Forces mécaniques au sein de l'endothélium

Michel Moussus

▶ **To cite this version:**

Michel Moussus. Forces mécaniques au sein de l'endothélium. Autre [cond-mat.other]. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENY008 . tel-01124193

HAL Id: tel-01124193
https://theses.hal.science/tel-01124193

Submitted on 6 Mar 2015

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

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

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique**

Arrêté ministériel : 7 aout 2006

Présentée par

Michel MOUSSUS

Thèse dirigée par **Alice Nicolas**
et codirigée par **Danielle Gulino**

préparée au sein du **Laboratoire des Technologies de la Microélectronique**
et de l' **Ecole doctorale de physique**

Forces mécaniques au sein de l'endothélium

Thèse soutenue publiquement le **05 février 2014**,
devant le jury composé de :

Eric Perez
Laboratoire de Physique Statistique, Rapporteur
Pascal Silberzan
Institut Curie, Rapporteur
Marc Block
Institut Albert Bonniot, Examinateur
Etienne Dague
Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes, Examinateur
Alice Nicolas
Laboratoire des Technologies de la Microélectronique, Directeur de thèse
Danielle Gulino
Laboratoire de Biologie du Cancer et de l'Infection, Co-Directeur de thèse
Hélène Delanoë-Ayari
Laboratoire de Physique de la Matière Condensée et Nanostructures, Invitée

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse sont le fruit de l'implication de nombreuses personnes, au premier rang desquelles figurent Alice Nicolas, directrice, et Danielle Gulino, co-directrice de cette thèse. Un duo d'encadrement dont la très bonne entente et la complémentarité ont été particulièrement constructives.

Tout d'abord, merci Alice de m'avoir donné l'opportunité et l'envie de faire cette thèse. Se lancer dans cette aventure avec un sujet aussi intéressant et sous la supervision d'une personne possédant tes qualités ne pouvait être qu'une expérience enrichissante. Merci pour cette introduction dans le monde de la biophysique, de m'avoir fait bénéficier de ta richesse et de ton exemplarité scientifiques, d'être toujours restée disponible et optimiste, et enfin de m'avoir toujours encouragé dans mes choix au cours de ces années.

Je te remercie Danielle pour ton initiation à la biologie cellulaire et pour la patience qu'ont nécessité au départ mes nombreuses et très naïves questions. Merci d'avoir accueilli avec énergie, enthousiasme (et patience !) les outils de la physique en complémentarité de l'approche biochimique pour étudier les jonctions intercellulaires. Cette approche multidisciplinaire a fini par donner les résultats escomptés. Enfin, merci pour tes conseils et ton aide durant la période de rédaction du manuscrit.

Un grand merci à Hélène Delanoë-Ayari pour sa précieuse collaboration durant cette thèse. Sans ton aide, et notamment le partage des innombrables codes que tu as développé, le passage à la microscopie à traction de force aurait été particulièrement ardu ! Merci également pour ton accueil au LPMCN, ton enthousiasme et tes idées qui ont permis de faire avancer cette thèse. J'associe également à ces remerciements Christelle der Loughian pour nos échanges au cours de notre initiation à la mécanique cellulaire.

Enfin merci à David Gyver-Fuard pour m'avoir formé avec une bonne dose d'imagination et d'ingéniosité aux techniques de microfabrication. Ces trois années de partage du même bureau (aménagé pour pouvoir vivre en autarcie plusieurs mois) ont été très agréables, tout comme l'ont été les sorties vélo. (ps : tu as gagné ton pari, je n'ai pas crevé pendant toute la durée de ma thèse grâce au montage des pneus Schwal.. Marath..).

Je souhaite remercier les différents membres du jury - Pascal Silberzan, Eric Perez, Etienne Dague et Marc Block - d'avoir accepté d'être rapporteurs et examinateurs de ces travaux de thèse ainsi que de leurs remarques constructives pendant la soutenance.

J'aimerais ensuite remercier Olivier Joubert et Jumana Boussey qui m'ont permis d'effectuer ma thèse au sein du LTM et de son environnement technologique privilégié.

Toujours au LTM, merci à Malou, Sylvaine et Stéphanie dont les compétences sont vitales dans le système administratif complexe du CEA.

Merci également :

- à Marianne Weidenhaupt et Denis Buttard qui m'ont permis d'avoir une expérience de l'enseignement.

- aux membres des différents laboratoires ou j'ai pu travailler et grâce à qui j'ai passé de très bons moments :

- La diaspora dijonnaise, descendue rejoindre la vallée du silicium grenobloise : Julien Cordeiro avec qui nous avons suivi une trajectoire commune pendant un certain nombre d'années. N'oublie pas les amis lorsque ta maitrise du 4ème état de la matière aura fait de Smart-Force une multinationale ; Claude Renaut pour les discussions scientifiques et

les balades à vélo ; Ludovic Robin pour son originalité !

- les thésards qui m'ont précédé : Thibault Honegger et Olivier Lecarme pour leurs conseils, l'intégration dans l'équipe et à l'extérieur du laboratoire. Adeline Chervin qui m'a appris à prendre soin de mes petites cellules au début de cette thèse.
- Kevin Berton pour sa bonne humeur permanente et son rôle cohésif dans l'équipe ; Camille Migdal qui m'a supporté avec bienveillance pendant la période de rédaction, Marie Courçon pour son aide dans les manips et sa gentillesse ; Caterina Tomba pour son ensoleillement ; Clarisse Benoit pour sa sympathie ; Helena Polena pour sa bonne humeur et la vie qu'elle apporte au sein du laboratoire.
- mais également : Marc Zelsmann, Isabelle Vilgrain, Abbas Mgharbel, Adama Sidibe, Stéphanie Bouillot, Mathieu Salaün, Maxime Bossart, Christophe Pin, Paulin Brichon, Raphaël Castellan, Alexandre Morel, Mélanie Charbit, Nicolas Bouchonville...
- des amis extérieurs au CEA qui ont contribué à rendre ces années à Grenoble très agréables : Joris Pianezze et Pierre Lales.

Enfin j'aimerais remercier tout particulièrement ma famille qui m'a toujours soutenu depuis le début de mes études. Mes parents qui m'ont permis de faire ces études et encouragé quelle que soit la voie choisie ainsi que mon frère (pour sa stimulation !) et ma sœur.

Forces mécaniques au sein de l'endothélium

Résumé : Les dysfonctionnements vasculaires ou les blessures induites par l'âge, le tabac, les traumatismes ou une hyperlipidémie font partie de la myriade de facteurs de risques qui contribuent à la pathogénèse de nombreuses maladies cardiovasculaires. Un objectif important de la biologie vasculaire est de comprendre les processus cellulaires qui favorisent ou protègent contre ces maladies vasculaires. Cette pathogénèse est étroitement associée au dysfonctionnement de la paroi interne des vaisseaux sanguins. Cette paroi est constituée par une monocouche de cellules endothéliales qui forment l'endothélium vasculaire. La réparation de l'endothélium implique le remodelage des adhésions focales (AF) et des jonctions adhérentes (JA). Des modifications dans la composition protéique de ces structures adhésives génèrent des forces qui sont à la base du remodelage et de la réparation de l'endothélium. Dans la littérature, les forces cellulaires sont étudiées sur des cellules isolées, des doublets de cellules ou des îlots de cellules en croissance mais les forces mécaniques qui s'exercent au sein d'un tissu doivent encore être caractérisées. Dans cette thèse, nous utilisons la Microscopie à Traction de Force (TFM) sur des substrats en polyacrylamide pour étudier l'équilibre mécanique entre les jonctions intercellulaires et les adhésions cellule/substrat. Nous analysons dans quelle mesure la TFM peut être utilisée pour étudier des monocouches cellulaires et présentons une nouvelle approche pour extraire les forces contractiles exercées par un tissu endothélial. Finalement, nous utilisons cette méthode pour caractériser les forces transmises par les cellules à leur substrat et les forces contractiles pour une monocouche endothéliale.

Cette méthode fournit un outil intéressant pour étudier la contribution de certaines protéines des jonctions adhérentes sur les forces transmises au sein de l'endothélium.

Mechanical forces within endothelium

Abstract : Vascular dysfunction or injury induced by aging, smoking, inflammation, trauma, hyperlipidaemia are among a myriad of risk factors that contribute to the pathogenesis of many cardiovascular diseases. An important objective in vascular biology is to understand cellular processes that promote or protect against cardiovascular diseases. This pathogenesis is very closely associated with dysfunction of the inner face of the vessel wall. The inner face of the vessel wall is lined by a monolayer of endothelial cells forming the vascular endothelium. Reparation of the endothelium involves remodelling of focal adhesions (FA) and adherent junctions (AJ). Modifications in the protein composition of these adhesive structures generate forces at the basis of endothelium remodelling and reparation. In the literature, cellular forces are studied on single cells, epithelial cell doublets or cell aggregates in growth but mechanical forces inside tissues remain to be characterized. In this thesis, we use traction force microscopy (TFM) on polyacrylamide substrates to study the mechanical equilibrium between intercellular junctions and cell/substrate adhesion. We analyse to which extent TFM can be used for studying monolayers and present a novel approach to extract contractile forces exerted by an endothelial tissue. Finally, we use this methodology to characterize forces transmitted to the substrate and the contractile forces generated by endothelial monolayers. This method provides an interesting tool to study the contribution of some proteins of the adherent junctions to force transmission within the endothelium.

Table des matières

1 Introduction générale **3**

1.1 Endothélium vasculaire . . . 4

1.1.1 Environnement . . . 4

1.1.2 Rôle physiologique et pathologies associées . . . 4

1.1.3 Structure . . . 6

1.1.4 Conclusion . . . 18

1.2 Mécanosensibilité cellulaire . . . 19

1.2.1 Forces et adhésions cellules/matrice . . . 19

1.2.2 Forces et mécanotransduction au sein d'une architecture multi-cellulaire . . . 27

1.3 Architecture moléculaire des jonctions adhérentes interendothéliales . . . 34

1.3.1 La VE-cadhérine . . . 34

1.3.2 La connexion cytosquelette/jonction adhérente . . . 34

2 Microsystème pour la mesure de la contractilité d'un tissu **39**

2.1 Présentation du système . . . 39

2.1.1 Principe de fonctionnement . . . 39

2.1.2 Dimensionnement du capteur . . . 40

2.2 Microfabrication du système . . . 43

2.2.1 Fabrication du moule . . . 43

2.2.2 Moulage des canaux déformables . . . 46

2.3 Mesure de contractilité . . . 49

2.3.1 Fonctionnalisation des canaux . . . 49

2.3.2 Capacité du système à mesurer la contractilité d'une monocouche . . . 53

3 Mesure des forces transmises au substrat **57**

3.1 État de l'art . . . 58

3.1.1 Introduction . . . 58

3.1.2 Choix de la technique de mesure de forces : gel versus piliers élastomériques . . . 59

3.1.3 Calcul des forces cellule-substrat en TFM . . . 60

3.1.4 Méthodes expérimentales . . . 64

3.2 Cellule isolée versus tissu . . . 73

3.2.1 De nouvelles conditions aux limites à prendre en compte . . . 73

3.2.2 Conclusion . . . 75

3.2.3 Méthodologie . . . 78

3.2.4 Résultats : mesure des forces transmises par une monocouche endothéliale à sa matrice extracellulaire . . . 82

3.3 Conclusion . . . 86

4 Mesure de la contractilité cellulaire **89**
4.1 État de l'art . . . 89
4.1.1 Méthodes moléculaires . . . 89
4.1.2 Méthodes mécaniques . . . 89
4.2 Mesure de la contractilité par la mesure du champ de déformation 2D . . . 92
4.2.1 Principe . . . 92
4.2.2 Sensibilité de la méthode au bruit expérimental . . . 93
4.3 Résultats . . . 95
4.3.1 Cellule isolée . . . 95
4.3.2 Monocouche confluente . . . 97
4.3.3 Influence de la taille de l'assemblée cellulaire . . . 97
4.3.4 Dynamique de la contractilité d'une monocouche endothéliale confluente . . . 103
4.3.5 Contractilité et forces de traction. . . . 104
4.3.6 La mesure de la contractilité permet-elle d'accéder aux forces intercellulaires ? . . . 105
4.3.7 Conclusion . . . 107

Bibliographie **111**

Introduction

Comprendre les interactions entre les cellules est un enjeu majeur pour expliquer les nombreuses transformations que subit un tissu. Par exemple, dans l'endothélium, le tissu qui tapisse la paroi interne du tronc vasculaire, les jonctions vasculaires endothéliales sont remodelées au cours de la transmigration des cellules inflammatoires ou métastatiques, la croissance des vaisseaux sanguins ou encore lors de la réparation de l'endothélium.

Pour permettre aux cellules de s'adapter aux changements nécessaires au remodelage du tissu, la composition protéique des adhérences cellulaires est modifiée. Cette adaptation des structures adhésives permet, notamment en cas de blessure, aux cellules d'exercer des forces de traction pour migrer et ainsi recoloniser une région endommagée. Lorsqu'elles sont à nouveau en contact les unes par rapport aux autres, les cellules reforment alors un tissu cohésif.

L'étude du rôle des forces mécanique dans les processus cellulaires a véritablement débuté au début des années 1990 avec la mise au point de nouvelles techniques pour manipuler les cellules et mesurer des forces aussi petites que quelques nN. Ces nouveaux outils ont permis de montrer le rôle essentiel des forces mécaniques dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation ou encore l'homéostasie. Principalement centrées sur les cellules isolées, ces études ont en outre permis de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la production et de la transmission des forces du cytosquelette sur la matrice extracellulaire via les adhésions focales.

Aujourd'hui, les études commencent à se tourner vers l'exploration des forces mécaniques dans des architectures multicellulaires avec notamment pour objectif de mieux comprendre les forces mécaniques qui s'exercent au niveau des jonctions intercellulaires. De récents travaux ont permis de quantifier les forces qui s'exercent au niveau des jonctions formées par des doublets de cellules et des ilots de cellules en croissance.

L'objectif de cette thèse qui s'effectue au Laboratoire des Technologies de la Microélectronique (LTM) en collaboration avec le laboratoire de Biologie du Cancer et de l'Infection (BCI) est de développer une méthode qui permette d'accéder aux forces mécaniques qui s'exercent au sein d'une monocouche cellulaire. Nous souhaitons ensuite coupler ces mesures mécaniques à la composition protéique des jonctions intercellulaires. En particulier nous nous intéressons au complexe protéique qui fait le lien entre la VE-cadhérine et le cytosquelette d'actine.

Le manuscrit s'articule autour de 4 chapitres : le premier chapitre présente le tissu qui a servi de modèle pour l'ensemble de la thèse : l'endothélium vasculaire. Une section de ce chapitre est consacrée à une revue bibliographique sur la mécanosensibilité cellulaire. La dernière section de ce chapitre est consacrée plus spécifiquement à l'architecture moléculaire des jonctions interendothéliales.

Le second chapitre est consacré au microsystème à base de micropiliers déformables que nous avons mis en place pour accéder à la contractilité d'un tissu.

Le chapitre suivant décrit la technique développée pour mesurer les forces transmises au substrat à l'aide de la microscopie à traction de forces ainsi que le résultat de ces mesures au sein de l'endothélium vasculaire.

Enfin, le dernier chapitre est consacré à une nouvelle méthode permettant de mesurer les contraintes intracellulaires dans des moncouches cellulaires.

Chapitre 1

Introduction générale

Sommaire

1.1 Endothélium vasculaire 4
1.1.1 Environnement 4
1.1.2 Rôle physiologique et pathologies associées 4
1.1.3 Structure 6
1.1.4 Conclusion 18
1.2 Mécanosensibilité cellulaire 19
1.2.1 Forces et adhésions cellules/matrice 19
1.2.2 Forces et mécanotransduction au sein d'une architecture multi-cellulaire 27
1.3 Architecture moléculaire des jonctions adhérentes interendothéliales 34
1.3.1 La VE-cadhérine 34
1.3.2 La connexion cytosquelette/jonction adhérente 34

1.1 Endothélium vasculaire

1.1.1 Environnement

L'endothélium vasculaire est le tissu qui tapisse la paroi interne des vaisseaux sanguins. Puisque la quasi totalité des tissus dépendent de l'apport en nutriments véhiculés par les vaisseaux sanguins, l'endothélium est présent dans l'ensemble de l'organisme.

Il existe 3 types de vaisseaux sanguins, dont les 2 premiers, les veines et les artères, sont les plus larges et possèdent une paroi externe épaisse et résistante constituée de tissus conjonctifs et de nombreuses couches de cellules musculaire lisses. La paroi interne est tapissée par une très fine couche de cellules endothéliales, l'endothélium, séparé des cellules musculaires lisses par une lame basale. La quantité de tissu conjonctif et de cellules musculaires lisses dans la paroi du vaisseau dépend de sa taille et sa fonction.

La paroi des vaisseaux larges peut être représentée comme la superposition de 3 couches concentriques spécialisées (Fig 1.1-d) :
-L'**intima** composé principalement de cellules endothéliales et qui constitue l'épithelium de revêtement de toutes les parois vasculaires en contact direct avec le flux sanguin.
-La **media** composée de cellules musculaires lisses et de constituants de la matrice extracellulaire qui permet le contrôle du tonus du vaisseau et participe au contrôle du diamètre du vaisseau et du flux sanguin.
-L'**adventice** composée de fibroblastes, de tissus conjonctifs et de fibres élastiques.

C'est dans les plus fines branches de l'arbre vasculaire que l'on trouve le 3ème type de vaisseau, les capillaires, qui sont aussi les plus abondants dans l'organisme, et dont la paroi est uniquement constituée de cellules endothéliales, d'une lame basale et de pericytes (Fig 1.1-b). Les pericytes qui entourent les petits vaisseaux sont apparentés aux cellules musculaires lisses vasculaires.

1.1.2 Rôle physiologique et pathologies associées

Les cellules endothéliales constituant l'endothélium remplissent de nombreuses fonctions, comme le maintien de l'intégrité des vaisseaux (Fig 1.2). Une de leurs fonctions clé est la régulation du tonus vasculaire par la production de substances vasoactives, telles que l'oxyde nitrique (NO) et l'EDHF, qui modifient les fonctions des muscles lisses. A l'interface entre le sang circulant dans les vaisseaux et les tissus, les cellules endothéliales contrôlent la perméabilité vasculaire et le recrutement de cellules immunitaires dans la paroi vasculaire. Les cellules endothéliales possèdent également une thromborésistance grâce à la production de molécules inhibant l'agrégation plaquettaire.

Les dysfonctions de l'endothélium peuvent se traduire par une vasodilatation réduite, un état pro-inflammatoire et des propriétés pro-thrombotiques. Elles sont associées à la plupart des formes de maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension, les maladies des artères coronaires, les maladies cardiaques chroniques, les diabètes et les maladies rénales chroniques.

Les mécanismes qui participent à la réduction de la vasodilatation incluent une diminution de la génération d'oxyde nitrique NO, un stress oxydatif et une production réduite de facteurs de polarisation. La régulation positive des molécules d'adhésion et la génération de chemokines permettant d'attirer les macrophages participent à la réponse inflammatoire et

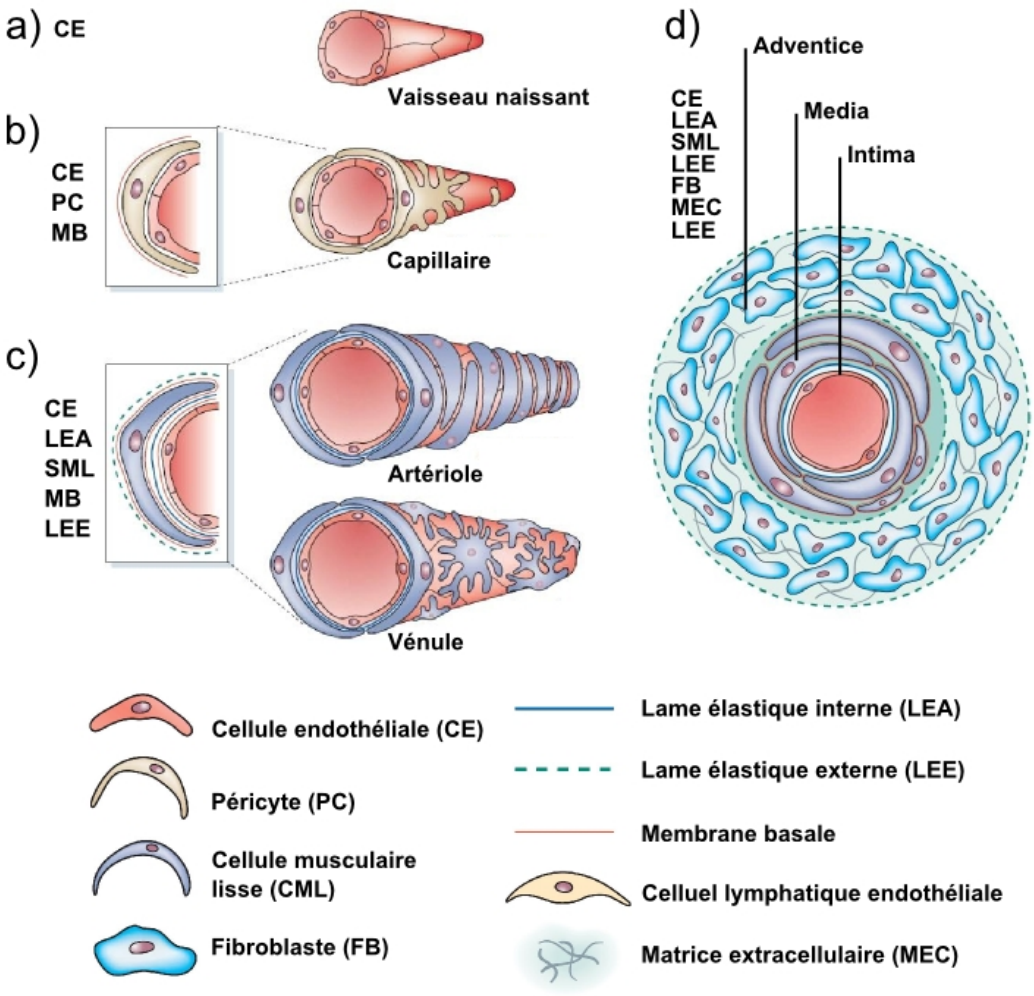


Figure 1.1 – Composition de la paroi des vaisseaux sanguins en fonction de leur type et de leur maturité. a) Vaisseau naissant, b) capillaire, c) artériole et veinule, d) veine ou artère. Adapté de [Jain 2003] .

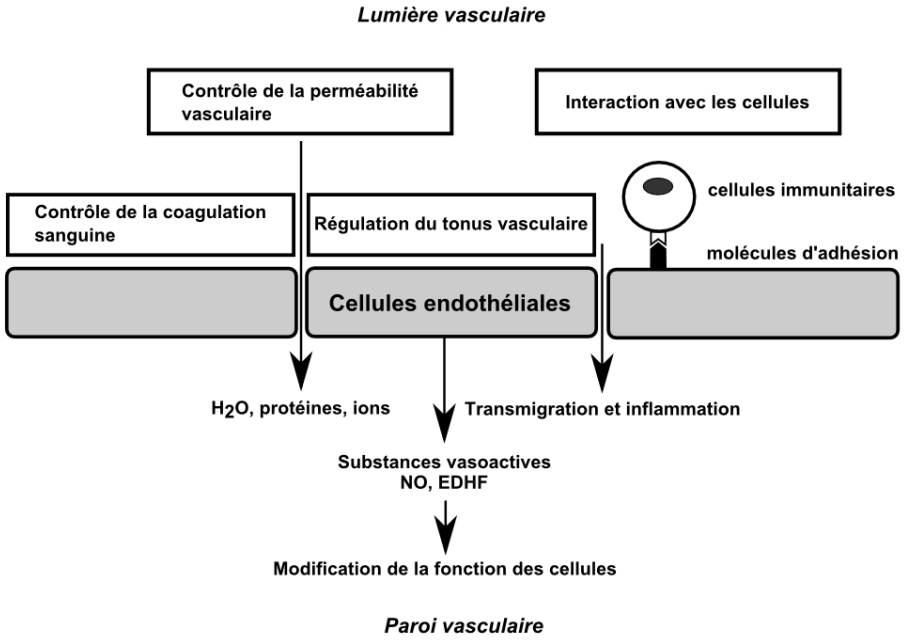


Figure 1.2 – Variété des fonctions exercées par les cellules endothéliales. Adapté de [Hirase 2012].

contribuent à l'état pro-thrombique.

Les dysfonctions endothéliales sont également un élément de la pathogénèse de l'athérosclérose. Cette pathologie progressive qui se caractérise par l'accumulation de lipides et d'éléments fibreux dans les artères est actuellement une des causes de mortalité les plus importantes liées aux maladies cardiovasculaires. La perte de l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la monocouche endothéliale contribue à la formation et à la croissance de l'athérome. Cette perte d'intégrité survient lorsque certaines cellules se détachent de l'endothélium et lorsque les jonctions intercellulaires sont perturbées ce qui forme de petits interstices entre les cellules. Ces lésions à la surface de l'endothélium conduisent à une ulcération et à la formation de fissures qui favorisent la thrombose et la rupture de l'athérome conduisant à une occlusion thrombotique et l'infarctus du myocarde.

La connaissance des mécanismes à la base de la réparation de l'endothélium vasculaire est nécessaire pour limiter les maladies vasculaires et/ou améliorer leurs traitements.

1.1.3 Structure

Afin de maintenir son intégrité et d'assurer ses fonctions, l'endothélium vasculaire est doté d'un système d'adhérence cellule-cellule et d'un système d'adhérence cellule-matrice.

1.1.3.1 Les adhésions cellule-cellule

Les cellules endothéliales sont capables d'adhérer les unes aux autres et de communiquer grâce à différentes structures jonctionnelles composées de protéines transmembranaires qui assurent l'adhérence homotypique intercellulaire et la connexion entre les cellules. Ces jonctions peuvent être classées en trois catégories : les jonctions serrées ou étanches, les jonctions

communicantes et les jonctions adhérentes qui participent respectivement à la fonction de barrière semi-perméable, à la communication entre cellules, et à l'intégrité tissulaire.

➢ Les jonctions serrées

Les **jonctions serrées** ou **étanches**, permettent à deux cellules adjacentes d'accoler leur membrane créant ainsi une barrière contrôlant le passage de molécules dans l'espace intercellullaire et empêchant la diffusion latérale des protéines hors de leur aire fonctionnelle. Situées entre la partie apicale et la partie basolatérale, elles contribuent à la polarisation des cellules endothéliales et épithéliales.

La variabilité des jonctions serrées est très importante le long des différents segments composant l'arbre vasculaire [Wallez 2008]. Cette disparité a un impact sur la perméabilité vasculaire et l'extravasation de cellules immunitaires. Ces variations concernent le degré de complexité des brins occlusifs, ainsi que la composition des jonctions serrées. Les cellules endothéliales des artères sont exposées à de hauts débits sanguins et ont développé en conséquence un système de jonctions serrées fortement développé alors que celles-ci sont moins complexes dans le système microvasculaire comme les capillaires ou les artérioles et encore moins dans les vénules.

Les jonctions serrées sont composées de différentes protéines transmembranaires telles que les occludines, les claudines, et de petites immunoglobulines jonctionelles (sJI pour small junctional immunoglobulins) comme JAM-A (Fig 1.3). A travers leur partie cytoplasmique elles peuvent se lier à un grand nombre de protéines du cytoplasme et du cytosquelette qui à leur tour sont impliquées dans des fonctions très diverses qui vont de la signalisation, à la polarisation cellulaire ou à la régulation de la transcription.

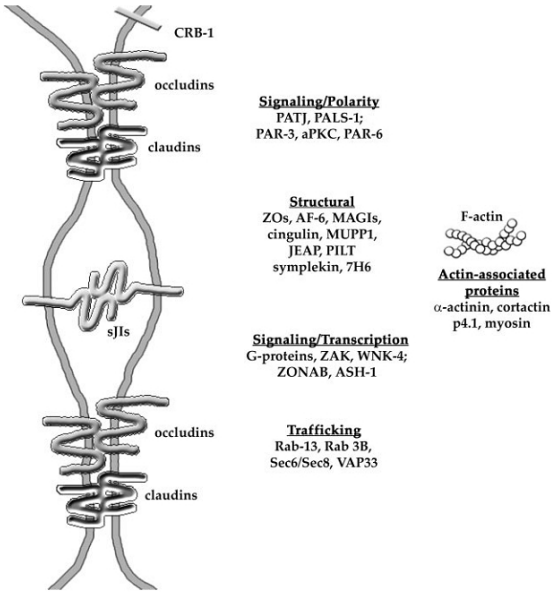
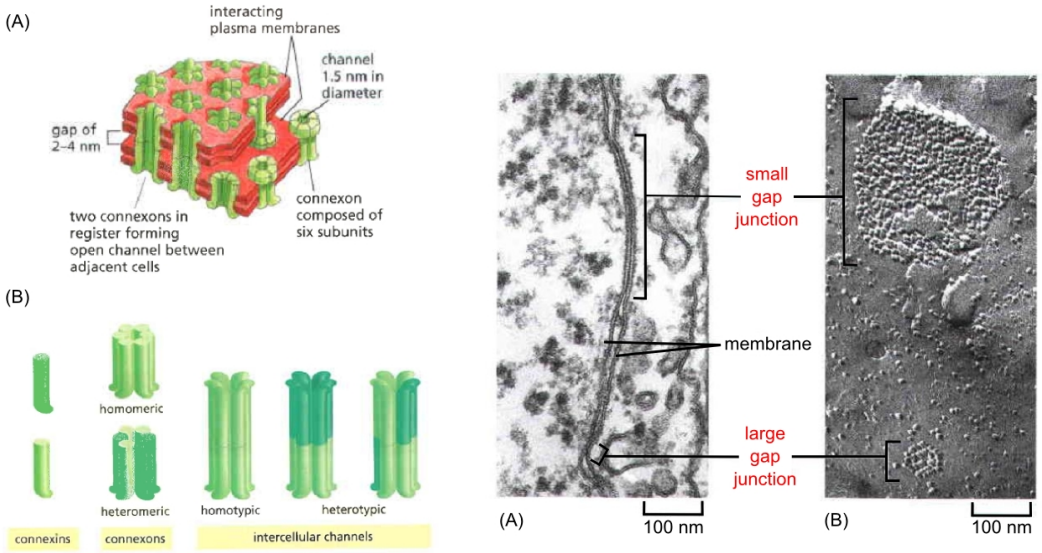


Figure 1.3 – Représentation schématique des jonctions serrées. [Dejana 2004]

➢ Les jonctions communicantes

Les **jonctions communicantes** ou **jonctions gap** sont composées de canaux étroits, remplis d'eau, qui connectent directement le cytoplasme des cellules adjacentes. Chaque canal, ou nexus, est formé de 2 hexamères de connexines (protéines à quatre domaines transmembranaires) appelés connexons qui délimitent un pore central par lequel de petites molécules peuvent passer d'une cellule à l'autre. Comme les jonctions serrées, l'expression des principaux types de connexines (73,40 et 43) n'est pas uniforme dans l'endothélium de tous les vaisseaux. Elle peut varier en fonction de l'espèce, du type de vaisseau et de sa position dans l'arbre vasculaire. [Haefliger 2004]



(a) **(b)**

Figure 1.4 – Jonctions communicantes (a) A) Représentation tridimensionelle de l'interaction de plasma membranaire de deux cellules adjacentes. Chaque bicouche lipidique est représentée par une paire de feuillets rouges. L'assemblage de protéines appelés connexons (vert) est formé de l'assemblage de 6 connexines qui pénètrent les 2 bicouches lipidiques. 2 connexons se rejoignent à travers l'espace (gap) intracellulaire pour former un canal continu entre deux cellules. B) Organisation de connexines en connexons dans les canaux intercellulaires. Les connexons peuvent être homomeriques ou hétéromériques, et le canal intercellulaire peut être homotypique ou hétérotypique [Bruce Alberts 2007]. (b) Jonctions communicantes en microscopie électronique. Larges et fines jonctions communicantes entre fibroblastes en culture. [Bruce Alberts 2007]

Ces canaux permettent l'échange d'ions inorganiques ou d'autre petites molécules solubles dans l'eau, mais pas celui des macromolécules telles que les protéines ou les acides nucléiques. Ainsi, les cellules connectées par les jonctions gap peuvent communiquer entre elles directement, sans avoir à surmonter la barrière membranaire. En mettant ainsi en relation leur cytoplasme, les cellules peuvent « sentir » ce que font leurs voisines et ainsi acquérir un comportement synchrone avec les autres cellules. Dans l'endothélium, ce couplage est important dans les phénomènes de migration et de prolifération cellulaires qui ont lieu au cours du développement ou de la réparation tissulaire.

➢ Les jonctions d'ancrage

La **jonction adhérente** est un élément essentiel de l'adhérence cellule-cellule. Cette structure est composée de récepteurs transmembranaires, les cadhérines, qui relient les cellules entre elles via les interactions homophiliques de leur domaine extracellulaire. Les cadhérines s'associent, via leur queue intracellulaire, à des partenaires cytoplasmiques, notamment les caténines, qui leur permettent un ancrage aux composants du cytosquelette que sont les filaments d'actine et les microtubules [Hinck 1994]. Ces complexes moléculaires interagissent également avec d'autre partenaires tels que les molécules de signalisation. Plusieurs types de cadhérines sont exprimées dans les cellules endothéliales, dont deux sont majoritaires. La VE-cadhérine qui constitue un marqueur spécifique des cellules endothéliales. La N-cadhérine qui assure le contact entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses ou les péricytes [Gilbertson-Beadling 1993],[Tillet 2005]. Au cours du chapitre suivant nous allons largement revenir sur l'architecture moléculaire de la jonction adhérente et son rôle dans la méchanotransduction.

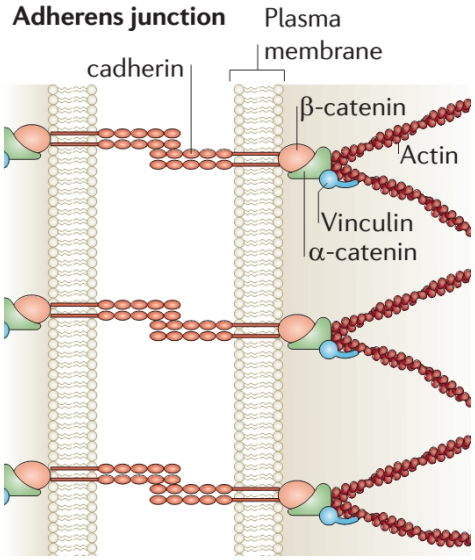


Figure 1.5 – Représentation schématique d'une jonction adhérente. Les cadhérines relient les cellules entre elles via les interactions homophiliques de leur domaine extracellulaire. Le domaine intracellulaire des cadhérines permet un ancrage aux composants du cytosquelette via différents partenaires cytoplasmiques tels que les caténines. [DuFort 2011]

Il existe également un deuxième type de jonctions d'ancrage, les **desmosomes**. Ces derniers ont pour but d'établir un lien fort entre les filaments intermédiaires du cytosquelette procurant ainsi une certaine élasticité et une certaine tenue aux tissus. Ces structures sont principalement localisées dans les tissus soumis à de forts stress mécaniques comme l'épiderme et le myocarde. Ces structures d'adhérence sont très présentes dans les épithéliums et peu répandues dans les endothéliums.

1.1.3.2 Les adhésions cellules-matrice

Les cellules endothéliales adhérent les unes aux autres mais doivent également pouvoir adhérer à leur support, la lame basale qui permet d'accrocher les cellules aux tissus conjonctifs

sous-jacents. Cette fine couche de matrice extracellulaire fournit un support mécanique à l'endothélium.

➢ Lame basale

La lame basale est une très fine couche (40-120 nm) composée de molécules matricielles, souple et résistante. Son rôle mécanique est essentiel. Dans la peau par exemple, l'épiderme dépend de la résistance de la lame basale pour rester attaché au tissu conjonctif sous-jacent, le derme. La lame basale est synthétisée par les cellules sur chacune de ses faces, c'est à dire d'une part par les cellules endothéliales et d'autre part par les cellules des tissus conjonctifs.

Comme d'autres matrices extracellulaires dans les tissus animaux, la lame basale est constituée de 2 principales classes de macromolécules extracellulaires : (1) les protéines fibreuses (généralement des glycoprotéines), et (2) des chaines de polysaccharides. La composition exacte de la lame basale mature varie d'un tissu à l'autre et même d'une région à l'autre de la même lame basale et contient typiquement des glycoprotéines de type laminine, collagène type IV, collagène type VI, fibronectine et nidogène ainsi que des protéolgycanes type perlecane. D'un point de vue structurel, les lames basales sont organisées sur une structure de molécules de laminine liées entre elles par leurs bras latéraux et maintenues juste en dessous des cellules endothéliales par les intégrines et d'autres récepteurs à la base de la membrane plasmique. Des molécules de collagène sont recrutées dans cette structure, s'assemblant sous forme d'un maillage de feuillets. Ce réseau de laminine et collagène est ponté par des protéines nidogènes et perlecanes.

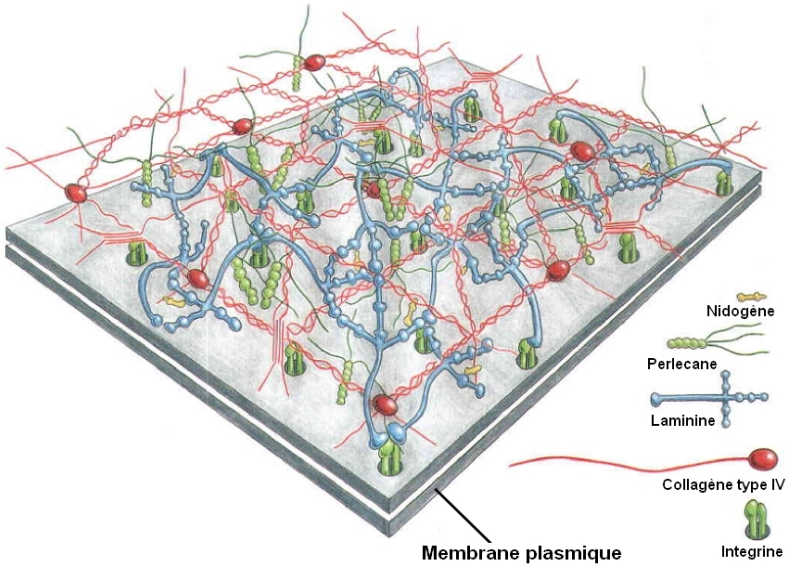


Figure 1.6 – Modèle de la structure moléculaire de la lame basale. La lame basale est formée par des interactions spécifiques entre les protéines laminine, collagène type IV, nidogène et le proteoglycane perlecane. Il existe des isoformes variées du collagène IV et de la laminine, chacune d'elles possédant une distribution distincte dans les tissus. Les récepteurs transmembranaires de la laminine (les integrines et les dystroglycanes) de la membrane plasmique sont soupçonnés d'organiser l'assemblage de la lame basale. [Bruce Alberts 2007]

➢ Les intégrines

Les cellules sécrètent de la matrice extracellulaire, l'organisent et la dégradent. La matrice, à son tour, exerce une influence cruciale sur les cellules au travers de protéines transmembranaires qui agissent comme des récepteurs de la matrice. Ces protéines accrochent la matrice située à l'extérieur de la cellule à son cytosquelette mais leur rôle est bien plus important qu'une simple attache mécanique passive. Les récepteurs de la matrice jouent un rôle crucial dans les cellules endothéliales, en favorisant leur accroche à la lame basale. Il existe plusieurs types de molécules pouvant fonctionner en tant que récepteurs ou co-recepteurs matriciels, tels que les proteoglycanes transmembranaires. Mais les principaux récepteurs matriciels sont les intégrines.

La famille des intégrines, qui comprend au moins 20 membres est composée de molécules hétérodimériques composées de 2 sous-unités de glycoprotéines, non covalemment attachées, nommées α et β. En plus de leur rôle dans l'angiogenèse et l'apoptose, les intégrines ont un rôle dans le maintien de la polarité cellulaire ainsi que dans la détection et la réponse à des changements de flux sanguins.

Un certain nombre d'intégrines sont exprimées à la surface des cellules endothéliales, incluant les récepteurs de la fibronectine, la laminine et le collagène. Différentes combinaisons de sous unités d'intégrines à la surface des cellules permettent de reconnaître une grande variété de protéines de la matrice extracellulaire dans différentes conditions physiologiques. Par exemple, les récepteurs de la fibronectine $\alpha_v\beta_1$ et $\alpha_5\beta_1$ sont fortement exprimés dans les cellules endothéliales quiescentes, alors que le récepteur de la fibronectine et de la vitronectine $\alpha_v\beta_3$ n'est exprimé dans les cellules endothéliales qu'au cours du processus d'angiogenèse [Brooks 1994].

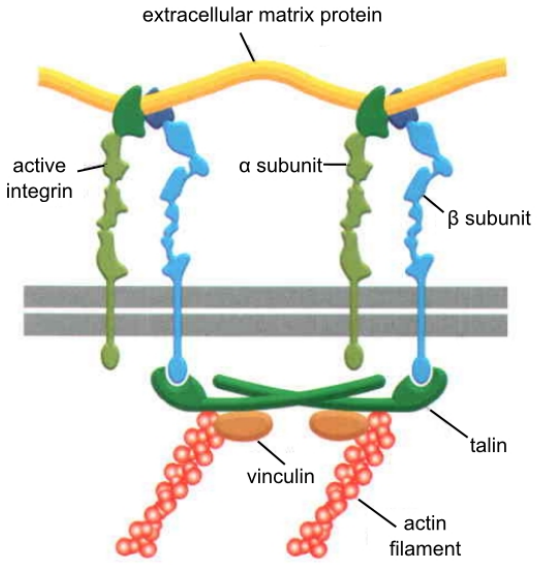


Figure 1.7 – Structure d'une intégrine connectant la matrice extracellulaire au cytosquelette d'actine de cellules adhérentes. La tête de la molécule d'intégrine s'attache directement à une protéine extracellulaire telle que la fibronectine ; La queue intracellulaire de l'intégrine s'attache à la taline qui à son tour se fixe à l'actine filamenteuse. Un ensemble de protéines d'ancrage intracellulaire, incluant l' α-actinine, la filamine et la vincuine, viennent renforcer ce lien. [Bruce Alberts 2007]

L'interaction des intégrines avec les protéines de la matrice extracellulaire se caractérise par des changements de conformation de leur domaines extracellulaires, une réorganisation du cytosquelette et la formation de clusters d'intégrines [Burridge 1988],[Loftus 1994]. Dans de nombreuse cellules, le rassemblement d'intégrines conduit à la formation de complexes d'adhésion focale contenant des protéines du cytosquelette cytoplasmiques ce qui offre par la suite une structure pour l'assemblage et la catalyse de protéines de signalisation [Burridge 1988].

1.1.3.3 Le cytosquelette

Dans les deux sections précédentes, nous avons vu les différentes structures adhésives que possédent les cellules endothéliales pour maintenir leur cohésion et communiquer entre elles au sein de l'endothélium. Que ce soient les jonctions adhérentes, les jonctions serrées ou les adhésions matricielles transmises par les intégrines, tous ces systèmes d'adhérence sont connectés au cytosquelette.

Le cytosquelette a un rôle central dans la cellule et ses fonctions sont très larges : il organise spatialement le contenu de la cellule, connecte les cellules physiquement et biochimiquement à leur environnement externe et génère des forces coordonnées qui permettent aux cellules de se déplacer et de changer de forme. Malgré le terme « squelette » le cytosquelette n'est pas une structure figée mais au contraire une structure très dynamique et adaptative.

Le cytosquelette est composé majoritairement de 3 types de polymères : **les filaments d'actine** qui déterminent la forme de la surface cellulaire et sont nécessaires à la locomotion des cellules. **Les microtubules** qui déterminent la position des organites membranaires et dirigent le transport intracellulaire. **Les filaments intermédiaires** à la base de la résistance mécanique de la cellule. Tous ces filaments du cytosquelette sont reliés entre eux et aux différents composants de la cellule par l'intermédiaire de centaines de protéines. Ces protéines sont essentielles à l'assemblage des filaments du cytosquelette à certains endroits de la cellule et incluent les protéines moteurs qui convertissent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP en forces mécaniques. Ces forces permettent notamment le déplacement des organites le long des filaments.

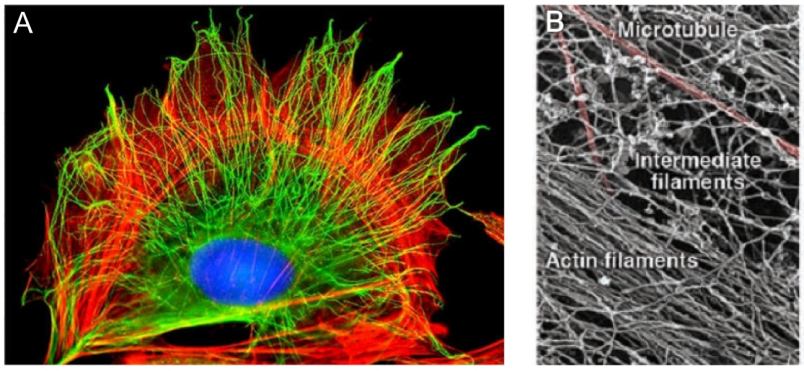


Figure 1.8 – Cytosquelette. A) Cellule en culture avec en vert les microtubules et en rouge les filaments d'actine, B) Image en microscopie électronique des différents polymères constituant le cytosquelette [Bruce Alberts 2007]

➢ **l'actine**

L'actine est la protéine la plus abondante dans la plupart des cellules eucaryotes. Les filaments d'actine ou actine-F sont des polymères en double hélice de 7 à 9 nm de diamètre formés par la polymérisation de monomères d'actine, l'actine globulaire ou actine-G. Ce sont les filaments les plus fins du cytosquelette qui possèdent la propriété de se rompre très facilement.

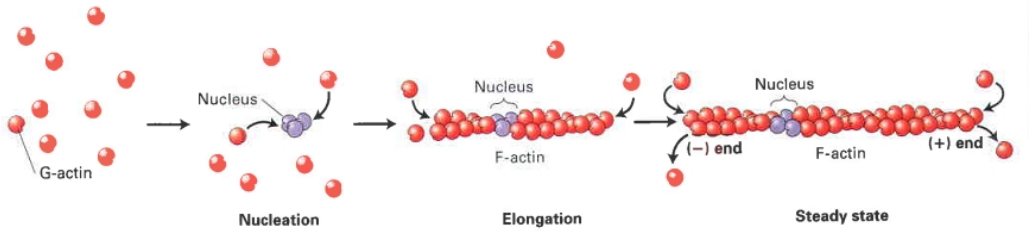


Figure 1.9 – Étapes de polymérisation de l'actine. Dans la phase initiale de nucléation, les monomères d'actine-G-ATP (rouge) commencent par former des complexes stables d'actine (violet). Ces amorces sont rapidement allongées dans une seconde phase par l'addition de sous-unités à chacune des extrémités des filaments. Dans la troisième phase les extrémités des filaments sont dans un état d'équilibre avec les monomères d'actine-G. [Harvey Lodish 2004]

Chaque filament d'actine possède une structure polarisée. A l'extrémité (+) ou extrémité barbée, l'addition d'une sous-unité d'actine et favorisée. A l'extrémité (−), ou pointue, c'est la dissociation d'une sous-unité d'actine qui est favorisée. L'énergie nécessaire à la polymérisation est fournie par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP en ADP. Les 3 étapes de polymérisation de l'actine, résumées sur la figure-1.9, sont les suivantes :

- une étape de **nucléation**, au cours de laquelle des sous unités d'actine-G s'assemblent en petits oligomères instables. Lorsque ces oligomères atteignent une taille de 3 sous-unités, ils peuvent servir de nucléateur pour les étapes suivantes de la polymérisation.

- une étape **d'élongation**, ou les monomères d'actine s'assemblent en se polarisant, avec une polymérisation plus rapide à l'extrémité (+) qu'a l'extrémité (−). L'ATP est hydrolysée en ADP suite à l'addition d'un monomère d'actine au polymère déjà formé.

- une étape de **dépolymérisation**, qui à l'inverse de la polymérisation est plus rapide à l'extrémité (−) qu'à l'extrémité (+). Il peut donc exister un état d'équilibre entre la polymérisation à l'extrémité (+) et la dépolymérisation à l'extrémité (−) où le filament semble se déplacer tout en gardant une longueur constante. Ce phénomène porte le nom de treadmiling.

Les filaments d'actine déjà formés peuvent ensuite être modulés par diverses protéines pour constituer des structures plus importantes. Dans les cellules endothéliales, on dénombre 6 grands types de super-structures d'actine :

-Les **lamellipodes** sont de fines protrusions de la membrane que l'on trouve au niveau du front de migration des cellules endothéliales. Ces structures sont généralement dépourvues de la plupart des organites et sont composée d'un réseau dense et dynamique de filaments d'actine. Les forces générées par cet assemblage de filaments d'actine au niveau du front de migration provoquent des protrusions membranaires et la croissance du lamellipode.

-La **lamelle** est localisée à l'arrière du lamellipode et est généralement la structure la plus grande des cellules motiles. Elle est constituée principalement d'un assemblage condensé de filaments d'actine linéaires. Ce réseau de filaments d'actine est plus stable et moins dynamique que celui des lamellipodes [Ponti 2004]. La lamelle est le siège d'adhésions plus fortes et matures que dans les lamellipodes et contient de la myosine II, un moteur moléculaire essentiel à la motilité cellulaire.

-Les **filopodes** sont de petites protrusions membranaires que les cellules utilisent pour sonder leur environnement. Les filopodes sont souvent situés au niveau du front de migration des cellules. Ces structures de 60 à 200 nm de diamètre contiennent des assemblages de 10 à 30 filaments d'actine parallèles maintenus entre eux par des protéines liant l'actine comme la fascine. Les filopodes sont orientés avec l'extrémité (+) des filaments d'actine dirigés dans le sens de la protrusion membranaire.

-Les **fibres de stress** sont formées par l'assemblage de filaments d'actine linéaires attachés à la matrice extracellulaire par des adhésions focales ou contacts focaux. Comme leur nom l'indique, ces fibres peuvent se contracter et exercer des tensions.

-L'**actine corticale** est un réseau d'actine moins ordonné que les autre structures décrites, situé sous la membrane plasmique, et qui assure son support et son organisation.

-La **ceinture d'adhérence** où les filaments d'actine forment une bande contractile autour de la cellule. Cette bande est reliée aux protéines des jonctions adhérentes et assurent la résistance mécanique de l'endothélium.

Dans les lamellipodes, la polymérisation de l'actine initiée par le complexe Arp2/3 est utilisée pour pousser la membrane plasmique vers l'avant de la cellule en migration (Fig 1.10-A). En plus de la motilité basée sur la polymérisation de l'actine, les cellules possèdent une grande famille de moteurs moléculaires, les myosines, qui peuvent se déplacer le long des filaments d'actine grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP. La myosines-II permet le déplacement des fibres d'actine grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP. Les fragments d'actomyosine constituent l'un des principaux appareils contractiles des cellules. D'autres myosines, comme la myosine V, assurent le transport de vésicules intracellulaires le long des fibres d'actine.

La myosine II est constituée de 2 "têtes" globulaires contenant un site de liaison à la fois pour l'ATP et l'actine et se poursuit par 2 « cous » qui se lient à 2 chaines légères. Le cou sert de levier pour amplifier la rotation des têtes consécutivement à la conversion de l'énergie chimique de l'ATP en mouvement mécanique. Ce domaine se poursuit par une longue chaîne surenroulée en hélice-α qui forme un domaine en forme de bâtonnet étendu, et se termine par une queue non hélicoïdale relativement courte. Les filaments de myosine II se lient à l'actine grâce à leurs têtes. L'activité de l'ATPase sur ces têtes permet leur changement de conformation et se traduit par le déplacement antiparallèle des filaments d'actine.

La régulation de l'activité de la myosine-II qui passe par la régulation de l'hydrolyse du complexe Mg^{2+}-ATP et la formation de filaments de myosine II est assurée par la phosphorylation de certains acides aminés présents dans les chaines légères de régulation (RLC) et

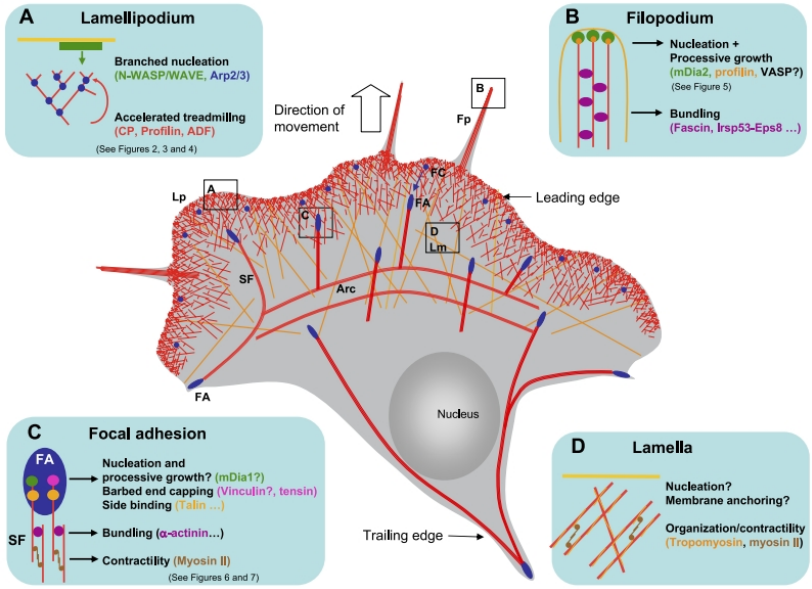


Figure 1.10 – Illustration schématique du cytosquelette d'actine d'une cellule en migration. Le schéma contient les principales structures rencontrées dans une cellule en migration. A : lamellipode, la ramification des filaments d'actine est générée au niveau de la membrane plasmique par la signalisation WASP-Arp2/3 et maintenue en 'tapis-roulant' (tredamilling) rapide par un ensemble de protéines de régulation (ADF, profiline, protéines de coiffe). B : A l'extrémité des filopodes, des protéines MDia2 catalysent l'assemblage profiline-actine. Les filaments résultants sont étroitement maintenus ensemble par diverses protéines comme la AFscine et le complexe Irsp53-Eps8. C : les cellules migrant lentement forment des adhésions focales en réponse à la signalisation de RhoA. Les adhésions focales connectent la matrice extracellulaire à des groupements contractiles composés d'actine, de myosine II, et de protéines liant l'actine comme l'α-actinine. D : La lamelle est caractérisée par un lent renouvellement de l'actine et contient de la tropomysine et de la myosine II. SF : fibre de stress ; AF :adhésion focale ; FC : complexe focal. [Le Clainche 2008]

les chaines lourdes. Plus d'une douzaine de kinases ont été rapportées comme étant capables de phosphoryler les RLC incluant la kinase des chaines légères de la myosine II (MLCK) ou encore ROCK. Ces kinases peuvent elles-mêmes êtres activées par des GTPases comme RhoA pour ROCK. La distribution de ces différentes kinases dans les cellules permet une activation localisée de la contractilité de l'actomyosine. Par exemple, MLCK est, au moins dans certaines cellules, plus localisée en périphérie, tandis que ROCK est plus centrale [Totsukawa 2000]. Cette différence de localisation explique pourquoi les structures d'actine dans le centre de la cellule comme les fibres de stress et les adhésions focales matures sont plus stables que celles qui sont localisées en périphérie et qui sont plus dépendantes d'une signalisation en amont.

➢ les microtubules

Les microtubules sont constitués de tiges creuses rigides d'environ 25 nm de diamètre dont la longueur de persistance, de plusieurs mm, les rend rigides à l'échelle de la cellule (de l'ordre de la dizaine de microns). Comme les filaments d'actine, les microtubules sont des structures dynamiques qui sont constamment en train de s'assembler et se désassembler. De par leur rigidité, ils donnent leur forme aux cellules, assurent le transport d'organites, et permettent la séparation des chromosomes pendant la mitose.

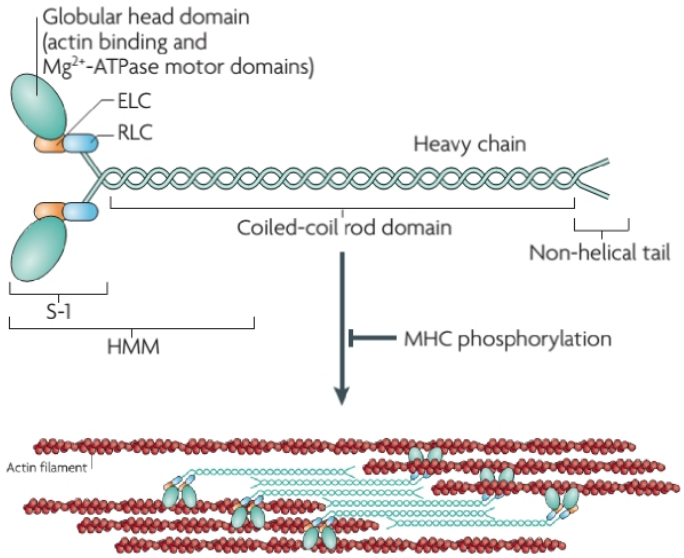
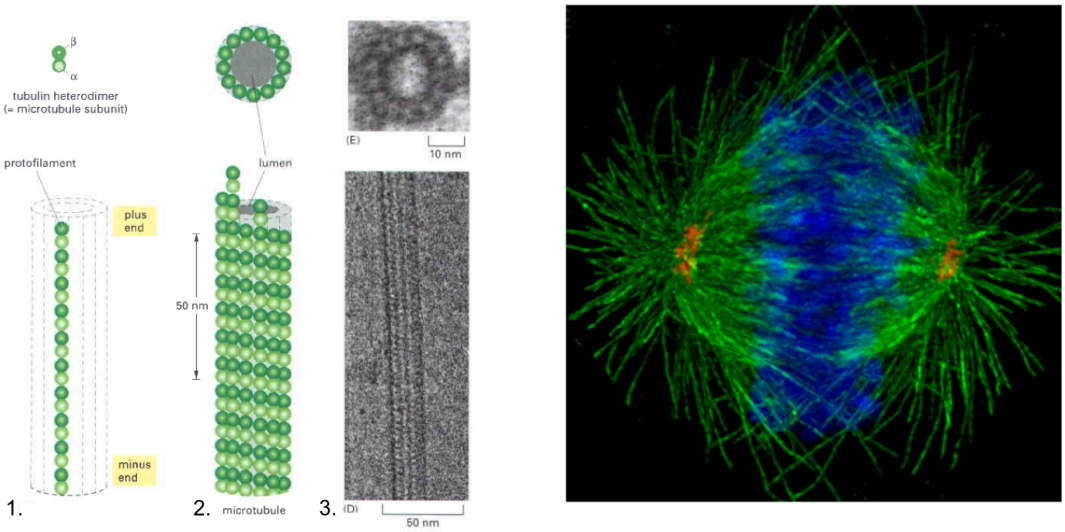


Figure 1.11 – Structure de la myosine-II. Le domaine globulaire au niveau des têtes, contient les régions de liaison pour l'actine et les domaines moteurs enzymatiques Mg2+-ATPase. Les chaînes légères essentielles (ELCs) et les chaines légères de régulation (RLCs) se lient aux chaines lourdes au niveau des bras du levier qui lient les têtes au bâtonnet. La meromyosine lourde (HMM) est un fragment qui contient les protéines motrices, le cou et une partie suffisante du bâtonnet pour produire la dimérisation entre les chaînes lourdes. Les molécules de myosine II s'assemblent en filaments bipolaires via leur domaine en bâtonnet. Ces filaments se lient à l'actine de façon antiparallèle et forment d'épais assemblages qui forment des structures telles que les fibres de stress [Vicente-Manzanares 2009]

Les microtubules sont composés de tubuline α et β qui forment des dimères. Les dimères de tubuline se polymérisent pour former des microtubules qui sont généralement constitués de 13 protofilaments linéaires assemblés autour d'un noyau creux. Comme les filaments d'actine, les microtubules sont des structures polaires avec deux extrémités distinctes : une extrémité (+) à forte croissance et une extrémité (−) à croissance plus faible. Cette polarité est un facteur important dans la détermination de la direction du mouvement le long des microtubules, tout comme la polarité des filaments d'actine définit la direction du mouvement des myosines. Le transport de molécules le long des microtubules s'effectue à l'aide de 2 moteurs moléculaires, la kinésine (qui se déplace dans le sens (+) et la dynéine (qui se déplace dans le sens (−), qui, comme la myosine II utilisent l'ATP comme source d'énergie pour se déplacer le long des microtubules. Lors de la mitose, les microtubules permettent de guider la séparation des chromosomes.

➢ les filaments intermédiaires

A l'inverse des 2 autres polymères du cytosquelette, la composition des filaments intermédiaires dépend du type cellulaire. Dans les cellules endothéliales, la vimentine et la kératine sont les principales protéines des filaments intermédiaires. Ces filaments peuvent facilement être étirés tout en étant très résistants à la rupture. Une autre propriété qui démarque les filaments intermédiaires des mircotubules et des filaments d'actine est leur absence de polarité intrinsèque. Enfin, aucun moteur moléculaire n'utilise les filaments intermédiaires comme "rails" de déplacements.



(a) (b)

Figure 1.12 – (a) Structure d'un microtubule. 1 : Représentation schématique d'une sous unité de tubuline (hétérodimère α-β) et d'un protofilament. 2 : Chaque protofilament est constitué d'un réseau de sous-unités adjacentes orientées dans la même direction. 3 : Image en microscopie électronique d'un court segment de microtubule. 3.E : Image en microscopie électronique d'une coupe de microtubules montrant un anneau de 13 protofilaments [Bruce Alberts 2007]. (b) Cellule HeLa en mitose. Image en super-résolution d'une cellule humaine en mitose avec le marquage de l'ADN (bleu), des microtubules (vert) et de la protéine du centrosome péricentrine (rouge). Les chromosomes sont alignés sur la plaque équatoriale par le fuseau mitotique, qui est organisé par les deux centrosomes [Lawo 2012]

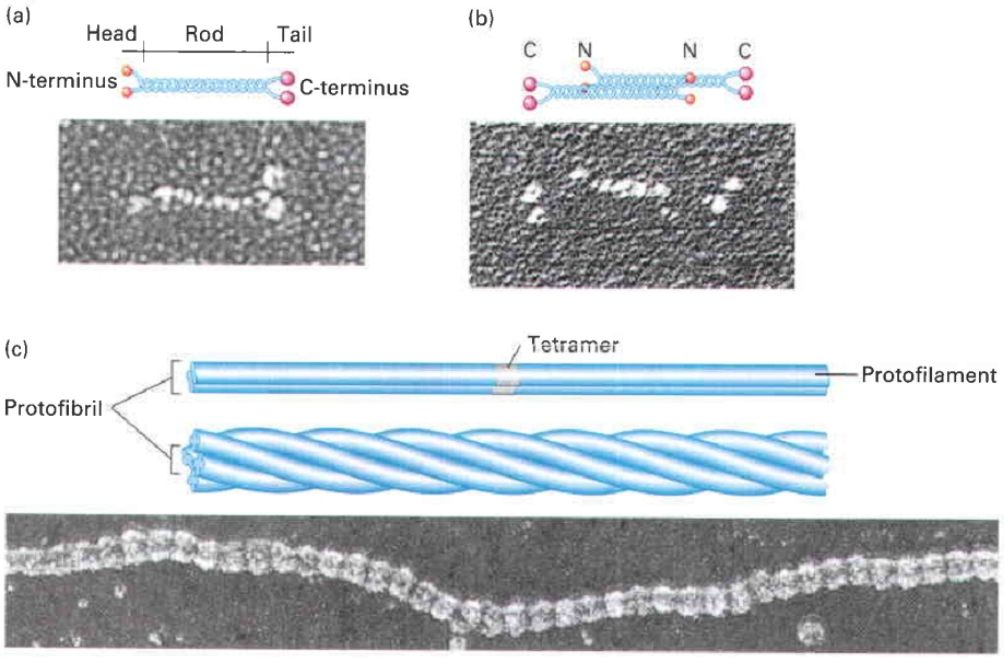


Figure 1.13 – Structure et assemblage des filaments intermédiaires. Images en microscopie électronique et schémas de dimères et tétramères de protéines de filaments intermédiaires ainsi que de filaments intermédiaires matures issus d'*Ascaris*, un parasite intestinal [Harvey Lodish 2004].

Le bloc de construction primaire des filaments intermédiaires est un dimère maintenu par les domaines en bâtonnet des monomères qui s'enroulent en spirale. Ces dimères s'associent alors en tétramères décalés, où les deux dimères sont dans des orientations opposées. Les tétramères sont assemblés bout à bout et verrouillés en longs protofilaments. Quatre protofilaments s'associent en protofibrille et quatre protofibrilles s'associent l'un à l'autre pour générer un filament de 10 nm (Fig 1.13).

Les filaments intermédiaires sont importants pour le maintien de la structure des cellules endothéliales et sont plus abondants dans les cellules exposées à un fort flux sanguin comme les cellules endothéliales aortiques. Les filaments intermédiaires sont connectés aux jonctions cellules-cellules ainsi qu'à la membrane basale par l'intermédiaire des contact focaux. Cette connexion des filaments de vimentine aux adhésions focales suggère qu'ils puissent avoir un rôle dans l'organisation des protéines des adhésions focales ou qu'ils leur servent d'échafaudage.

1.1.4 Conclusion

L'endothélium est un tissu central de l'organisme qui contrôle un grand nombre de processus physiologiques et pathologiques. Les cellules endothéliales sont équipées de différentes structures leur permettant de communiquer, de réguler la perméabilité au sein de l'endothélium, et de rester cohésives. La plupart de ces structures sont connectées au cytosquelette de la cellule qui organise spatialement son contenu, lui donne sa forme et ses propriétés mécaniques, et lui permet d'exercer des forces. C'est le rôle de ces forces mécaniques dont la manifestation la plus directe est la capacité des cellules à migrer qui est l'objet de la prochaine section.

1.2 Mécanosensibilité cellulaire

Au sein de l'endothélium, les cellules endothéliales sont exposées à de nombreuses perturbations mécaniques comme les contraintes de cisaillement provoquées par le flux sanguin ou encore la réparation tissulaire. En effet, lorsqu'une blessure est infligée à la monocouche endothéliale, les cellules à la périphérie de la plaie se mettent à migrer pour recoloniser la région lésée et restaurer l'intégrité de l'endothélium.

L'idée que les forces puissent réguler le remodelage et le développement des tissus n'est pas nouvelle puisqu'elle a été proposée en 1892 par un chirurgien et anatomiste, Julius Wolff. Il a postulé que les tissus osseux adaptaient leur structure à leur environnement mécanique en se basant sur l'observation que les trabécules suivaient les principales lignes de contraintes des os causées par des charges physiques [Wolff 1892]. Dans la même période, il a été proposé que les forces mécaniques étaient à l'origine de la forme des tissus et des organes durant le développement embryonnaire [Roux 1895],[Thompson 1917] mais il n'existait pas à l'époque d'outils permettant de valider expérimentalement ces idées. Et ce n'est que pratiquement un siècle plus tard que la communauté scientifique s'est à nouveau penchée sur la question. Durant une grande partie du 20ème siècle, les scientifiques se sont concentrés sur le développement d'outils de biologie moléculaire pour recenser les bases génétiques de la vie et ce n'est que depuis une vingtaines d'années, et avec l'arrivée de nouveaux outils pour mesurer et manipuler des forces de très faible amplitude, que la "mécano-biologie" a pris de l'ampleur.

1.2.1 Forces et adhésions cellules/matrice

Les cellules sont en permanence en train de sonder, pousser ou tirer sur leur environnement, une des preuves les plus directes de cette activité contractile étant la migration cellulaire. De plus en plus de recherches sont effectuées pour tenter de comprendre les mécanismes de régulation des forces contractiles. Pour comprendre la façon dont les forces sont transmises et potentiellement transduites en signal biochimique, il faut d'abord connaitre les structures cellulaires qui supportent ces forces. Les efforts des scientifiques se sont d'abord concentrés sur l'étude de ces mécanismes à l'échelle de la cellule unique et commencent à s'étendre à l'étude d'architectures multicellulaires. De nouveaux outils ont spécifiquement dû être mis au point pour mesurer et manipuler ces forces cellulaires. Dans cette section, nous passons en revue quelques-unes de ces techniques et leur contribution à la compréhension du rôle de la mécanique dans les processus physiologiques et pathologiques.

1.2.1.1 Mesure passive des forces au niveau des adhésions cellule/matrice

Un pas important dans la compréhension des forces transmises par les cellules à leur matrice a été franchi avec la mise au point de techniques de mesures de forces basées sur le champ de déformation de matrices extracellulaires élastiques. Il existe 2 variantes de cette technique dont les performances sont détaillées dans le chapitre 3. La première de ces technique, la microscopie à traction de Force (TFM) développée par Dembo et Wang, utilise des microbilles fluorescentes disséminées dans des hydrogels de polyacrylamide comme marqueurs pour détecter les déformations causées par les cellules adhérentes (Fig 1.14-a,b). La deuxième technique consiste à utiliser un réseau de plots élastomériques, sur lesquels sont ensemencées les cellules et dont la déflexion provoquée par la tension cellulaire renseigne sur les forces

exercées [Tan 2003], [du Roure 2005] (Fig 1.14-c,d).

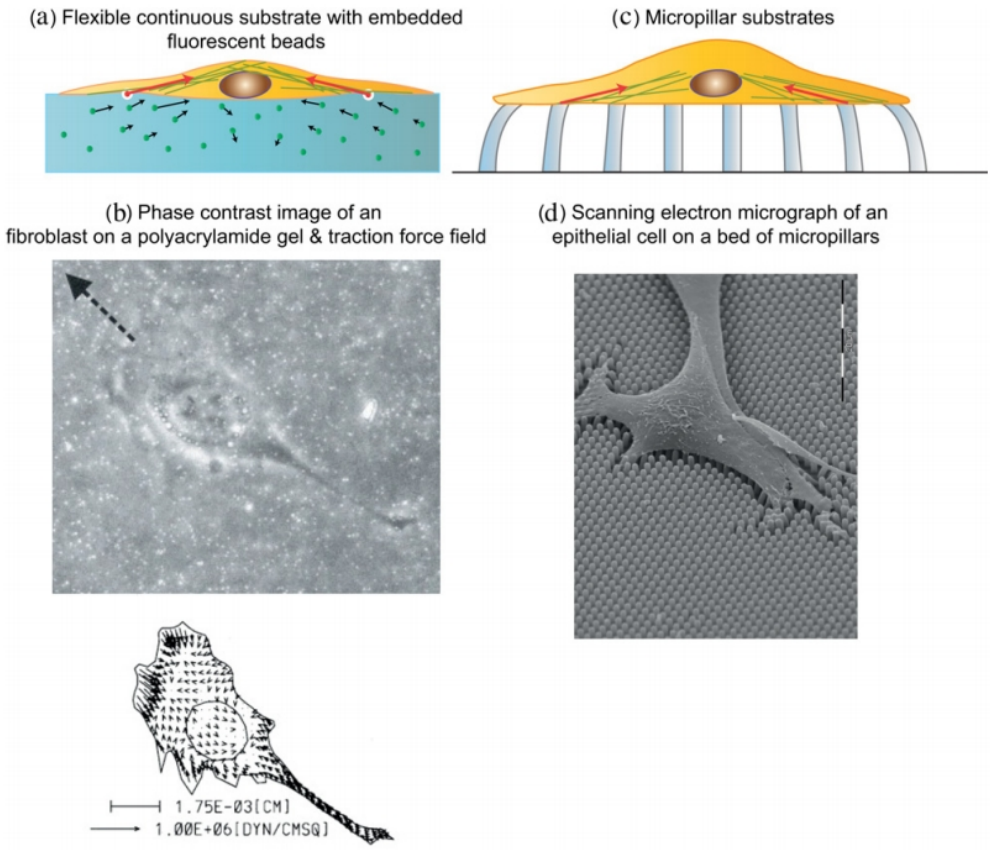


Figure 1.14 – Microscopies à traction de force (TFM), permettant de mesurer les forces exercées par les cellules.(a),(b), Représenation schématique de la TFM utilisant des billes fluorescentes disséminées dans un substrat en polyacrylamide et un exemple de déformation du substrat et des forces résultantes. (c),(d) Représentation schématique de TFM utilisant la méthode des micropiliers et exemple d'une cellule MDCK migrant sur un tapis de micropiliers.[Ladoux 2012]

Ces techniques permettent de mesurer des forces de l'ordre du $nN.\mu m^{-2}$ et d'atteindre des résolutions surfaciques de l'ordre de la dizaine de μm^2. Elles permettent de mesurer de manière passive la distribution des forces exercées par les cellules sur un substrat de rigidité donné et recouvert de la protéine de la matrice extracellulaire choisie. Couplées à une visualisation en fluorescence des protéines, les forces exercées peuvent être corrélées avec le remodelage de structures internes telles que les adhésions focales ou des constituants du cytosquelette.

Ces 2 techniques ont permis de montrer que les cellules adhérentes exerçaient constamment des forces contractiles sur leur substrat, dirigées vers l'intérieur de la cellule [Tan 2003], [Dembo 1999], [Balaban 2001].

Le perfectionnement de ces 2 méthodes, avec notamment la possibilité de fonctionnaliser très localement les substrats, et donc de restreindre l'adhésion cellulaire grâce à la technique du micro-tamponnage, a également permis d'identifier les implications multiples des forces cellulaires dans différents processus physiologiques ou pathologiques. Il a ainsi pu être observé

sur des cellules musculaires lisses, que la restriction de l'étalement cellulaire sur des réseaux de micro-plots empêchait les cellules d'exercer des forces de traction [Tan 2003] (Fig 1.15-1). Inversement, la régulation de la contractilité cellulaire induite par l'activation de RhoA a permis de restaurer la prolifération cellulaire même pour des cellules non étalées [Pirone 2006].

D'autre part il a été montré, sur des cellules fibroblastiques, que les forces de traction sont corrélées avec l'orientation des adhésions focales et augmentent linéairement avec leur surface, indiquant une contrainte (force par unité de surface) constante de l'ordre de 5 $nN.\mu m^{-2}$ (Fig 1.15-2).

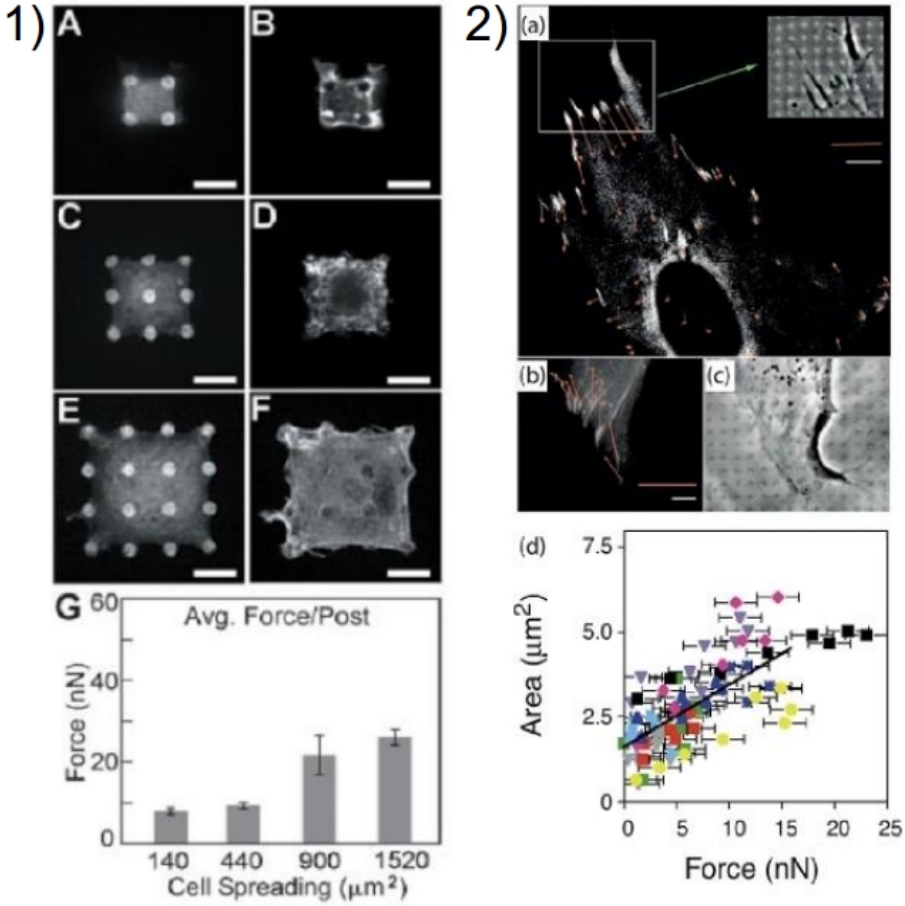


Figure 1.15 – 1. Rôle de l'étalement cellulaire dans la régulation des forces contractiles. (A-F) Images confocales de cellules musculaires attachées sur des microplots de différentes tailles recouverts de fibronectine. (A, C, et E) marquages fibronectine, (B,D, et F) marquages F-actine. (Barre d'échelle $10\mu m$.) (G) Force moyenne par plot en fonction du degré d'étalement.[Tan 2003]

2. Forces et adhésion focales. (a) Image en fluorescence d'un fibroblaste humain exprimant la GFP-vinculine localisée au niveau des adhésions focales. Les forces (flèches rouges) sont alignées dans la direction d'élongation des adhésions focales. (b) Image en fluorescence d'un fibroblaste humain marqué avec un anticorps anti-paxiline également localisé au niveau des adhésions focales. (c) Image en contraste de phase des motifs de fonctionnalisation qui permettent de mesurer les déformations du substrat. (d) Corrélation entre l'aire et la force des adhésions focales. Chaque symbole représente une adhésion focale différente. La pente représente une contrainte de 5.5 $nN\mu m^{-2}$ au niveau des adhésions focales.[Balaban 2001]

➢ **Influence de la rigidité du substrat sur les forces cellules/matrice**

Ces substrats permettent également d'étudier l'impact de la rigidité sur les forces et les processus cellulaires. En effet il est très facile de moduler la rigidité des hydrogels en variant leur degré de polymérisation. En fonction du type de polymérisation, ceci peut être effectué en contrôlant le rapport entre la quantité de polymère et d'agent réticulant (polymérisation chimique), ou la durée d'exposition à la source lumineuse (photopolymérisation). De la même façon une modulation de la rigidité peut être effectuée sur les réseaux de piliers déformables en variant leur hauteur.

Que ce soit avec la technique des micropilliers [Ghibaudo 2008], [Fu 2010] ou la technique des hydrogels [Lo 2000], [Califano 2010], il a été observé que les cellules exercent des forces plus importantes sur des substrats plus rigides, démontrant ainsi la capacité des cellules à sonder leur environnement mécanique. Cette relation entre force et rigidité a été déterminée pour plusieurs types cellulaires (fibroblastes ou cellules epitheliales MDCK) avec la technique des micropiliers [Ghibaudo 2008]. Il a été montré que l'intensité des forces augmente linéairement avec la rigidité pour atteindre ensuite un plateau autour de 60 $nN.\mu m^{-2}$ caractérisant ainsi la limite des forces que les cellules sont capables d'exercer sur leurs substrats.

Une autre étude, [Engler 2006] montre de façon très directe la sensibilité des cellules à leur environnement mécanique : des cellules souches mésenchymateuses se différencient en lignées différentes en fonction de la rigidité de la matrice sur laquelle elles sont ensemencées. Les cellules ensemencées sur les matrices les plus molles, mimant la rigidité du cerveau se différencient en cellules neurales, celles qui sont ensemencées sur des rigidités intermédiaires comme les muscles se différencient en cellules musculaires, et celles qui sont ensemencées sur les substrats les plus rigides, mimant les tissus osseux, se différencient en osteoblastes. Il a également été montré que les cellules étaient capables de modifier leur propre rigidité interne pour s'adapter à la rigidité de leur substrat [Solon 2007].

1.2.1.2 Application de forces externes

L'application de forces externes sur les cellules en utilisant des outils tels que les pinces magnétiques (MTs), les pinces optiques (OTs), le microscope à force atomique (AFM) ou encore les micropipettes a permis de révéler certains aspects du comportement cellulaire ou protéique.

Les pinces magnétiques qui permettent d'exercer des forces de 0.05 pN à 150 pN ont été utilisées pour manipuler des molécules uniques [del Rio 2009] et pour appliquer des forces sur les intégrines transmembranaires [Wang 1993]. Wang et al. ont montré que l'application de forces externes à l'aide de billes ferromagnétiques fonctionnalisées avec des récepteurs tels que les intégrines induit une rigidification de la cellule. La rigidité du cytosquelette (rapport entre contrainte et déformation) augmente proportionnellement à la force appliquée et diminue avec la dépolymérisation des microtubules et des filaments d'actines induite par des drogues.

Les pinces optiques permettent d'exercer des forces de 0.1 pN à 100 pN et ont été utilisées pour caractériser des moteurs moléculaires telles que les kinésines, myosines et dynéines

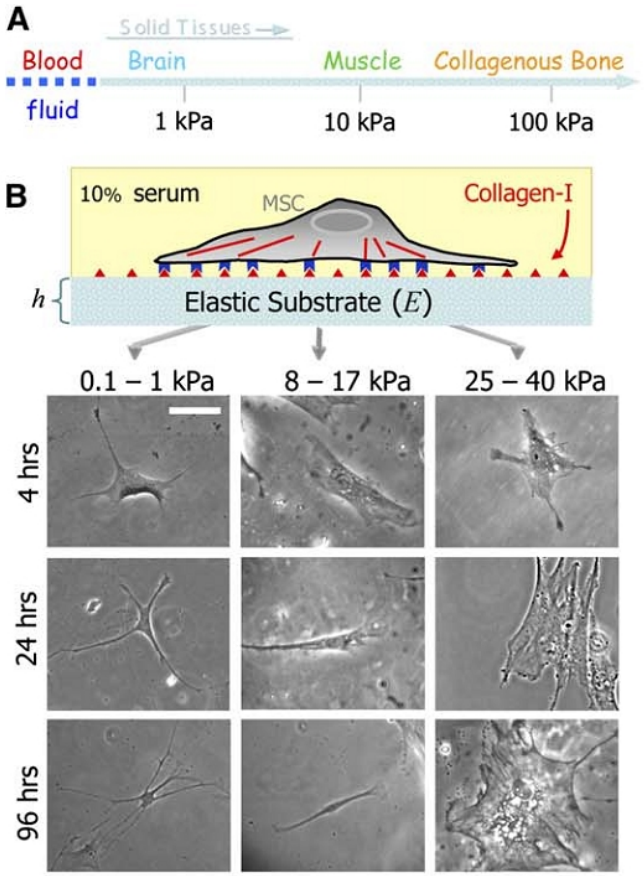


Figure 1.16 – Élasticité tissulaire et différenciation de cellules mesenchymateuses. A : Rigidité en kPa de différents tissus de l'organisme. B : Des cellules mésenchymateuses sont ensemencées sur des gels mimant la rigidité de différents tissus et fonctionnalisés avec du collagène-I. Les cellules, initialement petites et rondes se différencient en différents sous-types en fonction de la rigidité des gels sur lesquels elles ont été ensemencées.

[Asbury 2003], [Altman 2004]. Par exemple, à l'aide de cette technique, Altman et al. ont pu observer le déplacement de la myosine VI lorsqu'elle était soumise à des forces. L'expérience a consisté à attacher un filament d'actine entre deux billes de polystyrène maintenues dans des pièges optiques indépendants (Fig 1.17). Ce système a été mis en contact avec une construction myosine VI/GFP adsorbée à la surface d'une plateforme motorisée. Une boucle de rétroaction permet de maintenir une distance constante entre la bille qui est tirée par le moteur moléculaire et le piège qui maintient la bille, assurant ainsi une charge constante contre la marche (Fig 1.17). Cette expérience révèle qu'en présente d'ATP saturante, la cinétique de la myosine IV montre une faible dépendance à la charge appliquée jusqu'à une force proche du décrochement où la marche décroit fortement. Cette cinétique de marche est par contre significativement inhibée par la charge en présence d'ATP sous-saturé ou d'ADP.

Choquet et al ont restreint le mouvement de billes fonctionnalisées avec de la fibronectine ou des anticorps anti-integrines sur des fibroblastes avec un piège optique pour mimer des sites d'attache à la matrice extracellulaire de différentes résistances. Cette expérience a permis de montrer que les cellules sont capables de sentir les forces appliquées et d'y répondre par un renforcement proportionnel et local de leur adhésions au cytosquelette, ce qui permet à des forces plus importantes de s'exercer sur les intégrines. [Choquet 1997]

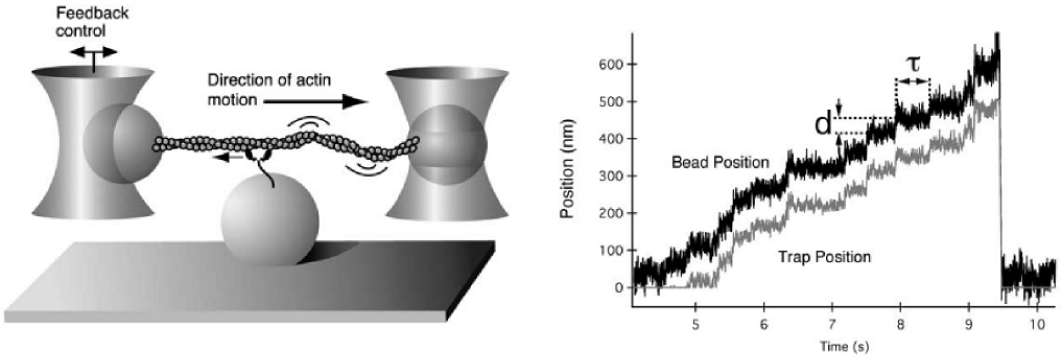


Figure 1.17 – Système de double piégeage optique, (A) Représentation schématique du système de piégeage optique utilisé pour contraindre le déplacement de la myosine VI avec une 'charge'.(B) Exemple d'enregistrement effectué avec le double piège optique. Le 1er tracé (en noir), correspond à la position de la bille transloquée par la myosine VI. Le deuxième tracé, (en gris), est la position de piège optique maintenant la bille. Lorsque la bille est éloignée du piège optique par la myosine, le piège se déplace pour maintenir une charge constante contre le déplacement de la myosine . Les caractéristiques observables sont la taille du pas (d), et le temps caractéristique (τ). Les données de l'enregistrement correspondant à une marche contre une force de 1 pN avec 2mM d'ATP [Altman 2004].

L'AFM, du fait de sa vaste gamme de forces (5-10 000 pN) a également été largement utilisée, que ce soit pour l'étude du dépliement de protéines en présence de forces [Rief 1999] ou pour caractériser les propriétés mécaniques et adhésives des cellules (Fig 1.18).

Ces différentes études, effectuées sur des types cellulaires variés, tels que les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules endothéliales et épithéliales, ont permis de montrer que les cellules répondent activement aux contraintes qui leur sont appliquées en remodelant leur cytosquelette d'actine et d'autres structures comme les adhésions focales. En retour, ces modifications structurelles entrainent des changements dans les forces contractiles et dans de nombreux processus cellulaires.

Cette capacité à transformer un événement mécanique en un signal biochimique est désigné par le terme de mécanotransduction [Ladoux 2012]. C'est un moyen par lequel des changements de conformation et ou des modification biochimiques induites par des forces mécaniques dans l'environnement cellulaire sont à l'origine de l'activation et de l'amplification de cascades de signalisation intracellulaires. Ces cascades conduisent à une réponse cellulaire qui va à son tour impacter les forces cellulaires. La mécanotransduction est donc un processus itératif où la cellule adapte son activité et sa contractilité à son environnement mécanique.

1.2.1.3 Les adhésions focales : sièges de la mécanotransduction

Nous avons vu dans la section précédente que l'adhésion de cellules isolées et leur migration est régie en grande partie par les intégrines, qui font le lien entre la matrice extracellulaire (MEC) et les composants intracellulaires. Les intégrines et la matrice extracellulaire sont le siège de mécanismes de mécanotransduction.

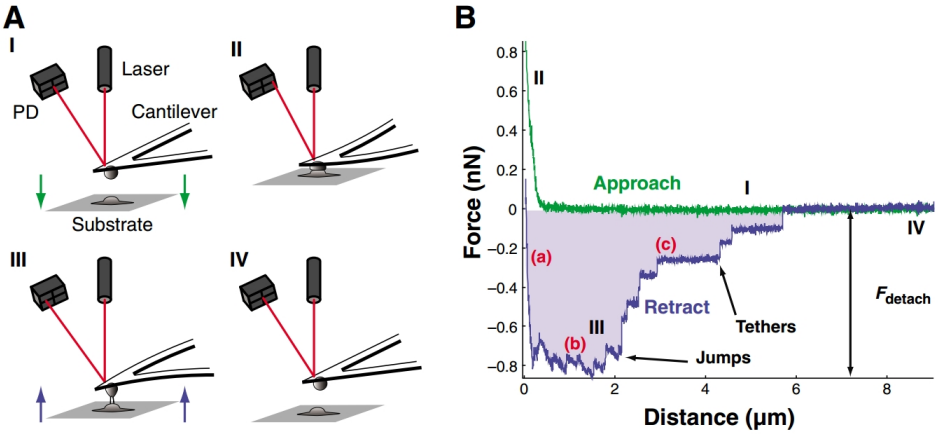


Figure 1.18 – AFM sur cellule unique : description de la mesure de l'adhésion cellulaire. Traces de (A) l'approche (vert) et (B) la rétraction (bleu). (A) Dans cette technique la pointe et le substrat sont mis en contact (A I). Le substrat sondé peut être une cellule, une surface fonctionnalisée ou une matrice organique. La position sur la photodiode d'un faisceau laser (ligne rouge) qui est réfléchi à l'arrière de la pointe mesure la déflection de la pointe et donc la force qui agit sur celle-ci. Pendant l'approche (flèches vertes), la cellule est compressée sur le substrat jusqu'à obtention de la force préétablie (souvent $< 1nN$) (A II). Après un temps de contact variant de 0 à 20 minutes, la pointe est rétractée de la surface (flèches bleues), et une courbe force-distance est enregistrée. Cette courbe correspond à la signature de l'adhésion cellulaire. Avec l'augmentation de la traction sur la cellule, les liens qui ont été formés entre la cellule et la pointe se rompent séquentiellement (A III) jusqu'à ce que la pointe soit complètement séparée de la cellule (A IV). Durant la séparation de la pointe et de la cellule, 2 types de détachements moléculaires peuvent se produire. Dans un premier temps le récepteur reste accroché au cortex cellulaire et se détache au fur et à mesure que la force augmente (« jumps » sur l'enregistrement). Le second type de détachement se produit lorsque l'attache au récepteur est rompue et les liens à la membrane sont étirés (« theters » sur l'enregistrement). Dans la courbe force-distance, ces derniers types de détachement se caractérisent par de longs plateaux. [Helenius 2008]

Ainsi dans la MEC, il a été montré que des forces pouvaient induire le dépliement de certains domaines de la fibronectine [Krammer 1999]. Cet événement peut à son tour démasquer certains sites permettant l'accroche et la signalisation de récepteurs cellulaires. De la même façon, il a été montré que des facteurs de croissance se liant à la MEC tel que le TGF-β peuvent être activés et libérés par l'intermédiaire de forces mécaniques et ainsi déclencher la signalisation cellulaire [Wipff 2007].

Les intégrines sont à la base de structures appelées adhésions focales (AFs). Ces AFs se forment lorsque les intégrines, activées par leur association avec certaines protéines de la MEC par leur partie extracellulaire, recrutent de nombreuses protéines par leur partie intracellulaire, permettant à ces récepteurs de se connecter avec le cytosquelette. Le dernier recensement fait état de plus de 180 protéines pouvant s'associer aux intégrines dans les AFs. Ces différentes protéines constituent « l'adhesome » des intégrines [Zaidel-Bar 2010]. Cet adhesome est constitué de protéines du cytosquelette, de protéines adaptatrices et de protéines de signalisation telles que les kinases, phosphatases, phospholipases et des régulateurs des GTPases. Cet assemblage moléculaire complexe induit des voies de signalisation qui permettent de réguler la dynamique des AFs, de contrôler l'intégrité entre les intégrines et les filaments d'actine. Tout ceci organise le cytosquelette d'actine ce qui va aboutir au contrôle de la migration cellulaire.

Différentes voies de signalisation modulent la maturation des AFs. Lors de leur maturation, la taille des AFs augmente et leur composition se modifie. A la suite de quoi, les AFs se stabilisent ou commencent à se désassembler. En fonction de leur taille (0.1-10 μm^2) et de leur localisation, les AFs peuvent être classifiées en adhésions naissantes, complexes focaux ou AFs (Fig 1.19). Les adhésions naissantes s'assemblent juste après que les intégrines aient interagi avec la MEC au bord du lamellipode. Elles peuvent alors se renouveler pendant la protrusion du lamellipode ou évoluer en complexes focaux à l'intérieur du réseau d'actine. A l'interface lamellipode-lamelle, ces adhésions grandissent et constituent les AFs connectés aux faisceaux d'actine (fibres de stress) qui permettent d'accrocher la cellule à la MEC.

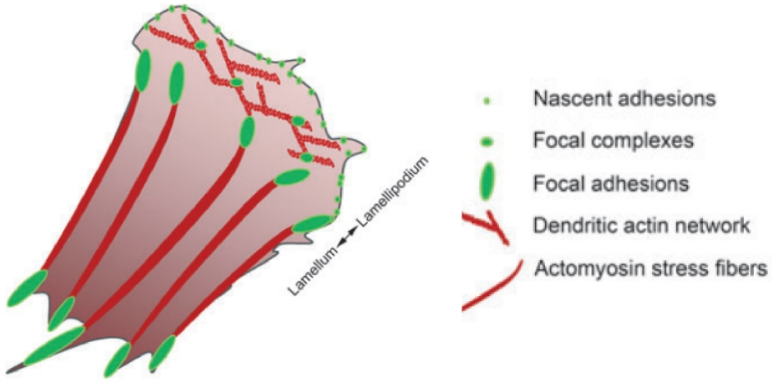


Figure 1.19 – Représentation schématique des structures du cytosquelette d'actine et des adhésions focales (AFs). La maturation des AFs est couplée avec l'organisation spécifique du cytosquelette d'actine. [Kuo 2013]

Cette maturation peut être stimulée par des signaux biochimiques ou physiques. Les régulateurs biochimiques de la maturation des AFs incluent les GTPases de la famille Rho qui sont à l'origine de signaux capables de réguler l'assemblage et la dynamique des AFs [Parsons 2010]. Il a été montré que la formation des complexes focaux est déclenchée par l'activité de la petite GTPase Rac1 [Nobes 1995] tandis que la signalisation de RhoA est à la base de la formation de AFs stables suite à l'activation de l'activité contractile de l'actomyosine [Ishizaki 1997]. RhoA lié à la GTP active sa cible ROCK qui accroit la contractilité liée à la myosine II en inhibant sa chaine légère phosphatase et phosphorylant directement la chaine légère de régulation de la myosine II (MLC). La force contractile générée par la myosine II peut alors conduire à la maturation des AFs [Helfman 1999]. La tension générée par la contractilité de l'actomyosine est également modifiée par la rigidité de la MEC qui peut en retour moduler les forces exercées par les cellules comme nous l'avons vu dans la section 1.2.1.1. Les AFs sont donc de petits mécano-senseurs dont la composition varie en fonction de l'état de maturation. En fait, la composition protéique des AFs est déterminée par les forces mécaniques qui s'appliquent localement. Le recrutement des protéines au niveau des AFs s'effectue de façon hiérarchisée par un certain nombre de protéines mécanosensibles [Sawada 2006]. Les récentes avancées de la microscopie super-résolution ont permis de caractériser les différentes strates composants les AFs : une première strate contient des protéines mécanosensibles comme la taline et la vinculine, puis une seconde strate est composée de régulateurs de l'actine composée de protéines telles que la zyxine et VASP (vasodilator stimulating phosphoprotein) ainsi que l'α-actinine qui accroche les adhésions focales au cytosquelette d'actomyosine (Fig 1.20).

Ces protéines d'échafaudage sont capables de connecter physiquement les intégrines au

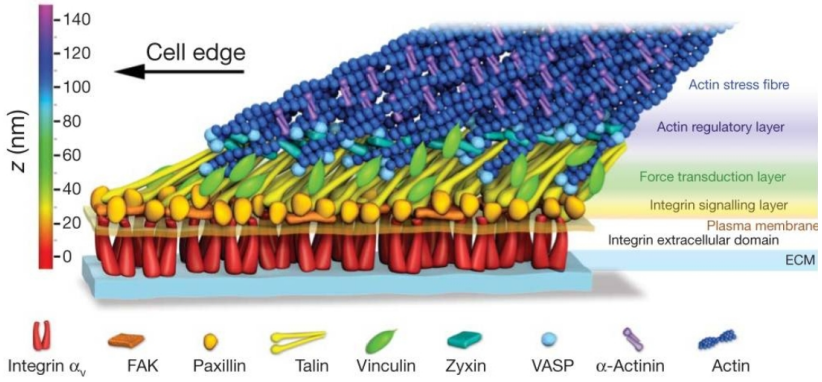


Figure 1.20 – Modèle schématique de l'architecture nanométrique des adhésions focales. [Kanchanawong 2010]

cytosquelette d'actine via des interactions directes ou indirectes. En réponse aux forces mécaniques, ces protéines mécanosensibles peuvent subir des changements de conformation ou des modifications enzymatiques qui changent leur affinité pour d'autres protéines des AFs ce qui à son tour modifie l'association des protéines avec les AFs. La taline, la paxiline et P130 peuvent notamment être dépliées en présence de forces exposant des sites de phosphorylation masqués en l'absence de forces [del Rio 2009], [Sawada 2006]. La deuxième catégorie de protéines de AFs est constituée des protéines de régulation qui contrôlent les connexions qui s'établissent entre les intégrines et les filaments d'actine à travers leur capacité à moduler l'activité, la stabilité ou la fonctionnalité des protéines d'échafaudage.

En conclusion, les AFs, en réponse à des forces mécaniques, réorganisent leur composition protéique selon une cascade hiérarchisée qui assemble les AFs dans différents états de maturité. Le modèle qui émerge de ces différentes études est représenté sur la figure 1.21. Dans les adhésions focales, certaines protéines sont présentes en quantité similaire dans les adhésions matures et immatures, indiquant qu'elles ne sont pas sensibles aux forces. A l'inverse, d'autres protéines des AFs sont sensibles aux forces et présentent une régulation positive ou négative en réponse à des forces mécaniques. Ces forces peuvent altérer l'abondance des AFs, leur conformation ou leur activité enzymatique modifiant l'association des AFs avec d'autres protéines des AFs ce qui, en retour, modifie leur état de maturité. Dans les AFs immatures, les protéines mécanosensibles et les protéines régulatrices transmettent des signaux de manière coordonnée pour provoquer une polymérisation dendritique de l'actine et la formation de AFs immatures requises pour la protrusion membranaire. En réponse à des forces mécaniques, les protéines mécanosensibles des AFs immatures sont régulées négativement et leur abondance dans les AFs diminue. L'évaluation de l'équilibre des forces locales permet alors d'initier des réponses différentes selon les environnements rencontrés par une cellule donnée .

1.2.2 Forces et mécanotransduction au sein d'une architecture multi-cellulaire

Alors que les connaissances sur la transmission des forces et la mécanotransduction au niveau des adhésion cellules/matrice commencent à être bien documentées, l'étude de la contribution des forces mécaniques à l'établissement des jonctions intercellulaires et au remodelage des tissus en est a ses débuts.

L'idée que les jonctions adhérentes puissent être le siège de la mécanotransduction a long-

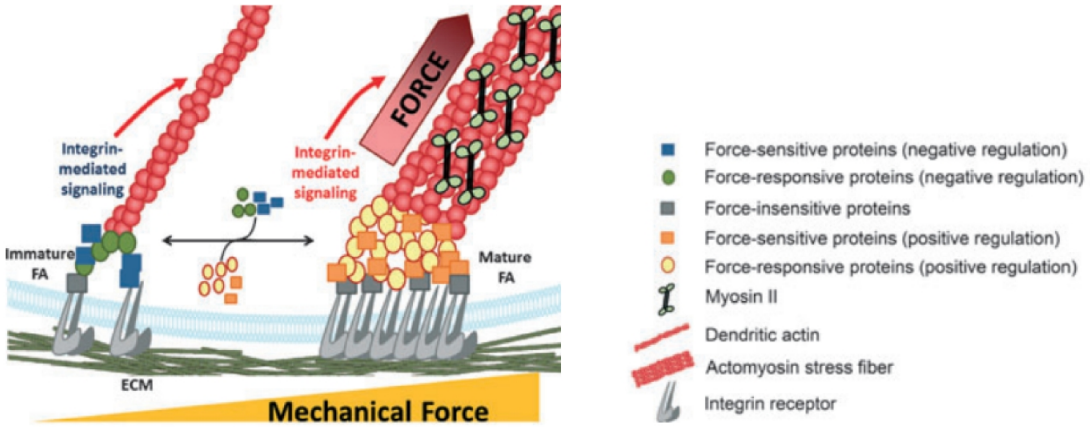


Figure 1.21 – Évolution de la composition protéique des AFs en réponse à des forces mécaniques. En réponse à des forces mécaniques, de nouvelles protéines viennent renforcer les adhésions focales. Les protéines insensibles aux forces (carré gris) ont des niveaux d'abondance similaire entre les AFs matures et immatures. [Kuo 2013]

temps été suspecté mais les études sur le sujet sont relativement récentes [Smutny 2010]. En effet les jonctions adhérentes lient les cytosquelettes de cellules adjacentes via des groupements de cadhérines, et sont donc bien placées pour jouer un rôle de mechano-senseur dans les architectures multicellulaires. Cette hypothèse a été renforcée par différentes études qui ont montré que la contractilité cellulaire était un prérequis à la formation des jonctions adhérentes [Brevier 2008], [Schwartz 2008].

1.2.2.1 Impact des forces sur les jonctions adhérentes

Comme pour les adhésions cellules/matrice, les études se sont concentrées sur la composition et la morphologie des jonctions adhérentes en réaction à l'application de forces externes ou à l'augmentation de la contraction du complexe d'acto-myosine [le Duc 2010], [Liu 2010], [Smutny 2010].

Le Duc et al. ont utilisé des pinces magnétiques pour manipuler des billes recouvertes de fragments recombinants de E-cadhérine avant de les mettre en contact avec la surface de cellules F9. Après que les fragments de E-cadhérine recombinants greffés sur les billes se soient liées aux cadhérines présentes à la surface des cellules F9, les billes ont été soumises à un champ magnétique pour générer des forces. En mesurant le déplacement des billes en réponse aux forces appliquées, il a été possible de calculer localement les changements de rigidité opérant au niveau des contacts cadhérine/cadhérine et induits par les forces appliquées. Il a ainsi pu être montré que la rigidité des contacts E-cadhérine recombinante/cellules F9 augmente avec l'application de forces externes. Il a également été observé que la réponse à ces forces est réduite dans les cellules déficientes en vinculine, démontrant ainsi le rôle important de cette protéine dans les mécanismes de mécanotransduction au niveau des jonctions adhérentes.

Liu et al. ont pour leur part observé que la longueur des jonctions adhérentes et les forces intercellulaires de cellules endothéliales augmentent ou diminuent respectivement avec l'activation ou l'inhibition de la myosine II [Liu 2010].

Ces études ont permis de montrer l'existence de mécanismes de renforcement des adhésions au niveau des jonctions intercellulaires comme cela avait été observé au niveau des adhésions focales.

1.2.2.2 Mesure des forces intercellulaires

Une des premières méthodes utilisée pour tenter de quantifier les forces intercellulaires a été la méthode des micropipettes. Il s'agit de manipuler des cellules individuelles en suspension par des micropipettes pour former des doublets de cellules adhérentes. Deux cellules maintenues au bout de micropipettes sont mises en contact (Fig 1.22). Le paramètre mesuré est la force nécessaire pour séparer les 2 cellules en contact. Après quelques secondes de contact, la force de séparation des cellules a été estimée à quelques nN. Cette force de séparation augmente linéairement avec le temps de contact jusqu'à atteindre un plateau autour de 225 nN après 1h de contact [Chu 2004].

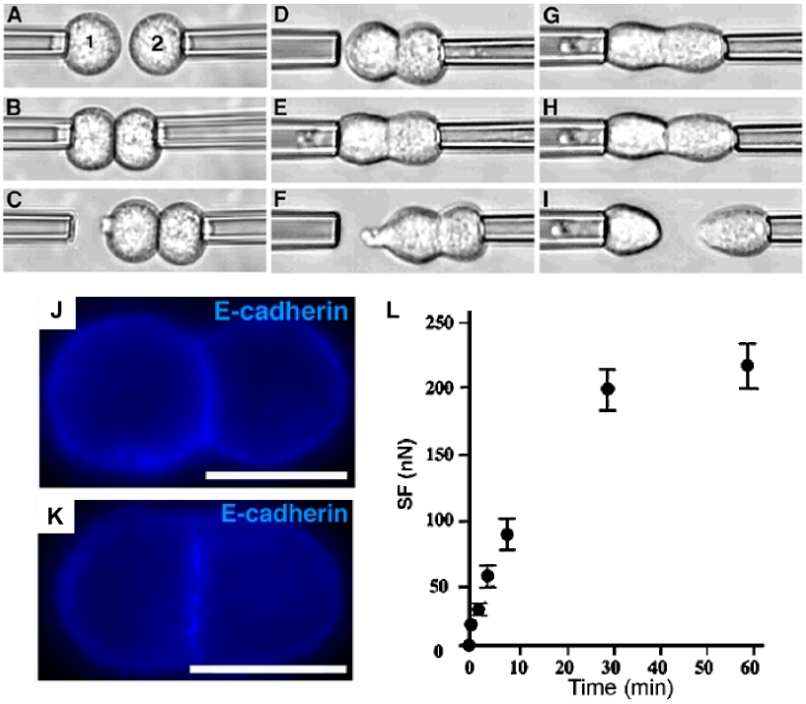


Figure 1.22 – Mesure des forces intercellulaires à l'aide de la méthode des micropipettes. (A,B) 2 cellules maintenues par une faible aspiration à l'extremité de micropipettes sont mises en contact. (C) La formation du contact intercellulaire est contrôlé après déplacement de la pipette de droite. (D) La 2ème cellule est maintenue contre la micropipette avec une forte aspiration (E-I) La première cellule est maintenue par la micropipette et l'aspiration est augmentée pendant que la micropipette de droite est déplacée pas à pas, jusqu'à ce que les cellules adhérentes se séparent. (J,K) Immunodétection de la E-cadhérine respectivement à 4 min et à 30 min après l'établissement du contact cellule-cellule.(L) Mesure de la force de détachement pour des cellules E-cadhérine maintenues en contact pendant 0.5 à 60 minutes [Chu 2004].

L'AFM a également été utilisée pour déterminer la force d'adhérence entre une cellule de mélanome et une monocouche de cellules endothéliales [Puech 2006]. Dans ce cas, le système expérimental est identique à celui décrit sur la figure 1.18, mais cette fois la pointe est fonctionnalisée avec une cellule plutôt qu'une protéine.

Une quantification des contraintes mécaniques s'exerçant entre 2 cellules étudiées en doublet a pu être obtenue en utilisant la technique des micropiliers et la TFM sur hydrogel [Liu 2010], [Maruthamuthu 2011]. Nous avons vu dans la section précédente que ces techniques permettent d'accéder aux forces transmises par les cellules à la matrice. Une valeur moyenne de force intercellulaire peut être extraite de la connaissance des forces cel-

lules/matrice en postulant l'équilibre mécanique entre les cellules du doublet. En effet les cellules étant considérées comme à l'équilibre sur la surface des substrats, la deuxième loi de Newton impose que la somme des forces de traction exercées par les cellules soit nulle. La force intercellulaire moyenne est donc obtenue en calculant la somme des forces de traction intégrée sous chaque cellule (Fig 1.23). A l'aide de ce raisonnement, Maruthamuthu et al. ont mesuré des forces intercellulaires de l'ordre de $100nN$ (environ 2 fois plus faibles que les forces de traction) s'exerçant perpendiculairement à la jonction d'un doublet de cellules épithéliales sur un gel de 8.4 kPa. Ces forces se sont révélées stables dans le temps malgré les fluctuations significatives de la taille des jonctions intercellulaires et de la morphologie cellulaire.

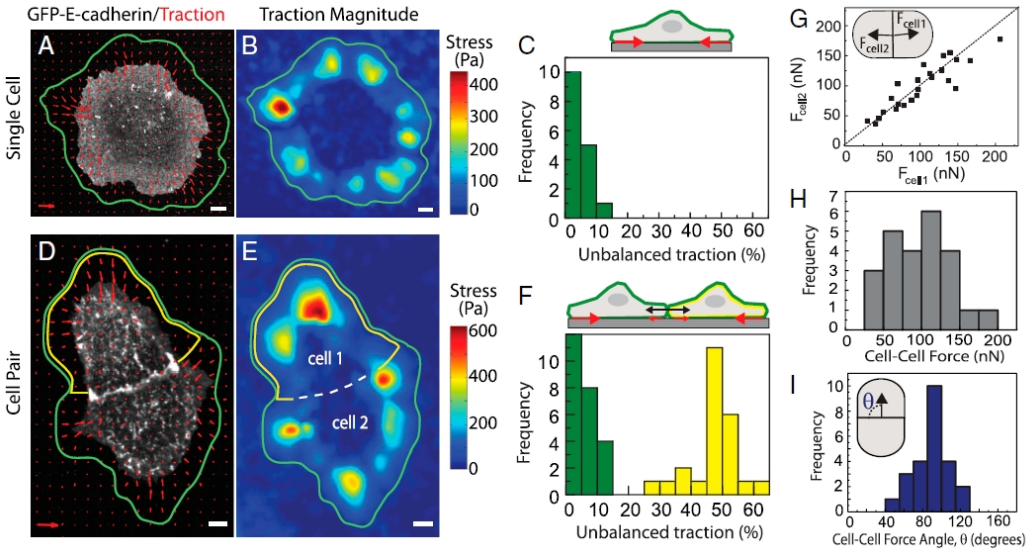


Figure 1.23 – L'équilibre des forces de traction permet d'accéder aux forces intercellulaires. (A,D) Cellules MDCK exprimant la E-Cadhérine-GFP sur lesquelles sont superposées les forces de traction (flèche rouge). La ligne verte indique la région utilisée pour calculer la somme des forces de traction. L'amplitude des contraintes est indiquée par les flèches rouges. (B,E) Cartes des amplitudes des forces de traction correspondant respectivement aux images A et D. (C,F) Histogramme des forces de traction non contrebalancées pour des cellules uniques exprimé en pourcentage pour le doublet ou une cellule du doublet (nombre de cellules uniques=16) et pour des doublets de cellules (nombre de doublets cellulaires=24). Les contours des régions utilisées pour calculer l'équilibre des forces à l'intérieur du doublet ou pour une seule cellule sont indiqués respectivement par les lignes vertes et jaunes. (G) Force exercée par la cellule 2 sur la cellule 1. (H) Histogramme des forces cellules-cellules, moyenne= 100 +- 40 nN. (I) Histogramme de l'angle entre les forces cellules-cellules et la ligne matérialisant le contact intercellulaire, moyenne= $88 + -18^{\circ}$ [Maruthamuthu 2011].

1.2.2.3 Mesure de contractilité

Le raisonnement simple qui peut être appliqué pour calculer les forces intercellulaires d'un doublet de cellules en TFM devient difficilement applicable à l'échelle d'une monocouche cellulaire. Plutôt que de chercher à calculer les forces appliquées au niveau de chaque jonction intercellulaire, Tambe et al ont mis au point une méthode permettant de calculer les contraintes internes qui s'appliquent à l'intérieur d'une monocouche cellulaire. Avec cette méthode que nous décrivons plus en détail dans le chapitre 4, Tambe et al ont pu cartographier les contraintes intracellulaires de monocouches épithéliales (MDCK) et endothéliales (RPME) en croissance. La conclusion de cette étude est que les contraintes mécaniques à l'interieur des monocouches cellulaires fluctuent fortement, émergent spontanément et ondulent à travers

les monocouches. Il a également été observé que la migration cellulaire suivait l'orientation locale de contrainte maximale.

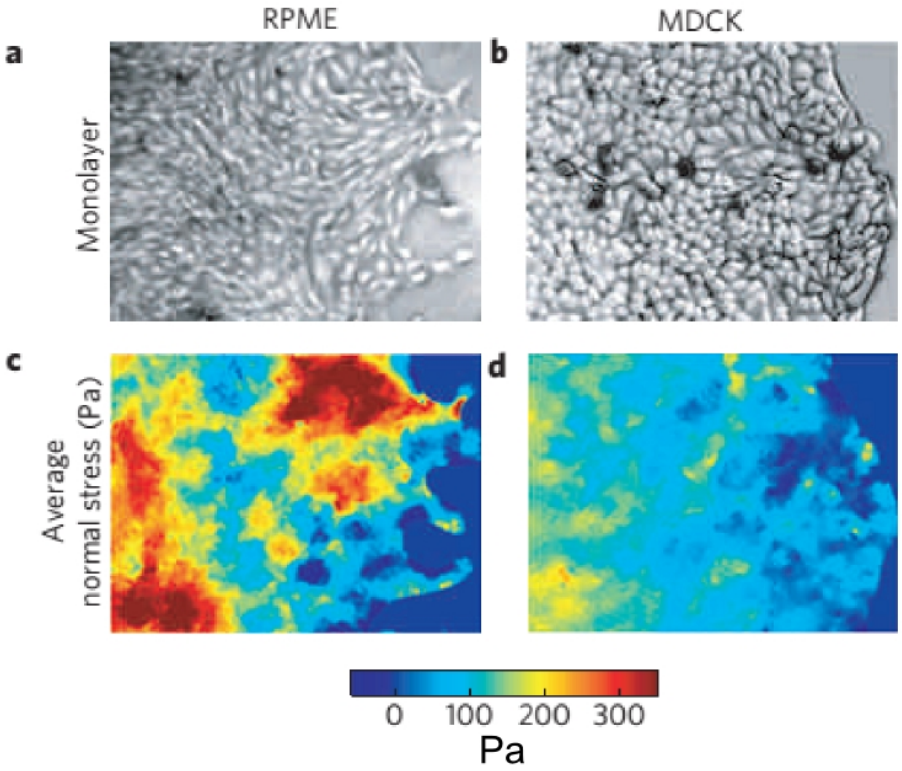


Figure 1.24 – Contraintes intracellulaires de monocouches en migration collective. (a,b) Images en transmission de monocouches de cellules RPME et MDCK respectivement avec (c,d) les cartes de contraintes intracellulaires moyennes associées. La taille verticale des images des monocouches est de 545 μm pour les RPME et 410 μm pour les MDCK. [Tambe 2011]

En biologie, la mesure de la contractilité cellulaire est réalisée en utilisant des méthodes moléculaires quantifiant l'expression de protéines spécifiques comme le moteur moléculaire myosine II ou les voies de signalisations comme Rho ou Rock qui contrôlent son activation [Burridge 1996], [Twiss 2013].

Une avancée importante de ces méthodes moléculaires, a été la mise au point de capteurs protéiques **FRET**(Förster resonance energy transfer), qui permettent de cartographier la tension à laquelle sont soumises des protéines ciblées [Borghi 2012], [Grashoff 2010], [Conway 2013]. Ces capteurs de tension sont construits en insérant dans une protéine cible un lien élastique entre 2 fluorophores qui peuvent émettre un signal FRET (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes) lorsque la protéine n'est soumise à aucune tension. Ainsi ces constructions sont réalisées de façon à ce que la mise sous tension de la protéine éloigne les fluorophores ce qui a pour conséquence de diminuer le signal FRET (Fig 1.25-B). La tension à laquelle est soumise la protéine est alors mesurable à l'aide d'un indice FRET (Fig 1.25-C). Cet indice a été préalablement calibré en mesurant la fluorescence FRET émise par le module de tension lorsque celui ci est étiré/relâché par des pinces magnétiques. Le module de tension est construit pour être sensible à des forces de l'ordre du pN, ce qui correspond aux estimations faites de la tension qui s'exerce sur les molécules au niveau des jonctions adhérentes ou

des contacts focaux à l'aide de la techniques de microscopie à traction de force.

Borghi et al. ont mis au point un capteur FRET sur la E-cadherin dans des cellules MDCK pour vérifier l'hypothèse que des forces sont directement transmises via les cadhérines. Avec leur construction, ils montrent que les E-cadhérines sont soumises à des forces de l'ordre du pN et que cette tension ne peut s'exercer qu'en présence du domaine de liaison de la E-cadherine pour la β-caténine. De façon plus surprenante, ils observent que la E-cadhérine est également sous tension au niveau de la membrane plasmique en dehors des contacts intercellulaires. Conway et al, ont développé le même type de construction sur la VE-cadhérine exprimée dans des cellules BAEC. Ils ont observé qu'il existe une tension significative dépendante de la myosine II au niveau des jonctions intercellulaires mais n'en détectent pas en dehors des jonctions.

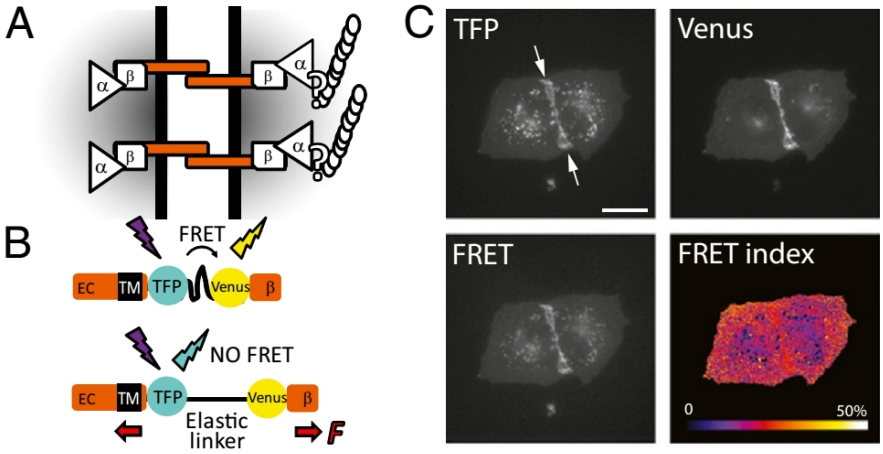


Figure 1.25 – (A) Modèle schématique d'une jonction intercellulaire à base de E-cadhérine. La E-cadhérine transmet, via sa partie extracellulaire, une tension mécanique au cytosquelette d'actine à travers la β-caténine, l'α-caténine et possiblement d'autres protéines. (B) Le module sensible à la tension (TSMod) est constitué de la paire de FRET mTFP/Venus et d'un lien élastique (GPGGA) dérivé de la soie d'araignée. TSMod a été inséré dans le domaine cytoplasmique de la E-cadhérine où il peut sonder les forces transmises entre le domaine transmembranaire et le domaine β de la β-caténine. Plus l'indice de FRET est élevé plus la tension correspondante est élevée. (C) Imagerie en fluorescence de 2 cellules adhérentes MDCK exprimant la construction EcadTSMod en mTFP, Venus, et FRET (excitation mTFP, émission Venus), avec la carte d'index de $FRET = I_{FRET}/(I_{FRET} + I_{mTFP})$, avec I désignant l'intensité de fluorescence correspondant aux différents indices corrigés du bruit de fond. Échelle : 20 μm [Borghi 2012].

1.2.2.4 Lien entre adhérences cellules/matrice et adhérence cellules/cellules

Les adhérences intercellulaires et les adhérences cellules/matrice sont des structures bien différenciées, les premières à base de cadhérines et les secondes à base d'intégrines, mais toutes les deux sont connectées au cytosquelette d'actomyosine. Depuis une dizaine d'années, plusieurs études se sont intéressées au dialogue pouvant exister entre intégrines et cadhérines [Huttenlocher 1998], [Marsden 2003], [Yano 2004].

Les micropipettes ont à nouveau été utilisées pour caractériser l'éventuelle interdépendance entre adhérence cellule/cellule et adhérence cellule/matrice. Martinez Rico et al. ont montré que la force nécessaire pour séparer un doublet de cellules augmente fortement lorsque les cellules du doublet ont développé des interactions avec un composant de la matrice ex-

tracellulaire comme la fibronectine où la vitronectine via les integrines, par rapport à une situation ou seules existent des interactions intercellulaires [Martinez-Rico 2010].

La distribution des forces de traction cellule/matrice en fonction de la maturité des jonctions intercellulaires a également fait l'objet d'études [Maruthamuthu 2011], [Mertz 2013]. Alors que pour des cellules faiblement ou non engagées dans des adhésions intercellulaires les forces de traction sont localisées sur la périphérie des cellules, les forces de traction diminuent fortement, jusqu'à devenir pratiquement indétectables au niveau des contacts intercellulaires (Fig 1.26 et Fig 1.23).

Ces différentes études montrent qu'il existe bien un lien entre les forces qui s'exercent au niveau des adhérences cellules/matrice et cellules/cellules même si la nature de ce lien (mécanotransduction liée aux connexions des deux types d'adhésions au cytosquelette d'actomyosine, ou signalisation biochimique) n'est pas encore élucidé.

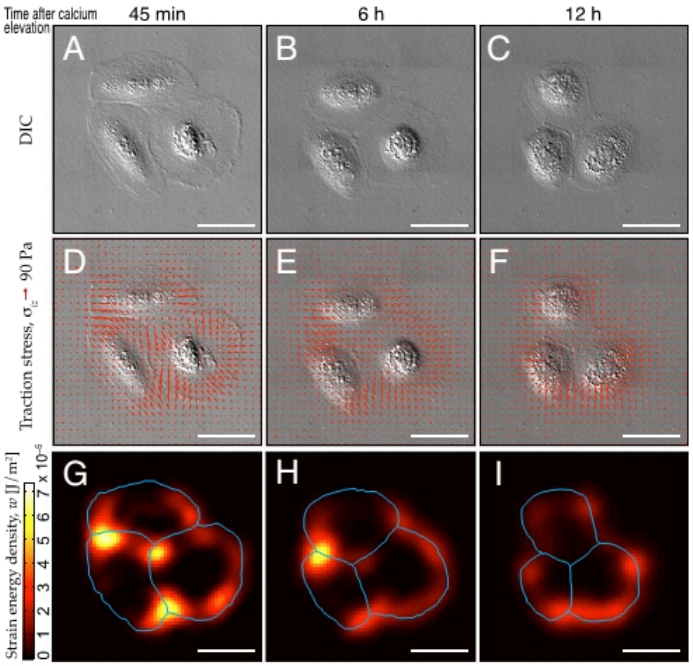


Figure 1.26 – Distribution des forces de traction en fonction de la stabilité des jonctions intercellulaires. (A-C) Images en contraste interférentiel (DIC) d'un îlot de keratinocytes de souris 45 min (A), 6 h (B), et 12 h (C) après élévation du calcium (les forces de traction se réorganisent dynamiquement dans un milieu chargé en calcium). (D-F) Distribution des forces de traction (flèches rouges). (G-I) Distribution de la densité d'énergie des contraintes [Mertz 2013].

1.3 Architecture moléculaire des jonctions adhérentes interendothéliales

Dans la section précédente nous avons vu que les cellules possèdent des structures leur permettant de s'adapter à leur environnement mécanique. Ainsi, les cellules peuvent renforcer ou diminuer leur attachement à la matrice extracellulaire en régulant la composition protéique de leurs AFs. L'étude de la mécanotransduction au niveau des jonctions adhérentes en est à ses débuts mais il y a de nombreuses raisons de penser que ces structures adhésives sont le siège de mécanismes similaires à ceux rencontrés dans les AFs. En effet certaines protéines impliquées dans la mécanotransduction des AFs comme la vinculine sont également présentes au niveau des jonctions adhérentes. De plus, l'application de forces externes au niveau des jonctions adhérentes provoque leur renforcement comme cela a été observé pour les AFs.

1.3.1 La VE-cadhérine

Comme nous l'avons brièvement vu dans la section 1.1.3.1, ce sont les cadhérines qui, au niveau des jonctions adhérentes, permettent aux cellules d'adhérer les unes aux autres. Leur nom dérive de "**CA**lcium **DE**pendent adhesion", adhérence dépendante du calcium. En effet, l'absence de calcium induit une perte de l'activité adhésive et une forte sensibilité aux protéases [Baumgartner 2000],[Nagar 1996]. Les cellules endothéliales expriment la **VE**-cadherine (cadhérine de l'**E**ndothelium **V**asculaire) et la N-cadhérine à des niveaux comparables mais dans la plupart des cas la VE-cadhérine est localisée au niveau des contacts intercellulaires alors que la N-cadhérine, non spécifique des cellules endothéliales, est exclue de ces structures lorsque le VE-cadhérine y est localisée [Navarro 1998]. La VE-cadhérine est donc un marqueur idéal des adhérences intercellulaires et est l'homologue de la E-cadhérine des cellules épithéliales.

D'un point de vue structurel, la VE-cadhérine est composée d'une partie extracellulaire, d'une partie transmembranaire, et d'une partie intracellulaire. La partie extracellulaire de la VE-cadhérine est composée de 5 domaines (une caractéristique partagée par toutes les cadhérines classiques) et est responsable de l'adhésion homophilique entre 2 cellules via la formation d'un dimère à partir des monomères situés à la surface de chacune des cellules [Brasch 2011]. La partie intracellulaire de la VE-cadhérine possède un domaine juxtamembranaire et un domaine d'interaction en position C-terminale qui servent de sites de liaison pour la p120-caténine d'une part et la β-caténine ou la plakoglobine (ou γ-caténine) d'autre part (Fig 1.27). Ces caténines peuvent à leur tour se lier à de nombreux partenaires intracellulaires pour assurer différentes fonctions de signalisation et de stabilisation des jonctions en particulier via des interactions avec le cytosquelette.

1.3.2 La connexion cytosquelette/jonction adhérente

1.3.2.1 Le rôle de la tension dans l'architecture des jonctions adhérentes

La VE-cadhérine n'interagit pas de manière directe avec le cytosquelette d'actine mais par l'intermédiaire de partenaires dont le premier maillon est la β-caténine (et plus rarement la γ-caténine). Le deuxième acteur de ce complexe situé entre la VE-cadhérine et le cytosquelette d'actine est l'α-caténine, qui possède une domaine d'interaction direct pour la

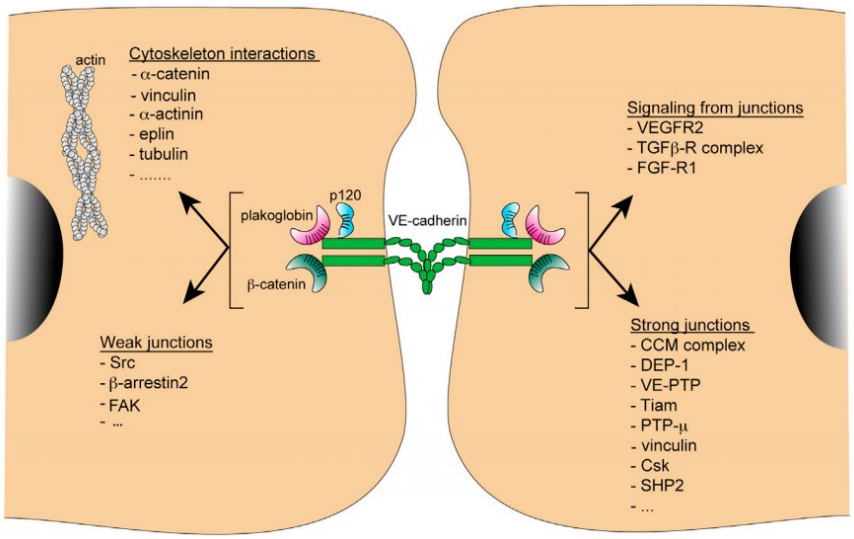


Figure 1.27 – Les nombreuses fonctions des jonctions adhérentes dans les cellules endothéliales. L'organisation des jonctions adhérentes est maintenue par le VE-Cadhérine qui est liée, via son domaine cytoplasmique, à la caténine-p120, la β-caténine ou la plakoglobine. Ces protéines s'assemblent en divers complexes qui ont des fonctions différentes de signalisation, stabilisation des jonctions ou d'interaction avec le cytosquelette [Giannotta 2013].

β-caténine et la γ-caténine [Nieset 1997].

Jusqu'en 2005, la principale fonction attribuée à l'α-caténine, était de constituer un lien direct entre le complexe cadhérine/β-caténine/α-caténine et le cytosquelette d'actine pour maintenir l'intégrité tissulaire. Cependant, ce concept a été remis en question par des études *in vitro* montrant que l'α-caténine ne peut se lier simultanément à la β-caténine et à l'actine [Yamada 2005], [Drees 2005]. D'après ces derniers auteurs, dans les cellules, l'α-caténine existe sous forme de monomères ou de dimères, les deux formes ayant des propriétés différentes. L'α-caténine monomérique, est la forme rencontrée au niveau des jonctions adhérentes puisqu'elle interagit préférentiellement avec le complexe E-cadhérine/β-caténine, tandis que la forme dimérique est cytoplasmique et s'associe avec les filaments d'actine [Drees 2005].

Si la connexion directe entre l'α-caténine dans sa forme monomérique et les filaments d'actine est remise en cause par les expériences précédentes, il existe des protéines intermédiaires connues pour interagir à la fois avec l'α-caténine et les filaments d'actine. Parmi ces protéines, on trouve la vinculine, l'α-actinine , l'EPLIN, l'afadine, ZO-1 et la formine.

En 2010, une explication à la différence de résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* a été apportée par les travaux de Yonemura. Cette étude montre que l'α-caténine oscille entre une forme repliée et une forme dépliée. L'α-caténine adopte une forme dépliée lorsqu'elle est soumise à une tension. La forme dépliée est acquise lorsque l'α-caténine est soumise à la tension de l'actomyosine. Ceci démasque un site de liaison pour la vinculine qui lie à son tour les filaments d'actomyosine [Yonemura 2010]. L'α-caténine se lie aux filaments d'actine via sa région C-terminale ou via des partenaires indirects. Ces résultats montrent qu'il existe un mécanisme de mécanotransduction au niveau des jonctions intercellulaires, avec un recrutement de protéines au niveau de l'α-caténine qui dépend de la tension exercée par le cytosquelette d'actomyosine.

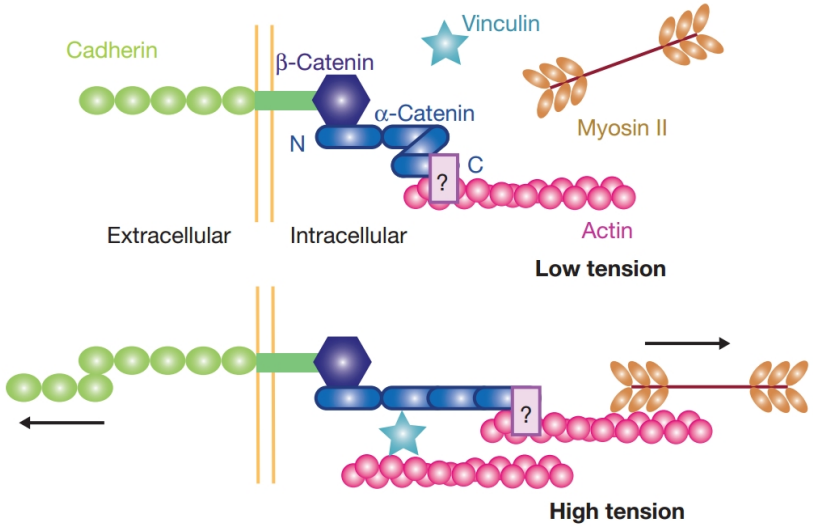


Figure 1.28 – Modèle de recrutement "force-dépendant" de la vinculine par l'α-caténine. N et C représentent respectivement les parties N et C terminales de l'α-caténine. L'α-caténine oscille entre une forme repliée et une forme dépliée en fonction de la tension à laquelle elle est soumise. La forme dépliée démasque un site de liaison pour la vinculine qui lie à son tour les filaments d'actomyosine. Un possible liant intermédiaire inconnu est représenté par le point d'interrogation [Yonemura 2010].

1.3.2.2 EPLIN : à l'interface entre complexe adhérent et cytosquelette d'actine

Au laboratoire BCI, les résultats de Chervin et al. suggèrent que dans les cellules endothéliales, EPLIN (Epithelial Protein Lost in Neoplasm) transmet la tension exercée par l'actomyosine à l'α-caténine. Ceci entraine un changement de conformation de l'α-caténine qui devient capable de recruter la vinculine [Chervin-Petinot 2012].

Au sein du laboratoire BCI, l'étude de la protéine EPLIN a été initiée suite aux travaux de l'équipe de Takeichi, en 2008, qui a montré que l'EPLIN s'associe à la fois au complexe E-cadhérine/β-caténine et le cytosquelette d'actine dans les cellules épithéliales [Abe 2008].

Après avoir montré qu'EPLIN s'exprime dans les cellules endothéliales à des niveaux comparables à celui observé dans les cellules épithéliales, Chervin et al. ont montré qu'EPLIN établit un lien entre l'α-caténine et les filaments d'actine. Lorsque l'expression d'EPLIN est bloquée par siRNA (petit ARN interférant), la vinculine se délocalise des jonctions adhérentes vers les contact focaux (Fig 1.29-A). De plus, l'inhibition de la contractilité de l'actomyosine à l'aide de la blebbistatine, provoque une délocalisation similaire. Ceci suggère qu'EPLIN joue un rôle dans le changement de conformation de l'α-caténine et par conséquent dans le recrutement de la vinculine. Ce recrutement de la vinculine au niveau des jonctions inter-endothéliales renforce les liens entre le complexe VE-cadhérine/caténine et le cytosquelette d'actine. Enfin la reconstitution d'un réseau vasculaire en matrice de Matrigel, à partir de cellules endothéliales déplétées en EPLIN, montre une capacité réduite des cellules à former un réseau pseudocapillaire. De nombreuses cassures apparaissent dans le réseau montrant le rôle essentiel d'EPLIN dans la stabilisation des structures capillaires dans un modèle d'angiogenèse *in vitro* (Fig 1.29-B). Ces résultats ont donné lieu à un nouveau modèle du complexe liant la VE-cadhérine au cytosquelette d'actine (Fig 1.30).

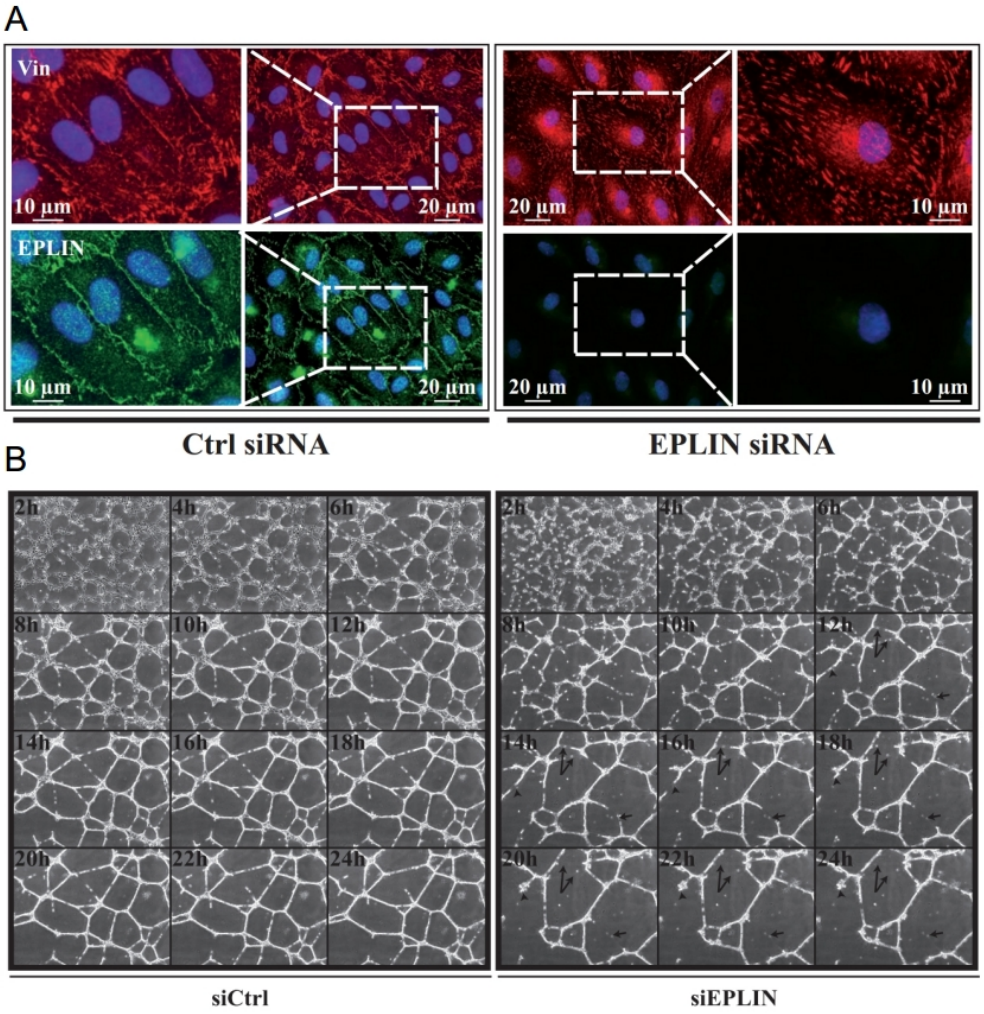


Figure 1.29 – (A) Impact de l'abrogation de l'expression d'EPLIN. 24h après un traitement avec le siRNA EPLIN, la vinculine est localisée au niveau des adhésions focales alors qu'en présence de siRNA ctrl, elle se trouve au niveau des jonctions intercellulaires. (B) Effet de l'abrogation d'EPLIN sur la formation de tubules *in vitro*. Images en contraste de phase de la formation de réseaux vasculaires à base d'HUVECs prétraitées avec un siRNA EPLIN ou ctrl. 24h après la transfection, les HUVECs ont été ensemencées sur matrice de Matrigel et filmées pendant 24h. Le nombre de cassures des structures du réseau est 2 fois plus élevé lorsque l'expression d'EPLIN est abrogée [Chervin-Petinot 2012].

1.3.2.3 Mécanique des jonction adhérentes

Les études récentes tendent donc à montrer que les jonctions interendothéliales peuvent être considérées, de la même façon que les adhésions focales, comme des structures mécanosensibles dont la composition protéique est modifiée en réponse à une tension mécanique. D'autre protéines sont connues comme s'associant aux filaments d'actine au niveau des jonctions adhérentes, notamment l'α-actinine. Le laboratoire BCI développe actuellement des outils de biologie moléculaire comme des siRNA ciblant ces protéines de façon à préciser leur rôle dans les processus de mécanotransduction au niveau de la jonction adhérente interendothéliale. Ceci devrait permettre d'affiner le modèle précédemment proposé par Yonemura puis par Chervin en mettant en évidence le recrutement d'autres partenaires protéiques du complexe VE-cadhérine-β-caténine.

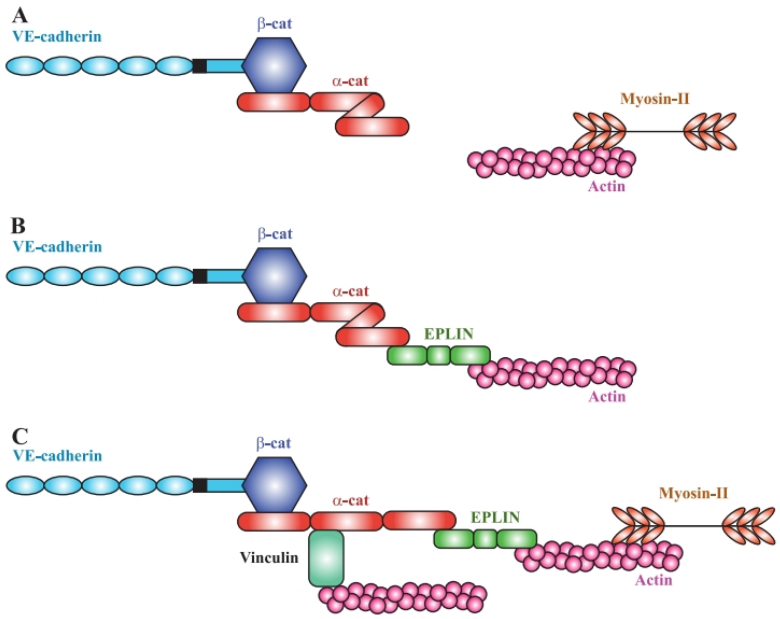


Figure 1.30 – EPLIN agit comme un mécanotransmetteur à la base du changement de conformation de l'α-caténine. (A) En l'absence d'EPLIN, la contractilité de l'actomyosine n'est pas transmise à l'α-caténine qui reste dans une conformation repliée et ne peut pas recruter la vinculine. (B) En présence de blebbistatine la contractilité de l'actomyosine est bloquée et l'*alpha*-caténine est maintenue dans sa conformation repliée ce qui l'empêche de se lier à la vinculine. (C) Lorsque la myosine II exerce son activité contractile, l'α-caténine se déplie ce qui permet le recrutement de la vinculine et ainsi l'accrochage des jonctions intercellulaires au cytosquelette d'actine [Chervin-Petinot 2012].

La mesure des forces s'exerçant au niveau des jonctions intercellulaires simultanément aux modifications protéiques des jonction adhérentes devrait permettre de préciser le rôle de la tension sur les modifications opérées. L'utilisation de drogues comme la blebbistatine permet de diminuer la contractilité de l'actomyosine mais celle ci s'effectue de façon globale et ne cible pas spécifiquement les jonctions adhérentes. C'est la raison pour laquelle l'utilisation de siRNA dirigés contre des protéines spécifiques des jonctions adhérentes, couplée à un système de mesure des forces cellulaires est un outil de choix pour l'étude de la mécanotransduction au niveau des jonctions intercellulaires. L'objectif de cette thèse est de développer un tel système pour permettre de mesurer les forces qui s'exercent au sein d'une monocouche endothéliale. ceci afin de caractériser mécaniquement le rôle des protéines engagées dans le complexe formé entre la VE-cadhérine et le cytosquelette d'actine.

Chapitre 2

Microsystème pour la mesure de la contractilité d'un tissu

Sommaire

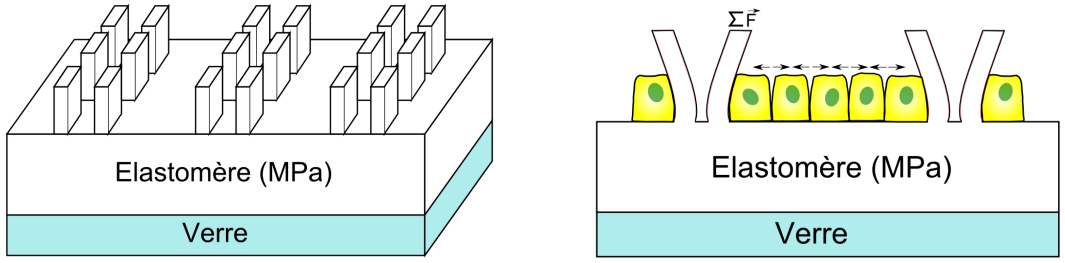
2.1 Présentation du système 39
2.1.1 Principe de fonctionnement 39
2.1.2 Dimensionnement du capteur 40
2.2 Microfabrication du système 43
2.2.1 Fabrication du moule 43
2.2.2 Moulage des canaux déformables 46
2.3 Mesure de contractilité 49
2.3.1 Fonctionnalisation des canaux 49
2.3.2 Capacité du système à mesurer la contractilité d'une monocouche 53

Les techniques actuelles permettent de mesurer, sous certaines conditions, le champ de traction que les cellules exercent sur leur matrice. Elles ont été brièvement introduites dans le chapitre précédent et seront largement traitées dans le chapitre 3. Il existe à l'heure actuelle une technique indirecte basée sur la mesure des efforts transmis à la matrice qui permet de mesurer la contractilité d'une monocouche [Tambe 2011]. Outre le fait que cette technique est mathématiquement très lourde, son résultat souffre de larges incertitudes liées aux filtrages successifs du bruit, ainsi que nous le discutons dans le chapitre 4. C'est pour tenter de palier cette difficulté que nous avons voulu développer un micro-système dont l'objectif serait de mesurer directement la contractilité au sein d'un endothélium reconstitué.

2.1 Présentation du système

2.1.1 Principe de fonctionnement

Nous proposons de réaliser un micro-capteur de forces constitué de canaux dont les parois sont déformables, ces canaux étant formés d'une rangée de piliers flexibles (Fig 2.1a). Le principe du capteur est de reconstituer *in vitro* une monocouche de cellules endothéliales à l'intérieur de ces canaux, et de mesurer la déformation de chacun des piliers qui les borde en résultat des forces exercées par la monocouche (Fig 2.1b). La déformation des parois des canaux donne en fait une estimation des forces contractiles moyennes internes à la monocouche. En effet, les cellules étant à l'équilibre au sein de la monocouche, celles qui bordent les piliers leur transmettent les forces contractiles exercées par l'ensemble de la monocouche.
La géométrie des canaux dépend de l'orientation moyenne des forces contractiles exercées par la monocouche cellulaire. Si les cellules s'avèrent exercer des forces essentiellement normales



(a) (b)

Figure 2.1 – (a) Représentation schématique de canaux déformables. (b) Vue en coupe du capteur de force montrant comment la contraction des cellules déforme les parois latérales des canaux.

à leurs jonctions intercellulaires, la mesure des forces normales aux parois des canaux permettra d'en évaluer l'amplitude. Celles ci pourront être obtenues en mesurant la déflexion de parois de canaux rectilignes. En revanche, si la contractilité cellulaire se traduit par des efforts tangentiels aux jonctions, celle-ci ne pourra être détectée que par l'utilisation de canaux dont les parois sont courbes (Fig 2.2).

Les 2 géométries de canaux ont été réalisées au cours de la thèse. L'objectif de notre étude était (i) de caractériser l'orientation des forces cellulaires par rapport aux jonctions intercellulaires, et (ii) de corréler la contractilité des monocouches endothéliales avec la composition protéique et la dynamique des jonctions interendothéliales.

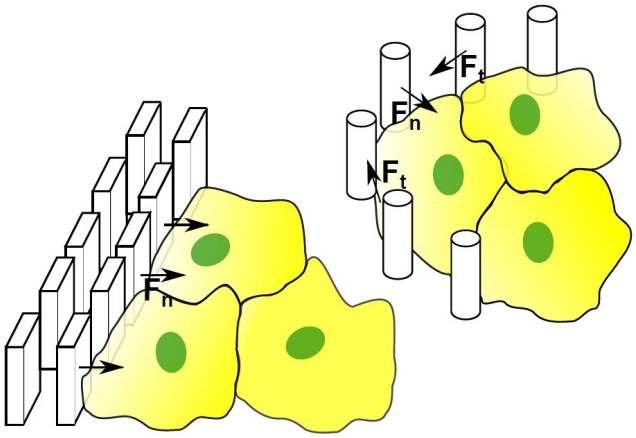


Figure 2.2 – Différentes géométries de canaux permettant l'accès à des forces normales et/ou tangentielles aux parois des canaux.

2.1.2 Dimensionnement du capteur

2.1.2.1 Estimation des déflexions attendues

La mesure des forces contractiles de la monocouche pourrait être obtenue en mesurant la déflexion des piliers. Cette évaluation nécessite de faire une hypothèse sur la distribution des forces le long des piliers. Ici nous avons fait l'hypothèse qu'il existe une distribution homogène

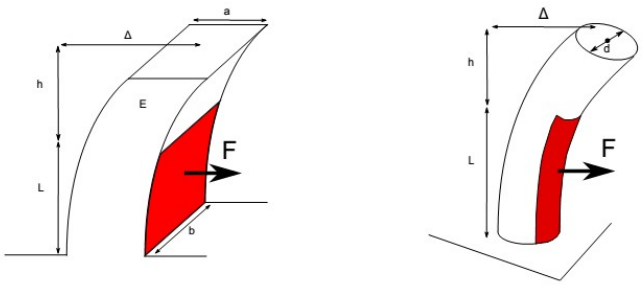


Figure 2.3 – Calcul de la déflexion des piliers. Dans un régime de faible déformation, la déflexion des piliers est proportionelle à la force appliquée. Cette déflexion peut être calculée à partir de la force qui s'exerce à la base du pilier et du module d'Young du PDMS .

des forces s'appliquant sur 3 μm de hauteur, cette épaisseur correspondant à l'épaisseur des cellules endothéliales. Les piliers sont constitués de PDMS (polydimethylsiloxane), un élastomère biocompatible, transparent et possédant une large gamme de rigidité. Dans un régime de faible déformation, la déflexion des piliers est proportionnelle à la force appliquée. La raideur du matériau ne dépend que du module d'Young du matériau et des paramètres géométriques des piliers.
Si on applique une force (F) sur une surface $(L * b)$ sur un pilier rectangulaire de hauteur $(L+h)$, de largeur(a) et possédant un module d'Young (E), la déflexion (Δ) mesurée en haut du pilier sera obtenue par la relation suivante [Landau 1967] :

$$\Delta = \int_0^L \frac{2f}{ba^3E} x^2(3(L+h)-x)dzdx \qquad \text{Eq. (2.1)}$$

on obtient alors :

$$\Delta = \frac{2fL^3(h+\frac{3}{4}L)}{Ea^3} \qquad \text{Eq. (2.2)}$$

Si on applique cette même force sur un pilier cylindrique , de diamètre d, les relations précédentes deviennent :

$$\Delta = \int_0^L \frac{64f}{6\pi d^3E} x^2(3(L+h)-x)dzdx \qquad \text{Eq. (2.3)}$$

ainsi on obtient :

$$\Delta = \frac{16fL^3(h+\frac{3}{4}L)}{3Ed^3} \qquad \text{Eq. (2.4)}$$

2.1.2.2 Autres critères pour le dimensionnement du capteur

Les choix de dimensionnement du capteur sont réalisés en tenant compte des 4 critères suivants :

➢ L'intensité des forces à mesurer

Les valeurs de forces cellulaires rapportées sont essentiellement des forces de **traction** exercées par les cellules sur leur substrat. Dans une étude portant sur la migration d'un épithélium (cellules MDCK) sur un substrat dense de micropiliers, [Saez 2010] met en évidence des forces de traction moyennes de 2 $nN/\mu m^2$ et une force maximale de 12,7 $nN/\mu m^2$. Pour une cellule unique , la valeur moyenne de cette force est de 0.6 $nN/\mu m^2$ avec un maximum de

3.8 $nN/\mu m^2$. Les résultats de [Balaban 2001] sur cellules isolées (fibroblastes), obtenus avec l'aide de substrats continus, montrent des forces de traction de l'ordre de 5.5 $nN/\mu m^2$. Les travaux de [Liu 2010] sur des doublets cellulaires font état de forces **intercellulaires** de 1 $nN/\mu m^2$. Dans les calculs qui suivent, nous avons fait l'hypothèse qu'une force de 5 $nN/\mu m^2$ s'exerce à la base du pilier.

➢ **Le système de détection**

La mesure de déflexion des piliers est réalisée en microscopie optique. Pour être mesurées avec une bonne précision, ces déflexions doivent être de 500 nm minimum.

➢ **Les technologies disponibles**

Les outils de lithographie optique accessibles au laboratoire LTM nous permettent d'envisager de miniaturiser les structures du capteur jusqu'à 1 μm. La technologie de gravure profonde offre la possibilité de concevoir des structures à fort rapport d'aspect.

➢ **Les dimensions cellulaires**

L'endothélium vasculaire reconstitué à partir de cellules HUVECS présente une épaisseur de 3μm. Leur confinement à l'intérieur des canaux nécessite que la hauteur des piliers soit au minimum 2 fois supérieure à l'épaisseur des cellules. Par ailleurs, les canaux doivent être larges devant la taille cellulaire, de l'ordre de 20μm, pour réduire l'influence des bords sur la contractilité des cellules endothéliales.

2.1.2.3 Choix réalisés

En prévision d'une répartition plus complexe des forces le long des piliers, leur comportement mécanique est modélisé avec le logiciel Comsol-Multiphysics qui se base sur la méthode des élément finis. Des simulations ont été effectuées pour connaitre la déformation des piliers en fonction de leurs dimensions pour un matériau de rigidité E=1MPa. Les résultats de la simulation donnent des résultats identiques au calcul analytique même dans le cas de déformations importantes (Fig 2.5). La modélisation par éléments finis est donc robuste et peut être utilisée dans des cas où l'adhésion sur le pilier est plus complexe.

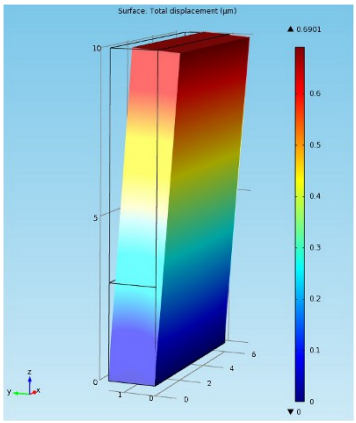
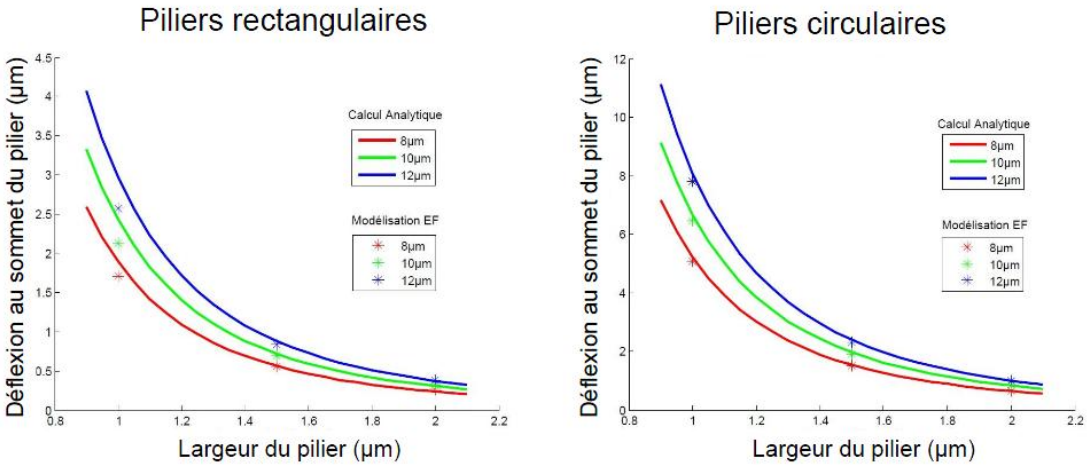


Figure 2.4 – Modélisation par éléments finis de la déflexion d'un pilier à géométrie réctangulaire.

En raison des critères de dimensionnement énoncés précédemment, nous avons choisi comme dimension pour le capteur, des piliers d'une largeur comprise entre 1.5 μm et 2 μm de large (ou diamètre) et de 10 μm de hauteur, avec un élastomère de rigidité E=1MPa et une largeur de canal de 100 μm.



(a) (b)

FIGURE 2.5 – Comparaison des déflexions des piliers obtenues par calcul analytique et modélisation par élément finis. Piliers rectangulaires (a) et cylindriques (b)

2.2 Microfabrication du système

La fabrication du microsystème a été réalisée en utilisant le concept de lithographie douce (soft lithography) développé par Kumar et Whiteside. Son nom provient de l'utilisation de matériaux organiques et de polymères, qualifiés de matériaux "mous" par les physiciens. Ce concept est à l'origine de différentes techniques de fabrication et de réplication de structures utilisant des moules et des tampons en élastomère. Une de ces techniques est le microcontact printing (μ-CP) [Kumar 1994] que nous expliquons plus en détail dans la section 2.3.1.1. La fabrication du microsystème est réalisée en 2 grandes étapes : la fabrication d'un moule en silicium contenant un négatif des canaux déformables puis l'utilisation du moule pour structurer les canaux déformables (Fig 2.6).

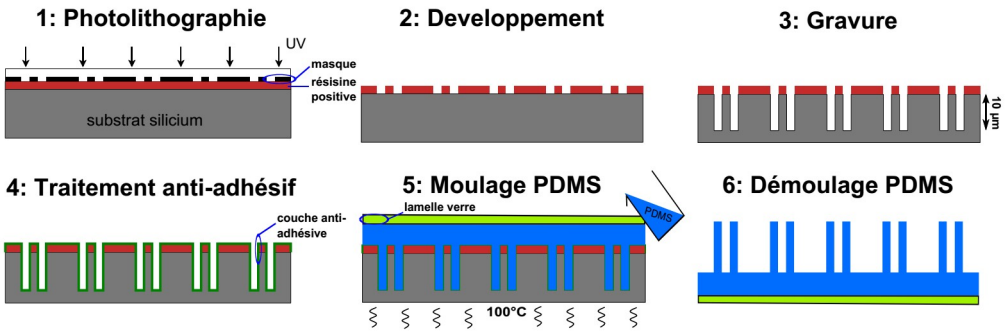


FIGURE 2.6 – Les différentes étapes de fabrication du microsystème.

2.2.1 Fabrication du moule

Le moule est réalisé en silicium, matériau dont les procédés de microfabrication sont bien maitrisés en raison de son utilisation intensive dans l'industrie de la microélectronique. La

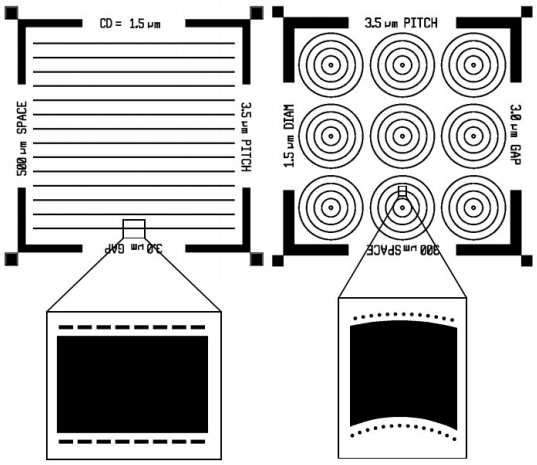


Figure 2.7 – Conception des motifs à l'aide du logicel L-edit. Les deux géométries de canaux, rectilignes et courbes, sont représentées ici. Une bande de $40\mu m$ a été ajoutée pour séparer les rangées de piliers pour mieux confiner les cellules dans les canaux.

fabrication du moule se déroule en 3 étapes : la conception des motifs, leur réplication sur un substrat en silicium puis leur gravure.

2.2.1.1 Conception des motifs et réalisation du masque de photolithographie

Les motifs à répliquer sur le moule en silicium doivent être dessinés à l'aide d'un logiciel puis transférés sur un masque. Les masques sont constitués d'une galette de verre ou de quartz, (transparent aux UV) sur lequel est déposée une couche de dioxyde de chrome (opaque aux UV). Le masque permet de transférer les motifs dessinés sur une résine lors de l'étape de photolithographie.
Nous avons dessiné les motifs à l'aide du logiciel L-edit (Tanner EDA). Ces motifs comprennent différentes largeurs de canaux ($100\mu m$ à $500\mu m$), et largeurs ou diamètres de pilier ($1.5\mu m$ et $2\mu m$) (Fig 2.7). Initialement les motifs étaient uniquement composés de lignes ou de cercles concentriques de piliers. Une bande de 40 μm a été ajoutée pour séparer les rangées de piliers lors d'un seconde conception de motifs pour empêcher la migration des cellules à travers les rangées de piliers et améliorer le confinement cellulaire dans chacun des canaux. Pour la réalisation du masque, nous avons choisi le quartz comme matériau transparent, qui laisse également passer les UV de plus courtes longueurs d'onde que le verre et permet d'obtenir une meilleure résolution lors de l'impression des motifs par photolithographie .

2.2.1.2 Transfert des motifs sur une résine : photolithographie

Lors de cette étape, les motifs reproduits sur le masque sont transférés sur le substrat. Une résine photosensible est étalée en film mince sur le substrat (plaquette de silicium). Ces résines sont des composés organiques dont la solubilité est affectée par le rayonnement UV. Vient ensuite une étape d'insolation de la résine avec un rayonnement UV à travers un masque, en verre ou en quartz, (transparent aux UV) sur lequel est déposé une couche de dioxyde de chrome (opaque aux UV). Les motifs sont constitués de verre ou de chrome suivant que l'on travail avec une résine positive ou négative :

- les **résines négatives** : le rayonnement UV entraîne une polymérisation des zones exposées, conférant ainsi à ces zones une résistance au solvant de révélation alors que les parties non insolées sont dissoutes dans ce solvant.
- les **résines positives** : le rayonnement UV entraîne une rupture des macromolécules, d'où une solubilité accrue des zones exposées dans le révélateur.

L'étape suivante consiste donc à révéler les motifs précédemment insolés à l'aide d'un solvant.

➢ **Protocole expérimental**

- Une plaquette de silicium (4 pouces) est rendue hydrophile avec un plasma oxygène pour une meilleure adhésion du promoteur d'adhérence.
- Le promoteur d'adhérence TI PRIME (MicroChemicals) est étalé sur le substrat en silicium à 3000rpm pendant 30s et recuit à 120°C pendant 2 min.
- Une résine photosensible positive UV5 (Rohm and Hass) est étalée à 4000 rpm pendant 60s puis recuite à 130°C pendant 90s. On obtient une épaisseur finale de résine de $0.85\mu m$.
- Les motifs du masque sont transférés sur le substrat par lithographie de contact à l'aide d'une insoleuse MJB4 DUV400 avec un temps d'insolation de 1.1s .
- Les zones insolées sont développées dans une solution de développeur MEGAPOSIT LDD-26W pendant 30s.
- Les substrats en silicium sont rincés dans un bac de rinçage.

2.2.1.3 Gravure

Le masque de résine est répliqué dans la couche de silicium par une technique de gravure ionique profonde (Deep Reactive Ion Etching). Nous avons opté pour le procédé de gravure Bosh qui est couramment utilisé pour obtenir des surfaces à fort rapport d'aspect (L/h>10). Ce procédé consiste en l'alternance de deux types de plasmas, l'un permettant la gravure du substrat, l'autre assurant sa passivation en créant un dépôt qui protège les parties gravées, empêchant ainsi la sous-gravure.

➢ **Protocole expérimental**

- La gravure est réalisée avec un bâti de gravure profonde (Surface Technology Systems).
- 20 cycles de gravure-déposition sont réalisés avec les paramètres suivants :
  Température du porte substrat=10°C
  Gravure : Puissance source plasma=200W ; Puissance Bias= 50W ; Pression=60mTorr
  Flux gazeux : 400 sccm SF_6/20 sccm C_4F_8/30 sccm O_2 ; Temps de gravure/cycle=3s
  Déposition : Puissance source plasma=200W ; Puissance Bias= 0W ; Pression=15mTorr
  Flux gazeux : 200 sccm C_4F_8 ; Temps de deposition/cycle=2s

2.2.1.4 Caractérisation du moule

Les dimensions des motifs gravés dans le substrat en silicium ont été caractérisés à l'aide d'un **Microscope Électronique à Balayage** (**MEB**). Cette technique d'imagerie permet

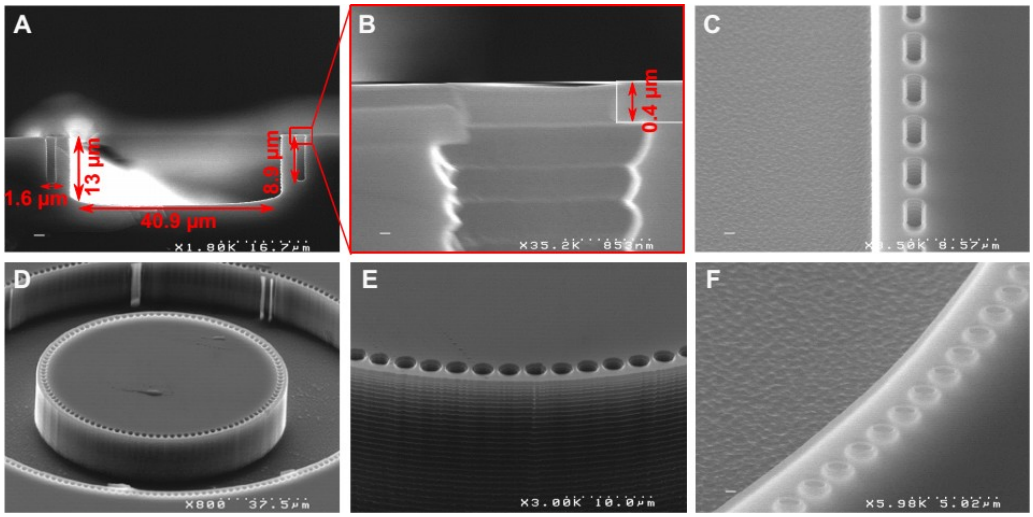


Figure 2.8 – Caractérisation MEB de la gravure des moules en silicium. A,B : vue en coupe des motifs gravés dans le silicium et de la couche de résine subsistante pour la géométrie de canaux rectilignes. C) Vue de dessus de la gravure des motifs qui serviront à mouler les piliers déformables. D,E,F) Vue à différentes échelles des motifs gravés dans le silicium pour la géométrie de canaux circulaires.

de visualiser la topographie d'une surface avec une résolution de quelques nanomètres. Son principe repose sur un balayage point par point de la surface de l'échantillon avec un faisceau très fin d'électrons. Sous l'impact du faisceau d'électrons accélérés, des électrons rétrodiffusés et des électrons secondaires émis par l'échantillon sont recueillis sélectivement par des détecteurs qui transmettent un signal à un écran cathodique dont le balayage est synchronisé avec le balayage de l'objet. On obtient ainsi une image topographique de la surface de l'objet balayé. Cette technique ne nécessite aucune préparation particulière des échantillons lorsqu'ils sont conducteurs comme c'est le cas du silicium.

L'échantillon est clivé avec une pointe en diamant dans l'axe des motifs pour une observation en coupe transversale. On peut ainsi accéder à la profondeur de gravure des motifs (Fig 2.8 A,B). Le profil "ciselé" de la gravure, est caractéristique du procédé Bosh (Fig 2.8 B). Chaque "tranche" correspondant à un nouveau cycle de gravure. Cette rugosité n'est pas un problème pour l'application visée et ne gêne pas le démoulage des piliers. Les paramètres de gravure choisis nous permettent d'obtenir des flancs très droits. A l'issue des 20 cycles de gravure déposition il reste une épaisseur de résine 0.4 μm pour une épaisseur initiale de résine de 0.85μm. La résine UV5 résiste donc très bien au processus de gravure puisqu'on grave $20nm$ de résine pour 450 nm de silicium soit une sélectivité de 1 :22. Comme on peut le constater sur la figure 2.8 A, la profondeur de gravure est dépendante de la largeur des motifs. Plus cette largeur est importante plus la quantité de gaz s'introduisant dans les motifs est importante d'où la différence de profondeur de gravure de $4\mu m$ observée entre le pilier de 1.6 μm de large et la bande centrale entre les piliers de 40.9μm. Les images C,D,E,F de la figure 2.8 sont des vues de dessus des moules rectangulaires ou circulaire.

2.2.2 Moulage des canaux déformables

2.2.2.1 Silanisation du moule

Afin de faciliter le démoulage de l'élastomère qui devient critique avec des motifs ayant un fort rapport d'aspect, le moule en silicium doit subir un traitement anti-adhésif. Pour ce

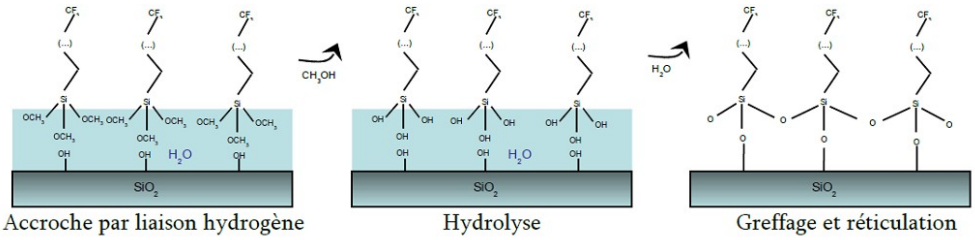


Figure 2.9 – Étapes de greffage de l'Optool

traitement nous avons utilisé un silane possédant une longue chaîne fluorée, l'Optool DSX (Daikin) [Truffier-Boutry 2010]. Le processus de greffage de l'Optool est décrit sur la figure 2.9.

➢ Protocole expérimental

- Le moule en silicium est rendu hydrophile avec un plasma oxygène pour une meilleure adhésion du silane.
- Le moule est trempé 2 minutes dans une solution d'optool et de perfluorohexane en concentration (1 :1000).
- Il est ensuite immergé 1 heure dans un bain marie à 65°C (hydrolyse)
- Le moule est ensuite rincé 10 minutes dans une solution de perfluorohexane afin d'éliminer l'excès d'optool non greffé.

2.2.2.2 Moulage des canaux

L'élastomère choisi pour la fabrication des piliers est le polydimethylsiloxane (PDMS). Ses propriétés lui confèrent de nombreux avantages, il est :

- **Biocompatible** (Après un traitement de surface). Le PDMS présente des groupements méthyles en surface et est donc naturellement hydrophobe. Pour que les cellules puissent adhérer à sa surface, le PDMS doit être rendu hydrophile par oxydation. Cette oxydation peut être réalisée par un plasma oxygène, des UV profonds, ou chimiquement avec un acide.
- **Peu coûteux**. La quantité de PDMS utilisée pour réaliser un substrat revient à quelques centimes d'euros.
- **Transparent** optiquement (240nm-1100nm). Il peut donc être utilisé en microscopie optique.
- **Faiblement auto-fluorescent**. On peut ainsi réaliser des marquages en immunofluorescence ou utiliser des fonctionnalisations avec des molécules fluorescentes (notamment pour la détection des sommets de piliers) sans être parasité par une fluorescence du PDMS.
- **Facile à mouler**. Le PDMS est facile à mouler car il reste liquide à température ambiante pendant plusieurs heures (même après adjonction de son réticulant). Il est possible de mouler des structures de l'ordre de 100-200nm. Pour descendre en résolution, du h-PDMS, plus rigide, peut être utilisé.

- **Adhésif** : Le PDMS peut être collé de manière étanche sur une lamelle de verre par réticulation ou par un traitement plasma lorsqu'il est déjà réticulé .
- **Mécaniquement modulable**. La gamme de rigidité sur laquelle peut être modulé le PDMS varie d'une cinquantaine de kPa à plusieurs MPa [Fuard 2008]. Cette modulation peut être effectuée en variant le pourcentage de réticulant ou en modifiant le temps de réticulation. On dispose ainsi d'un paramètre facilement ajustable (par rapport à la fabrication d'un moule) si les piliers s'avèrent trop rigides ou trop mous.

➢ Protocole expérimental

- Du PDMS non réticulé (Syligard 184, Dow Corning) est mélangé à un agent de réticulation dans une proportion 10 :1 puis dégazé pour évacuer toutes les bulles d'air.
- Une goutte de PDMS est appliquée sur le moule et l'ensemble est à nouveau dégazé pour bien remplir les motifs.
- Une lamelle de verre est déposée sur le PDMS non réticulé. L'ensemble est transféré sur une plaque chauffante à 100°C pendant 25 minutes pour obtenir une rigidité de $1MPa$ [Fuard 2008].
- Le démoulage s'effectue à l'air en retirant la lamelle de verre dans l'axe des piliers pour éviter qu'ils ne rentrent en contact et adhèrent entres eux par interaction électrostatique.

Lorsque l'écart entre piliers ou entre le pilier et la barrière de $40\mu m$ est inférieur à $2\mu m$ le démoulage des piliers devient assez délicat mais possible. En deçà d'1.5 μm le taux d'échec au démoulage est trop élevé, c'est pourquoi nous avons travaillé avec des espacement inter-pilier de 1.5-2μm.

Pour être caractérisés en **MEB**, les substrats en PDMS, qui sont des isolants électriques, doivent être recouverts d'un matériau conducteur. Pour cela on utilise un évaporateur de métaux pour déposer une couche de 20 nm d'Or-Palladium à la surface des substrats. Les dimensions des motifs sont déterminées à partir des vues de dessus (Fig 2.10 C,F). On retrouve à +- 0.1μm les dimensions des motifs dessinés sur le masque. Sur l'image D, figure 2.10, on peut voir quelques piliers effondrés lors du démoulage.

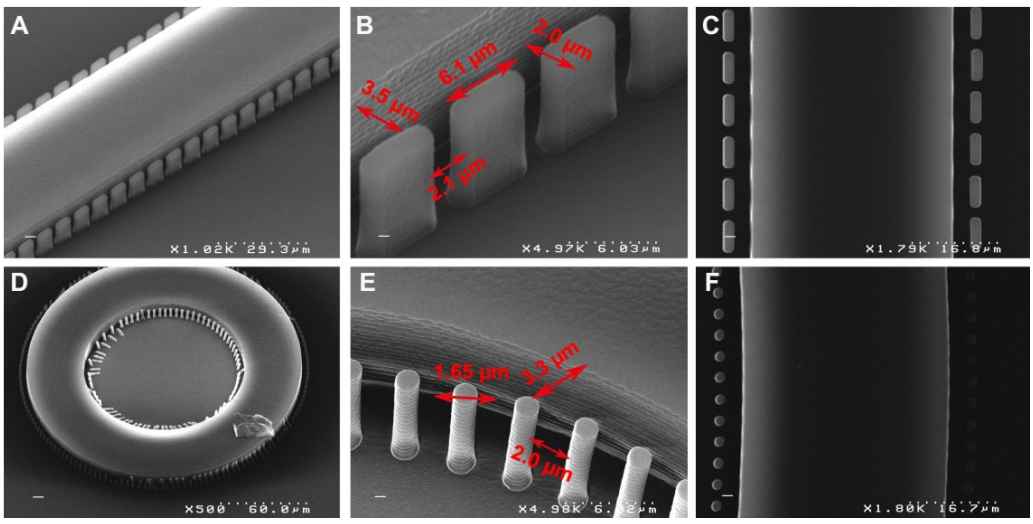


Figure 2.10 – Caractérisation des substrats en PDMS en **MEB**. Canaux rectilignes en vue latérale (A,B) et en vue de dessus (C). Canaux circulaires en vue latérale (D,E) et en vue de dessus (F).

La microfabrication des substrats achevée, il faut réaliser une étape de fonctionnalisation de surface pour rendre certaines zones adhésives ou répulsives pour les cellules.

2.3 Mesure de contractilité

2.3.1 Fonctionnalisation des canaux

2.3.1.1 Fonctionnalisation adhésive des canaux

Le PDMS utilisé pour les microcanaux est naturellement hydrophobe (angle de contact d'environ 105°) et les cellules ne peuvent adhérer à sa surface. Cependant, il peut aisément être rendu hydrophile par une oxydation de surface. En plus de l'hydrophilisation de la surface, l'oxydation va créer des groupes fonctionnels réactifs silanol qui peuvent être utilisés pour différents types de fonctionnalisation telle que la silanisation [Ulman 1996]. L'oxydation peut être réalisée à l'aide d'un plasma oxygène [Duffy 1998] ou par UV/ozone [Efimenko 2002]. Le plasma oxygène contient des espèces très énergétiques telles que des électrons, des ions et des radicaux qui oxydent fortement les éléments organiques de la surface. Le traitement par UV/ozone est plus doux et réalisé par génération d'oxygène atomique en combinaison d'un processus photochimique. Les longueurs d'onde à 185 nm produisent de l'ozone à partir d'oxygène moléculaire tandis que la longueur d'onde à 254 nm convertit l'ozone en oxygène atomique. Cette espèce réactive attaque ensuite les groupes siloxanes du PDMS pour former une couche de silice et des groupements silanols.

Le principal inconvénient de ces modifications physiques est que le PDMS retrouve son hydrophobicité quelques heures seulement après exposition à l'air [McDonald 2000]. Ce phénomène est expliqué comme étant la conséquence de la migration vers la surface des chaines de polymères non réticulés de faible poids moléculaire [Hillborg 2003]. Cependant, lorsque le PDMS est conservé en milieu liquide, l'hydrophilicité peut être conservée environ une semaine ce qui est souvent suffisant pour le temps des expériences.

Comme pour la culture cellulaire in vitro sur boite de petri, les cellules peuvent adhérer directement sur le PDMS oxydé car elles peuvent y secréter leur propre matrice extracellulaire. Néanmoins l'adhésion est plus rapide et régulière sur des substrats fonctionnalisés de façon homogène avec une protéine de la MEC. Une des protéines les plus communément utilisée pour la fonctionnalisation du PDMS est la fibronectine [Tan 2003], [du Roure 2005]. Une simple incubation de cette protéine pendant 1h permet son adsorption à la surface du PDMS oxydé. Nous avons utilisé cette méthode pour fonctionnaliser des canaux de 75 et 100 μm de large.

Dans un premier temps nous avons ensemencé les cellules sur ces substrats entièrement fonctionnalisés avec de la fibronectine et observé leur croissance dans les canaux pendant 3 jours. Les cellules endothéliales qui ont été utilisées durant toute la thèse sont des cellules issues de veines endothéliales ombilicales humaines (HUVECS) utilisées à faible passage (P2-P4).

Les cellules ont bien adhéré à la surface des substrats et ont atteint la confluence au bout de 48h (Fig 2.11). Cependant les cellules se sont alignées dans la direction des canaux. Ceux-ci ont du être élargis par la suite pour s'affranchir de l'impact de la largeur des canaux sur l'organisation des cellules et l'adhésion aux piliers suite à la formation de la monocouche endothéliale à l'interieur des canaux. Certains piliers ont été défléchis, ce qui montre que les dimensions choisies permettent bien de détecter des forces cellulaires. Cependant, les images

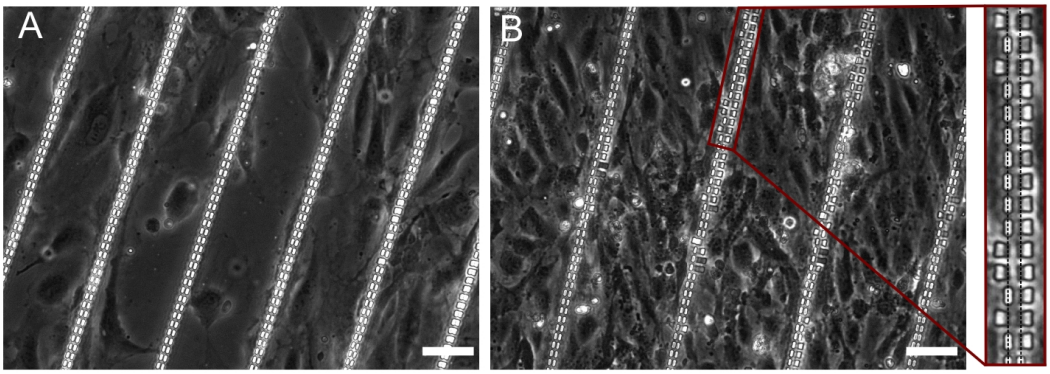


Figure 2.11 – Croissance des cellules dans les microcanaux. (A) 18h après ensemencement dans des canaux de 75 μm (B) 3 jours après ensemencement dans des canaux de 100 μm, agrandissement sur une zone de déformation des piliers. Barre d'échelle=50 μm

en contraste de phase n'ont pas permis de voir si les cellules adhérent uniquement au bord des piliers ou si elles les franchissent.

La deuxième étape a donc consisté à marquer les microfilaments d'actine pour observer les structures adhésives au contact des piliers. Ce marquage a permis de montrer que malgré la hauteur des piliers (9 μm) les cellules qui forment habituellement une monocouche d'environ 3 μm d'épaisseur sont capables de franchir les piliers (Fig 2.12).

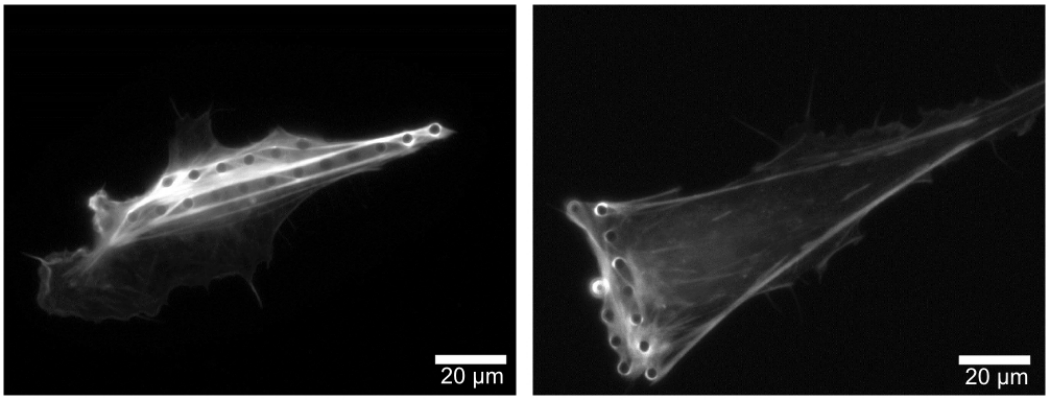


Figure 2.12 – Franchissement des piliers par les cellules HUVE transfectées avec un plasmide Life-Act permettant de visualiser les filaments d'actine.

2.3.1.2 Fonctionnalisation anti-adhésive des canaux

Pour empêcher les cellules de franchir les canaux, nous avons utilisé une fonctionnalisation anti-adhésive au sommet des piliers. A cette fin, nous avons modifié le design du capteur de façon à rajouter une structure rigide entre les piliers qui puisse servir à la fois à bloquer l'adhésion cellulaire, et à assurer le rôle de support pour le microtamponnage des piliers (Fig 2.13-A).

La technique de microtamponnage (μ-CP), développée au début des années 1990 par Kumar et Whitesides, permet de réaliser des motifs chimiques avec une résolution submicrométrique [Kumar 1994]. A l'origine, cette technique utilise un tampon constitué de polymère

avec des motifs en relief. Ce tampon est "encré" avec une molécule chimique et mis en contact avec la surface du substrat (Fig 2.13-B). L'encre peut ainsi être transférée du tampon au substrat uniquement dans les zones de contact. Cette technique a l'avantage d'être peu couteuse et facile à mettre en place. Cependant elle souffre de problèmes de reproductibilité dus à la difficulté de contrôler la distribution de molécules chimiques encrées sur le tampon et de la pression qui permet de transférer ces molécules sur le substrat.

Pour obtenir une fonctionnalisation répulsive pour les cellules, nous avons utilisé un copolymère, le poly-L-lysine-g-poly(ethylène glycol) (pll-g-peg,SurfaceSolutions) [Azioune 2011]. La stratégie de fonctionnalisation a consisté à tamponner le sommet des piliers avec le pll-g-peg puis à ajouter de la fibronectine dans les canaux.

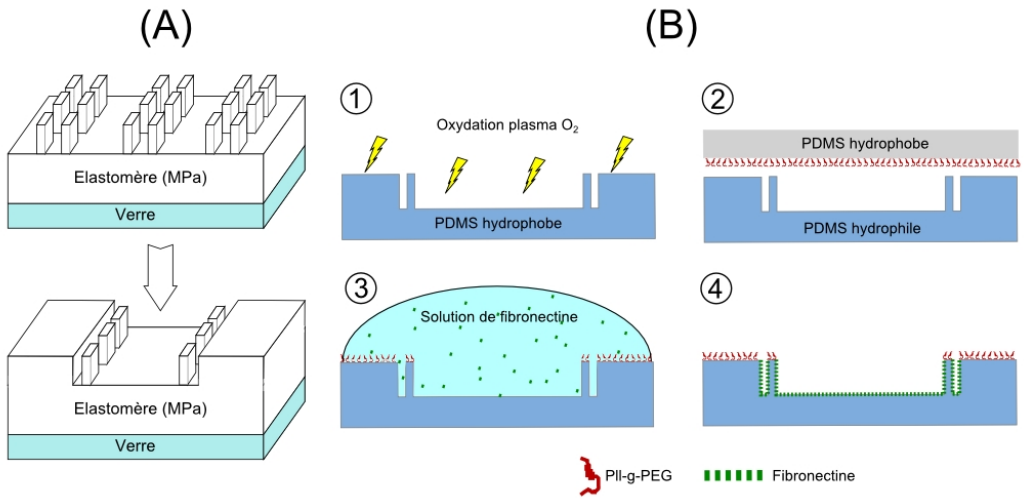


Figure 2.13 – (A) Modification du design du capteur pour limiter le franchissement des piliers par les cellules. (B) 1 : Oxydation de la surface du PDMS pour le rendre hydrophile. 2 : Tamponnage d'une monocouche de pll-g-peg. 3 : Le substrat est incubé dans une solution de fibronectine. 4 : Fonctionnalisation finale avec les zones adhésives et répulsives pour les cellules.

Le pll-g-peg est un copolymère polyéthylène glycol (PEG) polycationique avec une chaîne principale composée de polylysine (PLL) qui peut fortement s'adsorber sur des surfaces chargées négativement en solution aqueuse. Ses propriétés antiadhésives pour les protéines sont bien documentées [Huang 2000], [Michel 2002]. [Lee 2005] ont montré que la fonctionnalisation avec du pll-g-peg d'une surface de PDMS oxydé par un plasma O_2 empêche l'adhésion de protéines sur une période de plusieurs semaines. Dans la plupart des études, le pll-g-peg n'est pas directement tamponné sur un substrat mais utilisé pour recouvrir des zones après tamponnage de protéines de la MEC [Csucs 2003], [Azioune 2010].

Dans notre cas, à cause de la topographie des motifs, il a fallu adopter la stratégie de fonctionnalisation inverse, c'est à dire microtamponner le pll-g-peg au sommet des canaux puis remplir l'interieur des canaux avec de la fibronectine. Les tampons sont constitués de PDMS hydrophobe qui peut interagir avec la partie PEG du pll-g-peg. Ainsi les squelettes de PLL peuvent interagir avec les microcanaux qui ont préalablement été rendus hydrophiles à l'aide d'un plasma O_2.

➢ **Protocole expérimental**

- Les tampons ont été fabriqués en coulant une couche de plusieurs mm de PDMS non réticulé (voir 2.2.2.2) sur un wafer de silicium. Le PDMS a ensuite été recuit à 100°C pendant 2h. Une fois refroidi, de petits carrés de quelques cm de coté on été découpés dans le PDMS réticulé.
- Avant utilisation, les tampons ont été rincés à l'éthanol pour les débarrasser d'éventuels contaminants organiques. Une solution de pll-g-peg-TRITC (SurfaceSolutions) à 0.5 mg/ml à été préparée dans du PBS pH=7.0. Une goutte de cette solution à été déposée pendant 30 minutes sur la face la plus plate du PDMS, qui a été en contact avec le wafer. La goutte de solution a ensuite été aspirée avec une pipette et le substrat séché avec de l'air sec.
- Les substrats contenant les canaux ont été rendus hydrophiles à l'aide d'un plasma 0_2 pendant 15s, juste avant tamponnage. A l'aide d'une pince, les tampons ont été mis en contact avec le sommet des piliers pendant 30 secondes avec une légère pression manuelle.
- Les canaux déformables ont ensuite été rincés 3 fois avec du PBS puis incubés pendant 1h avec une solution de fibronectine à 20 $\mu g/ml$. Une fois le temps d'incubation terminé, les substrats ont été rincés 3 fois avec du PBS et stockés dans du PBS jusqu'à ensemencement des cellules.

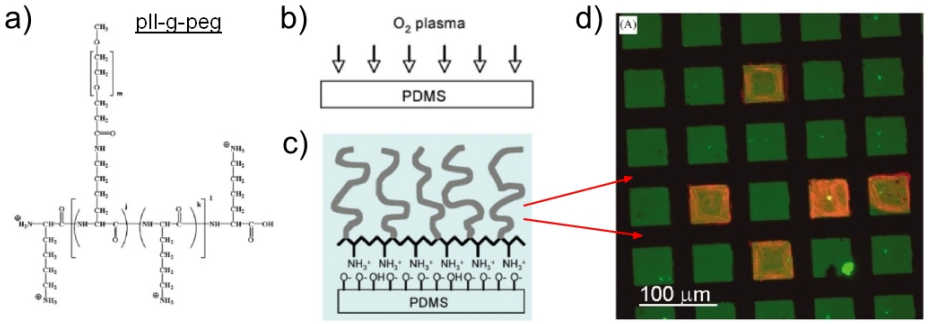


Figure 2.14 – (a) Structure moléculaire du pll-g-peg.(b) Oxydation à l'aide d'un plasma O_2 de la surface du PDMS. (c) Génération d'une monocouche de pll-g-peg à la surface du PDMS oxydé grâce aux interactions électrostatiques entre la chaîne de PLL et la surface chargée négativement. (a,b,c adapté de [Lee 2005](d)Images en fluorescence de fibroblastes humains adhérents sur des motifs de fibronectine/Alexa 488-fibrinogène de 50 μm^2 espacés de 20 μm suivi d'un remplissage avec du pll-g-peg. Les fibroblastes ont été marqués à l'actine et apparaissent en orange [Csucs 2003].

Comme on peut le voir sur la figure 2.15, il est assez difficile d'obtenir une fonctionnalisation homogène sur des surfaces de dimensions supérieures à quelques μm par la méthode du microtamponnage. Ceci est principalement dû à la difficulté d'appliquer une pression homogène manuellement sur le substrat. C'est la raison pour laquelle on peut voir des zones où le substrat est également tamponné à la base des piliers sur la figure 2.15 . D'autre part, lors de la gravure des moules, on a vu que les négatifs des piliers se situent 4 μm plus bas que les barres de séparation entre les piliers ce qui explique que le tamponnage soit moins homogène au sommet des piliers. Avant ensemencement des cellules dans les canaux, la qualité du traitement anti-adhésif doit donc être contrôlée systématiquement après microtamponnage.

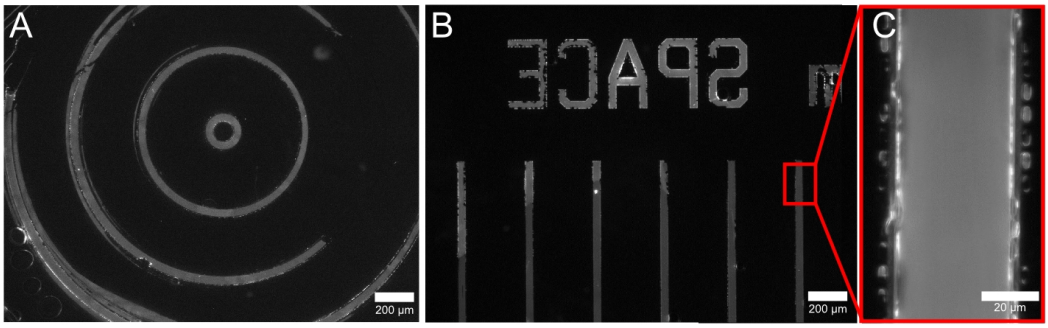


Figure 2.15 – Microtamponnage anti-adhésif du sommet des piliers à l'aide de pll-g-peg-tritc. (A) Canaux circulaires, (B) Canaux rectilignes, (C) Agrandissement d'une zone microtamponnée

2.3.2 Capacité du système à mesurer la contractilité d'une monocouche

Après fonctionnalisation, les cellules ont été ensemencées à faible densité dans les micro-canaux, puis filmées pendant 24h, jusqu'à ce que les cellules atteignent la confluence.

➢ Protocole expérimental

- Des cellules de veines endothéliales ombilicales humaines (HUVECs) à faible passage (P2-P4) , ont été cultivées dans du milieu EBM-2 supplémenté d'additifs EGM-2(Lonza).
- Les cellules ont été ensemencées à faible densité, 5.10^3 cellules/cm^2, pour éviter que de petits agrégats de cellules, plus résistants à une fonctionnalisation répulsive ne se forment sur les substrats.
- 1h après ensemencement, le milieu est légèrement agité avec une pipette pour décoller d'éventuels cellules faiblement adhérentes sur des motifs de pll-g-peg. A ce stade, il n'y avait pratiquement plus de cellules sur les "barrières", c'est à dire les zones répulsives de 40 μm recouvertes de pll-g-peg.

Si les cellules ont été mieux confinées dans les canaux grâce à la fonctionnalisation anti-adhésive, on observe toutefois qu'une fois proches de la confluence, les cellules semblent monter le long des piliers car des lamellipodes sont visibles en bordure de la barrière de 40 μm (Fig 2.15-A). De plus les images en fluorescence du sommet des piliers montrent le rapprochement des piliers les uns des autres, ce qui semble indiquer que les cellules adhèrent en longueur sur les piliers 2.16-C. Pour déterminer si cette difficulté de confinement est liée à la dynamique des cellules endothéliales HUVE, nous avons également testé le comportement de cellules épithéliales MDCK dans les micro-canaux. Les résultats ont été similaires à ceux obtenus avec les HUVECs.

Pour caractériser plus finement l'adhésion cellulaire au niveau des piliers, nous avons fixé les cellules lorsqu'elles atteignent la confluence dans les canaux puis procédé à des marquages immunofluorescents de la VE-cadhérine, de l'actine, de la vinculine et des noyaux, avant de visualiser ces marquages en microscopie confocale.

Sur la figure 2.17-A, on peut voir une coupe confocale d'une monocouche d'HUVECs. On remarque que les cellules à proximité des piliers possèdent des noyaux accolés à ces piliers, peut être à cause de l'organisation particulière que doivent prendre les cellules à leur contact.

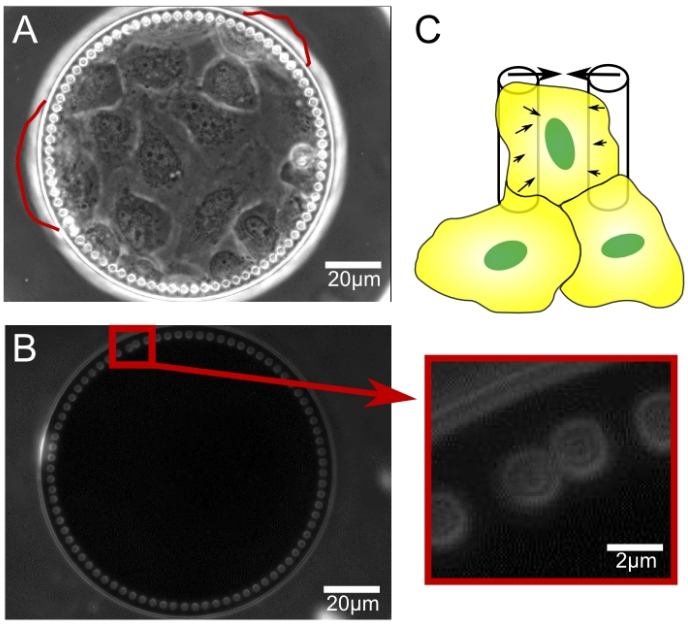


Figure 2.16 – (A) Images en contraste de phase de cellules HUVE dans dans un canal de 100 μm de diamètre 24h après ensemencement. On aperçoit quelques lamellipodes franchissant les piliers (lignes rouges) (B) Image en fluorescence du pll-g-peg TRITC du même canal. (C) Agrandissement d'une zone où les piliers sont défléchis les uns contre les autres et représentation schématique de la configuration des cellules au niveau de ces piliers.

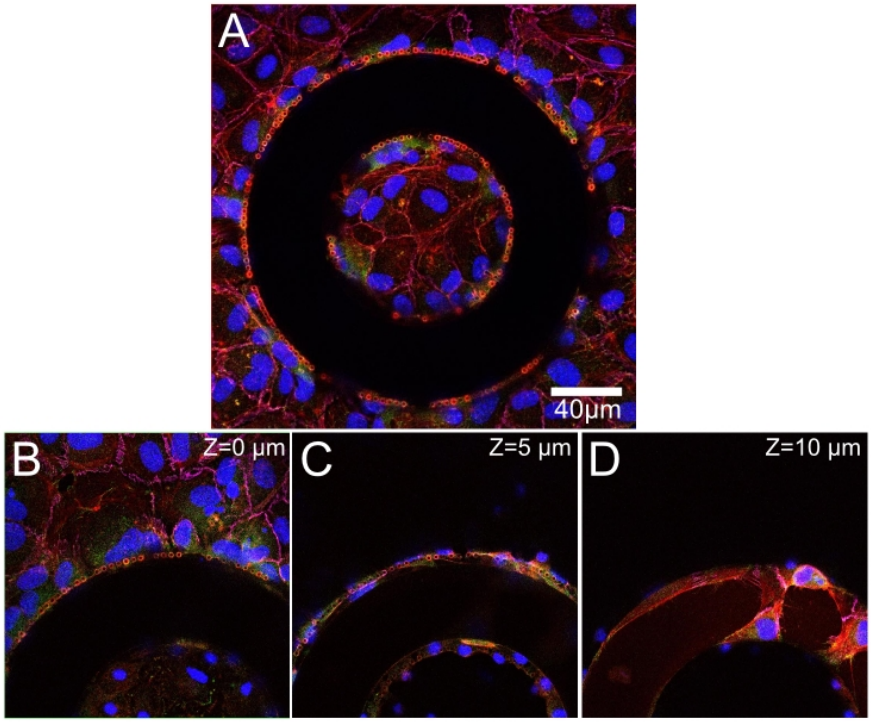


Figure 2.17 – (A) Coupe confocale, au niveau de la base des piliers, de cellules HUVE dans des canaux de 100 et 200 μm de large. Les noyaux sont représentés en bleu, la VE-cadhérine en rose, l'actine en rouge et la vinculine en vert. (B,C,D) Coupes confocales à plus fort grossissement de cellules HUVE à respectivement 0, 5, et 10 μm de la base des piliers.

On peut également observer que les piliers ont été recouverts d'actine et de vinculine. Sur la figure 2.17-C, qui correspond à une coupe confocale à mi-hauteur des piliers, on voit que les cellules ont adhéré le long des piliers parfois sur la face externe, et parfois même entre les piliers bien que l'espacement interpiliers soit de 1.5-2 μm. Sur la figure 2.17-D, qui correspond au sommet des piliers et de la barrière de séparation, on voit que les cellules ont partiellement adhéré au substrat en faisant un "pont" entre les 2 côtés de la barrière.

2.3.2.1 Discussion

En l'état, il apparait que l'adhésion est donc trop peu contrôlée pour permettre une mesure robuste de la contractilité de monocouches cellulaires reconstituées dans notre microsystème. Pour que de telles mesures puissent être réalisées, il faudrait obtenir une adhésion homogène des cellules uniquement à la base des piliers.

En raison de la dimension des piliers, s'il est techniquement possible de trouver des solutions pour fonctionnaliser le sommet des piliers ou la barrière qui les séparent, il est beaucoup moins aisé de venir fonctionnaliser spécifiquement une partie de la face interne des piliers. En effet la fragilité des pilliers rend complexe certaines techniques de fonctionnalisation 3D, comme l'utilisation de résines pour masquer une partie du substrat [Fuard 2010]. Dans ce type de fonctionnalisation sélective, la résine doit être étalée à une certaine vitesse pour obtenir l'épaisseur du masque désiré, ici environ 3 μm, puis lorsqu'une partie du substrat est fonctionnalisée, la résine doit être dissoute pour fonctionnaliser la deuxième partie du substrat. Or ce dépôt de résine est complexe à cause de la topographie du substrat et du fait que les piliers ont tendance à se coller les uns aux autres lors de l'étape de dissolution de la résine.

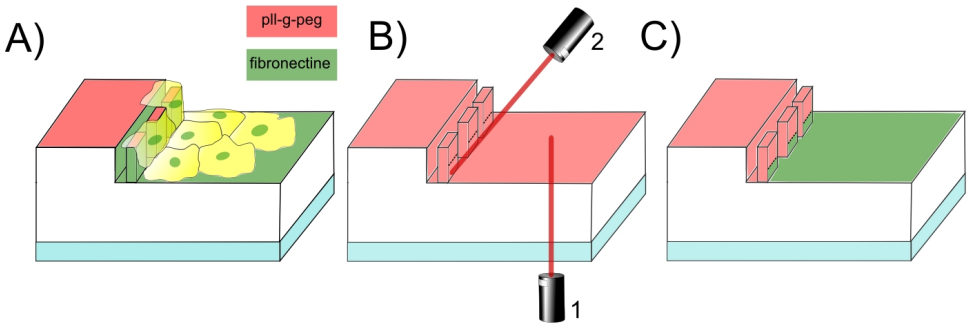


Figure 2.18 – Fonctionnalisation à l'aide d'un laser. (A) Système fonctionnalisé à l'aide de la méthode classique de microtamponnage. (B) Un laser peut être utilisé pour dégrader localement le pll-g-peg. Cette technique s'utilise dans la configuration du laser 1 mais peut difficilement s'appliquer dans la configuration du laser 2. (D) De la fibronectine peut s'adsorber dans les régions où le pll-g-peg à été dégradé.

Une autre technique, qui a été utilisée pour reprogrammer dynamiquement la forme des cellules aurait pu être envisagée [Vignaud 2012]. Cette méthode utilise un laser pulsé pour venir dégrader de façon submicrométrique le pll-g-peg. Si cette technique permet de finement fonctionnaliser finement la base des piliers (laser 1 Fig 2.18), la difficulté reste leur fonctionnalisation latérale (laser 2 Fig 2.18). En effet cette technique passe par l'objectif du microscope et il est difficilement envisageable d'incliner l'échantillon pour réaliser une fonctionnalisation latérale.

Ce chapitre a mis en évidence les difficultés à contraindre géométriquement l'adhésion cellulaire à l'intérieur de notre microsystème. La géométrie 3D du capteur et la taille réduite des structures rendent la fonctionnalisation complexe. La tendance des cellules à maximiser leur surface de contact avec le substrat, indépendamment des contraintes géométriques, est en partie responsable de ces difficultés. En conséquence, la mise au point d'un tel microsystème en vue de fournir une mesure statistiquement pertinente de la contractilité d'une monocouche cellulaire nous a paru techniquement très délicate. Nous nous sommes donc orientés vers une autre méthode, décrite dans le chapitre 4, pour réaliser la mesure de contractilité d'un endothélium vasculaire.

Chapitre 3

Mesure des forces transmises au substrat

Sommaire

3.1 État de l'art 58
3.1.1 Introduction 58
3.1.2 Choix de la technique de mesure de forces : gel versus piliers élastomériques 59
3.1.3 Calcul des forces cellule-substrat en TFM 60
3.1.4 Méthodes expérimentales 64
3.2 Cellule isolée versus tissu 73
3.2.1 De nouvelles conditions aux limites à prendre en compte 73
3.2.2 Conclusion 75
3.2.3 Méthodologie 78
3.2.4 Résultats : mesure des forces transmises par une monocouche endothéliale à sa matrice extracellulaire 82
3.3 Conclusion 86

Afin de réaliser une mesure de la contractilité d'un endothélium vasculaire, nous avons reconsidéré une approche indirecte. Cette démarche est similaire à celle menée par Fredberg et al [Tambe 2011] qui ont calculé la contractilité d'une monocouche à partir de la mesure des forces cellulaires transmises à la matrice. Comme décrit ci-dessous, cette méthode est mathématiquement assez lourde et nécessite l'utilisation de filtres successifs sur les données calculées. Dans le chapitre 4, nous détaillons une nouvelle méthode de calcul des contraintes intracellulaires mathématiquement très simple et contrôlée. Tout comme la méthode de Fredberg et al, elle repose sur la mesure du champ de déformation du substrat, mais les étapes de calcul suivantes diffèrent.

Pour une analyse globale de l'effet des modifications biochimiques des jonctions intercellulaires sur la mécanique des adhérences cellulaires, nous avons aussi souhaité extraire de ces mesures les forces cellulaires transmises à la matrice. Il existe aujourd'hui un panel de méthodes pour accéder aux forces transmises au substrat, revues dans la section 3.1. Ces techniques sont pour l'heure limitées à l'étude de cellules isolées ou d'îlots cellulaires. Dans ce chapitre, nous analysons dans quel contexte on peut les étendre à l'étude de monocouches cellulaires et présentons les résultats obtenus sur une monocouche endothéliale mature.

3.1 État de l'art

3.1.1 Introduction

L'idée de mesurer des forces cellulaires à l'aide d'un substrat élastique a été proposée pour la première fois par Harris [Harris 1981]. Dans cette expérience, des cellules fibroblastiques sont ensemencées sur des feuillets en silicone réticulé de faible épaisseur flottant sur du silicone non réticulé. De petites vaguelettes observées à la surface du silicone montrent la capacité des cellules à déformer leur substrat (Fig 3.1). Cette méthode ne permet cependant pas de quantifier les forces cellulaires aisément, car la relation entre les forces appliquées et les déformations observées est ici non linéaire (les rides à la surface du silicone résultent du flambage de la surface).

Le développement, 20 ans plus tard, de la Microscopie à Traction de Force (TFM en anglais) par Dembo et Wang est une étape importante dans la mesure de forces cellulaires [Wang 1993]. Cette méthode utilise des billes fluorescentes micrométriques dispersées dans un gel de polyacrylamide (PA). Les billes servent de marqueur pour suivre les déformations du gel qui résultent des forces appliquées par les cellules adhérentes. Une fois le champ de déplacement obtenu pour l'ensemble des billes, différentes méthodes décrites dans la section 3.1.3 permettent de calculer le champ de forces originel. Cette technique a d'abord permis de mettre en évidence les forces tangentielles exercées par les cellules sur leur substrat. Par la suite, d'autres groupes l'ont utilisée pour démontrer la présence de forces normales au plan de la surface [Hur 2009] [Delanoe-Ayari 2010] [Maskarinec 2009].

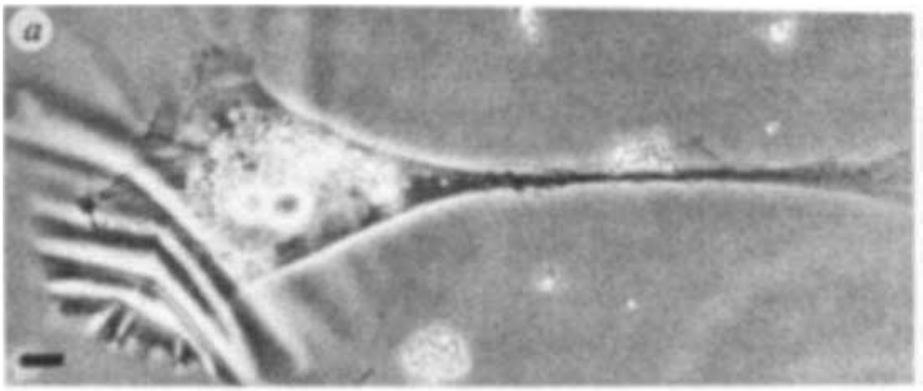
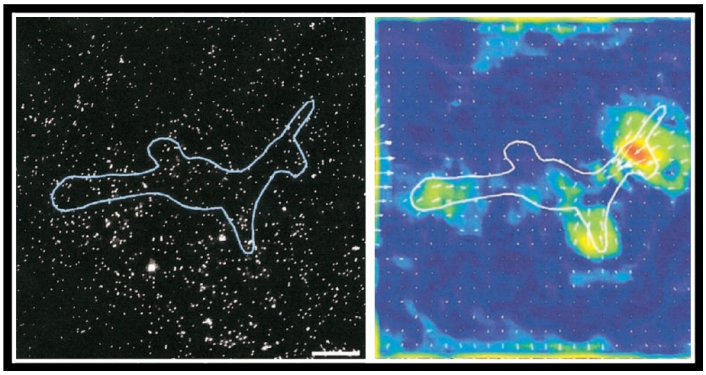


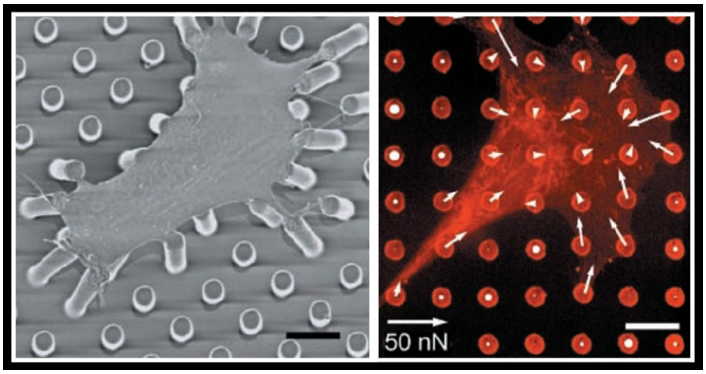
Figure 3.1 – Cellule fibroblastique déformant un feuillet en silicone [Harris 1981]

La complexité mathématique de la reconstruction du champ de forces avec la technique TFM a conduit au développement d'une seconde technique donnant accès aux forces transmises au substrat. Cette dernière consiste à utiliser un réseau de plots élastomériques déformables comme substrat cellulaire. La tension générée par les cellules sur le tapis de plots provoque leur fléchissement. La relation linéaire entre cette déflexion et la rigidité des piliers permet de calculer aisément les forces de traction tangentielles.

Dans la section suivante nous détaillons les possibilités et limites de chacune de ces deux techniques de mesure des forces de traction.



(a)



(b)

Figure 3.2 – (a) Mesure des forces avec la méthode TFM. L'image de gauche est une image en microscopie de fluorescence des billes disséminées dans un gel de polyacrylamide. Le contour d'une cellule ensemencée sur le gel est dessiné. L'image de droite repésente le champ de forces calculé à partir du déplacement des billes. [Butler 2002] (b) Méthode des piliers. L'image de gauche est une image en microscopie electronique à balayage d'une cellule déformant un réseau de piliers élastomériques. L'image de droite est une image en microscopie de fluorescence d'un réseau de piliers déformés par une cellule. Les flèches blanches représentent la déflexion des piliers. [Tan 2003]

3.1.2 Choix de la technique de mesure de forces : gel versus piliers élastomériques

La technique de Microscopie à Traction de Force **TFM** offre aux cellules des substrats continus. Pour leur part, les tapis de piliers, de part leur conception, contraignent la taille des sites d'adhérence à une section de pilier. Or la topographie du substrat affecte la morphologie et les mouvements cellulaires [Frey 2006]. Le diamètre des piliers utilisé exerce une influence sur la morphologie des adhérences [Ghassemi 2012] et la densité du réseau de piliers a également son importance sur les forces développées.

Par ailleurs, les propriétés élastiques des gels et des tapis de piliers diffèrent : les gels ont une élasticité isotrope, caractérisée par un module d'Young et un coefficient de Poisson, alors que les tapis de piliers ont une élasticité anisotrope, caractérisée par un module de flexion des piliers fini, une compressibilité infinie au regard des forces cellulaires (un pilier ne peut pas être étiré ni comprimé), et un module de cisaillement nul (la déformation d'un pilier ne déforme pas les piliers voisins). En conséquence, le calcul des forces est bien plus simple dans le cas des piliers puisque les forces sont directement proportionnelles à la déflexion des piliers.

Dans le cas de substrats continus en PA, la propagation des déformations rend le calcul des forces plus compliqué. En revanche, les tapis de piliers ne donnent accès qu'aux forces cellulaires tangentielles au substrat, contrairement aux gels qui permettent d'obtenir l'ensemble des composantes de forces [Delanoe-Ayari 2010].

Au delà des forces cellulaires, l'utilisation des gels ou des tapis de piliers permet de sonder différemment la mécanique cellulaire. L'absence de module de cisaillement dans les tapis de piliers permet d'accéder à la dynamique des adhérences cellulaires résultant des forces cellulaires internes. Malgré les artéfacts qu'ils induisent par la topographie, ils sont donc des candidats tout à fait pertinents pour l'étude de la mécanique des adhérences cellulaires à l'échelle micrométrique. Les gels, en revanche, fournissent des informations qui intègrent toutes les échelles cellulaires via la transmission des contraintes ou des déformations par le substrat, et en particulier la contribution des forces transmises par les cellules voisines ou par d'autres structures intracellulaires a priori faiblement couplées via le cytosquelette [Buxboim 2010], [Engler 2006], [Reinhart-King 2008].

D'un point de vue technique, les deux approches ne présentent pas les mêmes contraintes et difficultés. La fonctionnalisation avec une protéine est plus délicate sur les hydrogels en PA utilisés en TFM que sur le PDMS utilisé pour la technique des piliers, avec pour conséquence une variabilité importante des mesures de forces sur hydrogel dont l'origine est la différence d'affinité chimique des cellules pour la surface. Dans le cas des hydrogels la fonctionnalisation fait généralement intervenir un réactif bi-fonctionnel capable de se lier d'une part au PA et d'autre part avec la protéine de fonctionnalisation choisie. Cette molécule bi-fonctionnelle est assez coûteuse et instable. De plus la fonctionnalisation sur PA necessite des méthodes plus sophistiquées pour être homogène. A l'inverse, une simple oxydation du PDMS, avant la mise en contact de la protéine d'adhésion permet d'obtenir une fonctionnalisation robuste et homogène.

Un dernier point est la difficulté technique à réaliser les substrats. La fabrication chimique et le coût des substrats en PA les rendent facilement accessibles à tous les laboratoires. Les techniques de microfabrication nécessaires à la réalisation des piliers les réservent à des laboratoires ayant un environnent technologique important.

Au vu de notre utilisation pour l'étude de la mécanique tissulaire, avantages et inconvénients des deux techniques ont été résumés dans le tableau ci-dessous :

Ces deux techniques complémentaires ont été déterminantes dans la compréhension du rôle des forces dans de nombreux processus cellulaires (Chapitre 1). Etant *in fine* intéressés par la mécanique tissulaire, nous avons choisi de travailler avec des hydrogels. Ainsi, les couplages intercellulaires transmis par l'élasticité du substrat seront pris en compte. Par ailleurs, nous verrons en section 4.2 que le fait de pouvoir accéder au champ de déformation tridimensionnel se révèle être un atout potentiel pour la détermination des forces cellulaires.

Nous détaillons maintenant les différentes méthodes utilisées dans la littérature pour le calcul des forces de traction sur hydrogel.

3.1.3 Calcul des forces cellule-substrat en TFM

Lorsque les cellules exercent des forces de traction, elles déforment la surface de l'hydrogel, provoquant le déplacement des marqueurs fluorescents disséminés à l'intérieur du substrat. Plusieurs méthodes de calcul ont été proposées pour obtenir les champs de traction à partir des champs de déplacement mesurés. On peut classer ces méthodes en 2 grandes familles : la 1ère consiste à résoudre

Table 3.1 – Comparaison des avantages et inconvénients des méthodes de mesure de forces utilisant des hydrogels ou de piliers déformables.

	Hydrogels	**Piliers**
Substrat	continu +	discret -
Fonctionnalisation	Fonction de la rigidité -	homogène et stable +
Forces accessibles	2D/3D +	2D -
Calcul des forces	résolution problème inverse -	force= k*deflexion +
Fabrication	Chimique +	Microfabrication -

le problème élastique, la 2ème consiste à dériver directement le champ de contrainte.

Résolution du problème élastique

On considère que les hydrogels ont un comportement élastique linéaire et qu'ils sont homogènes et isotropes. Ils sont reliés par l'équation intégrale de Fredholm du premier ordre :

$$u_i(\mathbf{x}) = \int \sum G_{ij}(\mathbf{x} - \mathbf{x}')f_j(\mathbf{x}')d\mathbf{x} \qquad \text{Eq. (3.1)}$$

u(x) est le champ de déplacement mesuré expérimentalement. Pour un gel épais, le substrat peut être approximé par un milieu élastique semi-infini ce qui permet d'utiliser la fonction de Green Boussinesq [Landau 1967]. Ainsi, si on néglige les forces normales au substrat, le champ de déplacement $u(x)$ et le champ de traction $f(x)$ bidimensionnel sont reliés par la fonction de Green suivante :

$$G_{ij}(\mathbf{x}) = \frac{1+\nu}{\pi E r^3}\begin{pmatrix} (1-\nu)r^2 + \nu x^2 & \nu xy \\ \nu xy & (1-\nu)r^2 + \nu x^2 \end{pmatrix} \qquad \text{Eq. (3.2)}$$

avec ν et E respectivement le coefficient de Poisson et le module d'Young , $r = \sqrt{x^2+y^2} =\mid \mathbf{x} \mid$. L'inversion de l'intégrale de Fredhom permet de retrouver le champ de traction.

➢ Méthode des éléments finis de frontière (BEM)

Cette méthode est la première qui a été utilisée pour reconstruire un champ de force de traction sur substrat déformable [Dembo 1999]. L'idée est de discrétiser l'intégrale de l'équation 3.1 sur un maillage de façon à ce que la distance entre 2 nœuds soit suffisamment petite pour justifier une interpolation entre les nœuds. L'équation 3.1 peut dorénavant s'écrire :

$$u_{i\mathbf{x}} = \sum_j \sum_{\mathbf{x}'} M_{ij\mathbf{x}\mathbf{x}'} f_{j\mathbf{x}'} \qquad \text{Eq. (3.3)}$$

La matrice M est densément peuplée et mal conditionnée, principalement à cause de la résolution limitée du champ de déplacement. L'inversion du problème étant très sensible au bruit, le champ de traction calculé est chaotique (Fig 3.3) et nécessite une étape de régularisation [Schwarz 2002] pour obtenir une solution stable. Cette régularisation consiste à contraindre la solution en minimisant l'erreur quadratique moyenne entre les déplacements mesurés et ceux calculés sous l'effet d'une pénalité qui limite les divergences. La méthode de régularisation introduite par Tikhonov consiste à minimiser la fonction :

$$\|u_{i\mathbf{x}} - \sum_{j,\mathbf{x}'} M_{ij\mathbf{x}\mathbf{x}'} f_{j\mathbf{x}'}\|^2 + \lambda^2 \|\sum_{j,\mathbf{x}'} L_{ij\mathbf{x}\mathbf{x}'} f_{j\mathbf{x}'}\|^2 \qquad \text{Eq. (3.4)}$$

L'étape de régularisation est délicate : trop forte, elle diminue la résolution spatiale des forces, trop faible, elle permet que des vecteurs aberrants subsistent dans le champ de traction. Différents critères comme le χ ou la L-curve sont utilisés pour aider à faire ces choix.

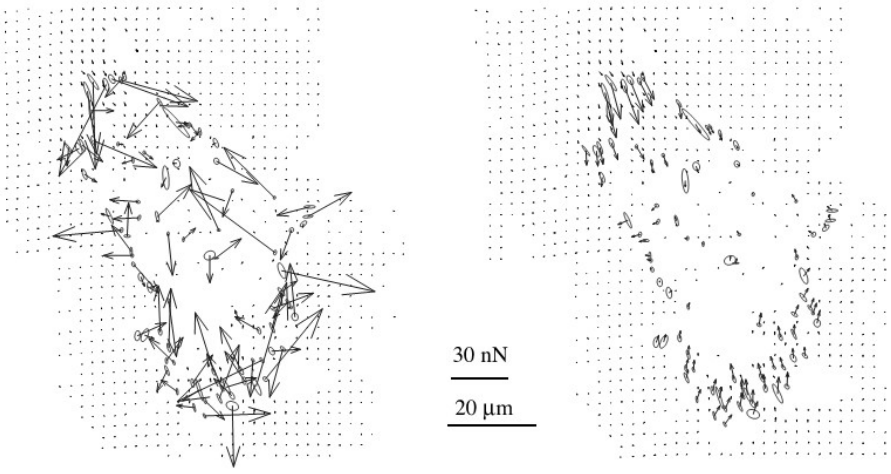


Figure 3.3 – Forces de traction d'une cellule avant et après régularisation. Le calcul de force est un problème mal conditionné, principalement à cause de la résolution limitée du champ de déplacement (image de gauche). Une étape de régularisation est nécessaire pour obtenir une solution stable (image de droite). [Schwarz 2002]

➢ Cytométrie de Traction par Transformée de Fourier (FTTC)

Butler et al. utilise la propriété qu'au travers d'une transformée de Fourier (TF) une équation de convolution devient une simple multiplication [Butler 2002]. L'équation de convolution des déplacements 3.1 devient, après une TF :

$$\tilde{u}_{i\mathbf{k}} = \left\{ \sum_j \tilde{G}_{ij} \tilde{f}_j \right\}_{\mathbf{k}}, \tilde{f}_{i\mathbf{k}} = \left\{ \sum_j \tilde{G}^{-1}_{ij} \tilde{u}_j \right\}_{\mathbf{k}} \qquad \text{Eq. (3.5)}$$

La fonction de Green dans l'espace de Fourier peut être calculée à partir de l'équation 3.2 :

$$\tilde{G}_{ij\mathbf{k}} = \frac{2(1+\nu)}{Ek^3} \begin{pmatrix} (1-\nu)k^2 + \nu k_y^2 & -\nu k_x k_y \\ -\nu k_x k_y & (1-\nu)k^2 + \nu k_x^2 \end{pmatrix} \qquad \text{Eq. (3.6)}$$

Lorsque $\mathbf{k}$ augmente, les termes de $\tilde{\mathbf{G}}(\mathbf{k})$ décroissent en $1/\mathrm{k}$ alors que pour son inverse $\tilde{\mathbf{G}}^{-1}(\mathbf{k})$ les valeurs augmentent avec k. Lorsque $\mathbf{k}$ devient très grand, le bruit des déplacements peut être notablement amplifié par $\tilde{\mathbf{G}}^{-1}(\mathbf{k})$ dans les forces résultantes et le problème peut devenir mal conditionné. Pour limiter ce problème Butler et al. utilisent une grille régulière de déplacements ce qui limite les plus hautes valeurs de $\mathbf{k}$. Cette stratégie correspond à une régularisation implicite.

Le champ de traction est obtenu en trois étapes : Premièrement une TF est appliquée sur le champ de déplacement. Ensuite l'équation 3.5 permet d'obtenir la TF des forces de traction pour chaque longueur d'onde. Enfin, une TF inverse sur l'ensemble du champ donne les forces de traction.

Deux approches de recouvrement des forces sont proposées : La méthode **non-contrainte** n'impose aucune condition sur la localisation des forces de traction. Elle prend en compte l'ensemble du champ de déplacement mesuré. Seule la composante continue de Fourier est fixée à 0 pour éliminer

les solutions de forces homogènes. A l'inverse la méthode **contrainte** impose la localisation des forces sous les cellules et fait abstraction des champs de déplacement hors du contour cellulaire. La méthode non-contrainte a l'avantage de ne pas nécessiter la connaissance du contour cellulaire et n'exclut pas d'informations sur les déplacements mais permet que des forces de traction puissent être générées ailleurs que sous la cellule. Comme tous les problèmes de Fourier discrets appliqués à un espace fini, la périodicité introduit des forces de traction artefactuelles aux limites du champ car les déplacements mesurés ne sont pas strictement périodiques. Lorsque le champ est contraint, le contour cellulaire doit être précisément connu pour que les forces sous le contour choisi n'aient pas à compenser des forces qui auraient été incorrectement définies comme nulles (cette remarque est aussi valable pour la méthode BEM). Des itérations sont alors nécessaires pour reconstruire un champ de déplacement similaire à la mesure expérimentale sous la cellule. Cette approche est alors plus coûteuse en calculs.

➢ Reconstruction avec des points de forces (TRPF)

Cette méthode introduite par Schwarz et al., est similaire à la **méthode des éléments finis de frontière** mais prend en compte la localisation des adhérences focales (vinculine) qui ont été préalablement marquées avec une molécule fluorescente. Il est supposé que toutes les forces de traction sont localisées en des points discrets connus. Le champ de traction est décrit comme une somme de fonctions de Dirac, $f_i(\mathbf{x}) = \sum_{\mathbf{x'}} F_{i\mathbf{x'}}\delta(\mathbf{x}-\mathbf{x'})$. L'intégrale de l'équation 3.1 est transformée en somme connectant chaque déplacement mesuré à l'ensemble des points de forces localisés. On arrive ainsi à un problème inverse discret avec G la solution de Boussinesq dans l'espace réel de l'équation 3.2 :

$$u_{i\mathbf{x}} = \sum_{j,\mathbf{x'}} G_{ij\mathbf{x}\mathbf{x'}} F_{j\mathbf{x'}} \qquad \text{Eq. (3.7)}$$

Cette équation peut être facilement inversée à l'aide d'une méthode de régularisation comme décrit dans la **méthode des éléments finis de frontière**.

➢ Résolution générique du problème élastique

L'équation 3.2 relie le champ de forces et le champ de déplacement dans le cas de forces appliquées à la surface d'un milieu élastique semi-infini élastiquement isotrope. Il peut être intéressant de généraliser le calcul des forces au cas où le substrat ne peut pas être supposé semi-infini ou lorsque sa géométrie se complexifie ou lorsque ses propriétés élastiques varient spatialement (cas des substrats à gradient de rigidité utilisés pour l'étude de la durotaxie [Lo 2000]. Dans tous ces cas, la fonction de Green n'est pas accessible analytiquement. Une méthode mise au point par Ambrosi [Ambrosi 2006] permet d'accéder au champ de forces connaissant le champ de déplacements dans des conditions plus générales. Brièvement, celle ci consiste à minimiser une fonctionnelle de coût (principe de la régularisation) sur les variables de déplacement et de force reliées par l'équation d'équilibre élastique au lieu d'être reliées par la solution formelle qu'est l'intégrale de Fredlhom (Eq. 3.1).

➢ Comparaison entre les différentes méthodes

Sabass et al. ont comparé les performances de trois méthodes présentées ci-dessus : BEM, FTTC et TRPF [Sabass 2008]. Leur analyse révèle l'importance d'un filtrage des champs de déplacement pour la FTTC et montre que certaines variantes de cette méthode (avec notamment l'ajout d'une étape de régularisation) pouvaient la rendre aussi performante que la BEM tout en étant beaucoup plus rapide. Ces deux méthodes sont fortement biaisées par des sites d'adhésion de petite taille. La méthode TRPF, en contraignant les forces aux sites adhésifs, permet d'obtenir une inversion plus précise. Mais elle repose sur l'hypothèse que les forces s'appliquent uniquement aux sites adhésifs ce qui ne semble pas toujours être le cas, en particulier pour les forces normales qui pourtant donnent lieu à des déplacements tangentiels.

Calcul direct : dérivation du champ de déformations

Yang et al sont les premiers à avoir utilisé une approche de calcul directe du champ de contrainte par éléments finis au lieu d'utiliser la solution de Boussinesq [Yang 2006]. Cette méthode permet de prendre en compte les effets de l'épaisseur finie du substrat dont ils montrent qu'elle influence l'amplitude des forces de traction.

Une fois le champ de déplacement connu, une Méthode par Éléments Finis (FEM) 3D permet de calculer le champ de traction. Le substrat étant en position d'équilibre, l'équation d'équilibre statique suivante doit être vérifiée :

$$[K]\{u\} = \{F\} \qquad \text{Eq. (3.8)}$$

avec $[K]$ la matrice globale de rigidité, $\{u\}$ le vecteur déplacement nodal, et $\{F\}$ le vecteur de force nodal. Cette condition d'équilibre peut être écrite en termes de sous-matrices et sous-vecteurs :

$$\begin{Bmatrix} [K_{cc}] & [K_{cs}] \\ [K_{cs}]^T & [K_{ss}] \end{Bmatrix} \begin{Bmatrix} \{u_c\} \\ \{u_s\} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} \{F_c\} \\ \{F_s\} \end{Bmatrix} \qquad \text{Eq. (3.9)}$$

avec l'indice s dénotant les degrés de liberté où les déplacements sont connus et c l'indice dénotant le reste des degrés de liberté où les forces sont connues. Les forces sur les nœuds situés à l'extérieur de la cellule sont considérées comme nulles. L'équation 3.9 devient alors :

$$\begin{Bmatrix} [K_{cc}] & [K_{cs}] \\ [K_{cs}]^T & [K_{ss}] \end{Bmatrix} \begin{Bmatrix} \{u_c\} \\ \{u_s\} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} \{0\} \\ \{F_s\} \end{Bmatrix} \qquad \text{Eq. (3.10)}$$

La première rangée de l'équation 3.10 permet d'exprimer les déplacements où les forces sont imposées comme nulles $\{u_c\}$ (même démarche que la FTTC contrainte) en fonction des déplacements connus $\{u_s\}$ car :

$$\{u_c\} = [K_{cc}]^{-1}(-[K_{cs}])\{u_s\} \qquad \text{Eq. (3.11)}$$

Après substitution on obtient le vecteur force correspondant aux vecteurs déplacements imposés $\{u_s\}$:

$$\{F_s\} = (-[K_{cs}]^T[K_{cc}]^{-1}[K_{cs}] + [K_{ss}])\{u_s\} \qquad \text{Eq. (3.12)}$$

$[K_{cc}]$ est la seule matrice qui nécessite une inversion. Elle peut toujours être inversée car définie positive. Les paramètres nécessaires à l'analyse FEM 3D sont les modules d'élasticité E et ν.

Cette méthode a l'avantage d'être plus rapide que celles qui résolvent le problème inverse, mais il est assez difficile de quantifier l'erreur sur le champ de traction calculé. Il serait intéressant de comparer les résultats obtenus par cette méthode avec le même jeu de données que les 3 méthodes précédentes. Il serait également intéressant de regarder les performances de cette méthode lorsque le champ n'est pas contraint.

Pour conclure sur ces différentes méthodes, chacune d'entre elle propose une régularisation plus ou moins explicite pour limiter l'impact du bruit sur le calcul des forces. Une des principales stratégies d'amélioration de la reconstruction du champ de traction est donc de réduire au maximum le bruit expérimental (qualité des gels, taille et densité des marqueurs, optique), et la qualité d'analyse des déplacements. Ensuite le choix d'une de ces méthodes peut dépendre de la nécessité de prendre en compte l'épaisseur du substrat, de pouvoir accéder au contour cellulaire, de la résolution visée ou de la capacité de calcul.

3.1.4 Méthodes expérimentales

Dans cette section nous décrivons les différentes étapes expérimentales qui conduisent à la mesure du champ de déformation induit par les cellules à la surface des hydrogels.

3.1.4.1 Fabrication des hydrogels

Les forces cellulaires attendues sont de l'ordre du $nN/\mu m^2$ [Schwarz 2007]. Pour pouvoir détecter un champ de déformation accessible à la microscopie optique, le substrat déformable doit donc avoir un module élastique de l'ordre du kPa. Par ailleurs, moins il est visqueux et plus son comportement élastique s'étend sur de grandes déformations, plus la mesure sera reproductible. Les hydrogels remplissent ces conditions dans la gamme de rigidité du kPa et sont donc de parfaits candidats comme substrats pour la mesure des forces cellulaires. Parmi eux, le polyacrylamide (PA) a de nombreux avantages. (i) Il est facile de moduler sa rigidité [Pelham 1997], (ii) l'adsorption non spécifique de protéines à sa surface est très faible [Georges 2005], (iii) il n'est pas biodégradable, les cellules ne peuvent pas le dégrader (iv) la taille de ses pores (100nm) empêche les cellules de pénétrer à l'intérieur, (v) il est transparent. Cela en fait donc un substrat dont les propriétés physiques et chimiques au cours d'une culture cellulaire restent relativement constantes dans le temps.

La méthode la plus courante pour obtenir des hydrogels en PA de rigidité homogène consiste à utiliser un mélange d'acrylamide (monomère) et de bis-acrylamide (réticulant) dont la polymérisation est initiée par un mélange d'ammonium persulfate (APS) et de tétramethylethylenediamine (TEMED). Une simple modification du ratio acrylamide/bis-acrylamide permet d'ajuster la rigidité des hydrogels. Les billes fluorescentes qui vont servir de marqueurs des déplacements sont incorporées à la solution contenant l'acrylamide et le bis acrylamide, avant réticulation.

Nous utilisons une méthode de réticulation du PA par photopolymérisation développée au laboratoire [Mgharbel 2011] et inspirée de [Wong 2003]. Cette méthode polymérise les gels à l'aide d'un photoinitiateur activable par UV à la place de l'APS-TEMED. Cette technique permet de réaliser des gradients de rigidité au sein des hydrogels. Dans cette thèse nous travaillons uniquement avec des gels de rigidité homogène. Dans notre cas les avantages de cette méthode sont la rapidité de polymérisation des gels et une plus grande homogénéité de la rigidité comparativement à la polymérisation chimique.

3.1.4.2 Fonctionnalisation des hydrogels

L'adsorption non spécifique de protéines à la surface des hydrogels de PA est très faible. Les cellules ne peuvent donc adhérer à la surface du gel que si les gels sont fonctionnalisés en surface avec des protéines de la matrice extracellulaire (MEC). Parmi ces protéines, les plus communes sont le collagène, et la fibronectine. Le choix de la protéine d'adhésion n'est pas anodin car chaque type de ligand peut activer un type spécifique d'intégrines et donc affecter le comportement cellulaire. Les cellules musculaires sont plus résistantes au détachement provoqué par un flux lorsque qu'elles adhèrent sur une matrice de fibronectine par rapport à leur adhésion sur une matrice de collagène IV [DiMilla 1993]. La densité de ligands à la surface des hydrogels est également un paramètre important, son augmentation module les forces de tractions cellulaires [Reinhart-King 2002], l'étalement et la motilité des cellules [Engler 2004],[Peyton 2005].

La fixation des protéines sur la surface de PA s'effectue de manière covalente, généralement à l'aide d'une molécule hétérobifonctionnelle photoactivable comme le sulfo-SANPAH (sulfosuccinimidyl 6 (4-azido-2-nitrophenyl-amino) hexanoate) [Dembo 1999]. Cette molécule possède à une de ses extrémités un groupement ester succinimidyle, qui peut se lier spontanément aux groupements amines des protéines, et à l'autre extrémité un groupement phenylazide, qui, lorsqu'il est activé par un rayonnement UV, réagit de façon non spécifique avec de nombreuses espèces chimiques inertes dont l'eau et le polyacrylamide. Cette réactivité non spécifique du groupement phenylazide est à l'origine de la difficulté de contrôle de la quantité et de l'homogénéité du greffage des protéines à la surface du polyacrylamide.

3.1.4.3 Microscopie

L'analyse des déformations engendrées par les cellules à la surface des hydrogels nécessite l'acquisition de trois types d'images : une image des cellules en contraste de phase, une image en fluorescence du plan de billes sous les cellules aux différents temps d'observation puis une image de ce même plan,

une fois les cellules détachées du substrat (par action de la trypsine par exemple). Cette dernière image sert de référence pour connaître la position des billes dans le gel non déformé. Si les déformations sont étudiées en 3 dimensions, une pile d'images des billes est réalisée à l'aide d'un microscope confocal ou d'un videomicroscope équipé d'un système motorisé précis de déplacement en Z (type piezoélectrique ou moteur pas à pas). Dans le cas d'une acquisition au vidéomicroscope, la profondeur de champ est plus grande qu'en microscopie confocale, les billes sont donc visibles sur un nombre de plans plus important pour une même distance de séparation entre plans. Cette différence est prise en compte dans les paramètres de PTV (Particle Tracking Velocimetry),(voir section 3.1.4.4) avec un paramètre qui fixe le nombre de plans dans lequel une bille peut se trouver. Pour obtenir une précision satisfaisante sur la mesure des déplacements, les acquisitions sont généralement réalisées à l'aide d'un objectif de grossissement 40x ou 60x couplé à un système anti-vibrations et à une caméra à bas niveau de bruit qui limitent physiquement le bruit de détection sur la position des billes.

3.1.4.4 Techniques d'analyse des déplacements

La finesse de reconstitution du champ de déplacement est un paramètre essentiel du fait de la sensibilité du calcul des forces de traction au bruit. Lorsque les acquisitions ont été réalisées, on dispose des images des billes fluorescentes avant et après déformation du gel induites par les forces de traction cellulaire. Dans un premier temps les images doivent être alignées entre elles pour corriger la dérive de la platine du microscope. Il existe ensuite 2 stratégies d'analyse des déplacements : la vélocimétrie par imagerie de particules (PIV : Particle Imaging Velocimetry) et la velocimétrie par suivi de particules PTV. Dans le premier cas les images des gels avant et après déformation sont découpées en petites fenêtres régulières qui sont comparées les unes par rapport aux autres pour identifier leur déplacement. La deuxième méthode consiste à suivre le déplacement individuel des billes.

➢ Réalignement des images

Au cours des acquisitions, la platine supportant l'échantillon va subir de petites variations de position. L'amplitude de ces variations dépend de la précision de déplacement de la platine, c'est à dire la précision avec laquelle elle peut revenir à sa position initiale lorsque des acquisitions sont réalisées sur différentes positions. Elle dépend également de la stabilité thermique du dispositif expérimental, les variations thermiques provoquant une contraction ou dilatation des matériaux constituant le microscope. L'alignement des images s'effectue à l'aide des zones du gel qui n'ont pas été déformées par les cellules. Un algorithme de corrélation croisée (voir PIV) permet de comparer ces zones non déformées avec l'image de référence (sans les cellules) pour déterminer les corrections à apporter dans les directions x et y. L'erreur que nous estimons sur les déplacements est obtenue en mesurant les déplacements sur les images des zones non déformées par rapport à la référence une fois les images réalignées. La précision d'alignement se situe entre 50 et 100 nm en fonction de la qualité des acquisitions.

➢ Vélocimétrie par suivi de particules (PTV)

Le **"tracking" de particules** consiste à déterminer individuellement les déplacements des différentes billes contenues dans l'image. Les algorithmes que nous avons utilisés pour réaliser les différentes étapes de tracking on été développés par Crocker et Grier en langage **IDL** [Crocker 1996] et adapté en langage **Matlab** par **Eric Dufresne** et **Daniel Blair**. Le tracking peut se décomposer en trois grandes étapes : l'identification des billes, leur localisation puis leur association avec les billes de l'image de référence.

1 : Identification

La première étape en **PTV** consiste à identifier les billes contenues dans l'image. Ces images sont composées de pixels ayant différents niveaux de gris. L'étendue de la gamme de niveau de gris est définie par le format d'acquisition et est généralement de 16 bits. Les billes étant fluorescentes, leur intensité est plus élevée que celle du substrat. Cette différence de contraste d'intensité est à la base de la localisation des billes.

Pour une identification optimale des billes, ces dernières doivent fluorescer avec un profil d'intensité gaussien, le fond de l'image ayant une intensité quasi nulle. Ces conditions sont obtenues avec l'utilisation d'un filtre passe bande qui permet de lisser l'image et d'en soustraire le bruit de fond lorsqu'un paramètre d'intensité seuil a été fourni (Fig 3.4-3). Pour la détection des billes, les paramètres fournis sont l'estimation de la taille du diamètre des billes en pixels ainsi que la valeur d'intensité seuil correspondant à la présence d'une bille. Il est donc important d'avoir une image dont l'intensité soit la plus homogène possible sur l'ensemble de l'image (réglages optiques optimaux) pour éviter que des variations trop importantes du seuil entre l'intensité des billes et celui du fond de l'image ne viennent perturber la détection. Pour affiner la localisation des billes, on peut ajouter un paramètre qui fixe la distance minimale entre le centre des billes. La densité des billes est un paramètre important car la présence d'agrégation de billes dans le gel ou une trop forte densité de billes vont perturber leur identification, la taille et le profil d'intensité des billes s'éloignant de la taille paramétrée et du profil gaussien attendu.

2 : Localisation

La localisation des billes est d'abord obtenue avec une résolution de l'ordre du pixel en identifiant les maximum d'intensité locaux puis une localisation sub-pixel peut être atteinte en calculant le centroïde des maximums trouvés (Fig 3.4-4). Il est possible d'obtenir une résolution de 0.1 pixel sur la localisation des billes pour des images ayant un faible niveau de bruit et des motifs de taille supérieurs à 5 pixels. En plus des coordonnées x, y (et z si tracking 3D) des centroïdes, 4 autres caractéristiques des billes sont relevées : la valeur d'intensité intégrée sur toute la bille, la hauteur du pic d'intensité, son rayon de giration (distance moyenne entre les bords de la bille et son centre de masse) et son excentricité.

3 : Association

Lorsque les coordonnées et les caractéristiques des billes sont connues, une étape de **tracking** permet de réassocier les couples de billes provenant des images obtenues avant et après déformation du substrat. Cette étape nécessite de trouver dans les 2 ensembles d'images, les particules qui ont les caractéristiques les plus proches. Un rayon à l'intérieur duquel la particule recherchée est supposée se trouver est défini. Si la densité de billes est élevée (ce qui est une condition pour obtenir une bonne résolution) et que leurs déplacements sont importants (gel mou), le risque d'erreur de ré-association des billes est grand car la probabilité de rencontrer une autre bille ayant des caractéristiques similaires à la bille recherchée est importante. [Delanoe-Ayari 2010] qui a été confrontée à ce problème lors de tracking 3D sur gel mou a développé une méthode de pré-tracking qui consiste à utiliser un PIV 3D avant l'étape de tracking de façon à orienter la recherche des billes et diminuer la taille du rayon dans lequel la recherche de billes partenaires va s'effectuer.

La technique du tracking conduit à un champ de déplacement dont la résolution et l'homogénéité dépend de la quantité et de la régularité des marqueurs fluorescents contenus dans les gels. Une autre méthode, la vélocimétrie par imagerie de particules (PIV), permet d'obtenir un champ de vitesse en tout point de l'espace par corrélation entre deux images.

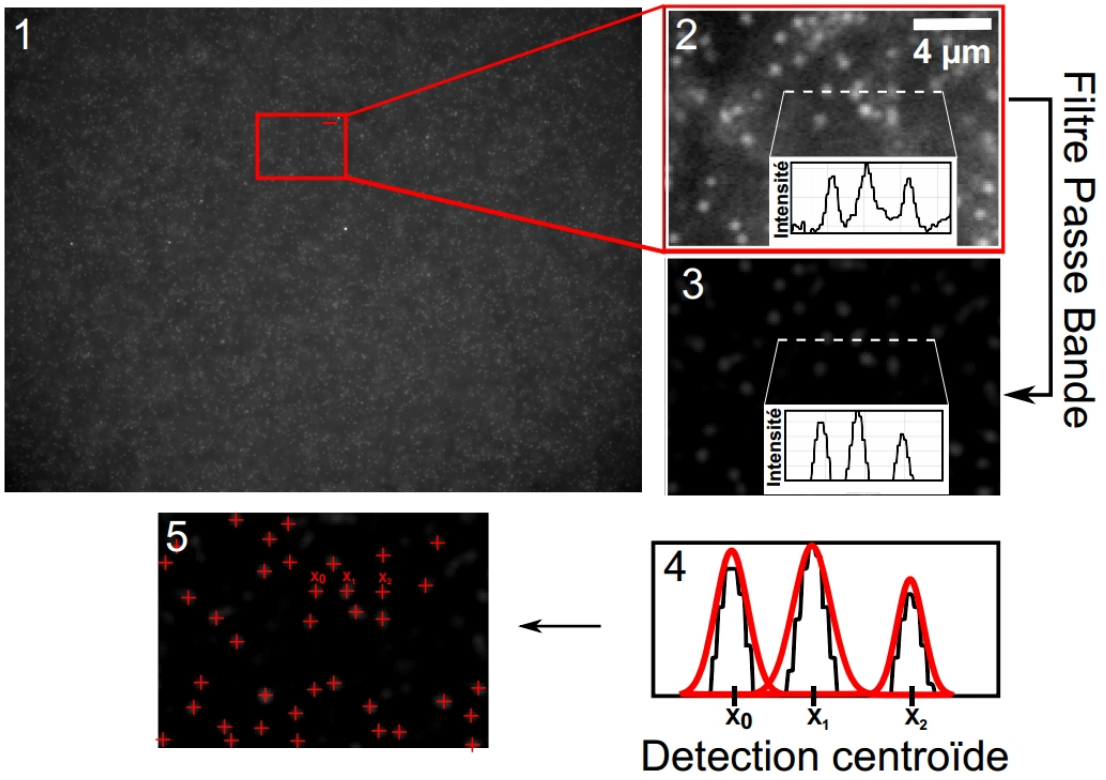


Figure 3.4 – Identification et localisation des billes en PTV. 1) Image en fluorescence des billes au voisinage de la surface du gel. 2) Profil d'intensité des billes fluorescentes. 3) Lissage du profil d'intensité à l'aide d'un filtre passe bande. 4) Détection des centroïdes des billes à l'aide d'un fit gaussien sur les profils d'intensité. 5) Résultat de l'indentification des positions des billes en PTV.

Vélocimétrie par imagerie de particules (PIV) :

La PIV est une technique couramment utilisée en hydrodynamique pour mesurer des champs de vitesses dans un écoulement [Raffel 1998]. Elle repose sur un calcul de corrélation entre 2 images successives afin de déterminer le déplacement moyen de traceurs contenus dans l'écoulement.

Après acquisition, l'image du champ de billes est divisée en petites fenêtres d'interrogation (Fig3.5). Chaque portion de l'image est comparée avec l'image de référence, image renseignant sur la répartition des billes lorsqu'aucune force n'est appliquée sur le gel. Les petites fenêtres sont déplacées jusqu'à ce que leur superposition avec la fenêtre de même localisation sur l'image de référence soit la meilleure possible. La qualité de cette superposition est évaluée à l'aide d'un algorithme de corrélation croisée et se traduit par un pic dans le plan d'intercorrélation lorsque le recouvrement est optimal. Le vecteur déplacement de la fenêtre d'interrogation correspond au nombre de pixels dans les directions x et y qui ont été utilisés pour déplacer la fenêtre d'interrogation jusqu'à la superposition optimale. On calcule ainsi un champ de déplacement régulier moyenné sur la taille d'une fenêtre.

Nous avons utilisé l'algorithme MatPIV v1.6 développé par **Kristian Sveen** pour extraire les champs des déplacements. Cette routine est fournie avec un set de filtres qui permet de corriger d'éventuels vecteurs aberrants.

Un des paramètres les plus importants en PIV est le choix de la taille de la fenêtre d'interrogation. Cette dernière va en effet influer sur la résolution des déplacements mesurés et agir comme un filtre qui va masquer les mouvements inférieurs à la taille de fenêtre et les déplacements supérieurs à la moitié de la taille de la fenêtre (voir calcul FFT). La PIV fait translater des fenêtres les unes par rapport aux autres et un mouvement de rotation ou un gradient dont l'échelle est inférieure à la taille de la fenêtre sera masqué. A l'inverse une taille de fenêtre trop petite diminuerait le nombre de structures

à corréler et pourrait conduire à des erreurs de recouvrement. Dans notre cas, les déplacements des billes s'étendent jusqu'à $\sim$ 20 pixels, et nous imposent de travailler avec une fenêtre de 64x64 pixels ; une fenêtre de 32x32 pixels autoriserait la détection des déplacements d'au maximum 16 pixels et nous ferait donc perdre une partie de l'information.

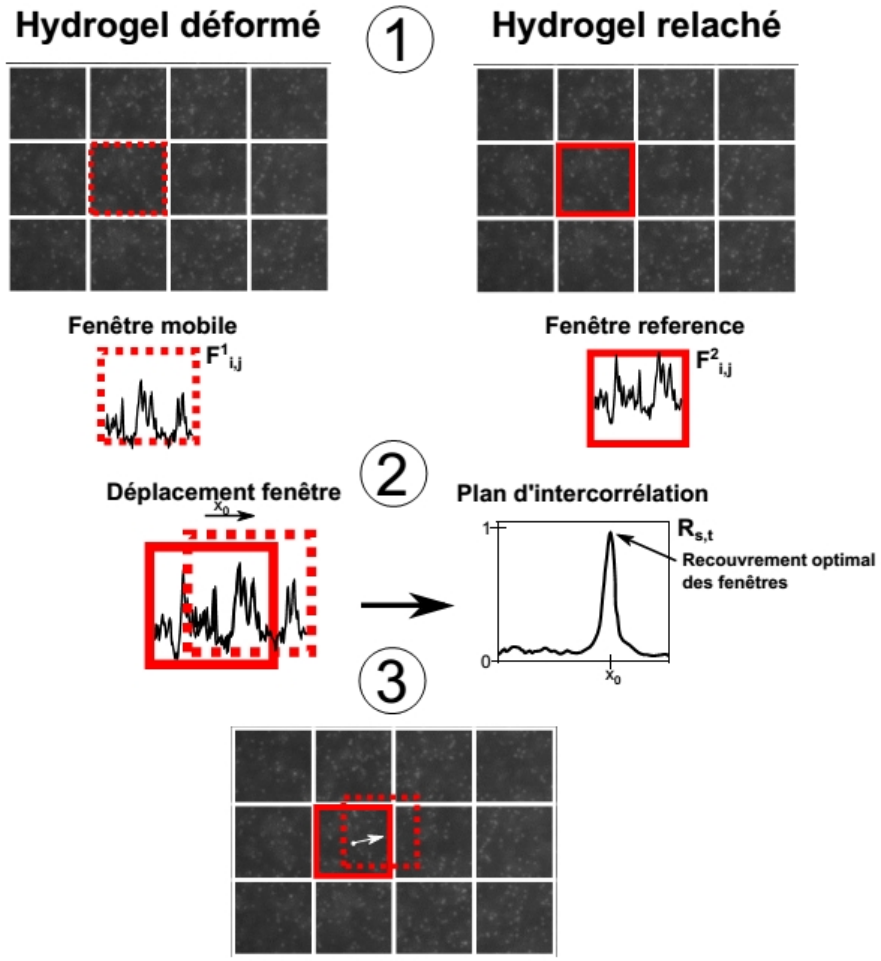


Figure 3.5 – Différentes étapes de la PIV. 1) Découpage en petites fenêtres (32x32 pixels) des images en fluorescence des billes au voisinage de la surface. 2) La fenêtre de référence est déplacée autour de sa position initiale et comparée avec les fenêtres voisines. Le pic dans le plan d'intercorrélation correspond au recouvrement maximal des fenêtres. 3) Résultat de l'indentification du déplacement des fenêtres en PIV.

Pour estimer la qualité de recouvrement des fenêtres, nous avons utilisé la méthode **single** de MatPIV qui utilise l'équation de corrélation croisée :

$$R_e(s,t) = \sum_{m=0}^{n-1} \sum_{p=0}^{n-1} F^1_{i,j}(m,p).F^2_{i,j}(m-s,p-t) \qquad \text{Eq. (3.13)}$$

avec $F^1_{i,j}$ et $F^2_{i,j}$ les sous fenêtres des images 1 et 2, n la taille des fenêtres. $R(s,t)$ est maximal lorsque la superposition des fenêtres est optimale. Pour accélérer la vitesse du calcul de la corrélation croisée, l'équation 3.13 est calculée dans l'espace de Fourier, par FFT. L'utilisation de la FFT limite la recherche du maximum de corrélation à la moitié de la taille de la fenêtre choisie. C'est la raison pour laquelle on utilisera une taille de fenêtre de 64*64 pixels pour des déplacements maximaux de

32 pixels. La localisation du maximum de $R(s,t)$, dont les coordonnées constituent l'estimation du déplacement, est d'abord estimée avec une précision de l'ordre du pixel puis affinée à l'aide d'une interpolation gaussienne. La précision est alors de l'ordre de 0.2 pixels [Raffel 1998].

Lorsque le champ de déplacements a été calculé, en fonction de la qualité des images des billes, il est parfois nécessaire de filtrer certains vecteurs aberrants puis de les interpoler. Ces filtres doivent être utilisés avec précaution et les déplacements suspects vérifiés à "l'œil" directement sur les images des billes pour ne pas trop lisser les champs de déplacements et perdre des informations importantes.

➢ Comparaison PIV/PTV

Les champs de déplacement obtenus par les 2 méthodes ont des profils différents : dans un cas on suit la trajectoire individuelle des particules, on obtient donc un champ de déplacement dont la résolution est variable car elle est fonction de la densité locale des particules. A l'inverse la technique de PIV, qui moyenne les déplacements sur une taille de fenêtre choisie, fournit un champ de déplacement régulier sur l'ensemble de l'image.

Nous avons testé les performances des 2 méthodes, avec différents paramètres pour mesurer les déplacements générés par une monocouche de cellules endothéliales exerçant des forces de traction sur un gel de 5 kPa. Pour juger de la fidélité de reconstruction du champ de déplacement par les 2 méthodes, nous avons effectué un tracking manuel visuel des billes. Ce tracking sert de référence (Fig 3.6-1). L'œil ne permet pas d'obtenir une résolution subpixel, mais la résolution de l'ordre du pixel est suffisante pour estimer correctement l'amplitude et la direction de la trajectoire des billes. Ces résultats ont été comparés à ceux de la méthode par PIV pour 2 tailles de fenêtre différentes, ainsi qu'avec la méthode PTV, avec ou sans pré-tracking.

Une première estimation manuelle de la taille des déplacements nous donne une valeur maximale de l'ordre de 16 pixels. Cette valeur nous place à la limite d'une taille de fenêtre de 32x32 et 64x64 pixels. Nous avons donc estimé les déplacements avec ces deux tailles de fenêtre. Les déplacements obtenus avec une fenêtre de 64x64 pixels sont conformes en amplitude et directions avec les 'vrais' déplacements (Fig 3.6-2). Avec une fenêtre de 32x32 pixels les déplacements ayant des fortes amplitudes sont plus difficilement détectables (faible recouvrement du plan d'intercorrélation) et vont donc se traduire par des vecteurs aberrants (Fig 3.6-3). Dans cet exemple, les vecteurs aberrants étant minoritaires, ils peuvent être supprimés avec une filtre médian puis interpolés sur la base du déplacement de leurs voisins (Fig 3.6-4).

Le PTV sans prétracking est également très bruité dans les zones de forts déplacements (Fig 3.6-5). Ceci vient du fait que l'on ne peut rechercher les positions des billes dans un disque de diamètre inférieur à 10 pixels autour des billes de référence. Avec un disque de diamètre supérieur, le nombre de combinaisons possibles d'association des billes devient trop important. Le tracking avec pré-tracking ne souffre plus de ces zones de fort déplacement mais il subsiste des zones d'erreurs, notamment en haut à gauche de l'image, et ce malgré la bonne orientation des vecteurs dans le PIV utilisé pour le pré-tracking (Fig 3.6-6). La raison est peut être la forte densité des billes dans cette zone.

La méthode qui a permis d'obtenir le champ de déplacements le plus fidèle à la réalité est la méthode PIV avec une fenêtre de 64x64 pixels. Le fait de moyenner les déplacements sur une zone de $3\mu m^2$ ne fait pas perdre d'informations importantes, tels que les plus petits mouvements à l'échelle cellulaire, car, comme nous le verrons en section 3.2.4.2, les déformations du gel sont corrélées sur des distances supérieures à la taille de cette fenêtre choisie. En outre, la PIV est très rapide numériquement et fournit un champ de déplacement en tout point de l'image. Cette méthode se révèle donc très pratique pour des analyses comme le calcul de corrélations des déplacements ou des forces.

La méthode PTV est plus lourde à mettre en œuvre, notamment lorsque l'on travaille avec des images de grande taille pour lesquelles le calcul des trajectoires peut rapidement devenir

coûteux en mémoire et en puissance de calcul. Mais c'est la seule méthode qui permette de distinguer des mouvements très localisés qui passeraient inaperçus s'ils étaient moyennés comme dans la méthode en PIV. Réduire la taille des déplacements en augmentant la rigidité des gels permet de faciliter le tracking mais masque les déplacements de faible amplitude qui se retrouvent noyés dans le bruit. La méthode de pré-tracking est donc indispensable si l'on doit détecter de grands déplacements. Des améliorations en termes de résolution peuvent également être apportées notamment par l'utilisation de 2 marqueurs de couleurs différentes [Sabass 2008].

Dans la suite des analyses, nous avons utilisé la PIV pour mesurer des déplacements en 2D. La méthode PTV a été utilisée pour contrôler que la méthode PIV ne masque pas de petits déplacements notamment autour des jonctions intercellulaires.

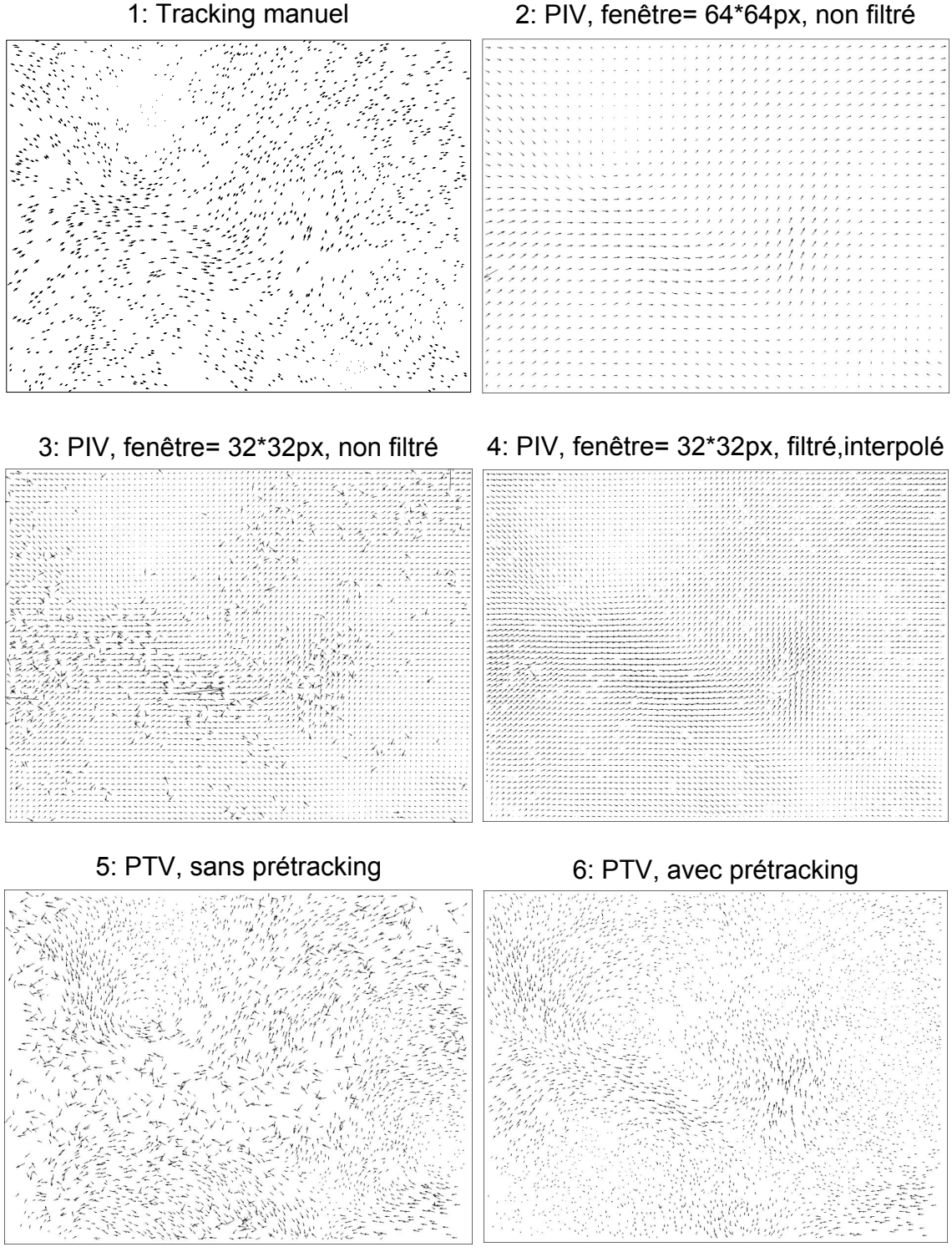


Figure 3.6 – Comparaison des différentes méthodes de reconstitution du champ de déplacement

3.2 Cellule isolée versus tissu

Le passage de l'étude d'une cellule isolée à un tissu cellulaire engendre de nouvelles contraintes tant expérimentales que pour le calcul des forces transmises au substrat. Dans cette section, nous détaillons ces nouvelles contraintes et nous décrivons les méthodes expérimentales développées et l'approche calculatoire choisie pour s'adapter à ces nouvelles conditions. Ces méthodes ont été ensuite appliquées à la mesure des forces développées par des monocouches de cellules endothéliales.

3.2.1 De nouvelles conditions aux limites à prendre en compte

Lorsque l'on étudie des cellules isolées ou de petits îlots cellulaires, une partie du substrat n'est pas recouverte de cellules et n'est donc pas soumise à des forces cellulaires. A une distance équivalente à la taille des cellules, la déformation du substrat est tout à fait négligeable, indétectable. Ces zones non déformées sont utilisées comme référence pour aligner les images. Dans le cas de monocouches cellulaires occupant toute la surface du substrat, il ne subsiste plus de zones du gel non déformées. L'alignement des images ne peut donc plus se faire par référence à des régions de la surface du gel non déformées. Par ailleurs, la plupart des méthodes de calcul de forces détaillées dans la section 3.1.3, (Boussinesq, méthode de l'adjoint ou Fourier), utilisent des conditions aux limites de force nulle et déplacement nul sur les bords de l'image. Elles ne sont donc a priori pas adaptées au calcul de forces sous une monocouche cellulaire, où les forces et le champ de déplacement en bordure d'image sont données par l'activité des cellules extérieures au champ de vision. Pour pallier cette inconnue, [Tambe 2013] et [Hur 2012] ont évalué numériquement l'influence de différentes conditions aux limites et défini une distance à partir de laquelle la région d'observation des forces est indépendante des conditions aux limites sur le bord de la monocouche. Nous discutons l'évaluation expérimentale et numérique de l'influence des bords de la monocouche sur la validité du calcul des forces.

➢ **Évaluation expérimentale**

Dans les travaux de Tambe et al, l'évaluation expérimentale de l'erreur introduite par les conditions aux limites non-nulles sur les bords est réalisée à partir d'un large îlot de **RPME** (cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires de rats) s'étendant sur plusieurs mm^2 (Fig 3.7-B). Le large champ d'observation a été obtenu par l'acquisition d'une mosaïque d'images qui ont ensuite été alignées les unes par rapport aux autres. L'îlot n'occupant pas la totalité du substrat, les forces de traction sont calculées avec des conditions aux limites connues à l'aide de la méthode de la FTTC contrainte (sect 3.1.3). Elles constituent la référence pour les valeurs de forces sur l'ensemble de l'îlot, obtenues avec un calcul exact (Fig 3.7-A). Les auteurs extraient ensuite de ces forces exercées sur le substrat les contraintes internes à la monocouche (voir chapitre 4). Les erreurs liées aux choix des conditions aux limites de la monocouche sont évaluées au travers des contraintes internes et non directement par les forces de traction.

Les contraintes de référence sont ensuite comparées avec les contraintes obtenues à l'intérieur d'une région de 800*800μm au centre de l'îlot cellulaire, sans bords libres, calculées en fixant des déplacements normaux nuls et des contraintes tangentielles nulles sur les quatre bords de la région d'observation (contraintes avec bords optiques) (Fig 3.7-D,H). Les auteurs retirent ensuite une bande périphérique correspondant à 20 % de la taille de la région d'ob-

servation soit 150 μm et comparent le résultat des contraintes calculées dans la sous région avec les contraintes calculées par le calcul de référence.

Les résultats de ces comparaisons montrent que les conditions aux limites au niveau des bords optiques introduisent des artefacts dans la distribution des contraintes de la monocouche et plus particulièrement au niveau des bords optiques. Ces artefacts qui sont hétérogènes et assez importants au voisinage des bords optiques, s'affaiblissent et s'homogénéisent dans les régions plus éloignées des bords (Fig 3.7-E,I). Les paramètres de régression pour un fit linéaire, $\delta y_i = m\delta x_i + c$, ont des valeurs de corrélation r^2=0.92 et r^2=0.98 respectivement avant et après découpe pour l'amplitude moyenne des contraintes normales dans la monocouche et de r^2=0.7 et r^2=0.84 pour les contraintes tangentielles maximales. L'amplitude moyenne des contraintes normales est cependant sous estimée, avec un décalage de 26.7 Pa par rapport à la référence (Fig 3.7-F,J).

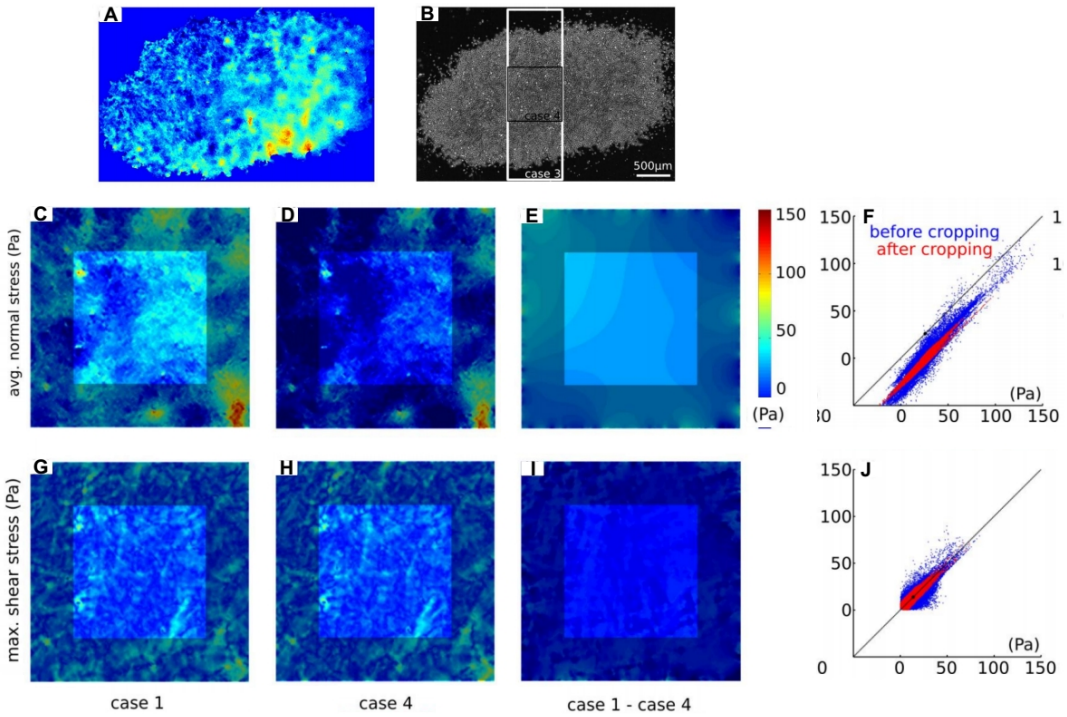


Figure 3.7 – Évaluation expérimentale de l'erreur introduite par les conditions aux limites non connues sur les bords optiques. A : Cartographie des contraintes intracellulaires d'un large îlot de plusieurs mm^2 de cellules RPME. Ces contraintes servent de référence car les conditions aux limites sont connues. B : Image en contraste de phase de l'îlot de cellules RPME. C,G : Pour évaluer les erreurs induites par la méconnaissance des conditions aux limites, les contraintes (normales et tangentielles) sont calculées sur une région centrale de l'ilot et comparées avec les contraintes de référence (cas1). (D,H) : La même démarche est ensuite réalisée en retirant une bande de 120 μm le long des bords optiques (cas 4). (E,I) : La différence avec les contraintes après avoir retiré la bande de 120 μm (cas 1- cas4) montre que les erreurs sont principalement contenues dans cette bande 120 μm. F,J : Diagramme des contraintes avant et après soustraction de la bande de 120 μm le long des bords. Paramètres de régression pour un fit linéaire pour F et J , $\delta y_i = m\delta x_i + c$: points bleus , (F) m=1.12, c=-26.1 Pa, r^2=0.92, (J) m=0.82, c=-1.04 Pa, r^2=0.7, points rouges , (F) m=1.07, c=-26.7 Pa, r^2=0.98, (J) m=0.89, c=-0.25 Pa, r^2=0.84. La taille de la région d'intérêt est de 830μm x830μm.[Tambe 2013]

Une démarche similaire d'exclusion d'une bande périphérique est proposée par Hur [Hur 2012] dans le cadre de l'étude d'une monocouche **BAEC** (cellules endothéliales aortiques bovines). Les auteurs calculent des forces de traction tridimensionnelles par FEM (section 3.1.3) en

imposant cette fois des conditions aux limites de forces nulles. La largeur de la bande d'exclusion est choisie à $10\mu m$ pour des images d'une taille de 110 μm*144μm. Ce découpage est donc beaucoup moins restrictif que dans les travaux de Tambe [Tambe 2013], avec un facteur 6 fois moins élevé. Il n'y a pas de vérification expérimentale de la validité de la taille de la bande d'exclusion choisie mais une justification à l'aide de simulations numériques qui sont décrites dans le paragraphe suivant. Cependant Tambe et al., en reprenant les caractéristiques du système de Hur et al. ont trouvé une corrélation plus faible, r^2=0.58 qu'avec leurs conditions aux limites symétriques et leur découpes plus larges r^2=0.98. Cette comparaison ne distingue pas la part de la contribution du choix des conditions aux limites et la part de la taille de la bande d'exclusion dans la différence de valeur de corrélation observée.

➢ **Évaluation numérique**

Pour analyser de quelle manière la perturbation des conditions aux limites se propage dans la région d'intérêt, Tambe et al. ont imposé une perturbation sinusoïdale sur un bord optique (Fig 3.8). Deux types de perturbations sont simulées, l'une sur les déplacements normaux, $u_n(y) = u_n \sin(2\pi y/\lambda)$, l'autre sur les contraintes : $\sigma_{xy} = \sigma_{xy} \sin(2\pi y/\lambda)$. Les déplacements normaux induisent une contrainte normale moyenne qui décroit de façon monotone avec la distance au bord optique. La longueur de décroissance est comparable à la longueur d'onde de la perturbation. Des résultats similaires sont obtenus lorsque la perturbation est une contrainte sinusoïdale.

Hur et al. ont également analysé l'impact d'une perturbation induite par des points de force extérieurs à la fenêtre d'observation. 8 paires de forces de 1 nN sont placées en dehors du champ d'observation (Fig 3.9-A). Les paires simulent un équilibre entre cellules. La séparation entre une paire de forces et entre un point de force et le champ d'observation est de $10\mu m$. Le champ de déformation résultant de cette perturbation décroit de 95 % sur une distance de l'ordre d'une taille cellulaire (Fig 3.9-B). Hur et al. analysent ensuite l'impact d'un champ de déplacement non nul à l'extérieur du champ d'observation sur la valeur des forces d'une cellule située à l'intérieur champ d'observation (Fig 3.9-C). La différence calculée sur le champ de traction est inférieure à 8 % et de seulement 1-2 % au centre de l'image (Fig 3.9-E). Hur et al. en déduisent que les effets des forces de traction induites par les cellules en dehors du champ de vision sont insignifiants sur le champ de traction calculé dans le champ de vision dès lors que l'on exclut les données sur une bande de largeur égale à une taille cellulaire adjacente au bord optique.

3.2.2 Conclusion

L'objectif visé par ces simulations consiste à quantifier l'impact de la méconnaissance des conditions aux limites sur la propagation de l'erreur sur les forces calculées à l'intérieur du champ d'observation. En effet, les cellules forment une monocouche continue entre l'intérieur et l'extérieur du champ d'observation.
Pour leur simulations, Hur et al. modélisent 8 dipôles de forces à l'équilibre pour représenter les effets de la monocouche. Ces effets se limitent donc à des interactions se produisant sur un doublet de cellules et ne prennent pas en compte des interactions qui auraient lieu à plus grande distance entre un nombre plus élevé de cellules.

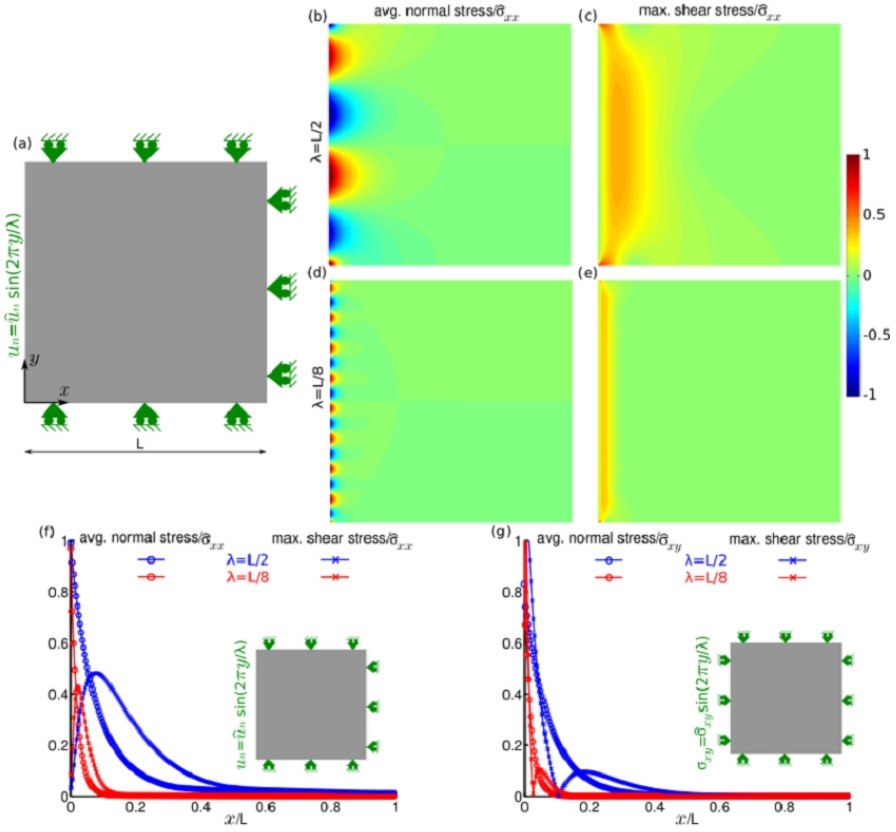


Figure 3.8 – Évaluation numérique de la distance de propagation des contraintes dans une monocouche suite à une perturbation sinusoïdale. (a) Une couche mince représentant une monocouche cellulaire est soumise à une perturbation sinusoïdale en déplacements $u_n = u_n \sin(2\pi y/\lambda)$ sur un des bords et $u_n = 0$ sur les deux autre bords. (b) Carte des contraintes normales moyennes et (c) carte des contraintes tangentielles maximales lorsque λ=L/2. (d-e) Les cartes de contraintes lorsque λ=L/8. (f) Décroissance du mode de Fourier dominant dans les contraintes induites par les conditions aux limites représentées dans l'encadré. Les courbes bleues correspondent à λ=L/2 et les courbes rouges à λ=L/8. Les courbes marquées avec des cercles représentent les contraintes normales moyennes et les courbes avec des croix représentent les contraintes tangentielles maximales. (g) Courbes décroissantes des contraintes induites par les conditions aux limites représentées dans l'encadré. [Tambe 2013]

Tambe et al. simulent la propagation d'une contrainte provoquée par une perturbation sinusoïdale qui est soit un déplacement, soit une contrainte. La distance de propagation qui en résulte est dépendante de la longueur d'onde de la perturbation. Cette simulation pose alors le problème du choix de la longueur de perturbation et de l'amplitude des contraintes. Comment déterminer ces différents paramètres ?

L'approche qui semble la plus pertinente pour déterminer l'impact de la taille des bords sur les conditions aux limites semble être la démarche expérimentale suivie par Tambe et al. qui se basent sur un vrai champ de contraintes sans hypothèses sous-jacentes.

Cette propagation des erreurs étant probablement type cellulaire dépendant (l'amplitude et la distribution des forces pouvant varier d'un type cellulaire à l'autre), et le calcul de Tambe et al étant effectué sur les contraintes intracellulaires et non directement sur les forces

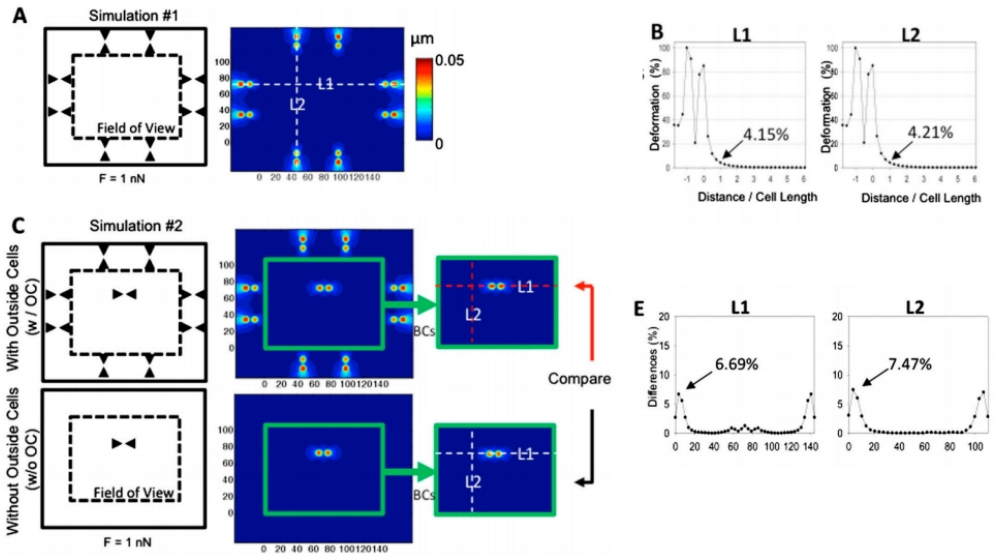


Figure 3.9 – Évaluation numérique des effets des forces de traction induites par les cellules en dehors du champ de d'observation sur le champ de traction calculé à l'intérieur du champ d'observation.(A, gauche) : Schéma de la simulation montrant la décroissance de la déformation du substrat. Une paire de flèches noires indique une cellule. Chaque flèche représente une force de 1nN. Les traits noirs en pointillés indiquent le champ optique (144x110 μm). (B) : Décroissance du champ de déformation normalisé par le maximum le long de la ligne L1 et L2. (C, gauche) : Schéma de la simulation comparant la situation avec des cellules (haut) et sans cellules (bas) à l'extérieur du champ optique. (C,droite) : Champs de déformations calculés avec les conditions aux limites précédentes. (E) : Différence de forces de traction calculées en présence de cellules (haut) et en l'absence de cellules (bas) à l'extérieur du champ optique sur les axes L1 et L2. [Hur 2012]

de traction, nous avons adapté leur méthode à notre système expérimental pour déterminer l'erreur induite par la méconnaissance des conditions aux limites avec notre méthode de calcul et le type cellulaire que nous avons utilisé.

3.2.3 Méthodologie

➢ Estimation de la validité du calcul de forces en monocouche

Notre méthode a été la suivante : nous avons utilisé une grande fenêtre d'observation, à l'aide d'une camera 4 champs fournissant des images de 2560*2160 pixels soit 4 fois la taille de champ d'un capteur standard. Ainsi, un objectif de 63x permet d'obtenir un champ de 270 μm*230 μm. Nous avons choisi, sur l'image du champ, une région centrale de 50 μm * 50 μm. Cette région centrale a ensuite été utilisée pour comparer la distribution et l'amplitude des forces calculées en variant la taille de la région utilisée pour le calcul des forces (Fig 3.10). Ces régions ont été choisies en prenant des bords de 10,25,40 et 65 μm de part et d'autre de la région centrale (Fig 3.10). La taille de bord maximale, 65 μm, a été choisie comme valeur de référence pour les forces calculées dans la région centrale. En effet, nous avons supposé qu'à une telle distance de la zone de comparaison des forces, les effets de la méconnaissance des conditions aux limites sur les bords sont négligeables sur les forces calculées dans la zone centrale.

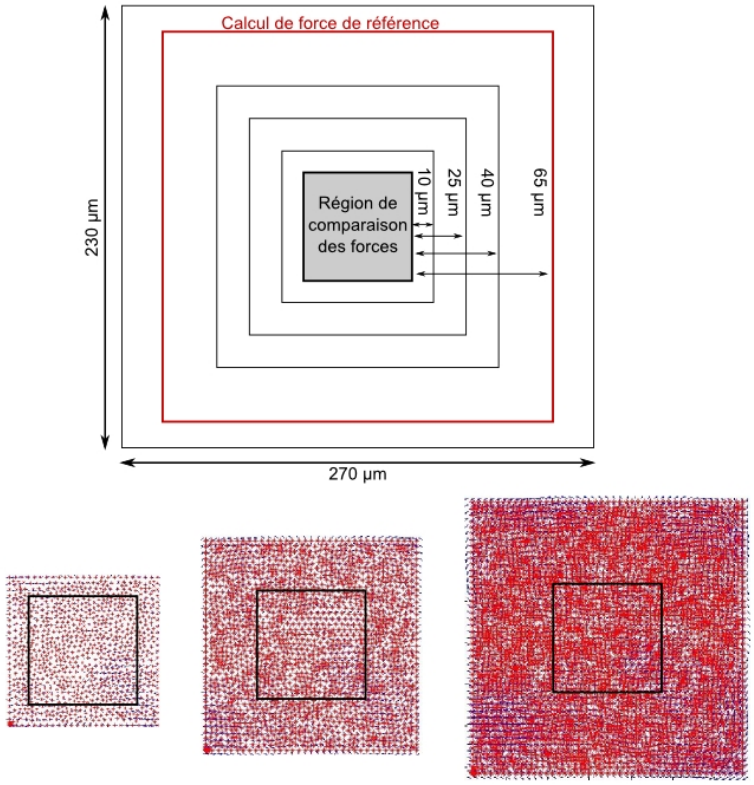


Figure 3.10 – Estimation de la validité du calcul de force en fonction de la taille des bords. Les 3 zones en bas de la figure représentent les différents maillages où sont calculés les forces pour les différentes tailles de bords.

Le calcul des forces a été effectué avec la méthode BEM en utilisant un paramètre de régularisation déterminé avec le critère L-curve sur le champ de déplacements de référence, c'est à dire pour une taille de bords de 65 μm. Le paramètre de régularisation $\lambda = 2*(N-M)*\sigma^2$ avec 2N la taille du vecteur des déplacements mesurés, 2M la taille du vecteur des forces calculées et σ l'écart type sur la distribution des erreurs de mesure sur les déplacements. La

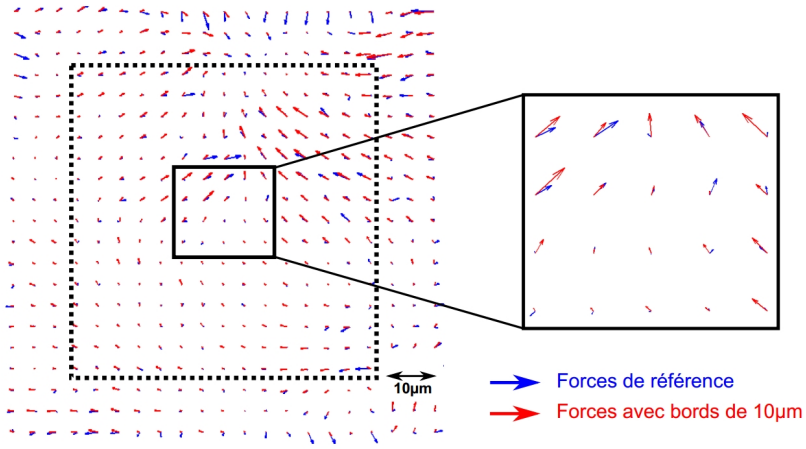


Figure 3.11 – Calcul des forces avec une taille de bords de 10 μm (rouge) comparé au calcul de force référence (bleu).

valeur de σ étant constante, λ a été recalculé pour les différentes tailles de fenêtres.

L'écart entre le calcul de force de référence et le calcul de force avec les différentes tailles de bords a été caractérisé en traçant les distributions des différences d'angles et d'amplitudes entre les vecteurs de référence et les vecteurs correspondant aux différentes tailles de bord (Fig 3.12).

Table 3.2 – Comparaison des forces calculées avec différentes tailles de bords (écarts types des distributions)

	bords 10 μm	bords 25 μm	bords 40 μm
$Angles(°)$	33	15	8
$Amplitudes(Pa)$	43	32	25

Les résultats de ces comparaisons, visibles sur la table 3.2, montrent que pour une taille de bords de 10 μm l'écart type sur la distribution des angles est de 33 degrés et l'écart type sur la distribution des amplitudes de 43 Pa ce qui est loin d'être négligeable comme le suggèrent les simulation numériques de Hur et al. En effet, ceux-ci trouvent une propagation de l'erreur inférieure à 10 % pour de bords de 10 μm. Notre estimation suggère une erreur plus proche des 30 % sur l'orientation des angles et l'amplitude des forces pour une telle taille de bords. Ainsi, il apparait que pour limiter l'erreur liée à la méconnaissance des conditions aux limites, il est préférable d'utiliser des bords d'au moins 25 μm. Les forces ainsi calculées présentent une erreur inférieure à 20 %.

Le fait de devoir retirer au minimum une bande de 25 μm autour de la région d'observation des forces limite l'exploitation des champs de déplacements obtenus avec l'utilisation d'une caméra standard, qui au 60x, fournit une image de 140*110 μm. En effet, si l'on retire 25 μm de chaque coté de la zone d'exploitation des forces, il ne reste qu'un champ de 90*60 μm ce qui, pour des cellules endothéliales à confluence, correspond à environ 8 cellules. Nous avons donc utilisé une caméra 4 champs pour l'étude des forces de traction de monocouches endothéliales de façon à pouvoir visualiser des champs de forces suffisamment larges pour que d'éventuels motifs de forces ne soient pas masqués par la taille du champ.

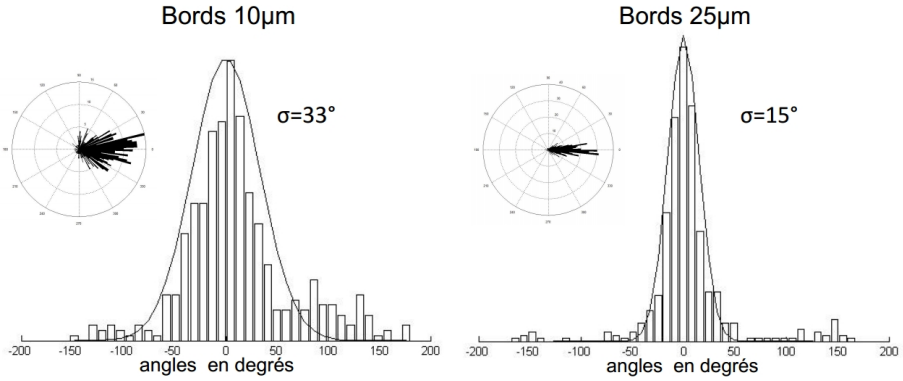


Figure 3.12 – Distribution angulaire des écarts entres les forces calculées avec des bords de 10 et 25 μm par rapport aux forces de référence.

➢ Fabrication des hydrogels

Des lamelles de 30mm de diamètre sont activées chimiquement à l'aide de Bind Silane(Fisher Scientific), pour permettre un greffage covalent des hydrogels de polyacrylamide. Les lamelles de verre sont d'abord nettoyées par immersion dans une solution de $NaOH$ 0.1M pendant 10 minutes. Elles sont ensuite rincées dans de l'éthanol et séchées avec de l'air sec. Une solution contenant 484 μl d'acide acétique et 56 μl de BindSilane complétée jusqu'à 15 ml avec de l'éthanol est préparée. 500 μl de cette solution est étalée sur chaque lamelle de verre puis séchée avec un chiffon de salle blanche ne laissant pas de poussière. Le gel de polyacrylamide est préparé par photopolymérisation [Mgharbel 2011]. Cette méthode est choisie car elle assure une meilleure uniformité des propriétés élastiques du gel par rapport à la polymérisation initiée chimiquement (sect 4.1.4.1). Une solution de 10% d'acrylamide, 0.5% de bis acrylamide est préparée. Des billes fluorescentes (2 % solide infrarouge, Molecular Probes) de 200nm sont ajoutées dans la solution à une concentration de 100 $\mu l/ml$. 30 μl de cette solution sont étalés sur la lamelle de verre. Une lamelle de verre hydrophobe équipée de cales de 40 μm d'épaisseur est déposée sur la goutte. Après photopolymérisation (insolation de 7.8 s sous une lampe de $2W/cm^2$), la lamelle de verre hydrophobe est retirée et le gel est laissé à gonfler dans de l'eau distillée pendant 24h. Les modules d'Young des gels ont été caractérisés par AFM avec une précision de 0.5 kPa. La plupart des expériences ont été réalisées avec des gels d'une rigidité de 5 kPa.

➢ Fonctionnalisation de surface

Les gels de polyacrylamide sont fonctionnalisés avec une concentration théorique de $5.4\mu g/cm^2$ de fibronectine issue de plasma humain (Roche Applied Science). La fibronectine est greffée de manière covalente à la surface du gel par l'intermédiaire de la molécule photoactivable hétérobifonctionnelle Sulfo-LC-SDA (Pierce). Cette molécule diffère de la molécule plus couramment utilisée Sulfo-SANPAH (sect. 4.1.4.2) par son groupe photosensible, un groupe diazirine, qui est plus stable et réactif. Une solution de 1.8mg/ml de Sulfo-LC-SDA dans du PBS est préparée et conservée à l'abri de la lumière. 1ml de la solution est étalé à la surface de chaque gel dans une chambre noire. Après 2 heures, la solution est retirée et remplacée par la solution de fibronectine pendant 1 heure. Après retrait de la solution de fibronectine, les gels sont exposés à de la lumière UV 365nm ($18mW/cm2$) pendant 5 min. Les gels sont ensuite rincés avec du PBS et incubés avec du milieu de culture 1 heure avant ensemencement des cellules.

➢ Culture cellulaire

Nous utilisons des cellules endothéliales issues de veines de cordons ombilicaux humains (HUVECS) à faible passage (P2-P4) , cultivées dans du milieu EBM-2 supplémenté d'additifs EGM-2 (Lonza). Les monocouches sont obtenues par ensemencement à une densité de 5.10^4 cellules/cm^2. Sur cellules

isolées, les mesures de forces ont été corrélées avec l'organisation du cytosquelette d'actine. Dans ce but, les cellules HUVE ont été transfectées avec le plasmide LifeAct pour marquer les filaments d'actine fluorescents. Pour chaque transfection, 2.10^6 cellules sont centrifugées (6 min à 1000 rpm) puis resuspendues dans 100 μl de solution de Nucleofector® et mélangées avec 4 μg de plasmide GFP-LifeAct avant d'être soumises à la nucléofection. Les cellules transfectées par le plasmide sont ensemencées à raison de 3000 cellules/cm^2 sur les gels et utilisées 24 heure après transfection.

➢ Limitation de la contractilité cellulaire

L'impact de la réduction de la contractilité cellulaire sur le champ de forces a été analysé en utilisant un agent chimique, la blebbistatine, un inhibiteur de la myosine II. La blebbistatine(Calbiochem) a été préparée en solution stock à 50 mM dans du dimethyle sulfoxide (DMSO) et utilisée à 25 μM. Le milieu de culture a été remplacé 1 heure avant l'addition de blebbistatine. Pendant l'expérience, la moitié du milieu de culture contenu dans une boite de petri de 35mm, soit 1 ml, a été remplacé par un volume identique de blebbistatine diluée pour obtenir une concentration finale de 25 μM . Les observations ont été réalisées 5,15,25 et 35 minutes après addition de blebbistatine.

➢ Acquisition des images

Les images 1 champ, de taille 1344*1024 pixels, ont été acquises avec un microscope inversé Olympus IX71 équipé d'une platine chauffante, et d'une chambre à CO_2. Les acquisitions sont réalisées avec un objectif à huile UPlan FLN x60/1.25 Ph3 monté sur un dispositif piézoélectrique pour l'acquisition en z et équipé d'une caméra ORCA-ER (Hamamatsu) . Les images 4 champs, de taille 2560*2160 pixels, ont été acquises à l'aide d'un microscope inversé Leica équipé d'une platine motorisée en Z. Le microscope ne possédant pas de filtre CY5, nous avons utilisé des billes de 500nm couplées au fluorochrome TRITC, à la place des billes de 200nm utilisées avec le microscope 1 champ.

Pour chaque position, trois types d'images sont acquises : (i) une image en contraste de phase des cellules, (ii) une pile de 12 images en fluorescence des billes situées juste en dessous des cellules ($\delta z = 0.3\mu m$) et (iii) une pile de 5 images en fluorescence de la couche de billes en contact avec le verre ($\delta z = 0.5\mu m$). La pile d'images prises au voisinage du verre sert de référence pour corriger la dérive du microscope dans les 3 dimensions. En effet, le gel étant fixé de manière covalente au verre, il ne peut pas se déformer au voisinage du verre. A la fin des expériences, les cellules sont décollées avec de la trypsine 1x(Lonza) pour obtenir les images de référence pour les marqueurs, lorsque la surface du gel n'est soumise à aucune force.

➢ Mesure des déformations

Comme décrit dans la section 3.1.4.4, les images sont d'abord réalignées en xy et z avec une résolution sub-pixel en utilisant une corrélation d'images avec le logiciel Matlab. Les déformations en 2D du substrat sont ensuite obtenues par la méthode PIV en utilisant des fenêtres de 64*64 pixels conduisant à un échantillonnage du champ de déplacement de 3.44×3.44 μm^2 avec un objectif 60x, et une résolution de 80nm.

➢ Calcul des forces

Le calcul des forces a été effectué avec la méthode **BEM** (sect 3.1.3) qui consiste à inverser l'intégrale de Fredholm à l'aide de la solution de Boussinesq. Nous avons utilisé un algorithme développé par Hélène Delanoë [Delanoe-Ayari 2008] inspiré de celui de Schwarz et al [Schwarz 2002], à l'exception qu'il approxime le motif cellulaire par un ensemble de forces ponctuelles sur un maillage triangulaire généré sous la cellule par une triangulation Delaunay [Delanoe-Ayari 2008]. La résolution numérique utilise l'extension de Matlab "Regularization Tools" de P. C. Hansen. Dans le cas des monocouches cellulaires, les forces sont calculées avec l'ensemble du champ de déplacement mesuré dans l'image, sous la contrainte de déplacement nul et force nulle le long des bords optiques. Le champ de force obtenu n'est ensuite pris en compte que dans la région centrale de l'image, obtenue en rognant une bande de 25 μm de large le long des bords optiques.

3.2.4 Résultats : mesure des forces transmises par une monocouche endothéliale à sa matrice extracellulaire

Dans un premier temps nous avons analysé les forces développées par une cellule endothéliale isolée, pour comparer nos résultats à ceux de la littérature. Puis nous avons mesuré les forces de traction exercées par une monocouche d'HUVEC. Enfin nous avons observé les effets d'un inhibiteur de la contractilité, la blebbistatine, sur les forces transmises par une monocouche de cellules à son substrat.

3.2.4.1 Cellule endothéliale isolée

Nous avons mesuré les forces de traction exercées par des cellules HUVECS isolées, transfectées avec un plasmide exprimant un marqueur de l'actine filamenteuse (3.2.3), ensemencées sur des gels de $5kPa$. Cette valeur a été choisie après des tests d'ensemencement sur différentes rigidités. Une rigidité de 5kPa s'est avérée optimale pour la détection des déplacements des billes en 2D. Une rigidité inférieure nécessite en effet une détection tridimensionnelle des déplacements du fait de la perte de focus sur les billes. Cette rigidité du substrat s'est également avérée optimale pour l'obtention de monocouches cellulaires avec des jonctions intercellulaires matures. Sur la figure 3.13 on remarque que les forces de traction exercées par la cellules sont de forte amplitude à la périphérie de la cellule et de faible amplitude au centre de la cellule et sous le noyau. Les forces sont d'amplitude maximale sous le lamellipode, dans le sens de la direction de migration et sont principalement orientées perpendiculairement aux filaments d'actine . Les contraintes (forces de traction surfaciques) maximales sont de l'ordre de 1.2 kPa et les contraintes moyennes de 338 Pa. Ces valeurs sont en accord avec les contraintes maximales de 1.3kPa et moyennes de 380kPa déterminées par [Califano 2010] avec des cellules endothéliales BAEC adhérant sur des substrats de rigidité identique.

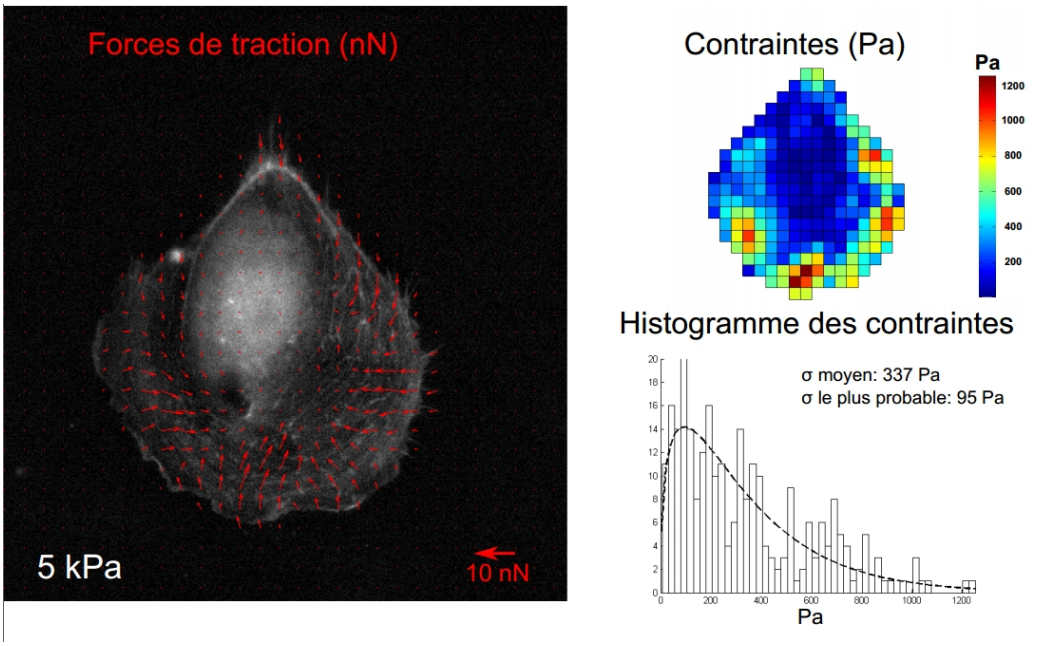


Figure 3.13 – Forces de traction exercées par une cellule HUVE isolée. Gauche : Image en microscopie de fluorescence d'une HUVEC isolée migrant sur un gel de 5kPa. Les filaments d'actine ont été marqués en fluorescence. Les forces de traction sont matérialisées par les flèches rouges. Droite : Représentation des contraintes (forces de traction par unité de surface) de la cellule HUVE (haut) et distribution des contraintes sur l'ensemble de la cellule (bas). La contrainte la plus probable est obtenue par un fit de la distribution des contraintes à l'aide d'une distribution log-normale.

3.2.4.2 Monocouche endothéliale mature

Nous avons ensuite mesuré les forces de traction exercées par des monocouches de cellules HUVECS confluentes, ensemencées sur des gels de $5kPa$. Les forces de traction ont été calculées sur des surfaces contenant 55 (expérience 1) ou 85 cellules (expérience 2). Seuls quelques contours cellulaires bien visibles sont représentés sur la figure 3.14 (correspondant à l'expérience 1) la phase du microscope utilisé ne permettant pas de distinguer clairement la totalité des contours cellulaires.

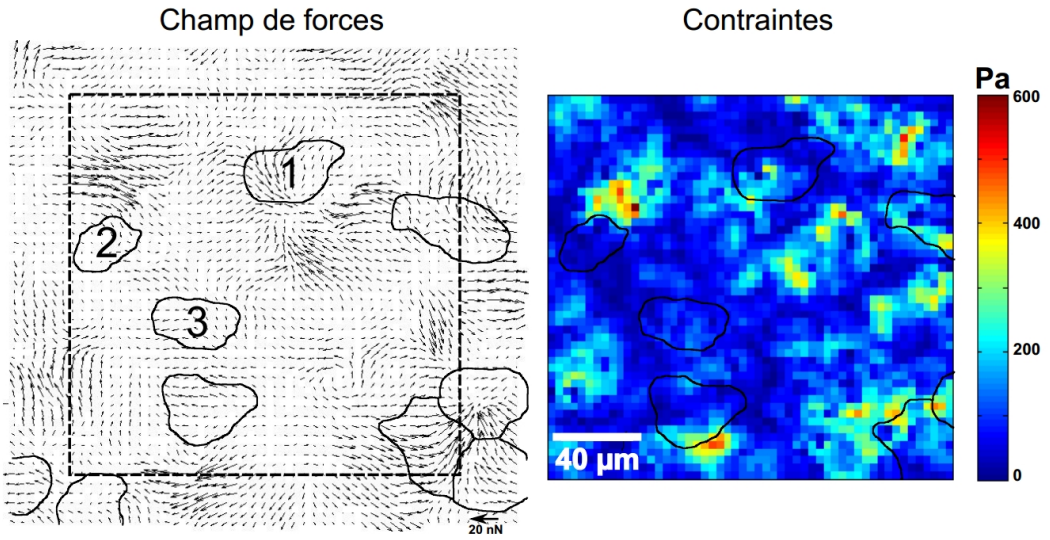


Figure 3.14 – Forces de traction exercées par une monocouche d'HUVECS confluentes. Représentation du champ de forces (gauche) et du champ de contraintes (droite) exercé par une monocouche de cellules endothéliales. Le champ optique comprend 55 cellules mais seuls quelques contours cellulaires bien visibles sont représentés. Le trait noir en pointillé représente la zone de 25 μm exclue des bords de la monocouche afin de limiter l'impact de la méconaissance des conditions aux limites sur le champ calculé.

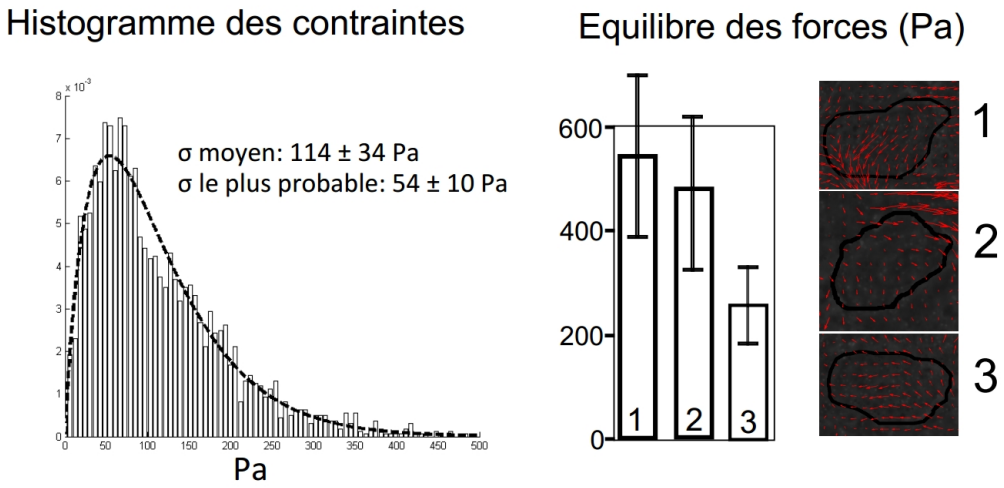


Figure 3.15 – Distribution des contraintes au sein d'une monocouche d'HUVECs confluente et équilibre des forces. Gauche : Représentation des contraintes pour la monocouche d'HUVEC de la figure 3.14. La contrainte la plus probable est obtenue par un fit de la distribution des contraintes à l'aide d'une distribution log-normale. Droite : Équilibre des contraintes calculé sur les 3 cellules dont les contours sont représentés sur la figure 3.14. Ces résultats montrent que les cellules ne sont pas à l'équilibre à l'intérieur de la monocouche.

➢La distribution et l'amplitude des forces de traction des HUVECs est modifiée lorsque les cellules s'organisent en monocouche.

L'amplitude moyenne des forces surfaciques, de 114 Pa obtenue à partir de l'expérience 1, est 3 fois inférieure à celle qui a été obtenue sur cellule isolée. Cette valeur s'est avérée assez stable, une valeur moyenne de 117 Pa ayant été obtenue dans l'expérience 2 (données non représentées ici). Cette diminution des forces de traction exercées sur le substrat est cohérente avec la diminution du nombre de fibres de stress observées lors de la maturation des jonctions intercellulaires. La distribution spatiale de l'amplitude des forces surfaciques est également modifiée par rapport à une cellule isolée, les zones de fortes contraintes n'étant plus limitées à la périphérie des cellules. Cette distribution hétérogène des contraintes que nous avons observée sur les monocouches d'HUVECS est comparable à celle qui a été mise en évidence par Hur et al [Hur 2012] sur monocouche de cellules **BAEC**.

➢ Les HUVECs restent dynamiques au sein d'une monocouche mature.

Nous avons ensuite voulu savoir si les cellules prises individuellement se trouvaient à l'équilibre mécanique au sein de la monocouche cellulaire. Dans ce but, nous avons calculé la valeur de l'intégrale des forces sous quelques cellules dont le contour cellulaire est bien visible. La valeur de la résultante des forces de traction surfaciques calculée sous ces cellules, qui est de quelques centaines de Pa, montre que les cellules ne sont pas à l'équilibre dans la monocouche. Ce résultat n'est pas surprenant car les cellules HUVEs continuent à être très mobiles lorsqu'elles atteignent la confluence. En effet, les travaux de Vitorino et al montrent que les cellules HUVEs continuent à se mouvoir les unes par rapport aux autres à une vitesse d'environ 10 $\mu m/h$ bien que les cellules de la monocouche soient complètement connectées par les jonctions adhérentes [Vitorino 2008]. Le fait que les HUVECs continuent à migrer à l'intérieur d'un endothélium intact confirme le fait que les jonctions à base de cadhérines ne sont pas des structures fixes mais au contraire fortement dynamiques comme précédemment proposé [Kametani 2007].

Malgré l'apparente maturité de la monocouche endothéliale observée en microscopie à contraste de phase, il serait intéressant de vérifier si cette hétérogénéité des contraintes n'est pas également en partie liée aux différents stades de maturité des jonctions intercellulaires. L'expression de molécules de VE-cadhérine-GFP à l'aide d'un lentivirus recombinant permettrait d'apporter une réponse à cette question. Les monocouches ont été filmées 48h après ensemencement, et ce temps pourrait encore être prolongé de 24h pour voir si une homogénéisation progressive apparait dans les forces de traction ou si les motifs de contraintes restent identiques à ceux observés à 48h. Le temps pendant lequel les HUVECS peuvent être observées est assez court puisqu'une fois arrivées à confluence elles perdent rapidement leurs caractéristiques de cellules primaires (à partir de 72h après leur ensemencement).

➢ Les forces de traction des cellules sont coordonnées sur de faibles distances.

Nous avons ensuite cherché à déterminer sur quelle distance les forces de traction exercées par les cellules sont coordonnées au sein de l'endothélium. Pour ce faire, nous avons calculé la longueur de corrélation des fluctuations du champ de déplacement du substrat :

$$(\tilde{u}_1, \tilde{u}_2) = (u_1(x,y) - < u1 >, v2(x,y) - < v2 >) \qquad \text{Eq. (3.14)}$$

que l'on peut considérer comme représentant les forces de traction que les cellules exercent sur leur matrice en utilisant :

$$\mathcal{C}(x_0, y_0) = \frac{\int \sum_i \tilde{u}_i(x + x_0, y + y_0)\tilde{u}_i(x,y)dxdy}{\int \sum_i \tilde{u}_i(x,y)^2 dxdy} \qquad \text{Eq. (3.15)}$$

En effet les forces de traction et les déplacements exercés par les cellules sur leur substrat sont proportionnels. Cependant l'orientation des forces de traction est fortement influencée par le choix

du paramètre de régularisation, nous avons donc préféré travailler directement avec les champs de déplacements du substrat.

Pour une monocouche d'HUVECs confluente, nous avons obtenu une longueur de corrélation L_c des déplacements d'environ 50 μm (Fig 3.16) ce qui correspond, pour une cellule HUVE, à une coordination des forces de traction au niveau de ses voisines immédiates. Cette valeur de L_c s'est avérée très stable d'une expérience à l'autre, et pour différentes tailles de populations cellulaires étudiées (85 et 130 cellules).

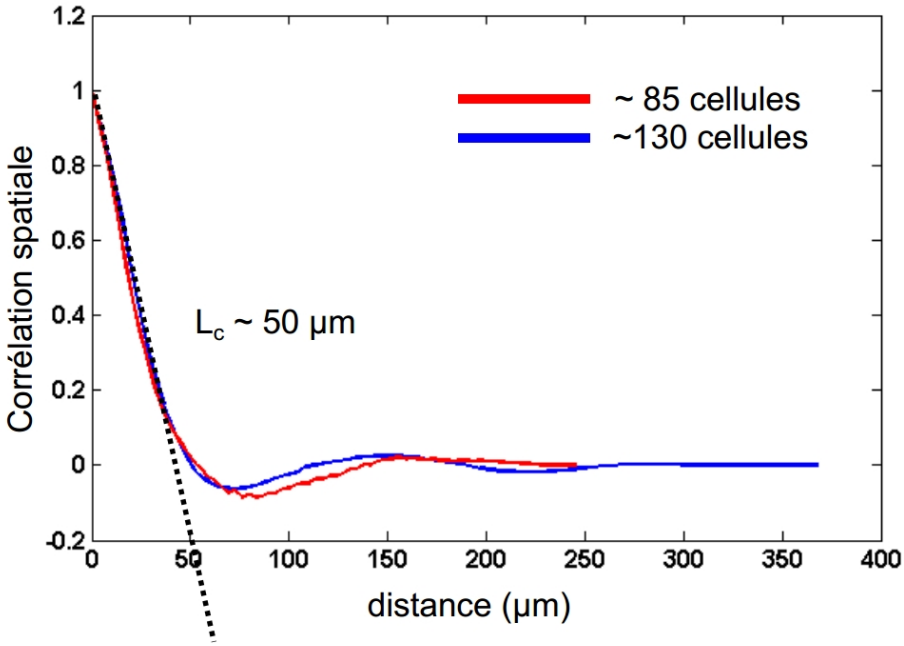


Figure 3.16 – Corrélation spatiale des déplacements au sein d'une monocouche d'HUVECS confluente. La longeur de corrélation, très proche pour les 2 expériences (avec 85 et 130 cellules dans le champ d'observation), est d'environ 50 μm.

Des mesures similaires de corrélation des champs de déplacements ont été effectuées sur des cellules épithéliales MDCK [Angelini 2010], [Petitjean 2010]. Angelini et al ont montré une dépendance de cette longueur de corrélation avec la densité cellulaire. En effet, ils observent une augmentation de la longueur de corrélation de respectivement 200 à 350 μm avec une augmentation de la densité cellulaire. Une relation linéaire est également obtenue entre la longueur de corrélation des déformations et la longueur de corrélation sur le déplacement des cellules. A l'inverse, sur substrat rigide , ils observent une relation inverse entre la longueur de corrélation sur les déplacements et la densité cellulaire. Ainsi, pour les cellules MDCK, sur substrats rigides (verre), les cellules à forte densité migrent en petits domaines tandis que sur des substrats mous (420 Pa) les cellules en forte densité migrent en larges domaines. Quelque soit la rigidité du substrat, la longueur de corrélation pour les cellules MDCK confluentes, reste largement supérieure à celles que nous avons obtenues avec des cellules HUVEs sur 5kPa($\sim 50\mu m$ (HUVECs) vs $\sim 300\mu m$ (MDCK)). Dans une monocouche endothéliale, les cellules ne sont donc pas aussi solidaires que dans une monocouche épithéliale.

L'équipe de Meyer a réalisé des mesures de corrélation des déplacements de cellules HUVEs confluentes sur substrat en verre [Vitorino 2008]. Ils obtiennent une longueur de corrélation d'environ 120 μm. Cependant ces résultats sont obtenus à partir des déplacements des cellules et non celui du substrat, sur un substrat rigide, présentant une fonctionnalisation différente de la notre (Collagen I vs fibronectine) et un calcul un peu différent qui consiste à calculer l'angle moyen entre les trajectoires de paires de cellules et à tracer l'inverse de cette valeur en fonction de la distance entre les paires

de cellules. De plus, outre la précision qui est supérieure dans le suivi de billes nanométriques par rapport à une cellule dont la forme peut varier au cours du temps, nos acquisitions ont été réalisées avec une résolution 3 fois supérieure. Cependant, nos résultats et ceux de Vitorino et al. semblent indiquer des longueurs de corrélation plus réduites pour les cellules HUVEs comparativement à celles des cellules MDCK.

3.2.4.3 Monocouche endothéliale traitée à la blebbistatine

Pour vérifier la capacité de notre système expérimental à mesurer des variations de forces de traction au sein d'une monocouche, nous avons traité une monocouche endothéliale avec de la blebbistatine (3.2.3). Pour des raisons de disponibilité de microscope et comme nous ne nous intéressions pas ici à la distribution spatiale des contraintes mais à leur intensité , nous avons utilisé un microscope 1 champ pour l'acquisition des images. Les forces de traction sont donc calculées sur de petites zones de $55\mu m$*$90\mu m$. Avec une amplitude moyenne de 102 kPa avant traitement blebbistatine, les forces surfaciques sont comparables à celles obtenues lors des 2 expériences précédentes. Les deux contrôles sont obtenus en réalisant deux acquisitions séparées de 10 minutes, puis la monocouche est traitée à la blebbistatine avec une mesure des forces surfaciques 5,15,25 et 35 minutes après traitement (Fig 3.17). 5 minutes après le début traitement, les forces surfaciques ont diminué de plus de la moitié et 25 minutes après traitement elles atteignent un palier correspondant à un tiers des contraintes initiales.

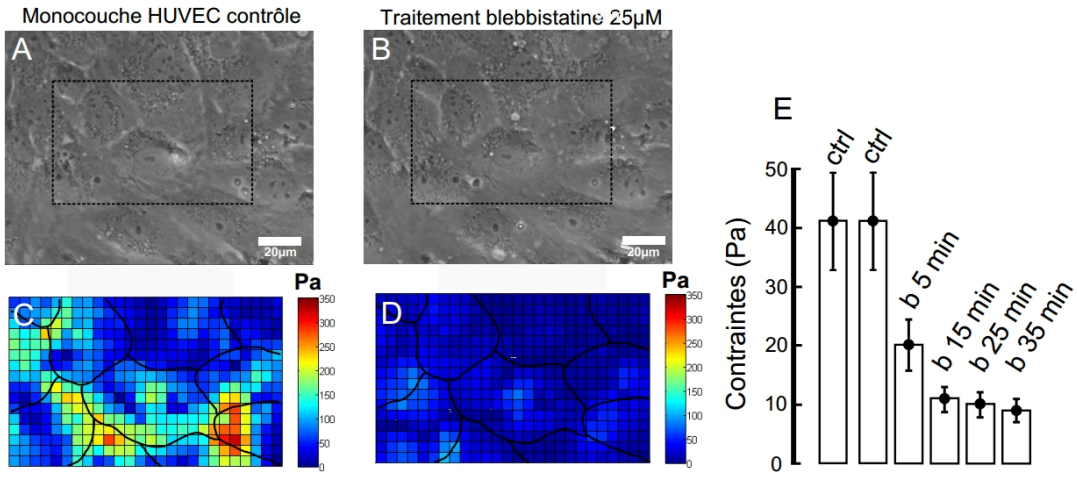


Figure 3.17 – Réduction de la contractilité d'une monocouche cellulaire. (A,B) Images en contraste de phase, avant, et 35 minutes après, traitement à la blebbistatine 25 μM. Les forces sont calculées à partir de l'ensemble du champ de déplacement mais seules les forces surfaciques à l'intérieur des pointillées sont représentées (C,D). (E) Pour chaque temps, les forces surfaciques (contraintes) sont représentées par leur valeur la plus probable.

3.3 Conclusion

Au cours de ce chapitre nous avons passé en revue les avantages et inconvénients de deux principales techniques de mesure des forces transmises par les cellules à leur matrice. Nous avons choisi d'utiliser la technique de TFM qui à l'avantage de préserver le couplage mécanique entre cellules qui peut s'exercer via les déformations du substrat. En contrepartie cette technique est plus lourde mathématiquement et très sensible au bruit expérimental. D'un point de vue numérique, cela implique d'effectuer une étape de régularisation dans le calcul de force. D'un point de vue expérimental, cela implique de minimiser les différentes sources de bruit. Notamment, notre technique de fabrication des hydrogels par photopolymérisation permet d'obtenir des gels optiquement très homogènes et donc un suivi plus précis des billes fluorescentes disséminées dans les gels.

A l'aide de notre système de TFM, nous avons mesuré les forces de traction exercées par des cellules endothéliales isolées et avons obtenu des résultats comparables en amplitude et distribution aux données issues de la littérature.

En nous basant sur les travaux de Hur et al et Tambe et al, nous avons proposé une méthodologie qui permet d'étendre le calcul des forces transmises à la matrice extracellulaire par une cellule isolée ou une petite assemblée cellulaire à une monocouche cellulaire. Les résultats de cette méthode montrent que l'erreur sur le calcul des forces de traction, lié à la méconnaissance des conditions aux limites sur les bords du champ devient inférieur à 20% au delà d'une distance de 25 μm des bords. Le fait de devoir retrancher une bande de 25 μm autour du champ d'observation oblige à travailler avec de grands champs si l'on veut à la fois pouvoir analyser une population suffisamment grande de cellules avec une grande résolution. Une solution alternative consisterait à reconstituer un grand champ à partir d'une mosaïque d'images mais cette solution est techniquement plus complexe car elle nécessite de réaligner très finement les images les unes par rapport aux autres pour ne pas impacter les déplacements au niveau de la frontière entre les images.

En nous basant sur cette méthode, nous avons calculé le champ de forces transmis par une monocouche endothéliale mature à son substrat. La première constatation que nous avons faite est la diminution importante des forces de traction lorsque les cellules sont engagées dans des adhésions intercellulaires. En effet les forces de traction moyennes diminuent d'un tiers pour les monocouches cellulaires par rapport à une cellule isolée. La distribution des forces est également modifiée, les zones de forte traction n'étant plus limitées à la périphérie cellulaire. Ce résultat est cohérent avec la restructuration de l'adhérence cellulaire dans les monocouches endothéliales. En effet, dans les monocouches endothéliales confluentes, on observe une concentration de certaines protéines d'adhésion, comme la vinculine, au niveau des jonctions intercellulaires et non plus au niveau des contacts cellules/matrice.

Le calcul de l'intégrale des forces sous quelques cellules a montré que les cellules ne se trouvent pas à l'équilibre au sein de la monocouche endothéliale. Des études de migration de cellules dans des monocouches endothéliales confluentes montrent que les cellules endothéliales continuent de se mouvoir les unes par rapport aux autres au sein de la monocouche à une vitesse de l'ordre de la dizaine de $\mu m/h$ [Vitorino 2008]. Ces résultats montrent que les jonctions adhérentes endothéliales sont des structures très dynamiques, constamment en train de s'assembler et se désassembler. L'étude des forces de traction au cours de l'ensemble du cycle de maturation de l'endothélium permettrait de préciser la dynamique des adhésions cellules/matrices. Ceci a pour conséquence de diminuer les forces qui s'exercent sur les adhésions focales.

Une autre question abordée a été la coordination mécanique des cellules au sein de l'endothélium. Le calcul de la longueur de corrélation des déplacements du substrat a montré que les forces de traction sont corrélées sur de courtes distances ($50\mu m$) correspondant, pour une HUVEC à une coordination avec ses voisines immédiates. Angelini et al. ont montré sur des cellules épithéliales MDCK que la taille de cette coordination cellulaire est liée à la densité cellulaire et à la rigidité du substrat. Pour une forte densité cellulaire et sur substrat mou cette équipe fait état de longueurs de corrélation de l'ordre de 300 μm, largement supérieure aux valeurs que nous avons obtenues avec les cellules HUVEs. Bien que nos résultats aient été obtenus avec des gels plus rigides (5 kPa vs 0.5 kPa) les cellules épithéliales semblent posséder un comportement plus collectif que les cellules endothéliales.

Les cellules épithéliales ont une forme cubique qui permet d'obtenir des jonction intercellulaires plus épaisse par rapport aux cellules endothéliales qui sont beaucoup plus plates. Ceci pourrait rendre les jonctions inter épithéliales plus stables et cohésives que les jonctions interendothéliales.

Enfin, nous avons vérifié la sensibilité de notre système de mesure de force en inhibant la contractilité de monocouches endothéliales. Comme attendu, les forces mesurées s'effondrent suite au traitement inhibant la contractilité.

Munis de cet outil, nous allons pouvoir étudier comment varie les forces de traction avec la confluence de la monocouche endothéliale. Nous allons pouvoir nous intéresser à la nature des protéines qui participent à la génération de ces forces ou à leur transmission. Pour cela, nous allons mettre en œvre la technique de siRNA pour bloquer l'expression de certaines protéines des structures adhésives de l'endothélium comme l'EPLIN, la vinculine, l'α-caténine. Les mesures de force de trac-

tion sur de telles monocouches pourront fournir des éléments indirects sur le rôle individuel de ces protéines au sein des jonctions intercellulaires.

Récemment, une approche a été proposée pour mesurer les forces s'exerçant à l'intérieur d'une monocouche cellulaire. De telles mesures peuvent potentiellement offrir une vision plus globale de la contractilité cellulaire puisqu'elles prennent en compte les forces exercées par les cellules sur leur matrice et les forces entre cellules. Cette méthode nécessite de calculer préalablement les forces de traction exercées par les cellules sur leur substrat. Dans le prochain chapitre, nous proposons une méthode simplifiée pour accéder à ces forces intracellulaires. Nous appliquons ensuite cette méthode à la mesure des contraintes à l'intérieur d'assemblées cellulaires de différentes tailles.

Chapitre 4

Mesure de la contractilité cellulaire

Sommaire

4.1 État de l'art 89
4.1.1 Méthodes moléculaires 89
4.1.2 Méthodes mécaniques 89
4.2 Mesure de la contractilité par la mesure du champ de déformation 2D 92
4.2.1 Principe 92
4.2.2 Sensibilité de la méthode au bruit expérimental 93
4.3 Résultats 95
4.3.1 Cellule isolée 95
4.3.2 Monocouche confluente 97
4.3.3 Influence de la taille de l'assemblée cellulaire 97
4.3.4 Dynamique de la contractilité d'une monocouche endothéliale confluente 103
4.3.5 Contractilité et forces de traction. 104
4.3.6 La mesure de la contractilité permet-elle d'accéder aux forces intercellulaires ? 105
4.3.7 Conclusion 107

4.1 État de l'art

4.1.1 Méthodes moléculaires

Dans le chapitre introductif nous avons brièvement présenté les techniques permettant de mesurer la contractilité cellulaire. Nous avons vu qu'en biologie, cette mesure de contractilité est réalisée en utilisant des méthodes moléculaires quantifiant l'expression de protéines spécifiques comme le moteur moléculaire myosine II ou les voies de signalisation comme Rho ou ROCK [Burridge 1996], [Twiss 2013]. Une méthode émergente et prometteuse est la construction de capteurs protéiques FRET qui permettent, à l'aide d'un lien élastique introduit dans la protéine cible, de mesurer la tension à laquelle cette protéine est soumise. Ainsi, ces capteurs optiques permettent d'obtenir des cartes finement détaillées de la tension à laquelle sont soumises les protéines cibles. Ces capteurs de tensions sont toutefois complexes à réaliser, et pour chaque nouvelle construction, l'effet de l'addition du module de mesure de tension à l'intérieur de la protéine doit être évalué.

4.1.2 Méthodes mécaniques

Bien que moins résolues que le FRET, des mesures mécaniques directes des forces intracellulaires offrent une vision intégrant la contribution de l'ensemble des partenaires moléculaires, quelles que soient leurs contributions.

Plus spécifiquement, des mesures de forces intercellulaires moyennes ont pu être extraites de la connaissance des forces cellules/matrices en postulant l'équilibre mécanique entre 2 cellules organisées

en doublet [Liu 2010], [Maruthamuthu 2011]. Ce raisonnement, simple à appliquer sur un doublet de cellules, ne peut pas être étendu à une monocouche cellulaire. En effet, les forces de traction exercées localement par chaque cellule sur le substrat sont contrebalancées sur des distances significativement plus larges que la taille d'une cellule. Il n'est alors plus possible de connaitre la contribution d'une cellule aux forces exercées sur la cellule adjacente.

Récemment, une méthode permettant de mesurer les forces qui s'exercent à l'intérieur d'une monocouche cellulaire, nommée Monolayer Stress Microscopy (MSM) a été développée par Tambe et al [Tambe 2011]. Dans cette approche, la monocouche cellulaire est considérée comme une fine plaque élastique contrainte par des forces surfaciques externes (les forces de tractions cellules/substrats) (Fig 4.1). La résolution des équations élastiques permet alors d'accéder aux contraintes cellulaires internes. Cette approche est basée sur la fait que les contraintes à l'intérieur de la monocouche correspondent à un résultat local de la balance complète des forces de tractions cellule/substrat qui s'exercent à travers la totalité de la monocouche comme le postulent les lois de Newton.

La monocouche est donc traitée comme un continuum d'un matériau dont les propriétés élastiques et l'épaisseur sont constantes, et qui subit des contraintes planaires. Le calcul des contraintes à l'intérieur de la monocouche nécessite alors de connaître les forces de traction cellules/substrat, les propriétés élastiques de la monocouche, c'est à dire son module d'Young E et son coefficient de Poisson ν et la hauteur de la monocouche.

Les contraintes à l'intérieur de la monocouche sont de 2 types : compressives (σ_{xx} et σ_{yy}) ou de cisaillement (σ_{xy} et σ_{yx}) (4.1). Une décomposition en valeurs propres du tenseur des contraintes permet de définir l'orientation et l'amplitude des contraintes principales (σ_{max} et σ_{min}). La décomposition en valeurs propres donne ainsi une image de la distribution spatiale des forces internes de compression (ou de dilatation). Ainsi, il est possible de tracer des cartes de contraintes normales moyennes $(\sigma_{max} + \sigma_{min})/2$ correspondant à la tension locale moyenne dans la monocouche et de l'anisotropie locale des contraintes $(\sigma_{max} - \sigma_{min})$. Une compression homogène se traduisant par un facteur d'anisotropie nul, alors que qu'une compression orientée conduit à une anisotropie maximale.

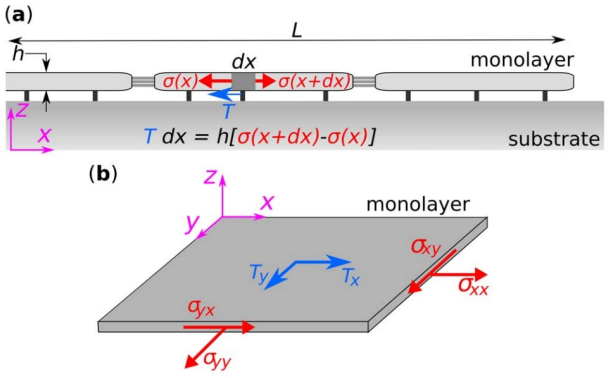


Figure 4.1 – MSM (monolayer stress microscopy) [Tambe 2013]. (a) La monocouche cellulaire est considérée comme une fine plaque de cellules. Chaque cellule dans la monocouche exerce une traction surfacique T sur le substrat. Selon la deuxième loi de Newton, les forces de traction sont compensées par les contraintes locales σ dans la monocouche tel que, dans une dimension, l'équilibre des forces s'écrit : $Tdx \sim h[\sigma(x+dx) - \sigma(x)]$. (b) La balance des forces est seulement assurée dans le plan xy. Les variations de contraintes à travers l'épaisseur sont considérées comme négligeables.

Les auteurs de cette méthode ont ainsi pu cartographier les contraintes intracellulaires pour des monocouches de cellules épithéliales MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) et endothéliales RPME (Rat Pulmonary Microvascular Endothelial) en croissance (Fig 4.2). Ils ont ainsi pu montrer que les contraintes mécaniques fluctuent fortement à l'intérieur des monocouches cellulaires, émergent spontanément et ondulent à travers les monocouches. Ils ont également observé que la migration cellulaire suit l'orientation locale des contraintes principales maximum c'est à dire que les cellules développent

des forces internes corrélées avec la direction du mouvement [Tambe 2011].

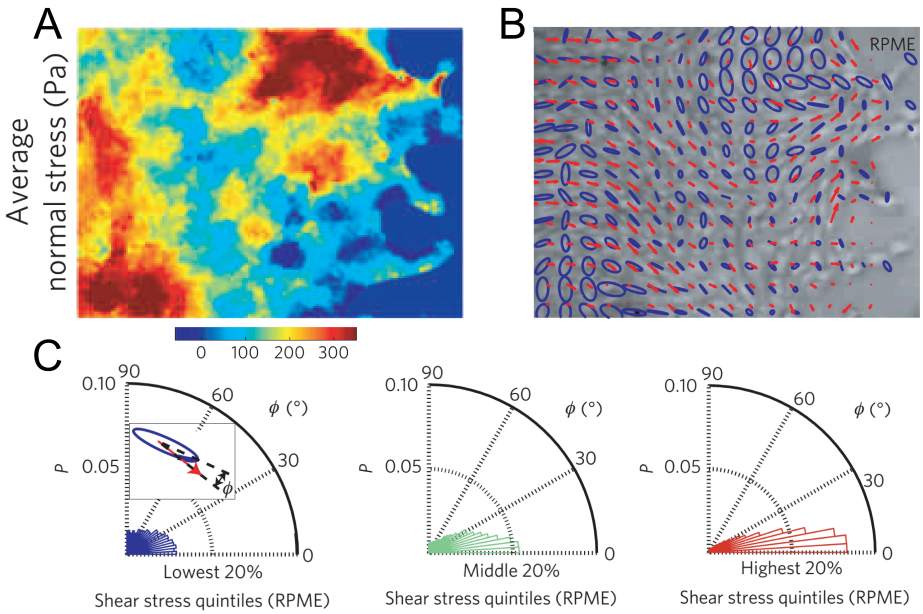


Figure 4.2 – MSM appliquée à une monocouche de cellules endothéliales RPM en croissance. (A) Contraintes moyennes normales dans la monocouche. (B) Ellipses de contraintes (bleu), et directions de migration cellulaire (rouge). (C) L'angle d'alignement ϕ entre l'axe majeur des ellipses de contraintes (contrainte normale principale maximale) et la direction du mouvement cellulaire est d'autant plus faible que les contraintes sont élevées.

Dans le problème biologique, ce sont les contraintes intracellulaires qui donnent naissance, via les adhésions, aux contraintes surfaciques qui déforment la matrice extracellulaire. Or la linéarité des équations élastiques justifie d'inverser le problème et de calculer les contraintes internes comme étant le résultat des contraintes surfaciques connues. Cette approche est cependant limitée par un important problème technique. La première étape du calcul des contraintes intracellulaires consiste à calculer les forces cellules/matrice. Or comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, ce calcul est très sensible au bruit expérimental et aux conditions aux limites. Ceci impose de travailler avec de larges champs d'observation, ce qui a pour conséquence l'utilisation d'objectifs à faible grossissement (si on ne dispose pas de camera grand champ) pour limiter l'impact des conditions aux limites non définies sur le champ de forces calculé. La conséquence est la limitation de la résolution de la mesure du champ de déplacement qui augmente le bruit expérimental et diminue la résolution du champ de force cellule/matrice. Or c'est cette dernière quantité qui est injectée dans les équations élastiques pour obtenir les contraintes intracellulaires locales dans la méthode de Tambe et al.

Cette approche multi-étape est donc assez lourde mathématiquement et rend l'estimation de l'erreur sur la quantification des contraintes intracellulaires difficile à évaluer.
Dans la section suivante nous décrivons la méthode de mesure de contraintes intracellulaires que nous avons développée dans le but de s'affranchir du calcul de forces cellules/matrices et de la connaissance des conditions limites sur les bords des champs d'observation pour mesurer la contractilité cellulaire.

4.2 Mesure de la contractilité par la mesure du champ de déformation 2D

4.2.1 Principe

Le principe de la méthode de calcul des contraintes intracellulaires que nous proposons ici repose sur la dérivation directe du champ de déplacements mesuré à la surface du substrat en PA.

Que les cellules soient isolées ou en monocouche, leur hauteur h est faible devant leur extension latérale L. En conséquence, les contraintes de faible amplitude appliquées à la surface des cellules vont avoir pour conséquence de fortes contraintes internes [Landau 1967]. Par exemple, une force surfacique locale conduit à des contraintes de compression/dilatation surfaciques d'amplitude E*L/h plus grandes que les forces surfaciques avec E le module d'Young de la monocouche cellulaire [Nicolas 2004]. De la même façon, une faible force normale déforme la monocouche cellulaire et conduit à de fortes contraintes de compression/dilatation de part et d'autre du plan médian de la monocouche. Cette propriété géométrique nous permet de considérer une monocouche cellulaire comme une plaque mince élastique, hypothèse qui nous permet ensuite de calculer les contraintes internes (Fig 4.3).

Pour des cellules adhérant de manière rigide au gel, les contraintes intracellulaires conduisent à la déformation de la matrice extracellulaire. Dans l'hypothèse d'une plaque mince, le champ de déplacement résultant, mesuré à la surface d'un substrat élastique est égal au champ de déplacement à l'intérieur de la monocouche. Ce champ de déplacements possède des composantes à l'intérieur et en dehors du plan [Delanoe-Ayari 2010], [Hur 2009], [Maskarinec 2009]. La monocouche cellulaire étant considérée comme une plaque mince, l'amplitude des contraintes intracellulaires dans le plan domine celles qui sont en dehors du plan. En conséquence, les champs de contraintes intracellulaires sont dominés par les composantes à l'intérieur du plan,σ_{ij}, avec i et j correspondant à x et y (Fig 4.3). Dans l'approximation des fines plaques élastiques, elles sont uniformes dans l'épaisseur cellulaire et s'écrivent simplement [Landau 1967] :

$$\begin{aligned} \sigma_{xx} &= \frac{E}{1-\nu^2}\left(\frac{\partial u_x}{\partial x} + \nu\frac{\partial u_y}{\partial y}\right) \\ \sigma_{yy} &= \frac{E}{1-\nu^2}\left(\frac{\partial u_y}{\partial y} + \nu\frac{\partial u_x}{\partial x}\right) \\ \sigma_{xy} &= \frac{E}{2(1+\nu)}\left(\frac{\partial u_x}{\partial y} + \frac{\partial u_y}{\partial x}\right) \end{aligned} \qquad \text{Eq. (4.1)}$$

avec E et ν de l'équation 4.1 les modules d'Young et le coefficient de Poisson de la monocouche cellulaire qui doivent être uniformes. Les composantes hors du plan n'interviennent pas dans l'équation 4.1 du fait de l'approximation de la plaque mince. Le calcul des forces intracellulaires devient très facile puisqu'il suffit de mesurer expérimentalement le champ de déplacement bidimensionnel à la du surface du substrat pour avoir accès aux forces intracellulaires sans avoir besoin de calculer les forces cellules/substrat. La méthode est alors uniquement limitée par la résolution du champ de déplacements.

Pour décrire le tenseur des contraintes, nous utilisons deux quantités qui sont des invariants géométriques : la norme euclidienne :

$$||\sigma|| = \sqrt{\sum_{i,j} \sigma_{i,j}^2} \qquad \text{Eq. (4.2)}$$

et le déviateur, que nous définissons comme la norme du déviatorique du tenseur des contraintes normalisé :

$$\eta = \frac{||\sigma - \frac{1}{2}tr(\sigma)I_2||}{||\sigma||} \qquad \text{Eq. (4.3)}$$

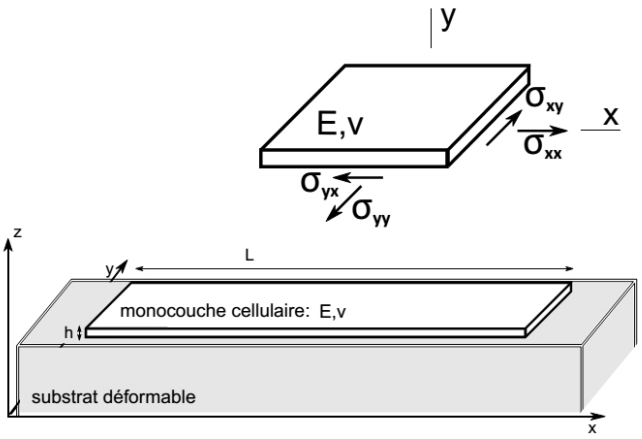


Figure 4.3 – La monocouche cellulaire est vue comme une plaque mince élastique de module d'Young E et de coefficient de poisson ν .

avec $tr(\sigma)$ la trace du tenseur et I_2 la matrice identité carrée en 2 dimensions. η est une mesure de l'anisotropie du tenseur des contraintes. Cette quantité varie entre 0 et 1. $\eta = 0$ quand le tenseur des contraintes est isotrope, et ne contient que des termes de pression hydrostatique. $\eta = 1$ lorsque le tenseur est antisymétrique, ses 2 valeurs propres étant opposées.
Les contraintes locales dans les cellules sont représentées par des ellipses dont l'axe majeur correspond aux contraintes principales maximales. La couleur des axes renseigne sur le signe des contraintes (compression ou dilatation). L'excentricité des ellipses indique l'anisotropie locale des contraintes fig (Fig 4.4).

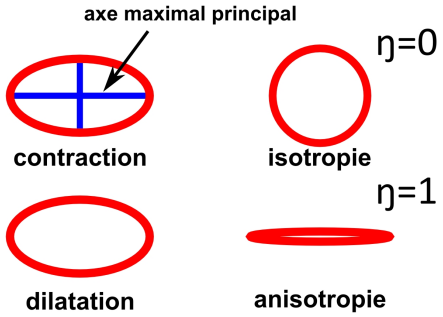


Figure 4.4 – Représentation du tenseur des contraintes.

4.2.2 Sensibilité de la méthode au bruit expérimental

Le calcul des contraintes intracellulaires ne nécessitant pas de calcul intermédiaire des forces cellules/substrat, la sensibilité au bruit de cette méthode à une seule étape peut être calculée à partir de l'équation 4.1 :

$$\left(\frac{\Delta\sigma}{\sigma}\right)^2 \simeq \left(\frac{\Delta E}{E}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\nu}{1-\nu}\right)^2 + \frac{1+\nu^2}{(1+\nu)^2}\left(\frac{\Delta(\partial u_x/\partial x)}{(\partial u_x/\partial x)}\right)^2 \qquad \text{Eq. (4.4)}$$

L'amplitude des contraintes est dépendante des constantes élastiques de la monococouche cellulaire. Le module d'Young E des cellules peut être mesuré par microscopie à force atomique (AFM). Stroka et al. ont mesuré ces module d'Young pour des cellules HUVEs avec différents degrés de

Table 4.1 – Modules d'Young mesurés pour différentes tailles d'assemblées cellulaires.

	cellule isolée	6-13 cellules	monocouche
Centre	854 ± 39 Pa	786 ± 130 Pa	757 ± 16 Pa
Périphérie	1558 ± 46 Pa	1738 ± 106 Pa	1042 ± 14 Pa

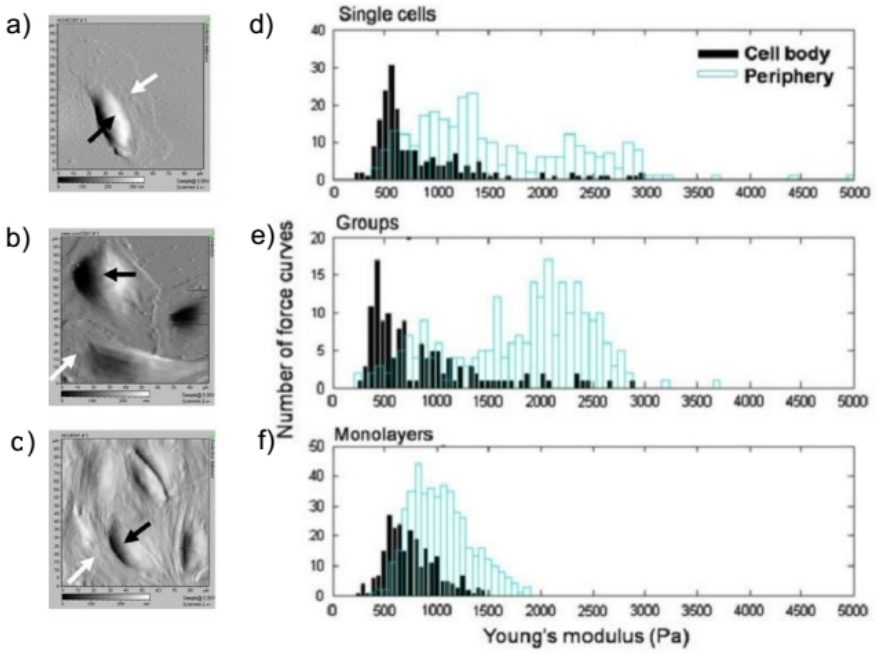


Figure 4.5 – Mesure par AFM du module d'Young E de cellules HUVECs pour différentes tailles d'assemblées cellulaires. (a-c) Images en contraste de phase d'un cellule isolée (a), en groupe de 6 à 13 cellules (b) et en monocouche (c). (d-e) Distribution des modules d'Young pour les différentes tailles d'assemblées cellulaire, au centre et en périphérie des cellules. Au centre des cellules : N= 195, 44, 67, 16, 246 pour les cellules isolées, les groupes de 3 cellules, les groupes de 4-5 cellules, les groupes de 6-13 cellules, et les monocouches. En périphérie des cellules : N= 284, 100, 98, 46, 457 pour les cellules isolées, les groupes de 3 cellules, les groupes de 4-5 cellules, les groupes de 6-13 cellules, et les monocouches.

maturité des jonctions intercellulaires (cellules isolées, petites assemblées cellulaires, monocouches) [Stroka 2011].

Les résultats de ces mesures, synthétisés dans le tableau 4.1, montrent que quelque soit le degré de contacts intercellulaires, le module d'Young à la périphérie des cellules est supérieur au module d'Young mesuré au centre de la cellule. Cette variation est supérieure à 100 % (Fig 4.5d-f). Le module d'Young des cellules isolées est plus important que celui des monocouches, à la périphérie comme au centre des cellules. La distribution du module d'Young pour des cellules isolées ou des petites assemblées cellulaires montre des distributions très larges tandis qu'elles sont beaucoup plus resserrées pour les monocouches. Ainsi, les cellules en monocouches sont plus homogènes en terme de rigidité que les cellules isolées ou les cellules appartenant à de petites assemblées cellulaires. Cette différence d'homogénéité a pour conséquence une variation de l'incertitude sur les contraintes intracellulaires en fonction de l'architecture cellulaire étudiée, la monocouche étant l'architecture cellulaire qui conduit à l'incertitude la plus faible sur le module d'Young. Dans nos calculs, nous prenons un module d'Young moyen E=1000Pa ce qui, par rapport aux données obtenues par Stroka et al., conduit à une erreur potentielle sur l'amplitude des contraintes d'environ 20 % pour des monocouches cellulaires.

Les variations du module de Poisson ν impactent l'amplitude et l'orientation du tenseur des contraintes. En l'absence de données expérimentales, nous prenons une valeur ν =0.5 (incompressibilité de la monocouche cellulaire). Une variation du module de Poisson jusqu'à une valeur aussi basse que 0.3 pourrait introduire une erreur de 13 %.

Le dernier terme de l'équation 4.4 provient du bruit expérimental sur la mesure du champ de déplacement. Ce bruit, de profil gaussien, possède une amplitude moyenne de 80 nm (voir section 3.1.4.4) ce qui conduit à une erreur inférieure à 10 %.

En globalité, l'erreur sur notre estimation des contraintes intracellulaires résulte majoritairement de la méconnaissance des propriétés élastiques des assemblées cellulaires et varie de 25 % pour une monocouche à près de 40% pour des petits groupements de cellules. L'erreur relative n'est plus que de 10% lorsque l'on compare des assemblées cellulaires dans des géométries similaires, comme des motifs adhésifs ou des monocouches si, en moyenne, les constantes élastiques peuvent êtres considérées comme identiques.

4.3 Résultats

Nous avons utilisé notre méthode pour calculer le tenseur des contraintes intracellulaires de cellules HUVEs dans différentes configurations, de la cellule isolée jusqu'à la monocouche. Nous avons ensuite étudié les effets du confinement cellulaire sur les contraintes intracellulaires. Enfin, nous avons observé une dynamique de ces contraintes intracellulaires à l'intérieur d'une monocouche endothéliale.

4.3.1 Cellule isolée

Pour tester la validité de notre méthode, nous avons d'abord calculé les contraintes qui s'exercent dans une cellules HUVE isolée migrant sur un gel de $5kPa$ recouvert de fibronectine. Un marquage de l'actine permet de relier les contraintes aux structures contractiles.

Comme on peut le voir sur la figure 4.6-A, l'actine est organisée en large cortex cortical bordé par un étroit lamelipode le long du front de migration. Des filopodes rétractiles sont visibles sur les bords arrières de la cellule. Les contraintes calculées nous donnent les informations suivantes :

Les maxima d'amplitude du tenseur des contraintes sont bien corrélés avec les motifs d'adhésion (points d'actine brillants sur la figure 4.6-A). Ce résultat n'est pas surprenant puisque, pour une cellule isolée, l'activité contractile du réseau d'actine doit être transmis à la surface à travers les sites adhésifs. La valeur la plus probable des contraintes, que nous prenons comme étant le maximum du fit de la distribution des contraintes par une distribution lognormale (Fig 4.6-E), est de l'ordre de 100 Pa. Cette valeur est en accord avec la valeur des forces de traction surfaciques de 95 Pa présentées dans la section 3.2.4.1.

La carte du déviateur des contraintes (4.6-D) révèle des comportements beaucoup plus fins et qui sont invisibles sur le champ de force : elle montre des régions où l'amplitude des contraintes est faible, mais l'anisotropie importante. Ces régions colocalisent avec les bords de la cellule, et plus particulièrement avec le lamellipode, où l'activité de polymérisation/dépolymérisation de l'actine due aux mouvements de la cellule est importante (la cellule bouge ici du haut vers le bas du champ d'observation).

Les directions principales du tenseur des contraintes corrèlent partiellement avec l'orientation des fibres d'actines qui sont observées dans le plan basal de la cellule (4.6-F). Une corrélation parfaite (distribution confinée autour 0 et 90 degrés) serait attendue si la contractilité cellulaire était exclusivement dirigée par les fibres d'acto myosine localisées dans le plan basal des cellules. Or bien qu'elles

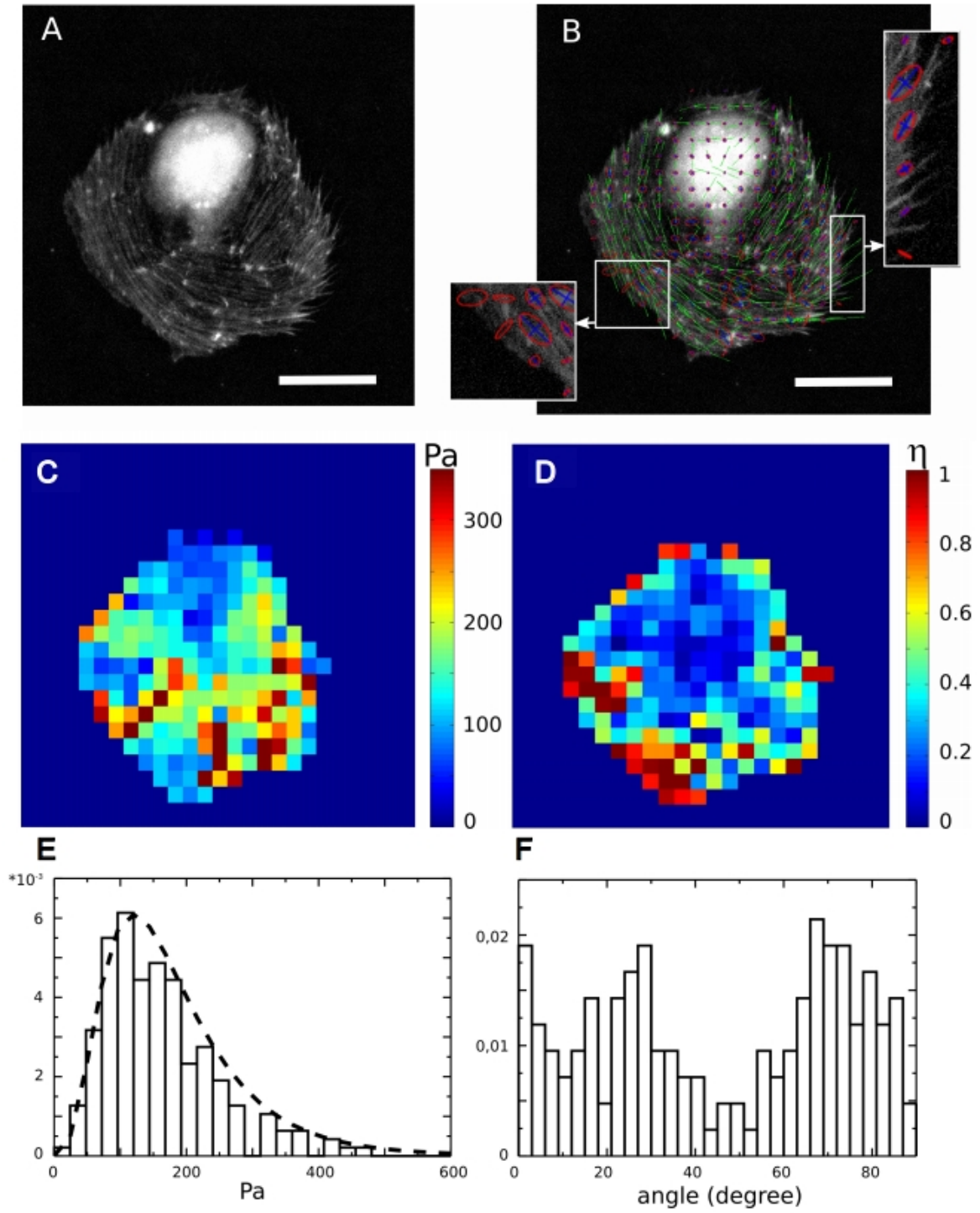


Figure 4.6 – Calcul des contraintes pour une cellule HUVE migrant sur un gel de 5kPa. A) Cellule HUVE dont l'actine est marquée par le LifeAct. B) Représentation du tenseur des contraintes dans sa base propre. Les longueurs des axes des ellipses sont données par la norme des valeurs propres du tenseur des contraintes. Les valeurs propres négatives sont représentées en bleu. Les fibres d'actine (lignes vertes) sont détectées par analyse de Fourier. C) Carte des amplitudes des contraintes. D) Carte du déviateur des contraintes. E) La valeur des contraintes la plus probable est de l'ordre de 100 Pa. F) angle de déviation entre les fibres d'actine détectées et le grand axe du tenseur des contraintes.

contribuent largement aux forces intracellulaires, des fibres d'actomyosine en dehors du plan basal ont également été décrites et ne sont pas prises en compte ici [Burnette 2011]. La validation de notre méthode peut donc uniquement être effectuée à la périphérie de la cellule, où aucune contractilité à l'extérieur du plan ne s'applique. Comme on peut le voir sur la figure 4.6-B, l'orientation du tenseur des contraintes corrèle alors très bien avec les extensions de l'actine.

4.3.2 Monocouche confluente

L'objectif étant à terme de corréler les contraintes mécaniques à la biochimie des adhésions intercellulaires, nous avons ensuite calculé les contraintes internes à une monocouche endothéliale confluente. Notre méthode de calcul nous permettant de nous affranchir de conditions aux limites, les différentes données ont été obtenues pour des monocouches filmées en 1 champ ou 4 champs pour obtenir un échantillon statistique plus important.

Comme observé avec les forces de traction, l'amplitude des contraintes dans la monocouche diminue fortement lorsque les cellules atteignent la confluence. En effet, l'amplitude des contraintes la plus probable est de 20 Pa soit 5 fois moins élevée que celle d'une cellule isolée. L'amplitude des contraintes est très hétérogène au sein de la monocouche et ses variations ne sont pas confinées à l'échelle cellulaire (Fig 4.7-C). On observe plutôt des pôles de contractilité localisés sur des zones de la taille de quelques cellules.

Les ellipses de contraintes (Fig 4.7-B,D) et la carte des contractions/dilatations associée montre également un paysage très hétérogène avec des zones de contraction ou dilatation qui s'étendent sur plusieurs cellules. L'orientation des ellipses des contraintes est parfois perpendiculaire aux jonctions intercellulaires et forment un dipôle contractile (cellules 1/2), et parfois normales aux jonctions (cellules 3/4). Les zones où les cellules sont plus contractiles ou à l'inverse en train de se dilater ne semblent pas non plus dépendre de la maturité des jonctions intercellulaires même si cette observation doit être conformée en utilisant des monocouches endothéliales exprimant une VE-cadhérine fluorescente.

Le déviateur des contraintes offre lui aussi un paysage hétérogène avec de fortes anisotropies des contraintes qui peuvent s'étaler sur plusieurs cellules.

4.3.3 Influence de la taille de l'assemblée cellulaire

Dans le chapitre précédent, nous avons vu les difficultés engendrées par l'absence de conditions aux limites sur le calcul des forces cellules/substrat pour l'étude de monocouches. Nous avons montré qu'en utilisant une fenêtre suffisamment large autour de la région étudiée, il était possible de calculer ces forces avec une erreur acceptable.

Une stratégie permettant de calculer les forces de traction sans avoir à travailler avec de larges champs consiste à confiner les cellules sur un motif adhésif inférieur à la taille du champ d'observation. En outre, ces motifs permettent de limiter la variabilité de la forme des cellules, qu'elles soient isolées ou en petites assemblées cellulaires [Thery 2010]. L'utilisation de motifs adhésifs permet alors d'obtenir des statistiques importantes sur le comportement cellulaire et de les corréler avec la géométrie induite par l'organisation intracellulaire. Nous avons décidé d'explorer les effets du confinement des cellules sur des motifs adhésifs pour 2 raisons : (i) réaliser des statistiques sur la contractilité de petits groupements de cellules dont on aurait modifié la biochimie des adhésions (ii) calculer à la fois les contraintes intracellulaires et les forces de traction avec des conditions aux limites bien définies.

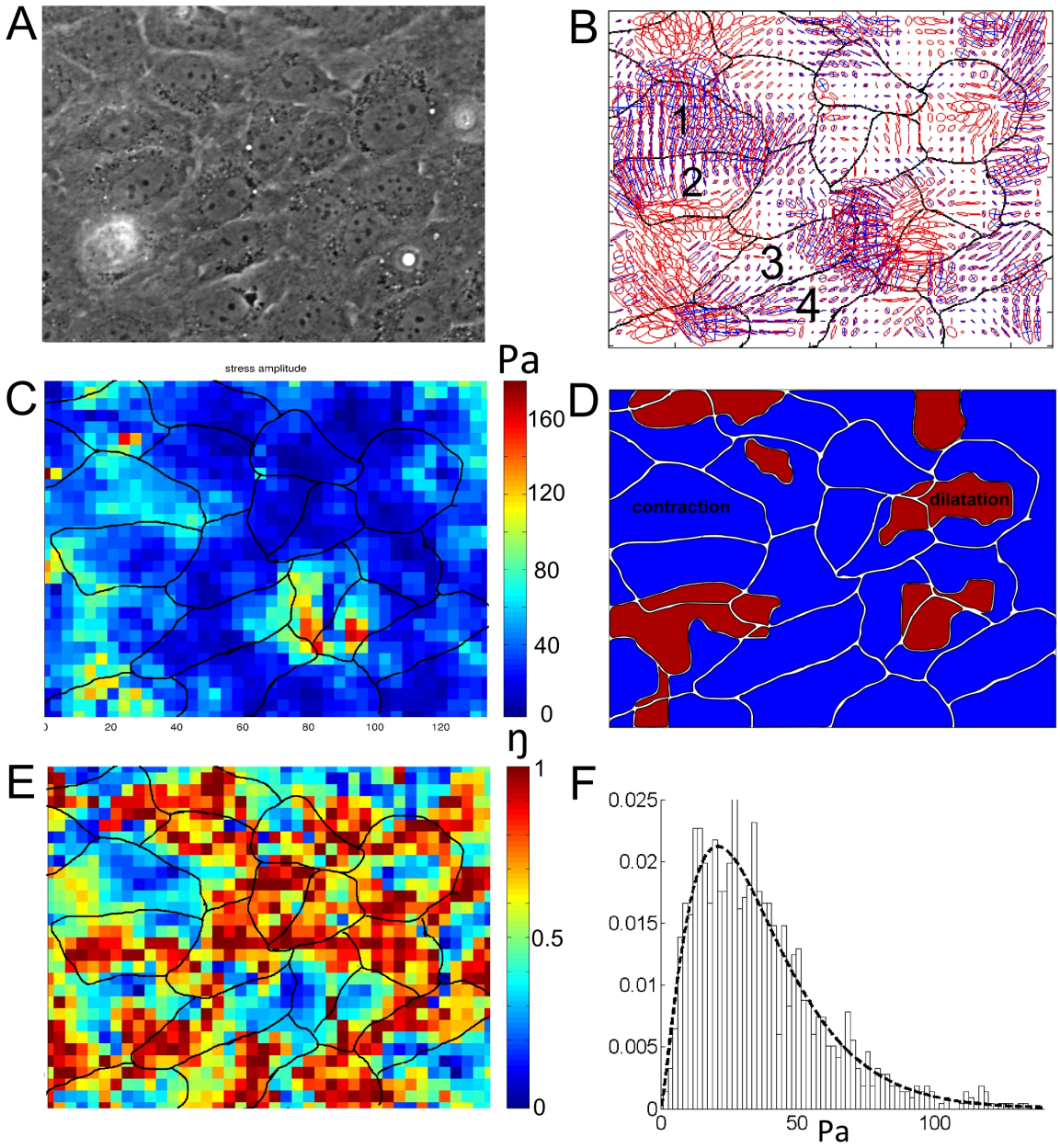


Figure 4.7 – Calcul des contraintes pour une monocouche de cellules HUVE confluente sur un gel de 5kPa. A) Monocouche d'HUVEC en contraste de phase. B) Tenseur des contraintes dans sa base propre. C) Carte des amplitudes des contraintes. D) Carte des zones de contraction/dilatation au sein de la monocouche E) Carte du déviateur des contraintes. F) Histogramme de l'amplitude des contraintes.

4.3.3.1 Fabrication de motifs circulaires sur substrat en polyacrylamide

Pour obtenir des motifs observables avec un microscope standard (1 champ) à haute résolution (60x), nous avons réalisé des motifs circulaires de fibronectine de 100 et 150 μm de diamètre sur des gels en polyacrylamide. Ces motifs ont été réalisés à l'aide de membranes en PDMS servant de pochoirs pour les motifs à fonctionnaliser [Wang 2002].

Les membranes ont été réalisées comme représenté sur la figure 4.8. Des réseaux de disques avec des diamètres et espacements variables ont été dessinés en utilisant le programme L-edit (Tanner

Research). Les schémas obtenus ont été utilisés pour produire un masque photolithographique. Les motifs ont ensuite été transférés sur une plaquette de silicium recouverte de résine photosensible en utilisant la lithographie de contact (voir section 2.2.1.1). La résine a été développée et la plaquette de silicium a été gravée à une profondeur de 50μm à l'aide de la technique de gravure ionique profonde DRIE (Fig 4.8-B). Les moules en silicium ainsi fabriqués ont été utilisés pour couler du PDMS produisant ainsi une impression négative des motifs en silicium. Le PDMS a été préparé comme décrit dans la section 2.2.2.2. Le PDMS non réticulé a ensuite été coulé sur les motifs en silicium, centrifugés pour obtenir une épaisseur finale de 40 μm, puis réticulé à 100°C pendant 1h. Après cette étape, une fine couche de PDMS subsistant au sommet des motifs circulaires a été retirée grâce à une gravure sélective du PDMS (Fuard2011). Les fines membranes de PDMS ont ensuite été déposées à la surface des gels en polyacrylamide à l'aide d'une pince (Fig 4.8-C).

La fonctionnalisation de la surface a été réalisée avec la méthode décrite en section 3.2.3 , avec le gel recouvert de la membrane en PDMS (Fig 4.8-D).

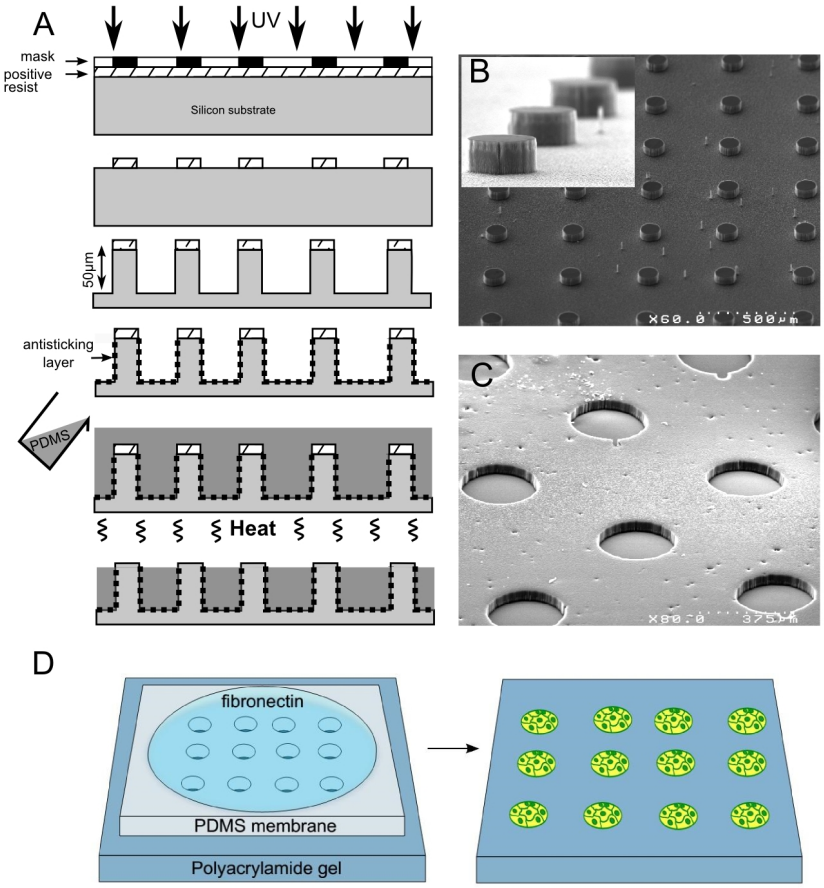


Figure 4.8 – Fabrication de membranes en PDMS et fonctionnalisation pour créer des motifs adhésifs sur les gels. A) Etapes de fabrication des membranes en PDMS. B) Image MEB de moules en silicium cylindriques de 100 μm de diamètre. C) Images MEB des membranes en PDMS pour des ilots de 150 μm. D) Méthode de fonctionnalisation des gels

Les cellules ont ensuite été déposées à la surface de la membrane. Après leur adhésion sur le gel, c'est à dire environ 1 heure après l'ensemencement, la membrane a été retirée à l'aide d'une pince et les cellules ont été laissées sur le gel pendant 24h avant les mesures de forces.

4.3.3.2 Résultats

➢ Les contraintes intracellulaires des cellules adhérant sur les motifs ne reproduisent pas la symétrie de l'îlot.

Comme on peut le voir sur la figure 4.9, la symétrie axiale de l'ilot d'HUVECS, qui comprend une dizaine de cellules, n'est visible ni sur la distribution de l'amplitude des contraintes, ni sur l'anisotropie du tenseur des contraintes. Les régions de fortes contraintes peuvent être situées autant à la périphérie qu'au centre de l'îlot. Les régions de contraintes anisotropes sont dispersées sur tout l'îlot et ne sont pas localisés préferentiellement à la périphérie comme pour des cellules isolées (Fig 4.6).

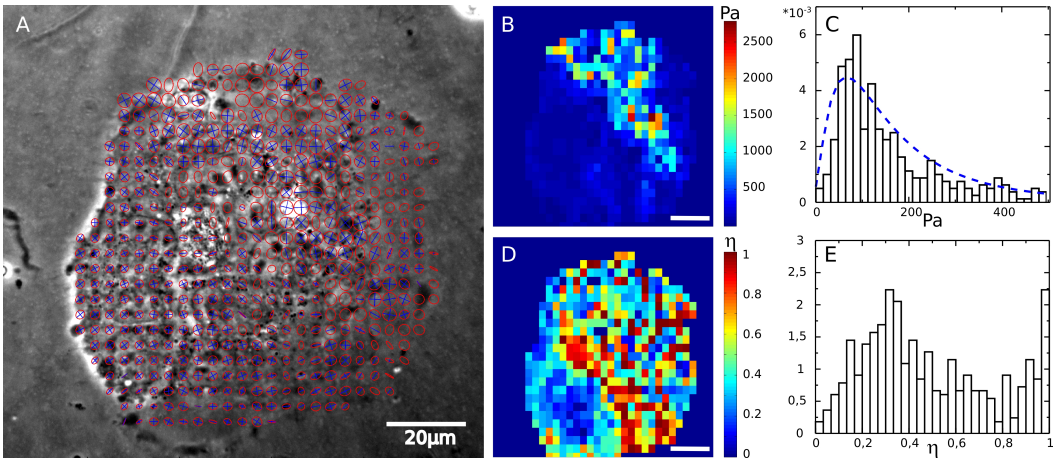


Figure 4.9 – Distribution des contraintes intracellulaires dans un îlot d'HUVECS de 100 μm de diamètre. A) Image en contraste de phase de l'îlot cellulaire avec superposition des ellipses qui montrent l'orientation du tenseur des contraintes. La longueur des axes correspond au log de la norme du tenseur des contraintes. B) Distribution spatiale de l'amplitude des contraintes. C) Histogramme de la norme des contraintes, fitté par une distribution lognormale. La valeur la plus probable des contraintes est 50 Pa. D) Distribution spatiale du déviateur des contraintes et E) son histogramme.

➢ Le confinement augmente l'amplitude des contraintes intracellulaires.

Nous avons comparé les contraintes intracellulaires dans les îlots d'HUVECS confinés sur des motifs de 100 μm et 150 μm avec celles de monocouches confluentes. Comme on peut le voir sur la figure 4.10, les amplitudes du champ de déplacements et des contraintes intracellulaires sont toutes deux sensibles aux dimensions des îlots. Les assemblées cellulaires de petite taille semblent transmettre des forces plus importantes au substrat et ressentir de plus grandes contraintes intracellulaires.
Nous avons également contrôlé que l'inhibition chimique de la contractilité cellulaire diminue les contraintes intracellulaires. Les assemblées cellulaires ont été traitées à la blebbistatine à une concentration de $25\mu M$. Les contraintes ont été mesurées 5,15, et 25 minutes après addition de la drogue. Nous avons observé une très nette diminution des déplacements et des contraintes (Fig 4.10). En l'absence de données concernant les effets de la blebbistatine sur les propriétés élastiques des assemblées cellulaires, l'estimation du champ de contraintes est réalisée en conservant une valeur constante du module d'Young. Cependant, si nous avions considéré que la blebbistatine remodèle le cytosquelette et rend les cellules moins rigides, nous n'aurions fait qu'augmenter la tendance observée.

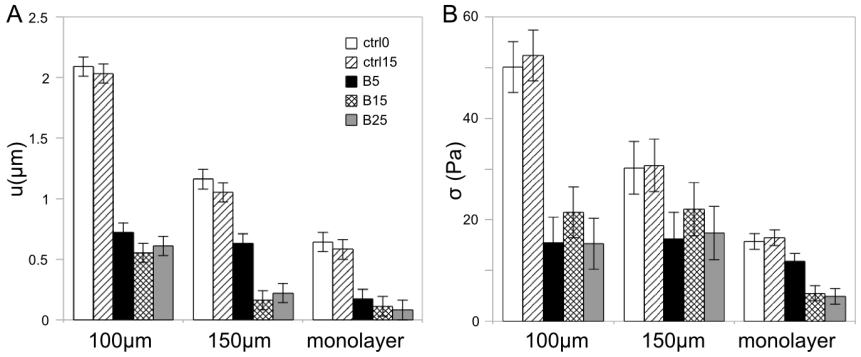


Figure 4.10 – Effets du confinement sur les champs de déplacements et les champs de contraintes. Amplitude des déplacements (A) et contraintes les plus probables (B) sur différentes tailles de motifs adhésifs et sur monocouche. Ctrl0 et ctrl15 correspondent à des images prises à 0 et 15 min avant traitement blebbistatine. La réduction de la contractilité obtenue par addition de blebbistatine est observée 5(B5), 15(B15) et 25(B25) minutes après addition de la drogue.

➢ La propagation du champ de déplacement est fortement influencée par la taille de l'assemblée cellulaire .

Nous avons également étudié la longueur de corrélation $\mathcal{C}$ des fluctuations du champ de déplacement $\tilde{u}$:

$$(\tilde{u}_1, \tilde{u}_2) = (u_1(x,y) - < u1 >, v2(x,y) - < v2 >) \qquad \text{Eq. (4.5)}$$

$$\mathcal{C}(x_0, y_0) = \frac{\int \sum_i \tilde{u}_i(x+x_0, y+y_0)\tilde{u}_i(x,y)dxdy}{\int \sum_i \tilde{u}_i(x,y)^2 dxdy} \qquad \text{Eq. (4.6)}$$

L'image de corrélation est ensuite interpolée sur une grille polaire et moyennée sur tous les angles. On obtient ainsi la courbe $\mathcal{C}(d)$, qui peut être fittée par une exponentielle décroissante pour donner accès aux longueurs de corrélation λ_u, dont les valeurs sont résumées dans le tableau 4.2. On voit que les longueurs de corrélation sur les déplacements et les contraintes augmentent avec la taille de l'assemblée cellulaire. Pour les déplacements la longueur caractéristique est d'environ $2*\lambda_u$=60 μm dans les monocouches cellulaires (4.3.3.2). Il n'est donc pas surprenant que les îlots cellulaires sur des motifs d'une centaine de microns de diamètre soient impactés par la taille finie des motifs.

Table 4.2 – Longueurs de corrélation des déplacements et contraintes

	single cell	100 μm island	150 μm island	monolayer
$\lambda_u(\mu m)$	9.3 ± 1.2	11.0±0.9	17.5±1.8	27.4±0.6
$\lambda_\sigma(\mu m)$	3.2 ± 0.2	3.5±0.3	4.0±0.2	5.7±0.3

➢ Les contraintes intracellulaires sont également influencées par la taille finie des motifs .

Les contraintes intracellulaires se propagent sur de très courtes distances dans les îlots d'HUVECS, comme on peut le quantifier par la décroissance exponentielle de la fonction moyenne de corrélation croisée (Eq 4.7) :

$$\mathcal{C}(x_0, y_0) = \frac{\int \sum_{(i,j)} \sigma_{ij}(x + x_0, y + y_0)\sigma_{ij}(x, y)dxdy}{\int \sum_{(i,j)} \sigma_{ij}(x, y)^2 dxdy} \quad \text{Eq. (4.7)}$$

Nous avons calculé l'équation 4.7 sur les fluctuations du tenseur des contraintes, $(\sigma(x, y) - < \sigma >)$, ou $< \sigma >$ est le tenseur des contraintes moyen, de façon à ce que la valeur moyenne du tenseur des contraintes ne masque pas le profil de corrélation. Le tableau 4.2 montre que les longueurs de corrélation sur les contraintes augmentent avec la taille des populations cellulaires étudiées. Cependant, nous avons atteint des valeurs proches de notre résolution limite (3 μm) donc pour préciser ces résultats, une plus grande résolution des champs de déplacements est nécessaire (une meilleure résolution peut être obtenue en utilisant des gels plus rigides).
Dans le but d'obtenir une image plus fine de l'impact de la géométrie des motifs sur la distribution des contraintes, nous avons également calculé la corrélation croisée angulaire du tenseur des contraintes :

$$\mathcal{C}(r, \theta) = \frac{\int d\theta' \sum_{(i,j)} \sigma_{ij}(r, \theta' + \theta)\sigma_{ij}(r, \theta')}{\int d\theta' \sum_{(i,j)} \sigma_{ij}(r, \theta')^2} \quad \text{Eq. (4.8)}$$

Comme précédemment, la corrélation croisée angulaire est calculée sur la fluctuation du tenseur des contraintes.
Elle révèle une organisation structurée sur les îlots cellulaires. En effet, de l'anticorrélation est visible au voisinage du centre de l'îlot (Fig 4.11-B). Ceci révèle que le champ de contraintes change d'orientation de façon corrélée le long de cercles internes. Lorsque l'on s'éloigne du centre de l'îlot, on observe une diminution de l'amplitude de l'anticorrélation et une augmentation du nombre de ses minima, montrant que le changement d'orientation des forces intracellulaires à lieu sur de plus faibles angles et est de moins en moins visible.

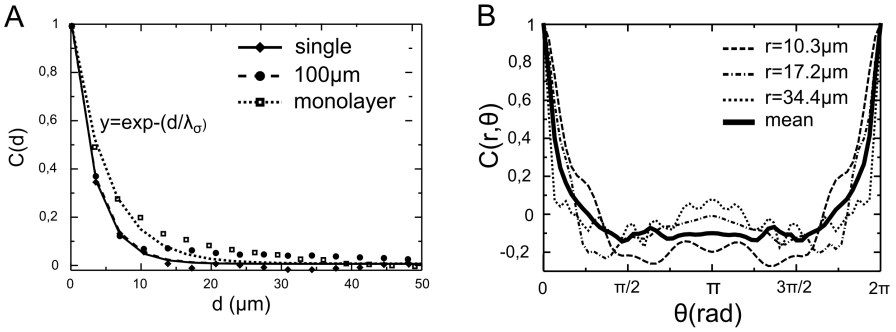


Figure 4.11 – Propagation des contraintes intracellulaires. A) Les contraintes intracellulaires ne se propagent que sur quelques microns quelle que soit la taille de l'assemblée cellulaire étudiée B) Variation de la corrélation angulaire pour différents rayons dans un îlot de 100 μm de diamètre moyenné sur 2 temps. L'anticorrélation est moins apparente lorsque r augmente, ce qui révèle une disparition de l'organisation des contraintes comme un dipôle. La moyenne est effectuée sur la totalité de l'îlot.

➢ Conclusion.

Le confinement des cellules modifie l'amplitude des contraintes intracellulaires. Il modifie aussi localement la propagation des contraintes intracellulaires du fait de la symétrie imposée par le motif d'adhésion. Seul le cœur du motif, dans les îlots de 100 à 150 μm transmet des contraintes intracellulaires de la même façon qu'à l'intérieur d'une monocouche. Ces perturbations liées aux effets de confinement sont reliés à l'organisation particulière et/ou au niveau d'activation de la machinerie contractile des cellules. Il est donc incertain que les résultats obtenus sur des assemblées cellulaires d'aussi petite taille reflète les réponses biochimiques qui ont lieu dans les monocouches. Pour retrouver les mêmes amplitudes et motifs de contractilité que dans les monocouches, la tailles des motifs doit

être supérieure à 200 μm et l'analyse doit être effectuée au centre du motif. Ces conditions restreignent donc l'utilisation des motifs à des tailles d'assemblées cellulaires d'une trentaine de cellules minimum pour retrouver des niveaux de contractilité identiques à ceux mesurés dans les monocouches.

4.3.4 Dynamique de la contractilité d'une monocouche endothéliale confluente

Avant de procéder à des modifications biochimiques de jonctions intercellulaires, nous avons souhaité caractériser la dynamique des contraintes internes à une monocouche confluente intacte. En effet, même lorsque les cellules ont atteint la confluence, les cellules continuent à se mouvoir les unes par rapport aux autres, et les jonctions intercellulaires sont dynamiques car elles sont constamment en train de se remodeler. Nous avons voulu voir si cette dynamique s'accompagnait de changements significatifs dans la contractilité de la monocouche.

Nous avons donc mesuré pendant 15h, avec un intervalle de temps de 10 minutes, les contraintes intracellulaires d'une monocouche confluente endothéliale (48h à 63h après ensemencement). Le champ utilisé pour suivre les déformations du gel permet de suivre environ 35 cellules. La dynamique de la contractilité de la monocouche est représentée sur la figure 4.12.

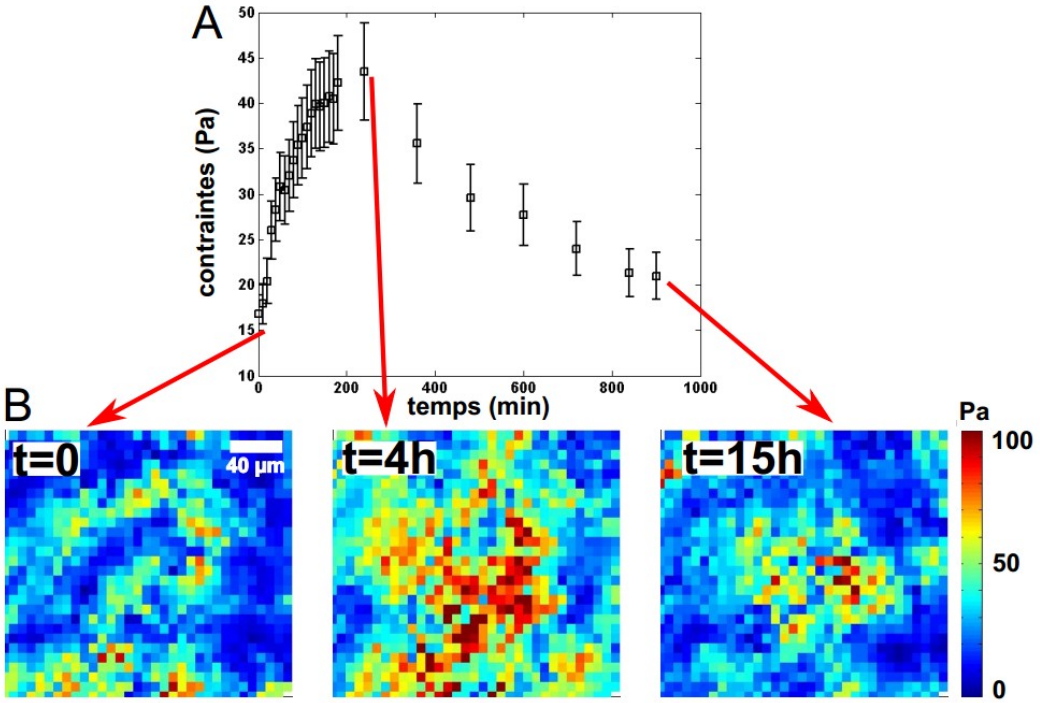


Figure 4.12 – Dynamique de la contractilité d'une monocouche endothéliale confluente. A) Contrainte la plus probable à l'intérieur de la monocouche en fonction du temps. B) Carte des contraintes à l'intérieur de la monocouche à t=0,4 et 15h.

De façon assez surprenante, la contractilité de la monocouche augmente de façon quasi constante pendant les 4 premières heures puis diminue pour atteindre une valeur proche de la valeur initiale. Cette hausse de la contractilité s'effectue dans les régions qui étaient déjà les plus contractiles. Cette dynamique s'effectue sans que des événements mettant en jeu le cycle cellulaire tels que des divisions ou des détachements de cellules apparaissent dans le champ d'observation. Avant de réaliser cette dynamique, nous avons mesuré la contractilité de 7 monocouches matures et trouvé une valeur de contractilité la plus probable relativement stable autour de 20 Pa (21.2 $\pm$ 6.5 Pa). Dans les expériences précédentes, une seule acquisition avait été réalisée sur les monocouches matures. On peut alors se demander si cette augmentation de la contractilité n'est pas liée aux conditions expérimen-

tales, notamment les acquisitions à hautes fréquences (20 images en fluorescence + 10 images en phase toutes les 10 minutes). Le stress cellulaire pourrait se traduire dans un premier temps par une augmentation rapide de la contractilité puis un réarrangement plus lent des cellules pour revenir à un niveau d'équilibre. Cette hypothèse devra être vérifiée sur un plus grand nombre de monocouches endothéliales et en augmentant l'intervalle de temps entre les prises de vue pour obtenir des résultats statistiquement satisfaisants.

4.3.5 Contractilité et forces de traction.

La contractilité, que nous obtenons en calculant le tenseur des contraintes intracellulaires, est une mesure locale de la tension qui s'exerce au sein d'une cellule ou d'une monocouche. Ces compressions/dilatations peuvent être transmises à la matrice et, en présence de jonctions intercellulaires, aux cellules environnantes.

➢ Cas d'une cellule isolée

Pour une cellule isolée, ces contraintes peuvent uniquement être transmises à la matrice. La mesure de la contractilité doit donc être similaire à la mesure des forces de traction.

Dans la section 4.3.1, nous avons vu que les maximums d'amplitude du tenseur des contraintes corrèlent bien avec les motifs d'adhésion. Les directions principales du tenseur des contraintes corrèlent partiellement avec l'orientation des fibres d'actine observée dans la plan basal de la cellule.

Lorsque l'on compare la distribution des forces de traction surfaciques aux contraintes intracellulaires, on voit que les forces surfaciques sont plus localisées en périphérie que ne le sont les forces de traction, ce qui pourrait être dû aux effets de la régularisation nécessaire au calcul de forces (Fig 4.13). Si la mesure des contraintes les plus probables se situe dans les deux cas autour de 100 Pa, les variations locales d'amplitude peuvent être très importantes. Pour le calcul de la contractilité, la méconnaissance des propriétés élastiques des cellules peut conduire à une erreur maximale de 40 % sur l'amplitude des contraintes et peut donc être à l'origine des différences rencontrées dans les amplitudes pour les 2 types de forces.

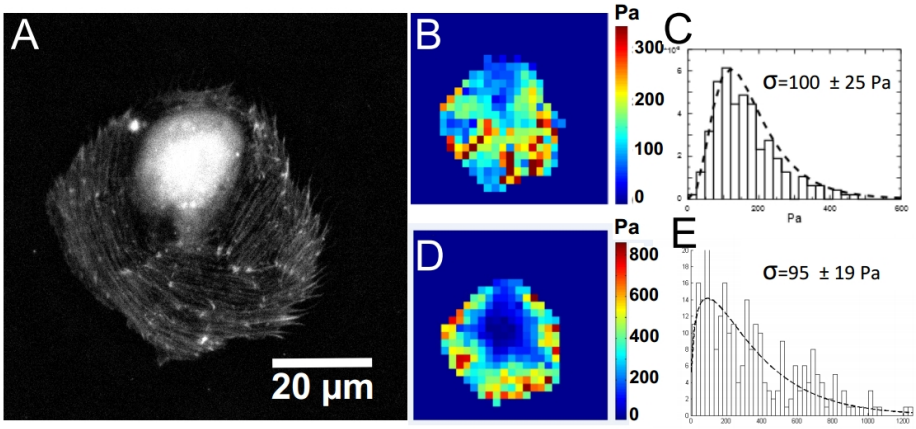


Figure 4.13 – Comparaison entre la mesure des forces de traction et la contractilité pour une cellule isolée. A) Cellule HUVE dont l'actine est marquée avec le LifeAct. B,C) Carte de l'amplitude des contraintes intracellulaires et histogramme des amplitudes associées. D,E) Carte de l'amplitude des forces de traction et histogramme des amplitudes associées.

➢ **Cas d'une monocouche confluente**

Dans le cas d'une monocouche, la contractilité est le résultat local des contraintes transmises par les cellules à la matrice et aux cellules adjacentes. La monocouche étudiée ici est celle qui a été présentée dans le chapitre précédent consacré à la mesure des forces de traction.

Si l'on compare la carte des ellipses de contraintes à la carte des forces de traction on constate que les zones fortement contractiles correspondent aux zones où convergent les forces de traction. De même, les zones de dilatation dans la monocouche correspondent aux zones où les forces de traction divergent. La contractilité des cellules semble donc être fortement corrélée aux forces de traction. Les fortes similitudes qui existent entre les forces de traction et la contractilité peuvent s'expliquer par une prédominance des forces de traction par rapport aux forces intercellulaires. En effet Maruthamutu et al. ont montré sur un doublet de cellules que les forces intercellulaires ont une amplitude 2 fois moins élevée que les forces de traction [Maruthamuthu 2011].

La carte de l'amplitude des contraintes présente de fortes similitudes en terme de distribution entre les contraintes intracellulaires et les forces de traction surfacique. En terme d'intensité, il existe un facteur 2 entre les amplitudes des contraintes les plus probables pour les deux mesures. En prenant en compte l'erreur maximale qui peut exister sur chacune des mesures, il est difficile de conclure à une différence d'amplitude significative entre les forces de traction et les contraintes intracellulaires qui pourraient résulter de la contribution des forces intercellulaires sur les contraintes intracellulaires mesurées.

4.3.6 La mesure de la contractilité permet-elle d'accéder aux forces intercellulaires ?

Une façon de vérifier expérimentalement si notre méthode de mesure de la contractilité prend en compte à la fois les forces de traction et les forces intercellulaires serait de pouvoir dissocier expérimentalement les jonctions intercellulaires tout en préservant, au moins sur une courte durée, les adhésions cellules/matrice.

La dissociation des jonctions intercellulaires s'accompagne assez rapidement d'une réorganisation des adhésions cellules/matrice et des forces de traction [Mertz 2013]. Cependant, il a été montré, sur un doublet de cellules, que la dissociation des jonctions intercellulaires en abaissant la concentration en Ca^{2+} du milieu dans lequel sont cultivées les cellules pour dissocier les interactions régies par les cadhérines, provoque des changement minimaux sur les forces de traction qui suivent les premières minutes de la déplétion en calcium [Maruthamuthu 2011]. Ceci signifie que dans cet intervalle de temps, l'utilisation d'un milieu sans calcium modifie faiblement les adhésions cellules/matrice. A l'inverse, dans le même temps, les forces intercellulaires diminuent de près de 50 %. Cette méthode pourrait être utilisée pour démontrer la contribution des force intercellulaires à notre mesure de contractilité.

Sur les monocouches, nous n'avons pas observé de motifs de contractilité particuliers au niveau des jonctions, celles-ci sont parfois comprimées ou dilatées, et les forces internes orientées perpendiculairement ou tangentiellement à la jonction. Pour une étude plus fine de la capacité de notre méthode de mesure de contractilité à faire émerger les forces intercellulaires, un système cellulaire plus minimal comme un doublet de cellules serait adapté. Plusieurs études analysant la distribution des forces de traction sur des doublets ou triplets de cellules ont montré que lors de la maturation des jonctions intercellulaires les forces de traction n'étaient plus visibles au niveau de la jonction [Maruthamuthu 2011], [Mertz 2013]. Si la résolution des déplacements mesurés est suffisamment élevée, on peut espérer observer localement les contraintes qui ne résulteraient que de la contribution des forces intercellulaires. Une résolution plus élevée pourra être obtenue en utilisant des substrats plus rigides.

Un système simple comme un doublet permet également plus simplement de modéliser les systèmes d'adhésions cellules matrice et cellule/cellule. On peut ainsi avoir une idée de la façon dont les forces intercellulaires affectent le champ de déplacement de la matrice extracellulaire. En calculant le tenseur

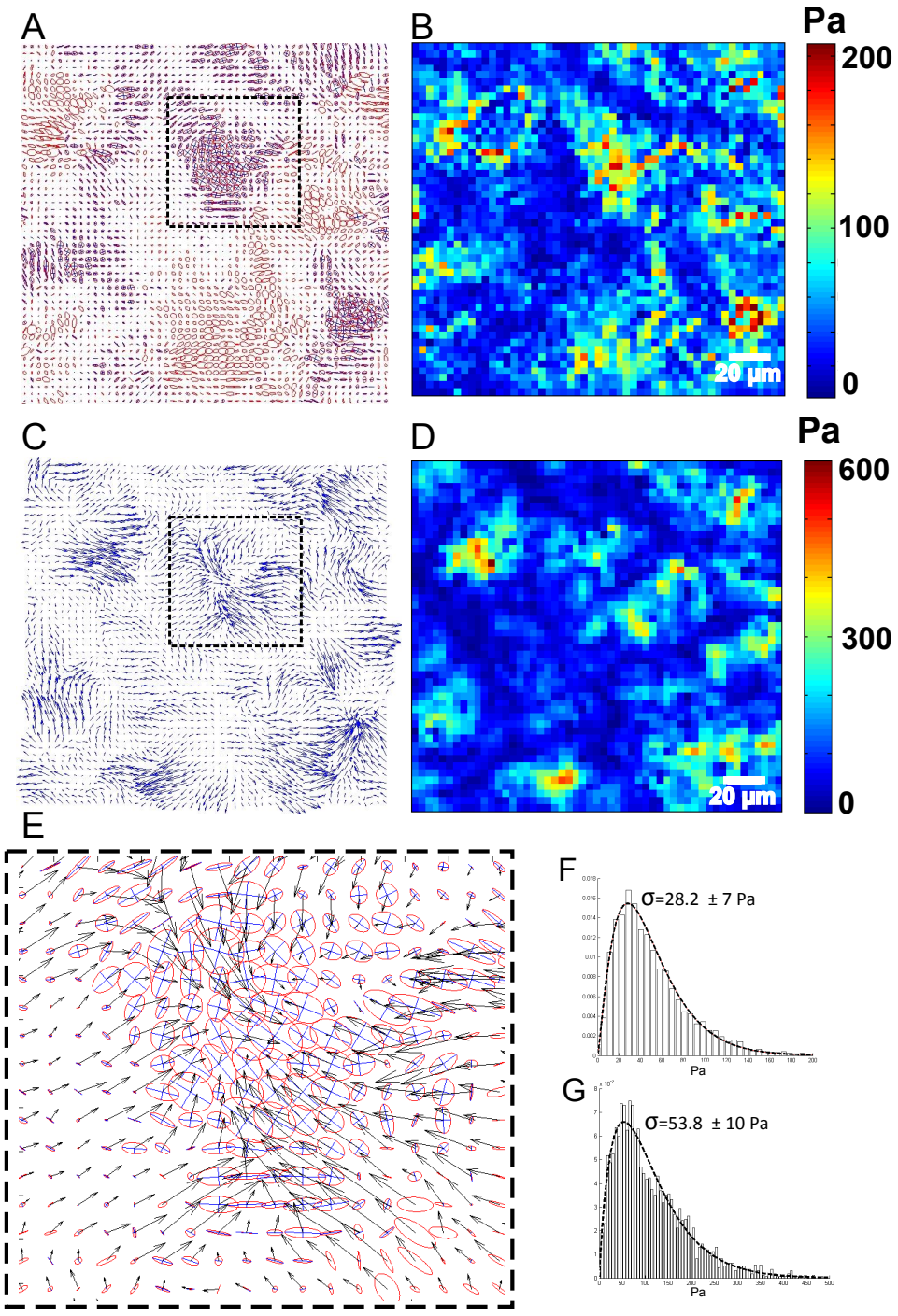


Figure 4.14 – Comparaison entre la mesure des forces de traction et la contractilité pour une monocouche cellulaire. A) Représentation du tenseur des contraintes dans sa base propre B) Amplitude des contraintes intracellulaires. C) Carte des forces de traction exercée par la monocouche sur son substrat. D) Amplitude des forces de traction E) Représentation conjointe du tenseur des contraintes (ellipses rouges) et des forces de traction (flèches noires) pour la zone matérialisée par un rectangle en pointillés sur les cartes A et C. F)Histogramme des contraintes intracellulaires. G) Histogramme des forces de traction.

des contraintes intracellulaires à l'aide de ce champ de déplacement, on pourra observer son profil au niveau des jonctions intercellulaires et déterminer quelle résolution est nécessaire pour déceler les forces intercellulaires.

4.3.7 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté une nouvelle méthode, très simple, pour quantifier les contraintes intracellulaires. En comparaison avec les autres méthodes, l'avantage principal de notre méthode est d'être insensible au contraintes qui sont à l'extérieur du champ d'observation. De plus, la précision du champ de contrainte calculé peut être aisément estimée à partir des erreurs expérimentales et ne repose pas sur des simulations numériques.

Comme nous l'avons vu dans la section 4.2.2, la principale source d'incertitude résulte de la méconnaissance des propriétés élastiques de l'assemblée cellulaire. Ceci limite la possibilité de comparer l'amplitude des contraintes intracellulaires entre différentes architectures du cytosquelette, par exemple dans le cas de traitement avec des drogues spécifiques. Cependant, la méthode peut être améliorée en couplant la quantification des contraintes à la mesure des propriétés élastiques des cellules. En outre cette limitation est partagée par les autres méthodes de calcul de contraintes intracellulaires [Tambe 2011], [Tambe 2013] puisqu'elles nécessitent une conversion entre déformation et contrainte dans les étapes de calcul.

Cependant, les variations relatives d'amplitude du champ de contrainte sont atteignables avec une bien meilleure précision lorsque les propriétés élastiques des assemblées cellulaires sont similaires, comme c'est le cas dans les monocouches. C'est alors la résolution du champ de déplacement qui fixe l'incertitude (inférieure à 10 % dans nos expériences). De plus, l'orientation des contraintes calculées est uniquement sensible au coefficient de poisson. Étant donné la gamme possible pour ses valeurs (entre 0.3 et 0.5), l'incertitude sur l'orientation des contraintes calculées n'excède pas 15 %.

Sur cellule isolée, où la contractilité est transmise en totalité à la matrice extracellulaire, nous avons pu corréler l'amplitude des contraintes aux structures adhésives de la cellule. En outre, les valeurs les plus probables du tenseur des contraintes et des forces de traction sont également comparables. Nous avons également pu caractériser la contractilité d'une monocouche endothéliale mature. Ces résultats font apparaître que le contractilité d'une monocouche endothéliale est 5 fois moins élévée que celle calculée pour une cellule isolée. De plus, il existe une grande hétérogénéité dans la distribution de l'amplitude des contraintes internes. Cette distribution des contraintes n'apparait pas discontinue au niveau des jonctions intercellulaires et les forces internes ne semblent pas présenter une orientation particulière au nivau des jonctions.

Avec notre méthode, nous avons ensuite montré que le confinement des cellules modifie l'amplitude des déplacements et des contraintes intracellulaires. En conséquence, les forces intercellulaires et les forces que les cellules exercent sur leur matrice sont sensibles à la taille de l'assemblée cellulaire. Dans la gamme des tailles de motifs que nous avons étudiée, cet effet ne résulte pas des effets de bords qui sont concentrés à la périphérie des assemblées cellulaires. La symétrie des motifs n'est pas visible sur le champ de contraintes, ni sur la distribution spatiale de l'amplitude, ni sur le tenseur déviatorique. Le confinement de l'assemblée cellulaire dans les motifs adhésifs apparait comme limitant ces effets de bords, qui sont attendus pour des îlots de cellules en croissance. La propagation des contraintes intracellulaires est également diminuée par le confinement. Pour retrouver les mêmes amplitudes et motifs de contractilité que dans les monocouches, la taille des motifs doit être supérieure à 200 μm et l'analyse doit être effectuée au centre du motif.

Les résultats du suivi de la dynamique d'une monocouche endothéliale confluente montre des variations de plus de 100 % de la contractilité durant les 15h de suivi. Cette hausse, quasi constante sur les 4 premières heures de suivi de la dynamique, diminue pour retrouver les valeurs de contractilité initiales. Des analyses complémentaires doivent être menées pour voir si ce résultat est la conséquence d'un artefact lié aux conditions expérimentales ou s'il peut être la conséquence d'un événement cy-

clique dans la monocouche.

La comparaison entre les contraintes internes et les forces de traction présentent des distributions comparables. Ceci pourrait s'expliquer par la domination des forces de traction sur les forces intercellulaires. Elle pourrait également résulter de l'hypothèse d'adhésion rigide de la monocouche sur son substrat. Des expériences de dissociation des jonctions pourraient éclaircir ce point. Enfin une analyse de la contractilité sur un modèle simplifié de doublet cellulaire, et plus simple à modéliser numériquement, pourrait permettre de préciser si une mesure des forces intercellulaires peut être extraite localement de la mesure des contraintes internes sous la jonction et la résolution du champ de déplacements nécessaire pour y parvenir.

Conclusion et perspectives

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont pour objectif de mieux comprendre le rôle des forces mécaniques dans les mécanismes de réarrangement et de réparation tissulaires.

Ainsi, nous nous sommes intéressés aux différentes techniques qui permettent de mesurer les forces qui s'exercent au niveau des adhésions cellule/matrice extracellulaire et cellule/cellule et qui jusqu'à présent se sont limités à l'étude de cellules isolées, doublets, ou petites assemblées cellulaires.

Pour aborder cette problématique, nous avons d'abord imaginé un microsystème, à base de piliers déformables, pour mesurer la contractilité d'une monocouche. Inspirée de la technique du « tapis de fakir » où les cellules adhérent sur un réseau de micropiliers, nous avons conçu un système dans le but de confiner les cellules dans un espace entouré de parois déformables. Nous avons réalisé la microfabrication d'un tel système qui s'est avéré sensible aux déformations attendues. Cependant, nous avons été confrontés à des difficultés pour le contrôle de l'adhésion cellulaire. En raison de la taille réduite des structures du microsystème et de leur géométrie tridimensionnelle, nous n'avons pas pu réaliser un confinement suffisamment robuste des cellules pour obtenir une mesure statistiquement pertinente de la contractilité d'une monocouche cellulaire.

Nous nous sommes orientés vers une approche indirecte de la mesure de la contractilité cellulaire en nous basant sur le champ de déplacements du substrat sur lequel adhèrent les cellules. Ce champ de déplacements permet également d'accéder aux forces de traction que les cellules exercent sur leur matrice. Cependant, le calcul de ces forces de traction est limité par la méconnaissance des conditions aux limites qui ne sont plus accessibles dans le cas de l'étude d'une monocouche. Nous avons alors proposé une méthode pour évaluer l'impact de la méconnaissance des conditions aux limites sur le calcul des forces de tractions. Les résultats de cette analyse montrent que la propagation de l'erreur devient inférieure à 20 % au-delà de 25 μm des bords de la monocouche. Nous avons ensuite calculé les forces de traction qui s'exercent au sein d'une monocouche endothéliale confluente et montré que celles-ci sont réduites de moitié par rapport à une cellule isolée. La distribution des forces est très hétérogène à l'intérieur de la monocouche et la coordination des forces de traction s'effectue sur de courtes distances (~ 50 μm).

Enfin, nous avons développé une nouvelle méthode pour quantifier les contraintes intracellulaires basées sur le champ de dérivation des déplacements du substrat. Cette méthode est très simple et mathématiquement contrôlée. Les paramètres du modèle sont les déplacements tangentiels du substrat et les modules élastiques des cellules. Cette méthode est donc particulièrement bien adaptée à l'étude des monocouches dans lesquelles les propriétés élastiques des cellules sont similaires. Avec cette méthode, nous avons montré que le confinement cellulaire sur de petits îlots de 100 et 150 μm de diamètre impacte l'amplitude, la distribution, et la propagation de contraintes internes cellulaires.

De nouvelles expériences, permettant de découpler momentanément les jonctions intercellulaires des adhésions cellules matrices, devront être menées pour tester les effets de l'hypothèse du modèle d'adhésion rigide sur le résultat des contraintes intracellulaires. Nous souhaitons également investiguer la possibilité d'extraire une mesure de forces intercellulaires de la mesure de contrainte interne.

Dans l'avenir, il serait intéressant de corréler l'impact de l'abrogation de certaines protéines des jonctions adhérentes sur les contraintes qui s'exercent dans l'endothélium. En effet, de plus en plus d'indices tendent à montrer que les processus de mécanotransduction qui sont observés au niveau des adhésions focales sont également en place au niveau des jonctions adhérentes. S'il est désormais démontré que des forces sont échangées entre les cellules, il reste à identifier les protéines qui sont effectivement impliquées dans la transmission de ces forces. Les protéines du complexe à base de VE-cadhérine pourraient jouer un rôle clé dans ce phénomène, en particulier celles qui sont connectées au cytosquelette d'actine. Au laboratoire, il a été montré que la protéine EPLIN qui est directement

connectée au cytosquelette d'actine agit comme un mécanotransmetteur à la base du changement de conformation de l'α-caténine en lien avec la VE-cadhérine. Lorsque l'EPLIN transmet la tension induite par l'activité contractile de la myosine II à l'α-caténine, cette dernière adopte une conformation étirée qui la rend apte à recruter différentes protéines comme la vinculine et l'α-actinine, ces deux protéines étant elles-même capables de lier les filaments d'actine. En utilisant la technique des siRNA au laboratoire BCI, il est possible d'éteindre sélectivement l'expression d'EPLIN, vinculine ou α-actinine par exemple. En mettant en œuvre notre mesure de contractilité sur des cellules traitées par des siRNA il devrait être possible de détecter les modifications de tension qui pourraient avoir lieu au niveau des jonctions adhérentes, et qui sont à la base de la capacité des cellules à renforcer ou diminuer leur adhésion au sein d'un tissu. Nous pourrons ainsi déduire la contribution de chacune des protéines précédemment citées à la transmission des forces au niveau des jonctions intercellulaires.

Bibliographie

[Abe 2008] Kentaro Abe et Masatoshi Takeichi. *EPLIN mediates linkage of the cadherin-catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 105, no. 1, pages 13–19, Janvier 2008. 36

[Altman 2004] David Altman, H.Lee Sweeney et James A. Spudich. *The Mechanism of Myosin VI Translocation and Its Load-Induced Anchoring.* Cell, vol. 116, no. 5, pages 737–749, Mars 2004. 23, 24

[Ambrosi 2006] D. Ambrosi. *Cellular Traction as an Inverse Problem.* SIAM J. Appl. Math., vol. 66, no. 6, pages 2049–2060, Janvier 2006. 63

[Angelini 2010] Thomas E. Angelini, Edouard Hannezo, Xavier Trepat, Jeffrey J. Fredberg et David A. Weitz. *Cell Migration Driven by Cooperative Substrate Deformation Patterns.* Phys. Rev. Lett., vol. 104, no. 16, pages 168104–, Avril 2010. 85

[Asbury 2003] Charles L. Asbury, Adrian N. Fehr et Steven M. Block. *Kinesin Moves by an Asymmetric Hand-Over-Hand Mechanism.* Science, vol. 302, no. 5653, pages 2130–2134, Décembre 2003. 23

[Azioune 2010] Ammar Azioune, Nicolas Carpi, Qingzong Tseng, Manuel Thery et Matthieu Piel. *Chapter 8 - Protein Micropatterns : A Direct Printing Protocol Using Deep UVs.* In Lynne Cassimeris et Phong Tran, editeurs, Microtubules : in vivo, volume Volume 97, pages 133–146. Academic Press, 2010. 51

[Azioune 2011] Ammar Azioune, Nicolas Carpi, Jenny Fink, Mohamed M. Chehimi, Damien Cuvelier et Matthieu Piel. *Robust Method for High-Throughput Surface Patterning of Deformable Substrates.* Langmuir, vol. 27, no. 12, pages 7349–7352, Mai 2011. 51

[Balaban 2001] Nathalie Q. Balaban, Ulrich S. Schwarz, Daniel Riveline, Polina Goichberg, Gila Tzur, Ilana Sabanay, Diana Mahalu, Sam Safran, Alexander Bershadsky, Lia Addadi et Benjamin Geiger. *Force and focal adhesion assembly : a close relationship studied using elastic micropatterned substrates.* Nat Cell Biol, vol. 3, no. 5, pages 466–472, Mai 2001. 20, 21, 42

[Baumgartner 2000] W. Baumgartner, P. Hinterdorfer, W. Ness, A. Raab, D. Vestweber, H. Schindler et D. Drenckhahn. *Cadherin interaction probed by atomic force microscopy.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 97, no. 8, pages 4005–4010, Avril 2000. 34

[Borghi 2012] Nicolas Borghi, Maria Sorokina, Olga G. Shcherbakova, William I. Weis, Beth L. Pruitt, W. James Nelson et Alexander R. Dunn. *E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell-cell contacts upon externally applied stretch.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 109, no. 31, pages 12568–12573, Juillet 2012. 31, 32

[Brasch 2011] Julia Brasch, Oliver J. Harrison, Goran Ahlsen, Stewart M. Carnally, Robert M. Henderson, Barry Honig et Lawrence Shapiro. *Structure and Binding Mechanism of Vascular Endothelial Cadherin : A Divergent Classical Cadherin.* Journal of Molecular Biology, vol. 408, no. 1, pages 57–73, Avril 2011. 34

[Brevier 2008] Julien Brevier, David Montero, Tatyana Svitkina et Daniel Riveline. *The asymmetric self-assembly mechanism of adherens junctions : a cellular push-pull unit.* Physical Biology, vol. 5, no. 1, pages 016005–, 2008. 28

[Brooks 1994] PC Brooks, RA Clark et DA Cheresh. *Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis.* Science, vol. 264, no. 5158, pages 569–571, Avril 1994. 11

[Bruce Alberts 2007] Julian Lewis Martin Raff Keith Roberts Peter Walter Bruce Alberts Alexander Johnson. Molecular biology of the cell 5th edition. Garland Science, Novembre 2007. 8, 10, 11, 12, 17

[Burnette 2011] Dylan T. Burnette, Suliana Manley, Prabuddha Sengupta, Rachid Sougrat, Michael W. Davidson, Bechara Kachar et Jennifer Lippincott-Schwartz. *A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells.* Nat Cell Biol, vol. 13, no. 4, pages 371–382, Avril 2011. 97

[Burridge 1988] K Burridge, K Fath, T Kelly, G Nuckolls et C Turner. *Focal adhesions : transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton.* Annual review of cell biology, vol. 4, pages 487–525, 1988. 12

[Burridge 1996] Keith Burridge et Magdalena Chrzanowska-Wodnicka. *Focal Adhesions, Contractility and Signaling.* Annu. Rev. Cell Dev. Biol., vol. 12, no. 1, pages 463–519, Novembre 1996. 31, 89

[Butler 2002] James P. Butler, Iva Marija Tolic-Norrelykke, Ben Fabry et Jeffrey J. Fredberg. *Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings.* American Journal of Physiology - Cell Physiology, vol. 282, no. 3, pages C595–C605, Mars 2002. 59, 62

[Buxboim 2010] Amnon Buxboim, Irena L. Ivanovska et Dennis E. Discher. *Matrix elasticity, cytoskeletal forces and physics of the nucleus : how deeply do cells 'feel' outside and in ?* Journal of Cell Science, vol. 123, no. 3, pages 297–308, Février 2010. 60

[Califano 2010] JosephP. Califano et CynthiaA. Reinhart-King. *Substrate Stiffness and Cell Area Predict Cellular Traction Stresses in Single Cells and Cells in Contact.* Cellular and Molecular Bioengineering, vol. 3, no. 1, pages 68–75–, 2010. 22, 82

[Chervin-Petinot 2012] Adeline Chervin-Petinot, Marie Courcon, Sebastien Almagro, Alice Nicolas, Alexei Grichine, Didier Grunwald, Marie-Helene Prandini, Philippe Huber et Danielle Gulino-Debrac. *Epithelial Protein Lost In Neoplasm (EPLIN) Interacts with Alpha-Catenin and Actin Filaments in Endothelial Cells and Stabilizes Vascular Capillary Network in Vitro.* Journal of Biological Chemistry, vol. 287, no. 10, pages 7556–7572, Mars 2012. 36, 37, 38

[Choquet 1997] Daniel Choquet, Dan P Felsenfeld et Michael P Sheetz. *Extracellular Matrix Rigidity Causes Strengthening of Integrin-Cytoskeleton Linkages.* Cell, vol. 88, no. 1, pages 39–48, Janvier 1997. 23

[Chu 2004] Yeh-Shiu Chu, William A. Thomas, Olivier Eder, Frederic Pincet, Eric Perez, Jean Paul Thiery et Sylvie Dufour. *Force measurements in E-cadherine mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42.* The Journal of Cell Biology, vol. 167, no. 6, pages 1183–1194, Décembre 2004. 29

[Conway 2013] D. E. Conway, M.T. Breckenridge, Elizabeth Hinde, Enrico Gratton, C.S. Chen et M.A. Schwartz. *Fluid Shear Stress on Endothelial Cells Modulates Mechanical Tension across VE-Cadherin and PECAM-1.* Curr Biol, vol. 23, no. 11, pages 1024–1030, Juin 2013. 31

[Crocker 1996] John C. Crocker et David G. Grier. *Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies.* Journal of Colloid and Interface Science, vol. 179, no. 1, pages 298–310, Avril 1996. 66

[Csucs 2003] Gabor Csucs, Roger Michel, Jost W Lussi, Marcus Textor et Gaudenz Danuser. *Microcontact printing of novel co-polymers in combination with proteins for cell-biological applications.* Biomaterials, vol. 24, no. 10, pages 1713–1720, Mai 2003. 51, 52

[Dejana 2004] Elisabetta Dejana. *Endothelial cell-cell junctions : happy together.* Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 5, no. 4, pages 261–270, Avril 2004. 7

[del Rio 2009] Armando del Rio, Raul Perez-Jimenez, Ruchuan Liu, Pere Roca-Cusachs, Julio M. Fernandez et Michael P. Sheetz. *Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding.* Science, vol. 323, no. 5914, pages 638–641, Janvier 2009. 22, 27

[Delanoe-Ayari 2008] H. Delanoe-Ayari H.-Ayari, S. Iwaya, Y. T. Maeda, J. Inose, C. RiviÃ¨re, M. Sano et J.-P. Rieu. *Changes in the magnitude and distribution of forces at different dictyostelium developmental stages.* Cell Motil. Cytoskeleton, vol. 65, no. 4, pages 314–331, Avril 2008. 81

[Delanoe-Ayari 2010] H. Delanoe-Ayari, J. P. Rieu et M. Sano. *4D Traction Force Microscopy Reveals Asymmetric Cortical Forces in Migrating Dictyostelium Cells.* Phys. Rev. Lett., vol. 105, no. 24, pages 248103–, Décembre 2010. 58, 60, 67, 92

[Dembo 1999] Micah Dembo et Yu-Li Wang. *Stresses at the Cell-to-Substrate Interface during Locomotion of Fibroblasts.* Biophys J, vol. 76, no. 4, pages 2307–2316, Avril 1999. 20, 61, 65

[DiMilla 1993] PA DiMilla, JA Stone, JA Quinn, SM Albelda et DA Lauffenburger. *Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength.* The Journal of Cell Biology, vol. 122, no. 3, pages 729–737, Août 1993. 65

[Drees 2005] Frauke Drees, Sabine Pokutta, Soichiro Yamada, W. James Nelson et William I. Weis. *Alpha-Catenin Is a Molecular Switch that Binds E-Cadherin-Beta-Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly.* Cell, vol. 123, no. 5, pages 903–915, Décembre 2005. 35

[du Roure 2005] Olivia du Roure, Alexandre Saez, Axel Buguin, Robert H. Austin, Philippe Chavrier, Pascal Siberzan et Benoit Ladoux. *Force mapping in epithelial cell migration.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 102, no. 7, pages 2390–2395, Février 2005. 20, 49

[Duffy 1998] David C. Duffy, J. Cooper McDonald, Olivier J. A. Schueller et George M. Whitesides. *Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane).* Anal. Chem., vol. 70, no. 23, pages 4974–4984, Octobre 1998. 49

[DuFort 2011] Christopher C. DuFort, Matthew J. Paszek et Valerie M. Weaver. *Balancing forces : architectural control of mechanotransduction.* Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 12, no. 5, pages 308–319, Mai 2011. 9

[Efimenko 2002] Kirill Efimenko, William E. Wallace et Jan Genzer. *Surface Modification of Sylgard-184 Poly(dimethyl siloxane) Networks by Ultraviolet and Ultraviolet/Ozone Treatment.* Journal of Colloid and Interface Science, vol. 254, no. 2, pages 306–315, Octobre 2002. 49

[Engler 2004] Adam Engler, Lucie Bacakova, Cynthia Newman, Alina Hategan, Maureen Griffin et Dennis Discher. *Substrate Compliance versus Ligand Density in Cell on Gel Responses.* Biophys J, vol. 86, no. 1, pages 617–628, Janvier 2004. 65

[Engler 2006] Adam J. Engler, Shamik Sen, H. Lee Sweeney et Dennis E. Discher. *Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification.* Cell, vol. 126, no. 4, pages 677–689, Août 2006. 22, 60

[Frey 2006] Margo T. Frey, Irene Y. Tsai, Thomas P. Russell, Steven K. Hanks et Yu-li Wang. *Cellular Responses to Substrate Topography : Role of Myosin II and Focal Adhesion Kinase.* Biophys J, vol. 90, no. 10, pages 3774–3782, Mai 2006. 59

[Fu 2010] Jianping Fu, Yang-Kao Wang, Michael T Yang, Ravi A Desai, Xiang Yu, Zhijun Liu et Christopher S Chen. *Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates.* Nat Meth, vol. 7, no. 9, pages 733–736, Septembre 2010. 22

[Fuard 2008] D. Fuard, T. Tzvetkova-Chevolleau, S. Decossas, P. Tracqui et P. Schiavone. *Optimization of poly-di-methyl-siloxane (PDMS) substrates for studying cellular adhesion and motility.* Microelectronic Engineering, vol. 85, no. 5, pages 1289–1293, Mai 2008. 48

[Fuard 2010] David Fuard, Michel Moussus, Caterina Tomba, David Peyrade et Alice Nicolas. *Fabrication of three-dimensional structures for the assessment of cell mechanical interactions within cell monolayers.* Journal of Vacuum Science & Technology B, vol. 28, no. 6, pages C6K1–C6K7, 2010. 55

[Georges 2005] Penelope C. Georges et Paul A. Janmey. *Cell type-specific response to growth on soft materials.* Journal of Applied Physiology, vol. 98, no. 4, pages 1547–1553, Avril 2005. 65

[Ghassemi 2012] Saba Ghassemi, Giovanni Meacci, Shuaimin Liu, Alexander A. Gondarenko, Anurag Mathur, Pere Roca-Cusachs, Michael P. Sheetz et James Hone. *Cells test substrate rigidity by local contractions on submicrometer pillars.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 109, no. 14, pages 5328–5333, Avril 2012. 59

[Ghibaudo 2008] Marion Ghibaudo, Alexandre Saez, Lea Trichet, Alain Xayaphoummine, Julien Browaeys, Pascal Silberzan, Axel Buguin et Benoit Ladoux. *Traction forces and rigidity sensing regulate cell functions.* Soft Matter, vol. 4, no. 9, pages 1836–1843, 2008. 22

[Giannotta 2013] Monica Giannotta, Marianna Trani et Elisabetta Dejana. *VE-Cadherin and Endothelial Adherens Junctions : Active Guardians of Vascular Integrity.* Developmental Cell, vol. 26, no. 5, pages 441–454, Septembre 2013. 35

[Gilbertson-Beadling 1993] SK Gilbertson-Beadling et C Fisher. *A potential role for N-cadherin in mediating endothelial cell-smooth muscle cell interactions in the rat vasculature.* Lab Invest, vol. 69, pages 203–209, 1993. 9

[Grashoff 2010] Carsten Grashoff, Brenton D. Hoffman, Michael D. Brenner, Ruobo Zhou, Maddy Parsons, Michael T. Yang, Mark A. McLean, Stephen G. Sligar, Christopher S. Chen, Taekjip Ha et Martin A. Schwartz. *Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics.* Nature, vol. 466, no. 7303, pages 263–266, Juillet 2010. 31

[Haefliger 2004] Jacques-Antoine Haefliger, Pascal Nicod et Paolo Meda. *Contribution of connexins to the function of the vascular wall.* Cardiovascular Research, vol. 62, no. 2, pages 345–356, Mai 2004. 8

[Harris 1981] Albert K. Harris, David Stopak et Patricia Wild. *Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis.* Nature, vol. 290, no. 5803, pages 249–251, Mars 1981. 58

[Harvey Lodish 2004] Paul Matsudaira Chris A. Kaiser Monty Krieger Matthew P. Scott Lawrence Zipursky James Darnell Harvey Lodish Arnold Berk. Molecular cell biology 5th edition. 2004. 13, 17

[Helenius 2008] Jonne Helenius, Carl-Philipp Heisenberg, Hermann E. Gaub et Daniel J. Muller. *Single-cell force spectroscopy.* Journal of Cell Science, vol. 121, no. 11, pages 1785–1791, Juin 2008. 25

[Helfman 1999] David M. Helfman, Esther T. Levy, Christine Berthier, Michael Shtutman, Daniel Riveline, Inna Grosheva, Aurelie Lachish-Zalait, Michael Elbaum et Alexander D. Bershadsky. *Caldesmon Inhibits Nonmuscle Cell Contractility and Interferes with the Formation of Focal Adhesions.* Molecular Biology of the Cell, vol. 10, no. 10, pages 3097–3112, Octobre 1999. 26

[Hillborg 2003] Henrik Hillborg, Nikodem Tomczak, Attila Olah, Holger Schonherr et G. Julius Vancso. *Nanoscale Hydrophobic Recovery : A Chemical Force Microscopy Study of UV/Ozone-Treated Cross-Linked Poly(dimethylsiloxane).* Langmuir, vol. 20, no. 3, pages 785–794, Décembre 2003. 49

[Hinck 1994] L Hinck, I S Nathke, J Papkoff et W J Nelson. *Dynamics of cadherin/catenin complex formation : novel protein interactions and pathways of complex assembly.* The Journal of Cell Biology, vol. 125, no. 6, pages 1327–1340, Juin 1994. 9

[Hirase 2012] Tetsuaki Hirase et Koichi Node. *Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, vol. 302, no. 3, pages H499–H505, Janvier 2012. 6

[Huang 2000] Ning-Ping Huang, Roger Michel, Janos Voros, Marcus Textor, Rolf Hofer, Antonella Rossi, Donald L. Elbert, Jeffrey A. Hubbell et Nicholas D. Spencer. *Poly(l-lysine)-g-poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces : Surface-Analytical Characterization and Resistance to Serum and Fibrinogen Adsorption.* Langmuir, vol. 17, no. 2, pages 489–498, Décembre 2000. 51

[Hur 2009] SungSik Hur, Yihua Zhao, Yi-Shuan Li, Elliot Botvinick et Shu Chien. *Live Cells Exert 3-Dimensional Traction Forces on Their Substrata.* vol. 2, no. 3, pages 425–436–, 2009. 58, 92

[Hur 2012] Sung Sik Hur, Juan C. del Alamo, Joon Seok Park, Yi-Shuan Li, Hong A. Nguyen, Dayu Teng, Kuei-Chun Wang, Leona Flores, Baldomero Alonso-Latorre, Juan C. Lasheras et Shu Chien. *Roles of cell confluency and fluid shear in 3-dimensional intracellular forces in endothelial cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 109, no. 28, pages 11110–11115, Juillet 2012. 73, 74, 77, 84

[Huttenlocher 1998] Anna Huttenlocher, Margot Lakonishok, Melissa Kinder, Stanley Wu, Tho Truong, Karen A. Knudsen et Alan F. Horwitz. *Integrin and Cadherin Synergy Regulates Contact Inhibition of Migration and Motile Activity.* The Journal of Cell Biology, vol. 141, no. 2, pages 515–526, Avril 1998. 32

[Ishizaki 1997] Toshimasa Ishizaki, Mamoru Naito, Kazuko Fujisawa, Midori Maekawa, Naoki Watanabe, Yuji Saito et Shuh Narumiya. *p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions.* FEBS Letters, vol. 404, pages 118–124, Mars 1997. 26

[Jain 2003] Rakesh K Jain. *Molecular regulation of vessel maturation.* Nat Med, vol. 9, no. 6, pages 685–693, Juin 2003. 5

[Kametani 2007] Yoshiko Kametani et Masatoshi Takeichi. *Basal-to-apical cadherin flow at cell junctions.* Nat Cell Biol, vol. 9, no. 1, pages 92–98, Janvier 2007. 84

[Kanchanawong 2010] Pakorn Kanchanawong, Gleb Shtengel, Ana M. Pasapera, Ericka B. Ramko, Michael W. Davidson, Harald F. Hess et Clare M. Waterman. *Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions.* Nature, vol. 468, no. 7323, pages 580–584, Novembre 2010. 27

[Krammer 1999] Andre Krammer, Hui Lu, Barry Isralewitz, Klaus Schulten et Viola Vogel. *Forced unfolding of the fibronectin type III module reveals a tensile molecular recognition switch.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 96, no. 4, pages 1351–1356, Février 1999. 25

[Kumar 1994] Amit Kumar, Hans Biebuyck et George Whitesides. *Patterning Self-Assembled Monolayers : Applications in Materials Science.* Langmuir, vol. 10, pages 1498–1511, 1994. 43, 50

[Kuo 2013] Jean-Cheng Kuo. *Mechanotransduction at focal adhesions : integrating cytoskeletal mechanics in migrating cells.* J. Cell. Mol. Med., vol. 17, no. 6, pages 704–712, Juin 2013. 26, 28

[Ladoux 2012] Benoit Ladoux et Alice Nicolas. *Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues.* Reports on Progress in Physics, vol. 75, no. 11, pages 116601–, 2012. 20, 24

[Landau 1967] L. Landau et E. Lifshitz. Theory of elasticity. Mir Ed., 1967. 41, 61, 92

[Lawo 2012] Steffen Lawo, Monica Hasegan, Gagan D. Gupta et Laurence Pelletier. *Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material.* Nat Cell Biol, vol. 14, no. 11, pages 1148–1158, Novembre 2012. 17

[Le Clainche 2008] Christophe Le Clainche et Marie-France Carlier. *Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration.* Physiological Reviews, vol. 88, no. 2, pages 489–513, Avril 2008. 15

[le Duc 2010] Quint le Duc, Quanming Shi, Iris Blonk, Arnoud Sonnenberg, Ning Wang, Deborah Leckband et Johan de Rooij. *Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II independent manner.* The Journal of Cell Biology, vol. 189, no. 7, pages 1107–1115, Juin 2010. 28

[Lee 2005] Seunghwan Lee et Janos Voros J.s. *An Aqueous-Based Surface Modification of Poly(dimethylsiloxane) with Poly(ethylene glycol) to Prevent Biofouling.* Langmuir, vol. 21, no. 25, pages 11957–11962, Novembre 2005. 51, 52

[Liu 2010] Zhijun Liu, John L. Tan, Daniel M. Cohen, Michael T. Yang, Nathan J. Sniadecki, Sami Alom Ruiz, Celeste M. Nelson et Christopher S. Chen. *Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions.* Proceedings of the National Academy of Sciences, pages –, Mai 2010. 28, 29, 42, 90

[Lo 2000] Chun-Min Lo, Hong-Bei Wang, Micah Dembo et Yu-li Wang. *Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate.* Biophys J, vol. 79, no. 1, pages 144–152, Juillet 2000. 22, 63

[Loftus 1994] J C Loftus, J W Smith et M H Ginsberg. *Integrin-mediated cell adhesion : the extracellular face.* Journal of Biological Chemistry, vol. 269, no. 41, pages 25235–25238, Octobre 1994. 12

[Marsden 2003] Mungo Marsden et Douglas W. DeSimone. *Integrin-ECM Interactions Regulate Cadherin-Dependent Cell Adhesion and Are Required for Convergent Extension in Xenopus*, Juillet 2003. 32

[Martinez-Rico 2010] Clara Martinez-Rico, Frederic Pincet, Jean-Paul Thiery et Sylvie Dufour. *Integrins stimulate E-cadherin-mediated intercellular adhesion by regulating Src-kinase activation and actomyosin contractility.* Journal of Cell Science, vol. 123, no. 5, pages 712–722, Mars 2010. 33

[Maruthamuthu 2011] Venkat Maruthamuthu, Benedikt Sabass, Ulrich S. Schwarz et Margaret L. Gardel. *Cell-ECM traction force modulates endogenous tension at cell-cell contacts.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 108, no. 12, pages 4708–4713, Mars 2011. 29, 30, 33, 90, 105

[Maskarinec 2009] Stacey A. Maskarinec, Christian Franck, David A. Tirrell et Guruswami Ravichandran. *Quantifying cellular traction forces in three dimensions.* Proceedings of the National Academy of Sciences, pages –, Décembre 2009. 58, 92

[McDonald 2000] J. Cooper McDonald, David C. Duffy, Janelle R. Anderson, Daniel T. Chiu, Hongkai Wu, Olivier J. A. Schueller et George M. Whitesides. *Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane).* Electrophoresis, vol. 21, no. 1, pages 27–40, Janvier 2000. 49

[Mertz 2013] Aaron F. Mertz, Yonglu Che, Shiladitya Banerjee, Jill M. Goldstein, Kathryn A. Rosowski, Stephen F. Revilla, Carien M. Niessen, M. Cristina Marchetti, Eric R. Dufresne et Valerie Horsley. *Cadherin-based intercellular adhesions organize epithelial cell-matrix traction forces.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 110, no. 3, pages 842–847, Janvier 2013. 33, 105

[Mgharbel 2011] A. Mgharbel et A. Nicolas. *Procede de preparation d'une matrice hydrogel par photopolymerisation*, 2011. 65, 80

[Michel 2002] Roger Michel, Jost W. Lussi, Gabor Csucs, Ilya Reviakine, Gaudenz Danuser, Brigitte Ketterer, Jeffrey A. Hubbell, Marcus Textor et Nicholas D. Spencer. *Selective Molecular Assembly Patterning : A New Approach to Micro- and Nanochemical Patterning of Surfaces for Biological Applications.* Langmuir, vol. 18, no. 8, pages 3281–3287, Mars 2002. 51

[Nagar 1996] Bhushan Nagar, Michael Overduin, Mitsuhiko Ikura et James M. Rini. *Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization.* Nature, vol. 380, no. 6572, pages 360–364, Mars 1996. 34

[Navarro 1998] Pilar Navarro, Luigi Ruco et Elisabetta Dejana. *Differential Localization of VE- and N-Cadherins in Human Endothelial Cells : VE-Cadherin Competes with N-Cadherin for Junctional Localization.* The Journal of Cell Biology, vol. 140, no. 6, pages 1475–1484, Mars 1998. 34

[Nicolas 2004] A. Nicolas et S. A. Safran. *Elastic deformations of grafted layers with surface stress.* Phys. Rev. E, vol. 69, no. 5, pages 051902–, Mai 2004. 92

[Nieset 1997] J.E. Nieset, A.R. Redfield, F. Jin, K.A. Knudsen, K.R. Johnson et M.J. Wheelock. *Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin.* Journal of Cell Science, vol. 110, no. 8, pages 1013–1022, Avril 1997. 35

[Nobes 1995] Catherine D Nobes et Alan Hall. *Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia.* Cell, vol. 81, no. 1, pages 53–62, Avril 1995. 26

[Parsons 2010] Thomas Parsons, Alan Horwitz et Martin Schwartz. *Cell adhesion : integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension.* Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 11, no. 9, pages 633–643, Septembre 2010. 26

[Pelham 1997] Robert J. Pelham et Yu-li Wang. *Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 94, no. 25, pages 13661–13665, Décembre 1997. 65

[Petitjean 2010] L. Petitjean, M. Reffay, E. Grasland-Mongrain, M. Poujade, B. Ladoux, A. Buguin et P. Silberzan. *Velocity Fields in a Collectively Migrating Epithelium.* Biophys J, vol. 98, no. 9, pages 1790–1800, Mai 2010. 85

[Peyton 2005] Shelly R. Peyton et Andrew J. Putnam. *Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion.* J. Cell. Physiol., vol. 204, no. 1, pages 198–209, Juillet 2005. 65

[Pirone 2006] Dana M. Pirone, Wendy F. Liu, Sami Alom Ruiz, Lin Gao, Srivatsan Raghavan, Christopher A. Lemmon, Lewis H. Romer et Christopher S. Chen. *An inhibitory role for FAK in regulating proliferation : a link between limited adhesion and RhoA-ROCK signaling.* The Journal of Cell Biology, vol. 174, no. 2, pages 277–288, Juillet 2006. 21

[Ponti 2004] A. Ponti, M. Machacek, S. L. Gupton, C. M. Waterman-Storer et G. Danuser. *Two Distinct Actin Networks Drive the Protrusion of Migrating Cells.* Science, vol. 305, no. 5691, pages 1782–1786, Septembre 2004. 14

[Puech 2006] Pierre-Henri Puech, Kate Poole, Detlef Knebel et Daniel J. Muller. *A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM.* Ultramicroscopy, vol. 106, no. 8, pages 637–644, Juin 2006. 29

[Raffel 1998] M. Raffel, C. Willert et J. Kompenhans. Particle image velocimetry : A practical guide. Springer, 1998. 68, 70

[Reinhart-King 2002] Cynthia A. Reinhart-King, Micah Dembo et Daniel A. Hammer. *Endothelial Cell Traction Forces on RGD-Derivatized Polyacrylamide Substrate.* Langmuir, vol. 19, no. 5, pages 1573–1579, Décembre 2002. 65

[Reinhart-King 2008] Cynthia A. Reinhart-King, Micah Dembo et Daniel A. Hammer. *Cell-Cell Mechanical Communication through Compliant Substrates.* Biophys J, vol. 95, no. 12, pages 6044–6051, Décembre 2008. 60

[Rief 1999] Matthias Rief, Jaime Pascual, Matti Saraste et Hermann E Gaub. *Single molecule force spectroscopy of spectrin repeats : low unfolding forces in helix bundles.* Journal of Molecular Biology, vol. 286, no. 2, pages 553–561, Février 1999. 24

[Roux 1895] W Roux. *Gesammelte Abhandlungen uber Entwicklungsmechanik.* (Leipzig, Germany : W. Engelmann), 1895. 19

[Sabass 2008] B Sabass, ML Gardel, CM Waterman et US Schwarz. *High Resolution Traction Force Microscopy Based on Experimental and Computational Advances.* Biophysical Journal, vol. 94, no. 1, pages 207–220, Janvier 2008. 63, 71

[Saez 2010] A Saez, E Anon, M Ghibaudo, O du Roure, J-M Di Meglio, P Hersen, P Silberzan, A Buguin et B Ladoux. *Traction forces exerted by epithelial cell sheets.* Journal of Physics : Condensed Matter, vol. 22, no. 19, pages 194119–, 2010. 41

[Sawada 2006] Yasuhiro Sawada, Masako Tamada, Benjamin J. Dubin-Thaler, Oksana Cherniavskaya, Ryuichi Sakai, Sakae Tanaka et Michael P. Sheetz. *Force Sensing by Mechanical Extension of the Src Family Kinase Substrate p130Cas.* Cell, vol. 127, no. 5, pages 1015–1026, Décembre 2006. 26, 27

[Schwartz 2008] MA Schwartz et DW DeSimone. *Cell adhesion receptors in mechanotransduction.* Curr Opin Cell Biol, vol. 20, no. 5, pages 551–556–, Octobre 2008. 28

[Schwarz 2002] U.S. Schwarz, N.Q. Balaban, D. Riveline, A. Bershadsky, B. Geiger et S.A. Safran. *Calculation of Forces at Focal Adhesions from Elastic Substrate Data : The Effect of Localized Force and the Need for Regularization.* Biophys J, vol. 83, no. 3, pages 1380–1394, Septembre 2002. 61, 62, 81

[Schwarz 2007] Ulrich Schwarz. *Soft matters in cell adhesion : rigidity sensing on soft elastic substrates.* Soft Matter, vol. 3, no. 3, pages 263–266, 2007. 65

[Smutny 2010] Michael Smutny et Alpha S. Yap. *Neighborly relations : cadherins and mechanotransduction.* The Journal of Cell Biology, vol. 189, no. 7, pages 1075–1077, Juin 2010. 28

[Solon 2007] Jerome Solon, Ilya Levental, Kheya Sengupta, Penelope C. Georges et Paul A. Janmey. *Fibroblast Adaptation and Stiffness Matching to Soft Elastic Substrates.* Biophys J, vol. 93, no. 12, pages 4453–4461, Décembre 2007. 22

[Stroka 2011] Kimberly M. Stroka et Helim Aranda-Espinoza. *Endothelial cell substrate stiffness influences neutrophil transmigration via myosin light chain kinase-dependent cell contraction.* Blood, vol. 118, no. 6, pages 1632–1640, Août 2011. 94

[Tambe 2011] Dhananjay T. Tambe, C. Corey Hardin, Thomas E. Angelini, Kavitha Rajendran, Chan Young Park, Xavier Serra-Picamal, Enhua H. Zhou, Muhammad H. Zaman, James P. Butler, David A. Weitz, Jeffrey J. Fredberg et Xavier Trepat. *Collective cell guidance by cooperative intercellular forces.* Nat Mater, vol. 10, no. 6, pages 469–475, Juin 2011. 31, 39, 57, 90, 91, 107

[Tambe 2013] Dhananjay T. Tambe, Ugo Croutelle, Xavier Trepat, Chan Young Park, Jae Hun Kim, Emil Millet, James P. Butler et Jeffrey J. Fredberg. *Monolayer Stress Microscopy : Limitations, Artifacts, and Accuracy of Recovered Intercellular Stresses.* PLoS ONE, vol. 8, no. 2, pages e55172–, Février 2013. 73, 74, 75, 76, 90, 107

[Tan 2003] John L. Tan, Joe Tien, Dana M. Pirone, Darren S. Gray, Kiran Bhadriraju et Christopher S. Chen. *Cells lying on a bed of microneedles : An approach to isolate mechanical force.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 100, no. 4, pages 1484–1489, Février 2003. 20, 21, 49, 59

[Thery 2010] Manuel Thery. *Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions.* Journal of Cell Science, vol. 123, no. 24, pages 4201–4213, Décembre 2010. 97

[Thompson 1917] D.W. Thompson. *On Growth and Form.* (Cambridge : Cambridge University Press), 1917. 19

[Tillet 2005] Emmanuelle Tillet, Daniel Vittet, Olivier Feraud, Robert Moore, Rolf Kemler et Philippe Huber. *N-cadherin deficiency impairs pericyte recruitment, and not endothelial differentiation or sprouting, in embryonic stem cell-derived angiogenesis.* Experimental Cell Research, vol. 310, no. 2, pages 392–400, Novembre 2005. 9

[Totsukawa 2000] Go Totsukawa, Yoshihiko Yamakita, Shigeko Yamashiro, David J. Hartshorne, Yasuharu Sasaki et Fumio Matsumura. *Distinct Roles of Rock (Rho-Kinase) and Mlck in Spatial Regulation of Mlc Phosphorylation for Assembly of Stress Fibers and Focal Adhesions in 3t3 Fibroblasts.* The Journal of Cell Biology, vol. 150, no. 4, pages 797–806, Août 2000. 15

[Truffier-Boutry 2010] D. Truffier-Boutry, A. Beaurain, R. Galand, B. Pelissier, J. Boussey et M. Zelsmann. *XPS Study of the Degradation Mechanism of Fluorinated Anti-sticking Treatments Used in UV Nanoimprint Lithography.* Microelectron. Eng., vol. 87, no. 2, pages 122–124, Février 2010. 47

[Twiss 2013] Floor Twiss et Johan Rooij. *Cadherin mechanotransduction in tissue remodeling.* vol. 70, no. 21, pages 4101–4116–, 2013. 31, 89

[Ulman 1996] Abraham Ulman. *Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers.* Chem. Rev., vol. 96, no. 4, pages 1533–1554, Janvier 1996. 49

[Vicente-Manzanares 2009] Miguel Vicente-Manzanares, Xuefei Ma, Robert S. Adelstein et Alan Rick Horwitz. *Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration.* Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 10, no. 11, pages 778–790, Novembre 2009. 16

[Vignaud 2012] Timothee Vignaud, Remi Galland, Qingzong Tseng, Laurent Blanchoin, Julien Colombelli et Manuel Thery. *Reprogramming cell shape with laser nano-patterning.* Journal of Cell Science, vol. 125, no. 9, pages 2134–2140, Mai 2012. 55

[Vitorino 2008] Philip Vitorino et Tobias Meyer. *Modular control of endothelial sheet migration.* Genes and Development, vol. 22, no. 23, pages 3268–3281, Décembre 2008. 84, 85, 87

[Wallez 2008] Yann Wallez et Philippe Huber. *Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, vol. 1778, no. 3, pages 794–809, Mars 2008. 7

[Wang 1993] N Wang, JP Butler et DE Ingber. *Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton.* Science, vol. 260, no. 5111, pages 1124–1127, Mai 1993. 22, 58

[Wang 2002] Ning Wang, Emanuele Ostuni, George M. Whitesides et Donald E. Ingber. *Micropatterning tractional forces in living cells.* Cell Motil. Cytoskeleton, vol. 52, no. 2, pages 97–106, Juin 2002. 98

[Wipff 2007] Pierre-Jean Wipff, Daniel B. Rifkin, Jean-Jacques Meister et Boris Hinz. *Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix.* The Journal of Cell Biology, vol. 179, no. 6, pages 1311–1323, Décembre 2007. 25

[Wolff 1892] Y Wolff. *Das Gesetz der Transformation der Knochen (Berlin : Verlag von August Hirschwald).* 1892. 19

[Wong 2003] Joyce Y. Wong, Alan Velasco, Padmavathy Rajagopalan et Quynh Pham. *Directed Movement of Vascular Smooth Muscle Cells on Gradient-Compliant Hydrogels.* Langmuir, vol. 19, no. 5, pages 1908–1913, Janvier 2003. 65

[Yamada 2005] Soichiro Yamada, Sabine Pokutta, Frauke Drees, William I. Weis et W. James Nelson. *Deconstructing the Cadherin-Catenin-Actin Complex.* Cell, vol. 123, no. 5, pages 889–901, Décembre 2005. 35

[Yang 2006] Zhaochun Yang, Jeen-Shang Lin, Jianxin Chen et James H-C. Wang. *Determining substrate displacement and cell traction fields : a new approach.* Journal of Theoretical Biology, vol. 242, no. 3, pages 607–616, Octobre 2006. 64

[Yano 2004] Hajime Yano, Yuichi Mazaki, Kazuo Kurokawa, Steven K. Hanks, Michiyuki Matsuda et Hisataka Sabe. *Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion.* The Journal of Cell Biology, vol. 166, no. 2, pages 283–295, Juillet 2004. 32

[Yonemura 2010] Shigenobu Yonemura, Yuko Wada, Toshiyuki Watanabe, Akira Nagafuchi et Mai Shibata. *[alpha]-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development.* Nat Cell Biol, vol. 12, no. 6, pages 533–542, Juin 2010. 35, 36

[Zaidel-Bar 2010] Ronen Zaidel-Bar et Benjamin Geiger. *The switchable integrin adhesome.* Journal of Cell Science, vol. 123, no. 9, pages 1385–1388, Mai 2010. 25

Articles

Michel Moussus, Christelle der Loughian, David Fuard, Marie Courçon, Danielle Gulino Debrac, Hélène Delanoë-Ayari et Alice Nicolas. *Intracellular stresses in patterned cell assemblies.* Soft Matter, vol 10, pages 2414-2423, 2014.

David Fuard, Michel Moussus, Caterina Tomba, David Peyrade, Alice Nicolas. *Fabrication of three-dimensional structures for the assessment of cell mechanical interactions within cell monolayers.* JVST B, 2010.