

Activité et réponse à une blessure d'un tapis de cellules

Axel Buguin (axel.buguin@curie.fr), **Erwan Grasland**, **Laurence Petitjean**, **Mathieu Poujade**, **Myriam Reffay**, **Pascal Silberzan**

Institut Curie/Centre de Recherches/Laboratoire PCC/UPMC, 75248 Paris Cedex 05

Olivia du Roure, **Marion Ghibaudo**, **Benoît Ladoux**, **Alexandre Saez**, **Léa Trichet**

Université Paris Diderot/Laboratoire MSC/UMR 7057 CNRS, 75205 Paris Cedex 13

La migration et l'adhésion cellulaires sont deux processus essentiels intervenant dans la structuration et le développement des tissus.

Pour préciser l'influence respective des environnements biochimiques et mécaniques sur la cellule permettant cette organisation, nous présentons deux expériences utilisant des dispositifs microfabriqués.

L'une permet de mesurer les forces que des cellules exercent sur leur substrat, et l'autre permet de déterminer la réponse d'un tissu à une blessure modèle.

Les résultats mettent en évidence une réponse spécifique des cellules en fonction de leur environnement mécanique local.

Tous les organismes vivants multicellulaires présentent un degré d'organisation extrêmement étonnant [1]. Un homme adulte, par exemple, est constitué d'environ 10^{11} cellules, toutes issues d'une cellule unique, l'œuf fécondé qui se divise. Ces cellules possèdent des propriétés morphologiques (du globule rouge de taille $\sim 10\ \mu\text{m}$ à certaines cellules neuronales atteignant quelques dizaines de centimètres de longueur) et fonctionnelles (cellule musculaire/globule blanc) parfaitement différenciées. Parmi les processus impliqués dans le développement (embryogénèse) et la régénération des tissus cellulaires, on privilégie généralement l'expression* et la régulation des gènes qui permettent d'obtenir une telle diversité. Le contrôle génétique et la différenciation ne sont toutefois pas suffisants pour expliquer, à eux seuls, un tel degré d'organisation. Celui-ci nécessite également une communication des cellules entre elles ou avec leur environnement. Cette communication peut prendre plusieurs formes complémentaires et couplées :

- en exprimant* des molécules que peuvent ensuite détecter les cellules voisines *via* des récepteurs transmembranaires spécifiques ;
- en exerçant des contraintes ou en modulant l'adhésion sur leurs voisines, directement par contact ou plus indirectement par l'activation de protéines transmembranaires mécano-sensibles.

Pour parvenir à une meilleure compréhension de ces phénomènes, nous avons mis au point deux dispositifs expérimentaux faisant appel aux techniques de micro-fabrication issues de la microélectronique :

- en premier lieu, un substrat qui permet de cartographier dynamiquement, à une échelle subcellulaire, les forces de quelques nN que des cellules exercent sur lui ;
- ensuite, une méthode originale permettant d'étudier la réponse dynamique d'une

assemblée de cellules (tissu) à une perturbation (libération de surface). Cette méthode s'apparente à un test de cicatrisation classique, mais permet de s'affranchir de son manque de reproductibilité grâce à un contrôle plus précis de l'environnement physicochimique des cellules.

Ces deux dispositifs sont compatibles avec la microscopie de fluorescence, technique de choix, en particulier pour localiser les protéines impliquées dans les processus d'adhésion et de migration cellulaires. Ils mettent en évidence l'émergence de comportements individuels, fonction de l'environnement mécanique, au sein d'une population de cellules *a priori* homogène.

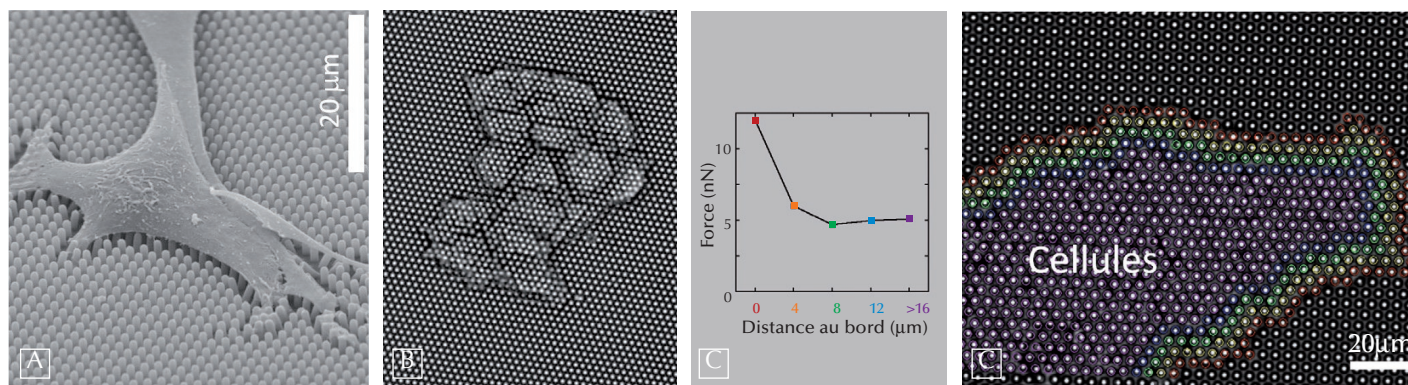
Forces exercées par les cellules sur leur environnement

L'adhésion et la migration cellulaires (essentielle pour des processus aussi variés que la morphogénèse, l'angiogénèse*, l'organisation des réseaux de neurones...) impliquent bien évidemment la génération de forces. Celles-ci sont transmises par le cytosquelette et les complexes protéiques d'adhésion*.

Le capteur de forces

Pour quantifier ces forces, nous avons fabriqué un substrat supportant un grand nombre de piliers déformables ($10^7/\text{cm}^2$) de taille micrométrique (fig. 1A), qui sont utilisés comme autant de microcapteurs de forces. Ce substrat est réalisé par moulage d'un élastomère silicone sur un moule en silicium microstructuré par les techniques classiques de microfabrication. Son module de Young est de l'ordre de 1 MPa, voisin de celui des élastiques en caoutchouc du commerce. C'est ici la finesse de la microstructure (piliers de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre et dont la hauteur peut être ajustée de 1 à $10\ \mu\text{m}$ pour varier leur constante de raideur) qui

Les termes suivis d'un astérisque (*) sont définis dans le glossaire, p. 21.



1. Quantification des forces exercées par un îlot de cellules sur un substrat de micropiliers déformables.

(A) Cellule déposée sur le substrat, observée en microscopie électronique à balayage.

(B) Îlot de cellules (vue de dessus) observé en microscopie optique. La mesure de la déflexion du sommet de chacun des piliers (de constante de raideur calibrée) permet de déterminer localement et dynamiquement les forces exercées par les cellules sur leur substrat. Vu leur diamètre, ces piliers agissent comme des guides d'onde lumineuse et le déplacement de leur sommet, plus brillant, peut être facilement détecté en microscopie optique par transmission (les cellules sont transparentes), avec une précision meilleure que 50 nm.

(C) À droite : image de la répartition des contraintes (moyenne temporelle) en bord d'un épithélium* en cours de croissance. À gauche : graphe de l'intensité des forces en fonction de la distance à ce bord. Les cellules de bord exercent des forces deux fois plus importantes sur le substrat (le code de couleur du graphe pour l'intensité de ces forces correspond à celui de l'image).

permet à chaque pilier de se déformer significativement sous l'influence de forces inférieures au nN [2]. Lors de ces expériences, la mesure (grâce à un microscope optique) de la déflexion des piliers, préalablement recouverts de protéines reproduisant l'environnement physiologique des cellules (matrice extra-cellulaire*), permet d'accéder dynamiquement aux forces locales exercées par les cellules (ici des cellules épithéliales de type MDCK*) dans le plan du substrat (fig. 1B).

Activité des cellules

Pour des îlots de quelques dizaines de cellules, ces mesures montrent l'existence d'une importante activité sous l'îlot (fluctuations temporelles importantes des forces mesurées), principalement aux frontières entre cellules. En outre, les contraintes moyennes que les cellules exercent sur le substrat sont maximales sur les bords de l'îlot et dirigées vers son centre (fig. 1C). Ainsi, les cellules de bord, bien qu'identiques génétiquement aux autres cellules, s'en distinguent par l'importance des forces qu'elles exercent sur le substrat.

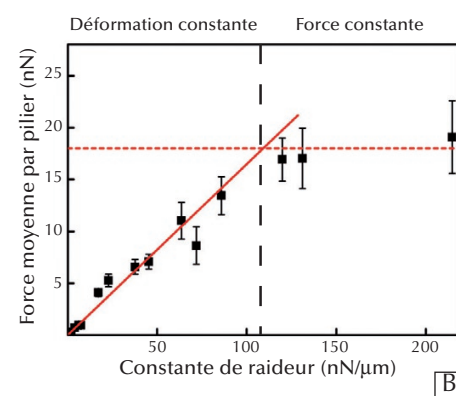
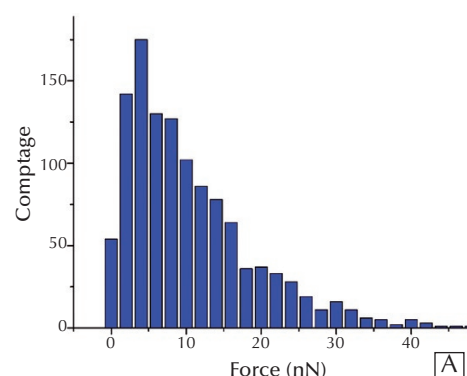
Forces exercées et rigidité du substrat

Un autre exemple, illustrant bien l'influence de l'environnement local, est un phénomène déjà observé en mécanique cellulaire, la « durotaxie » : *in vitro*, une cellule cultivée à cheval entre un substrat mou et un substrat dur migre spontanément vers la zone de plus grande rigidité [3] et de même, *in vivo*, les cellules se déplacent en suivant les gradients de rigidité de la

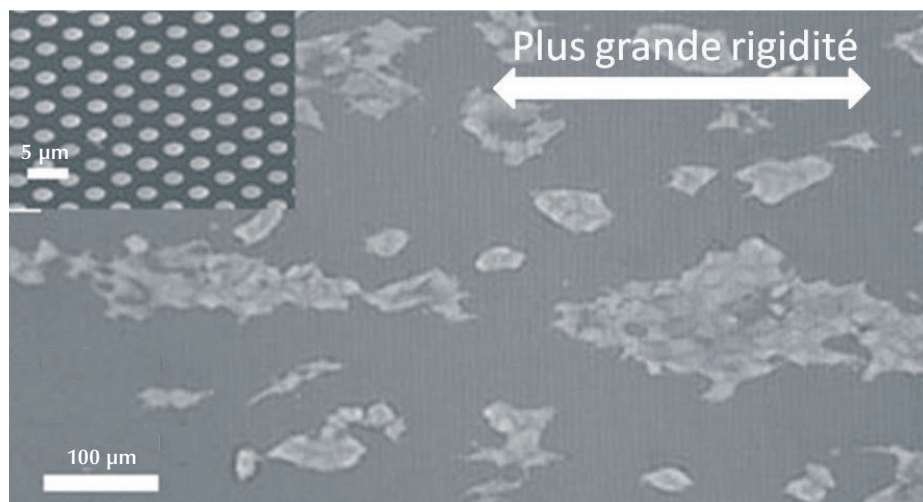
matrice extra-cellulaire*. Pour quantifier ce phénomène et caractériser la variation des forces avec la rigidité du substrat, nous avons utilisé les mêmes surfaces microstructurées en faisant varier la raideur des piliers (ce qui est facile, simplement en jouant sur leurs hauteur et diamètre [4]). Sur une gamme de rigidités s'étendant de 1 à 100 nN/μm, on remarque (fig. 2) que les forces moyennes (de 0,1 à 10 nN) exercées par les cellules sur le substrat croissent linéairement avec la raideur jusqu'à atteindre un plateau pour les piliers les plus raides. En d'autres termes, on passe d'un régime « substrat mou » où les cellules exercent sur les piliers une *déformation* constante (~ 100 nm en moyenne) à un régime « substrat dur » où c'est la force exercée qui est constante et qui s'établit à environ 20 nN. On observe également en microscopie de fluorescence que la taille et la forme des complexes d'adhésion* visualisés avec une protéine d'adhésion fluorescente sont affectées par la raideur du substrat [4]. Que la réponse cellulaire traduise l'existence d'une taille caractéristique intrinsèque (~ 100 nm, *i.e.* la pente mesurée dans le régime linéaire), ou que les cellules soient capables d'adapter la force qu'elles exercent à la rigidité du substrat, ces expériences mettent à nouveau en évidence l'influence de l'environnement mécanique.

Rigidité du substrat et organisation du tissu

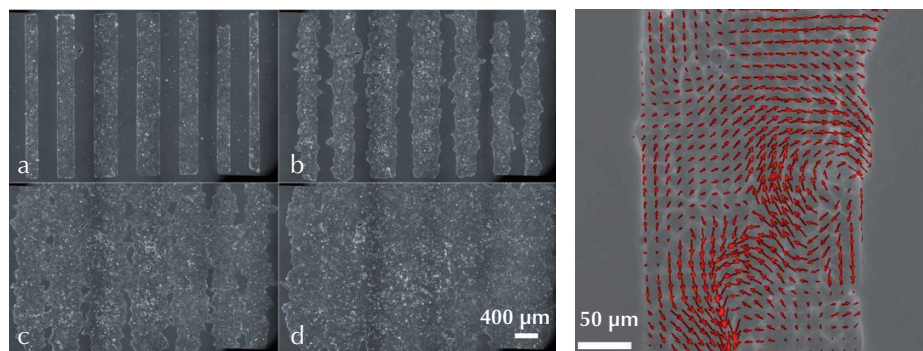
Une question demeure : ces variations des forces en fonction de la rigidité locale sont-elles suffisantes pour organiser ou pour influencer sur la structure d'un tissu en cours



2. Forces exercées par un îlot de cellules sur les piliers du substrat de la figure 1. (A) Histogramme de distribution des forces mesurées. (B) Force moyenne déduite de cet histogramme en fonction de la constante de raideur des piliers : on observe qu'elle augmente linéairement avec la rigidité du substrat, puis atteint un régime de saturation.

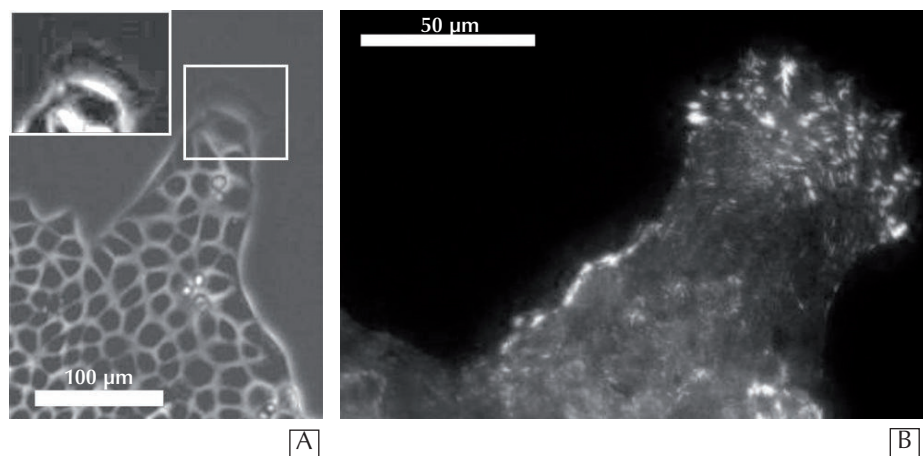


3. Des cellules déposées sur une surface présentant une anisotropie de rigidité, piliers de section ovale (insert) dont la direction de plus grande rigidité est indiquée par une flèche, **se développent de manière anisotrope**. Une analyse détaillée montre que les cellules présentes en bord d'îlots selon la direction de plus grande raideur exercent des forces beaucoup plus importantes.



4. Fermeture de blessures modèles.

(A) Séquence d'images obtenues en microscopie optique montrant la fermeture de blessures « modèles » de largeurs variables (a : $t = 1,5$ h ; b : $t = 13$ h ; c : $t = 25$ h ; d : $t = 37$ h). $t = 0$ correspond au retrait du micro-pochoir. (B) Champ de déplacements obtenu par PIV* (Particle Image Velocity) dans une bande de cellules en cours de croissance ($t = 4$ h).



5. Observation d'un bord d'épithélium* envahissant une surface libre.

(A) Vue de détail où on voit apparaître des digitations, en tête desquelles se distingue une cellule « leader » présentant un lamellipode particulièrement actif (insert : vue agrandie de la zone délimitée par le cadre). (B) Le marquage des points d'adhésion au substrat par des protéines d'adhésion rendues fluorescentes montre une activité très importante des cellules « leaders ».

>>>

de croissance ? Les propriétés mécaniques (par exemple les variations spatiales de rigidité présentes dans les tissus) peuvent-elles guider la migration des cellules ?

Pour répondre à cette question, nous avons confectionné des surfaces présentant une anisotropie de rigidité. Les piliers sont ici de section ovale, donc plus raides dans la direction de leur grand axe. La croissance de cellules épithéliales* sur ce type de substrat montre que celles-ci s'orientent et s'étirent selon cette direction (fig. 3) : le tissu en cours de formation reflète l'anisotropie du substrat qui lui est présenté, en s'allongeant dans la direction la plus rigide. À nouveau, les propriétés physiques locales de l'environnement suffisent à induire un comportement particulier des cellules.

Blessures modèles

Dans la première partie, nous avons cherché à quantifier les forces et l'influence du substrat pour des cellules en cours de croissance. Lorsque les cellules entrent en contact, deviennent jointives et se densifient, elles cessent progressivement de se diviser et forment un tapis dense. Nous avons voulu tester la réponse de cet épithélium* à une perturbation mécanique : la libération de surface.

La blessure « traditionnelle »

Le test de cicatrisation, couramment utilisé sur les cultures cellulaires, consiste à arracher mécaniquement à l'aide d'un objet pointu une tranchée de cellules dans un épithélium à confluence*. En observant au cours du temps la réponse des cellules restantes (la « cicatrisation ») à cette « blessure », on mesure qualitativement la capacité des cellules à migrer et à se diviser pour restaurer l'intégrité de la monocouche. Toutefois, ces expériences sont complexes puisqu'elles endommagent les cellules du bord de la blessure. Diverses interprétations sont alors possibles :

- les cellules endommagées en bord de blessure sont susceptibles de relarguer leur contenu dans le milieu, en particulier des facteurs solubles qui peuvent déclencher une réponse des cellules restantes ;
- une autre hypothèse est que la blessure, endommageant les cellules de bord, les rend perméables au milieu extra-cellulaire ce qui déclencherait leur migration ;
- enfin, il reste la possibilité que la simple création d'un bord libre sur un épithélium* soit suffisante pour provoquer la migration des cellules.

La blessure « modèle »

Pour mieux caractériser cette migration, nous avons développé un dispositif permettant de découpler ces effets. Utilisant à nouveau la microfabrication, des films minces ajourés (d'épaisseur environ 100 µm) sont fabriqués en élastomère de silicone ; ces films sont déposés sur une surface, et on laisse pousser les cellules dans les ouvertures jusqu'à confluence* où elles cessent de se déplacer. On retire alors ces micro-pochoirs (fig. 4Aa), ce qui libère de la surface sans affecter l'intégrité des cellules. L'observation se fait ensuite sur des durées de l'ordre de 10 à 30 heures sur un microscope équipé d'un incubateur (fig. 4A). Avec cette technique de fabrication des pochoirs, on peut créer de nombreux motifs strictement identiques sur le même film. Une seule expérience permet donc d'obtenir une bonne statistique tout en variant la géométrie des ouvertures.

Mouvements et division des cellules

Le premier résultat marquant de ces expériences est qu'effectivement, la présence d'une surface libre suffit à déclencher la migration collective des cellules, ce qui valide une hypothèse de base de nombreux travaux portant sur la migration cellulaire. Plus quantitativement, nous intéressant tout d'abord au comportement moyen, nous avons confirmé un résultat déjà reporté dans la littérature, à savoir que la largeur moyenne d'une blessure rectangulaire se résorbe de manière quadratique avec le temps. Toutefois, si on part de bandes de largeur initiale suffisamment faible (< 150 µm), le comportement est différent puisque la zone libérée est envahie (par migration et division des cellules restantes) plus lentement et à vitesse constante : les deux bords de la bande ne sont plus indépendants.

Il faut noter que le taux de division des cellules reste approximativement constant au sein du tissu au cours de cette progression, ce qui montre que les phénomènes observés traduisent la migration collective des cellules.

Pour étudier les déplacements dans l'ensemble de l'épithélium* à une échelle plus locale, nous avons utilisé la technique de PIV* (Particle Image Velocimetry). On constate que les déplacements des cellules sont cohérents et qu'elles évoluent en groupes coordonnés s'étendant sur environ 150 µm (fig. 4B) [5], soit une distance du même ordre que la largeur en dessous de laquelle on voit interagir les deux bords d'une bande.

Digitations en bord de blessure

Une observation plus détaillée du bord de la blessure montre une progression très irrégulière. En partant d'une ligne de bord parfaitement rectiligne, lors du retrait du pochoir, on obtient après quelques heures un bord présentant des digitations marquées (fig. 5A). Ces doigts, qui comptent quelques dizaines de cellules, croissent à vitesse constante ; ils sont précédés par une cellule (fig. 5A, insert), dite « leader », dont les caractéristiques sont tout à fait particulières. Beaucoup plus grande et étalée que les autres, elle présente à l'avant une protrusion membranaire (lamellipode) prononcée et active. Une image obtenue en microscopie de fluorescence, mettant en évidence les adhésions avec le substrat, confirme ce caractère spécifique (fig. 5B), et met à nouveau l'accent sur le couplage entre biochimie et biomécanique.

Pour spectaculaires qu'elles soient, ces cellules « leaders » sont transitoires : une fois la jonction entre les deux bords de la blessure faite, il est impossible de les distinguer des autres cellules, tout comme rien dans leur aspect ne permet d'anticiper quelles cellules deviendront « leaders ».

Conclusion

La formation des tissus implique la migration, la division et la différenciation des cellules. Nos expériences confirment que ces phénomènes ne résultent pas uniquement de l'environnement biochimique, mais peuvent être induits par les propriétés mécaniques locales (rigidité, surface libre).

Les deux expériences présentées ici, permettent d'illustrer cette richesse de comportements. Même si elles sont réalisées sur des tapis bidimensionnels de cellules épithéliales*, il est intéressant de noter que nos résultats se rapprochent d'observations obtenues sur des cultures cellulaires tridimensionnelles. Ainsi, des expériences, *in vitro* et *in vivo*, menées sur la souris montrent que l'invasion par des cellules tumorales peut s'opérer de manière individuelle ou collective. Par exemple, des digitations collectives précédées par des cellules « leaders » dégradant la matrice extra-cellulaire*, ont été mises en évidence *in vivo* à partir de tumeurs implantées sur des souris [6].

L'étape suivante consistera à développer des outils similaires pour étudier des tissus tridimensionnels plus proches des conditions rencontrées physiologiquement. ■

Glossaire

Angiogenèse :
processus de croissance des vaisseaux sanguins.

Cellules épithéliales :
cellules jointives formant un tapis (épithélium) et délimitant la bordure d'un tissu.

Complexe d'adhésion :
ensemble des protéines permettant la liaison entre le cytosquelette (réseau organisé de polymères biologiques) de la cellule et les cellules voisines ou un substrat (grâce à des protéines transmembranaires).

Confluence :
état atteint par un épithélium lorsque l'ensemble des cellules qui le constitue deviennent jointives par croissance ou cicatrisation.

Exprimer, expression :
au sens de la biologie, synthèse biochimique de molécules fonctionnelles (protéines, ARN...) à partir du code génétique.

Matrice extra-cellulaire :
ensemble des macromolécules extra-cellulaires (majoritairement des protéines sécrétées par les cellules) d'un tissu.

MDCK :
lignée de cellules épithéliales de rein de chien.

PIV :
technique de corrélation entre images successives, traditionnellement utilisée en hydrodynamique pour décrire les champs d'écoulement.

Bibliographie

- 1 • T. d'Arcy Wentworth et T. Kroonm, *On Growth and Form*, Dover Publications, Ed. (1992) (1^{re} édition, 1917).
- 2 • O. du Roure *et al.*, "Force mapping in epithelial cell migration", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **102** (2005) 2390.
- 3 • C.M. Lo *et al.*, "Cell movement is guided by the rigidity of the substrate", *Biophys. J.* **79** (2000) 144-152.
- 4 • A. Saez, A. Guigou, P. Silberzan et B. Ladoux, "Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformation or forces?", *Biophys. J.*, **89** (2005) 52-54.
- 5 • M. Poujade *et al.*, "Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **104** (2007) 15988.
- 6 • K. Wolf *et al.*, "Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion", *Nat. Cell Biol.*, **9** (2007) 893.