YAP/TAZ regulate nucleus pulposus cell phenotype through cell shape. *The FASEB Journal*. 2019;33(12):14022-14035. doi:10.1096/FJ.201802725RRR
244. Melcher ML, Block I, Kropf K, Singh AK, Posern G. Interplay of the transcription factor MRTF-A and matrix stiffness controls mammary acinar structure and protrusion formation. *Cell Communication and Signaling*. 2022;20(1):1-13. doi:10.1186/S12964-022-00977-2/FIGURES/6
245. Árnadóttir J, Chalfie M. Eukaryotic Mechanosensitive Channels. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37032807125836>. 2010;39(1):111-137. doi:10.1146/ANNUREV.BIOPHYS.37.032807.125836
246. Kang H, Hong Z, Zhong M, et al. Piezo1 mediates angiogenesis through activation of MT1-MMP signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2019;316(1):C92-C103. doi:10.1152/AJPCELL.00346.2018

247. He L, Si G, Huang J, Samuel ADT, Perrimon N. Mechanical regulation of stem-cell differentiation by the stretch-activated Piezo channel. *Nature*. 2018;555(7694):103-106. doi:10.1038/NATURE25744
248. Gudipaty SA, Lindblom J, Loftus PD, et al. Mechanical stretch triggers rapid epithelial cell division through Piezo1. *Nature*. 2017;543(7643):118-121. doi:10.1038/NATURE21407
249. Wang L, You X, Lotinun S, Zhang L, Wu N, Zou W. Mechanical sensing protein PIEZO1 regulates bone homeostasis via osteoblast-osteoclast crosstalk. *Nat Commun*. 2020;11(1). doi:10.1038/S41467-019-14146-6
250. Song J, Liu L, Lv L, et al. Fluid shear stress induces Runx-2 expression via upregulation of PIEZO1 in MC3T3-E1 cells. *Cell Biol Int*. 2020;44(7):1491-1502. doi:10.1002/CBIN.11344
251. Jin P, Jan LY, Jan YN. Mechanosensitive Ion Channels: Structural Features Relevant to Mechanotransduction Mechanisms. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050509>. 2020;43:207-229. doi:10.1146/ANNUREV-NEURO-070918-050509
252. Kuebler WM, Ying X, Bhattacharya J. Pressure-induced endothelial Ca(2+) oscillations in lung capillaries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282(5). doi:10.1152/AJPLUNG.00275.2001
253. Yin J, Kuebler WM. Mechanotransduction by TRP channels: general concepts and specific role in the vasculature. *Cell Biochem Biophys*. 2010;56(1):1-18. doi:10.1007/S12013-009-9067-2
254. Herrera-Pérez S, Lamas JA. TREK channels in Mechanotransduction: a Focus on the Cardiovascular System. *Front Cardiovasc Med*. 2023;10:1180242. doi:10.3389/FCVM.2023.1180242
255. Qin L, He T, Chen S, et al. Roles of mechanosensitive channel Piezo1/2 proteins in skeleton and other tissues. *Bone Research* 2021 9:1. 2021;9(1):1-17. doi:10.1038/s41413-021-00168-8

256. Muhamed I, Wu J, Sehgal P, et al. E-cadherin-mediated force transduction signals regulate global cell mechanics. *J Cell Sci.* 2016;129(9):1843-1854. doi:10.1242/JCS.185447/-/DC1
257. Priya R, Gomez GA, Budnar S, et al. Feedback regulation through myosin II confers robustness on RhoA signalling at E-cadherin junctions. *Nat Cell Biol.* 2015;17(10):1282-1293. doi:10.1038/NCB3239
258. Y L, O K, D C, et al. Compressive forces stabilise microtubules in living cells. Published online February 7, 2022. doi:10.1101/2022.02.07.479347
259. Kechagia Z, Sáez P, Gómez-González M, et al. The laminin-keratin link shields the nucleus from mechanical deformation and signalling. *Nat Mater.* 2023;22(11):1409-1420. doi:10.1038/S41563-023-01657-3
260. Cao R, Tian H, Tian Y, Fu X. A Hierarchical Mechanotransduction System: From Macro to Micro. *Advanced Science.* Published online 2023:2302327. doi:10.1002/ADVS.202302327
261. Alisafaei F, Moheimani H, Elson EL, Genin GM. A nuclear basis for mechanointelligence in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023;120(19):e2303569120. doi:10.1073/PNAS.2303569120/ASSET/0A1BAF8C-289E-4016-BC6C-1490536422A5/ASSETS/PNAS.2303569120.FP.PNG
262. Balestrini JL, Chaudhry S, Sarrazy V, Koehler A, Hinz B. The mechanical memory of lung myofibroblasts. *Integr Biol (Camb).* 2012;4(4):410-421. doi:10.1039/C2IB00149G
263. Dunham C, Havlioglu N, Chamberlain A, Lake S, Meyer G. Adipose stem cells exhibit mechanical memory and reduce fibrotic contracture in a rat elbow injury model. *FASEB Journal.* 2020;34(9):12976-12990. doi:10.1096/FJ.202001274R
264. Yang C, Tibbitt MW, Basta L, Anseth KS. Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nat Mater.* 2014;13(6):645. doi:10.1038/NMAT3889

265. Wei D, Liu A, Sun J, et al. Mechanics-Controlled Dynamic Cell Niches Guided Osteogenic Differentiation of Stem Cells via Preserved Cellular Mechanical Memory. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(1):260-274. doi:10.1021/ACSAMI.9B18425
266. Nasrollahi S, Walter C, Loza AJ, Schimizzi G V., Longmore GD, Pathak A. Past matrix stiffness primes epithelial cells and regulates their future collective migration through a mechanical memory. *Biomaterials*. 2017;146:146. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2017.09.012
267. Carnevale I, Capula M, Giovannetti E, Schmidt T, Coppola S. A mechanical memory of pancreatic cancer cells. *bioRxiv*. Published online August 9, 2019:730960. doi:10.1101/730960
268. Moon SY, Campos PS de, Matte BF, et al. Cell contractility drives mechanical memory of oral squamous cell carcinoma. <https://doi.org/10.1091/mbcE22-07-0266>. Published online July 24, 2023. doi:10.1091/MBC.E22-07-0266
269. Li CX, Talele NP, Boo S, et al. MicroRNA-21 preserves the fibrotic mechanical memory of mesenchymal stem cells. *Nature Materials* 2016 16:3. 2016;16(3):379-389. doi:10.1038/nmat4780
270. Watson AW, Grant A, Parker SS, et al. Breast tumor stiffness instructs bone metastasis via mechanical memory. *bioRxiv*. Published online November 20, 2019:847699. doi:10.1101/847699
271. Killaars AR, Grim JC, Walker CJ, Hushka EA, Brown TE, Anseth KS. Extended Exposure to Stiff Microenvironments Leads to Persistent Chromatin Remodeling in Human Mesenchymal Stem Cells. *Advanced Science*. 2019;6(3):670. doi:10.1002/ADVS.201801483
272. Heo SJ, Thorpe SD, Driscoll TP, Duncan RL, Lee DA, Mauck RL. Biophysical Regulation of Chromatin Architecture Instills a Mechanical Memory in Mesenchymal Stem Cells. *Scientific Reports* 2015 5:1. 2015;5(1):1-14. doi:10.1038/srep16895

273. Mathur J, Shenoy VB, Pathak A. Mechanical memory in cells emerges from mechanotransduction with transcriptional feedback and epigenetic plasticity. *bioRxiv*. Published online March 21, 2020:2020.03.20.000802. doi:10.1101/2020.03.20.000802
274. Price CC, Mathur J, Boerckel JD, Pathak A, Shenoy VB. Dynamic self-reinforcement of gene expression determines acquisition of cellular mechanical memory. *Biophys J*. 2021;120(22):5074. doi:10.1016/J.BPJ.2021.10.006
275. The behavior of organisms: an experimental analysis. Accessed September 4, 2023. <https://psycnet.apa.org/record/1939-00056-000>
276. Mongillo G. Hebbian Learning. *Encyclopedia of the Sciences of Learning*. Published online 2012:1417-1419. doi:10.1007/978-1-4419-1428-6_1898
277. Barron AB, Hebets EA, Cleland TA, Fitzpatrick CL, Hauber ME, Stevens JR. Embracing multiple definitions of learning. *Trends Neurosci*. 2015;38(7):405-407. doi:10.1016/J.TINS.2015.04.008
278. Dussutour A. Learning in single cell organisms. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;564:92-102. doi:10.1016/J.BBRC.2021.02.018
279. Papini MR. Comparative psychology: Evolution and development of behavior, Second edition. *Comparative Psychology: Evolution and Development of Behavior, Second Edition*. Published online January 1, 2011:1-785. doi:10.4324/9780203837818
280. Pereira S, Kooy D van der. Entwined engrams: The evolution of associative and non-associative learning. *Worm*. 2013;2(2):e22725. doi:10.4161/WORM.22725
281. Rankin CH, Abrams T, Barry RJ, et al. Habituation Revisited: An Updated and Revised Description of the Behavioral Characteristics of Habituation. *Neurobiol Learn Mem*. 2009;92(2):135. doi:10.1016/J.NLM.2008.09.012
282. Thompson RF, Spencer WA. Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol Rev*. 1966;73(1):16-43. doi:10.1037/H0022681

283. Pfeffer W, Pfeffer W. *Physiologische Untersuchungen*. W. Engelmann; 1873. doi:10.5962/bhl.title.3758
284. Holmes E., Gruenberg G. (1965). Learning in plants. *Worm Runner's Dig*. 7 9–12.
285. Bose J. C. (1906). *Plant Response*. London: Longmans.
286. Applewhite PB. Behavioral plasticity in the sensitive plant, *Mimosa*. *Behav Biol*. 1972;7(7):47-53. doi:10.1016/S0091-6773(72)80187-1
287. Gagliano M, Renton M, Depczynski M, Mancuso S. Experience teaches plants to learn faster and forget slower in environments where it matters. *Oecologia*. 2014;175(1):63-72. doi:10.1007/S00442-013-2873-7/METRICS
288. Zucker RS. Crayfish escape behavior and central synapses. II. Physiological mechanisms underlying behavioral habituation. *J Neurophysiol*. 1972;35(5):621-637. doi:10.1152/JN.1972.35.5.621
289. Castellucci VF, Kandel ER. A quantal analysis of the synaptic depression underlying habituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71(12):5004-5008. doi:10.1073/PNAS.71.12.5004
290. H.S. Jennings, Studies on reactions to stimuli in unicellular organisms. IX. on the behavior of fixed Infusoria (*Stentor* and *Vorticella*), with special reference to the modifiability of protozoan reactions, *Am. J. Physiol.* Content. 8 (1902) 23e60.
291. Wright CS, Joshi K, Iyer-Biswas S. Cellular learning: Habituation sans neurons in a unicellular organism. *Current Biology*. 2023;33(2):R61-R63. doi:10.1016/J.CUB.2022.12.008
292. Rajan D, Makushok T, Kalish A, et al. Single-cell analysis of habituation in *Stentor coeruleus*. *Current Biology*. 2023;33(2):241-251.e4. doi:10.1016/J.CUB.2022.11.010
293. Wood DC. Habituation in *Stentor*: a response-dependent process. *The Journal of Neuroscience*. 1988;8(7):2248. doi:10.1523/JNEUROSCI.08-07-02248.1988

294. Boisseau RP, Vogel D, Dussutour A. Habituation in non-neural organisms: evidence from slime moulds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016;283(1829). doi:10.1098/RSPB.2016.0446
295. Y M, H T, M Y, H S. Relationship between intracellular period modulation and external environment change in *Physarum plasmodium*. *Cell Struct Funct*. 1994;19(6):363-370. doi:10.1247/CSF.19.363
296. Boussard A, Delescluse J, Pérez-Escudero A, Dussutour A. Memory inception and preservation in slime moulds: the quest for a common mechanism. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2019;374(1774). doi:10.1098/RSTB.2018.0368
297. Vogel D, Dussutour A. Direct transfer of learned behaviour via cell fusion in non-neural organisms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016;283(1845). doi:10.1098/RSPB.2016.2382
298. McFadden PN, Koshland DE. Habituation in the single cell: diminished secretion of norepinephrine with repetitive depolarization of PC12 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(5):2031. doi:10.1073/PNAS.87.5.2031
299. McFadden PN, Koshland DE. Parallel pathways for habituation in repetitively stimulated PC12 cells. *Neuron*. 1990;4(4):615-621. doi:10.1016/0896-6273(90)90119-Z
300. Martin PT, Koshland DE. Neurosecretory habituation in PC12 cells: Modulation during parallel habituation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(11):5052-5056. doi:10.1073/pnas.92.11.5052
301. Keath JR, Westhead EW. Factors affecting habituation of PC12 cells to ATP. *Eur J Biochem*. 2004;271(20):4034-4041. doi:10.1111/J.1432-1033.2004.04341.X
302. Nilsonne G, Appelgren A, Axelsson J, Fredrikson M, Lekander M. Learning in a simple biological system: a pilot study of classical conditioning of human macrophages in vitro. *Behav Brain Funct*. 2011;7:47. doi:10.1186/1744-9081-7-47

303. Pontes AC, Mobley RB, Ofria C, Adami C, Dyer FC. The evolutionary origin of associative learning. *American Naturalist*. 2020;195(1):E1-E19. doi:10.1086/706252/ASSET/IMAGES/LARGE/FG7.JPEG
304. Teaching Machines.
305. Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. Oxford Univ. Press.
306. Logan CA. When scientific knowledge becomes scientific discovery: The disappearance of classical conditioning before Pavlov. *J Hist Behav Sci*. 2002;38(4):393-403. doi:10.1002/JHBS.10067
307. Gagliano M, Vyazovskiy V V., Borbély AA, Grimmonprez M, Depczynski M. Learning by Association in Plants. *Sci Rep*. 2016;6(1):38427. doi:10.1038/srep38427
308. Markel K. Lack of evidence for associative learning in pea plants. *Elife*. 2020;9:1-11. doi:10.7554/eLife.57614
309. Cvrčková F, Konrádová H. Associative learning in plants: light quality history may matter. *BIOCELL*. 2021;46(3):645-649. doi:10.32604/BIOCELL.2022.018114
310. Gelber B. Investigations of the behavior of *Paramecium aurelia*. I. Modification of behavior after training with reinforcement. *J Comp Physiol Psychol*. 1952;45(1):58-65. doi:10.1037/H0063093
311. Gelber B. Investigations of the behavior of *Paramecium aurelia*. III. The effect of the presence and absence of light on the occurrence of a response. *J Genet Psychol*. 1956;88(1):31-36. doi:10.1080/00221325.1956.10532951
312. Gelber B. Food or training *Paramecium*. *Science*. 1957;126(3287):1340-1341. doi:10.1126/SCIENCE.126.3287.1340
313. Gelber B. Reminiscence and the trend of retention in *Paramecium Aurelia*. *The Psychological Record 1962 12:2*. 2017;12(2):179-192. doi:10.1007/BF03393455

314. Gershman SJ, Balbi PEM, Gallistel CR, Gunawardena J. Reconsidering the evidence for learning in single cells. *Elife*. 2021;10:1-15. doi:10.7554/ELIFE.61907
315. Hennessey TM, Rucker WB, McDiarmid CG. Classical conditioning in paramecia. *Anim Learn Behav*. 1979;7(4):417-423. doi:10.3758/BF03209695/METRICS
316. Armus HL, Montgomery AR, Gurney RL. Discrimination learning and extinction in paramecia (*P. caudatum*). *Psychol Rep*. 2006;98(3):705-711. doi:10.2466/PRO.98.3.705-711
317. De la Fuente IM, Bringas C, Malaina I, et al. Evidence of conditioned behavior in amoebae. *Nat Commun*. 2019;10(1):1-12. doi:10.1038/s41467-019-11677-w
318. Brunner M, Millon-Frémillon A, Chevalier G, et al. Osteoblast mineralization requires β 1 integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition. *J Cell Biol*. 2011;194(2):307. doi:10.1083/JCB.201007108
319. Baschieri F, Illand A, Barbazan J, et al. Fibroblasts generate topographical cues that steer cancer cell migration. *Sci Adv*. 2023;9(33):eade2120. doi:10.1126/SCIADV.ADE2120/SUPPL_FILE/SCIADV.ADE2120_MOVIES_S1_TO_S5.ZIP
320. Carrasco-Pujante J, Bringas C, Malaina I, et al. Associative Conditioning Is a Robust Systemic Behavior in Unicellular Organisms: An Interspecies Comparison. *Front Microbiol*. 2021;12. doi:10.3389/FMICB.2021.707086/FULL
321. Gandhi N, Ashkenasy G, Tannenbaum E. Associative learning in biochemical networks. *J Theor Biol*. 2007;249(1):58-66. doi:10.1016/J.JTBI.2007.07.004
322. Hoffer SM, Westerhoff H V., Hellingwerf KJ, Postma PW, Tommassen J. Autoamplification of a Two-Component Regulatory System Results in “Learning” Behavior. *J Bacteriol*. 2001;183(16):4914. doi:10.1128/JB.183.16.4914-4917.2001
323. Fernando CT, Liekens AML, Bingle LEH, et al. Molecular circuits for associative learning in single-celled organisms. *J R Soc Interface*. 2009;6(34):463. doi:10.1098/RSIF.2008.0344

324. Yi TM, Huang Y, Simon MI, Doyle J. Robust perfect adaptation in bacterial chemotaxis through integral feedback control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(9):4649. doi:10.1073/PNAS.97.9.4649
325. Saito Y, Owaki T, Matsunaga T, et al. Apoptotic Death of Hematopoietic Tumor Cells through Potentiated and Sustained Adhesion to Fibronectin via VLA-4. *J Biol Chem*. 2010;285(10):7006. doi:10.1074/JBC.M109.027581
326. Pawar SC, Demetriou MC, Nagle RB, Bowden GT, Cress AE. INTEGRIN α 6 CLEAVAGE: A NOVEL MODIFICATION TO MODULATE CELL MIGRATION. *Exp Cell Res*. 2007;313(6):1080. doi:10.1016/J.YEXCR.2007.01.006
327. Iwai M, Tulafu M, Togo S, et al. Cancer-associated fibroblast migration in non-small cell lung cancers is modulated by increased integrin α 11 expression. *Mol Oncol*. 2021;15(5):1507. doi:10.1002/1878-0261.12937

RESEARCH ARTICLE

Frustration of endocytosis potentiates compression-induced receptor signaling

Francesco Baschieri*[‡], Dahiana Le Devedec*, Samuel Tettarasar, Nadia Elkhatib and Guillaume Montagnac[‡]

ABSTRACT

Cells experience mechanical stresses in different physiological and pathological settings. Clathrin-coated structures (CCSs) are sensitive to such perturbations in a way that often results in a mechanical impairment of endocytic budding. Compressive stress is a mechanical perturbation that leads to increased membrane tension and promotes proliferative signals. Here, we report that compression leads to frustration of CCSs and that CCSs are required to potentiate receptor-mediated signaling in these conditions. We show that cell compression stalled CCS dynamics and slowed down the dynamic exchange of CCS components. As previously reported, compression-induced paracrine activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) was the primary cause of ERK (ERK1 and ERK2, also known as MAPK3 and MAPK1, respectively) activation in these conditions. We observed that EGFR was efficiently recruited at CCSs upon compression and that CCSs were required for full ERK activation. In addition, we demonstrated that compression-induced frustrated CCSs could also increase ligand-dependent signaling of other receptors. We thus propose that CCS frustration resulting from mechanical perturbations can potentiate signaling through different receptors, with potential important consequences for the adaptation of the cell to its environment.

This article has an associated First Person interview with the first author of the paper.

KEY WORDS: Clathrin, Endocytosis, Signaling

INTRODUCTION

Clathrin-mediated endocytosis (CME) relies on the assembly of clathrin-coated structures (CCSs) at the internal leaflet of the plasma membrane. CCSs are endowed with the capacity to recruit specific receptors and to bend the membrane in order to generate receptor-containing endocytic vesicles (McMahon and Boucrot, 2011). Membrane bending is, however, sensitive to mechanical perturbations that oppose the invagination force generated by CCSs. For instance, high plasma membrane tension stalls CCS invagination and thus prevents CME (Boulant et al., 2011; Raucher and Sheetz, 1999). Other types of mechanical perturbations can also prevent normal CCS budding. For example, a subset of CCSs termed tubular clathrin/AP-2 lattices (TCALs), which specifically nucleate at contact sites between the cell and collagen fibers, show reduced dynamics because they attempt, and fail, to internalize fibers that are longer than

the cell itself (Elkhatib et al., 2017). High substrate rigidity can also impair CCS budding through favoring the $\alpha\text{v}\beta 5$ -integrin-dependent formation of flat and long-lived clathrin-coated plaques (Baschieri et al., 2018). Thus, CCS frustration is a common response to a wide array of mechanical perturbations. CCS frustration might not simply be a passive consequence of environmental perturbations but could actually participate in building an adapted response to these modifications. Indeed, we showed that TCALs help the cell to migrate in 3D environments (Elkhatib et al., 2017) and that clathrin-coated plaques that assemble on stiff substrates serve as signaling platforms for different receptors, ultimately leading to sustained cell proliferation (Baschieri et al., 2018).

Cell compression was recently shown to induce CCS frustration as well, most likely because of an increased membrane tension (Ferguson et al., 2017). Compressive forces are frequently encountered in the organism, whether in a physiological or pathological context (Butcher et al., 2009; Kalli and Stylianopoulos, 2018; Nia et al., 2017; Rakesh et al., 2010; Tschumperlin et al., 2004). These forces deeply impact the cell physiology and modulate signaling pathways as well as gene expression profile. For example, in bronchial epithelial cells, compression has been shown to activate the epidermal growth factor receptor (EGFR) through a force-induced, metalloprotease-dependent shedding of heparin-binding EGF (HB-EGF) precursor (Tschumperlin et al., 2004). In addition, mechanical compression in solid tumors was reported to promote both proliferation and apoptosis via mechanisms that are still not entirely clear (Alessandri et al., 2013; Cheng et al., 2009). Yet, whether compression-induced EGFR activation (Tschumperlin et al., 2002, 2004) occurs in tumors is not known. Because we previously observed that EGFR uses frustrated clathrin-coated plaques as signaling platforms (Baschieri et al., 2018), we wondered whether pressure-induced CCS frustration could participate in EGFR signaling in these conditions.

RESULTS

Compression reduces CCS dynamics

To investigate the consequences of compressive forces on CCS dynamics, we used HeLa cells that were genome-edited to express a fluorescently-tagged version of $\mu 2$ -adaptin (AP2M1), a subunit of the clathrin adaptor AP-2 (Fig. S1A–C). Cells were grown on glass coverslips and confined under an agarose plug under a constant compressive stress of 1 kPa (see Materials and Methods; Fig. S1D) that closely match the reported stress observed in solid tumors (0.21–20 kPa in tumors; negligible in healthy tissues) (Fernández-Sánchez et al., 2015; Kalli and Stylianopoulos, 2018; Nia et al., 2017). We noticed that confinement induced an enlargement of the cell area, and blebs were often observed at the cell edges (Fig. S1E), suggesting that membrane tension is most likely dramatically increased in these conditions (Gauthier et al., 2012). In addition, the nuclei of cells under compression were enlarged and nuclear blebs were also visible at their rim (Fig. S1F). These observations indicate that cells are indeed experiencing compression in our assays.

Inserm U1279, Gustave Roussy Institute, Université Paris-Saclay, 94805 Villejuif, France.

*These authors contributed equally to this work

[‡]Authors for correspondence (guillaume.montagnac@gustaveroussy.fr; francesco.baschieri@gustaveroussy.fr)

 F.B., 0000-0003-0218-5320; G.M., 0000-0001-7999-819X

Handling Editor: Andrew Ewald
Received 26 September 2019; Accepted 28 July 2020

Because compression stress higher than 3.87 kPa has been reported to increase apoptosis in tumor spheroids *in vitro* (Cheng et al., 2009), we tested whether a transient solid stress of 1 kPa could modulate apoptosis or proliferation rates and found no significant differences between control cells and cells that experienced compression (Fig. S1G,H). In classical culture conditions, HeLa cells display a mixture of dynamic, diffraction-limited CCSs, corresponding to canonical clathrin-coated pits, and long-lived, large CCSs, corresponding to clathrin-coated plaques. We observed that compression globally increased the lifetime of CCSs as well as the occurrence of plaques (as defined by a lifetime greater than 300 s; Fig. 1A,B), thus confirming previous reports (Ferguson et al., 2017). Because integrin $\alpha\beta 5$, which is necessary for clathrin-coated plaque assembly, could possibly play a role in the pressure-

induced global increase of CCS lifetime, we treated cells with cilengitide, a potent $\alpha\beta 5$ inhibitor. While CCSs were mostly dynamic in cilengitide-treated cells before pressure, confinement under the agarose gel dramatically increased the lifetime of CCSs as well as the occurrence of stalled CCSs (Fig. 1A,C). These results indicate that the increased lifetime and stabilization of CCSs under compression is independent of $\alpha\beta 5$ integrin and is most likely the consequence of increased membrane tension. Membrane tension was recently shown to regulate the dynamics of CCS components (Bucher et al., 2018). To investigate whether pressure also impacts on the dynamics of major CCS components in our system, we performed fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments in cells expressing GFP-tagged $\mu 2$ -adapin. We chose to FRAP large and long-lived individual CCSs corresponding to

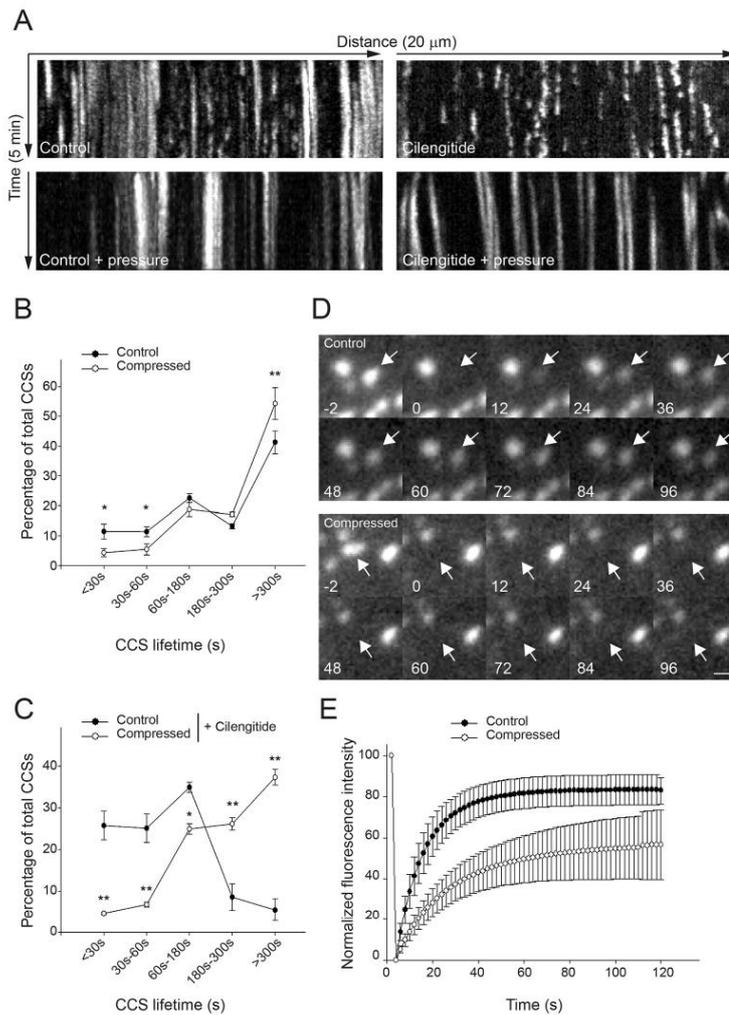


Fig. 1. Cell compression reduces CCS dynamics. (A) Kymographs showing CCS dynamics in genome-edited HeLa cells expressing endogenous mCherry-tagged $\mu 2$ -adapin that were either compressed or not under an agarose plug and treated or not with cilengitide, as indicated. Cells were imaged by spinning-disk microscopy every 5 s for 5 min. (B,C) Quantification of the dynamics of CCSs observed as in A. $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.001$, as compared to control condition (one-way ANOVA). (D) Gallery depicting fluorescence recovery of a single CCS (arrows) after photobleaching in control (upper panels) or compressed (lower panels) cells. Time before or after photobleaching is indicated in seconds. Scale bar: 1 μm . (E) Quantification of fluorescence recovery as in D, in control or compressed cells as indicated. All results are expressed as mean \pm s.d.

clathrin-coated plaques, because the long-lived nature of these structures allows monitoring of fluorescence recovery over minutes. In control conditions, fluorescence recovery was fast (half time of recovery, $t_{1/2} \approx 8$ s) with a plateau reaching $\sim 80\%$, thus showing that only $\sim 20\%$ of AP-2 complexes were immobile at CCSs (Fig. 1D,E). However, the mobile fraction only reached $\sim 60\%$ and the half time of recovery was increased when pressure was applied to cells ($t_{1/2} \approx 15$ s; Fig. 1D,E). Although we cannot strictly exclude that FRAP parameters may be affected by vesicular budding (Chen

et al., 2019), these results suggest that cell compression slows down AP-2 turnover in a similar manner as increased membrane tension (Saleem et al., 2015).

Compression leads to CCS-dependent EGFR signaling

Compressive forces have been reported to activate EGFR and downstream ERK signaling (Tschumperlin et al., 2002, 2004). Indeed, we observed that compression triggered transient activation of ERK (ERK1 and ERK2, also known as MAPK3 and MAPK1,

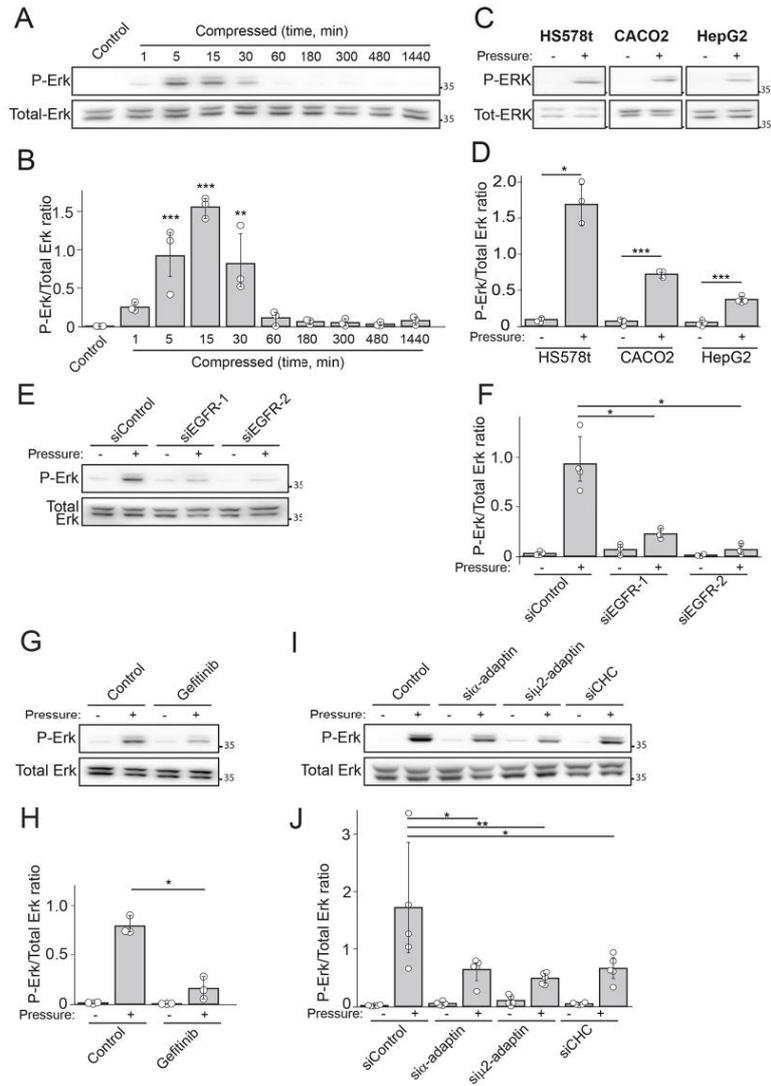


Fig. 2. See next page for legend.

Fig. 2. CCSs are required for EGFR-dependent signaling. (A) Western blot analysis of phospho-ERK (P-ERK) levels in HeLa cells uncompressed (control) or compressed for different time periods, as indicated (representative image of three independent experiments). Total ERK was used as loading control. (B) Densitometry analysis of bands obtained in western blots as in A. Results are expressed as means±d. ratio of P-ERK:total ERK from three independent experiments. ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$ (Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks). (C) Western blot analysis of P-ERK levels in the indicated cell lines compressed or not for 30 min (representative image of three independent experiments). Total ERK was used as loading control. (D) Densitometry analysis of bands obtained in western blots as in C. Results are expressed as means±d. ratio of P-ERK:total ERK from three independent experiments. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (two-tailed paired *t*-test). (E) Western blot analysis of P-ERK levels in HeLa cells compressed or not for 30 min and treated or not with EGFR-specific siRNAs, as indicated (representative image of four independent experiments). Total ERK was used as loading control. (F) Densitometry analysis of bands obtained in western blots as in E. Results are expressed as means±d. ratio of P-ERK:total ERK from four independent experiments. * $P < 0.05$ (one-way ANOVA). (G) Western blot analysis of P-ERK levels in HeLa cells compressed or not for 30 min and treated or not with AP-2 subunits- or CHC-specific siRNAs, as indicated (representative image of five independent experiments). Total ERK was used as loading control. (H) Densitometry analysis of bands obtained in western blots as in G. Results are expressed as means±d. ratio of P-ERK:total ERK from three independent experiments. * $P < 0.05$ (one-way ANOVA). (I) Western blot analysis of P-ERK levels in HeLa cells compressed or not for 30 min and treated or not with AP-2 subunits- or CHC-specific siRNAs, as indicated (representative image of five independent experiments). Total ERK was used as loading control. (J) Densitometry analysis of bands obtained in western blots as in I. Results are expressed as means±d. ratio of P-ERK:total ERK from five independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ (Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks). Molecular mass markers in A,C,E,G,I are indicated in kDa.

respectively) (Fig. 2A,B). Similar observations were made in cells experiencing a hypo-osmotic shock, a condition known to increase membrane tension (Fig. S2A,B). Compression of three different transformed cell lines also led to transient ERK activation (Fig. 2C,D). We also observed that GFP-tagged ERK2 transiently translocated from the cytoplasm to the nucleus when HeLa cells were confined under the agarose plug, thus confirming the activated status of ERK in these conditions (Fig. S2C,D). Pressure-induced ERK activation was dependent on EGFR expression (Fig. 2E,F; Fig. S2E) as well as on EGFR kinase activity, because treatment with the EGFR kinase-activity inhibitor gefitinib inhibited ERK phosphorylation under compression (Fig. 2G,H).

CCSs have been shown to act as platforms that potentiate receptor-mediated signaling, particularly in the case of EGFR (Sigismund et al., 2008; Vieira et al., 1996). Modulation of CCS lifetime is an important regulator of receptor signaling output and, for instance, long-lived clathrin-coated plaques are more potent than dynamic clathrin-coated pits in supporting signaling (Baschieri et al., 2018). Because compression stalls CCS dynamics, we reasoned that compression-induced ERK activation could be at least partially due to the increased lifetime of CCSs induced by mechanical stress. Indeed, we observed that AP-2 subunits or clathrin heavy chain (CHC) knockdown reduced ERK activation under compression (Fig. 2I,J; Fig. S2E). Thus, CCSs are required for full EGFR signaling in compressed cells.

Mechanisms of EGFR recruitment at frustrated CCSs under pressure

EGFR is recruited to CCSs upon ligand-induced activation (Rappoport and Simon, 2009). To ascertain whether compressive stress would lead to the same outcome, genome-edited HeLa cells expressing mCherry-tagged endogenous μ 2-adaptin and overexpressing GFP-tagged EGFR were compressed under an

agarose plug and monitored using total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. EGFR quickly accumulated at CCSs upon compression (Fig. 3A,B; Movie 1). Increasing membrane tension through applying a hypotonic shock on cells also resulted in EGFR recruitment at CCSs (Fig. S3A,B). We also observed a punctate phospho-tyrosine staining colocalizing with CCSs in cells experiencing compression (Fig. S3C,D). This staining was specifically lost in cells pretreated with gefitinib (Fig. S3C,D) suggesting that activated EGFR is present at CCSs in control cells under compression. Surprisingly, gefitinib did not prevent compression-induced EGFR accumulation at CCSs (Fig. 3B,D; Movie 2). This latter observation is in favor of a previously proposed model whereby ligand-induced EGFR dimerization is required for interaction with the CCS machinery, in a kinase domain activity-independent manner (Wang et al., 2005).

Of note, all these experiments were performed in the absence of serum and of any added EGFR ligands. It has been reported that, in bronchial epithelial cells, the compression resulting from bronchoconstriction induces ADAM metalloprotease-dependent ectodomain shedding from the EGF-family ligand HB-EGF, thus leading to paracrine–autocrine EGFR stimulation (Tschumperlin et al., 2004). Inactivation of these metalloproteases using the large spectrum metalloprotease inhibitor Batimastat was shown to prevent EGFR activation following compressive stress (Tschumperlin et al., 2004). Indeed, we observed that Batimastat reduced both EGFR recruitment at CCSs (Fig. 3B,C; Movie 2) and ERK activation (Fig. 3E,F) upon compression. Conditioned medium from compressed cells was sufficient to activate ERK in serum-starved cells (Fig. S3E,F). However, conditioned medium from compressed cells treated with Batimastat failed to activate ERK (Fig. S3E,F). Of note, Batimastat did not inhibit ERK activation when EGFR was stimulated using externally added EGF (Fig. S3G,H). We hence subjected Batimastat-treated cells to hypotonic swelling to increase their plasma membrane tension and observed that Batimastat treatment prevented EGFR recruitment to CCSs in these conditions (Fig. S3A,B). Taken together, in agreement with the literature, our data suggest that cellular compression leads to metalloprotease-dependent shedding of EGFR ligands, thus resulting in EGFR activation.

Compression-induced frustration of CCSs modulates receptor sorting

Frustration of the endocytic machinery could potentially impact any CCS cargo. We therefore aimed to determine whether other receptors could also be recruited at CCSs upon cell compression. We first analyzed the dynamics of the prototypical CCS cargo transferrin receptor (TfR), which is usually constitutively recruited at CCSs in order to be internalized. Although mCherry-tagged TfR strongly accumulated at CCSs in control cells, it was excluded from CCSs in compressed cells (Fig. 4A,B; Movie 3). This surprising result suggests that compression modulates receptor sorting at CCSs. Given that EGFR accumulates in CCSs of compressed cells, we sought to test whether EGFR and TfR competed for recruitment to CCSs, despite having different sorting motifs (Bonifacino and Traub, 2003). However, TfR was still excluded from CCSs of compressed cells upon EGFR knockdown, showing that no competition exists between these two receptors (Fig. 4B). We also observed a global increase of plasma membrane TfR-associated signal upon compression (Fig. 4C; Movie 3). This most likely reflects the dramatic inhibition of TfR uptake from the cell surface, leading to its accumulation at the plasma membrane. In addition, we observed in FRAP experiments that fluorescence recovery of

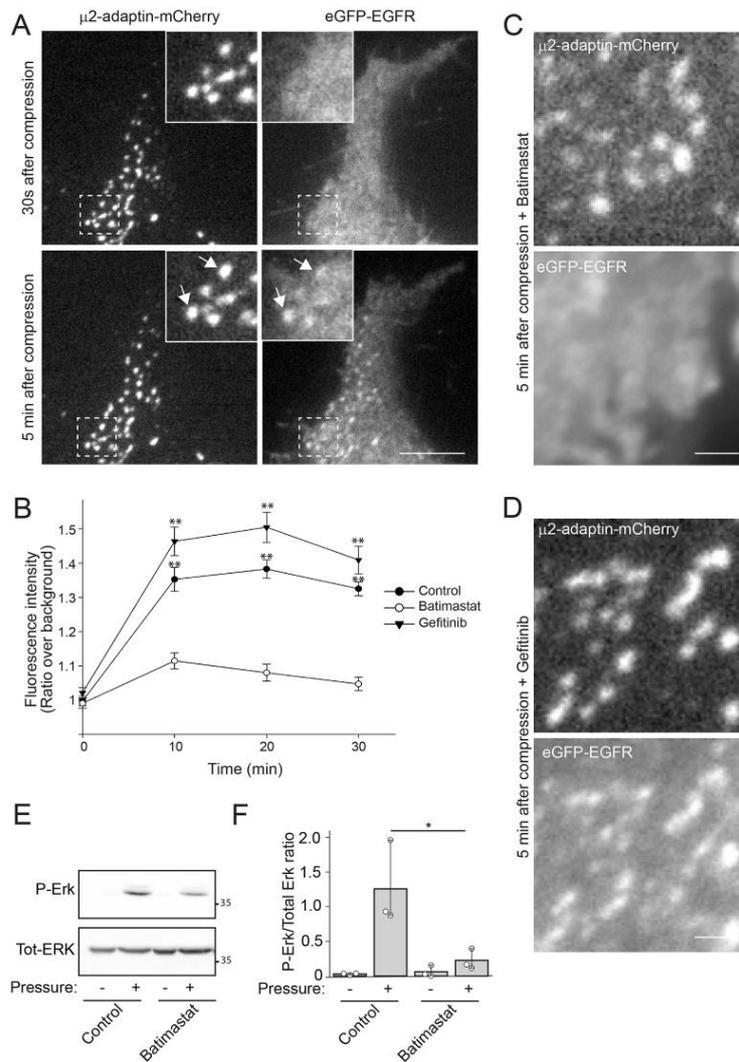
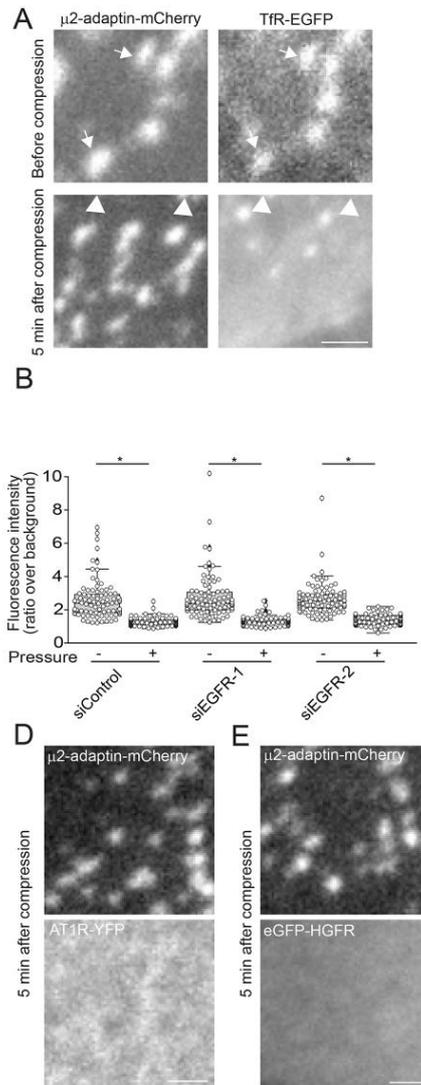


Fig. 3. EGFR is recruited at CCSs under compression. (A) Genome-edited HeLa cells expressing endogenous mCherry-tagged μ 2-adaptin were transfected with a plasmid encoding eGFP-tagged EGFR, seeded on glass, compressed under an agarose plug and imaged by TIRF microscopy every 15 s for 30 min. Time after compression is indicated. Higher magnifications of boxed regions are shown. Arrows point to EGFR positive CCSs. Scale bar: 8 μ m. (B) Quantification of eGFP-EGFR enrichment at CCSs at the indicated time points after compression in control cells or in cells treated with Batimastat or with gefitinib, as indicated. $n=3$, 20 structures per experiment were analyzed. $**P<0.001$ compared to Batimastat-treated cells (Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks). (C) Genome-edited HeLa cells expressing endogenous mCherry-tagged μ 2-adaptin were transfected with a plasmid encoding eGFP-tagged EGFR and seeded on glass. 24 h later, cells were serum starved for 2 h, treated with 10 μ M Batimastat for 1 h, then compressed under an agarose plug and imaged by TIRF microscopy every 15 s for 30 min. Time after compression is indicated. Scale bar: 1 μ m. (D) Genome-edited HeLa cells expressing endogenous mCherry-tagged μ 2-adaptin were transfected with a plasmid encoding eGFP-tagged EGFR and seeded on glass. 24 h later, cells were serum starved for 2 h, treated with gefitinib for 1 h, then compressed under an agarose plug and imaged by TIRF microscopy every 15 s for 30 min. Time after compression is indicated. Scale bar: 1 μ m. (E) Western blot analysis of phospho-ERK (P-ERK) levels in HeLa cells serum starved for 2 h, then treated with 10 μ M Batimastat for 1 h, and subjected or not to compression, as indicated (representative image of four independent experiments). Total ERK1/2 was used as a loading control. (F) Densitometry analysis of bands obtained in western blots as in E. Results are expressed as mean \pm s.d. ratio of P-ERK:total ERK from three independent experiments. $*P<0.05$ (one-way ANOVA). Molecular mass markers in E are indicated in kDa.



EGFR-GFP at CCSs was reduced in cells experiencing compression, as compared to uncompressed cells stimulated with 10 ng/ml EGF (Fig. S4A). Thus, compression impacts on both CCS component dynamics (Fig. 1D) and CCS cargo dynamics (Fig. 4A,B; Fig. S4A). We next looked at different receptors whose endocytosis is normally triggered by their ligands. The G-protein-coupled receptor (GPCR) angiotensin receptor-1 (AT1R, also known as AGTR1) and hepatocyte growth factor receptor (HGFR, also known as MET), which are recruited at CCSs upon specific ligand stimulation (Fig. S4B,C) (Eichel et al., 2016; Petrelli et al., 2002), did not accumulate at CCSs under pressure in the absence of

ligands (Fig. 4D,E). These results indicate that compression does not result in the fast activation of these receptors in the absence of their specific ligands.

Compression-induced frustration of CCSs controls signaling

We reasoned that, beside the specific case of EGFR, frustrated CCSs could have an impact on signaling downstream of other receptors, provided that the ligands of those receptors are present in the system. To test this hypothesis, we incubated HeLa cells in medium supplemented with suboptimal doses of either HGF or angiotensin II and tested the consequences on HGFR or AT1R localization,

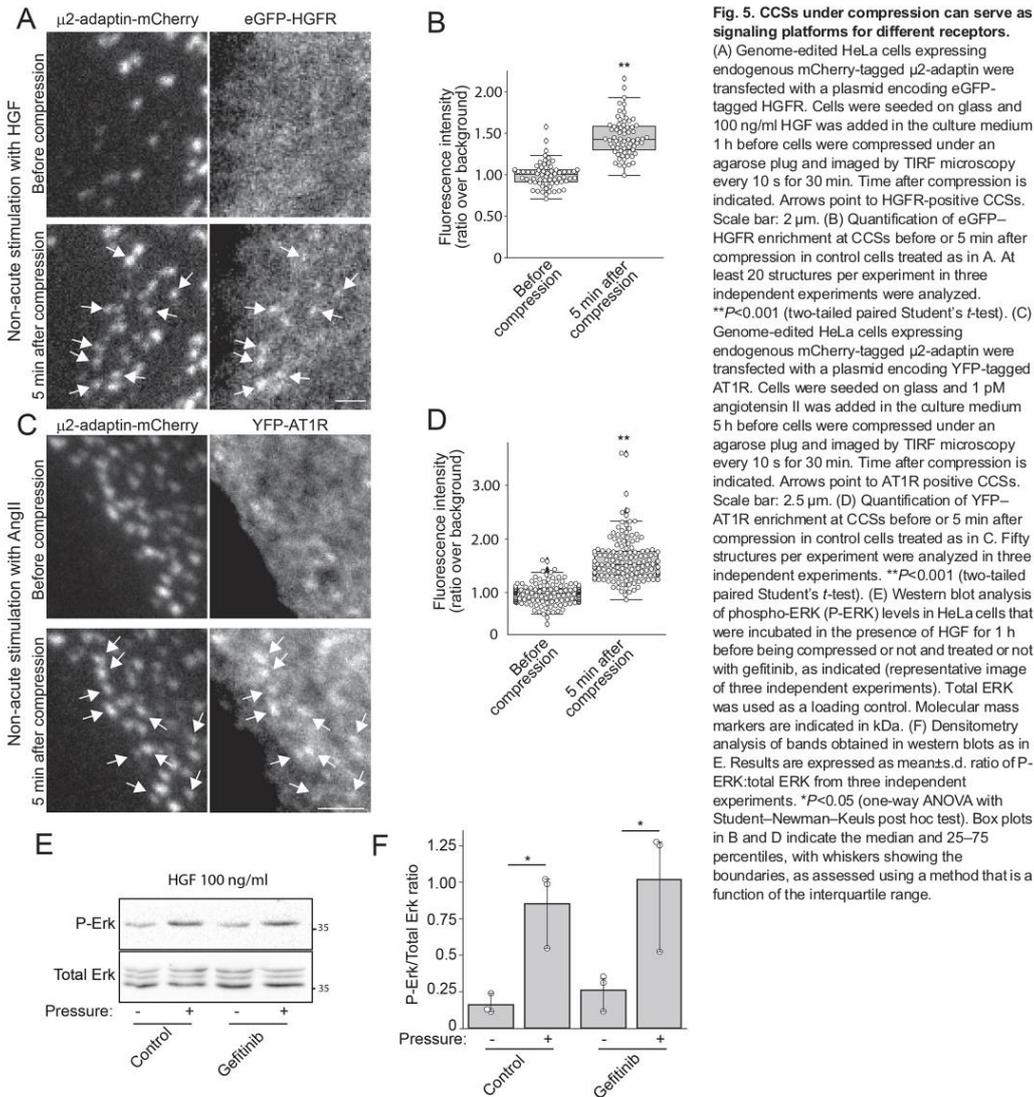
Fig. 4. Receptors are sorted differently in CCSs under compression. (A) Genome-edited HeLa cells expressing endogenous eGFP-tagged μ 2-adaptin were transfected with a plasmid encoding mCherry-tagged TfR and were imaged by TIRF microscopy before (upper panel) or 5 min after (lower panel) compression. Arrows point to TfR positive CCSs. Arrowheads point to TfR-positive, AP-2-negative structures most likely corresponding to endosomes. Scale bar: 2 μ m. (B) Quantification of mCherry-TfR enrichment at CCSs before or 5 min after compression in cells treated as in A, with the addition of the indicated siRNA treatments. Thirty structures per experiment were analyzed in three independent experiments. * $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks). (C) TfR average intensity at the ventral plasma membrane of HeLa cells as in A was measured before and after compression. Ten cells per experiment were analyzed in three independent experiments. ** $P < 0.001$ (Wilcoxon test). (D,E) Genome-edited HeLa cells expressing endogenous mCherry-tagged μ 2-adaptin were transfected with plasmids encoding YFP-tagged AT1R (D) or GFP-tagged HGFR (E), seeded on glass, compressed under an agarose plug and imaged by TIRF microscopy every 10 s for 30 min. Time after compression is indicated. Scale bars: 1.5 μ m. Box plots in B and C indicate the median and 25–75 percentiles, with whiskers showing the boundaries, as assessed using a method that is a function of the interquartile range.

respectively. Neither of the two receptors accumulated at CCSs in these non-acute stimulation conditions (Fig. 5A–D). However, cell compression led to an efficient recruitment of these receptors at CCSs (Fig. 5A–D). Clustering of receptors at CCSs most likely results from low levels of receptor activation, leading to their progressive accumulation at compression-induced frustrated CCSs. In addition, gefitinib-mediated inhibition of EGFR was not sufficient to block ERK activation in compressed cells treated with suboptimal doses of HGF (Fig. 5E,F). This demonstrates that, provided the appropriate ligand is present, receptors other than

EGFR can be trapped in compression-induced frustrated CCSs, thus leading to sustained signaling in the ERK pathway.

DISCUSSION

Here, we confirmed previous findings showing that cell compression leads to frustrated endocytosis, with an accumulation of long-lived CCSs (Ferguson et al., 2017). Several pieces of evidence point to a predominant role of integrins in CCS frustration through local anchoring of the CCS machinery to the substrate (Baschieri et al., 2018; De Deyne et al., 1998; Elkhathib et al., 2017).



HeLa cells display numerous frustrated CCSs, also termed clathrin-coated plaques, whose formation depends on local enrichment of the $\alpha\beta 5$ integrin (Baschieri et al., 2018). Yet, inhibiting this integrin did not prevent the accumulation of long-lived CCSs in cells experiencing compression. Cell compression most likely results in a dramatic increase in membrane tension, which is known to impede CCS budding (Boulant et al., 2011; Raucher and Sheetz, 1999). Thus, our data strongly suggest that frustration of CCSs, as detected in compressed cells, results from increased membrane tension.

We also reported that AP-2 dynamics was perturbed at frustrated CCSs under compression. This might also result from increased membrane tension, because this feature is known to modulate the interaction of CCS components with the plasma membrane (Saleem et al., 2015). Altered dynamics of CCS components is likely to perturb cargo recruitment at CCSs and, indeed, we observed that the TfR was excluded from CCSs under compression. It is not clear why some receptors like EGFR, HGFR, and AT1R could still be recruited at compression-induced frustrated CCSs upon ligand binding, while the TfR, which is normally constitutively addressed to these structures, became excluded. This might depend on the different types of endocytosis motifs present on receptor cytosolic tails that engage different recognition sites on the AP-2 complex and/or on other CCS components (Bonifacino and Traub, 2003). In addition, it remains to be elucidated why the dynamics of EGFR was reduced at compression-induced frustrated CCSs. It is possible that the reduced AP-2 dynamics we observed at frustrated CCSs modulates interactions between cargos and the clathrin coat. Along this line, it was recently shown that clathrin dynamic exchange at CCSs is critical to regulate cargo sorting (Chen et al., 2019).

It was previously reported that EGFR becomes activated in bronchial epithelial cells subjected to mechanical stress, leading to strong ERK activation. This activation has been shown to be dependent on metalloprotease-regulated HB-EGF shedding and on reduction of the intercellular space, leading to paracrine activation of the receptor (Tschumperlin et al., 2004). Our data demonstrate that a similar mechanism exists in different transformed cell lines, suggesting that compression-induced EGFR activation could play an important role in physiopathological situations like solid tumors that are often characterized by high mechanical pressure. Contrary to what was described for bronchial epithelial cells, cancer cells responded to the soluble factor even in non-constricted environments (Fig S3E,F), suggesting that a reduction in intercellular space is dispensable in our model. Surprisingly, we observed that EGFR recruitment at CCSs did not depend on the activity of the kinase domain of the receptor. It has long been believed that EGFR autophosphorylation is required for both signaling output and endocytosis of the receptor (Lamaze and Schmid, 1995). Yet, some studies have suggested that ligand-induced EGFR dimerization is sufficient to induce the accumulation of the receptor at CCSs, without the need for autophosphorylation of the cytosolic tail (Wang et al., 2002, 2005). Our data clearly support this model.

We additionally showed that CCSs are required for full ERK activation downstream of EGFR in compressed cells. These observations are in good agreement with previous reports demonstrating that CCSs can serve as signaling platform for EGFR (Sigismund et al., 2008; Vieira et al., 1996). Yet, we previously demonstrated that clathrin-coated plaques can also serve as signaling platform for other receptors (Baschieri et al., 2018). Here, we report that compression-induced frustrated CCSs could

potentiate HGFR signaling when HGF was present in the extracellular environment, leading to strong ERK activation even when EGFR kinase activity was inhibited. It is likely that frustrated CCSs trap the few activated HGFRs that, instead of being internalized, progressively accumulate in these stalled structures. The same holds true for AT1R, raising the possibility that this might be a general mechanism acting to potentiate signaling in cells that experience solid stress. This is of special interest in the case of cancer, where cells are often subjected to mechanical stress in an environment that is rich in several growth factors (Shojaei et al., 2010; Straussman et al., 2012; Zhang et al., 2010).

To conclude, we propose that, in complex microenvironments, mechanical stress leads to activation of the ERK signaling pathway not only because of HB-EGF shedding and paracrine activation of EGFR, but also because compression-induced frustrated CCSs can trap and potentiate signaling by many other receptors.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and constructs

HeLa cells (a gift from Philippe Chavrier, Institut Curie, Paris, France; ATCC CCL-2), genome-edited HeLa cells engineered to express an endogenous GFP-tagged or mCherry-tagged $\mu 2$ -adaptin subunit, HepG2 cells (ATCC HB-8065), Caco-2 cells (ATCC HTB-37) and Hs578t cells (a gift from Christophe Lamaze, Institut Curie, Paris, France), were grown in DMEM Glutamax supplemented with 10% fetal calf serum at 37°C in 5% CO₂. For microscopy, cells were serum-starved for at least 2 h before the experiment. All cell lines were tested for mycoplasma contamination. The plasmid encoding GFP-ERK2 was a gift from Dr Hesso Farhan (Institute of Basic Medical Sciences, Oslo, Norway). Plasmids encoding mCherry-TfR (#55144; deposited by Michael Davidson) and EGFR-GFP (#32751; deposited by Alexander Sorkin), and pLenti-MetGFP (#37560; deposited by David Rimm) were from Addgene. The plasmid encoding AT1R-YFP was a kind gift of Dr Mark Scott (Institut Cochin, Paris, France).

Plasmids were transfected 24 h after cell plating using either Lipofectamine 3000 according to the manufacturer's instructions or by electroporating cells in suspension using an AMAXA nucleofector kit V according to the manufacturer's instructions. Alternatively, linear polyethylenimine (PEI; MW 25,000; Polysciences, cat. no. 23966) at 1 mg/ml was used to transfect cells at 50% confluency in a 6-well plate according to the following protocol: 2 μ g of DNA was added to 100 μ l of OptiMEM, followed by addition of 4 μ l of PEI, vortexing and incubation for 10 min at room temperature prior to adding the mix to the cells.

Antibodies and drugs

Rabbit polyclonal anti-total-ERK1/2 (cat. no. 9102) and anti-phospho-ERK1/2 (cat. no. 9101) were purchased from Cell Signaling Technology. Mouse monoclonal anti-total-ERK1/2 (cat. no. 13-6200) was purchased from Thermo Fisher. Mouse monoclonal anti- α -tubulin (cat. no. T9026) was purchased from Sigma. Mouse monoclonal anti-clathrin heavy chain (CHC; cat. no. 610500) and mouse monoclonal anti-Ki-67-FITC (cat. no. 612472) were purchased from BD Biosciences. Mouse monoclonal anti- α -adaptin (cat. no. ab2807), rabbit monoclonal anti-AP2M1 (cat. no. ab75995) and rabbit monoclonal anti-EGFR (cat. no. ab2430) were purchased from Abcam. Rabbit polyclonal anti- α -adaptin antibody (M300) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti phosphotyrosine (cat. no. 05-321) was obtained from Millipore. AnnexinV-Cy5.5 was from BD Biosciences (cat. no. 559935). Antibodies used for western blot analyses were diluted at 1:1000 in PBS containing 0.1% Tween and either 5% BSA or 5% non-fat dried milk. For immunofluorescence, antibodies were diluted 1:200 in PBS containing 0.3% BSA. Anti-Ki-67-FITC was used at a dilution of 1:500 in PBS containing 0.3% BSA. HRP-conjugated anti-mouse and anti-rabbit antibodies for western blotting were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA) and were used at a dilution of 1:3000. Alexa-conjugated antibodies as well as Cy3- and Cy5-conjugated antibodies were from Molecular Probes (Invitrogen) and were used at a dilution of 1:200. Gefitinib (cat. no.

CDS022106) was purchased from Sigma and used at a final concentration of 10 μ M. Cilengitide was purchased from Selleckchem (cat. no. S7077) and used at a final concentration of 10 μ M. Human recombinant HGF (cat. no. 1404; used at 100 ng/ml), human recombinant EGF (cat. no. E9644; used at 10 ng/ml), and angiotensin II (cat. no. A9525) were purchased from Sigma. For HGF experiments in Fig 5A and B, cells were previously serum starved for at least 2 h and HGF was added to the serum-free medium for 1 h before the experiment. For AT1R experiments in Fig 5C and D, cells were serum starved for 2 h, then 1 pM angiotensin II was added for 5 h in serum-free medium prior to start the experiment. Sir-DNA (Siprochrome; sc-007) was used at 0.5 μ M to stain nuclei for live-cell imaging. Cells were incubated for 20 min in the presence of Sir-DNA, then washed once with PBS to eliminate excess Sir-DNA and returned into DMEM.

In vitro compression experiments

To investigate the effect of compressive stress on cell behavior, an under-agarose assay was used (Heit and Kubes, 2003). Cells were plated either in 6-well cell culture plates or in glass-bottom dishes (μ -Dish; cat. no. 190301; Ibdid). 24 h hours later, cells were subjected to mechanical stress using an agarose plug overlaid with the weight necessary to reach a pressure of approximately 1000 Pa (agarose plug of 1.9 cm^2 , corresponding to the area of one well of a 24-well plate, and weight of 20 g). To prepare agarose gels, agar was weighed then dissolved in DMEM Glutamax to a final concentration of 2.4%. The mixture was then cast in an empty dish or well and cooled at room temperature. Agar disks were sterilized under UV light and equilibrated at 37°C before use. For western blotting, cells were subjected to compression for 30 min prior to cell lysis, unless otherwise stated. For video microscopy, videos were started 30 s before applying the compressive stress. Compressed cells were then imaged for 30 min, acquiring one image every 10 s unless stated differently. Alternatively, for CCS dynamics and for FRAP experiments, videos were acquired before and under compression, and the videos before compression were compared to the videos under compression. For ERK2 nuclear enrichment, cells were treated with Sir-DNA, as described above, and imaged by spinning-disk microscopy. Cells were manually segmented in FIJI (<https://imagej.net/Fiji>), and the Sir-DNA channel was used for the segmentation of the nucleus. Cytoplasm segmentation was obtained by subtracting the area of the nucleus from the cell area. ERK fluorescence was measured over time in the nucleus and in the cytoplasm, then the nuclear enrichment (nuclear:cytosolic signal ratio) was calculated for each cell.

Western blotting

For western blotting experiments, cells were lysed in ice cold MAPK buffer (100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% IGEPAL CA-630, 0.1% SDS and 50 mM TRIS-HCl pH 7.4) supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Protein concentration was measured using a Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (cat. no. 1856210), according to the manufacturer's instructions, in order to load equal amounts of proteins. Antibodies were diluted at 1:1000 in PBS containing 0.1% Tween and either 5% BSA or 5% non-fat dried milk. For stripping, membranes were incubated in a commercial stripping buffer (cat. no. ST010; Gene Bio-Application) according to the manufacturer's instructions. Western blot quantification was performed in FIJI.

RNA interference

For siRNA depletion, 200,000 cells were plated in 6-well plates. After 24 h, cells were treated with the indicated siRNA (30 nM) using RNAimax (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instruction. Protein depletion was maximal after 72 h of siRNA treatment, as shown by immunoblotting analysis with specific antibodies. To deplete CHC, α -adaplin or μ 2-adaplin, cells were transfected once as described above and then a second time, 48 hours later, with the same siRNAs. In this case, cells were analyzed 96 hours after the first transfection. The following siRNAs were used: μ 2-adaplin, 5'-AAGUGGAGCCUUUCGGGUCA-3'; clathrin heavy chain (CHC), 5'-GCUGGGAAAACUCUUCAGATT-3'; α -adaplin, 5'-AUGGCGGUGUGUCGCUCTT-3'; epidermal growth factor receptor (EGFR), 5'-GAGGAAAUAUGUACUACGA-3' (EGFR-1) and 5'-GCAAAGUGUGUAACGGAAUAGGUAU-3' (EGFR-2); non-

targeting siRNAs (siControl), ON-TARGETplus Non-Targeting SMARTpool siRNAs (Dharmacon D-001810-01). It should be noted that the AP2 complex is stable only when all of its subunits respect a precise stoichiometric ratio and, consequently, depletion of any of the subunits of AP2 leads to loss of all the components of the complex (Boucrot et al., 2010; Motley et al., 2006).

Immunofluorescence microscopy and fluorescence quantification

For anti-phospho-tyrosine staining (P-Tyr), cells were briefly extracted for 30 s using 0.1% Triton prior to fixation in methanol for 10 min. HeLa cells genome edited to express an endogenous GFP-tagged or mCherry-tagged μ 2-adaplin subunit were fixed for 2 min in methanol and immunostained. Images were acquired on a Leica Sp8 confocal with a Pecon incubation chamber, equipped with two hybrid and three PMT detectors, using 405, 488, 561 and 633 nm lasers. Imaging was performed using a 63 \times objective (1.4 NA), if not specified otherwise. Fluorescence of selected regions was measured on at least 50 structures of five different cells per condition in three independent experiments. Data are expressed as mean \pm s.d. Colocalization between GFP- or mCherry-tagged AP2 and Alexa 568- or Alexa 488-immunostained AP2 was measured using the FIJI plugin JACoP (Bolte and Cordelières, 2006).

Spinning-disk microscopy of live cells

For CCS dynamics, cells were imaged at 5 s intervals for the indicated time using a spinning-disk microscope (Andor) based on a CSU-W1 Yokogawa head mounted on the lateral port of an inverted IX-83 Olympus microscope equipped with a 60 \times 1.35 NA UPLSAPO objective lens and a laser combiner system, which included 491 and 561 nm 30 mW DPSS lasers (Andor). Images were acquired with a Zyla sCMOS camera (Andor). Alternatively, cells were imaged on a Nikon Ti2 Eclipse (Nikon France SAS, Champigny sur Marne, France) inverted microscope equipped with a 60 \times 1.40 NA oil objective (WD 0.130), a sCMOS PRIME 95B camera (Photometrics, AZ, USA) and a dual output laser launch, which included 405, 488, 561 and 642 nm 30 mW lasers. The emission filter characteristics are as follows: 452/45 nm (Semrock Part# FF01-452/45); 470/24 nm (Chroma 348716); 525/50 nm (Semrock Part# FF03-525/50); 545/40 nm (Chroma 346986); 609/54 nm (Semrock Part# FF01-609/54); 708/75 nm (Semrock Part# FF01 708/75). Both microscopes were controlled using Metamorph 7 software (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA).

For CCS dynamics quantification, the lifetime of CCSs was measured using the TrackMate plugin of FIJI (Tinevez et al., 2017). Tracks below 5 s in duration (detected in only 1 frame) were discarded. Measured individual lifetimes were pooled into two groups: the 'dynamic' group corresponding to structures with a lifetime below the duration of the movie (5 min) and the 'static' group with a lifetime of 5 min. Of note, the relative percentage of dynamic versus static structures would be dependent on the duration of the movie, because static structures are only counted once whereas dynamic structures continuously nucleate and disappear during the movie. To circumvent this limitation, all quantifications of CCS dynamics represent the relative number of static or dynamic events detectable at the plasma membrane at a given time point. At least 1000 CCSs from at least 5 cells per condition and per experiment were tracked in 3–5 independent experiments. Data are expressed as mean \pm s.d.

TIRF microscopy and FRAP

For total internal reflection fluorescence microscopy (TIRF), HeLa cells transfected with the indicated plasmids were imaged through a 100 \times 1.49 NA APO TIRF WD 0.13–0.20 oil objective lens on a Nikon Ti2 Eclipse (Nikon France SAS, Champigny sur Marne, France) inverted microscope equipped with a sCMOS PRIME 95B camera (Photometrics, AZ, USA) and a dual output laser launch, which included 405, 488, 561 and 642 nm 30 mW lasers, and driven by Metamorph 7 software (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). A motorized device (Piezo electrical XYZ stage from Nikon) driven by Metamorph allowed the accurate positioning of the illumination light for evanescent wave excitation.

For TIRF-FRAP experiments, one CCS was manually selected and subjected to 100% laser power (30 mW laser) scan in order to have a bleaching of at least 80% of the fluorescence. One frame was collected before photobleaching, and 60 frames were collected after bleaching to analyze fluorescence recovery at a frequency of 1 frame/2 s. The data were analyzed using the FIJI FRAP Profiler plugin (McMaster University, Canada) to extract recovery curves and calculate the half time of recovery.

Apoptosis assays

3×10^5 cells were plated on 6-well plates. 24 h later, compression assays were performed. Cells were trypsinized, resuspended in 1 ml of medium, washed with ice cold PBS, resuspended in binding buffer (0.1 M HEPES, pH 7.4, 1.4 M NaCl and 25 mM CaCl₂) at a density of 1×10^6 cells/ml. 1×10^5 cells were then mixed with 5 μ l of Annexin-V-Cy5.5 and DAPI (final concentration 1 μ g/ml) and incubated at room temperature for 15 min. Then, flow cytometry analysis was performed on a BD FACSAria Fusion. Data were analyzed using FlowJo 10.0.7. Cells positive for Annexin V and negative for DAPI were counted as early apoptotic. Three matched experiments per conditions were performed and data are represented as mean \pm s.d.

Statistical analyses

Statistical analyses in Fig. 1B,C; Fig. 2F,H; Fig. 3E; Fig. 5F; and Fig. S3H were performed using a one-way ANOVA. Statistical analyses in Fig. 2B,J; Fig. 3B; Fig. 4B; Fig. S1H; Fig. S2B; and Fig. S3B,D,F were performed using a Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks. Statistical analyses in Fig. 2D; Fig. 5B,D; and Fig. S1G were performed using two-tailed Student's *t*-tests. Statistical analyses in Fig. 4C were performed using the Wilcoxon test. All data are presented as mean \pm s.d. of at least three independent experiments, except where otherwise stated. Graphics were prepared with the open-source software Instant Clue (Nolte et al., 2018) and statistical analyses were performed using SigmaPlot or Instant Clue software.

Acknowledgements

We thank the imaging facilities of Gustave Roussy for help with image acquisition. Core funding for this work was provided by the Gustave Roussy Institute and Inserm.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: F.B., G.M.; Validation: F.B., N.E.; Investigation: F.B., N.E., D.L.D., S.T.; Formal analysis: F.B.; Writing - original draft preparation: F.B., G.M.; Writing - review & editing: F.B., G.M.; Supervision: G.M.; Funding acquisition: G.M.

Funding

Support was provided by grants from the ATP-Avenir Program, the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer, the Groupement des Entreprises Françaises dans la lutte contre le Cancer (GEFLUC) and from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE15-0005-03) to G.M. This project was supported by grant 'Taxe d'apprentissage Gustave Roussy - 2017 - DLD' from the Institut Gustave-Roussy. F.B. acknowledges support by the 2019 Metastasis Award from the Beug Foundation.

Supplementary information

Supplementary information available online at <https://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.239681.supplemental>

Peer review history

The peer review history is available online at <https://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.239681.viewer-comments.pdf>

References

Alessandri, K., Sarangi, B. R., Gurchenkov, V. V., Sinha, B., Kiessling, T. R., Fetter, L., Rico, F., Scheuring, S., Lamaze, C., Simon, A., et al. (2013). Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 14843-14848. doi:10.1073/pnas.1309482110

Baschieri, F., Dayot, S., Elkhatib, N., Ly, N., Capmany, A., Schauer, K., Betz, T., Vignjevic, D. M., Poincloux, R. and Montagnac, G. (2018). Frustrated endocytosis controls contractility-independent mechanotransduction at clathrin-coated structures. *Nat. Commun.* **9**, 3825. doi:10.1038/s41467-018-06367-y

Bolte, S. and Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **224**, 213-232. doi:10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x

Bonifacino, J. S. and Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 395-447. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800

Boucrot, E., Saffarian, S., Zhang, R. and Kirchhausen, T. (2010). Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One* **5**, e10597. doi:10.1371/journal.pone.0010597

Boulant, S., Kural, C., Zeeh, J.-C., Ubelmann, F. and Kirchhausen, T. (2011). Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1124. doi:10.1038/ncb2307

Bucher, D., Mukenhim, M., Sochacki, K. A., Saharuk, V., Huck, C., Zambarda, C., Taraska, J., Cavalcanti-Adam, E. A. and Boulant, S. (2018). Focal adhesion-generated cues in extracellular matrix regulate cell migration by local induction of clathrin-coated plaques. *bioRxiv* 493114. doi:10.1101/493114

Butcher, D. T., Alliston, T. and Weaver, V. M. (2009). A tense situation: forcing tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 108-122. doi:10.1038/nrc2544

Chen, Y., Yong, J., Martínez-Sánchez, A., Yang, Y., Wu, Y., De Camilli, P., Fernández-Busnadiego, R. and Wu, M. (2019). Dynamic instability of clathrin assembly provides proofreading control for endocytosis. *J. Cell Biol.* **218**, 3200-3211. doi:10.1083/jcb.201804136

Cheng, G., Tse, J., Jain, R. K. and Munn, L. L. (2009). Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PLoS One* **4**, e4632. doi:10.1371/journal.pone.0004632

De Deyne, P. G., O'Neill, A., Resneck, W. G., Dmytrenko, G. M., Pumplun, D. W. and Bloch, R. J. (1998). The vitronectin receptor associates with clathrin-coated membrane domains via the cytoplasmic domain of its beta5 subunit. *J. Cell Sci.* **111**, 2729-40.

Eichel, K., Jullié, D. and von Zastrow, M. (2016). β -Arrestin drives MAP kinase signalling from clathrin-coated structures after GPCR dissociation. *Nat. Cell Biol.* **18**, 303-310. doi:10.1038/ncb3307

Elkhatib, N., Breteau, E., Baschieri, F., Rioja, A. L., Van Niel, G., Vassilopoulos, S. and Montagnac, G. (2017). Tubular clathrin/AP-2 lattices pinch collagen fibers to support 3D cell migration. *Science (80-)* **356**, eaal4713. doi:10.1126/science.aal4713

Ferguson, J. P., Huber, S. D., Willy, N. M., Ayygün, E., Goker, S., Atabay, T. and Kural, C. (2017). Mechanoregulation of clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Sci.* **130**, 3631-3636. doi:10.1242/jcs.205930

Fernández-Sánchez, M. E., Barbier, S., Whitehead, J., Béalle, G., Michel, A., Latorre-Ossa, H., Rey, C., Fouassier, L., Claperon, A., Brullé, L., et al. (2015). Mechanical induction of the tumorigenic β -catenin pathway by tumour growth pressure. *Nature* **523**, 92-95. doi:10.1038/nature14329

Gauthier, N. C., Masters, T. A. and Sheetz, M. P. (2012). Mechanical feedback between membrane tension and dynamics. *Trends Cell Biol.* **22**, 527-535. doi:10.1016/j.tcb.2012.07.005

Heit, B. and Kubus, P. (2003). Measuring chemotaxis and chemokinesis: the under-agarose cell migration assay. *Sci. Signal.* **2003**, pi5-pi5. doi:10.1126/stke.2003.170.pi5

Kalli, M. and Stylianopoulos, T. (2018). Defining the role of solid stress and matrix stiffness in cancer cell proliferation and metastasis. *Front. Oncol.* **8**, 55. doi:10.3389/fonc.2018.00055

Lamaze, C. and Schmid, S. L. (1995). Recruitment of epidermal growth factor receptors into coated pits requires their activated tyrosine kinase. *J. Cell Biol.* **129**, 47-54. doi:10.1083/jcb.129.1.47

McMahon, H. T. and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 517-533. doi:10.1038/nrm3151

Motley, A. M., Berg, N., Taylor, M. J., Sahlender, D. A., Hirst, J., Owen, D. J. and Robinson, M. S. (2006). Functional analysis of AP-2 α and μ 2 subunits. *Mol. Biol. Cell* **17**, 5298-5308. doi:10.1091/mbc.e06-05-0452

Nia, H. T., Liu, H., Seano, G., Datta, M., Jones, D., Rahbari, N., Incio, J., Chauhan, V. P., Jung, K., Martin, J. D., et al. (2017). Solid stress and elastic energy as measures of tumour mechanopathology. *Nat. Biomed. Eng.* **1**, 0004. doi:10.1038/s41551-016-0004

Nolte, H., MacVicar, T. D., Tellkamp, F. and Krüger, M. (2018). Instant clue: a software suite for interactive data visualization and analysis. *Sci. Rep.* **8**, 1-8. doi:10.1038/s41598-018-31154-6

Petrelli, A., Gilestro, G. F., Lanzardo, S., Comoglio, P. M., Migone, N. and Giordano, S. (2002). The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* **416**, 187-190. doi:10.1038/416187a

Rakesh, K., Yoo, B., Kim, I.-M., Salazar, N., Kim, K.-S. and Rockman, H. A. (2010). beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. *Sci. Signal.* **3**, ra46. doi:10.1126/scisignal.2000769

Rappoport, J. Z. and Simon, S. M. (2009). Endocytic trafficking of activated EGFR is AP-2 dependent and occurs through preformed clathrin spots. *J. Cell Sci.* **122**, 1301-1305. doi:10.1242/jcs.040030

Raucher, D. and Sheetz, M. P. (1999). Membrane expansion increases endocytosis rate during mitosis. *J. Cell Biol.* **144**, 497-506. doi:10.1083/jcb.144.3.497

- Saleem, M., Morlot, S., Hohendahl, A., Manzi, J., Lenz, M. and Roux, A. (2015). A balance between membrane elasticity and polymerization energy sets the shape of spherical clathrin coats. *Nat. Commun.* **6**, 6249. doi:10.1038/ncomms7249
- Shojaei, F., Lee, J. H., Simmons, B. H., Wong, A., Esparza, C. O., Plumlee, P. A., Feng, J., Stewart, A. E., Hu-Lowe, D. D. and Christensen, J. G. (2010). HGF/c-Met acts as an alternative angiogenic pathway in sunitinib-resistant tumors. *Cancer Res.* **70**, 10090-10100. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0489
- Sigismund, S., Argenzio, E., Tosoni, D., Cavallaro, E., Polo, S. and Di Fiore, P. P. (2008). Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev. Cell* **15**, 209-219. doi:10.1016/j.devcel.2008.06.012
- Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z. R., Du, J., Davis, A., Mongare, M. M., Gould, J., Frederick, D. T., et al. (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* **487**, 500-504. doi:10.1038/nature11183
- Tinevez, J.-Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G. M., Reynolds, G. D., Laplantine, E., Bednarek, S. Y., Shorte, S. L. and Eliceiri, K. W. (2017). TrackMate: an open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* **115**, 80-90. doi:10.1016/j.ymeth.2016.09.016
- Tschumperlin, D. J., Shively, J. D., Swartz, M. A., Silverman, E. S., Haley, K. J., Raab, G. and Drazen, J. M. (2002). Bronchial epithelial compression regulates MAP kinase signaling and HB-EGF-like growth factor expression. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **282**, L904-L911. doi:10.1152/ajplung.00270.2001
- Tschumperlin, D. J., Dai, G., Maly, I. V., Kikuchi, T., Laiho, L. H., McVittie, A. K., Haley, K. J., Lilly, C. M., So, P. T. C., Lauffenburger, D. A., et al. (2004). Mechanotransduction through growth-factor shedding into the extracellular space. *Nature* **429**, 83-86. doi:10.1038/nature02543
- Vieira, A. V., Lamaze, C. and Schmid, S. L. (1996). Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science (80-)* **274**, 2086-2089. doi:10.1126/science.274.5295.2086
- Wang, Y., Pennock, S., Chen, X. and Wang, Z. (2002). Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7279-90. doi:10.1128/MCB.22.20.7279-7290.2002
- Wang, Q., Villeneuve, G. and Wang, Z. (2005). Control of epidermal growth factor receptor endocytosis by receptor dimerization, rather than receptor kinase activation. *EMBO Rep.* **6**, 942-948. doi:10.1038/sj.embor.7400491
- Zhang, X., Nie, D. and Chakrabarty, S. (2010). Growth factors in tumor microenvironment. *Front. Biosci.* **15**, 151-65. doi:10.2741/3612

Résumé de thèse :

Les cellules sont capables de sentir les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire (MEC), ce qui impacte leur migration, leur prolifération et leur différenciation. La durotaxie est la capacité des cellules à migrer vers des environnements plus rigides. Ce phénomène joue un rôle dans l'invasion des cellules tumorales, avec une augmentation de la rigidité du microenvironnement tumoral. Les cellules sont sensibles à cette rigidité, modifiant ainsi leur capacité de migration. Elles sont également sensibles à la rigidité de l'environnement rencontré dans le passé. Ce phénomène se nomme « mémoire mécanique ». L'objectif de mon projet de thèse est de tester l'implication de l'histoire environnementale des cellules sur leurs capacités durotactiques.

En étudiant l'effet de la mémoire mécanique sur la durotaxie, j'ai pu constater que des cellules fraîchement décongelées migrent aléatoirement, alors que les mêmes cellules testées après plus de 3 jours de culture post-décongélation durotaxent. Ceci suggère que les cellules acquièrent la durotaxie au cours des 3 premiers jours de culture après décongélation.

J'ai voulu tirer parti de ces observations pour déterminer si l'acquisition de la durotaxie chez les cellules fraîchement décongelées dépend de la rigidité du substrat sur lequel elles sont cultivées. Et en effet, les cellules cultivées sur un substrat dur acquièrent la durotaxie, alors que les cellules cultivées sur un substrat mou migrent aléatoirement. Ainsi, la mémoire mécanique régule l'acquisition d'un caractère durotactique.

J'ai ensuite observé que des cellules ayant acquis la durotaxie après 3 jours de culture perdent cette propriété et migrent de façon aléatoire sur le gradient si elles sont ensuite cultivées pendant 3 jours sur un substrat mou. Ces données suggèrent donc une régulation complexe des propriétés durotactiques par l'histoire environnementale de la cellule.

Un des éléments capitaux qui caractérise l'environnement des cellules cultivées in vitro est le sérum de veaux foetal (SVF). La concentration en SVF est connue pour moduler les capacités de migration des cellules. J'ai donc testé l'impact d'une carence en SVF sur

l'acquisition de la durotaxie. J'ai observé que des cellules fraîchement décongelées et cultivées 3 jours sur du plastique, mais avec seulement 2% de SVF, n'acquièrent pas la durotaxie. En revanche, si ces mêmes cellules sont ensuite cultivées 3 jours sur substrat mou avec 10% de SVF, alors les cellules migrent vers les zones les plus molles du gradient de rigidité. Cette inversion de la durotaxie, que nous nommons « mollo-taxie », est très surprenante, et m'a amené à pousser plus loin mes investigations. Ainsi, j'ai observé que si les cellules sont d'abord cultivées sur substrat mou avec 10% de SVF, puis sur substrat dur avec seulement 2% de SVF, elles mollo-taxent également. Ainsi, l'association entre une carence en sérum et un substrat dur conduit les cellules à mollo-taxer seulement si elles ont connu, avant ou après, un épisode sur substrat mou avec 10% de SVF. J'ai donc testé l'association inverse, c'est-à-dire la période sur substrat mou avec 2% de SVF et la période sur substrat dur avec 10% de SVF. Les cellules ayant subi ce cycle durotaxent comme les cellules parentales.

Une des hypothèses supportant l'inversion de la durotaxie est le changement de la rigidité préférentielle de la cellule. Il est décrit que les cellules possèdent une rigidité optimale, où elles exercent le maximum de traction, et donc dirigent leurs migrations vers cette rigidité. J'ai pu observer que les cellules qui mollo-taxent sont plus étalées et ont plus d'adhérences focales sur des rigidités faibles, par rapport aux cellules durotactiques. Cela suggère que notre conditionnement modifie la rigidité préférentielle de nos cellules.

Cette capacité d'adaptation associative peut présenter un avantage sélectif pour des cellules cancéreuses placées dans un environnement tumoral complexe et fluctuant.

Thesis summary :

Cells are able to sense the mechanical properties of the extracellular matrix (ECM), which impacts their migration, proliferation, and differentiation. Durotaxis is the ability of cells to migrate towards stiffer environments. This phenomenon plays a role in the invasion of tumor cells, with an increase in the stiffness of the tumor microenvironment. Cells are sensitive to this stiffness, thus modifying their migration capacity. They are also sensitive to the stiffness of the environment encountered in the past. This phenomenon is called "mechanical memory". The aim of my thesis project is to test the implication of the environmental history of cells on their durotactic abilities.

By studying the effect of mechanical memory on durotaxis, I found that freshly thawed cells migrate randomly, whereas the same cells tested after more than 3 days of post-thaw culture become durotactic. This suggests that cells acquire durotaxis during the first 3 days of culture after thawing.

I wanted to take advantage of these observations to determine if the acquisition of durotaxis in freshly thawed cells depends on the stiffness of the substrate on which they are cultured. Indeed, cells cultured on a stiff substrate acquire durotaxis, whereas cells cultured on a soft substrate migrate randomly. Thus, mechanical memory regulates the acquisition of a durotactic trait.

I then observed that cells that have acquired durotaxis after 3 days of culture lose this property and migrate randomly on the gradient if they are subsequently cultured for 3 days on a soft substrate. These data suggest a complex regulation of durotactic properties by the environmental history of the cell.

One of the key elements that characterizes the in vitro culture environment of cells is fetal bovine serum (FBS). The FBS concentration is known to modulate cell migration abilities. I therefore tested the impact of FBS deficiency on the acquisition of durotaxis. I observed that freshly thawed cells cultured for 3 days on plastic with only 2% FBS do not acquire durotaxis. However, if these same cells are then cultured for 3 days on a soft substrate with

10% FBS, then the cells migrate towards the softest areas of the stiffness gradient. This inversion of durotaxis, which we call “mollotaxis”, is very surprising and led me to further investigate. Thus, I observed that if cells are first cultured on a soft substrate with 10% FBS, then on a stiff substrate with only 2% FBS, they also mollotax. Thus, the association between FBS deficiency and a stiff substrate leads cells to mollotax only if they have experienced, before or after, an episode on a soft substrate with 10% FBS. I therefore tested the reverse association, i.e., the period on a soft substrate with 2% FBS and the period on a stiff substrate with 10% FBS. The cells that underwent this cycle durotaxed like the parental cells.

One hypothesis supporting the inversion of durotaxis is the change in the cell's preferred stiffness. It is described that cells have an optimal stiffness, where they exert maximum traction and thus direct their migration towards this stiffness. I observed that cells that mollotax are more spread out and have more focal adhesions on low stiffnesses compared to durotactic cells. This suggests that our conditioning modifies the cell's preferred stiffness.

This associative adaptation ability may provide a selective advantage for cancer cells placed in a complex and fluctuating tumor environment.

Titre : Régulation du choix de migration par l'histoire environnementale de la cellule.

Mots clés : Mécanotransduction, Migration, Durotaxie

Les cellules peuvent migrer de façon aléatoire ou dirigée. La durotaxie est un phénomène de migration dirigée, si les cellules ont le choix, elles vont préférentiellement migrer vers des environnements durs, plutôt que mous. Il a été montré que les cellules pouvaient retenir des informations de leurs environnements passés, ce qui modifie leurs migrations. Ceci est appelé « mémoire mécanique ». Nous avons montré que la mémoire mécanique avait un impact sur la durotaxie des cellules.

De plus, nos résultats suggèrent que les cellules sont capables d'associer des stimuli rencontrés dans leur passé, modifiant leurs migrations. Ce phénomène rappelle la mémoire associative qui permet au chien de Pavlov d'anticiper l'arrivée de nourriture en salivant quand il entend le son de la cloche, car ces deux éléments ont été associés dans son passé. De telles capacités d'adaptation associative peuvent apporter un avantage sélectif des cellules cancéreuses dans un environnement qui est complexe.

Title : Regulation of migration choice by the environmental history of the cell.

Keywords : Mechanotransduction, Migration, Durotaxis

Abstract : Cells can migrate randomly or in a directed manner. Durotaxis is a phenomenon of directed migration, where if given a choice, cells will preferentially migrate towards hard environments rather than soft ones. It has been shown that cells can retain information from their past environments, which modifies their migration. This is called "mechanical memory". We have shown that mechanical memory has an impact on cell durotaxis.

Furthermore, our results suggest that cells are capable of associating stimuli encountered in their past, modifying their migration. This phenomenon is reminiscent of the associative memory that allows Pavlov's dog to anticipate the arrival of food by salivating when it hears the sound of the bell because these two elements have been associated together in its past. Such associative adaptation may provide a selective advantage for cancer cells in a complex environment.