

Table des matières

Introduction Générale.....	1
Chapitre 1 : Contexte & État de l’art.....	5
1.1. Les macrophages et leur environnement.....	5
1.1.1. Rôle immunitaire des macrophages.....	5
1.1.2. Activation des macrophages.....	6
1.1.3. Rôle du microenvironnement.....	7
1.1.4. Contextes pathologiques.....	9
1.2. Propriétés mécaniques des macrophages.....	10
1.2.1. Les structures d’adhérences des macrophages : Podosomes.....	10
1.2.2. Perception et transduction des stimuli mécaniques au sein de la cellule.....	12
1.3. Migration des macrophages.....	14
1.3.1. Mode mésenchymateux & amiboïde.....	15
1.3.2. Un continuum de mode de migration.....	17
1.3.3. Rôle du noyau.....	19
1.3.4. Forces appliquées pendant la migration.....	21
1.4. Mesure de forces cellulaires.....	22
1.4.1. Panorama des techniques expérimentales actives.....	22
1.4.2. Panorama des techniques expérimentales passives.....	28
1.5. Objectifs de la thèse.....	39
Table des illustrations.....	41
Chapitre 2 : Micro canaux équipés de capteurs de forces pour l’étude de la migration des macrophages en milieu confiné.....	45
2.1. Fabrication de canaux équipés de micropiliers en PDMS.....	45
2.1.1. Design des dispositifs.....	45
2.1.2. Fabrication du moule.....	49
2.1.3. Réplique du moule en PDMS.....	50
2.2. Caractérisation du dispositif et modélisation des capteurs de force.....	52
2.2.1. Caractérisation des dimensions.....	52
2.2.2. Évaluation des propriétés mécaniques des piliers de PDMS.....	53
2.3. Analyse de la flexion des piliers due aux forces mécaniques des macrophages en migration confinée.....	56
2.3.1. Acquisition des images.....	57
2.3.2. Recalage des images.....	58
2.3.3. Segmentation des images de fluorescence.....	58
2.3.4. Suivi des piliers.....	59
2.3.5. Classification des piliers.....	59
2.3.6. Recalage des piliers.....	59
2.3.7. Zone nucléaire et extra nucléaire.....	60
2.3.8. Evaluation de l’orientation et de l’amplitude des forces.....	61
2.3.9. Limitation de détection.....	62
2.4. Résultats : Migration des macrophages dans les canaux équipés de piliers.....	62

2.4.1. Mise en place de l'expérience.....	62
2.4.2. Observation de la migration des macrophages dans les canaux équipés ou non de piliers.....	63
2.4.3. Observation des macrophages fixés dans les canaux au microscope électronique à balayage.....	65
2.4.4. Observation des macrophages par immunofluorescence en 3D.....	68
2.4.5. Les noyaux des macrophages.....	70
2.5. Résultats : Forces appliquées par les macrophages pour fléchir les piliers.....	72
2.5.1. Amplitude de la flexion.....	72
2.5.2. Orientation des forces.....	77
2.6. Conclusion et discussion.....	80
Table des illustrations.....	83
Chapitre 3 : Treillis tridimensionnels pour l'étude de la migration des macrophages en 3D.....	87
3.1. Fabrication des treillis par lithographie optique à deux photons.....	87
3.1.1. Design du réseau 3D.....	87
3.1.2. Fabrication de réseaux en résine par lithographie laser biphotons.....	88
3.2. Caractérisation du réseau 3D.....	93
3.2.1. Mesure dimensionnelles des structures.....	93
3.2.2. Propriétés mécaniques de la résine et du réseau.....	96
3.3. Analyse des déformations des poutres du réseau 3D par les macrophages	100
3.3.1. Traitement d'images appliqué aux vidéos pour l'analyse des déformations : Déformées des poutres & suivi des nœuds du réseau.....	101
3.3.2. Déformées de la maille.....	104
3.4. Observation et caractérisation de la migration 3D au sein du réseau Tridimensionnel.....	105
3.4.1. Invasion de l'échafaudage par les cellules.....	105
3.4.2. Déformation du réseau par un macrophage	112
3.4.3. Evaluation des forces cellulaires dans le contexte 3D.....	115
3.5. Conclusion.....	121
Table des illustrations.....	123
Conclusion générale.....	127

Introduction Générale

La recherche fondamentale a pour objectif de répondre à des problématiques de domaines bien différents les uns des autres. La finalité est de comprendre les phénomènes physiques, biologiques et chimiques qui nous entourent. La compréhension de ces problèmes mène à des savoirs indispensables à nos sociétés. En effet, les recherches menées tout au long de l'ère humaine ont permis de rendre compréhensible des phénomènes inexplicables jusqu'alors et qui avaient mené à des croyances infondées. Ces études fondamentales sont également indispensables à la recherche appliquée et permettent le développement de nouveaux outils parfois très rapidement utiles, même s'il peut arriver que dans certains cas, les réels progrès apportés par des technologies émergentes puissent être discutés de manière critique. Le développement de nouvelles techniques, par exemple les ordinateurs quantiques ou les « bistouris laser », est basé sur les résultats fondamentaux de la physique quantique pour le premier et de l'optique pour le deuxième.

La recherche fondamentale évolue de nos jours si bien que le cloisonnement qui existait entre les différents domaines, disparaît au profit de sujets de recherche communs et nécessitant l'expertise de plusieurs champs disciplinaires pour être résolu. Les outils et techniques développés dans un domaine pour une application donnée peuvent être adaptés et réutilisés pour des applications dans des domaines très différents. Notamment, le développement des micros et nanotechnologies, développées initialement pour créer les composants des outils informatiques quotidiennement utilisés, est maintenant utilisé pour créer des microdispositifs miniaturisés servant dans le domaine de la santé. Notre sujet d'étude qui sera décrit dans ce mémoire relève de cette typologie. L'étude de la migration des macrophages *ex vivo* implique le développement de microdispositifs via des processus propres aux microtechnologies de salle blanche, mais également la manipulation de cellules biologiques vivantes ainsi que le traitement d'images, soit l'utilisation de compétences interdisciplinaires.

Le sujet de cette thèse fondamentale, financée par l'Agence Nationale de la Recherche via le soutien au projet « Macronano », a été conçu à l'interface de différents domaines par mes directeurs de thèse : le Professeur Christophe Vieu et le Docteur Christophe Thibault, et réalisée dans l'équipe ELiA (Engineering for Life Science Applications) du LAAS-CNRS (Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes du Centre National de la Recherche Scientifique) en étroite collaboration avec l'équipe du Docteur Isabelle Maridonneau-Parini de l'IPBS (Institut de Protéomique et de Biologie Structurale) de Toulouse.

Les macrophages sont des cellules impliquées dans le système immunitaire. Leur présence dans les organes assure une surveillance constante en détectant d'éventuelles menaces pathogènes. Leur capacité à **migrer** dans ces tissus permet d'atteindre les cibles et de les éliminer. Cependant, il peut

arriver que dans certains contextes inflammatoires ou cancéreux, les macrophages puissent également participer à la prolifération de certaines affections. Les zones atteintes présentent bien souvent des propriétés topologiques et mécaniques différentes de celles des tissus sains (rigidité, porosité, confinement spatial ...) et induisent des réponses mécaniques du macrophage spécifiquement liées à ce contexte géométrique et mécanique. En effet, les macrophages sont bien connus pour leurs propriétés mécanosensorielles. Notamment, l'orientation et l'amplitude des forces appliquées par les macrophages lors de leurs mouvements migratoires ne sont pas les mêmes selon le micro environnement au sein duquel ils évoluent. Ainsi l'étude *ex vivo* de ces mécanismes de migration en fonction du contexte micro-environnemental qui semble au départ de nature assez fondamentale, permettra de contribuer à mieux comprendre le rôle, bénéfique ou délétère de ces cellules et de mettre à jour les déterminants biologiques qui les font basculer d'un rôle à l'autre.

Le présent mémoire de thèse décrira dans un premier temps les macrophages et les connaissances déjà acquises sur sa biologie, sa mécanique et ses mécanismes de migration. N'étant pas de formation initiale en biologie, le lecteur devra pardonner certaines maladresses probables, mais disposera de toutes les clefs de compréhension de mon travail de recherche. L'étude de la migration des macrophages peut être abordée avec des techniques diverses et variées. Une liste non exhaustive de ces méthodes sera ensuite donnée et discutée dans le but de montrer l'originalité de la voie que nous avons choisie.

Le deuxième chapitre exposera le premier dispositif conçu et fabriqué pour étudier les forces générées par des macrophages humains lors d'une migration spatialement confinée. Ce microdispositif est constitué de microcanaux fluidiques de dimensions contrôlées équipés de micropiliers déformables, servant de capteurs de forces. Nous avons ensuiteensemencé des macrophages humains à l'intérieur de ces dispositifs, puis observé finement la flexion des micropiliers engendrée par les forces cellulaires appliquées par les macrophages lors de leur migration au sein de ces canaux. Grâce au développement d'un algorithme permettant l'analyse des images, nous avons pu évaluer les forces générées dans différentes zones cellulaires et révéler que les cellules redirigent les forces de pression de l'intérieur vers l'extérieur lorsque le degré de confinement spatial augmente. Nous révélons ainsi un mécanisme de migration très particulier, peu sensible à l'adhérence du micro-environnement et n'impliquant pas les forces de traction largement décrites dans les études antérieures sur des surfaces planes, non représentatives des contextes physiologiques au sein desquels les macrophages sont amenés à migrer.

Pour aller au-delà de cette première étude et afin de bien mettre en avant les particularités d'une migration au sein d'un environnement réellement tri-dimensionnel, nous décrivons dans le chapitre troisième la fabrication des réseaux tridimensionnels périodiques obtenus par une méthode de lithographie optique à deux photons. Les motifs de ces réseaux possèdent des dimensions

caractéristiques de l'échelle cellulaire (structures de l'ordre du micron et périodicité de l'ordre de 10 μm). Ils sont composés de poutres suspendues qui peuvent être déformées par les cellules vivantes qui migrent au sein de ces treillis tridimensionnels. En enregistrant de nombreuses séquences vidéo des déformations de l'échafaudage lorsque des macrophages humains les infiltrent, nous avons pu étudier l'activité mécanique des macrophages au cours temps lorsqu'ils évoluent au sein de ces micro-environnements complexes, et de géométrie non plane. Sur une séquence particulière, représentative des observations effectuées, grâce à la mesure de la rigidité mécanique du matériau constituant le treillis, de la théorie de l'élasticité linéaire et d'une méthode de calcul aux éléments finis, nous évaluons la force cellulaire globale d'un macrophage lorsqu'il migre dans un microenvironnement 3D. De manière assez similaire au chapitre 2, nous révélons une migration qui procède par une poussée cellulaire contre les obstacles de son environnement (les poutres) et non par adhérence et traction. Contrairement à la méthode développée au chapitre 2 qui permet de mesurer les forces appliquées en certains points de la cellule, ici nous sommes capables d'évaluer la contrainte globale qu'exerce toute la cellule sur son environnement élastique.

Nous livrons au lecteur le résumé de ces recherches ainsi que les valeurs numériques des forces ou des contraintes mécaniques exercées par les macrophages humains au sein de ces micro-environnements reconstitués. Nous attirons toutefois son attention sur la relative imprécision des valeurs numériques qui sont fortement dépendantes de la valeur des modules élastiques des matériaux utilisés. Par faute de temps nous n'avons pas réussi à mesurer par nous-mêmes, une valeur précise de ces modules pour les matériaux impliqués après le processus de fabrication. Nous avons pris des valeurs réalistes de ces paramètres grâce à des études spécifiques de la littérature réalisées par d'autres équipes de recherche, si bien que les valeurs finales des efforts mécaniques que nous dévoilons doivent être considérées avec une incertitude relative de l'ordre de 20%.

Chapitre 1 : Contexte & État de l'art

1.1. Les macrophages et leur environnement

1.1.1. Rôle immunitaire des macrophages

Le système immunitaire décrit l'ensemble des mécanismes de défense de notre organisme. Si un agent pathogène infecte nos organes, deux processus s'actionnent en parallèle pour l'éliminer :

L'immunité dite innée : les neutrophiles et macrophages (figure 1¹) phagocytent rapidement les éléments étrangers et les détruisent.

L'immunité dite adaptative : les différents types de lymphocytes (figure 1) coopèrent afin de supprimer les agents pathogènes, notamment par la sécrétion d'anticorps spécifiques.

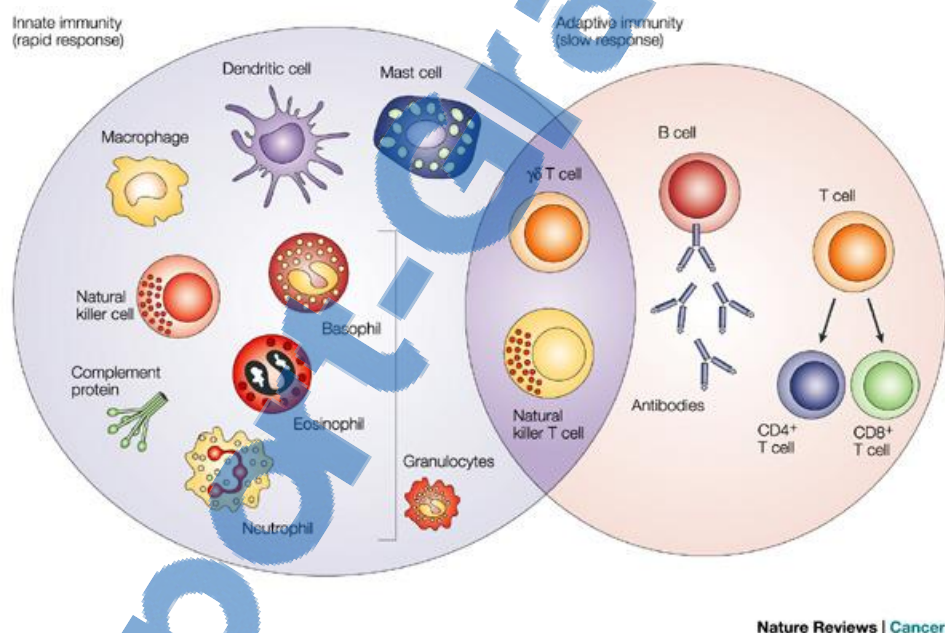


Figure 1 : Cellules impliquées dans les réponses innées et acquises du système immunitaire. Extrait de Dranoff et al.¹.

Ces deux processus impliquent la reconnaissance du "soi" et du "non-soi" et sont en interaction : les leucocytes communiquent par des protéines qu'elles produisent pour moduler les actions du système

¹ Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews*. **4**, 11-22

immunitaire en fonction du niveau de l'inflammation. Ces cellules sont donc toujours en mouvement et s'autorégulent. Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement attaché à la capacité de migration des macrophages, cellules clés de notre immunité innée.

1.1.2. Activation des macrophages

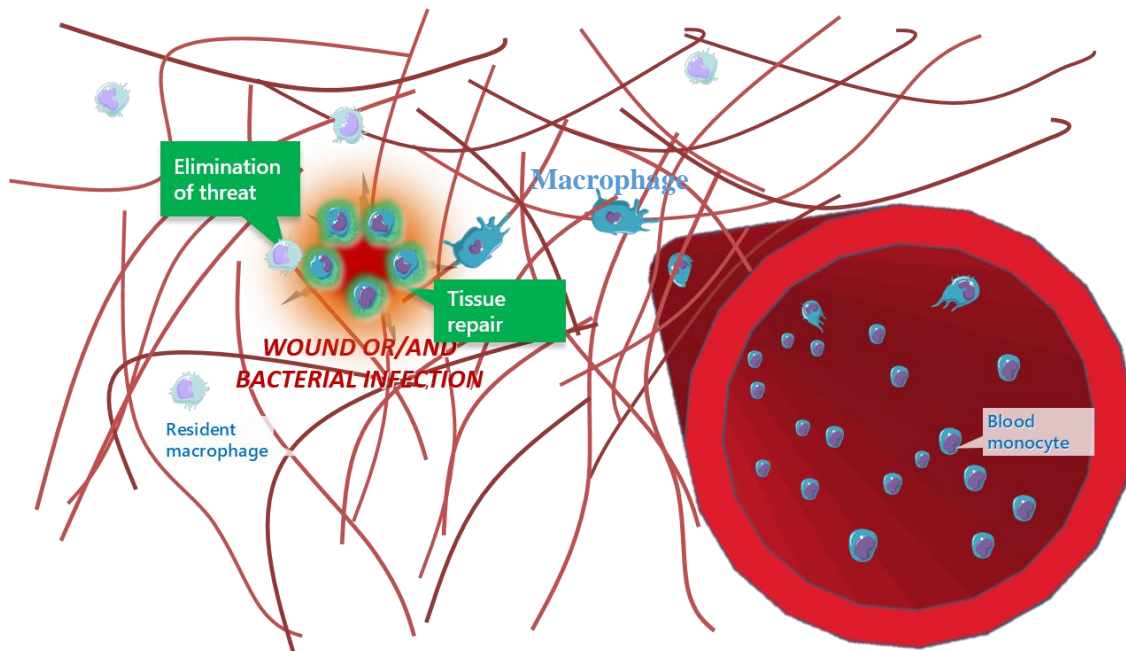


Figure 2 : Schéma du recrutement des macrophages lors d'une infection. Les macrophages résidents détectent le site infecté et transmettent l'information aux monocytes qui quittent alors le vaisseau sanguin. Ils se différencient alors en macrophage en migrant vers le site infecté.

Les monocytes circulent dans le réseau sanguin jusqu'aux différents organes où ils se différencient en cellules dendritiques ou en macrophages en réponse à une signalisation via des cytokines (M-CSF, GM-CSF, IL-4, IL-34)². La figure 2 schématise la différenciation qui a lieu quand le monocyte traverse la membrane du vaisseau sanguin³, et la migration faite par les macrophages pour atteindre le lieu de l'inflammation pour éliminer des menaces, telles que des bactéries. Les macrophages dérivés de monocytes se différencient en macrophages dits « résidents », présents en permanence dans les organes et nommés en fonction de ceux-ci (macrophages péritonéaux pour le péritoine, cellules de Kupffer pour le foie)⁴. Les macrophages peuvent s'activer de différentes manières en fonction de leur environnement cytokinique et acquérir différentes fonctions. Les macrophages pro-inflammatoires M1 et alternatifs M2,

² Jenkins, SJ et al. (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from blood, is signature of TH2 inflammation. *Science*. **332**, 1284-1288

³ Gordon, S., Taylor, RT. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews*. **5**, 953-964

⁴ Murray, PJ., Wynn, AW. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews*. **11**, 723-737

dont la pertinence *in vivo* est encore aujourd'hui débattue, sont des extrêmes des différents phénotypes que l'on peut retrouver dans l'organisme, voir figure 3⁵.

1.1.3. Rôle du micro environnement

- La matrice extra cellulaire

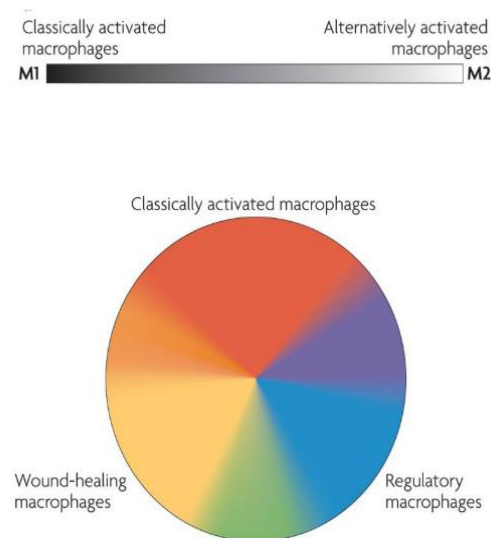


Figure 3 : Spectre d'activation des macrophages. Le panel en haut montre une polarisation linéaire des M1 et M2. En bas, une représentation circulaire des macrophages entre les macrophages activés de façon classique, les macrophages activés pour la réparation des tissus. Adapté de Mosser et al, 2008⁵

La matrice extra cellulaire est un réseau, structuré de molécules, qui confère notamment sa rigidité au tissu, qui évolue au cours du temps et qui se spécialise en fonction des cellules présentes⁶. Réciproquement, la matrice extra cellulaire influe sur le comportement des cellules. En effet, leur prolifération, leur différenciation, leur polarité et bien d'autres paramètres⁷ peuvent évoluer suivant la composition de la matrice extra cellulaire.

Les composants

Les collagènes sont les protéines les plus présentes dans les matrices extracellulaires. Organisé sous forme de fibres, le collagène de type I, dont le module d'Young est de 360 MPa, confère sa rigidité à la matrice extra cellulaire⁸. Il est produit par les fibroblastes et les chondroblastes, les cellules

⁵ Adapté de Mosser, DM., Edwards, JP. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews*. **8**, 958-969

⁶ Matrisian, LM. (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends in Genetics*. **6**, 121-125

⁷ Gattazzo, F et al. (2014). Extracellular matrix : A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1840**, 2506-2519

⁸ Mecham, RP. (2012). Overview of Extracellular Matrix. *Current Protocols in Cell Biologist*. **57**, 10.1.1-10.1.16

endothéliales et musculaires. Différents agencements des chaînes de molécules sont possibles. Les différents types de collagène (I, II, III...) sont présents en proportions différentes dans les tissus pour réaliser des fonctions différentes (type II prépondérant dans l'œil, type I dans la peau).

Les tropoélastines, sécrétées par les fibroblastes, confèrent à la matrice extra cellulaire leurs propriétés élastiques et sont très présentes dans les composants qui se dilatent comme les poumons⁹.

Les microfibrillines, également sécrétés par les fibroblastes, forment avec les tropoélastines les fibres d'élastine. Elles sont liées par des ponts formés de microfibrilles de glycoprotéines¹⁰. Dans le cas particulier de la lame basale, on trouve des laminines qui permettent via des intégrines l'adhérence avec les cellules⁹.

Les glycoprotéines sont également des composants de la matrice cellulaire comme la laminine et la fibronectine. Ces protéines jouent des rôles au sein de la matrice extracellulaire et favorisent par exemple son élasticité ou l'interaction entre la matrice extra cellulaire et les cellules qui évoluent dans ce milieu.

Les propriétés mécaniques de la matrice extra cellulaire

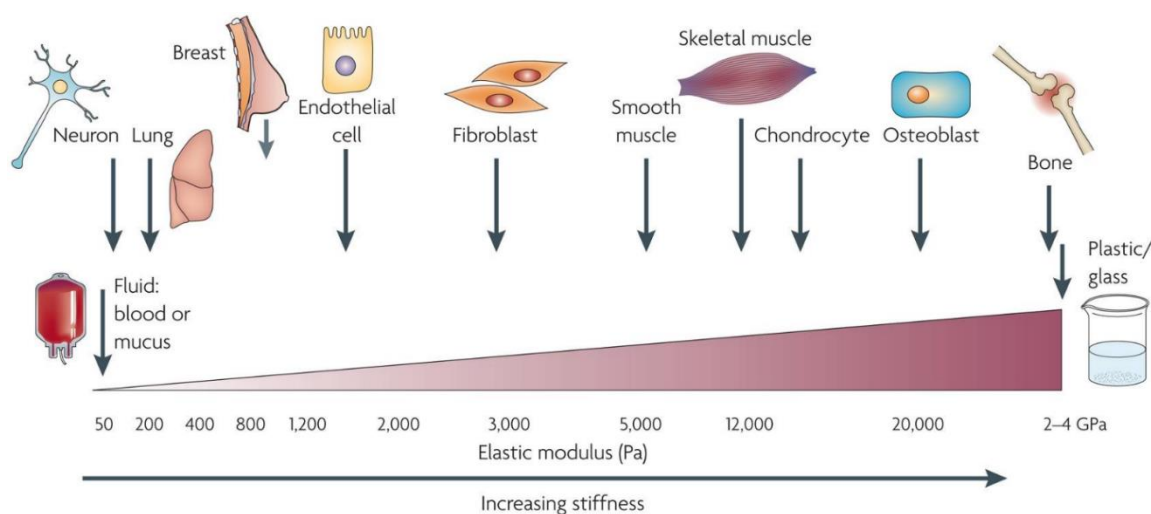


Figure 4 : Rigidité des différents tissus du corps humain. Échelle de rigidité des différents tissus du corps humain. Adapté de Butcher et al, 2009¹¹

Les propriétés mécaniques des tissus sont variables, dans la figure 4 sont classés différents éléments biologiques en fonction de leur rigidité¹¹. Les modules d'Young de ces éléments varient entre des centaines de MPa (poumons, poitrine...) à quelques GPa (os). Les cellules résidentes dans ces tissus sont influencées par ces rigidités, mais également par les contraintes de cisaillement, de compression ou

⁹ Alerts, B et al. (2002). Molecular biology of the cell, 4th edition. Garland Science.

¹⁰ Sakai, YS. (1986). Fibrillin, a new 350-kD Glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *Current The Journal of Cell Biology*. **103**, 2499-2509

¹¹ Adapté de Butcher DT et al. (2009). À tense situation; forcing tumour progression. *Nature*. **9**, 108-122

de tension qui leur sont appliquées. Les cellules répondent à ces contraintes et maintiennent un certain équilibre mécanique crucial pour le bon fonctionnement de l'organe¹². Tout changement dans ces tissus perturbe cet équilibre et impacte les cellules.

La réorganisation des fibres, un changement du nombre de nœuds dans le réseau ou une augmentation des protéines modifient la rigidité apparente du tissu et peuvent affecter les macrophages et leur capacité à réaliser leur fonction¹². En effet, les cellules développent des mécanismes de perception de l'environnement mécanique (mechanosensing) et s'adaptent à la rigidité perçue. Pour les macrophages, des structures spécifiques appelées podosomes permettent d'évaluer les contraintes exercées par l'environnement, et par un système de chaîne d'activation, de s'y adapter.

1.1.4. Contextes pathologiques

Lorsqu'une tumeur se développe dans un tissu, les propriétés mécaniques de ce dernier ne sont pas les mêmes que celles du tissu sain. La rigidité du microenvironnement tumoral est augmentée. Les macrophages s'adaptent à ces propriétés et migrent dans ce nouvel environnement. Parfois, ils peuvent favoriser l'angiogenèse et donc la vascularisation des tumeurs en délivrant des facteurs de croissance des vaisseaux. Une fois la tumeur vascularisée, des cellules cancéreuses peuvent migrer et envahir le réseau sanguin, circuler dans le sang, pour aller former des métastases dans d'autres organes¹³, comme décrits sur la figure 5.

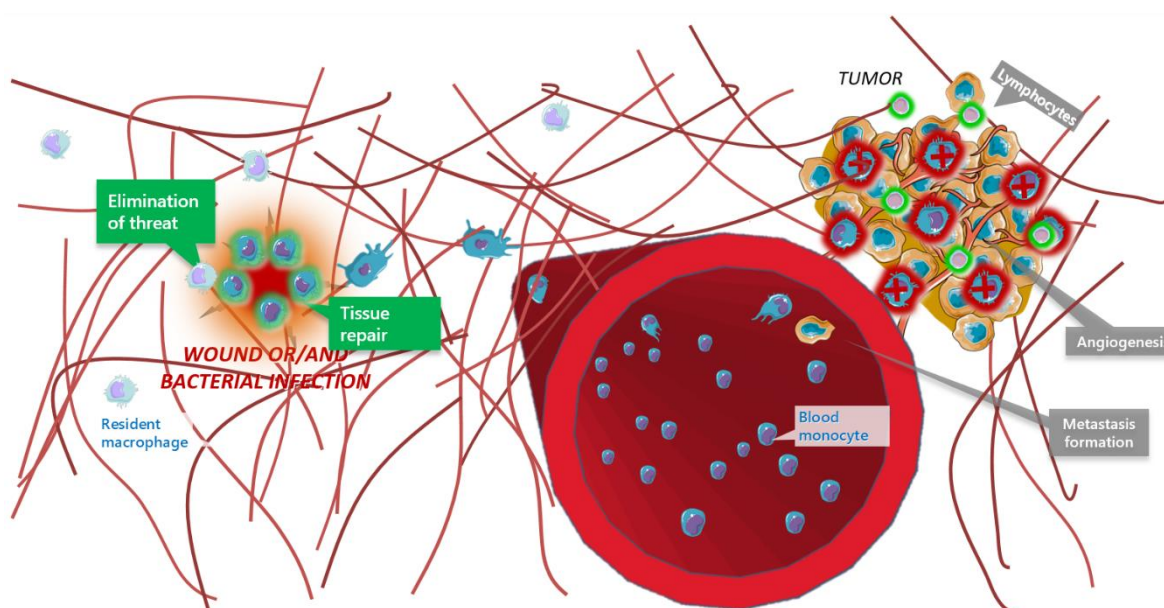


Figure 5 : Schéma du recrutement des macrophages lors d'une infection et du développement d'une tumeur. Les macrophages résidents détectent le site infecté ou la tumeur et transmettent l'information aux monocytes qui quittent alors le vaisseau sanguin. Ils se différencient en macrophages et migrent vers le site infecté ou la tumeur. En migrant dans la zone de la tumeur, le macrophage permet la vascularisation de celle-ci et la migration des cellules cancéreuses.

¹² Discher, DE et al. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Materials and biology*, **310**, 1139-1143

¹³ Qian, BZ., Pollard, JW. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. **141**, 39-51

Les macrophages sont également connus pour aider parfois le développement de maladies inflammatoires chroniques comme l'athérosclérose et la polyarthrite rhumatoïde. Dans ce dernier cas, les macrophages infiltrent, en migrant, les membranes synoviales et participent à l'érosion osseuse¹⁴.

L'implication des macrophages dans le développement de certaines maladies est telle qu'aujourd'hui ils constituent des cibles thérapeutiques¹⁴. L'étude des mécanismes impliqués dans l'infiltration tissulaire des macrophages est donc un enjeu majeur.

1.2. Propriétés mécaniques des macrophages

1.2.1. Les structures d'adhérences des macrophages : Podosomes

Les macrophages forment des structures d'adhérence spécifiques appelées podosomes. Les podosomes sont également formés par les cellules dendritiques ou bien les ostéoclastes. Les podosomes permettent aux macrophages d'adhérer à leur environnement, et de dégrader la matrice extra cellulaire.

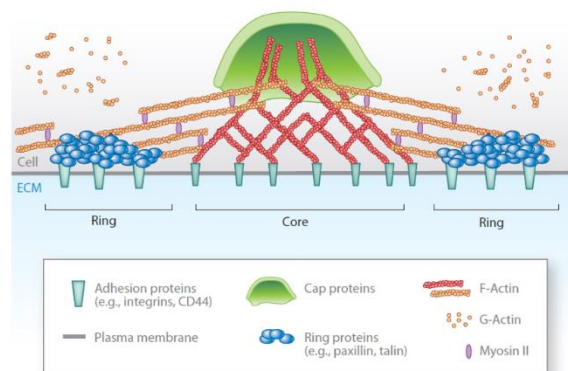


Figure 6 : Schéma d'un podosome en coupe transverse. Le corps du podosome est composé d'actine filamenteuse (en rouge), relié aux branches d'actine latérales (orange), elles-mêmes reliées aux protéines de l'anneau (bleu). Le cœur d'actine est surmonté d'un chapeau de protéines. Extrait de Linder 2011 et al.¹⁵

¹⁴ Maridonneau-Parini, I. (2014). Control of macrophage 3D migration: a therapeutic challenge to limit tissue infiltration. *Immunological Reviews*, **162**, 216-231.

Le podosome est composé de structures liées les unes aux autres. Le cœur, en rouge sur la figure 6¹⁵, est formé d'actine filamenteuse (F) nucléée par le complexe de protéines Arp2/3^{16 17}. Au sein de l'anneau d'adhérence, en orange sur la figure 6, s'accumulent des intégrines et des protéines permettant de lier les intégrines au cytosquelette (taline, vinculine...) ¹⁸. La coiffe, récemment décrite, en vert sur la figure 6, est une structure formée de protéines (formine, FMNL1¹⁹, INF2²⁰, superviline²¹, la fascine²²) qui surmonte le cœur d'actine.

Les podosomes peuvent s'organiser les uns par rapport aux autres et former des super structures, notamment dans la sealing zone de l'ostéoclaste. Il a été montré pour la première fois en 2015, qu'ils se lient entre eux par des câbles d'actine. Leurs actions sont alors corrélées à celles de leurs premiers voisins²³.

Cette architecture du podosome est valable lorsque le macrophage migre sur des surfaces telles que les substrats 2D *in vitro* de culture cellulaire. Cependant, lorsque le macrophage migre dans un environnement 3D dense, par exemple du matrigel, l'architecture caractéristique du podosome n'a pas

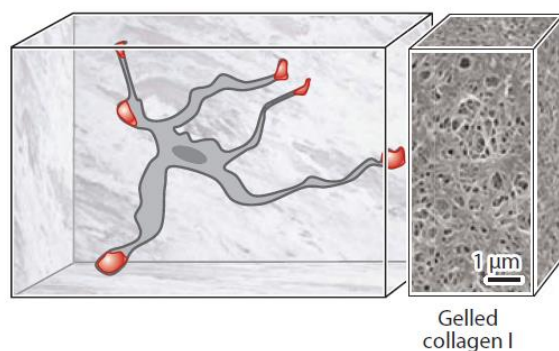


Figure 7 : Podosome en 3D. Schéma d'un macrophage migrant dans un gel de collagène. Des structures de type podosome sont observées au bout des protrusions. Extrait de van Goethem 2010²⁴

¹⁵ Extrait de Linder, S et al. (2011). Invadosomes in proteolytic cell invasion. *Journal of the cell biology*. **27**, 185-211

¹⁶ El Azzouzi, K et al. (2016) Metalloproteinase MT1-MMP islets act as memory devices for podosome reemergence. *Journal of the cell biology*, **213**, 109-125

¹⁷ Schönlchen, A., Feyer, M., (2010). Fifteen formins for an actin filament: A molecular view on the regulation of human formins. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1803**, 152-163

¹⁸ Zamboni-Zallone, A et al. (1989). Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts : A beta3 integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Experimental Cell Research*. **182**, 645-652

¹⁹ Mersich, AT et al. (2010). The formin FRL1 (FMNL1) is an essential component of macrophage podosomes. *Cytoskeleton(Hoboken)*. **67**, 753-585

²⁰ Panzer, L et al. (2016). The formins FHOD1 and INF2 regulate inter- and intra- structural contractility of podosomes. *Journal of Cell Science*, **129**, 298-213.

²¹ Bhuvania, R et al. (2012). Supervillin couples myosin-dependent contractility to podosomes and enables their turnover. *Journal of Cell Science*. **125**, 2300-2314

²² Ruoslahti, E. (1996). Integrin Signaling and matrix assembly. *Tumor Biol*, **17**, 117-124.

²³ Proag, A et al. (2015). Working together : spatial synchrony in the force and actin dynamics of podosome first neighbors. *ACS Nano*. **9**, 3900-3813

pour l'instant été observée, même si les protéines caractéristiques du podosome y sont observées (actine F, vinculine, taline, paxiline, voir figure 7) ²⁴.

1.2.2. Perception et transduction des stimuli mécaniques au sein de la cellule

Surface du substrat

La topologie et la rugosité du support de migration de la cellule influent sur la localisation des podosomes, figure 8²⁵. Par exemple, des cellules dendritiques forment des podosomes de manière alignée le long des micro marches structurées²⁶, comme schématisées sur la figure 8. De même une autre étude a montré que les ostéoclastes forment des organisations particulières de podosomes au contacts des os et leur rugosité particulière^{27,28}.

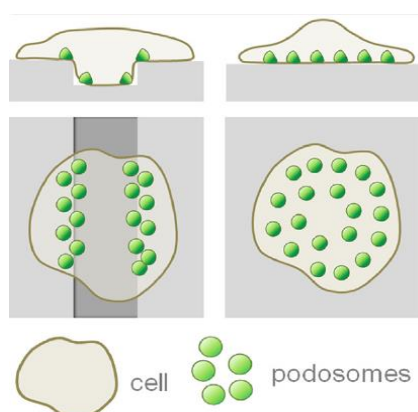


Figure 8 : Localisation des podosomes sur une surface non plane. Les podosomes se forment au niveau des reliefs et non d'une surface plane. Extrait de Linder 2016.²⁵

²⁴ Van Goethem, E et al. (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages : differential involvement of proteases and podosome-like structures. *Journal of Immunology*. **184**, 1049-1061

²⁵ Linder, s., Wiesner, C., (2015). Feel the force: Podosomes in mechanosensing. *Experimental Cell Research*. *Experimental Cell Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.11.026i>

²⁶ Van den Dries, K et al. (2012). Geometry sensing by dendritic cells dictates spatial organization and PGE2-induced dissolution of podosomes. *Cellular and Molecular life sciences*. **69**, 1889-1901

²⁷ D, Geblinger et al. (2009). Surface-induced podosome organization and dynamics in cultured osteoclasts. *Chembiochem*. **10**, 158-165

²⁸ Anderegg, F et al. (2011). Substrate adhesion regulates sealing zone architecture and dynamics in cultured osteoclasts. *PLOS one*. **6**, e28583.

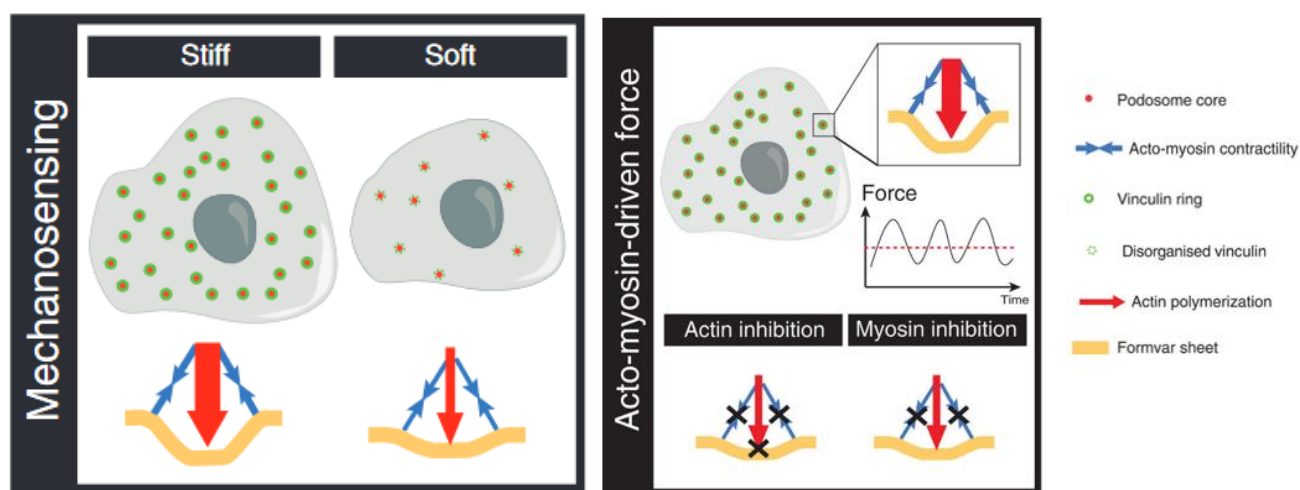


Figure 9 : Modèle mécanique des podosomes des macrophages. Le cœur du podosome pousse sur le substrat. La force du podosome oscille autour d'une valeur fixe au cours du temps. Les forces sont exercées grâce à la poussée du cœur d'actine et à pour effet de contracter les liens (filaments d'actine reliés entre eux par la myosine) entre le cœur et l'anneau. L'inhibition de l'actine mène à l'arrêt de ces deux contractions alors que l'inhibition de la myosine seulement à l'arrêt de la contraction des liens. Extrait de Labernadie, A²⁹.

Les podosomes perçoivent la rigidité du support sur lequel le macrophage adhère, figure 9²⁹. Plus le substrat est mou et moins de podosomes sont formés. Ce résultat indique que la rigidité est détectée par le macrophage, ce qui induit une réponse adaptée à son environnement (rétro action). Cette détection est possible grâce à un cycle de contraction de l'actine et de la myosine. Le cœur d'actine se contracte par phases régulières, et génère des cycles de protrusions, poussée du podosome puis relâchement sur la surface du substrat. Ces alternances de poussée et de relâchement s'effectuent grâce à la contraction des liens (filaments d'actine reliés entre eux par la myosine) entre le cœur et l'anneau. L'inhibition de la myosine mène ainsi à une disparition des poussées des podosomes. L'inhibition de l'actine conduit également à une inhibition de la poussée du cœur d'actine. Les liens entre l'anneau et le cœur sont des potentiels médiateurs entre le cytosquelette et l'environnement. Ils seraient le siège de la mécanotransduction. En effet, des protéines mécanosensibles telles que la taline sont présentes à l'anneau du podosome. Sous l'effet de la tension qui lui est appliquée, la taline s'étire et offre de nouveaux sites de liaison à la vinculine. La quantité de vinculine serait ainsi directement liée à la force appliquée par le cœur d'actine sur le substrat³⁰.

²⁹ Labernadie, A et al. (2014). Protrusion force microscopy reveals oscillatory force generation and mechanosensing activity of human macrophage podosomes. *Nature Communications*. **5** :5343.

³⁰ Del Rio et al. (2009). Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*. **323**, 638-641

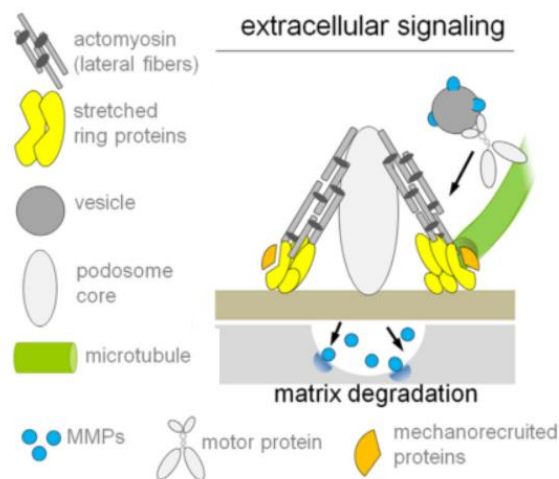


Figure 10 : Dégradation de la matrice par un podosome. Les microtubules transportent des molécules jusqu'à l'anneau du podosome des molécules utilisées pour la dégradation de la matrice extra cellulaire. Extrait de Linder 2015³².

Il a également été montré que les podosomes ont un rôle dans le remodelage de la matrice extra cellulaire. En effet, des vésicules de MT1-MMP, représentées par des ronds gris sur la figure 10, sont transportées par les kinases, en bleu sur la figure 10, le long des microtubules, schématisés en vert, vers la matrice extra cellulaire pour la dégrader. Les microtubules sont liés à l'anneau du podosome³¹. Le lien entre les microtubules et l'anneau se ferait par les protéines mécanosensibles ce qui permettrait de réguler la quantité de molécules délivrées dans la matrice extra cellulaire pour dégrader la matrice³².

Le podosome permettrait donc d'adhérer à son environnement tout en transcrivant des informations sur les propriétés mécaniques du substrat en données intra cellulaire, et également de dégrader la matrice en transmettant des molécules à son environnement. Ces deux activités pourraient être corrélées dans le temps et dans l'espace par le podosome.

1.3. Migration des macrophages

Les macrophages évoluent au sein de tous les tissus des organes et sont capables de migrer d'un tissu à l'autre. Pour ce faire, ils migrent au travers des parois endothéliales, comme les vaisseaux sanguins et lymphatiques, à travers les membranes basales sous-jacentes et les tissus interstitiels. Ils passent donc d'un support de migration plan à un support de migration tridimensionnel. Afin de se

³¹ Wiesner, C et al. KIF5B and KIF3A/KIF3B kinesins drive MT1-MMP surface exposure, CD44 shedding, and extracellular matrix degradation in primary macrophages. *Blood*. **116**, 1559-1569.

³² Linder, s., Wiesner, C., (2015). Feel the force : Podosomes in mechanosensing. *Experimental Cell Research*. **343**, 67-72

mouvoir dans ces différents environnements, les macrophages peuvent utiliser des modes de migration différents, dont les deux extrêmes sont le mode amiboïde et le mode mésenchymateux.

1.3.1. Mode mésenchymateux & amiboïde

Une étude a été menée en 2010 par Van Goethmen dans l'équipe de Maridonneau Parini³³ sur les modes de migration 3D des macrophages. L'étude a démontré que les macrophages pouvaient adapter leur mode de migration en fonction de l'organisation des fibres dans les matrices dans lesquels ils migrent.

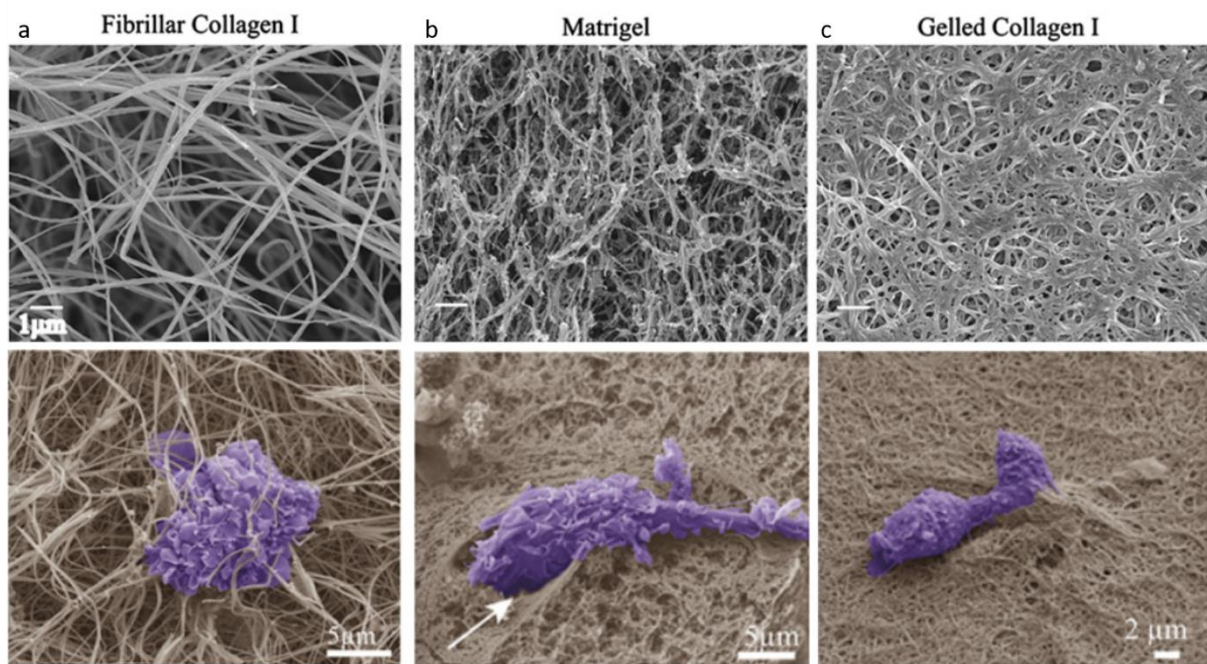


Figure 11 : Images par microscopie électronique à balayage de matrice, de gel et des macrophages fixés pendant leur migration dans ces matrices. (a) Le macrophage migre dans une matrice de collagène 1, il a adopté une forme ronde. (b) Le macrophage migre dans une matrice de matrigel, il a adopté une forme allongée avec des protrusions. (c) Le macrophage migre dans une matrice de collagène et a adopté une forme allongée. Extrait de Van Goethem³³.

³³ Van Goethem, E et al. (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages : differential involvement of proteases and podosome-like structures. *Journal of Immunology*. **184**, 1049-1061

- Mode mésenchymateux

Ce mode est utilisé lors de la migration des macrophages dans du Matrigel ou des gels peu poreux de collagène, comme imagé dans la figure 11 (b et c) et 12³⁴. La figure 12³⁵ schématise la forme adoptée par les macrophages pour migrer dans cette matrice. La vitesse de migration est lente, de 10 $\mu\text{m/h}$ jusqu'à 30 $\mu\text{m/h}$. Les cellules sont allongées et forment de longues protrusions ainsi que des structures à leurs extrémités qui sont suspectées de jouer un rôle dans la dégradation de la matrice. Ces structures peuvent être identifiées comme des podosomes 3D. En effet, des composants des podosomes 2D comme l'actine filamenteuse et la paxiline sont co-localisés dans ces structures.

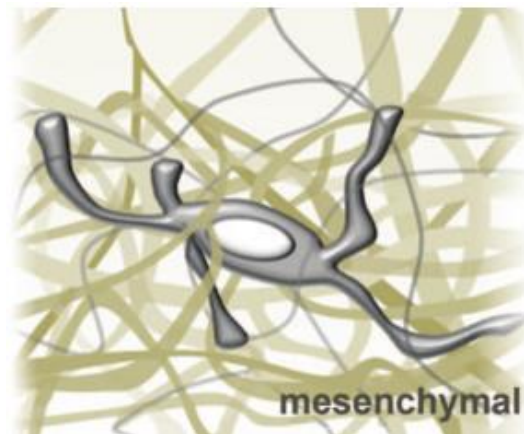


Figure 12 : Schéma d'un macrophage migrant avec un mode mésenchymateux. Extrait de Wiesner et al³⁵

Deux types de macrophages sont observés dans ces matrices, ce qui explique l'intervalle dans les vitesses de migration. En effet, certains macrophages peuvent être qualifiés de meneurs, car ils créent des tunnels lors de leur migration dans la matrice en la dégradant, ils ont une vitesse de migration lente (10 $\mu\text{m/h}$). D'autres macrophages empruntent ces tunnels et n'ont pas besoin de dégrader la matrice, ils ont donc une vitesse de migration plus rapide (30 $\mu\text{m/h}$).

Ce type de migration dépend fortement de l'activité de dégradation de la matrice extracellulaire. Inversement, l'inhibition de la kinase ROCK n'impacte pas l'invasion des macrophages à travers des matrices denses³⁶.

³⁴ Van Goethem, E et al. (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *Journal of Immunology*. **184**, 1049-1061

³⁵ Wiesner et al. (2014). Podosome in space. *Cell Adhesion & Migration*. **8**, 179-191.

- *Mode amiboïde*

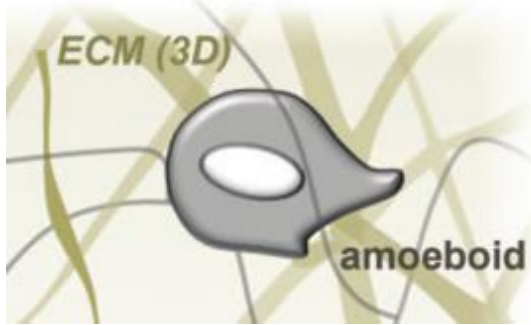


Figure 13 : Schéma d'un macrophage migrant avec un mode amiboïde. Extrait de Wiesner et al³⁵

Ce mode de migration est par exemple observable dans des matrices poreuses de collagène I (figure 11a). Dans de telles matrices, les macrophages adoptent une forme arrondie, comme schématisés sur la figure 13³⁶ avec de petites protrusions instables. Ils migrent dans la matrice avec une vitesse de migration d'environ 40 $\mu\text{m}/\text{h}$. L'inhibition de ROCK impacte la migration des macrophages à travers des matrices poreuses de

collagène, mais pas l'inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire³⁹.

1.3.2. Un continuum de mode de migration

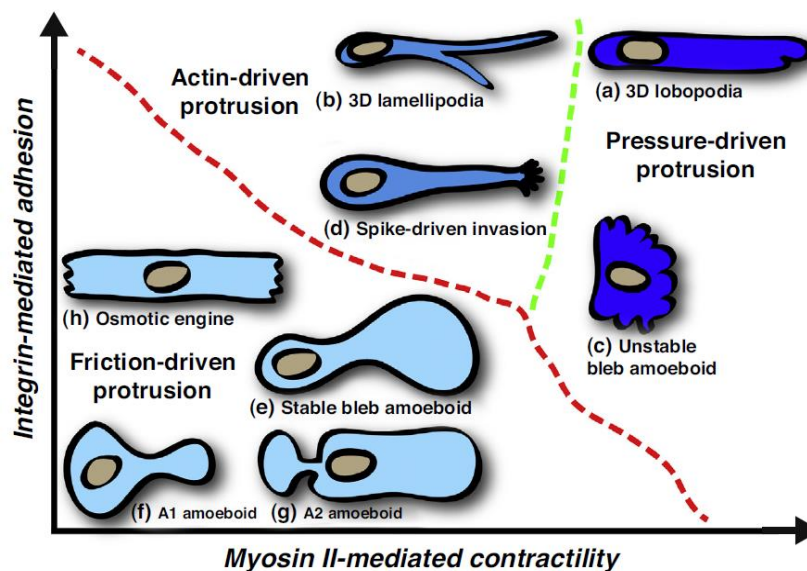


Figure 14 : Les régulateurs de la plasticité cellulaire dans des environnements en trois dimensions. Les cellules établissent un mode de migration selon deux principaux paramètres, le degré de contraction de la myosine et le degré d'adhérence sur le substrat. Extrait de Petrie and Yamada³⁷

L'étude de la migration sur d'autres types de cellules (humaine ou de lignée) a montré que les macrophages n'étaient pas les seules cellules à utiliser ces modes de migration selon le milieu dans

³⁶ Van Goethem, E et al. (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *Journal of Immunology*. **184**, 1049-1061

lequel elles évoluent. Il n'existe pas uniquement deux modes de migrations, mais un continuum de modes de migration³⁷, voir figure 14.

Trois paramètres influent sur le mode de migration: (i) l'adhérence de la cellule au substrat (ii) la contraction du cortex cellulaire (couche du cytoplasme), et (iii) la présence de protrusions^{38, 39}.

(i & iii) Les protrusions produites par les cellules permettent d'appliquer des **forces de traction** à l'avant de la cellule, via des sites d'adhérence, menant à la migration de la cellule. Plus il est facile pour les cellules d'adhérer, plus elles utiliseront le mode de migration mésenchymateux. À noter que certaines cellules, comme les leucocytes et les macrophages, adhèrent aux substrats sans former des fibres de stress et peuvent passer au mode de migration amiboïde tout en continuant à adhérer au substrat⁴⁰.

(ii) La contraction du cortex cellulaire se produit quand deux conditions sont réunies : lorsque la cellule ne peut plus adhérer sur le substrat et lorsqu'elle est confinée par son environnement. En effet, quand la cellule ne peut adhérer sur un substrat, elle va réorganiser son cytosquelette. La cellule ne formera plus d'adhérences focales et va augmenter la tension de son cortex. Deux modes amiboïdes ont été mis en évidence selon le degré de confinement de la cellule. Quand le confinement est faible, la contraction est faible, la cellule utilise une forme ronde avec de petites protrusions instables. Quand le confinement est important, la contraction augmente, la cellule va former un bleb à l'avant et transférer le cytoplasme et le noyau dans ce nouveau bleb⁴¹. La vitesse du flux rétrograde du cortex est corrélée à la vitesse de migration de la cellule. **Les forces de friction** transmises du cortex à la membrane puis à son environnement permettent à la cellule d'avancer.

Deux stratégies différentes sont donc adoptées par la cellule pour migrer dans des environnements tridimensionnels : Soit la cellule dégrade la matrice et la remodèle pour pouvoir avancer, soit la cellule se « contorsionne » pour passer à travers les pores de la matrice⁴². Dans ce cas, la cellule doit déformer son noyau pour pouvoir migrer.

³⁷ Petrie, RJ., Yamada, KM. (2016). Multiple mechanisms of 3D migration: the origins of plasticity. *Current Opinion Cell Biology*. **42**, 7-12.

³⁸ Liu, YJ et al. (2015). Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. *Cell*. **160**, 649-672.

³⁹ Lämmermann, T., Sixt, M. (2009) Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Current Opinion Cell Biology*. **21**, 636-644

⁴⁰ Poincloux, R et al. (2011). Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. **108**, 1943–1948.

⁴¹ Bergert, M et al. (2015). Force transmission during adhesion-independent migration. *Nature Cell Biology*. **17**, 524-529

⁴² McGregor, AL et al. (2016) Squish and squeeze-the nucleus as a physical barrier during migration in confined environments. *Current Opinion cell Biology*. **40**, 32-40

1.3.3. Rôle du noyau

Rigidité du noyau

Le noyau est en effet l'organite le plus gros de la cellule, il est également le plus rigide^{43,44,45}. Deux éléments principaux sont responsables de cette rigidité :

Les laminines qui sont des protéines fibreuses que l'on peut diviser en trois groupes (A, B et C). On les retrouve dans l'enveloppe nucléaire⁴⁶. L'inhibition de la lamine A et C mène à une baisse de la rigidité du noyau⁴⁷ ce qui n'est pas le cas de la lamine B⁴⁸. En revanche, une augmentation de la lamine B peut mener à une sur rigidité du noyau⁴⁹.

L'organisation de la chromatine influence également la viscoélasticité du noyau. En effet, une augmentation de l'euchromatine par rapport à l'hétérochromatine amène à une grande déformabilité du noyau⁵⁰.

Une limite physique

Le noyau apparaît comme un facteur limitant lors de la migration de la cellule. Une étude⁵¹ a montré en 2013 que le noyau est une limitation physique pendant une migration tridimensionnelle. En effet, la vitesse de migration des cellules baisse avec une diminution de la taille des pores et les cellules finissent par arrêter de migrer quand le noyau atteint sa limite de déformabilité. Une étude⁵² de Swift et al a montré qu'en réduisant la lamine A/C dans le noyau, les cellules migraient plus facilement à travers des constriction *in vivo* et *in vitro*.

⁴³ Dong, G et al. (1991). Cytoplasmic rheology of passive neutrophils. *Biorheology*, **28**, 557-567

⁴⁴ Maniotis, AJ et al. (1997). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *PNAS*. **94**, 849-854

⁴⁵ Caille, N et al. (2002). Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells. *Journal of Biomechanics*. **35**, 177-187

⁴⁶ Shimi, T et al. (2015). Structural organization of nuclear lamins A, C, B1, and B2 revealed by superresolution microscopy. *Molecular biology of the cell*. **26**, 4075-4086.

⁴⁷ Lammerding, J et al. (2004) Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *The journal of clinic investigation*. **113**, 370-378.

⁴⁸ Lammerding, J et al. (2006). Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *The journal of biological chemistry*. **281**, 25768-25780.

⁴⁹ Ferrera, D et al. Lamin B1 overexpression increase nuclear rigidity in autosomal dominant leukodystrophy fibroblasts. *FASEB journal*. **28**, 3906-3918

⁵⁰ Pajeroski, JD et al. Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. **104**, 15619-15624.

⁵¹ Wolf, K et al. (2013). Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *The journal of cell biology*. **201**, 1069-1084.

⁵² Swift, J et al. (2013). Nuclear Lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science*. **341**, 1240104

Un élément actif des mécanismes de migration ?

Le noyau ne serait pas qu'une limitation physique pour la migration de la cellule, mais aussi un élément qui participerait activement aux mécanismes de migration des cellules.

Le noyau est lié au cytosquelette de la cellule via le complexe LINC qui permet de lui transmettre des forces mécaniques⁵³ et déplacer son noyau intrinsèquement. Par exemple, sur la figure 15 est représentée une cellule qui migre et tire le noyau de l'arrière de la cellule vers l'avant à l'aide de la contraction du complexe d'acto-myosine. Notons que dans les modes de type amiboïde, les cellules poussent le noyau en contractant la myosine à l'arrière de la cellule⁵⁴, comme nous l'avons vu précédemment.

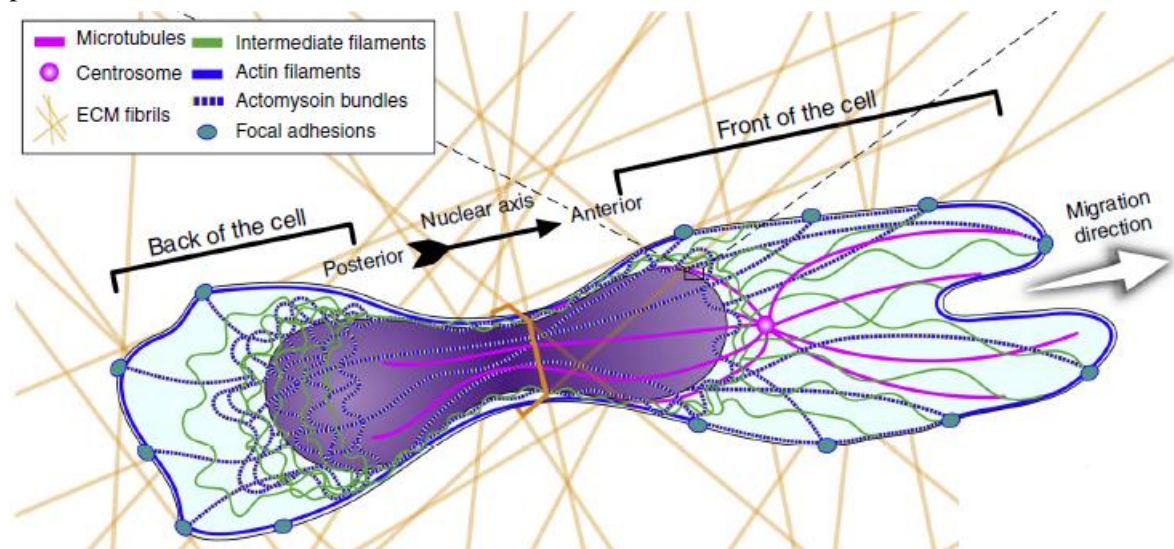


Figure 15 : Organisation et dynamique du cytosquelette pendant la migration dans un environnement 3D. Quand la cellule passe par des pores de petites tailles, le noyau sépare la cellule en deux parties : l'avant et l'arrière. Le cytosquelette déplace le noyau en le poussant via la contraction du complexe actomyosine à l'arrière de la cellule et l'aide des microtubules, des filaments intermédiaires. Extrait Mc Gregor, AL⁵⁶.

Le noyau peut alors servir de piston actif et créer des compartiments dans la cellule⁵⁵, cela est représenté sur la figure 15⁵⁶. Ainsi la cellule peut augmenter la pression sur le noyau, à l'arrière en contractant le cytosquelette, indépendamment de l'avant et créer un gradient de pression qui va pousser le noyau vers l'avant où la pression est plus faible. La cellule utilise alors le noyau à son avantage pour migrer.

⁵³ Crisp, M et al. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm; role of the LINC complex. *The journal of cell biology*. **172**, 41-53

⁵⁴ Lämmzemann, T et al. (2008) Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*. **453**, 51-55.

⁵⁵ Petrie, RJ et al. (2014) Generation of compartmentalized pressure by a nuclear piston governs cell motility in a 3D matrix. *Science*. **345**, 1062-1065

⁵⁶ McGregor, AL et al. (2016) Squish and squeeze-the nucleus as a physical barrier during migration in confined environments. *Current Opinion cell Biology*. **40**, 32-40

Enfin, une étude d'Osborne et al. dans l'équipe de Burridge a montré que le noyau pouvait agir comme un mécanosenseur. En effet, en appliquant des forces de pression sur le noyau via le complexe LINC, ils ont observé une augmentation de la lamine A/C au niveau du noyau qui conduit à une augmentation de la rigidité du noyau⁵⁷.

La cellule applique donc des forces intra cellulaires sur son noyau pour pouvoir avancer dans la matrice extra cellulaire. Elle applique également des forces extra cellulaires sur son environnement. Ces forces dépendent du mode de migration utilisé par la cellule.

1.3.4. Forces appliquées pendant la migration

En changeant leur mode de migration, les cellules changent les mécanismes mis en place pour migrer. Les forces appliquées, pour se mouvoir dans les matrices, ne sont donc pas les mêmes.

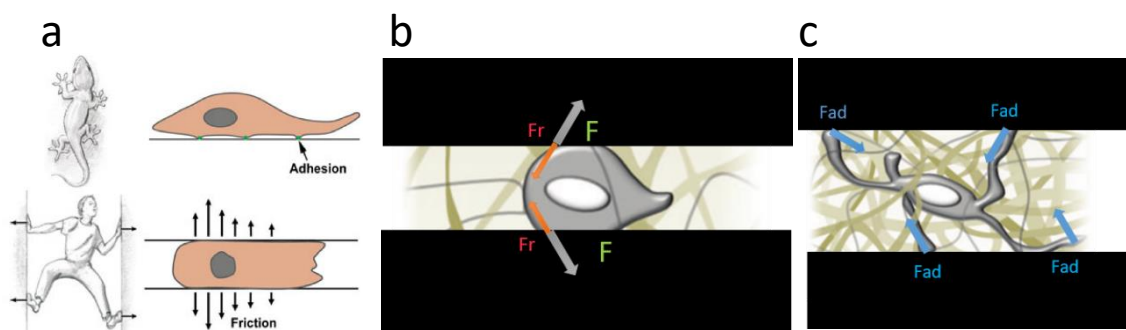


Figure 16 : Description des forces appliquées par les cellules. (a) Analogie entre le mode de migration mésenchymateux qui peut être comparé à un lézard grimpant le long d'un mur : l'adhérence au niveau des points de contact permet de migrer. Dans le mode amiboïde, la cellule peut être comparée à un homme escaladant deux parois proches l'une de l'autre. (b) Modèle des forces (Fr) appliquée lors d'une migration amiboïde. (c) Modèle des forces (Fad) appliquées lors d'une migration mésenchymateuse. Extrait et adapté de de Heuzé et al⁵⁸ et Van Goethem⁵⁹.

Lorsque la cellule utilise le mode amiboïde, la cellule génère un flux rétrograde qui met la cellule en tension, les **forces de friction** générées par le flux sont alors exercées sur leur environnement, voir figure 16a⁵⁸ et b⁵⁹.

Lorsque la cellule utilise le mode mésenchymateux, elle tire sur les fibres de stress et les sites d'adhérence qui se situent à l'avant, dans les protrusions, et à l'arrière. Un déséquilibre entre les forces de traction appliquées à l'avant et à l'arrière permet à la cellule d'avancer. Ces forces sont qualifiées de **forces de traction**, voir figure 16a⁵⁹ et c⁶⁰.

⁵⁷ Guilluy C, et al.(2014). Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nature Cell biology*. **16**, 376-381

⁵⁸ Heuzé, ML et al. (2013) Migration of dendritic cells: physical principles, molecular mechanisms, and functional implications. *Immunological reviews*. **256**, 240-254.

⁵⁹ Van Goethem, E et al. (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *Journal of Immunology*. **184**, 1049-1061

1.4. Mesure de forces cellulaires

Deux types de mesures sont possibles : le premier est qualifié d'actif, car la mesure s'effectue en imposant une contrainte à la cellule. On mesure alors les propriétés mécaniques des cellules. Le deuxième est dit passif, dans ce cas, c'est la cellule qui applique une contrainte au support. L'analyse des déformations permet de remonter à la contrainte que le matériau subit ou bien à la force qu'applique la cellule⁶⁰.

1.4.1. Panorama des techniques expérimentales actives

Le Microscope à Force Atomique

Le microscope à force atomique a été inventé en 1986⁶¹. Il est équipé d'une pointe, d'un cantilever, d'une platine de déplacement piézo-électrique X, Y et Z, d'un LASER et d'une photodiode. Grâce aux céramiques piézo-électriques, la pointe qui est fixée sur le cantilever est approchée de la surface de la cellule jusqu'à entrer en contact avec celle-ci. Le mode « Force Spectroscopy » est utilisé. Après le contact, le cantilever continue sa course et deux phénomènes se passent : le cantilever se fléchit et la pointe indente la cellule. Connaissant la sensibilité du cantilever et sa constante de raideur, il est possible de convertir la flexion du cantilever en force. Les courbes force-indentation sont ainsi obtenues, une courbe typique est montrée dans la figure 17⁶². Au départ, le bras du levier est loin de la cellule, il n'est donc pas défléchi quand il est suffisamment proche du matériau sous l'impact des forces électrostatique, la pointe est brusquement attirée vers la surface du matériau, après le contact, la déflexion augmente au fur et à mesure l'indentation de la cellule. Quand ce dernier inverse sa course, il est de moins en moins fléchi jusqu'à se courber dans l'autre sens. En effet, les forces d'adhérence empêchent la pointe de se détacher de la cellule jusqu'à un certain point où elle se décroche brusquement. Des modèles, comme celui d'Hertz, établissent des relations entre la force appliquée et l'indentation mesurée. Ces équations dépendent de la forme de la pointe (pyramide triangulaire, sphère...) et de leur diamètre (quelques dizaines de nm à des dizaines de μm). En faisant une hypothèse sur le module de Poisson de la cellule, il est alors possible de déduire une sorte de module d'Young caractérisant la rigidité locale de la cellule.

⁶⁰ Kamm, RD, et al. (2017). Cellular nanomechanics. *Springer handbook of nanotechnology*. 1069-1100

⁶¹ G, binnig, et al. (1986) Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930

⁶² Gavara, N. (2017). A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics. *Microscopy research and technique*. **80**, 75-84

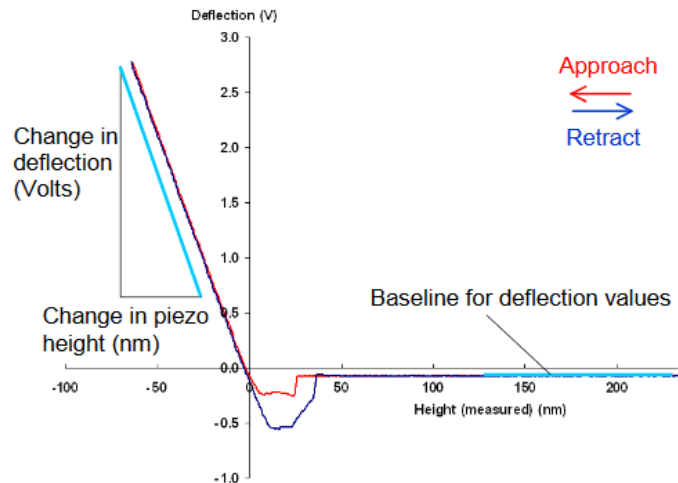


Figure 17 : Courbe Déflexion-indentation. La courbe d'approche du cantilever en bleu et la courbe de retrait en rouge. Extrait de Gavara, N et al⁶²

L'AFM offre l'avantage de pouvoir faire des mesures sur des matériaux mous (kPa, comme les cellules) ou sur des matériaux durs (GPa). Cependant, il convient d'adapter la raideur du cantilever en fonction du module d'Young du matériau observé. Il faut donc connaître l'ordre de grandeur du module d'Young. De plus, des phénomènes d'adhésions interfèrent sur les mesures. Cela rend difficiles les mesures de valeurs absolues des modules d'Young, mais n'empêche pas de faire des mesures comparatives entre cellules⁶⁴.

L'étude de cellules cancéreuses par l'AFM a montré que leur rigidité est plus faible (70%) que les cellules non cancéreuses, quelques kPa⁶³. La résolution de l'AFM permet de faire des études subcellulaires, ce qui a mené à étudier la rigidité de différentes organelles de la cellule (cytosquelette, noyau...)^{64, 65}. Il est possible aussi d'utiliser l'AFM pour mesurer la raideur des cellules en fonction de la rigidité du support sur lequel elles adhèrent. Ainsi des fibroblastes sont capables d'adapter leur raideur à celle de leur substrat (0.5 à 40 kPa) jusqu'à atteindre un plateau de 20 kPa⁶⁶.

Une autre technique, nommé micro indentation, repose sur le même principe que l'AFM. Une pointe, qui est un cylindre de 10 à 100 μm de diamètre, vient sonder et déformer la cellule à l'échelle sub cellulaire⁶⁷. L'avantage de cette technique est que l'on ne peut appliquer des forces que de l'ordre

⁶³ Cross, SE et al. (2007) Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nature nanotechnology*. **2**, 780 - 783

⁶⁴ Li, QS et al. (2008) AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communication*. **374**, 609-613.

⁶⁵ Lammerding, J. (2011). Mechanics of the nucleus. *Comprehensive physiology*. **1**, 783-807.

⁶⁶ Solon, J et al. (2007) Fibroblast adaption and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophysical journal*. **93**, 4453-4461

⁶⁷ Davidson, L., Keller, R. (2007) Measuring mechanical properties of embryos and embryonic tissues. *Methods in cell biology*. **23**, 425-439

du microNewton, ce qui n'est pas possible avec l'AFM où l'on peut appliquer des forces de l'ordre du pN au nN.

Les pinces magnétiques et optiques

Les pinces magnétiques ont été développées en 1949 pour étudier le cytoplasme des cellules^{68,69}. Des billes paramagnétiques ou ferromagnétiques sont ingérées (phagocytées par exemple) par les cellules. Puis un pulse de champ magnétique est utilisé pour magnétiser les billes tandis que d'autres champs magnétiques permanents permettent de faire bouger les billes (translations et rotations possibles). Un microscope inversé équipé d'une caméra permet d'enregistrer les mouvements des billes et d'en déduire la rhéologie subcellulaire des cellules⁷⁰. Elles permettent d'appliquer des forces de l'ordre du fentoNewton au picoNewton et sont utilisées également pour étudier, par exemple, les paramètres physiques de brins d'ADN⁷¹.

Les pinces optiques, utilisées pour la première fois en 1994⁷² reposent sur le même principe que les pinces magnétiques. En effet, des billes cette fois-ci transparentes avec un plus fort indice de réfraction que la cellule sont également ingérées par les cellules. En faisant passer un faisceau laser focalisé par la bille, il est possible de la déplacer. Sous l'influence d'un gradient d'intensité lumineuse, la bille va se déplacer vers la zone la plus intense, voir figure. 18⁷³. Les forces applicables ne sont pas plus grandes que le nanoNewton car l'intensité du laser ne doit pas endommager la cellule⁷⁴. De même, cette technique permet d'évaluer les paramètres physiques de molécules⁷⁵, ou encore de l'ADN⁷⁶.

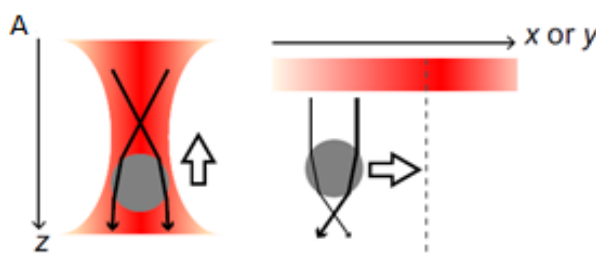


Figure 18: Schéma d'une bille contrôlée par LASER. La bille va être attirée par la zone du LAZER la plus concentrée. Deux gradients sont possibles : en Z en mettant le focus sur en haut ou en bas de la bille. En X et Y en utilisant deux faisceaux avec l'un plus intense que l'autre. Extrait de Sugimura K⁷³

⁶⁸ Crick, FHC., Hughes, AFW. (1949) The physical properties of cytoplasm ; a study by means of the magnetic particle method. *Experimental. Cell Research*. **1**, 36-80

⁶⁹ Yagi, K. (1960). The mechanical and colloidal properties of amoeba protoplasm and their relations to the mechanism of amoeboid movement. *Comparative Biochemistry and physiology*. **3**, 73-91

⁷⁰ Tanase, M et al. (2007). Magnetic tweezers in cell biology. *Methods in cell biology*. **83**,473-493

⁷¹ Lipfert, J et al. (2010). Magnetic torque tweezer : measuring torsional stiffness in DNA and RecA-DNS filaments. *Nature methods*. **7**, 977-980

⁷² Svoboda , K. Block, SM. (1994). Biological applications of optical forces. *Annual Review Biophysical and Biomolecular Structure*. **23**, 247-285

⁷³ Sugimura K, et al. (2016) Measuring forces and stresses in situ in living tissues. *Development*, **142**, 186-196.

⁷⁴ Polacheck, WJ, Chen, CS. (2016) Measuring cell-generated forces : a guide to the available tools. *Nature Methods*. **28**, 415-423

⁷⁵ Chwee, TL, Ang, L. (2011). Mechanopathology of red blood cell diseases-Why mechanics matters. *Theoretical and applied mechanics letters*, **1**, 014000

⁷⁶ Neuman, KC, Nagy, A. (2008). Single-molecule force spectroscopy : optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nature Methods*. **5**, 491-505

Cette méthode est considérée comme active bien que ce soit sujet à débat. Si dans certaines méthodes de mesures de force, la toxicité du laser est un problème, elle est une solution dans d'autres méthodes. En effet, une plaie dans un tissu révèle que ce dernier est sous tension quand il n'est pas endommagé. En utilisant les lasers, il est possible d'ablater localement un organe de la cellule (centaine de nm), des jonctions entre les cellules, ou même des lignes de cellules qui composent un tissu (centaines de μm)^{77, 78}. Les forces qui étaient équilibrées dans le système sont alors perturbées, le tissu va se déplacer pour retrouver un équilibre entre les forces. La mesure de la dynamique de l'écartement et de l'écart maximal entre les points qui étaient d'abord reliés, grâce à la microscopie optique permet de remonter à la tension existant avant l'ablation, voir Fig. 19⁷⁹. Cette méthode peut être réalisée *in vivo*, comme dans les embryons de drosophiles, où il a été démontré que cette tension avait un rôle dans la géométrie des cellules⁸⁰ et sur l'élongation des tissus⁸¹.

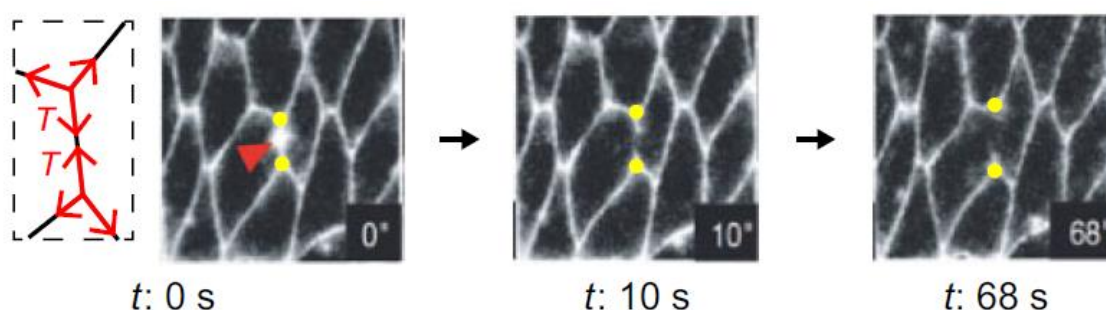


Figure 19 : Ablation d'une jonction cellule-cellule. Illustration de la tension présente à une jonction entre cellules à gauche. À droite, une jonction cellule-cellule est ablatée, les images prises à 10s et 68s de l'ablation montrent l'écartement des deux brins au cours du temps, résultant du déséquilibre créé. Extrait de Sugimura K⁷⁹

L'action du laser sur l'organe conduit à un déséquilibre des forces et ce déséquilibre permet de mesurer les tensions mises en jeu, c'est pourquoi je la considère comme active.

⁷⁷ Ma, X et al. (2009). Probing embryonic tissue mechanics with laser hole drilling. *Physical biology*, **6**, 036004.

⁷⁸ Huston, MS et al. (2003). Forces for morphogenesis investigated with laser microsurgery quantitative modeling. *Science*, **4**, 145-149

⁷⁹ Sugimura K, et al. (2016) Measuring forces and stresses in situ in living tissues. *Development*, **142**, 186-196

⁸⁰ Farhadifar R et al. (2007). The influence of cell mechanics, cell-cell interactions, and proliferation on epithelial packing. *Current biology*, **14**, 2095-2104

⁸¹ Rauzi, M et al. Nature and anisotropy of cortical forces orienting Drosophila tissue morphogenesis. *Nature Cell Biology*, **10**, 1401-1410

Aspiration par micropipette

Il s'agit de contraindre mécaniquement la cellule de façon globale. En effet, dans le premier cas, une cellule, suspendue dans un milieu ou adhérent sur un support, est aspirée partiellement ou globalement par une micropipette, dont l'ouverture est de 4 à 50 μm^2 . Dans le même temps, la cellule est observée au microscope optique pour mesurer la tension de surface en comparant la forme de la cellule avant et pendant l'aspiration.⁸⁴ Des expériences, voir figure 20⁸², menées sur des neutrophiles ont montré la responsabilité de la couche corticale, adjacente à la membrane, dans la tension de surface et de l'équilibre créé entre la cellule dans la pipette et l'aspiration. Elle est composée de filaments d'actine et de myosine. Elle est en partie⁸³.

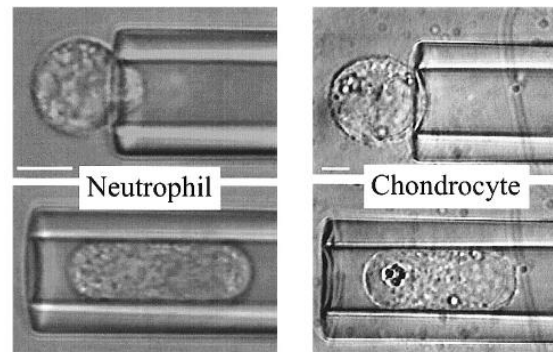


Figure 20 : Aspiration par micropipette. À gauche, aspiration d'un Neutrophile et à droite d'un chondrocyte. Extrait de Gochmuth, RM ⁸².

Rhéologie uniaxiale

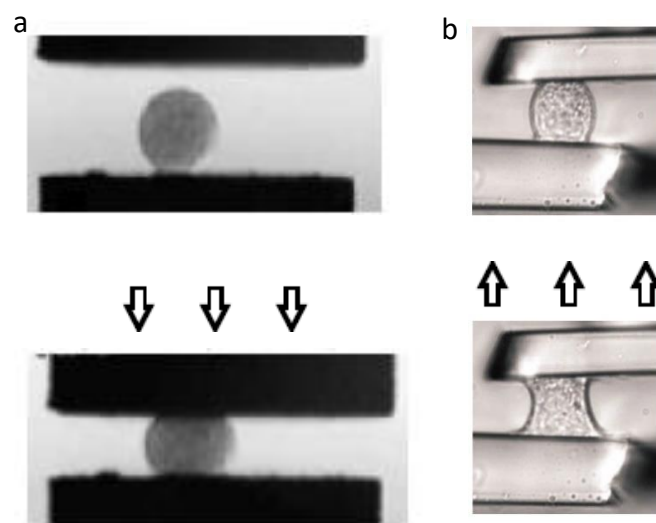


Figure 21 : Déformation uni axiale d'une cellule. (a) Une cellule est comprimée entre deux surfaces de façon constante ou dynamique. Extrait de Sugimura, K⁸² (b) une cellule adhérente est mise en tension uniaxiale entre deux surfaces. Extrait de Roc-Cusachs, P⁸⁴

La cellule doit adhérer sur deux substrats, qui peuvent être recouverts de couches de protéines appartenant à la matrice extra cellulaire pour favoriser ou non l'adhérence. Le premier, si *in vitro*, est rigide et ne sert que de support, si *in vivo*, il correspond à l'environnement physiologique de la cellule. Le second peut être rigide ou mou (non déformable ou déformable). En écartant les deux supports l'un

⁸² Gochmuth, RM. (2000). Micropipette aspiration of living cells. *Journal of biomechanics*. **1**, 15-22

⁸³ Evans, E, Yeung, A. (1989). Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipette aspiration. *Biophysical journal*. **56**, 151-160

de l'autre, voir figure 21b⁸⁴, la cellule est mise en tension, le support alors mou, va se déformer. L'analyse de cette déformation est faite par un transducteur électronique. Si les deux supports rigides sont rapprochés l'un de l'autre, voir figure 21a⁸⁵, alors la cellule est mise en compression de façon constante ou dynamique. Ces études permettent d'étudier les paramètres de viscoélasticité des cellules^{86, 87}. La traction subie par la cellule peut être observée par biréfringence. En effet, l'indice de réfraction d'un matériau varie selon l'intensité d'un stress anisotrope⁸⁸ et l'analyse de biréfringence induite permet de visualiser le stress.

Rhéologie sous flux

Le principe de cette technique est d'imposer un flux contrôlé à des cellules adhérentes ou non, et d'observer l'impact de ce flux sur la mécanique des cellules, telles que leur viscoélasticité, raideur ou encore leur adhérence. Le développement d'outils microfluidiques a permis de mettre en œuvre cette méthode, par la création de macro ou microcanaux, dans lesquels un différentiel de pression à l'entrée et à la sortie fait circuler un fluide à vitesse contrôlée. Cette méthode est particulièrement pertinente pour l'étude des globules rouges qui circule sous un flux sanguin dans les veines/artères. En 1974, il a été montré qu'un flux minimum est requis pour détacher les globules rouges du substrat et que ce seuil dépend de la nature du substrat⁸⁹. Plus récemment une étude a montré la différence de viscoélasticité entre des globules rouges de patient sains et de patient malades (drépanocytose) sous un flux visant à les faire passer par de petites constriction, voir figure 22⁹⁰.

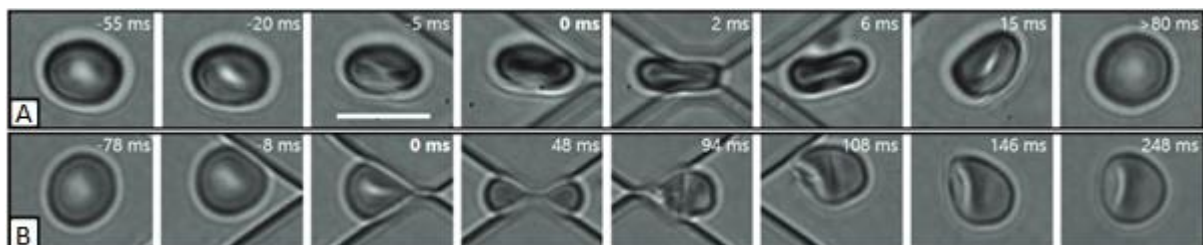


Figure 22 : Déformation d'une cellule à l'aide d'un flux et d'une constriction. Time-laps d'un globule rouge sain (a) et non sain (b) passant une constriction sous un flu, dans le premier cas le globule rouge se déforme légèrement avant de retrouver sa forme initiale alors que dans le deuxième cas le globule rouge se déforme plus et ne retrouve pas sa forme initiale. Extrait de Gambhire⁹⁰.

Ces techniques *in vitro*, dites actives, viennent imposer une contrainte à la cellule pour étudier leur rhéologie en fonction des paramètres physiques de son environnement (substrat 2D) ou encore en

⁸⁴ Roc-Cusachs, P et al. (2017) Quantifying forces in cell biology. *Nature cell biology*. **19**, 742-751

⁸⁵ Sugimura, K et al. (2016). Measuring forces and stresses in situ in living tissues. *Development*. **143**, 186 -196.

⁸⁶ Desprat, N et al (2005). Creep function of a single living cell. *Biophysical journal*. **88**, 2224-2233

⁸⁷ Mitrossilis, D et al. (2010). Real-time single-cell response to stiffness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **38**, 16518-16523

⁸⁸ Oldenbourg, R et al. (2005). Polarization microscopy with the LC-PolSope. *Live cell imaging: A laboratory manual*. 205-237

⁸⁹ Mohandas, N et al. (1974). Adhesion of red cells to foreign surfaces in the presence of flow. *Journal of biomedical materials research banner*. **8**, 119-136

⁹⁰ Gambhire, G et al. (2017). High aspect ratio sub-micrometer channels using wet etching: application to the dynamics of red blood cell transiting through biomimetic splenic slits. *Small*. **13**, 1700967

fonction des drogues délivrées pour changer le comportement des cellules. Dans tous ces cas, les cellules sont immobiles sur leur substrat ou en mouvement dû à leur environnement et non à leur mécanisme de migration. Ces techniques ne permettent pas d'étudier les forces impliquées dans les mécanismes de migration des cellules.

À l'inverse, les techniques, dites passives, permettent de mesurer les contraintes ou les forces appliquées par les cellules. Elles permettent également d'étudier les cellules dans des environnements plus physiologiques (nature des substrats, propriétés physiques et topologie).

1.4.2. Panorama des techniques expérimentales passives

La première technique utilisée pour mesurer les forces appliquées par les cellules a été mise en place en 1980 par Harris et al, voir figure 23⁹¹. La culture de cellules sur des films suffisamment souples de silicone a permis de mettre en évidence des forces par le plissement de la surface. Ces forces nommées « de traction » s'exercent dans le plan du film et non perpendiculairement au film.

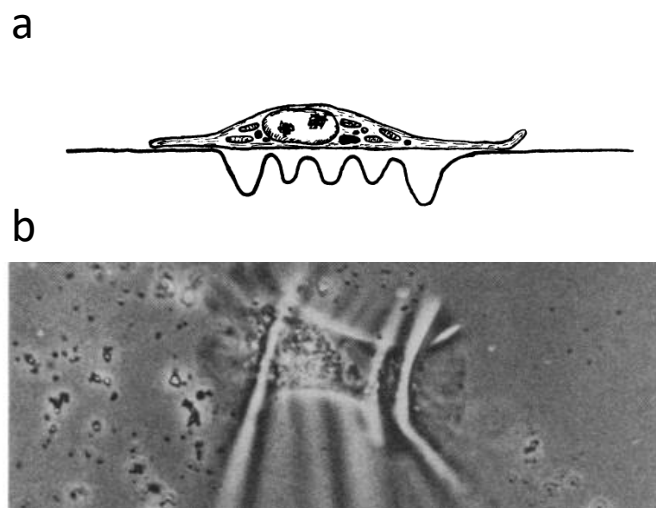


Figure 23 : Déformation d'une membrane de silicone par un fibroblaste. (a) Schéma de profil d'un fibroblaste en train de déformer une surface de silicone lors de sa migration (b) Image optique d'un fibroblaste en train de déformer une surface de silicone lors de sa migration. Extrait de Harris et al.⁹¹

TFM : Mesure de force de traction des cellules

➔ *Principe de fonctionnement.*

Cette technique est décrite dans de nombreuses revues^{92, 93}. Elle permet de mesurer les forces de migration appliquées par des cellules migrantes dans un environnement tridimensionnel ou sur une surface. Pour ce faire, des billes fluorescentes, dont le diamètre est inférieur à 1 μm , sont incorporées

⁹¹ Harris AK et al. (1980). Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science*. **208**, 177-179

⁹² Polacheck, WJ, Chen CS. (2016) Measuring cell-generated forces: a guide to the available tools. *Nature Methods*. **13**, 415-423

⁹³ Roc-Cusachs, P et al. (2017) Quantifying forces in cell biology. *Nature cell biology*. **19**, 742-751

de façon homogène dans un substrat souple afin que les cellules puissent le déformer. Le diamètre des billes doit être suffisamment petit pour permettre une localisation submicrométrique des billes mais suffisamment importante pour que le signal soit visible. Ces derniers sont souvent en silicone (12 à 100 kPa) ou en polyacrylamide (1,2 à 100 kPa), dans les deux cas, ils résistent aux protéines de dégradation émises par la cellule. Un traitement de surface avec une protéine de la matrice extra cellulaire peut être effectué pour favoriser ou inhiber l'adhérence de la cellule.

Les cellules sont cultivées dessus, et adhèrent aux substrats par des sites d'adhérence et migrent si besoin, en deux dimensions. En migrant, les cellules appliquent des forces sur le substrat qui vont le déformer et cette déformation mène aux mouvements des billes. Un microscope à fluorescence permet de filmer le mouvement des billes et un algorithme⁹⁴ permet d'analyser leur mouvement au cours du temps et dans l'espace. À noter que l'algorithme est particulièrement complexe à mettre en œuvre, et que des plateformes en open source permettent maintenant d'avoir accès à ces algorithmes. Après la lyse de la cellule, une dernière acquisition des billes permet de connaître la position de référence de celles-ci, c'est-à-dire, leur position au repos. Une calibration du dispositif est nécessaire pour valider les mesures : soit une force connue est appliquée sur le substrat, et l'analyse du mouvement des billes doit donner la force appliquée, soit par le développement d'un modèle théorique.

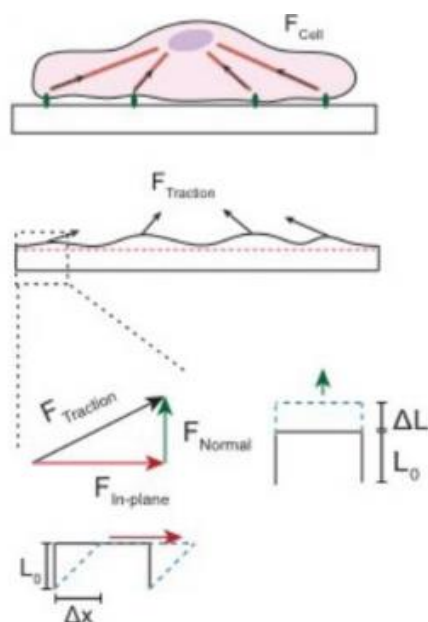


Figure 24 : Décomposition des forces cellulaires. (a) La cellule migre sur une surface 2D. La force de traction peut se décomposer en deux forces (une normale au plan et une appartenant le plan). Les forces normales vont mettre le matériau en compression ou en tension et les forces dans le plan cisailent le matériau. Extrait de Polacheck WJ & Chen SC.⁹⁵

⁹⁴ Martiel JL et al. (2015) Measurement of cell traction forces with ImageJ. *Methods cell biology*. **125**, 269-287

Comme indiqué sur la figure 24⁹⁵, les forces de traction peuvent se décomposer comme la somme des forces étant parallèle à la surface sur laquelle la cellule migre, plus une composante normale à la surface. Au départ, seules les forces dans le plan étaient mesurées, l'amélioration des techniques d'imagerie comme le microscope confocal, et les techniques d'analyse comme le développement d'un nouvel algorithme ont permis de mesurer le déplacement des billes dans les trois directions et donc d'avoir accès aux forces appliquées par la cellule dans les trois directions^{99,96,97,98,99}.

➔ De la 2D vers la 3D

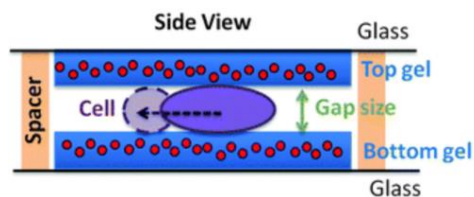


Figure 25 : Système d'évaluation des forces de friction. Deux surfaces rigides recouvertes d'une couche de gel contenant des billes fluorescentes contraignent la cellule en étant à quelques μm l'une de l'autre. La mesure du déplacement des billes lors de la migration de la cellule donne accès aux forces de friction. Extrait de Yip, AK¹⁰³

La TFM a permis dans un premier temps d'étudier les forces de traction appliquées par la cellule lorsqu'elle migre sur un substrat 2D^{100,101,102}. Cette technique s'est très vite améliorée et a été appliquée à des environnements tridimensionnels, comme imagée sur la figure 25. Deux surfaces se faisant face ont été utilisées pour contraindre une cellule et mesurer les forces appliquées sur ces deux surfaces. Le suivi des billes fluorescentes a permis de mettre en évidence que les cellules génèrent des blebs lorsque le mode amiboïde était utilisé et a mis en lumière les forces de friction utilisées, voir figure 25¹⁰³.

⁹⁵ Polacheck, WJ and Chen CS. (2016). Measuring cell-generated forces: a guide to the available tools. *Nature methods*. **13**, 415-423

⁹⁶ Hur, SS et al. (2009). Live cells exert 3-Dimensional traction forces on their substrata. *Cellular and molecular biology*. **2**, 425-436

⁹⁷ Franck, C et al. (2007). Three-dimensional full-field measurements of large deformations in soft materials using confocal microscopy and digital volume correlation. *Experimental mechanics*. **47**, 427-438

⁹⁸ C. Franck et al. (2011). Three-dimensional traction force microscopy: a new tool for quantifying cell-matrix interactions. *PLOS one*. **6**, e17833

⁹⁹ Del Alamo, JC et al. (2013) Three-dimensional quantification of cellular traction forces and mechanosensing of thin substrata by fourier traction force microscopy. *PLOS one*. **8**, e69850

¹⁰⁰ Harris, AK et al. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature*. **290**, 249-251

¹⁰¹ Dembo, M et al. Imaging the traction stresses exerted by locomoting cells with the elastic substratum method. *Biophysical Journal*. **70**, 2008-2022

¹⁰² Legant, WR et al. Multidimensional traction force microscopy reveals out-of-plane rotational moments about focal adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **110**, 881-886

¹⁰³ Yip, AK et al. (2015). Traction stress analysis and modeling reveal that amoeboid migration in confined space is accompanied by expansive forces and requires the structural integrity of the membrane-cortex interactions. *Integrative biology*. **7**, 1196-1211

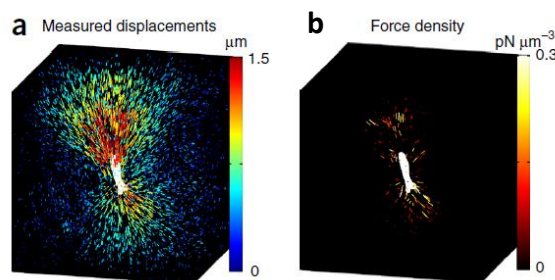


Figure 27 : Mesure des forces de traction dans une matrice de polymère. (a) Déplacements des billes à proximité d'une cellule. (b) Forces appliquées par la cellule obtenues après calcul. Extrait de Steinwachs, J¹⁰⁷

Cette technique également applicable avec un gel ou des hydrogels¹⁰⁴. Ces matrices sont isotropes et la déformation du matériau est linéaire par rapport à la force appliquée. Ces deux propriétés ne sont pas toujours vérifiées dans les matrices extra cellulaires. En effet, le comportement élastique non linéaire de ces matrices extra cellulaires et leur anisotropie rendent compliqué le calcul menant aux forces appliquées par la cellule. C'est pourquoi cette technique est difficile à mettre en œuvre *in vivo*. Cependant, une étude menée par Steinwachs et al montre qu'il a été possible d'appliquer cette méthode à un bio polymère non linéaire, se rapprochant des conditions *in vivo* des cellules. Comme nous pouvons le voir sur la figure 26¹⁰⁵ le déplacement des billes générées par la migration d'une cellule a été converti en force cellulaire.

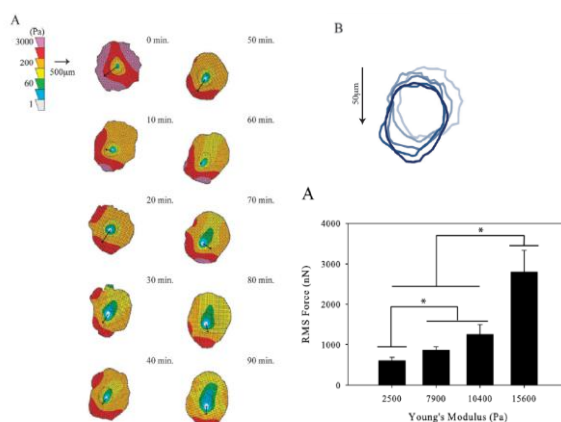


Figure 26 : Étude des forces de traction exercées par des macrophages humains. (a) Représentation des pressions exercées par le macrophage au cours du temps. (b) Visualisation de la trajectoire de migration du macrophage (c) Forces appliquées par les macrophages en fonction de la rigidité du substrat. Extrait de Hind, LE¹⁰⁶

¹⁰⁴ Bloom, RJ et al. (2008). Mapping local matrix remodeling unduced by a migrating tumor cell using three-dimensional multiple-particle tracking. *Biophysical journal*. **95**, 4077-4088

¹⁰⁵ Steinwachs, J et al. (2015). Three-dimensional force microscopy of cells in biopolymer networks. *Nature methods*. **13**, 171-176

En ce qui concerne les macrophages humains, matériel biologique qui sera étudié pour cette thèse, l'étude de la migration sur un substrat 2D avec la méthode TFM a permis de mesurer des forces de l'ordre du μN , ces forces varient selon la rigidité du substrat (2,5 kPa à 15,6 kPa), voir figure 27¹⁰⁶.

FRET : Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

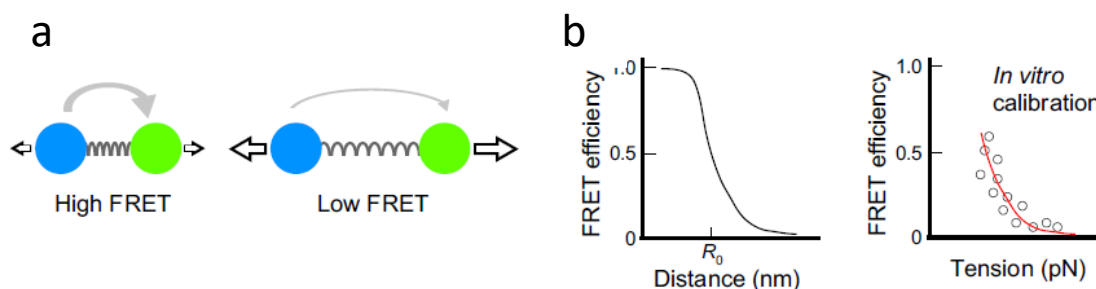


Figure 28 : Principe de fonctionnement du FRET. (a) Schéma de fonction d'un capteur FRET. (b) Plus la molécule accepteuse est proche de la molécule réceptrice, plus le signal fluorescent est fort. Mettre en tension le système revient à baisser le signal lumineux. La calibration du système se fait *in vitro*, le signal fluorescent est mesuré et corrélé à la force appliquée au système. (c). Extrait de Sugimura, K¹¹⁰

Cette méthode repose sur le transfert d'énergie entre deux molécules : pour ce faire, le spectre d'émission de la molécule donneuse doit recouvrir au moins partiellement le spectre d'excitation de la molécule accepteuse¹⁰⁷. Plus les molécules sont proches, plus le signal FRET sera important. Plus les molécules s'éloignent, moins le signal de fluorescence sera important. Une molécule donneuse peut être reliée à une molécule accepteuse par une molécule polymère^{108,109}. En connaissant la constante de raideur de la molécule polymère, il est possible de relier l'intensité du signal FRET à la distance séparant les molécules donneuse, voir figure 28, et accepteuse et donc à la tension imposée au système. Le profil d'intensité est également tracé en fonction de la distance séparant les molécules, voir figure 28b^{110,111}. Ce capteur de force moléculaire de haute résolution peut être introduit *in vivo*¹¹² ou *in vitro*^{113,114}.

¹⁰⁶ Hind, LE et al. (2015). Macrophage motility is driven by frontal-towing with a force magnitude dependent on substrate stiffness. *Integrative biology*. **7**, 447-453

¹⁰⁷ Miyawaki, A. (2011) Development of probes for cellular functions using fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer. *Annual Review Biochemistry*. **80**, 357-373

¹⁰⁸ Meng, F et al. (2008). A fluorescence energy transferbased mechanical stress sensor for specific proteins in situ. *the FEBS Journal*. **275**, 3072-3087

¹⁰⁹ Grashoff, C et al. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*. **466**, 263-266

¹¹⁰ Sugimura, K et al. (2016). Measuring forces and stresses in situ in living tissues. *Development*. **143**, 186 -196

¹¹¹ Cai, D et al. (2014). Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell*. **157**, 1146-1159

¹¹² Krieg, M et al. (2014) Mechanical control of the sense of touch by β -spectrin. *Nature*. **16**, 24-233

¹¹³ Grashoff, C et al. (2010) Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*. **466**, 263-266

¹¹⁴ R. Gomez-Martinez et al. (2013). Silicon chips detect intracellular pressure changes in living cells. *Nature Nanotechnology*. **8**, 517-521

Ce capteur de haute précision donne accès à l'amplitude des forces de traction (mais pas de compression) et ne donne pas la direction des forces. De plus, les mesures restent semi-qualitatives, car il est difficile de convertir le signal lumineux en force, cependant il est possible de faire une calibration du système *in vitro*¹¹⁵. Les forces mesurables sont de l'ordre du pN, la mesure d'une force plus grande n'est pas possible. Cependant, il est possible d'imager plusieurs signaux fluorescents en même temps, et de combiner cette technique à des manipulations mécaniques des cellules.

PFM : Mesure de force de protrusions cellulaire

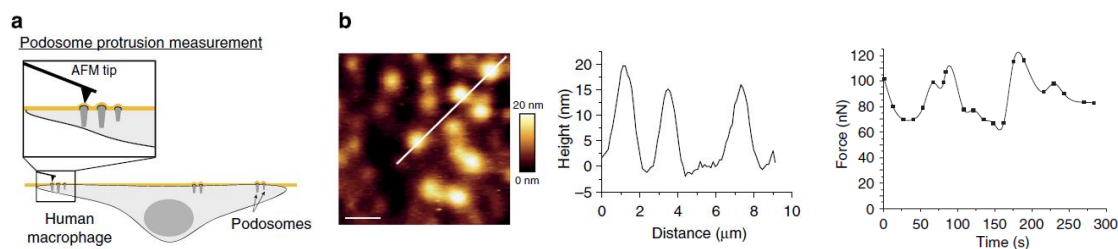


Figure 29 : Mesure des forces de poussée des podosomes. (a) Principe de fonctionnement de la PFM, la pointe vient sonder la membrane (Formvar) alors que la cellule adhérente au-dessous applique des forces de protrusions. (b) Image obtenue avec l'AFM des protrusions induites par un macrophage humain, mesures de la hauteur des protrusions le long de la ligne blanche de l'image. Oscillation de la force d'un podosome de macrophage mesurée par PFM. Extrait de Labernadie et al¹¹⁶.

Cette technique repose sur l'AFM (décrit en 1.4.1.) et a été mise en place en 2014 lors d'une collaboration entre le LAAS et l'IPBS, voir figure 29¹¹⁶. Des macrophages sontensemencés sur une membrane (Formvar) souple et déformable. L'AFM sonde le dessus de la membrane de Formvar et mesure sa topographie, comme schématisé sur la figure 29a. La hauteur de protrusion est mesurée quand la pointe de l'AFM balaye la surface du podosome. Une image AFM des protrusions induites par les podosomes d'un macrophage humain est montrée, figure 29a. En corrélant les différences de hauteur au niveau des podosomes, reconnus par marquage fluorescent de ses protéines, il a été démontré que les podosomes font des protrusions en moyenne de 15 nm. Les forces de protrusions des podosomes oscillent au cours du temps entre 60 nN et 100 nN, comme indique le graphique de droite sur la figure 29, et les podosomes sont synchronisés entre eux¹¹⁷.

¹¹⁵ R. Gomez-Martinez et al. (2013). Silicon chips detect intracellular pressure changes in living cells. *Nature Nanotechnology*. **8**, 517-521

¹¹⁶ Labernadie, A et al. (2014) Protrusion force microscopy reveals oscillatory force generation and mechanosensing activity of human macrophage podosomes. *Nature Communications*. **4**, 5343

¹¹⁷ Proag, A et al. (2015). Working Together: Spatial Synchrony in the Force and Actin Dynamics of Podosome First Neighbors. *ACS Nano*. **9**, 3800-3813

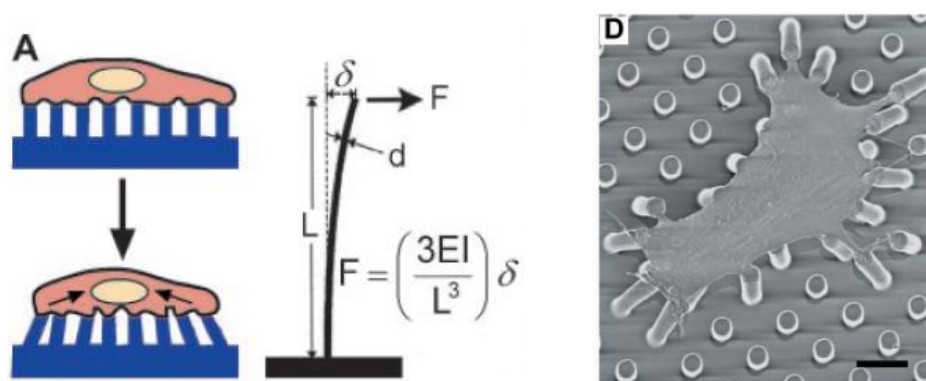


Figure 30 : Micro piliers comme capteur de force. (a) Schéma d'une cellule adhérente sur un lit réseau de micropiliers, en appliquant des forces de traction les piliers vont fléchir. La flexion du pilier (δ) est reliée à la force (F) qui l'a fait fléchir. L , la hauteur du pilier, d le diamètre du pilier, E le module d'Young et I le moment quadratique. (b) Image optique d'une cellule musculaire appliquant des forces de traction sur un lit de pilier. Extrait de Tan, JL¹¹⁸.

Le développement des micros et nanotechnologies a permis l'essor de cette méthode. En effet, à l'aide de procédés de lithographie, il a été possible de fabriquer des piliers de PDMS possédant de hauts rapports de forme (diamètre/hauteur), comme montré sur la figure 30a. Le PDMS étant biocompatible, il a été possible de cultiver des cellules sur ces piliers. Les forces de traction appliquées par les cellules les font fléchir. Le suivi de l'extrémité libre du pilier, par microscopie, permet de déterminer l'amplitude des déplacements et la direction. Le calcul des forces est alors possible en utilisant la théorie des poutres. En effet, l'équation de la figure 29a relie la force appliquée au module d'Young du PDMS à la géométrie du pilier (hauteur et diamètre) et enfin au mouvement de ce dernier. Cette technique a été utilisée en 2002 par Tan et al et a permis de corréler l'amplitude des forces cellulaires à la taille des sites d'adhérence, l'image réalisée par microscopie à balayage de la figure 30 permet de visualiser une cellule migrante sur un lit de pilier et les flexions de ces derniers¹¹⁸. Cette technique a largement été utilisée par la suite, et a permis d'étudier et de mieux comprendre les mécanismes de migration 2D des cellules. Les études suivantes ont démontré, par exemple, que les forces appliquées par les cellules sur les piliers sont synchronisées avec les mouvements du noyau¹¹⁹. Il a aussi été possible de corréler la localisation des forces maximales de traction à la direction de migration des cellules dendritiques¹²⁰. Il a également été démontré que le diamètre des piliers avait une influence sur les forces de traction¹²¹.

¹¹⁸ Tan, JL et al. (2002). Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 1484-1489

¹¹⁹ Li, Q et al. (2015). Micropillar displacements by cell traction forces are mechanically correlated with nuclear dynamics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **461**, 372-377

¹²⁰ Ricart, BG et al. (2011) Measuring traction forces of motile dendritic cells on micropost arrays. *Biophysical journal*. **101**, 2620-2828

¹²¹ Ghassemi. S et al. (2012). Cells test substrate rigidity by local contractions on submicrometer pillars. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **109**, 5328-5333

La magnétisation des piliers de PDMS a permis de rendre cette méthode « active ». En effet, sous l'effet d'un champ magnétique contrôlé les piliers peuvent fléchir et appliquer une force locale à la cellule.¹²²

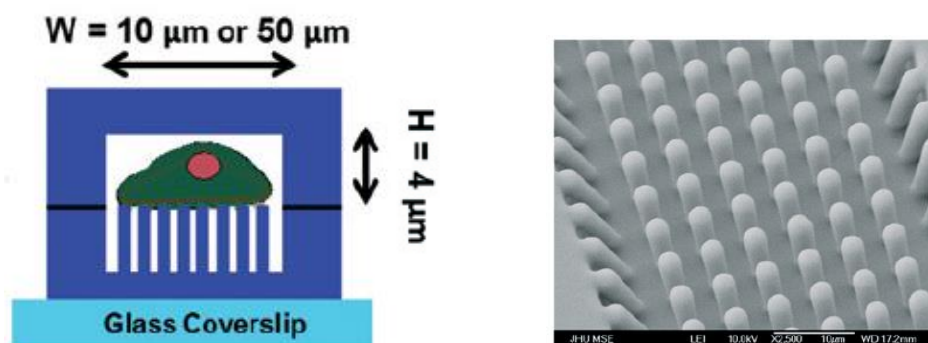


Figure 31 : Mesure de traction force sous confinement. À gauche, un schéma d'une cellule migrant sur un lit de piliers. Le canal autour confine la cellule, à droite, une image MEB des piliers intégrés dans un canal. Extrait de Raman, SR¹²⁵.

Les procédés de microtechnologies ont également permis de fabriquer des piliers de différentes tailles (hauteur et diamètre) pour jouer sur leur rigidité ce qui influence la migration cellulaire^{123,124}

Récemment, des micropiliers ont été fabriqués dans des canaux fluidiques pour étudier les mécanismes de migration des cellules¹²⁵, comme schématisés sur la figure 31 et imagés par microscopie électronique à droite. Une méthode similaire a été utilisée pour mesurer la force exercée par la croissance d'un champignon¹²⁶. Les cellules migrent sur des piliers et sont entourées par un canal en PDMS qui les confine. Les forces de traction ont alors pu être suivies selon le degré de confinement des cellules. Cette corrélation a montré que les forces de traction diminuent en fonction du degré de confinement.

¹²² Tan, J et al. (2003). Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**, 1484–1489

¹²³ Wang, B et al. (2017). Fabrication of elastomer pillar arrays with height gradient or cell culture studies. *Microelectronic engineering*. **175**, 50-55

¹²⁴ Saez, A et al. (2007). Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructure anisotropic substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**, 8281-8286

¹²⁵ Raman, SR et al. (2013). Probing cell traction forces in confined microenvironments. *Lab on a Chip*. **13**, 4599-5607.

¹²⁶ Tayagui, A et al. (2017). An elastomeric micropillar platform for the study of protrusive forces in hyphal invasion. *Lab on a Chip*. **17**, 3643-3653

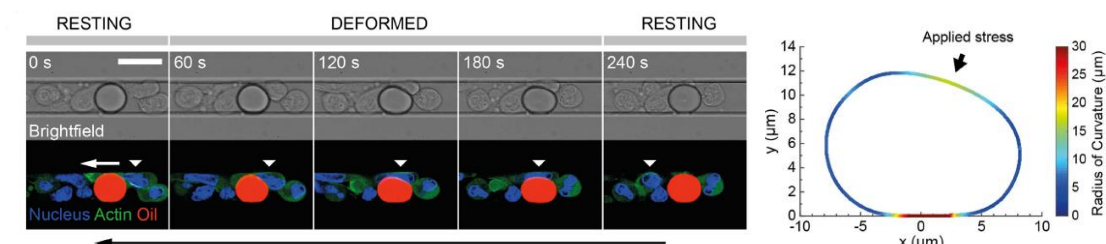


Figure 32 : Mesure de pression exercée par une cellule sur une goutte d'huile. Séquence d'images d'une cellule migrante dans un canal contenant une goutte d'huile. Sous la pression exercée par la cellule, la goutte d'huile se déforme. Mesure de la pression appliquée par la cellule sur la goutte d'huile. Extrait de Molino, D et al.¹²⁸

Une goutte d'huile peut être utilisée comme capteur de force. Elle peut être introduite entre des cellules dans un tissu¹²⁷ ou dans un canal microfluidique¹²⁸. Une séquence d'images optiques permet de visualiser les gouttes d'huile (en rouge) et l'avancée de la cellule (vert pour l'actine et bleu pour le noyau) malgré la présence de la goutte d'huile dans le canal, voir figure 32. Le graphique de la figure 32 permet de visualiser la déformation de la goutte et la compression qu'elle subit. Cette dernière est reliée à la pression normale subie par la goutte d'huile, ainsi il est possible de remonter à la pression qu'exerce la cellule. Cependant, ces gouttes ne doivent pas être trop grosses, pour ne pas ressentir les effets de la pesanteur, n'y être trop petites pour ne pas être juste poussées dans les canaux et non déformées, ce qui ne permet pas de faire des microcanaux suffisamment fins pour confiner complètement les cellules. Cela ne permet pas également de faire une étude subcellulaire.

Microdispositifs 3D déformables

À l'aide de procédé de lithographie 3D, des microdispositifs comme celui imagé sur la figure 33¹²⁹ en forme de fleur et nommés μ -fleur ont permis de mesurer des forces de traction dans un dispositif en trois dimensions. La gestion des contraintes interfaciales entre des couches de Ti et SiO_2 est à l'origine de la forme du dispositif. Des couches d'or ont été déposées au centre, puis à 20 et 50 μm du centre des leviers pour favoriser l'adhérence des cellules. La calibration, force-déplacement, et le suivi des extrémités libres permet de remonter, par un calcul, aux forces appliquées par la cellule pour fléchir ces bras de levier.

¹²⁷ Campàs, O et al. (2014). Quantifying cell-generated mechanical forces within living embryonic tissues. *Nature methods*. **11**, 349-349

¹²⁸ Molino, D et al. (2016). On-chip quantitative measurement of mechanical stresses during cell migration with emulsion droplets. *Scientific report*. **6**, 29113

¹²⁹ Marelli, M et al. (2013). Cell force measurements in 3D microfabricated environments based on compliant cantilevers. *Lab on a Chip*. **14**, 286-812

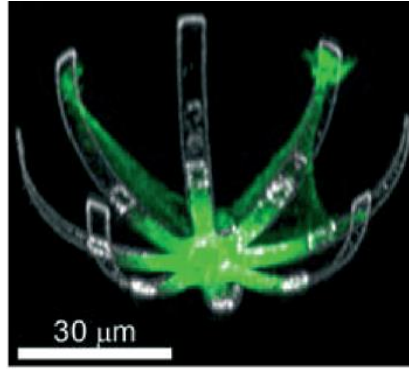


Figure 33 : Micro dispositif 3D pour la mesure des forces de traction. Extrait de Marelli, M et al¹²⁹

D'autre part, le développement de la lithographie 3D par polymérisation à deux photons permet actuellement de fabriquer des structures avec une résolution de quelques centaines de nanomètres. Cela donne accès au développement de dispositifs 3D complexes avec des hauts rapports de forme déformables par les cellules. Ces dispositifs peuvent à la fois jouer le rôle de support 3D pour la migration, mais aussi de capteurs de force. En effet, deux études ont mis en place des supports 3D pour mesurer des forces cellulaires.

Le développement d'une structure 3D, voir figure 34, permet de mesurer les forces appliquées aux piliers en mesurant leur flexion, mais aussi d'étudier les différents mécanismes (contraction et contrainte élastique de l'actine périphérique) responsables de la forme de la cellule. Cette structure est composée de 5 piliers de 25 μm de haut reliés entre eux par 10 poutres se situant à 15 μm de la lamelle de verre, comme imagé sur le panel de gauche de la figure 33¹³⁰. Un deuxième dispositif basé également sur des piliers qui cette fois, ne servent qu'à surélever des poutres de diamètre sub micrométrique a été développé, l'image par microscopie électronique à balayage du dispositif est montré au centre de la figure 32¹³¹. La taille et la rigidité des poutres coïncident avec les tailles et rigidités des fibres que l'on trouve dans la matrice extra cellulaire (fibronectine...). La contraction régulière de cardiomyocytes, cultivés sur ces supports, a été observée ainsi que la déformation de ces poutres due à ces contractions, comme le montre la séquence d'images sur le panel de droite de la figure 34.

¹³⁰ Brand, Ca et al. (2011) Tension and elasticity contribute to fibroblast cell shape in three dimensions. *Biophysical Journal*. **113**, 770-774.

¹³¹ Klein, F et al. (2010). Elastic Fully three-dimensional microstructure scaffolds for cell force measurements. *Advanced Materials*. **22**, 868-871.

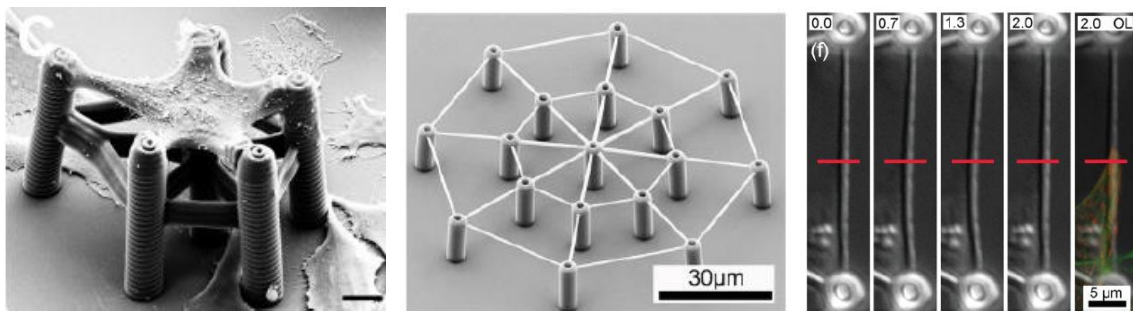


Figure 34 : Micro dispositifs 3D pour la mesure des forces cellulaires. À gauche, structure permettant d'étudier la forme des cellules, les piliers sur les extrémités permettent de mesurer la force des cellules. Extrait de Brand et al¹³². Au milieu et à droite, culture de cardiomyocytes sur un support 3D (structure du milieu), des battements réguliers de ces derniers ont été observés par l'analyse des déformations des poutres. Cela a permis de remonter jusqu'aux forces. Extrait de Klein, F et al¹³¹.

Un autre dispositif ¹³² a permis de mesurer des forces cellulaires. Une cage composée de 5 membranes (une sur le dessus, quatre sur les côtés) a été développée par la technique de polymérisation par deux photons, cette cage est observable sur l'image de la figure 35 où nous observons la superposition d'une image de fluorescence de la cage auto fluorescente et des cellules marquées et d'une image de transmission. En jouant sur la puissance du laser, les auteurs ont pu moduler les propriétés mécaniques de la cage (1 face moins rigide que les autres) et ont montré que l'invasion de la cage par des cellules tumorales dépend de la rigidité de celle-ci. Plus les faces sont molles, plus les cellules cancéreuses envahissent la cage. En envahissant la cage, les cellules appliquent des forces sur la paroi, provoquant leur déplacement. Un algorithme permettant de modéliser des forces s'exerçant sur la membrane au niveau de la cellule a permis de retrouver une des configurations observées. Ces forces sont de l'ordre du μN.

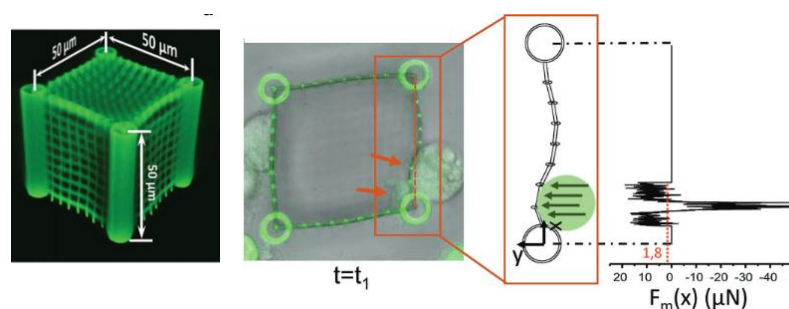


Figure 35 : Micro dispositif pour l'étude de l'invasion cellulaire. Image optique de cellules cancéreuses envahissant une cage permettant de remonter à des forces de cellules cancéreuses. Extrait de Lemma, ED et al¹³²

¹³² Lemma, ED et al. (2017). Microenvironmental stiffness of 3D polymeric structures to study invasive rates of cancer cells. *Advanced healthcare materials*, 1700888

Bien que ces dispositifs soient des supports de culture 3D, ils ne permettent pas d'étudier les cellules sous confinement. Or le confinement des cellules dans leur environnement physiologique est omniprésent.

1.5. Objectifs de la thèse

La migration des cellules du système immunitaire, telles que les macrophages, est un mécanisme essentiel. En effet, cela leur permet de réaliser certaines de leurs fonctions, par exemple, phagocyter des bactéries ou réparer les tissus endommagés. Il a également été démontré que la modification de la matrice cellulaire liée à la migration de ces cellules avait un rôle parfois, dans le développement de certaines maladies. Étudier les mécanismes de migration de ces cellules pourrait nous aider à mieux comprendre leur rôle, bénéfique ou délétère.

Au cours des deux dernières décennies, des études ont été réalisées pour mesurer les forces mécaniques exercées par des cellules vivantes sur leur environnement. Cela a conduit au développement de diverses techniques ayant pour objectif de mieux comprendre la génération par des cellules de forces pendant leur migration sur des substrats bidimensionnels (2D), comme j'ai pu le décrire dans la partie 1.4 de ce chapitre. Cependant, *in vivo*, les cellules migrent à travers des environnements tridimensionnels (3D) et les mécanismes utilisés pour migrer en 3D diffèrent significativement de ceux de la migration 2D, en effet, comme vu dans la partie 1.3, le confinement de la cellule qui ne peut avoir lieu sur des supports de migration 2D influence les mécanismes mis en place par la cellule pour migrer. Il est donc nécessaire de développer des outils pour comprendre comment les cellules migrent en 3D. En particulier, des études doivent être menées pour déterminer comment les cellules appliquent des forces en fonction du niveau de confinement auquel elles sont confrontées.

L'objectif de la thèse est donc de mesurer des forces appliquées par les cellules lorsqu'elles migrent dans un espace tridimensionnel *ex vivo* sous confinement. Pour ce faire, un dispositif microfluidique a été développé et fabriqué. Ce dispositif est équipé de deux tailles de microcanaux fluidiques ($5 \times 10 \mu\text{m}^2$ ou $10 \times 10 \mu\text{m}^2$) contenant des micropiliers d'environ $2 \mu\text{m}$ de diamètre et $8.5 \mu\text{m}$ de hauteur centrés sur l'axe du canal et ayant leur extrémité libre. Ces piliers sont des obstacles qui entravent le mouvement de la cellule dans le canal, la cellule devra alors créer des contacts avec les piliers et les déformer pour continuer à migrer dans le canal. La mesure de la flexion des piliers permet à l'aide de la théorie des poutres de remonter à la force locale appliquée par la cellule. Cet outil permet d'étudier l'amplitude et la direction des forces locales appliquées par les cellules pendant leur migration dans un environnement confiné. Cet outil permet à la fois de mesurer les forces de migration appliquées par la cellule à l'échelle subcellulaire sous un confinement plus ou moins important. Nous montrons dans cette thèse que ces dispositifs ont permis de mettre à jour le rôle particulier du noyau dans la migration confinée.

Dans un deuxième temps, nous avons fabriqué des réseaux 3D - à l'échelle cellulaire - composés de poutres qui peuvent être déformées par des cellules migrant à l'intérieur. En enregistrant une séquence vidéo des déformations de ce réseau, il est possible d'étudier les forces appliquées par la cellule au cours du temps. Cet outil permet contrairement aux canaux équipés de pilier de mesurer les forces globales de la cellule, puisque le support de migration sert lui-même de capteur de force, au sein même d'un environnement réellement 3D contrairement à un microcanal rectiligne de section rectangulaire.

Table des illustrations

Figure 1 : Cellules impliquées dans les réponses innées et acquises du système immunitaire. Extrait de Dranoff et al ¹	2
Figure 2 : Schéma du recrutement des macrophages lors d'une infection. Les macrophages résidents détectent le site infecté et transmettent l'information aux monocytes qui quittent alors le vaisseau sanguin. Ils se différencient alors en macrophage en migrant vers le site infecté.....	2
Figure 3 : Spectre d'activation des macrophages. Le panel en haut montre une polarisation linéaire des M1 et M2. En bas, une représentation circulaire des macrophages entre les macrophages activés de façon classique, les macrophages activés pour la réparation des tissus. Adapté de Mosser et al, 2008 ⁵	2
Figure 4 : Rigidité des différents tissus du corps humain. Échelle de rigidité des différents tissus du corps humain. Adapté de Butcher et al, 2009 ¹¹	2
Figure 5 : Schéma du recrutement des macrophages lors d'une infection et du développement d'une tumeur. Les macrophages résidents détectent le site infecté ou la tumeur et transmettent l'information aux monocytes qui quittent alors le vaisseau sanguin. Ils se différencient en macrophages et migrent vers le site infecté ou la tumeur. En migrant dans la zone de la tumeur, le macrophage permet la vascularisation de celle-ci et la migration des cellules cancéreuses.....	2
Figure 6 : Schéma d'un podosome en coupe transverse. Le corps du podosome est composé d'actine filamenteuse (en rouge), relié aux branches d'actine latérales (orange), elles-mêmes reliées aux protéines de l'anneau (bleu). Le cœur d'actine est surmonté d'un chapeau de protéines. Extrait de Linder 2011 et al. ¹⁵	2
Figure 7 : Podosome en 3D. Schéma d'un macrophage migrant dans un gel de collagène. Des structures de type podosome sont observées au bout des protrusions. Extrait de van Goethem 2010 ²⁴	2
Figure 8 : Localisation des podosomes sur une surface non plane. Les podosomes se forment au niveau des reliefs et non d'une surface plane. Extrait de Linder 2016. ²⁵	2
Figure 9 : Modèle mécanique des podosomes des macrophages. Le cœur du podosome pousse sur le substrat. La force du podosome oscille autour d'une valeur fixe au cours du temps. Les forces sont exercées grâce à la poussée du cœur d'actine et a pour effet de contracter les liens (filaments d'actine reliés en entre eux par la myosine) entre le cœur et l'anneau. L'inhibition de l'actine mène à l'arrêt de ces deux contractions alors que l'inhibition de la myosine seulement à l'arrêt de la contraction des liens. Extrait de Labernadie, A ²⁹	2
Figure 10 : Dégradation de la matrice par un podosome. Les microtubules transportent des molécules jusqu'à l'anneau du podosome des molécules utilisées pour la dégradation de la matrice extra cellulaire. Extrait de Linder 2015 ³²	2
Figure 11 : Images par microscopie électronique à balayage de matrice, de gel et des macrophages fixés pendant leur migration dans ces matrices. (a) Le macrophage migre dans une matrice de collagène 1, il	

a adopté une forme ronde. (b) Le macrophage migre dans une matrice de matrigel, il a adopté une forme allongée avec des protrusions. (c) Le macrophage migre dans une matrice de collagène et a adopté une forme allongée. Extrait de Van Goethem ³³ .	2
Figure 12 : Schéma d'un macrophage migrant avec un mode mésenchymateux. Extrait de Wiesner et al ³⁵	2
Figure 13 : Schéma d'un macrophage migrant avec u mode amiboïde. Extrait de Wiesner et al ³⁵	2
Figure 14 : Les régulateurs de la plasticité cellulaire dans des environnements en trois dimensions. Les cellules établissent un mode de migration selon deux principaux paramètres, le degré de contraction de la myosine et le degré d'adhérence sur le substrat. Extrait de Petrie and Yamada ³⁷	2
Figure 15 : Organisation et dynamique du cytosquelette pendant la migration dans un environnement 3D. Quand la cellule passe par des pores de petites tailles, le noyau sépare la cellule en deux parties : l'avant et l'arrière. Le cytosquelette déplace le noyau en le poussant via la contraction du complexe actomyosine à l'arrière de la cellule et l'aide des microtubules, des filaments intermédiaires. Extrait Mc Gregor, AL ⁵⁶ .	2
Figure 16 : Description des forces appliquées par les cellules. (a) Analogie entre le mode de migration mésenchymateux qui peut être comparé à un lézard grim pant le long d'un mur : l'adhérence au niveau des points de contact permet de migrer. Dans le mode amiboïde, la cellule peut être comparée à un homme escaladant deux parois proches l'une de l'autre. (b) Modèle des forces (Fr) appliquée lors d'une migration amiboïde. (c) Modèle des forces (Fad) appliquées lors d'une migration mésenchymateuse. Extrait et adapté de de Heuzé et al ⁵⁸ et Van Goethem ⁵⁹ .	2
Figure 17 : Courbe Déflexion-indentation. La courbe d'approche du cantilever en bleu et la courbe de retrait en rouge. Extrait de Gavara, N et al ⁶²	2
Figure 18: Schéma d'une bille contrôlée par LASER. La bille va être attirée par la zone du LAZER la plus concentrée. Deux gradients sont possibles : en Z en mettant le focus sur en haut ou en bas de la bille. En X et Y en utilisant deux faisceaux avec l'un plus intense que l'autre. Extrait de Sugimura K ⁷³	2
Figure 19 : Ablation d'une jonction cellule-cellule. Illustration de la tension présente à une jonction entre cellules à gauche. À droite, une jonction cellule-cellule est ablatée, les images prises à 10s et 68s de l'ablation montrent l'écartement des deux brins au cours du temps, résultant du déséquilibre créé. Extrait de Sugimura K ⁷⁹	2
Figure 20 : Aspiration par micropipette. À gauche, aspiration d'un Neutrophile et à droite d'un chondrocyte. Extrait de Gochmuth, RM ⁸² .	2
Figure 21 : Déformation uni axiale d'une cellule. (a) Une cellule est comprimée entre deux surfaces de façon constante ou dynamique. Extrait de Sugimura, K ⁸² (b) une cellule adhérente est mise en tension uniaxiale entre deux surfaces. Extrait de Roc-Cusachs, P ⁸⁴	2
Figure 22 : Déformation d'une cellule à l'aide d'un flux et d'une constriction. Time-laps d'un globule rouge sain (a) et non sain (b) passant une constriction sous un flu, dans le premier cas le globule rouge	

se déforme légèrement avant de retrouver sa forme initiale alors que dans le deuxième cas le globule rouge se déforme plus et ne retrouve pas sa forme initiale. Extrait de Gambhire ⁹⁰	2
Figure 23 : Déformation d'une membrane de silicone par un fibroblaste. (a) Schéma de profil d'un fibroblaste en train de déformer une surface de silicone lors de sa migration (b) Image optique d'un fibroblaste en train de déformer une surface de silicone lors de sa migration. Extrait de Harris et al. ⁹¹ . 2	2
Figure 24 : Décomposition des forces cellulaires. (a) La cellule migre sur une surface 2D. La force de traction peut se décomposer en deux forces (une normale au plan et une appartenant le plan). Les forces normales vont mettre le matériau en compression ou en tension et les forces dans le plan cisailent le matériau. Extrait de Polacheck WJ & Chen SC. ⁹⁵	2
Figure 25 : Système d'évaluation des forces de friction. Deux surfaces rigides recouvertes d'une couche de gel contenant des billes fluorescentes contraignent la cellule en étant à quelques μm l'une de l'autre. La mesure du déplacement des billes lors de la migration de la cellule donne accès aux forces de friction. Extrait de Yip, AK ¹⁰³	2
Figure 27 : Étude des forces de traction exercées par des macrophages humains. (a) Représentation des pressions exercées par le macrophage au cours du temps. (b) Visualisation de la trajectoire de migration du macrophage (c) Forces appliquées par les macrophages en fonction de la rigidité du substrat. Extrait de Hind, LE ¹⁰⁶	2
Figure 26 : Mesure des forces de traction dans une matrice de polymère. (a) Déplacements des billes à proximité d'une cellule. (b) Forces appliquées par la cellule obtenues après calcul. Extrait de Steinwachs, J ¹⁰⁷	2
Figure 28 : Principe de fonctionnement du FRET. (a) Schéma de fonction d'un capteur FRET. (b) Plus la molécule accepteuse est proche de la molécule réceptrice, plus le signal fluorescent est fort. Mettre en tension le système revient à baisser le signal lumineux. La calibration du système se fait <i>in vitro</i> , le signal fluorescent est mesuré et corrélé à la force appliquée au système. (c). Extrait de Sugimura, K ¹¹⁰²	
Figure 29 : Mesure des forces de poussée des podosomes. (a) Principe de fonctionnement de la PFM, la pointe vient sonder la membrane (Formvar) alors que la cellule adhérente au-dessous applique des forces de protrusions. (b) Image obtenue avec l'AFM des protrusions induites par un macrophage humain, mesures de la hauteur des protrusions le long de la ligne blanche de l'image. Oscillation de la force d'un podosome de macrophage mesurée par PFM. Extrait de Labernadie et al ¹¹⁶	2
Figure 30 : Micro piliers comme capteur de force. (a) Schéma d'une cellule adhérente sur un lit réseau de micropiliers, en appliquant des forces de traction les piliers vont fléchir. La flexion du pilier (δ) est reliée à la force (F) qui l'a fait fléchir. L, la hauteur du pilier, d le diamètre du pilier, E le module d'Young et I le moment quadratique. (b) Image optique d'une cellule musculaire appliquant des forces de traction sur un lit de pilier. Extrait de Tan, JL ¹¹⁸	2
Figure 31 : Mesure de traction force sous confinement. À gauche, un schéma d'une cellule migrant sur un lit de pilier. Le canal autour confine la cellule, à droite, une image MEB des piliers intégré dans un canal. Extrait de Raman, SR ¹²⁵	2

Figure 32 : Mesure de pression exercée par une cellule sur une goutte d'huile. Séquence d'images d'une cellule migrante dans un canal contenant une goutte d'huile. Sous la pression exercée par la cellule, la goutte d'huile se déforme. Mesure de la pression appliquée par la cellule sur la goutte d'huile. Extrait de Molino, D et al ¹²⁸	2
Figure 33 : Micro dispositif 3D pour la mesure des forces de traction. Extrait de Marelli, M et al ¹²⁹	2
Figure 34 : Micro dispositifs 3D pour la mesure des forces cellulaires. À gauche, structure permettant d'étudier la forme des cellules, les piliers sur les extrémités permettent de mesurer la force des cellules. Extrait de Brand et al ¹³² . Au milieu et à droite, culture de cardiomyocytes sur un support 3D (structure du milieu), des battements réguliers de ces derniers ont été observés par l'analyse des déformations des poutres. Cela a permis de remonter jusqu'aux forces. Extrait de Klein, F et al ¹³¹	2
Figure 35 : Micro dispositif pour l'étude de l'invasion cellulaire. Image optique de cellules cancéreuses envahissant une cage permettant de remonter à des forces de cellules cancéreuses. Extrait de Lemma, ED et al ¹³²	2

Chapitre 2 : Micro canaux équipés de capteurs de forces pour l'étude de la migration des macrophages en milieu confiné

2.1. Fabrication de canaux équipés de micropiliers en PDMS

2.1.1. Design des dispositifs

L'objectif scientifique est de mesurer les forces de migration exercées par un macrophage lorsqu'il migre dans un environnement *au sein duquel il se trouve confiné spatialement*. Le principe mis en œuvre consiste à fabriquer des microcanaux fluidiques de petite dimension afin de confiner le macrophage et d'insérer au sein de ce microcanal des piliers déformables servant de capteurs de force. Le micro dispositif est schématisé sur la figure 1. Nous avons choisi d'intégrer des piliers de 2 μm de diamètre

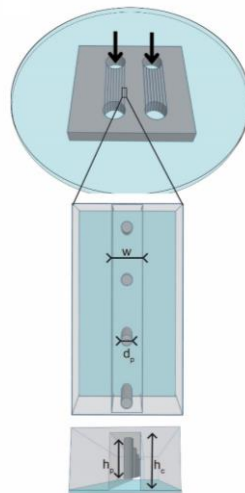


Figure 1 : Schéma du dispositif de microfluidique. En haut, dispositif complet avec les réservoirs et les deux séries de microcanaux, au milieu: zoom sur un canal équipé de piliers, W est la largeur du canal, d_p le diamètre du pilier, h_p la hauteur du pilier et h_c la hauteur du canal, en bas : vue 3D au sein d'un canal équipé de piliers monté au-dessus d'une lame de verre.

dans des canaux de largeurs variables ce qui permet de faire varier le degré de confinement subi par la cellule. *In fine*, la hauteur des murs des canaux a été ajustée autour de 10 μm et celle des piliers autour de 9 μm , inférieure à la hauteur des canaux pour avoir une extrémité libre afin de pouvoir être fléchi sous l'action des forces cellulaires. De cette manière, il sera possible pour les cellules de fléchir les piliers, et la mesure en microscopie optique du mouvement de l'extrémité du pilier nous permettra de remonter aux forces cellulaires, à leur direction ainsi qu'à leur module.

Trois générations de canaux équipés de piliers ont été conçues successivement. Les problèmes rencontrés lors du développement des dispositifs ou lors des premières expériences réalisées ont eu une influence sur les générations suivantes.

Les microcanaux en polydiméthylsiloxane (PDMS) équipés de micro piliers sont obtenus par moulage d'un prépolymère sur un moule en silicium. Ce moule comprend le négatif des canaux et des piliers. Le moule est fabriqué par photolithographie et gravure ionique réactive en utilisant la résine comme masque de gravure. La fabrication du moule est conventionnelle, la réplication du moule en PDMS permet de fabriquer un grand nombre de dispositifs à partir d'un seul moule d'origine. Les puces microfluidiques sont ensuite collées de façon définitive sur une lamelle de verre afin de fermer les canaux (voir figure 1 en bas). Les paragraphes 2.1.2. et 2.1.3. reprennent le protocole détaillé de la fabrication du moule puis des microdispositifs.

Génération 1

La première génération de canaux comprend 3 largeurs différentes : 6, 10 et 20 μm . Dans le premier cas, un pilier tous les 11 μm est placé au milieu du canal. Dans le canal de 10 μm de large, des groupes de 4 piliers répartis sur deux lignes, comme indiqué sur la figure 2, sont placés tous les 21 μm . Dans le dernier cas correspondant au canal le plus large, des groupes de 24 piliers, répartis sur 4 lignes comme schématisés sur la figure 2, sont placés tous les 27 μm . La technique de photolithographie utilisée pour définir ces structures nous permet de placer les piliers à 2 μm les uns des autres au minimum et à la même distance des parois des canaux.

À noter que pour cette génération, le moule a été fabriqué avec une seule étape de gravure. En raison d'un effet technologique lié à la gravure du silicium¹, il est impossible d'obtenir des piliers de 9 μm de hauteur, pour une hauteur de 10 μm des canaux. La hauteur obtenue pour les piliers n'est que de 4 μm . Cela permet par contre d'obtenir facilement des piliers droits après le développement. Ce phénomène, baptisé ARDE (Aspect Ratio Dependent Etching), provient du fait que la vitesse de gravure dépend de la taille des cavités à graver. Plus la cavité est grande et plus la vitesse de gravure est importante. Ainsi, les espaces intercanaux correspondant à des cavités seront plus profonds que les piliers qui correspondent à des cavités de 2 μm de diamètre. Pour pallier ce problème, une deuxième génération de pilier a été conçue avec deux étapes de photolithographie et deux étapes de gravure permettant d'appliquer des temps de gravure différents pour les microcanaux et les piliers et ainsi d'ajuster de manière séparée la hauteur finale des microcanaux et des piliers.

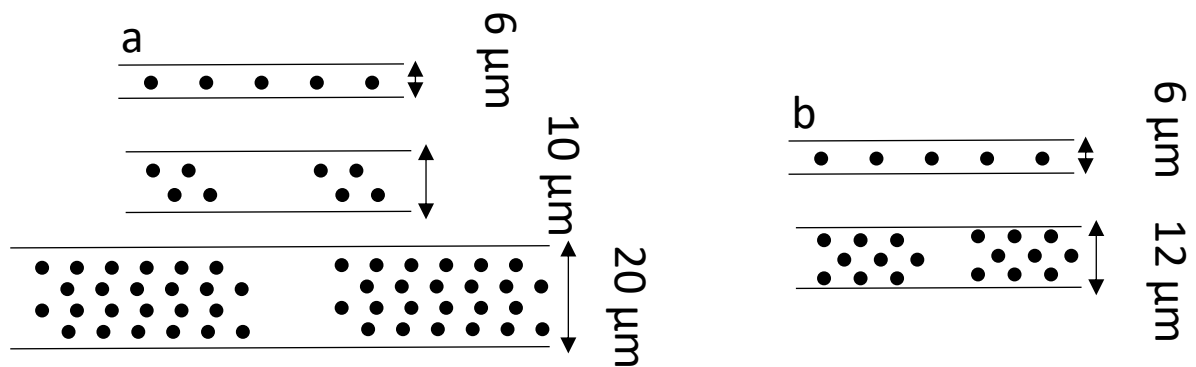


Figure 2 : Schéma de la première et deuxième génération des canaux. (a) Première génération de canaux équipés de piliers, schéma d'un canal de 6 μm de large, 10 μm de large et de 20 μm de large. (b) Deuxième génération de canaux équipés de piliers, schéma d'un canal de 6 μm de large et de 12 μm de large.

Génération 2

Pour la génération 2, le canal de largeur 6 μm a été conservé avec un pilier tous les 15 μm . La largeur du canal de 10 μm a été augmentée à 12 μm pour obtenir une largeur deux fois plus importante que le canal de 6 μm de large. Cette largeur reste suffisamment petite pour confiner les macrophages. Des groupes de 9 piliers, répartis sur trois lignes comme indiqué sur la figure 2, sont placés au centre du canal tous les 17 μm . Cependant après des premiers essais, nous avons constaté que cette disposition ne permet pas à tous les piliers de rester droits. Les piliers les plus proches du bord s'effondrent contre les murs, ce qui a mené à la génération 3 du dispositif, une seule rangée de piliers étant placée au centre du canal de 12 μm de large.

¹ Lai, SL et al. (2006). Aspect ratio dependent etching lag reduction in deep silicon etch processes. *Journal of Vacuum Science & Technology*. **24**, 1283.

Génération 3

La troisième et dernière génération est composée de deux types de canaux. Le premier a une largeur de $12\text{ }\mu\text{m}$, avec une ligne de pilier placée au milieu du canal. Les piliers sont espacés tous les $12\text{ }\mu\text{m}$. Le deuxième a une largeur de $6\text{ }\mu\text{m}$ avec une ligne de piliers placée au milieu du canal également, mais les piliers sont espacés de $21\text{ }\mu\text{m}$. Les deux extrémités des canaux sont reliées à des réservoirs cylindriques de 3 mm de diamètre. La longueur typique d'un canal est de 2 mm . Le schéma de la figure 3 permet de visualiser les canaux équipés de piliers.

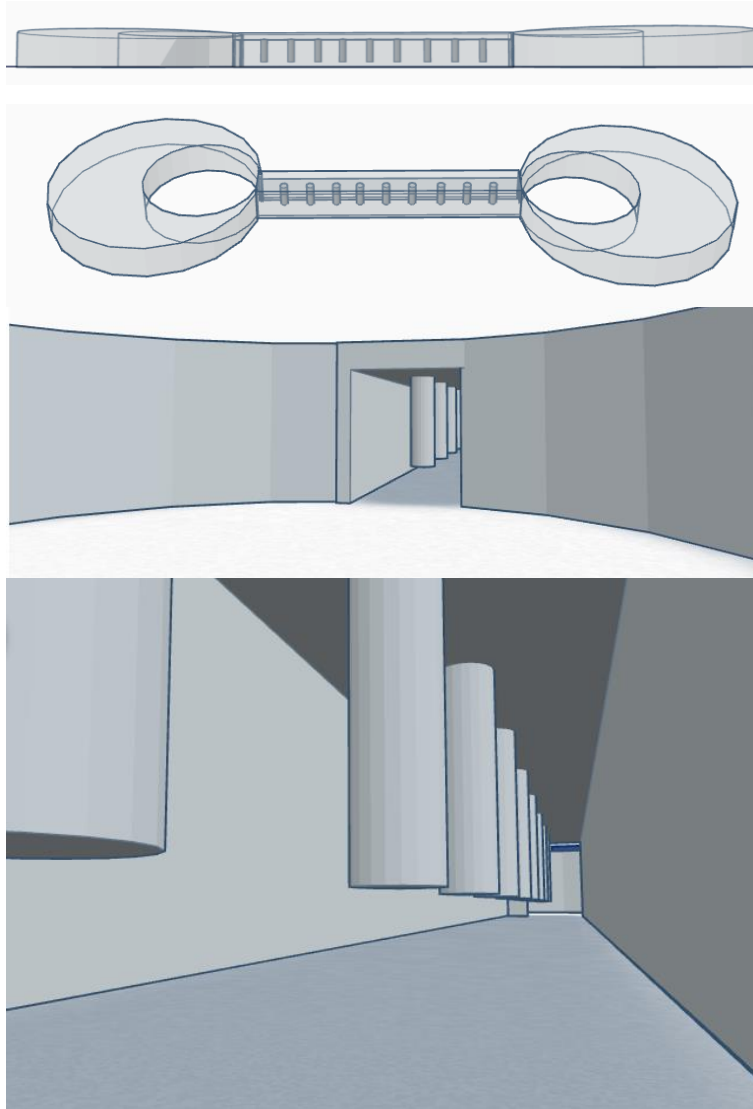


Figure 3 : Schéma du dispositif de microfluidique. De haut en bas : vue de côté, vue en diagonale depuis le réservoir du dispositif, puis vue de l'intérieur du canal.

2.1.2. Fabrication du moule

Le wafer est d'abord nettoyé avec un traitement de surface par plasma O₂ (5 min, 80 W), puis déshydraté dans un four (15 min, 100°C). Une couche de hexamethyldisilazane est déposée sur le wafer afin de favoriser l'adhérence de la résine sur le wafer. La couche de résine positive est déposée par « spin coating » (durée 30 s, vitesse 3600 rpm, accélération 5000 rpm/s, épaisseur 1.1 µm). Le wafer est ensuite exposé aux UV (20 mW/cm²@ 405nm, durée 11s, le masque est collé au wafer par aspiration) à travers un masque contenant les motifs correspondant aux piliers, voir étape 1 de la figure 4. La résine est chauffée (60s, 110°C) puis développée à l'aide d'un solvant (MF CD 26), voir étape 2 de la figure 4. Enfin, les micromotifs sont transférés sur le wafer à l'aide d'une gravure ionique réactive profonde (AICATEL-AMS 400, 243s). Cette gravure est constituée d'une étape de gravure du Si par SF₆ (2s) et d'une étape de passivation des surfaces par C₄F₈ (3.5s). Ces deux étapes sont répétées en boucle pour avoir une gravure anisotrope (uniquement dans la direction z). La résine restante est délaquée par plasma O₂ (5 min, 80 W), voir étape 3 de la figure 4.

La même séquence d'étapes (dépôt de la résine positive sur le wafer, exposition de la résine aux UV à travers un masque contenant cette fois le motif des réservoirs et des canaux, développement de la résine, gravure, délaquage) est réalisée pour créer les canaux et les réservoirs. À noter que l'alignement des canaux sur les motifs de piliers déjà existants sur le wafer est effectué manuellement sous contrôle optique. Cette étape est réalisée avec un aligneur optique (Suss Microtec, MA 150) qui permet un alignement au micron près. Le temps de gravure ionique pour structurer les canaux est augmenté à 251s

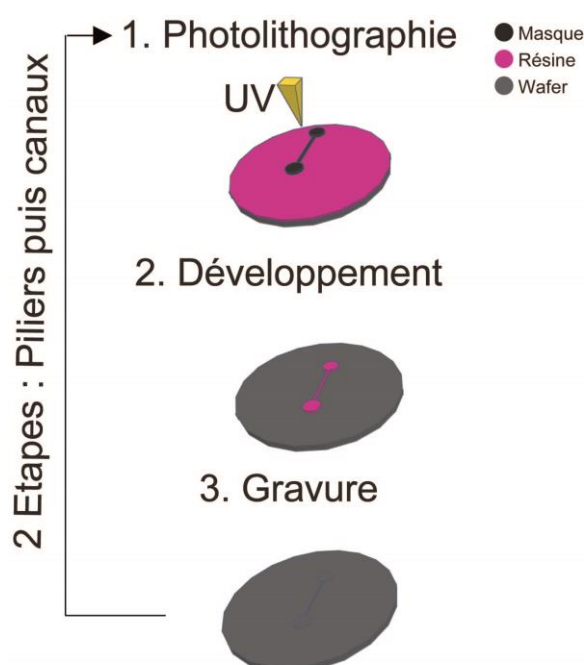


Figure 4 : Processus de fabrication du moule. (1) le wafer sur lequel est déposée une couche de résine positive est exposé aux UV à travers un masque. (2) La couche de résine restante sur le wafer après développement. (3) Wafer structuré après l'étape de gravure.

avec les mêmes séquences de gravure que pour les piliers. Pour pouvoir démouler le PDMS, la surface de ce dernier est passivée à l'aide d'un dépôt de perfluorodecyltrichlorosilane réalisé en phase vapeur.

La première génération de moule a été fabriquée avec une seule étape de gravure. Pour une hauteur de 10 μm des canaux, la hauteur des piliers est de 4 μm . Les trous de diamètre 2 μm ont été moins gravés que les zones intercanaux qui font des centaines de micromètres carrés. Pour éviter ce problème, les trous pour les piliers et les zones intercanaux doivent être gravés les uns après les autres avec différent temps de gravure. Pour ce faire, deux étapes de photolithographies sont réalisées. Les trous pour les piliers ont été créés lors de la première étape et les micros canaux lors de la deuxième étape.

2.1.3. Réplique du moule en PDMS

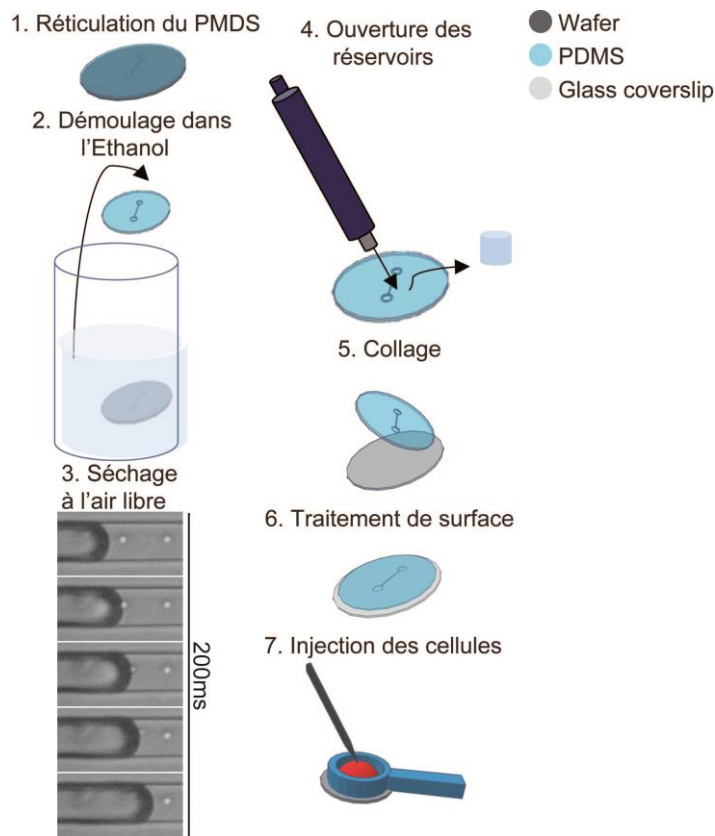


Figure 5 : Fabrication des dispositifs et lancement de l'expérience. (1) Le PDMS est coulé sur le wafer et dégazé avant polymérisation thermique à 100°C pendant 1h. (2) Le PDMS réticulé est démoulé dans l'éthanol puis posé sur une lamelle de verre. (3) Le PDMS sèche pendant 30 minutes à température ambiante, la séquence d'image montre la progression du ménisque formé par l'éthanol (à droite des images) et l'air (à gauche des images) et qui courbe les piliers toujours de la même façon. (4) Ouverture des réservoirs à l'aide d'un emporte-pièce. (5) Le timbre est retourné et soumis à un plasma O₂ comme la lamelle de verre puis le timbre est collé à la lamelle de verre de façon irréversible. (6) Un traitement de surface est réalisé pour promouvoir (fibronectine) ou inhiber (PEG-g-PLL) l'adhérence des cellules. (7) Injection des cellules dans les réservoirs des dispositifs.

Le moule fabriqué en salle blanche est utilisé pour fabriquer les puces micros fluidiques en PDMS. La succession d'étapes pour créer ces dispositifs est présentée dans la figure 5. Le prépolymère de silicone est mélangé avec un agent de réticulation avec un ratio de 10 g pour 1 g, puis coulé sur le moule. Pour éliminer les bulles créées lors du mélange du polymère, l'ensemble est placé dans une cloche sous vide pendant quelques minutes. La réticulation du PDMS, étape 1 de la figure 5, est obtenue en plaçant le wafer dans un four (100°C) pendant 1 heure puis démoulé dans l'éthanol, étape 2 de la figure 5, et laissé sécher à l'air libre, étape 3 de la figure 5. Cette étape est critique, en effet, si le PDMS est démoulé à l'air libre, les piliers s'effondrent complètement dans des directions aléatoires. Démouler dans l'éthanol permet de garder les piliers droits. Le dispositif est ensuite placé sur une lamelle de verre, avec les motifs vers la lamelle de verre. Lors du séchage à température ambiante, le ménisque de l'éthanol qui se déplace au fur et à mesure de l'évaporation dans le canal, va courber les piliers toujours de la même manière. Les piliers se courbent jusqu'à toucher le flanc du canal. L'ouverture des réservoirs à l'aide d'un emporte-pièce permet de relever les piliers. Ce phénomène est certainement dû au déséquilibre de pression créé dans les canaux lors de l'ouverture. À noter que cet effet de redressement ne fonctionne pas systématiquement (dans 50 % des cas environ pour les canaux de 12 μm de large et dans 10% des cas environ pour les canaux de 6 μm de large). Dans les cas où le redressement complet échoue, quelques fois, aucun pilier ne se relève, parfois seulement la moitié et parfois l'on peut voir tous les piliers de 4 canaux de 12 μm de large relevés, à l'exception d'un seul. Malgré ce taux d'insuccès, comme un moule complet possède au total 22 dispositifs, il est possible d'obtenir en moyenne 12 dispositifs utilisables à chaque moulage. Une fois séchés, les dispositifs sont retournés et exposés à un plasma O_2 (90 s, 50 W) pour activer leurs surfaces. Les lamelles de verre sont aussi exposées au plasma O_2 . Pour finir, les dispositifs en PDMS sont collés sur les lamelles de verre de façon irréversible, étape 5 de la figure 5.

Une fois collés, les dispositifs sont placés 1 heure à 100°C dans un four pour être stérilisés, puis stockés dans une solution stérile (PBS) pour que les canaux restent hydrophiles. Pour les expériences, un traitement de surface est réalisé pour promouvoir (fibronectine) ou inhiber (PEG-g-PLL) l'adhérence des cellules, étape 6 de la figure 5. Les cellules sont ensuite injectées dans les réservoirs et immergées dans le milieu de culture, étape 7 de la figure 5.

2.2. Caractérisation du dispositif et modélisation des capteurs de force

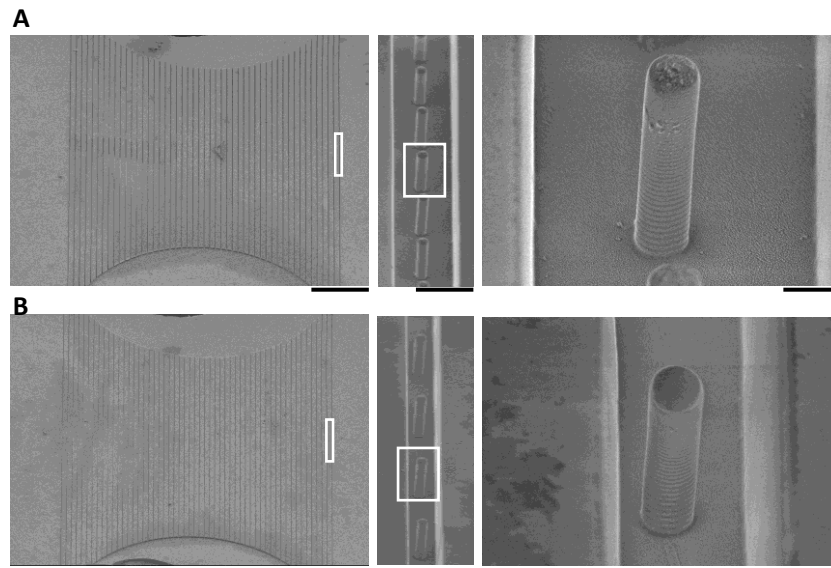


Figure 6 : Images par microscopie électronique à balayage d'un micro dispositif. À gauche, champ large de tous les canaux de 12 μm (A) et 6 μm (B) barre d'échelle 500 μm , au milieu zoom sur un des canaux barre d'échelle 10 μm , à droite zoom sur un des piliers des canaux de 12 et 6 μm de large, barre d'échelle 2 μm .

2.2.1. Caractérisation des dimensions

La Figure 6 montre l'ensemble des canaux liés aux réservoirs, sur la figure 6A pour les canaux de 12 μm et sur la figure 6B pour les canaux de 6 μm de large. Une vue agrandie de l'un des canaux permet de visualiser les piliers intégrés au centre des canaux, puis une image centrée sur un pilier, permet d'observer la forme et l'état de surface des piliers. On peut notamment observer des lignes régulières creusées le long des canaux et à la périphérie des piliers qui proviennent des cycles de gravure/passivation décrits précédemment.

Les dimensions des canaux et des piliers de la troisième génération ont été mesurées par microscopie électronique à balayage après une calibration soigneuse de l'instrument. La hauteur du canal h_c , la hauteur des piliers h_p , le diamètre des piliers d_p et la largeur du canal W sont donnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Dimensions des canaux et des piliers. h_c : hauteur du canal, h_p : hauteur du pilier, d_p : diamètre du pilier et W_6 et W_{12} : largeurs réelles des canaux de dimension nominale 6μ et 12μ respectivement.

	h_c	h_p	d_p	W_6	W_{12}
Moyenne (μm)	11.25	8.42	1.86	6.46	12.45
Ecart type (μm)	0.78	0.76	0.16	0.20	0.10
Nombre de mesures	6	17	27	14	4

2.2.2. Évaluation des propriétés mécaniques des piliers de PDMS

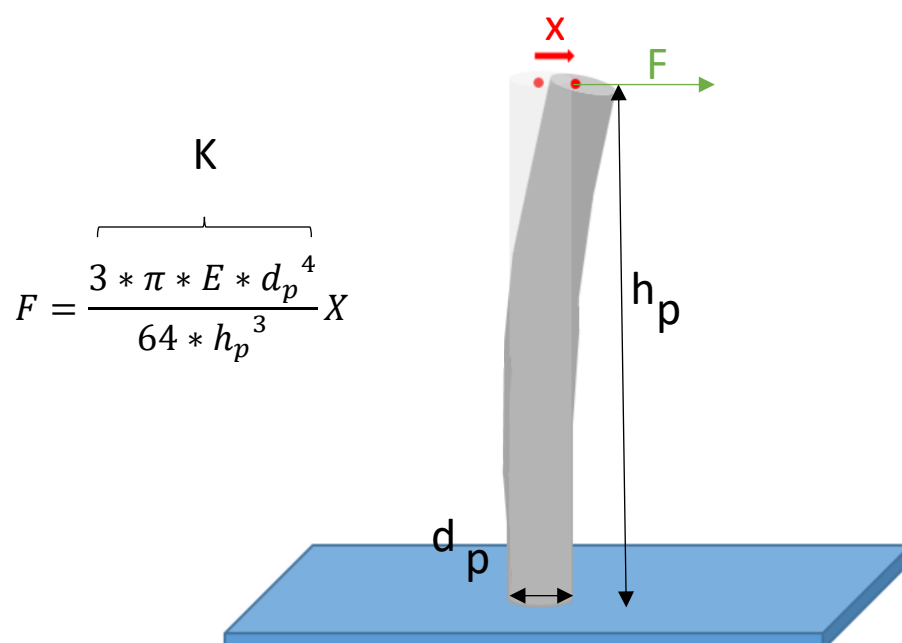


Figure 7 : Schéma de la flexion d'une poutre cylindrique encastree de diamètre d_p , de hauteur h_p , sous l'action d'une force (F) appliquee à son extremité. La poutre est composee d'un materiau de module d'Young E . La fleche X est reliee à la force par le facteur K .

Connaissant les dimensions des piliers fabriques dans les canaux indiquees dans le tableau 1, il est possible d'évaluer leur constante de raideur. Pour évaluer la constante de raideur des piliers integres dans les canaux, l'équation issue de la theorie des poutres et dite d'Euler-Bernoulli, explicitée dans la figure 7, est utilisee^{2,3}. Elle relie le déplacement de l'extrémité libre du pilier à la force appliquee sur

² Sniadecki, NJ and Chen, CS et al. (2007). Microfabricated silicone elastomeric post arrays for measuring traction forces of adherent cells. *Methods in cell biology*. **83**, 313-328.

³ Cheng, S et al. (2010). Note: Mechanical study of micromachined polydimethylsiloxane "elastic" microposts, *Review of scientific instruments*. **81**, 106104.

cette même extrémité via le module d'Young (E), le diamètre de la poutre (d_p) et la hauteur du pilier (h_p , Figure 7). Les propriétés mécaniques du PDMS sont connues de la littérature et dépendent du temps et de la température de réticulation⁴. Pour une cuisson de 1 heure à 100°C, le module d'Young est de 2.05 +/- 0.12 MPa. Pour une hauteur des piliers de 8.42 μm et un diamètre de 1.86 μm , la raideur K du pilier est donc de 5.9 nN/ μm avec une incertitude de 3.9 nN/ μm

Pour déplacer l'extrémité d'un pilier d'un micromètre, la cellule doit donc appliquer une force de 5.9 nN. Il a été montré que les macrophages humains appliquent des forces de cet ordre grandeur au niveau de leurs sites adhérences sur des surfaces 2D. On peut donc raisonnablement supposer que les macrophages pourront déplacer les piliers de manière observable optiquement lors de leur migration confinée au sein des canaux.

Évaluation de l'influence de la localisation du point d'appui de la force sur le pilier

Les cellules appliquent des forces sur une surface donnée et non de manière ponctuelle comme dans l'hypothèse utilisée pour établir l'équation précédente. La taille de cette surface et sa localisation sur le pilier (distance par rapport à l'extrémité) vont avoir une influence sur la flexion de celui-ci. Inversement, évaluer les forces que la cellule applique à partir de la flexion du pilier implique de connaître où cette force s'applique et sur quelle surface.

Des simulations sur le logiciel Comsol ont été réalisées pour évaluer l'influence de la surface sur laquelle s'applique la force et sa localisation sur la hauteur du pilier (axe z). Pour ce faire, on suppose dans un premier temps que la cellule applique une force de 2.8 nN. Cette valeur est typique des forces appliquées par les structures d'adhérence des macrophages sur des surfaces 2D⁵. Cette valeur de force est donc représentative des situations que nous risquons d'observer. Pour les simulations, cette force est répartie sur la moitié du cylindre et sur une hauteur de 1 μm , soit une surface de 2.83 μm^2 . Cette surface est également assez caractéristique des dimensions des sites d'adhérences et d'application des forces dans des situations 2D. La figure 8, montre le déplacement de l'extrémité libre du pilier en fonction de la position sur l'axe Z du pilier de cette zone d'appui. Comme attendu le déplacement est maximal (0.41 μm) quand la force est appliquée à l'extrémité libre du pilier et minimal (0.008 μm) quand la force est appliquée au niveau de l'extrémité fixée du pilier. La cellule devrait appliquer une force de 330 nN au niveau de l'extrémité fixée pour obtenir un déplacement de 0.41 μm .

⁴ Johnston, I et al. (2014). Characterization of Bulk Sylgard 184 for Microfluidics and Microengineering. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. **24**, 035017.

⁵ Labernadie, A et al. (2014). Protrusion force microscopy reveals oscillatory force generation and mechanosensing activity of human macrophage podosomes. *Nature Communications*. **5** :5343.

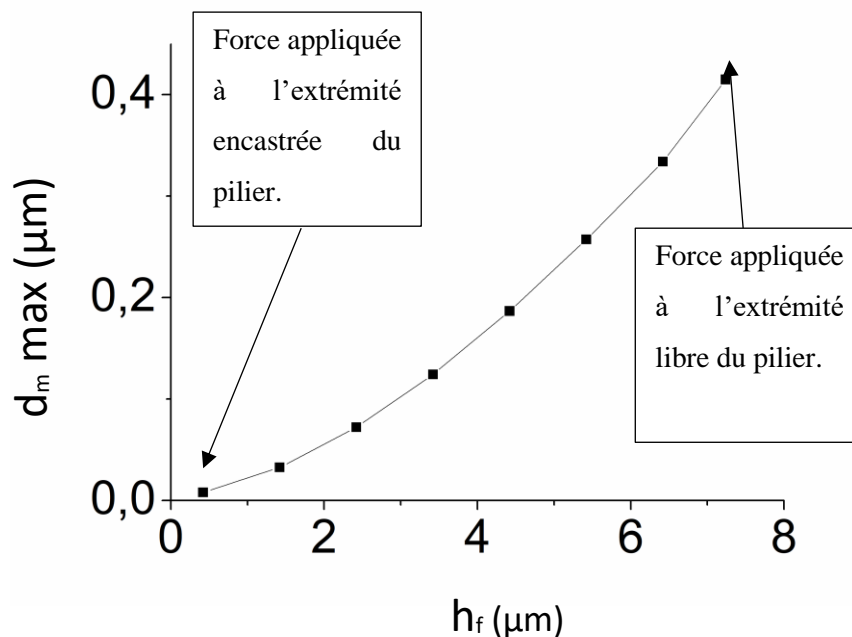


Figure 8 : Flexion d'un pilier encastré. Le déplacement de l'extrémité libre du pilier ($d_m \text{ max}$) est tracé en fonction du positionnement sur l'axe z (h_f) du point central de la surface d'application de la force. Cette surface est celle d'un demi cylindre de hauteur $1 \mu\text{m}$ et de rayon identique à celui du pilier (voir texte).

Trois méthodes sont comparées pour évaluer la force exercée par la cellule sur un pilier, le résultat de cette comparaison est donné dans la figure 9. La première méthode consiste à utiliser la loi d'Euler-Bernoulli est de calculer grâce à l'équation de la figure 7 le déplacement de l'extrémité du pilier lorsque celui-ci est soumis à une force de 2.8 nN s'exerçant sur son extrémité libre. Le déplacement du pilier est alors de $0.47 \mu\text{m}$. Le logiciel COMSOL est utilisé pour la deuxième et troisième méthode, dans le premier, une force est appliquée de façon ponctuelle l'extrémité libre du pilier, dans le second cas la force s'applique sur une surface de $2.83 \mu\text{m}^2$ et positionné à l'extrémité du pilier. Les déplacements obtenus sont de $0.49 \mu\text{m}$ dans le premier cas et de $0.42 \mu\text{m}$ dans le deuxième cas. L'écart entre la première et deuxième méthode est de 4 % environ et entre la première et troisième méthode est de 12%.

Pour conclure, la taille de la surface d'application de la force et sa localisation sur l'axe du pilier sont des paramètres importants à connaître pour déterminer la force exercée par la cellule. Cependant, comme nous le verrons dans la partie expérimentale, de nombreuses observations témoignent que lorsque des mouvements des piliers sont observés, l'extrémité libre des piliers est en contact avec les macrophages. Dès lors que l'extrémité du pilier est sollicitée, considérer une force ponctuelle ou une force répartie sur une surface typique de quelques microns carrés ne modifie la force appliquée que de

12 %. Pour évaluer les modules des forces de migrations nous avons donc fait le choix raisonné de supposer que la force s'applique à l'extrémité du pilier de manière ponctuelle.

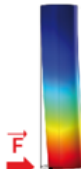
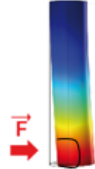
	Utilisation de la loi d'Euler-Bernoulli.	Simulation COMSOL avec une force ponctuelle et positionnée à l'extrémité du pilier.	Simulation COMSOL avec une force répartie sur une surface de 2.83 μm^2 et positionnée à l'extrémité du pilier.
Description de la méthode utilisée	$F = \frac{3 * \pi * E * d_p^4}{64 * h_p^3} X$		
Flexion du pilier X (μm)	0.47	0.49	0.42

Figure 9 : Evaluation de la flexion d'un pilier avec trois méthodes différentes. Dans le premier cas, l'équation d'Euler-Bernoulli est utilisée, dans le deuxième cas une simulation COMSOL permet d'évaluer la flexion du pilier lorsqu'une force ponctuelle est appliquée à l'extrémité du pilier, et dans le dernier cas une simulation COMSOL permet d'évaluer la flexion du pilier quand une force est appliquée sur une surface de 2.83 μm^2 situé à l'extrémité du pilier. La force appliquée est identique dans les trois cas et vaut 2.8 nN, le tableau illustre la méthode employée et la flexion de l'extrémité du pilier obtenue.

2.3. Analyse de la flexion des piliers due aux forces mécaniques des macrophages en migration confinée

Pour pouvoir calculer les forces cellulaires, il faut filmer les cellules en train de migrer dans les canaux et quantifier les mouvements des piliers. Les paragraphes suivants expliquent comment les images sont acquises et comment le traitement d'image est réalisé pour évaluer l'amplitude des forces cellulaires, leurs orientations et leurs localisations.

La figure ci-dessous reprend le traitement d'images appliqué à la totalité des séquences sélectionnées pour l'analyse. Des références seront faites à cette figure tout au long de cette partie.

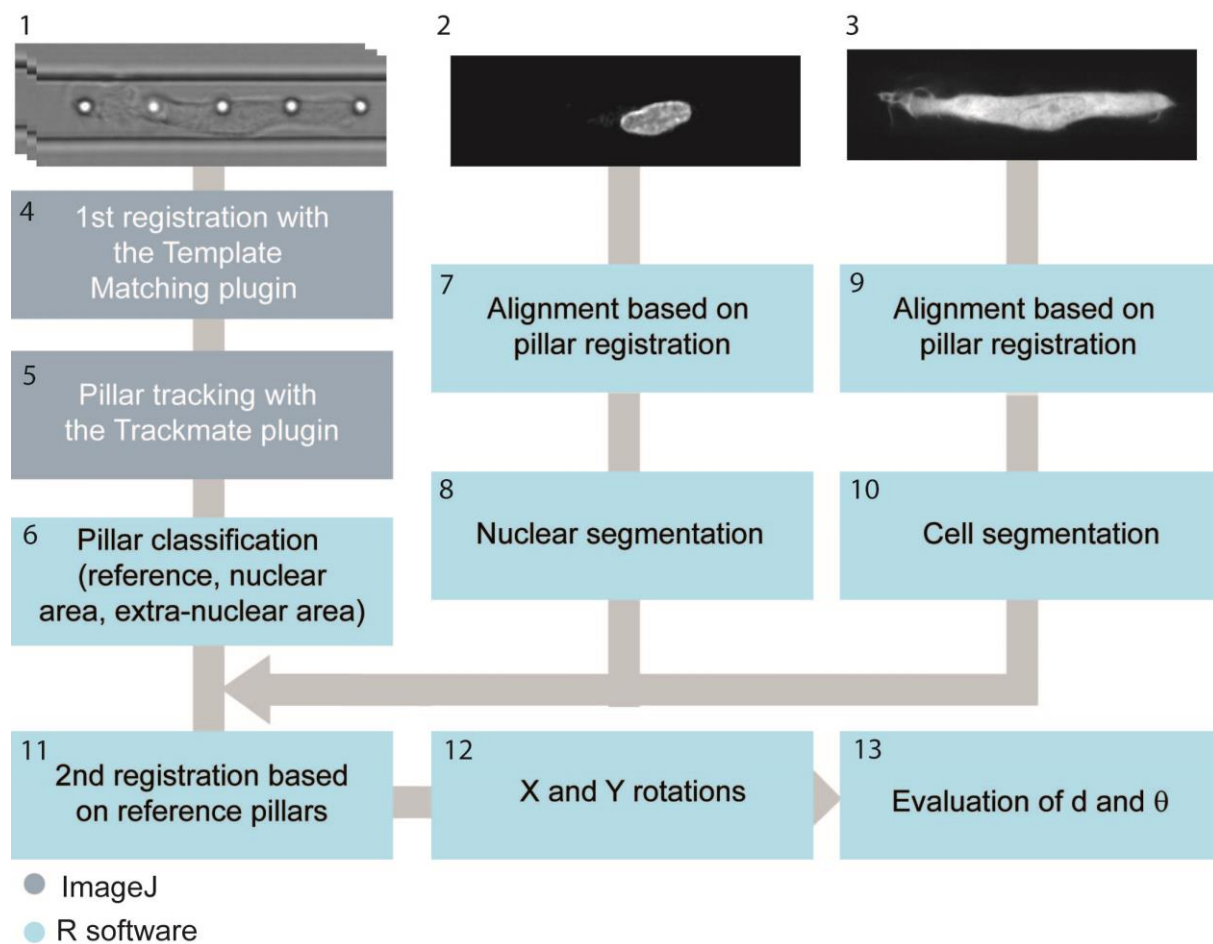


Figure 10 : Diagramme du traitement d'images. (1-3) Exemple d'images brutes des canaux et des piliers en lumière blanche (1), des images brutes des noyaux (2) et du cytoplasme (3) en fluorescence. (4) Recalage des images du canal et des piliers. (5) Suivi des piliers (6), identification des piliers selon leur position par rapport à la cellule. (7,9) Les translations faites sur les images en lumière blanche sont appliquées aux images du noyau et du cytoplasme. (8,10) Segmentation des noyaux et des cellules (11) Second recalage des images basé sur les piliers qui ne sont pas en contact avec des cellules. (12) Application d'une rotation de 180° à certains piliers selon leur localisation. (13) Évaluation de l'amplitude (d) des flexions et de leur orientation (θ).

2.3.1. Acquisition des images

Les macrophages migrant dans les canaux sont imagés après 48 heures d'incubation dans le micro dispositif. L'acquisition se fait à l'aide d'un microscope inversé confocal équipé d'un objectif x60 à immersion. Les cellules sont préalablement marquées par un « Cell Tracker » qui permet de suivre le cytoplasme de la cellule. Le noyau est également marqué au Hoechst.

Une seule image en fluorescence du cytoplasme (bloc 3 de la figure 10) et une seule image du noyau (bloc 2 de la figure 10) sont acquises à une position z donnée. L'acquisition d'une seule image en fluorescence du cytoplasme et du noyau permet de limiter la photo toxicité sur la cellule. Une image tous les μm sur l'axe z (bloc 1 de la figure 10) est acquise en lumière blanche autour d'une position donnée pour suivre les piliers. L'opération est répétée toutes les 2 minutes pendant au moins 1 heure. Après quoi un détergent (SDS 0.5%) est utilisé pour lyser la cellule. Une dernière acquisition est faite pour connaître la position exacte des piliers sans contrainte exercée dessus.

2.3.2. Recalage des images

Les séquences d'images réalisées en lumière blanche permettent de suivre le mouvement des piliers. La séquence d'images pour laquelle on obtient le meilleur focus pour l'extrémité libre des piliers est utilisée pour les suivre au cours du temps. Dans un premier temps un recalage des images est réalisé à l'aide du Plugin « Template Matching » du logiciel ImageJ, bloc 4 de la figure 10. Les translations en X et Y réalisées sur ces images pour les recaler sont sauvegardées pour être appliquées aux images fluorescentes du noyau et du cytoplasme de la cellule, blocs 7 et 9 de la figure 10.

2.3.3. Segmentation des images de fluorescence

Pour connaître la position du macrophage dans les canaux, les images représentant le cytoplasme de la cellule sont utilisées. Elles sont dans un premier temps segmentées sous imageJ, bloc 9 de la figure 10. Les pixels représentant le cytoplasme sont passés à 1 alors que les autres sont passés à 0. Les coordonnées des 4 pixels se situant aux extrémités (x négatif, x positif, y négatif et positif, indiqué par des points orange sur la figure 11) sont alors enregistrées pour chaque image. Le carré, en jaune sur la figure 11, passant par chaque point permet de délimiter la zone où le cytoplasme de la cellule se trouve sur chacune des images.

Le même principe est appliqué au noyau, bloc 8 de la figure 10, les quatre points sont représentés cette fois-ci en violet sur la figure 11 et le carré bleu représente la zone nucléaire. De plus, pour le noyau, la moyenne des coordonnées des pixels le représentant est calculée pour déterminer les coordonnées du centre de masse du noyau au cours du temps, représenté par l'étoile bleue sur la figure 11. Ces coordonnées du centre de masse sont utilisées pour calculer la vitesse instantanée de la cellule, c'est-à-dire la vitesse de la cellule entre deux images consécutives acquises.

Un algorithme codé avec le langage de programmation R a permis d'extraire ces données et de les conserver dans des fichiers afin d'être utilisé par la suite pour classifier les piliers selon leur position par rapport à la cellule.



Figure 11 : Segmentation de la zone cellulaire et nucléaire. Les quatre pixels représentant les quatre extrémités de la cellule (pixel avec le plus grand x, le plus petit x, le plus grand y et le plus petit y) représentées par les points orange permettent de délimiter la zone cellulaire qui est le rectangle jaune passant par ces quatre points. Les quatre points bleus représentent les quatre extrémités du noyau et permettent de délimiter la zone nucléaire, c'est-à-dire

2.3.4. Suivi des piliers

Le plugin « Trackmate » d'ImageJ est utilisé pour suivre l'extrémité libre des piliers, bloc 5 de la figure 10, le détecteur « Laplacian of Gaussian » a été utilisé. Il segmente les images avec une estimation des « blobs » de 10 pixels. Les coordonnées de chaque pilier au cours du temps sont conservées dans un fichier.

2.3.5. Classification des piliers

Un algorithme codé avec le langage de programmation R permet d'exploiter les données extraites à l'étape précédente. Il classifie dans un premier temps les piliers selon ces différents critères, bloc 6 de la figure 10 :

- Pilier dans un canal traité au PEG-g-PLL ou à la fibronectine
- Pilier dans un canal de 6 ou 12 μm de large
- Pilier dans la zone nucléaire, dans la zone extra nucléaire ou dans la zone extra cellulaire

Ces critères permettent donc d'établir 8 groupes de piliers :

Tableau 2 : Description des 8 groupes de piliers selon les conditions d'expérimentation (largeur du canal, traitement de surface et de la position des piliers par rapport à la cellule).

	Gpe 1	Gpe 2	Gpe 3	Gpe 4	Gpe 5	Gpe 6	Gpe 7	Gpe 8
Traitement de surface	Fibro	Fibro	Fibro	Fibro	PEG	PEG	PEG	PEG
Largeur du canal	12 μm	12 μm	6 μm	6 μm	12 μm	12 μm	6 μm	6 μm
Zone cellulaire	Zone nucléaire	Zone Extra nucléaire	Zone nucléaire	Zone Extra nucléaire	Zone nucléaire	Zone Extra nucléaire	Zone nucléaire	Zone Extra nucléaire

Un neuvième groupe de pilier est à ajouter à ceux décrits ci-dessus : celui des piliers qui ne sont pas en contact avec les cellules qu'importe la largeur du canal et le traitement de surface réalisé.

2.3.6. Recalage des piliers

La détection des mouvements de ces piliers témoins par le plugin « Trackmate » d'ImageJ correspond à du bruit. Pour s'affranchir de ce bruit, pour chaque vidéo, les déplacements mesurés qui correspondent en réalité au mouvement de l'image n+1 par rapport à l'image n des piliers du groupe 9 entre deux images consécutives sont moyennés. Puis le déplacement moyen (δX_b , δY_b) est soustrait aux

coordonnées des piliers de l'image n+1. Ainsi un deuxième recalage est effectué seulement sur les piliers. Cette étape correspond au bloc 11 de la figure 10.

2.3.7. Zone nucléaire et extra nucléaire

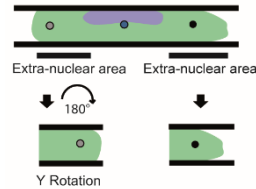


Figure 12 : Fusion des deux zones extra nucléaires. Afin de fusionner les piliers de la zone extra nucléaire se situant à gauche du noyau à celle de droite, une rotation de 180° est appliquée. Cela permet par la suite d'observer la direction des forces appliquées par les cellules dans les zones extra nucléaires indépendamment de leur situation en aval ou en amont de la cellule.

Quand une cellule migre dans un canal équipé de micro piliers le noyau se trouve en général au centre de la cellule. Deux zones extra nucléaires existent alors : une à droite du noyau et une à gauche, comme indiqué sur la figure 12. Pour réunir ces deux zones, les piliers qui sont à gauche du noyau subissent une rotation de 180°, nommée « Y rotation » sur la figure 12. Les données issues de ces piliers sont fusionnées avec ceux issus de la zone extra cellulaire à droite du noyau. Cette étape correspond au bloc 12 de la figure 10.

D'autre part, le noyau passe d'un côté ou de l'autre du pilier pour avancer dans le canal. Afin de pouvoir corrélérer l'orientation de la force appliquée par la cellule par rapport à son noyau, quand le centre de masse du noyau est au-dessus du pilier sur l'image une rotation de 180° est appliquée aux piliers se trouvant dans la zone. Cette rotation est nommée « rotation X » comme indiqué sur la figure 13. Cette étape correspond au bloc 12 de la figure 10.

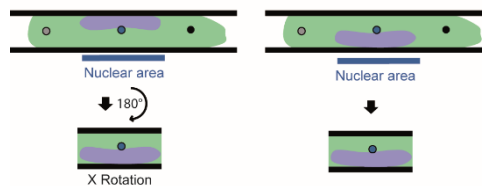


Figure 13 : Rotation des piliers dans la zone nucléaire. À gauche, le noyau passe au-dessus du pilier, dans ce cas une rotation de 180° est appliquée aux piliers se trouvant dans la zone nucléaire. À droite, le noyau passe en dessous du pilier, aucune rotation n'est appliquée.

2.3.8. Évaluation de l'orientation et de l'amplitude des forces

Les piliers sont donc maintenant classifiés selon les conditions d'expérimentation et selon leur position par rapport à la cellule. Il reste à déterminer l'amplitude de la flexion et son orientation.

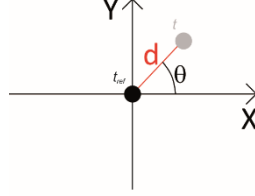


Figure 14 : Référentiel d'un pilier. L'axe x est aligné sur l'axe du canal. La position du pilier non soumis à des contraintes est la position de référence (t_{ref}). La position du pilier à un temps t est représentée par le point gris. La distance séparant cette position à la position de référence est d et la direction du mouvement est caractérisée par l'angle θ .

Pour chaque pilier est défini un référentiel, comme indiqué sur la figure 12. L'axe X est défini comme étant parallèle à l'axe du canal et l'axe Y perpendiculaire à l'axe X. Le centre du référentiel est positionné sur la position du pilier quand celui ne subit aucune contrainte. Cette position de référence du pilier est définie par les coordonnées de ce pilier sur la dernière image acquise (après lyse cellulaire). Cette image correspond à la position du pilier quand il n'est pas contraint. Si le pilier, au cours de la vidéo s'est retrouvé dans la zone extra cellulaire, alors la position référence est la moyenne de toutes les coordonnées des positions obtenues lorsque le pilier se trouvait dans cette zone plus la dernière image acquise. Pour calculer l'amplitude de flexion, définie comme d sur la figure 14, l'équation suivante est utilisée :

$$d_t = \sqrt{(X_t - X_{ref})^2 + (Y_t - Y_{ref})^2}$$

L'angle entre l'axe du canal et la direction du mouvement appelé θ , représenté sur la figure 14, est évalué de la manière suivante :

$$\theta = \tan^{-1}\left(\frac{y}{x}\right) * \frac{180}{\pi} + 180, \quad x < 0$$

$$\theta = \tan^{-1}\left(\frac{y}{x}\right) * \frac{180}{\pi}, \quad x > 0, \quad y > 0$$

$$\theta = \tan^{-1}\left(\frac{y}{x}\right) * \frac{180}{\pi} + 360, \quad x > 0, \quad y < 0$$

Avec $x = X - X_{ref}$ et $y = Y - Y_{ref}$

Cet angle permet d'évaluer la direction des forces exercées par la cellule.

2.3.9. Limite de détection

Afin de distinguer un fléchissement réel du pilier distinct du bruit, une limite de détection des mouvements est établie avec les piliers du groupe 9 décrits précédemment. L'écart type du bruit mesuré à l'aide de ces piliers est de 11 nm. Nous considérons donc que toutes les valeurs d supérieures à 11 nm sont significatives et indiquent la présence d'une force cellulaire.

2.4. Résultats : Migration des macrophages dans les canaux équipés de piliers

Dans un premier temps, un résumé du protocole mis en place pour étudier les macrophages migrant dans les canaux est expliqué. La migration des macrophages dans des canaux équipés ou non de piliers est un premier résultat qui sera décrit dans la deuxième partie de ce chapitre. Il y sera notamment décrit les différentes dynamiques de migration qui ont été observées. Puis des caractérisations de cellules fixées dans les canaux pour valider le confinement plus ou moins important seront décrites. Finalement, les amplitudes et orientations des forces exercées par les cellules pendant leur migration seront exposées et interprétées.

2.4.1. Mise en place de l'expérience

Après avoir terminé la fabrication des dispositifs au LAAS, ces derniers sont stockés dans une solution de PBS comme décrit dans la partie 1.1. Les dispositifs sont alors déplacés à l'IPBS où les expériences avec les macrophages ont lieu. Un traitement de surface est réalisé sur les canaux pour promouvoir ou inhiber l'adhérence de la cellule. Pour ce faire, la fibronectine est utilisée pour promouvoir cette adhérence et le PEG-g-PLL est utilisé pour l'inhiber. Les molécules sont incubées pendant une heure à température ambiante dans les dispositifs. Puis trois lavages sont réalisés au PBS et un dernier avec du milieu de culture. En parallèle, les monocytes sont isolés du sang de patients sains et différenciés en macrophages pendant 7 jours. Puis le cytoplasme est marqué avec un « Cell Tracker » et le noyau du macrophage au Hoechst. Les macrophages sont décollés des lamelles de verre, centrifugés et suspendus dans un milieu de culture à la concentration de 10^5 cellules/mL. 10 μ L de cette solution est injectée dans chacun des réservoirs des dispositifs qui sont alors incubés pendant 1 heure à 37°C, sous 5% de CO₂. Cela permet de laisser du temps aux macrophages pour qu'ils adhèrent à la lamelle de verre. Puis les dispositifs sont immergés dans du milieu de culture. Après 48 heures de culture, les macrophages migrant dans les canaux sont imagés avec un confocal « Spinning disk ». Ce dernier est équipé d'un objectif 60x à immersion. Le microscope est également équipé d'une étuve permettant d'incuber les cellules à 37°C sous 5% de CO₂ pendant l'imagerie.

2.4.2. Observation de la migration des macrophages dans des canaux équipés ou non de piliers

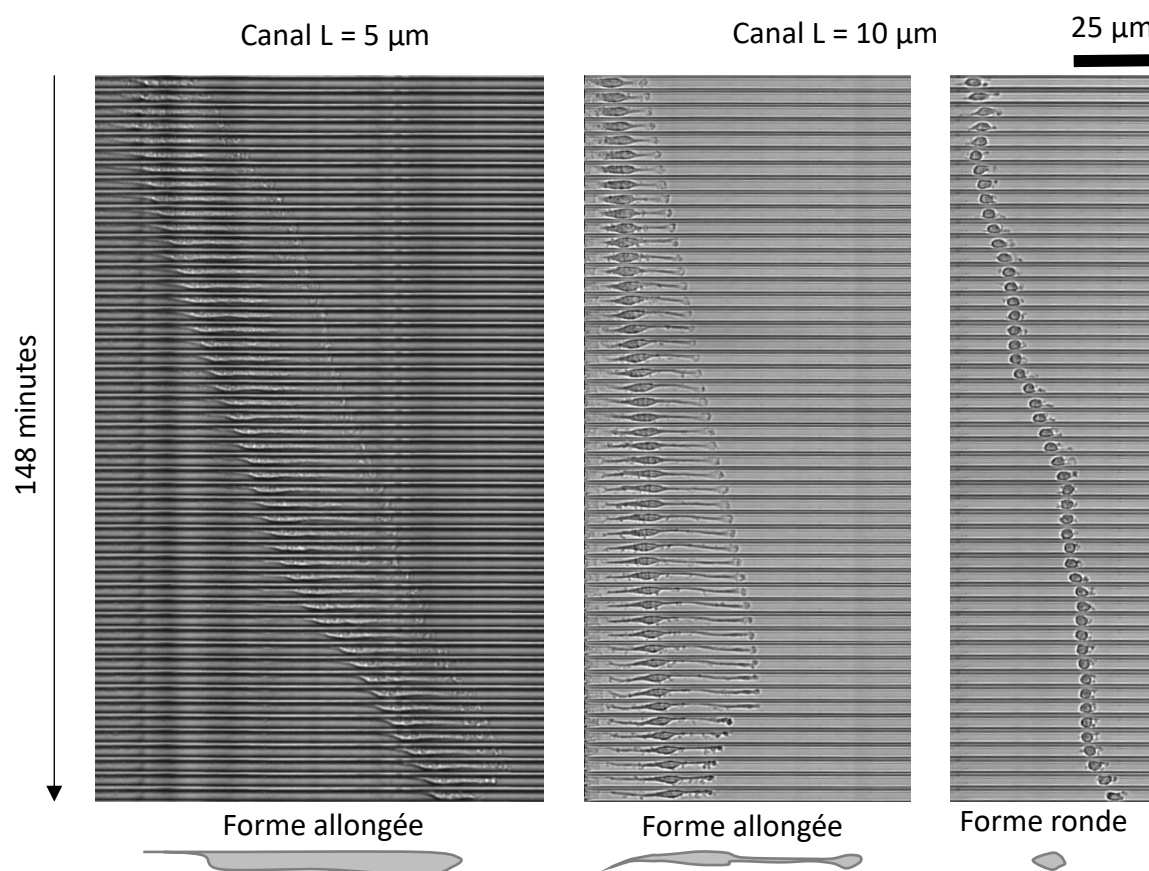


Figure 15 : Kymographes : séquences d'images acquises toutes les 2 minutes des cellules migrant dans des canaux.. A gauche, un macrophage migrant avec une forme allongée dans un canal de section $5 \times 10 \mu\text{m}^2$. Sur le panel du centre, un macrophage migre dans un canal de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. Sur le panel de droite, on observe la migration d'un macrophage dans un canal de section $10 \times 10 \mu\text{m}^2$, le macrophage utilise une forme ronde.

La première expérience réalisée avait pour but de faire migrer des macrophages dans des microcanaux non équipés de piliers. Les canaux étudiés avaient une section de $5 \times 10 \mu\text{m}^2$ et $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. Cette expérience a permis de vérifier que les macrophages humains ont la capacité de migrer dans des espaces confinés tels que nos microcanaux.

La figure 15 ci-dessus montre trois macrophages représentatifs en train de migrer dans des microcanaux pendant 148 minutes. Le premier macrophage, sur le panel de gauche, migre avec une forme allongée, comme schématisée en dessous de la séquence d'images, dans un canal de $5 \mu\text{m}$ de large. Sur le panel du milieu, on observe un macrophage en train de migrer dans un canal de $10 \mu\text{m}$ de large, il a également une forme allongée. On peut observer que ce macrophage s'allonge de plus en plus

pour explorer le canal. Enfin, sur le panel de droite, le macrophage a une forme ronde, comme schématisé sous la séquence d'images.

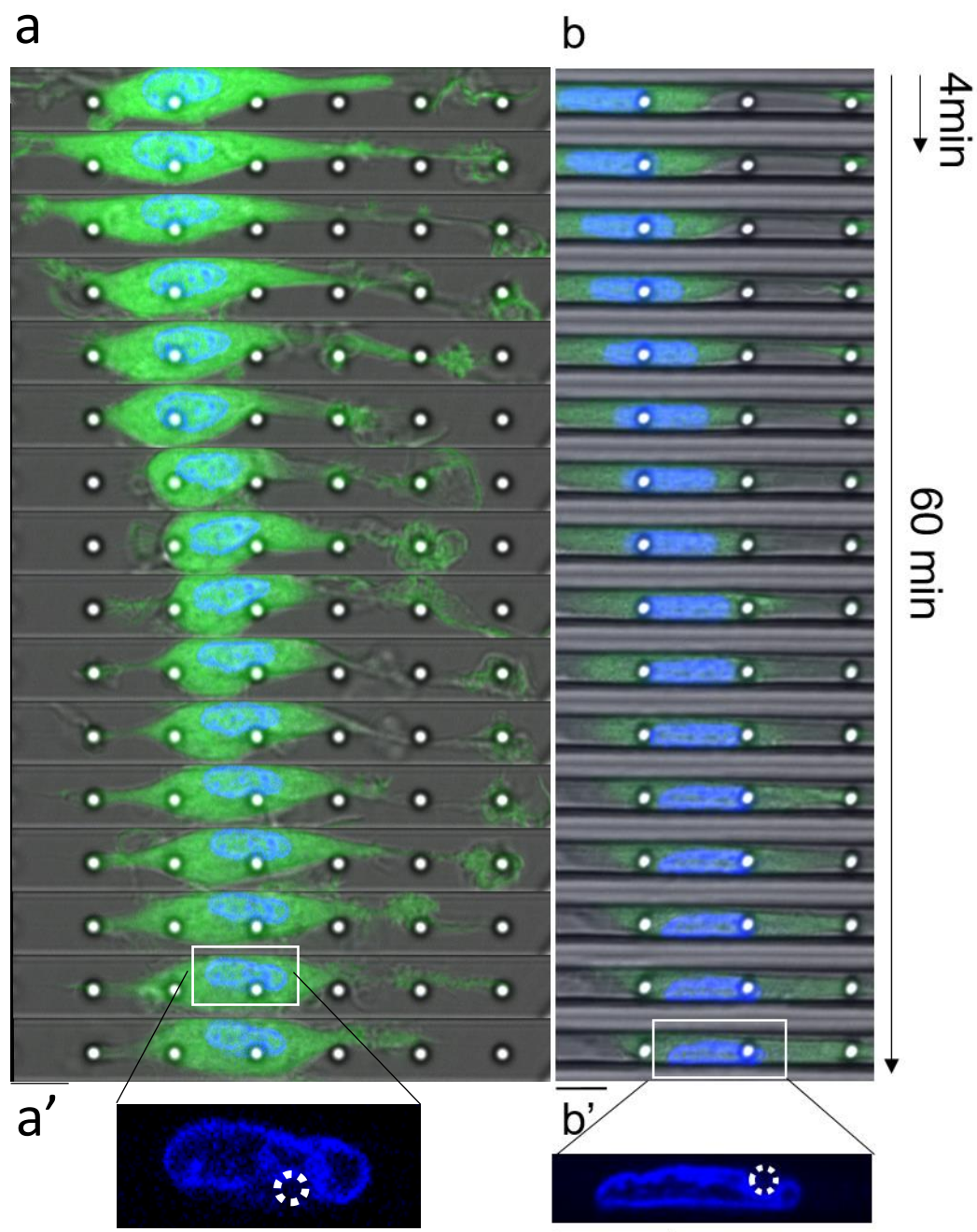


Figure 16 : Kymographes de macrophages migrants dans des canaux équipés de piliers. Le cytoplasme des macrophages est marqué par un « cell tracker » vert et le noyau des cellules est marqué au Hoechst en bleu. Les macrophages migrent dans un canal de (a) 12x10 μm² ou de (b) 6x10 μm². (a' et b') Zooms sur les noyaux des macrophages qui sont déformés au cours de la migration. (a, a' et b') Echelle 10 μm. (b) Echelle 5 μm.

Les macrophages sont donc capables de migrer dans des canaux de sections 10μm x 10μm et 5μm x 10μm. On observe deux comportements : soit le macrophage opte pour une forme allongée, soit il opte

pour une forme ronde. Les vitesses de migration de ces macrophages sont du même ordre de grandeur que celles observables dans des gels ou des matrices⁶.

Les expériences suivantes ont consisté à intégrer des piliers au centre des canaux pour mesurer les forces cellulaires. Les marquages du cytoplasme et des noyaux ont permis également de voir évoluer ces deux éléments au cours de la migration. Sur la figure 16 ci-dessus, sur le panel de gauche, nous pouvons observer un macrophage, migrant dans un canal de 12 μm de large équipé de piliers. Sur le panel de droite, on observe un macrophage migrant dans un canal de 6 μm de large équipé de piliers. On peut donc conclure que la création de piliers au centre des canaux n'a pas empêché la migration des macrophages.

Nous avons alors pu mesurer la vitesse de migration des macrophages, en nous basant sur le déplacement de leur noyau comme indiqué dans la partie 2.3.3. La vitesse de migration, sur l'ensemble des macrophages étudiés, est de 12 $\mu\text{m}/\text{h}$ pour les canaux de 12 μm de large et de 10 $\mu\text{m}/\text{h}$ dans les canaux de 6 μm . Ces vitesses ne sont pas significativement différentes l'une de l'autre. À noter qu'aucun chimio attractant n'a été utilisé pour attirer la cellule dans les canaux et les faire migrer dans une direction donnée.

Ces expériences suggèrent également que les macrophages sont confinés dans les canaux et donc touchent tous les flancs des canaux. En effet, la déformation des noyaux que l'on peut observer sur les figures 16a et b suggère que le noyau lui-même est confiné. De plus le cytoplasme de la cellule est observable sur toute la largeur du canal à certains endroits. Pour valider cette hypothèse, une fixation des cellules après 24 heures de migration a été réalisée. Puis des images par microscopie électronique à balayage et par microscopie de fluorescence ont été acquises d'une part pour vérifier que les cellules font des contacts avec les piliers et de l'autre que les macrophages sont en contact avec toutes les parois du canal.

2.4.3. Observation des macrophages fixés dans les canaux au microscope électronique à balayage

Afin d'observer les macrophages au microscope électronique à balayage, les canaux en PDMS ne sont pas collés à la lamelle de verre de façon irréversible. Pour ce faire, les canaux en PDMS ne sont pas passés au plasma O_2 , mais simplement déposés sur la lamelle de verre. Par des interactions de Van Der Waals, ils vont s'attacher l'un à l'autre.

⁶ Van Goethem, E et al. (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages : differential involvement of proteases and podosome-like structures. *Journal of Immunology*. **184**, 1049-1061

Après 24 heures de culture dans les canaux, les macrophages sont fixés avec une solution de glutaraldéhyde pendant leur migration. Les canaux en PDMS sont décollés de la lamelle de verre. Les deux parties sont ensuite déshydratées par des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes (25%, 50%, 75% puis 100), puis séchées à l'air libre.

Sur la figure 17 ci-dessous, des images réalisées par microscopie électronique à balayage de ces macrophages fixés dans les canaux sont présentées. On peut voir que les macrophages, teintés en vert, sont étendus de part et d'autre du canal, touchant la paroi de gauche et de droite et font des contacts avec les piliers. En effet, ces contacts partent de l'extrémité libre des piliers et remontent parfois le long de ces derniers.

Sur certaines images, comme la Figure 17b, on peut également voir que le macrophage touche le plafond du canal. Cependant, la seule présence du macrophage empêche, la plupart du temps, de voir sur quelle distance ils touchent la paroi supérieure. Une observation en 3D par immunofluorescence a permis de montrer que les macrophages s'étendaient de la lamelle de verre à la paroi supérieure du canal dans les canaux de 12 et 6 μm de large.

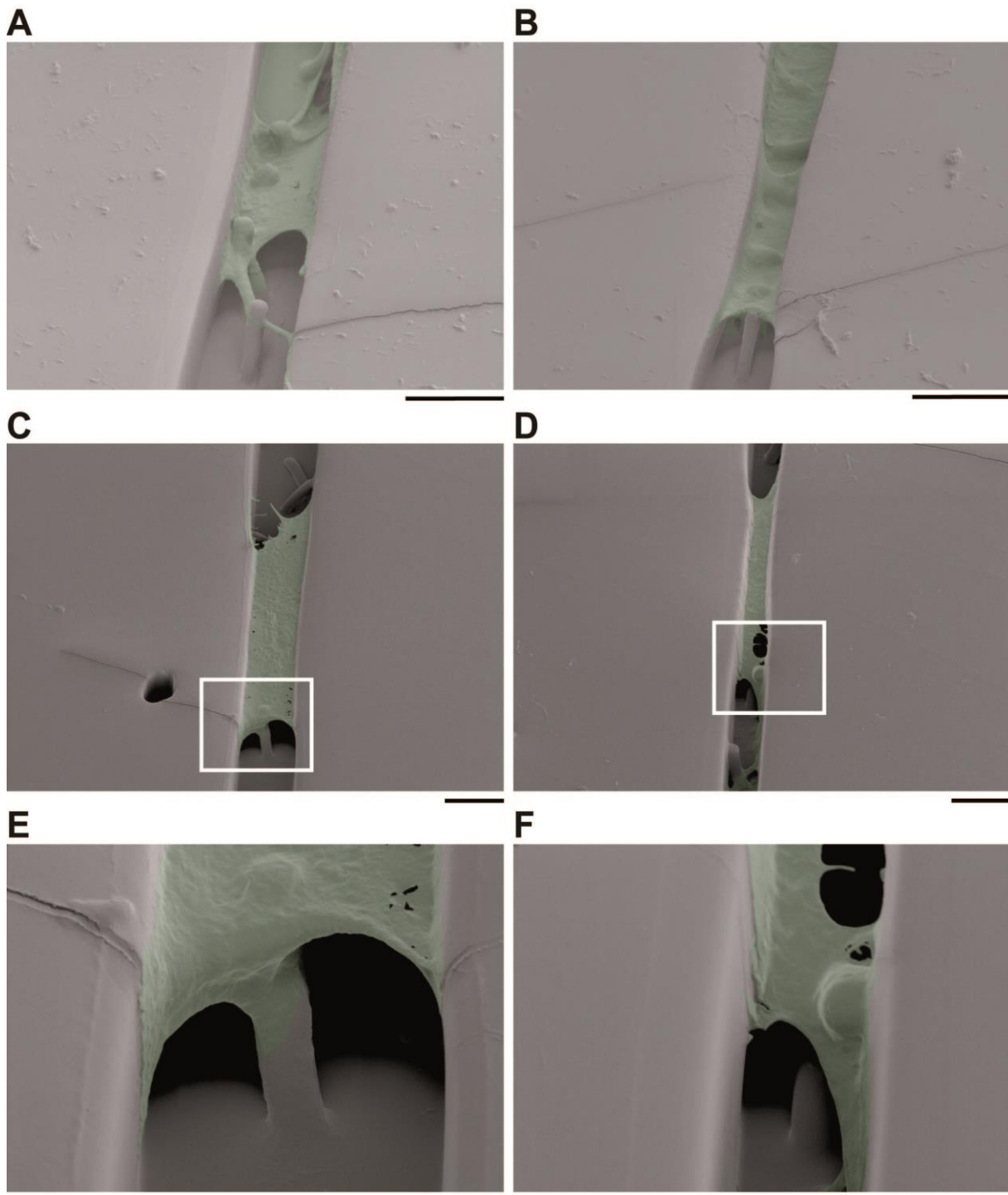


Figure 17 : Images par microscopie électronique à balayage de macrophages fixés lors de leur migration dans les canaux équipés de piliers après 48 heures de culture. Les macrophages ont été colorés en vert à l'aide du logiciel Photoshop. (A & C) Le canal fait 12 µm de large. (B & D) Le canal fait 6 µm de large. Barre d'échelle 12 µm. (E) Zoom sur le pilier de la figure (C). (F) Zoom sur le pilier de la figure (D). Barre d'échelle 2 µm.

2.4.4. Observation des macrophages par immunofluorescence en 3D

Afin de vérifier le confinement des macrophages dans les canaux, ces derniers ont été marqués par immunofluorescence après fixation pendant leur migration. L'actine filamenteuse et la vinculine sont marquées à l'aide de la phalloïdine pour le premier et d'anticorps de souris primaire anti-vinculine pour le second. Enfin, un anticorps secondaire fluorescent anti-souris est utilisé pour se fixer sur l'anticorps primaire. Les noyaux sont marqués aux Hoechst.

La figure 18 montre le type de résultat obtenu. Sur la figure 18a, on observe un macrophage migrant dans un canal de 12 μm de large, tandis que sur la figure 18b, on observe un macrophage migrant dans un canal de 6 μm de large. Dans les deux cas, on peut observer une vue de dessus des piliers, puis une vue latérale et enfin une vue normale à l'axe du canal, ainsi que des schémas explicatifs, aidant à la compréhension des images de fluorescence.

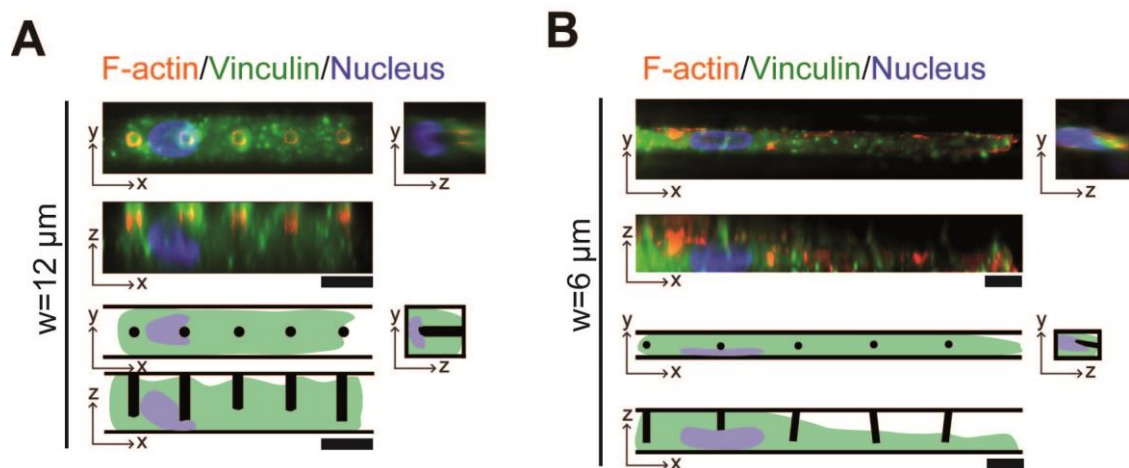


Figure 18 : Marquage par immunofluorescence des macrophages fixés dans un canal de 12 μm de large (a) et de 6 μm de large (b). L'actine est marquée en rouge, la vinculine en vert et le noyau en bleu. Des schémas ont été réalisés pour aider à la compréhension. Barre d'échelle 10 μm .

Pour le premier macrophage, voir figure 18a, on observe que l'actine filamenteuse est concentrée autour des piliers, plutôt sur l'extrémité encastree. La vinculine, en verte est uniformément répartie sur l'ensemble du cytoplasme. Le noyau ayant épousé la forme du pilier semble s'orienter vers le bas pour passer en dessous du pilier. On peut également observer une répartition uniforme de la vinculine dans le cytoplasme de la cellule migrant dans un canal de 6 μm de large, voir figure 18b. Cependant, l'actine filamenteuse est concentrée cette fois-ci sur le contour de la cellule au niveau de la membrane. Nous voyons également que la cellule dans le canal de 6 μm , est répartie de haut en bas au niveau de son noyau, mais pas au niveau de son extrémité qui s'étend sur la lamelle de verre. Dans ce canal, la cellule semble passer sur le côté du pilier et non en dessous.

Les résultats obtenus par marquage en immunofluorescence appuient ceux obtenus par observation par microscopie électronique à balayage. Les macrophages migrant dans les canaux de 12

et 6 μm touchent toutes les parois des canaux et établissent des contacts avec les piliers. Seules les extrémités des macrophages, nommés protrusions, qui sont suffisamment fines pour ne toucher qu'une partie des piliers n'occupent pas tout l'espace dans le canal.

Une façon d'évaluer le degré de confinement de la cellule consiste à observer la morphologie du noyau, dans les canaux et de la comparer à celle observée sur une surface 2D.

2.4.5. Les noyaux des macrophages

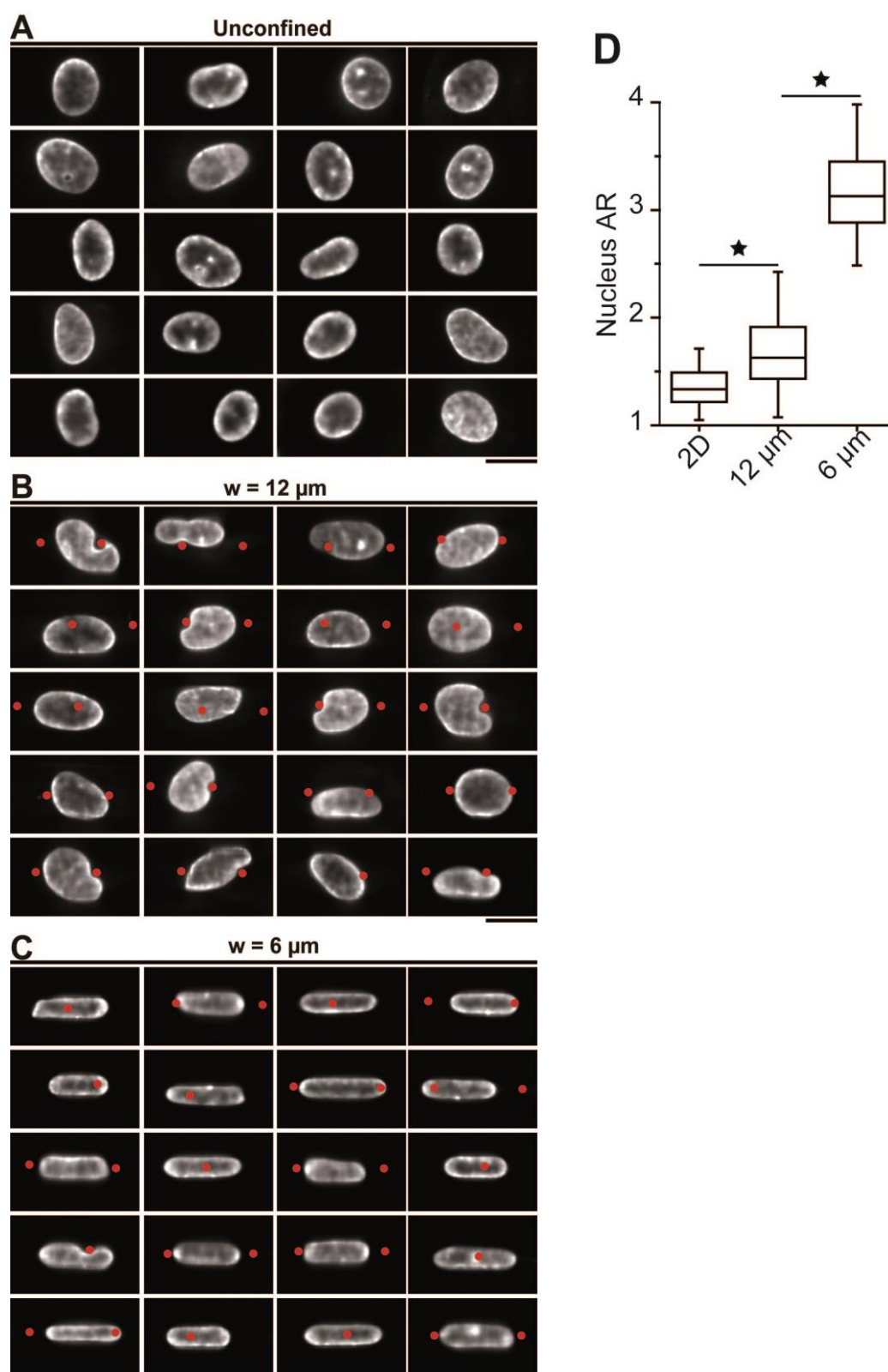


Figure 19 : Morphologie des noyaux des macrophages par marquage au Hoechst. (A) Les macrophages évoluent sur une lamelle de verre. (B) Les macrophages migrent dans des canaux de 12 μm de large équipés de piliers. (C) Les macrophages migrent dans des canaux de 6 μm de large équipés de piliers. Les points rouges permettent de situer les piliers des canaux. La barre d'échelle est de 10 μm . (D) Facteur de forme des noyaux défini par le rapport du grand axe de l'ellipse ajusté sur le noyau divisé par son petit axe. Test statistiques utilisé Wilcoxon-Mann-Whitney.

Afin d'évaluer l'influence du confinement sur les macrophages par les canaux et les piliers, un marquage fluorescent a été réalisé au Hoechst sur des noyaux après 48 heures de culture sur une lamelle de verre, dans les canaux de 12 μm de large et de 6 μm de large. Une acquisition de haute résolution a été réalisée sur l'axe z (une image tous les 250 nm) à l'aide d'un objectif 60X monté sur un microscope Eclipse Nikon Ti-E. Les images sont ensuite déconvoluées avec le logiciel Huygens Professional version 16.10. La morphologie des macrophages a été étudiée en projetant les maximums d'intensité des coupes transverses réparties sur l'axe z. Une galerie de ces noyaux est montrée sur la figure 19. Les noyaux des macrophages ayant migré sur une lamelle de verre sont montrés sur la figure 19a. Sur la figure 19b et 19c, les noyaux des macrophages ayant migrés dans les canaux de 12 μm et de 6 μm de large, respectivement sont montrés. Puis à l'aide de la fonction « Shape Descriptor » le facteur de forme des noyaux est mesuré en divisant le grand axe de l'ellipsoïde ajusté sur le noyau par le petit axe de cette dernière. Ainsi, plus le ratio est proche de 1, plus la forme du noyau est ronde, plus le ratio est supérieur à 1 plus le noyau est allongé. 47, 62 et 27 noyaux de macrophages migrant respectivement en 2D, dans des canaux de 12 μm et de 6 μm de large ont été utilisés pour réaliser les mesures.

Les résultats de cette analyse sont présentés sur la figure 19d. On constate que les macrophages migrant sur une surface 2D ont en moyenne un ratio de 1.38 et que les ratios des deux autres populations sont significativement plus importants. En effet, le ratio des noyaux des macrophages migrant dans des canaux de 12 μm est de 1.8, alors que celui migrant dans les canaux de 6 μm de large est de 3.2. La différence de facteur de forme entre les deux dimensions de canaux est significative.

Cette analyse démontre que le confinement des canaux équipés de piliers a une influence sur la morphologie du noyau et suggère que le confinement spatial a un impact sur l'organisation du cytosquelette de la cellule et probablement sur les mécanismes de migration.

2.5. Forces appliquées par les macrophages pour fléchir les piliers




		Donneur 1	Donneur 2	Donneur 3
				
Traitement de surface	Largeur du canal	Nombre de cellules	Nombre de cellules	Nombre de cellules
Fibronectine	6µm	2	2	4
Fibronectine	12µm	3	2	3
PEG-G-PLL	6µm	2	2	5
PEG-G-PLL	12µm	1	2	3
	Total	8	8	15

Figure 20 : Tableau du nombre de cellules par conditions (donneur, traitement de surface, largeur du canal).

L'analyse des forces cellulaires a été obtenue à l'aide de trois séries d'expériences. Pour chacune de ces expériences, des macrophages humains provenant de trois donneurs sains ont été utilisés. Le nombre de cellules utilisées par expérience est donné dans la figure 20. Au total, 31 cellules de 3 donneurs ont été utilisées.

2.5.1. Amplitude de la flexion

Le traitement d'images, décrit dans la partie 2.1, a permis de suivre le mouvement des piliers au cours du temps. La figure 21 permet de visualiser l'amplitude de la flexion de 6 piliers confrontés à des cellules, trois étant dans un canal de 12 µm de large et les trois autres dans un canal de 6 µm de large. Ces canaux ont été traités avec de la fibronectine pour favoriser l'adhérence de la cellule. La flexion du pilier est due à une force appliquée par la cellule sur ce pilier. En supposant que cette force est appliquée à l'extrémité du pilier et en appliquant la loi d'Euler-Bernoulli^{7,8}, il est possible de convertir cette amplitude de flexion en amplitude de force appliquée par la cellule. Cette conversion est réalisée et indiquée sur les graphiques, à gauche l'échelle indique le déplacement des piliers en µm et à droite est indiquée la force correspondante appliquée par la cellule à l'extrémité libre du pilier.

⁷ Sniadecki, NJ and Chen, CS et al. (2007). Microfabricated silicone elastomeric post arrays for measuring traction forces of adherent cells. *Methods in cell biology*. **83**, 313-328.

⁸ Cheng, S et al. (2010). Note: Mechanical study of micromachined polydimethylsiloxane "elastic" microposts, *Review of scientific instruments*. **81**, 106104

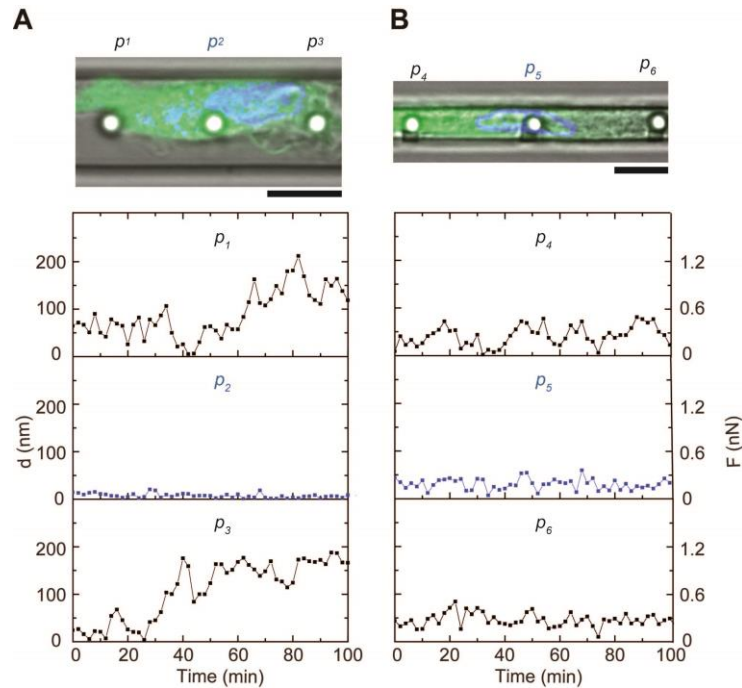


Figure 21 : Dynamique des forces au cours de la migration cellulaire dans un canal de (A) 12 μm et (B) 6 μm . Les piliers P_1 , P_3 , P_4 et P_6 sont dans la zone extra nucléaire. Les piliers P_2 et P_5 sont dans la zone nucléaire. Le déplacement est tracé au cours du temps et converti en force. (a) Échelle 10 μm . (b) Echelle 8 μm .

Les piliers P_1 et P_3 de la figure 21a, montrent des flexions allant jusqu'à 0.2 μm d'amplitude, et notamment pour le P_3 , cette amplitude est maintenue plus ou moins constante sur les dernières 60 minutes. Ces deux piliers se trouvent de part et d'autre du noyau. Le pilier P_2 lui se trouve au niveau du noyau tout le long de la durée du film. L'amplitude de mouvement de ce pilier est en moyenne de 7 nm soit en dessous de la limite de détection de mouvement établie dans la partie 2.3.9. La cellule force donc beaucoup plus sur les piliers à ses extrémités. Dans le canal de 6 μm de large, pour les piliers P_4 et P_6 on voit que les déplacements maximums sont en dessous de 0.1 μm contre 0.05 μm pour le pilier P_5 , on observe donc la même tendance que dans le canal de 12 μm de large.

Ces premiers résultats montrent que les cellules qui migrent dans des canaux de 12 et 6 μm de large sont capables d'appliquer des forces sur les piliers et ces forces sont suffisamment importantes pour générer des flexions observables. Des plus, ces résultats suggèrent que les forces appliquées dans la zone où se trouve le noyau sont plus faibles qu'aux extrémités de la cellule. Pour valider cette

hypothèse, une étude des forces appliquées dans ces deux zones (i) la zone nucléaire et (ii) et la zone extra nucléaire, est réalisée.

Forces appliquées par la cellule dans les zones nucléaire et extra-nucléaire

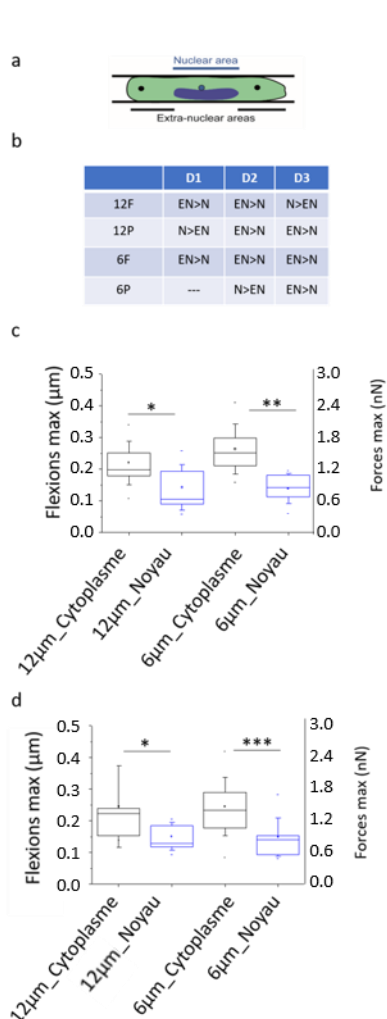


Figure 22 : Amplitudes des forces cellulaires selon leur emplacement. (A) Distinction de deux zones, la zone nucléaire et la zone extra nucléaire. (B) Utilisation du test Mann-Whitney pour tester l'hypothèse « les forces sont plus importantes quand elles sont localisées dans la zone extra nucléaire ». Lorsqu'il est indiqué « EN>N » l'hypothèse est acceptée quand il est marqué « N>EN », c'est l'hypothèse inverse qui est acceptée. (C & D) Forces maximales appliquées par les cellules selon la zone extra nucléaire et la zone nucléaire

Sur le schéma de la Figure 22a est représentée une vue de dessus d'une cellule migrant dans un canal équipé de micropiliers. La zone où se trouve le noyau est appelée zone nucléaire et les deux zones qui se trouvent à droite et à gauche du noyau forment la zone extra nucléaire. Les piliers sont classifiés selon leur zone d'appartenance, comme expliqué dans la partie 2.3.5. Pour chacun des donneurs, selon la taille des canaux et le traitement de surface fait au préalable, la distribution des amplitudes des piliers appartenant à la zone nucléaire est comparée à la distribution des piliers appartenant à la zone extra nucléaire. Pour chacune des conditions, le test statistique de Mann-Whitney a montré une différence significative. Ces résultats sont montrés dans le tableau de la figure 22b, dans 8 cas sur 11 les cellules ont plus forcé au niveau de la zone extra cellulaire.

Cette variabilité est présente au niveau des trois donneurs. Les trois cas où la cellule force plus dans la zone extra cellulaire sont répartis sur les trois donneurs. Pour le donneur 1, c'est quand la cellule migre dans un canal de 12 µm de large traité avec du PEG-g-PLL. Pour le donneur 2, c'est dans un canal de 6 µm de large traité au PEG-g-PLL également. Pour le troisième donneur, c'est dans le canal de 12 µm de large traité à la fibronectine.

Cette table montre que les macrophages ont tendance à forcer plus au niveau de leur extrémité. L'étude des flexions maximums des piliers par zones (extra nucléaire et nucléaire) confirme cette tendance. En effet, les graphes c et d de la figure 22, montrent les flexions maximales par zone selon si les canaux sont traités avec de la fibronectine (Fig. 22c) ou avec du PEG-g-PLL (Fig. 22d), et selon la taille des canaux. Ces deux graphes montrent bien que les maximums de flexion des piliers sont

observables dans la zone extra nucléaire et sont significativement supérieurs aux maximums des flexions des piliers se trouvant dans la zone nucléaire.

Note : Malheureusement, aucune flexion des piliers n'a été enregistrée pour les deux cellules du donneur 1 migrant dans les canaux de 6 μm de large et traités au PEG-g-PLL. Cela ne permet pas d'effectuer tous les tests pour le donneur 1. Dans ce cas le résultat est remplacé par «---».

Influence du traitement de surface sur l'amplitude de la flexion

	D1	D2	D3
12_Extra_Nucléaire	P>F	Pas de différence	F>P
12_Nucléaire	F>P	Pas de différence	F>P
6_Extra_Nucléaire	---	P>F	Pas de différence
6_Nucléaire	---	F>P	F>P

Figure 23 : Influence du traitement de surface sur l'amplitude des forces appliquées par les cellules.

Utilisation du test Mann-Whitney pour tester l'hypothèse « Les forces sont plus importantes quand le canal est traité avec de la fibronectine ». Si inscrit « F>P », l'hypothèse est acceptée, si inscrit « P>F », l'hypothèse inverse est acceptée. Si inscrit « Pas de différence », les deux hypothèses sont rejetées.

Dans le tableau de la figure 23 sont présentés les résultats des tests statistiques réalisés pour évaluer l'influence du traitement de surface des canaux sur les forces cellulaires.

Dans les canaux de 12 μm de large, nous voyons que pour le donneur 1, les forces appliquées par les macrophages sont plus importantes pour les canaux traités au PEG-g-PLL quand les piliers se trouvent dans la zone extra nucléaire. Pour les piliers se trouvant dans la zone nucléaire, la cellule force plus sur les piliers traités à la fibronectine. Pour le donneur 2, il n'y a pas de différence d'amplitude de force selon le traitement de surface dans les canaux de 12 μm de large. Pour le donneur 3, les forces sont supérieures dans les canaux traités avec la fibronectine indépendamment de la zone où se trouve le noyau.

Dans les canaux de 6 μm , seules les données obtenues pour les donneurs 2 et 3 nous permettent de faire les tests. Pour le donneur 2, les forces sont plus importantes quand les canaux sont traités au PEG-g-PLL dans les canaux de 12 μm de large et quand les piliers sont dans la zone extra nucléaire, sinon c'est l'inverse. Pour le donneur 3, il n'y pas de différence quand les piliers sont dans la zone extra nucléaire. Par contre pour la zone nucléaire, les cellules se trouvant dans les canaux traités à la fibronectine ont une amplitude de force plus importante que quand elles appliquent des forces dans les canaux traités au PEG-g-PLL.

Ces résultats sont très variables selon les donneurs et ne nous permettent pas de conclure de manière générale sur l'influence du traitement de surface sur les mécanismes de migration des macrophages.

Influence de la largeur du canal sur l'amplitude de la flexion

	D1	D2	D3
F_Extra_Nucléaire	6>12	6>12	12>6
P_Extra_Nucléaire	---	6>12	12>6
F_Nucléaire	6>12	Pas de différence	12>6
P_Nucléaire	---	6>12	Pas de différence

Figure 24 : Influence du confinement sur l'amplitude des forces. Le test de Mann-Whitney est utilisé pour tester l'hypothèse suivante « Les forces appliquées dans les canaux de 6 μm de large sont plus importantes que celles appliquées dans les canaux de 12 μm de large ». Quand il est marqué 6>12, l'hypothèse est acceptée, quand il est marqué 12>6 l'hypothèse inverse est acceptée, quand il est marqué « Pas de différence », les deux hypothèses sont rejetées.

Dans le tableau de la figure 24 sont référencés les résultats des tests statistiques réalisés pour évaluer l'influence du confinement des cellules sur les forces de migration.

D'après les donneurs 1 et 2, les macrophages migrant dans les canaux de 6 μm de large appliqueraient des forces plus importantes dans ces derniers que dans les canaux de 12 μm de large. D'après le donneur 3, les forces appliquées dans les canaux de 12 μm de large appliqueraient des forces plus importantes que dans les canaux de 6 μm de large.

Cette variabilité ne nous permet pas non plus de conclure sur l'influence du confinement sur l'amplitude des forces appliquées par les cellules. Des expériences avec des donneurs supplémentaires devront être réalisées.

Cependant, cette série d'expériences réalisées avec trois donneurs nous donne accès à d'autres informations intéressantes concernant l'orientation des forces appliquées.

2.5.2. Orientation des forces

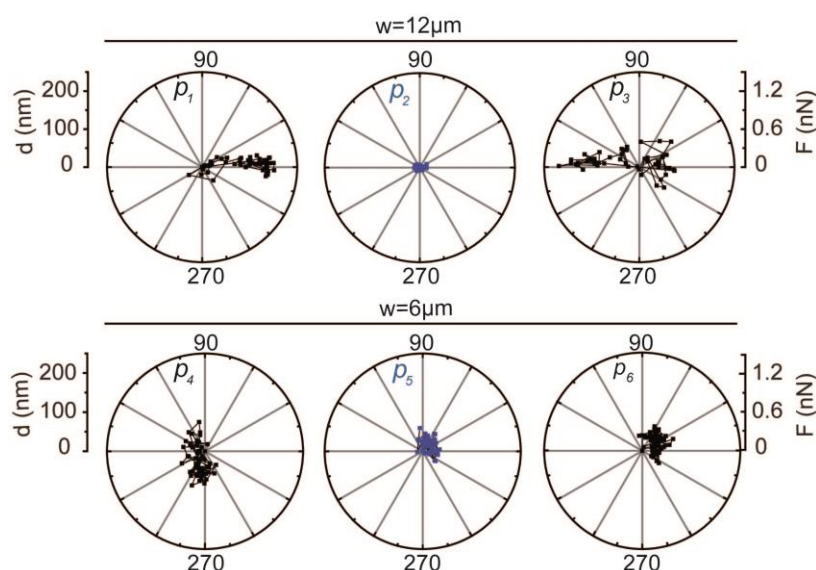


Figure 25 : Représentation polaire des déplacements des piliers (figure 22) en fonction de l'angle θ et du temps. En haut, les piliers P1, P2 et P3 sont soumis aux contraintes exercées par une cellule migrant dans un canal de $12\ \mu\text{m}$ de large. En bas, les piliers P4, P5 et P6 sont soumis à une cellule migrant dans un canal de $6\ \mu\text{m}$ de large. Les piliers P2 et P5 se trouvent dans les zones nucléaires, les piliers P1, P3, P4 et P6 dans les zones extra nucléaires.

L'orientation des flexions des piliers peut être aussi analysée et est accessible grâce aux traitements d'images réalisés et décrits dans la partie 2.3.8. Sur la figure 25 l'amplitude de la flexion des piliers P1, P2, P3, P4, P5 et P6 de la figure 22 est représentée sur un diagramme polaire au cours du temps.

Nous observons que les piliers P1 et P3 sont tirés par la cellule vers son noyau. Les piliers P4 et P6 sont eux poussés sur les côtés du canal. Le pilier P5 est poussé du côté où le noyau ne passe pas. Ces deux cellules montrent un comportement différent selon leur degré de confinement. L'analyse de toutes les cellules étudiées permet de valider cette tendance.

Influence du confinement sur l'orientation de la force cellulaire.

L'analyse de l'orientation des forces cellulaires sur les piliers pendant la migration des macrophages est réalisée selon le traitement de surface, la position (nucléaire ou extra-nucléaire) et la taille des canaux. Les études ont d'abord été réalisées selon chaque donneur pour vérifier la convergence des données. Ici, il ne sera présenté que les résultats de la fusion des données provenant des trois donneurs.

Sur les graphiques de la figure 26, est représentée la distribution des forces selon leur direction dans le cas de macrophages migrants dans des canaux traités avec de la fibronectine. Quatre représentations polaires exposent ces distributions selon la zone extra nucléaire et nucléaire, des canaux de 12 μm et de 6 μm . Pour les canaux de 12 μm de large, nous voyons que la cellule a tendance à tirer sur les piliers qui sont dans la zone extra nucléaire vers son noyau. Les piliers qui sont dans la zone nucléaire ne sont pas poussés dans des directions préférentielles.

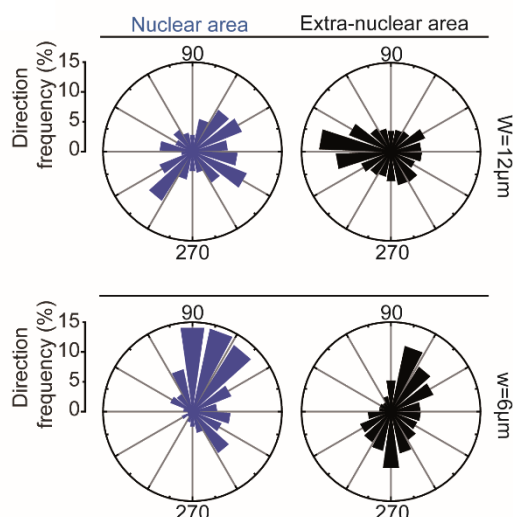


Figure 26 : Distribution des directions des forces exercées par les cellules dans des canaux de 12 μm de large (en haut), de 6 μm de large (en bas) traité à la fibronectine selon si les piliers se trouvent dans la zone nucléaire (graphiques en bleu) et dans la zone extra nucléaire (graphique en noir).

Dans les canaux de 6 μm de large, nous voyons que les piliers qui sont dans la zone extra nucléaire sont poussés sur les côtés du canal, d'un côté comme de l'autre. Pour les piliers se trouvant dans la zone nucléaire de la cellule, les piliers sont poussés du côté où le noyau ne passe pas.

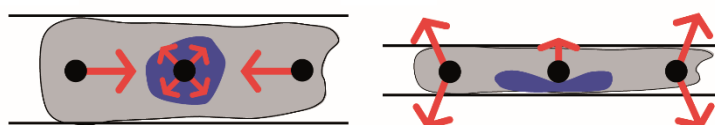


Figure 27 : Schéma du modèle des forces exercées par les cellules en fonction d'un faible confinement (à gauche) et d'un fort confinement (à droite) quand l'adhérence est favorisée par le traitement des canaux à la fibronectine.

Pour conclure, la cellule oriente ses forces en fonction de son degré de confinement. Elle applique des forces de traction sur les piliers quand elle est peu confinée, et ces forces deviennent des forces de poussée quand la cellule est plus fortement confinée. Les schémas de la figure 27, représentent schématiquement les orientations des forces exercées par les macrophages quand ils migrent dans des canaux de 12 ou 6 μm de large, fonctionnalisés avec de la fibronectine.

Canaux « non-adhésifs » traités avec du PEG-G-PLL

Les cellules migrant dans les canaux fonctionnalisés avec du PEG-g-PLL, orientent leur force de la même façon dans les canaux de 12 μm de large que ceux traités à la fibronectine. En effet, les piliers dans la zone extra cellulaire sont tirés par la cellule vers le noyau, et donc le centre de la cellule, comme montré par le graphe de la figure 28. Les piliers dans la zone nucléaire sont poussés perpendiculairement à l'axe du canal d'un côté ou de l'autre, voir figure 28. Par contre, la distribution est asymétrique sur l'axe du canal. Cela pourrait s'expliquer par le sens de migration de la cellule qui induit une asymétrie.

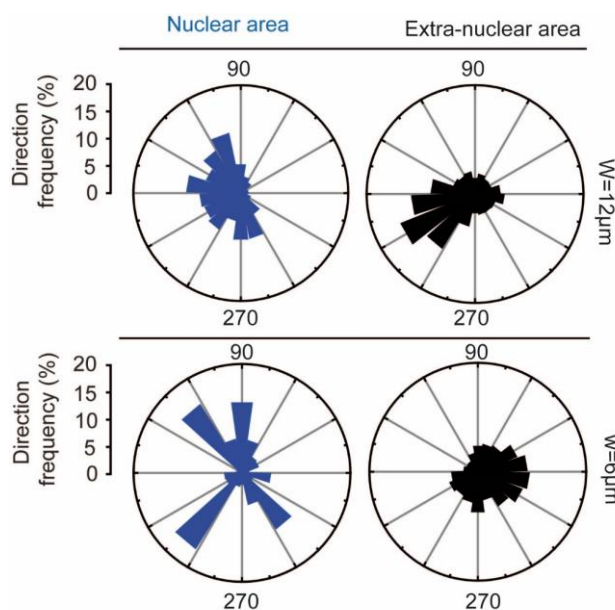


Figure 28 : Distribution des directions des forces exercées par les cellules dans des canaux de 12 μm de large (en haut), de 6 μm de large (en bas) traité au PEG-g-PLL selon la zone d'appartenance des piliers (nucléaire et extra nucléaire).

Dans les canaux de 6 μm de large, les piliers se trouvant dans la zone extra nucléaire sont poussés vers l'extérieur de la cellule, voir figure 28, c'est donc l'inverse de ce qui arrive dans les canaux de 12 μm de large. Il s'agit là de forces de poussée et non de traction appliquées par les macrophages sur les piliers.

Pour les piliers se trouvant dans la zone nucléaire, quatre directions apparaissent comme préférentielles, 90°, 110°, 220° et 290° comme indiqués sur la figure 28

Ces expériences montrent encore que les macrophages adaptent l'orientation de leur force selon leur degré de confinement. Les schémas de la figure 29 résument la direction de ces forces en fonction du degré de confinement des macrophages dans des canaux fonctionnalisés avec du PEG-g-PLL.

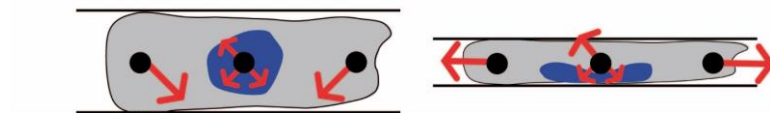


Figure 29 : Schéma du modèle des forces cellulaires exercées en fonction d'un faible confinement (à gauche) ou d'un fort confinement (à droite) et d'une adhérence inhibée par le traitement des canaux avec du PLL-g-PEG.

2.6. Conclusion et discussion

L'utilisation de la technologie de microfabrication a permis de fabriquer des microenvironnements complexes pour étudier la migration cellulaire. En effet, la structuration d'une surface de silicium à l'aide de procédés de photolithographie et de gravure sèche a permis de fabriquer un moule avec des motifs microscopiques. La mise en place d'un démoulage des répliques en PDMS dans l'éthanol a permis l'intégration de piliers droits et déformables au sein de canaux de migration capables de confiner spatialement les cellules.

Les macrophages étudiés, ont migré avec succès dans les canaux micro fluidiques, bien que les constriction créées par la présence des piliers soient au minimum de 2 μm . La fabrication de deux types de canaux avec deux largeurs (6 et 12 μm) a permis d'étudier la migration des macrophages sous faible et fort confinement. Nous avons observé un changement de comportement des macrophages : les forces exercées par les cellules contre les piliers au cours de la migration changent d'orientation, ces résultats semblent suggérer un mode de migration nommé « Chimeying », qui prévoit que sous fort confinement les cellules utilisent des forces de friction pour se mouvoir⁹. Ces résultats ont déjà été montrés pour une cellule migrant entre deux couches de gels espacés de 2 μm prétraitées pour inhiber l'adhérence de la cellule¹⁰. De même, l'étude des forces de traction de cellules confinées migrant sur des piliers en PDMS

⁹ Heuzé, ML et al. (2013) Migration of dendritic cells: physical principles, molecular mechanisms, and functional implications. *Immunological reviews*. **256**, 240-254

¹⁰ Yip, AK et al. (2015). Traction stress analysis and modeling reveal that amoeboid migration in confined space is accompanied by expansive forces and requires the structural integrity of the membrane-cortex interactions. *Integrative biology*. **7**, 1196-1211.

dans des canaux a permis de montrer que les forces de traction diminuaient lorsque le confinement augmentait¹¹.

L'une des principales différences entre la migration 2D et 3D est le rôle mécanique du noyau. En effet, en raison de sa taille et de sa rigidité, le noyau est le principal facteur limitant de la migration cellulaire à travers des constriction^{12,13} alors qu'il ne constitue pas une barrière pour la migration 2D. Lors de la progression des macrophages dans les canaux, nous avons mesuré des forces de l'ordre du nanonewton au niveau des noyaux et nous avons également observé que le noyau se déformait quand il passait au niveau des piliers. Il a été reporté dans la littérature que cette déformation du noyau peut provoquer une réorganisation physique, une altération de la chromatine, voire la rupture de l'enveloppe nucléaire et la mort cellulaire^{14,15,16,17,18}. Nous avons remarqué que les forces maximales exercées dans les zones extranucléaires sont significativement plus élevées que les forces exercées dans les zones nucléaires. Ce résultat suggère que la génération de forces autour du noyau ou aux extrémités des cellules implique des mécanismes différents. Ce dispositif a également permis d'observer l'influence du confinement sur la déformation des noyaux. À l'avenir, ce dispositif pourrait permettre de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse mécanique du noyau et dans la génération de forces internes et externes lors de la migration confinée.

Cependant, dans notre étude nous n'avons pas montré que le traitement de surface pour inhiber l'adhérence des cellules avait un impact sur l'amplitude des forces. Ce résultat suggère deux hypothèses. Soit les molécules utilisées n'ont pas bien adhéré aux surfaces en PDMS et sur la lamelle de verre.

¹¹ Raman, SR et al. (2013). Probing cell traction forces in confined microenvironments. *Lab on a Chip*. **13**, 4599-5607.

¹² Calero-Cuenca, F J et al. (2018). Dealing with the Nucleus During Cell Migration. *Curr Opin Cell Biol*, **50**, 35-41.

¹³ Davidson, P M. et al. (2014). Nuclear Deformability Constitutes a Rate-Limiting Step During Cell Migration in 3-D Environments. *Cell Mol Bioeng*, **7**, 293-306.

¹⁴ Aureille, Jet al. (2017). Mechanotransduction Via the Nuclear Envelope: A Distant Reflection of the Cell surface. *Curr Opin Cell Bio.*, **44**, 59-67.

¹⁵ Petrie, RJ et al. (2014) Generation of Compartmentalized Pressure by a Nuclear Piston Governs Cell Motility in a 3d Matrix. *Science*. **345**, 1062-1065.

¹⁶ Guilluy, C. et al. (2014). Isolated Nuclei Adapt to Force and Reveal a Mechanotransduction Pathway in the Nucleus. *Nat Cell Biol*. **16**, 376-381.

¹⁷ Denais, C.M. et al. (2016). Nuclear Envelope Rupture and Repair During Cancer Cell Migration. *Science*. **352**, 353-358.

¹⁸ Raab, M et al. (2016). Escrt Iii Repairs Nuclear Envelope Ruptures During Cell Migration to Limit DNA Damage and Cell Death. *Science*. **352**, 359-362.

Cependant, la culture des macrophages dans les réservoirs des dispositifs a montré que les macrophages adhéraient beaucoup plus vite dans les dispositifs traités à la fibronectine comparativement aux dispositifs traités au PEG-g-PLL. Cela montre donc que les molécules étaient au moins présentes sur la lamelle de verre. De plus, l'utilisation de fibronectine marquée a permis de prouver la présence de fibronectine dans tous les canaux après le traitement de surface. Il nous semble donc logique de minimiser cette première hypothèse. La deuxième hypothèse est que les cellules n'utilisent pas les sites adhérences pour migrer dès lors qu'elles sont confinées. C'est cette deuxième hypothèse que nous privilégions.

Enfin la variabilité induite par l'utilisation de plusieurs donneurs ne nous a pas permis de conclure à propos de l'intensité des forces. En effet, nous n'avons pas pu conclure sur une possible différence de module entre les forces de traction et les forces de poussée. Une deuxième série de mesures serait nécessaire pour établir une tendance.

Un marquage de la vinculine par transfection permettrait de corrélérer la dynamique des forces à l'expression de cette protéine qui est connue pour son rôle fondamental dans l'activité mécanique des macrophages. Il serait d'autant plus intéressant de l'étudier dans un canal dont la section diminue au fur et à mesure que la cellule avance pour observer la réorganisation de cette vinculine lorsque la cellule passe de forces de traction à des forces de poussée. De plus, ce type d'expériences permettrait de comparer l'amplitude des forces de poussée à celle des forces de traction d'une seule et même cellule.

L'amélioration de l'algorithme créé pour analyser les forces de migration pourrait permettre d'étudier plus en détail la dynamique des forces : fréquence et période. Il serait possible aussi d'étudier la dynamique de migration comme la vitesse, la persistance et corrélérer ces données aux forces appliquées par les cellules.

Les macrophages n'utilisent pas que les piliers pour avancer, en effet, ils utilisent également les parois des canaux comme support de migration. On peut alors se demander si les forces appliquées par la cellule contre les piliers sont de même nature que les forces utilisées contre les parois. Est-ce que les forces appliquées contre les piliers sont des forces qui permettent la migration ou sont-ce des forces qui poussent ou tirent simplement un obstacle gênant la progression de la cellule dans le canal ?

Pour répondre à ces questions, nous avons développé un micro réseau 3D cubique formé de poutres suspendues. Ces réseaux permettent une migration confinée des cellules dans un environnement poreux réellement tridimensionnel. La mesure de la déformation des poutres engendrée par les forces appliquées par les cellules pour migrer permet de remonter aux forces globales exercées par la cellule lors de sa migration confinée dans un réseau 3D. Ces résultats sont présentés au sein du prochain chapitre.

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma du dispositif de microfluidique. En haut, dispositif complet avec les réservoirs et les deux séries de microcanaux, au milieu: zoom sur un canal équipé de piliers, W est la largeur du canal, d_p le diamètre du pilier, h_p la hauteur du pilier et h_c la hauteur du canal, en bas : vue 3D au sein d'un canal équipé de piliers monté au-dessus d'une lame de verre.....	45
Figure 2 : Schéma de la première et deuxième génération des canaux. (a) Première génération de canaux équipés de piliers, schéma d'un canal de $6\ \mu\text{m}$ de large, $10\ \mu\text{m}$ de large et de $20\ \mu\text{m}$ de large. (b) Deuxième génération de canaux équipés de piliers, schéma d'un canal de $6\ \mu\text{m}$ de large et de $12\ \mu\text{m}$ de large.	46
Figure 3 : Schéma du dispositif de microfluidique. De haut en bas : vue de côté, vue en diagonale depuis le réservoir du dispositif, puis vue de l'intérieur du canal.....	46
Figure 4 : Processus de fabrication du moule. (1) le wafer sur lequel est déposée une couche de résine positive est exposé aux UV à travers un masque. (2) La couche de résine restante sur le wafer après développement. (3) Wafer structuré après l'étape de gravure.	46
Figure 5 : Fabrication des dispositifs et lancement de l'expérience. (1) Le PDMS est coulé sur le wafer et dégazé avant polymérisation thermique à 100°C pendant 1h. (2) Le PDMS réticulé est démoulé dans l'éthanol puis posé sur une lamelle de verre. (3) Le PDMS sèche pendant 30 minutes à température ambiante, la séquence d'image montre la progression du ménisque formé par l'éthanol (à droite des images) et l'air (à gauche des images) et qui courbe les piliers toujours de la même façon. (4) Ouverture des réservoirs à l'aide d'un emporte-pièce. (5) Le timbre est retourné et soumis à un plasma O_2 comme la lamelle de verre puis le timbre est collé à la lamelle de verre de façon irréversible. (6) Un traitement de surface est réalisé pour promouvoir (fibronectine) ou inhiber (PEG-g-PLL) l'adhérence des cellules. (7) Injection des cellules dans les réservoirs des dispositifs.	46
Figure 6 : Images par microscopie électronique à balayage d'un micro dispositif. À gauche, champ large de tous les canaux de $12\ \mu\text{m}$ (A) et $6\ \mu\text{m}$ (B) barre d'échelle $500\ \mu\text{m}$, au milieu zoom sur un des canaux barre d'échelle $10\ \mu\text{m}$, à droite zoom sur un des piliers des canaux de 12 et $6\ \mu\text{m}$ de large, barre d'échelle $2\ \mu\text{m}$	46
Figure 7 : Schéma de la flexion d'une poutre cylindrique encastrée de diamètre d_p , de hauteur h_p , sous l'action d'une force (F) appliquée à son extrémité. La poutre est composée d'un matériau de module d'Young E . La flèche X est reliée à la force par le facteur K	46
Figure 8 : Flexion d'un pilier encastré. Le déplacement de l'extrémité libre du pilier ($d_m \text{ max}$) est tracé en fonction du positionnement sur l'axe z (h_f) du point central de la surface d'application de la force. Cette surface est celle d'un demi cylindre de hauteur $1\ \mu\text{m}$ et de rayon identique à celui du pilier (voir texte).....	46
Figure 9 : Evaluation de la flexion d'un pilier avec trois méthodes différentes. Dans le premier cas, l'équation d'Euler-Bernoulli est utilisée, dans le deuxième cas une simulation COMSOL permet	

d'évaluer la flexion du pilier lorsqu'une force ponctuelle est appliquée à l'extrémité du pilier, et dans le dernier cas une simulation COMSOL permet d'évaluer la flexion du pilier quand une force est appliquée sur une surface de $2.83 \mu\text{m}^2$ situé à l'extrémité du pilier. 46

Figure 10 : Diagramme du traitement d'images. (1-3) Exemple d'images brutes des canaux et des piliers en lumière blanche (1), des images brutes des noyaux (2) et du cytoplasme (3) en fluorescence. (4) Recalage des images du canal et des piliers. (5) Suivi des piliers (6), identification des piliers selon leur position par rapport à la cellule. (7,9) Les translations faites sur les images en lumière blanche sont appliquées aux images du noyau et du cytoplasme. (8,10) Segmentation des noyaux et des cellules (11) Second recalage des images basé sur les piliers qui ne sont pas en contact avec des cellules. (12) Application d'une rotation de 180° à certains piliers selon leur localisation. (13) Évaluation de l'amplitude (d) des flexions et de leur orientation (θ). 46

Figure 11 : Segmentation de la zone cellulaire et nucléaire. Les quatre pixels représentant les quatre extrémités de la cellule (pixel avec le plus grand x, le plus petit x, le plus grand y et le plus petit y) représentées par les points orange permettent de délimiter la zone cellulaire qui est le rectangle jaune passant par ces quatre points. Les quatre points bleus représentent les quatre extrémités du noyau et permettent de délimiter la zone nucléaire, c'est-à-dire le rectangle passant par ces 4 points. L'étoile représente le centre de masse du noyau. 46

Figure 12 : Fusion des deux zones extra nucléaires. Afin de fusionner les piliers de la zone extra nucléaire se situant à gauche du noyau à celle de droite, une rotation de 180° est appliquée. Cela permet par la suite d'observer la direction des forces appliquées par les cellules dans les zones extra nucléaires indépendamment de leur situation en aval ou en amont de la cellule. 46

Figure 13 : Rotation des piliers dans la zone nucléaire. À gauche, le noyau passe au-dessus du pilier, dans ce cas une rotation de 180° est appliquée aux piliers se trouvant dans la zone nucléaire. À droite, le noyau passe en dessous du pilier, aucune rotation n'est appliquée. 46

Figure 14 : Référentiel d'un pilier. L'axe x est aligné sur l'axe du canal. La position du pilier non soumis à des contraintes est la position de référence (t_{ref}). La position du pilier à un temps t est représentée par le point gris. La distance séparant cette position à la position de référence est d et la direction du mouvement est caractérisée par l'angle θ 46

Figure 15 : Kymographes : séquences d'images acquises toutes les 2 minutes des cellules migrant dans des canaux.. A gauche, un macrophage migrant avec une forme allongée avec une vitesse de $40 \mu\text{m/h}$ dans canal de section $5 \times 10 \mu\text{m}^2$. Sur le panel du centre, un macrophage migre dans un canal de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ avec une vitesse de $12 \mu\text{m/h}$. Sur le panel de droite, on observe la migration d'un macrophage dans un canal de section $10 \times 10 \mu\text{m}^2$, le macrophage utilise une forme ronde et présente une vitesse moyenne de migration de $17 \mu\text{m/h}$ 46

Figure 16 : Kymographes de macrophages migrants dans des canaux équipés de piliers. Le cytoplasme des macrophages est marqué par un « cell tracker » vert et le noyau des cellules est marqué au Hoechst

en bleu. Les macrophages migrent dans un canal de (a) $12 \times 10 \mu\text{m}^2$ ou de (b) $6 \times 10 \mu\text{m}^2$. (a' et b') Zooms sur les noyaux des macrophages qui sont déformés au cours de la migration.	46
Figure 17 : Images par microscopie électronique à balayage de macrophages fixés lors de leur migration dans les canaux équipés de piliers après 48 heures de culture. Les macrophages ont été colorés en vert à l'aide du logiciel Photoshop. (A & C) Le canal fait $12 \mu\text{m}$ de large. (B & D) Le canal fait $6 \mu\text{m}$ de large. Barre d'échelle $10 \mu\text{m}$. (E) Zoom sur le pilier de la figure (C). (F) Zoom sur le pilier de la figure (D). Barre d'échelle $2 \mu\text{m}$	46
Figure 18 : Marquage par immunofluorescence des macrophages fixés dans un canal de $12 \mu\text{m}$ de large (a) et de $6 \mu\text{m}$ de large (b). L'actine est marquée en rouge, la vinculine en vert et le noyau en bleu. Des schémas ont été réalisés pour aider à la compréhension. Barre d'échelle $10 \mu\text{m}$	46
Figure 19 : Morphologie des noyaux des macrophages par marquage au Hoechst. (A) Les macrophages évoluent sur une lamelle de verre. (B) Les macrophages migrent dans des canaux de $12 \mu\text{m}$ de large équipés de piliers. (C) Les macrophages migrent dans des canaux de $6 \mu\text{m}$ de large équipés de piliers. Les points rouges permettent de situer les piliers des canaux. La barre d'échelle est de $10 \mu\text{m}$. (D) Facteur de forme des noyaux défini par le rapport du grand axe de l'ellipse ajusté sur le noyau divisé par son petit axe.	46
Figure 20 : Tableau du nombre de cellules par conditions (donneur, traitement de surface, largeur du canal).	46
Figure 21 : Dynamique des forces au cours de la migration cellulaire dans un canal de (A) $12 \mu\text{m}$ et (B) $6 \mu\text{m}$. Les piliers P_1 , P_3 , P_4 et P_6 sont dans la zone extra nucléaire. Les piliers P_2 et P_5 sont dans la zone nucléaire. Le déplacement est tracé au cours du temps et converti en force. Échelle $10 \mu\text{m}$	46
Figure 22 : Amplitudes des forces cellulaires selon leur emplacement. (A) Distinction de deux zones, la zone nucléaire et la zone extra nucléaire. (B) Utilisation du test Mann-Whitney pour tester l'hypothèse « les forces sont plus importantes quand elles sont localisées dans la zone extra nucléaire ». Lorsqu'il est indiqué « $EN > N$ » l'hypothèse est acceptée quand il est marqué « $N > EN$ », c'est l'hypothèse inverse qui est acceptée. (C & D) Forces maximales appliquées par les cellules selon la zone extra nucléaire et la zone nucléaire quand les canaux sont traités à la (C) fibronectine et au (D) PEG-g-PLL.	46
Figure 23 : Influence du traitement de surface sur l'amplitude des forces appliquées par les cellules. Utilisation du test Mann-Whitney pour tester l'hypothèse « Les forces sont plus importantes quand le canal est traité avec de la fibronectine ». Si inscrit « $F > P$ », l'hypothèse est acceptée, si inscrit « $P > F$ », l'hypothèse inverse est acceptée. Si inscrit « Pas de différence », les deux hypothèses sont rejetées. .	46
Figure 24 : Influence du confinement sur l'amplitude des forces. Le test de Mann-Whitney est utilisé pour tester l'hypothèse suivante « Les forces appliquées dans les canaux de $6 \mu\text{m}$ de large sont plus importantes que celles appliquées dans les canaux de $12 \mu\text{m}$ de large ». Quand il est marqué $6 > 12$, l'hypothèse est acceptée, quand il est marqué $12 > 6$ l'hypothèse inverse est acceptée, quand il est marqué « Pas de différence », les deux hypothèses sont rejetées.	46

Figure 25 : Représentation polaire des déplacements des piliers (figure 22) en fonction de l'angle θ et du temps. En haut, les piliers P1, P2 et P3 sont soumis aux contraintes exercées par une cellule migrant dans un canal de 12 μm de large. En bas, les piliers P4, P5 et P6 sont soumis à une cellule migrant dans un canal de 6 μm de large. Les piliers P2 et P5 se trouvent dans les zones nucléaires, les piliers P1, P3, P4 et P6 dans les zones extra nucléaires.....	46
Figure 26 : Distribution des directions des forces exercées par les cellules dans des canaux de 12 μm de large (en haut), de 6 μm de large (en bas) traité à la fibronectine selon si les piliers se trouvent dans la zone nucléaire (graphiques en bleu) et dans la zone extra nucléaire (graphique en noir).	46
Figure 27 : Schéma du modèle des forces exercées par les cellules en fonction d'un faible confinement (à gauche) et d'un fort confinement (à droite) quand l'adhérence est favorisée par le traitement des canaux à la fibronectine.....	46
Figure 28 : Distribution des directions des forces exercées par les cellules dans des canaux de 12 μm de large (en haut), de 6 μm de large (en bas) traité au PEG-g-PLL selon la zone d'appartenance des piliers (nucléaire et extra nucléaire).	46
Figure 29 : Schéma du modèle des forces cellulaires exercées en fonction d'un faible confinement (à gauche) ou d'un fort confinement (à droite) et d'une adhérence inhibée par le traitement des canaux avec du PLL-g-PEG.....	46

Chapitre 3 : Treillis tridimensionnels pour l'étude de la migration des macrophages en 3D

3.1. Fabrication des treillis par lithographie optique à deux photons

3.1.1. Design du réseau 3D

L'objectif est de concevoir un micro dispositif permettant la culture tridimensionnelle de cellules. Il doit à la fois permettre leur migration, leur confinement et la mesure des forces cellulaires. Pour ce faire, nous avons fabriqué un réseau de poutres suspendues formant des angles droits avec une période constante, permettant d'obtenir une maille carrée, comme schématisée sur la figure 1. Le diamètre des poutres (d) et la période (p), comme indiqué sur le panel de droite de la figure 1,

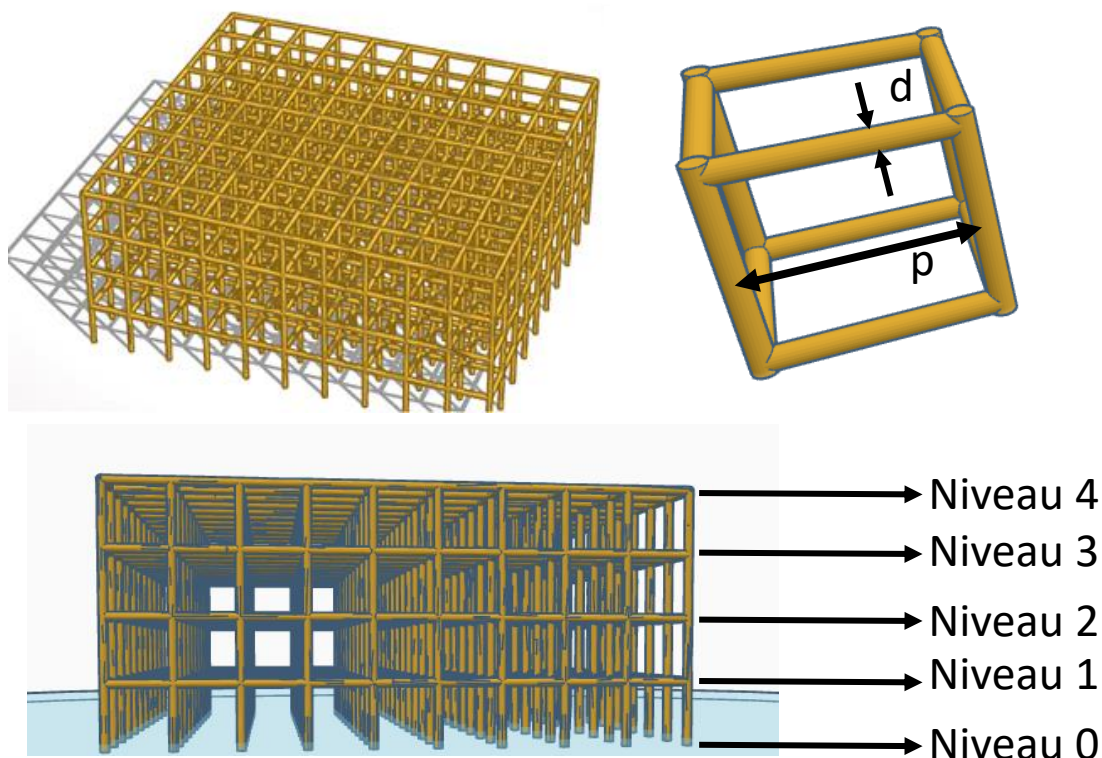


Figure 1 : Schéma du réseau avec une période de 10 μm . En haut à gauche, vue globale du treillis tridimensionnel. En haut à droite, zoom sur l'une des mailles du réseau, avec le diamètre (d) des poutres, et la période (p) de la maille. En bas, définition des niveaux du réseau. Le niveau 0 correspond au niveau de la lamelle de verre, puis le niveau 1 le niveau juste après la lamelle de verre et ainsi de suite jusqu'à atteindre le dernier, le plus éloigné de la lamelle de verre, nommé niveau 4.

permettent de jouer sur la raideur des poutres et le confinement de la cellule. Les différents niveaux du réseau sont numérotés de 0 à 4.

Quatre types de réseaux ont été conçus. Ils ont une période variant de 3 à 10 μm et un diamètre de poutre égal à environ 1 micron. La taille des noyaux des macrophages est de 10 μm en moyenne¹. La période la plus grande permet d'induire un confinement spatial où la cellule est en contact avec toutes les poutres d'une maille du réseau. La plus petite période quant à elle, contraint fortement le noyau et donc la cellule entière.

3.1.2. Fabrication de réseaux en résine par lithographie laser bi-photons

Traitement de surface du support du réseau

L'observation de la migration des macrophages se fait avec un microscope inversé et donc à travers le support sur lequel sont fabriqués les réseaux. Cela implique de travailler sur des lamelles de verre très fines non adaptées à l'outil de lithographie 3D (Nanoscribe®) utilisé pour fabriquer le réseau de poutres.

En effet, lors de la fabrication des réseaux, le faisceau laser du système Nanoscribe® commence à polymériser la résine à l'interface entre la résine et le support. La base de la structure est ainsi attachée au support et elle ne peut pas bouger au cours de la fabrication. Comme imagé sur la figure 2, la réflexion du laser au niveau de l'interface permet la détection automatique de cette même interface entre la lamelle de verre et la résine, c'est-à-dire de définir la côte $z=0$ où le faisceau laser est

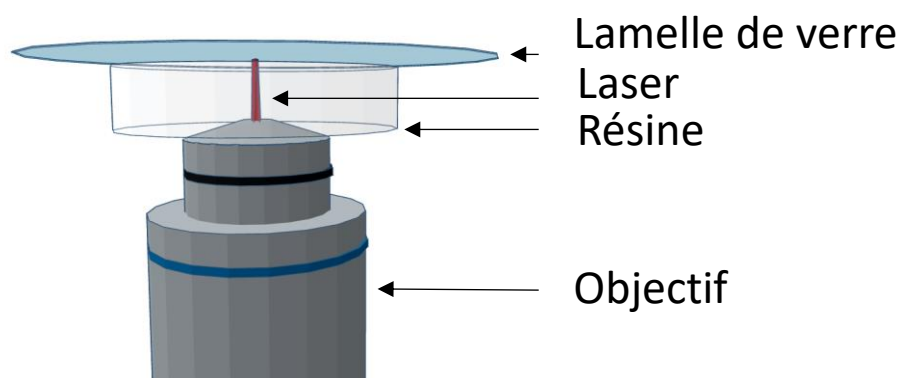


Figure 2 : La lamelle de verre sur laquelle est déposée la résine (IP-Dip) est retournée sur le porte échantillon. L'objectif est en contact avec la résine. Cette dernière sert également de milieu d'immersion.

focalisé précisément sur cette interface. Cette détection automatique peut être réalisée uniquement si l'écart d'indice optique est suffisamment grand entre la résine liquide à polymériser et le support.

¹ Lammerding, J. (2011). Mechanics of the nucleus. *Comprehensive Physiology*. **1**, 783-807

Nous avons constaté que dans le cas d'une lamelle de verre, le saut d'indice de réfraction ne permet pas cette mise au point.

Pour pallier ce problème, une couche fine de platine (entre 2 et 3 nm) est déposée par pulvérisation ($v = 0.3 \text{ nm/min}$) sur la lamelle de verre. Cette couche en augmentant le coefficient de réflexion de l'interface permet la détection automatique de l'interface entre la résine et la lamelle de verre. Il est important de signaler que dans cette gamme d'épaisseur de métallisation, la lamelle reste suffisamment translucide pour pouvoir imager les structures au microscope inversé.

Polymère utilisé

La résine liquide polymérisée par le faisceau laser est commercialisée par la société Nanoscribe® sous le nom d'IP-Dip. Cette résine est autofluorescente avec un large spectre d'émission² (et sera par la suite imagé par fluorescence avec la longueur d'excitation de 488 nm et le filtre d'émission sera centré sur la gamme 500-540 nm). Cette caractéristique est essentielle, car elle permettra de visualiser le treillis en fluorescence et donc de suivre la déformation des poutres provoquée par la migration d'une cellule.

Principe de la lithographie laser bi-photons.

Le système de photolithographie à deux photons, décrit sur la figure 3, est utilisé pour créer les réseaux tridimensionnels. La polymérisation de la résine se fait par l'absorption de deux photons au niveau du point de focalisation du laser, dans le petit volume (voxel) où l'intensité est suffisante pour que la probabilité d'absorption de deux photons soit non négligeable. En effet cette absorption à deux photons, représentée en rouge sur la figure 3, permet d'exciter les monomères de la résine avec suffisamment d'énergie pour induire des réactions de polymérisation. Ce phénomène a lieu au point focal du laser (lieu de haute concentration visible sur le panel de droite de la figure 3). Ce point focal où ce type d'absorption se produit définit un petit volume nommé voxel, par analogie avec le pixel qui est une petite surface d'excitation ou d'émission en lithographie ou en imagerie 2D. Ce voxel définit alors la résolution du système qui est de l'ordre de 250 nanomètres dans le système utilisé au LAAS.

Ce système est équipé d'un microscope, d'une plateforme piézoélectrique, de miroirs galvanométriques, d'un laser et d'un ordinateur. La plateforme de balayage piézoélectrique permet de générer les mouvements latéraux du substrat sur lequel est déposée la résine. Les miroirs permettent de générer le mouvement en Z du point de focalisation. L'objectif vient au contact de la résine qui doit être polymérisée. La résine sert également de liquide d'immersion pour l'objectif. En synchronisant les mouvements et l'action du laser, il est ainsi possible de générer des objets 3D par écriture séquentielle.

² Accardo, A et al. (2017) Multi-photon laser writing and 3D imaging of polymeric freestanding architectures for cell colonization. *Small*. **13**, 1700621.

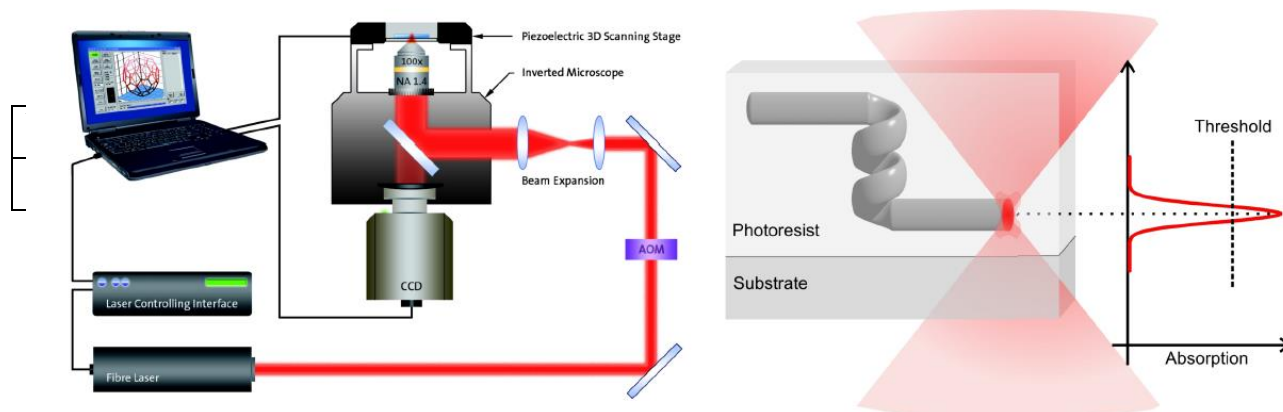


Figure 3 : Principe de fonctionnement du Nanoscribe®. À gauche, l'ordinateur communique avec la plateforme piézoélectrique, les miroirs galvanométriques, la caméra et le laser pour piloter la position du point focal du laser pour fabriquer la structure. À droite, schéma du laser polymérisant la résine. Adapté du manuel d'instruction du Nanoscribe®.

Contrôler la rigidité des réseaux est essentiel afin de se situer dans une gamme où les poutres pourront être déformées de manière observable par les cellules en migration. Quatre paramètres sont donc importants à considérer lors de la fabrication des structures. En effet, il est possible de moduler la rigidité des structures en jouant sur ces paramètres. Le premier paramètre est la puissance du laser, variant de 0 à 50 mW. Plus la puissance du laser est importante, plus le voxel de polymérisation s'élargit ainsi, à puissance plus élevée le diamètre de la poutre augmente et donc la rigidité de la poutre devient également plus importante. Le second paramètre est la vitesse d'écriture. À grande vitesse la quantité d'énergie cédée à la résine dans chaque voxel est moindre conduisant à un faible taux local de polymérisation et donc à un matériau de moindre rigidité mécanique. Le troisième paramètre est le « hatching ». Le hatching correspond à la distance dans le plan XY entre deux voxels qui sont polymérisés. Le quatrième paramètre est le « slicing ». Le slicing est la distance le long de l'axe z séparant deux voxels polymérisés. Ces distances ont un effet sur la tenue mécanique et sur la topographie des structures. Après différentes séries d'essais, les paramètres que nous avons choisis pour fabriquer les structures sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Un dernier paramètre est également important, car il peut introduire une anisotropie de topologie et de rigidité dans la structure. Avec une direction d'écriture parallèle à l'axe des poutres, les poutres sont polymérisées selon leur longueur. L'image acquise par microscopie électronique à balayage de la partie gauche de la figure 4 montre un réseau polymérisé avec ces conditions ; le trait bleu montre la direction de polymérisation du réseau. Les poutres ainsi structurées le long de leur axe

sont lisses. En revanche, comme on peut le voir sur cette même image, les poutres perpendiculaires à cette direction d'écriture sont polymérisées selon leur largeur et apparaissent, après le développement de la résine, très rugueuses. Nous observons clairement la succession des différentes lignes de polymérisation. Afin d'éviter cette différence entre les poutres, la direction d'écriture est faite selon l'une des diagonales d'une face du cube. Le réseau imagé sur le panel de droite de la figure 4 est écrit avec une direction d'écriture parallèle à la ligne bleue.

Développement du réseau

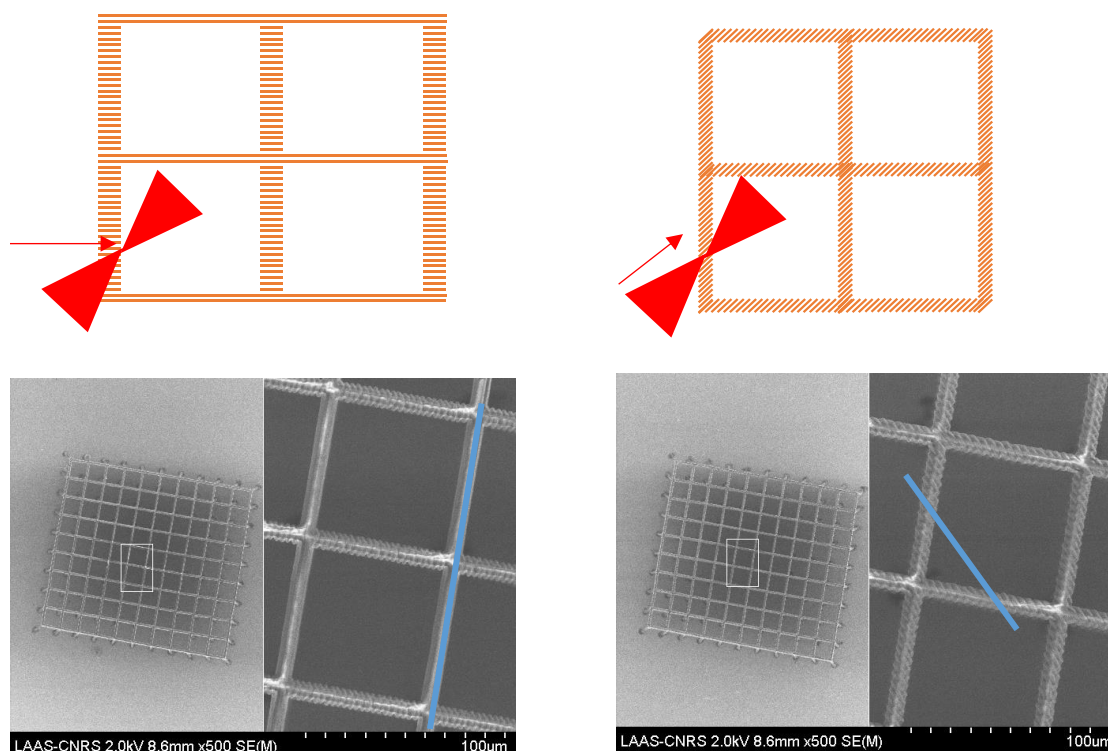


Figure 4 : Anisotropie de polymérisation. A gauche, la direction de polymérisation, indiquée par la ligne bleue, est parallèle à des poutres et perpendiculaire aux autres. A droite, l'angle entre la polymérisation et les poutres est de 45° , de cette manière aucune anisotropie est introduite entre les poutres des plans (X, Y).

Après exposition laser de toutes les structures, la lamelle de verre est plongée pendant 20 minutes dans un développeur (SU8 developer) pour dissoudre la résine non polymérisée. La structure est ensuite rincée à l'isopropanol.

Séchage super critique

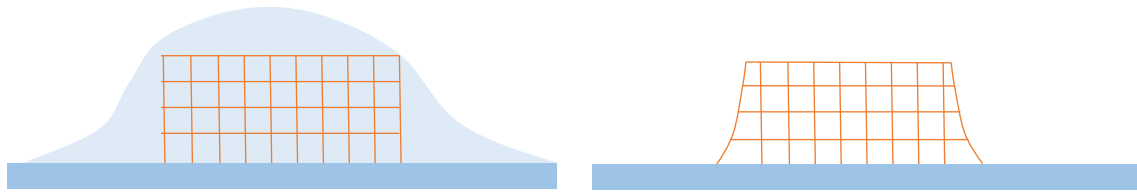


Figure 5 : Schéma de la déformation des structures après séchage. A gauche, la structure est encore encadrée d'éthanol et non déformée. A droite est représentée la structure après le séchage de l'éthanol, les flancs sont déformés.

Une fois le rinçage à l'isopropanol effectué, l'échantillon est plongé dans l'éthanol. Lors du séchage de la surface, le ménisque de l'éthanol applique une tension de surface importante ($22 \mu\text{N.m}^{-1}$) sur la structure. Cela mène à une contraction de la structure représentée sur le schéma de droite de la figure 5. Le séchage à l'air libre induit donc des fractures ou des déformations du réseau parfois importantes. Le séchage supercritique permet de réduire considérablement ces effets grâce à une transition de phase liquide instantanément vers le gaz. En effet, en menant le liquide à son point critique, les phases gazeuse et liquide présentent la même masse volumique et le même indice de réfraction³. Ce fluide supercritique est ensuite évaporé et éliminé en diminuant la pression. En s'échappant dans cet état, aucune tension de surface n'est appliquée sur la structure.

³ Jafri, IH et al. (1999) Critical point drying and cleaning for MEMS technology. *Proceedings of the SPIE*. **3880**, 51-58.

3.2. Caractérisation du réseau 3D

3.2.1. Mesures dimensionnelles des structures

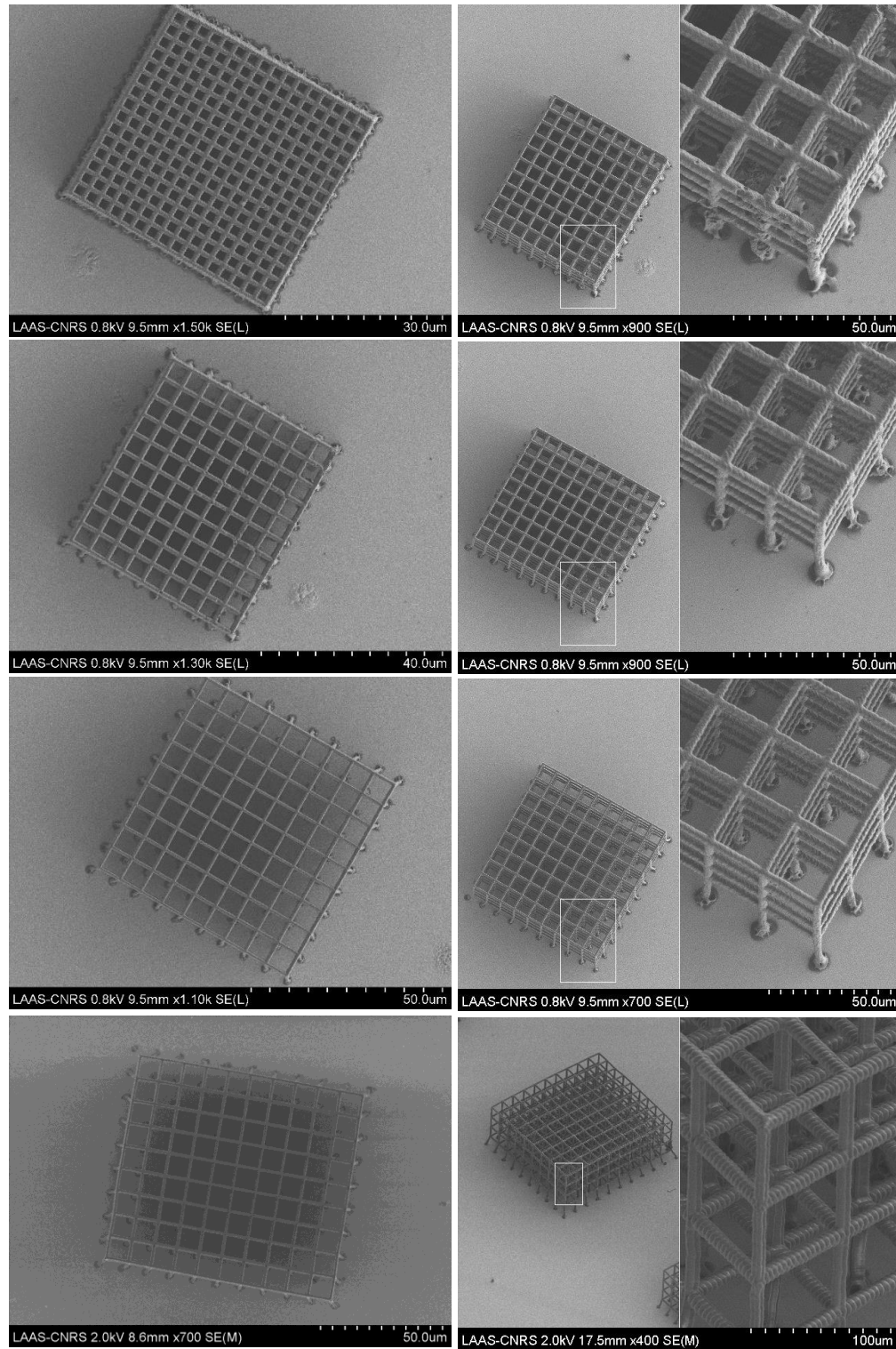


Figure 6 : Images MEB des réseaux 3D. A gauche, vue de dessus des réseaux. A droite, vue en diagonale des réseaux. De haut en bas, les réseaux avec des périodes de 3, 5, 7 et 10 μm sont présentés.

Les microstructures après fabrication sont observées par microscopie électronique par balayage et par microscopie confocale. Les images obtenues par observation par microscopie électronique à balayage (MEB) présentées dans la figure 6 permettent de valider l'ancrage de la structure sur la lamelle de verre. Cela permet de vérifier également que les structures n'ont pas subi d'altérations lors du développement et du séchage.

Les caractérisations faites par microscopie confocale ont permis de mesurer la période (p) des réseaux et le diamètre (d) des poutres. Pour ce faire, le profil d'intensité du signal d'auto-fluorescence de la résine est analysé au niveau d'une ligne, représentée en rouge sur la figure 7. Les coordonnées Y des pics d'intensités donnent les positions des poutres. La périodicité (p), indiquée sur la figure 7, est calculée en soustrayant la coordonnée Y de la poutre la plus à droite à la coordonnée Y de la poutre la plus à gauche. Cette valeur est ensuite divisée par le nombre d'intervalles entre les poutres pour obtenir la période. Le diamètre (d) des poutres, indiqué sur la figure 7, correspond à la largeur de la base des pics d'intensités.

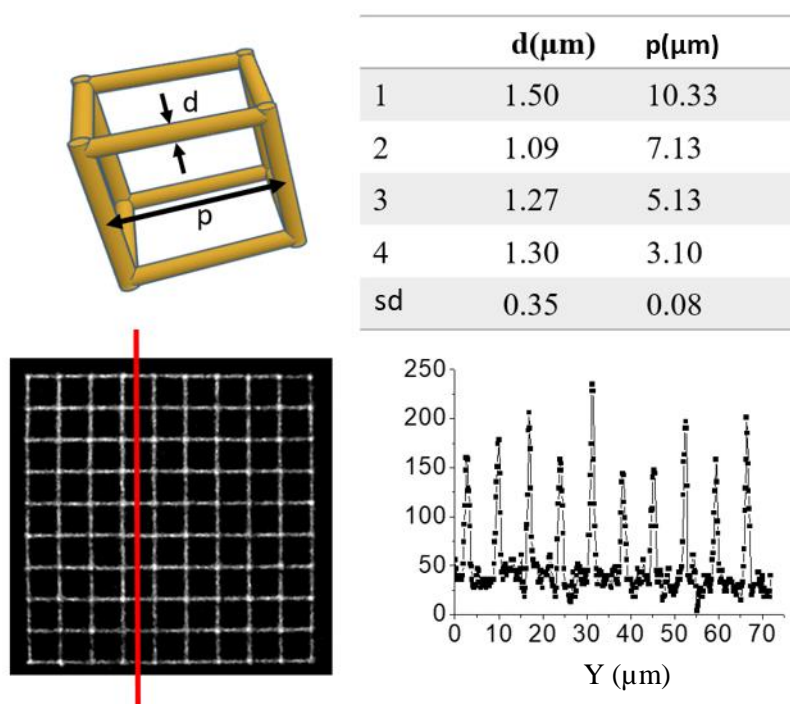


Figure 7 : Mesure de la période (p) et du diamètre (d) des poutres du réseau. En haut à gauche, schéma d'une maille du réseau, en haut à droite, résultats des mesures de la période (p) et du diamètre (d) des poutres, l'écart type (sd) est donné dans la dernière ligne du tableau. En bas à gauche, image de microscopie par fluorescence d'un réseau de période $7\ \mu\text{m}$, la ligne rouge indique là où a été mesuré le profil d'intensité de fluorescence selon l'axe Y , présenté en bas à droite.

Un algorithme développé avec le langage de programmation R a permis de calculer ces deux paramètres (d et p) semi-automatiquement. L'utilisateur définit un seuil qui se situe au-dessus du bruit

de fond. L'algorithme trouve la première valeur qui est au-dessus de cette limite (valeur A), puis cherche la prochaine qui se trouve en dessous de cette limite (Valeur B). La coordonnée X de la valeur précédente à B (Valeur C) est alors soustraite à la coordonnée X de la valeur A trouvée. En valeur absolue, cette différence donne le diamètre des poutres. L'utilisateur doit simplement s'assurer que

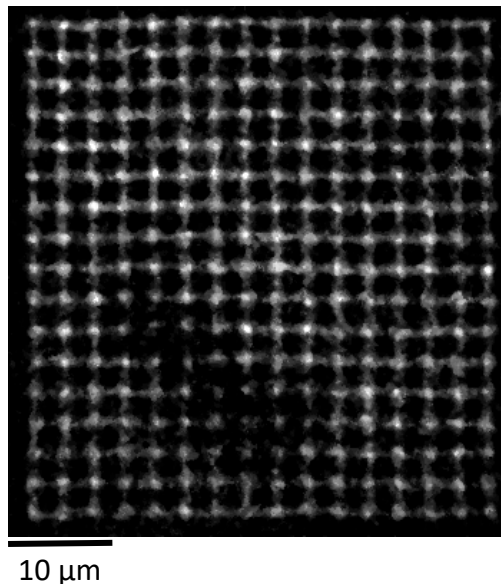


Figure 8 : Observation du niveau 1 d'un réseau de période 3 µm par microscopie de fluorescence. L'absence de polymérisation par endroits est due à la création de bulles lors du passage du laser sur l'interface résine/lamelle de verre.

tous les pics trouvés correspondent bien à des pics d'intensité liés à la présence d'une poutre.

Les périodes obtenues, données dans la table de la figure 7, sont au maximum 3% supérieure à la valeur visée. Le diamètre des poutres, exposé aussi dans la table de la figure 7, est élargi d'environ 50 % par rapport à la consigne du dessin 3D, soit 1.5 µm pour 1 µm visé. Cette différence peut être due à la puissance du laser qui est élevée (25 mW) mais qui est nécessaire pour écrire avec une vitesse de 10 mm.s⁻¹ et obtenir les structures sans dommage à la fin du développement. Ces dimensions se sont avérées compatibles avec notre objectif d'observer la migration des macrophages au sein de ces treillis et de suivre par imagerie la déformation des poutres lors de la migration.

L'observation par microscopie confocale a aussi permis de mettre en avant un défaut de fabrication pour les réseaux ayant une période de 3 µm, voir figure 8 qui montre l'image du niveau 1 de la structure. Ce défaut est dû à la génération de bulles, observables lors de la polymérisation de la matière à l'interface de la résine et de la lamelle. Après avoir dépassé une certaine hauteur, la génération de bulles pendant la polymérisation cesse. Ainsi les défauts de polymérisation engendrés par ce phénomène de dégazage sous irradiation ne sont visibles qu'au voisinage immédiat de la lamelle et uniquement pour les réseaux de très courte période. Notons également que ces défauts de

fabrication sont difficilement observables par microscopie électronique à balayage, car ils se situent à l'intérieur du treillis.

Pour conclure, la fabrication de micro réseaux sur une fine lamelle de verre recouverte d'une couche de platine à l'aide du Nanoscribe® est possible avec les paramètres décrits. Le séchage par CO₂ super critique permet d'éviter la possible déformation des réseaux liée au séchage à l'air libre. Les dimensions obtenues sont compatibles avec les dimensions cellulaires visées. La rigidité des structures doit être suffisamment faible pour permettre la déformation des poutres par les cellules. Le prochain paragraphe exposera les méthodes utilisées pour caractériser la rigidité apparente de ces structures.

3.2.2 Propriétés mécaniques de la résine & du réseau

Trois paramètres lient la déformation d'un matériau isotrope et élastique aux efforts qui lui sont appliqués :

Le coefficient de poisson

Le coefficient de poisson définit la déformation d'un matériau perpendiculairement à la direction de sollicitation uniaxiale du matériau. Il se calcule selon l'équation (1).

$$\nu = -\frac{\delta x}{x} * \frac{z}{\delta z} \quad (1)$$

En mesurant les déformations suivant deux directions perpendiculaires $\delta x/x$ et $\delta z/z$, il est possible de calculer le module de poisson de l'IP-Dip. Les valeurs reportées dans la littérature sont très étalées variant de 0.14⁴ et 0.49⁵, ces valeurs sont très différentes et ne nous permettent pas de conclure sur la valeur réelle du module de poisson de l'IP-Dip. Cependant, nous supposons qu'il se trouve entre 0.2 et 0.5 pour ce type de matériau^{6,7}.

Le module de Young

Lorsque qu'un matériau élastique isotrope est soumis à une faible compression ou traction uniaxiale, il se déforme élastiquement dans la direction de sollicitation. Cette déformation est proportionnelle à la contrainte appliquée, ce coefficient de proportionnalité est appelé module de Young. Les modules de Young de l'IP-Dip référencés sont donnés dans le tableau ci-dessous. Ces

⁴ Bauer, J et al. (2015). Push-to-pull tensile testing of ultra-strong nanoscale ceramic-polymer composites made by additive manufacturing. *Extrem mechanics letters*. **3**, 105-112.

⁵ Lemma ED et al. (2017) Mechanical properties tunability of three-dimensional polymeric structures in two-photon lithography. *IEEE transaction on nanotechnology*. **16**.

⁶ Callister.W.D,JR. (2007) Material science and Engineering : An introduction. 7th edition. John Wiley & Sons, Inc.

⁷ Oberg, E et al. Machinery's handbook. 30th edition. Industrial Press Inc., 2016.

différentes mesures indiquent que le module de Young du matériau polymérisé peut être modulé par la puissance du Laser, la vitesse d'écriture, le slicing et le hatching.

Tableau 1 : Module de Young de l'IP-Dip selon la puissance du laser et la vitesse d'écriture.

Puissance du Laser (mW)	Vitesse d'écriture (µm/s)	Module de Young (GPa)	Référence
20	100	0.88	8
20	50	0.96	9
5	100	0.75	9
13	100	5.5	10

Nos treillis ont été fabriqués avec une puissance de 25 mW, valeur supérieure d'au moins 25 % à celle utilisée dans ces études^{9,10} avec une vitesse d'écriture de 10 mm/s (100 fois plus importante). Il est donc difficile de déterminer le module de Young de notre matériau à partir des études de la littérature, en l'absence d'un modèle clair permettant de calculer le taux de polymérisation local en fonction des variations de tous ces paramètres.

Nous n'avons pas réussi à mesurer par nous-mêmes, une valeur précise de ces modules élastiques pour la résine structurée avec notre processus de fabrication. Nous avons donc pris des valeurs réalistes de ces paramètres basées sur des études spécifiques^{8,9,10} de la littérature réalisées par d'autres équipes de recherche, si bien que les valeurs finales des efforts mécaniques que nous dévoilons doivent être considérées avec une incertitude relative de l'ordre de 20%. Nous avons choisi d'utiliser un module de Young de 0.88 GPa et un coefficient de poisson de 0.45.

⁸ Jayne, RK et al. (2018) Dynamic actuation of soft 3D micromechanical structures using micro-electromechanical systems (MEMS). *Advanced materials technologies. Advancer materials technologies*. **3**, 1700293.

⁹ Lemma ED et al. (2017) Mechanical properties tunability of three-dimensional polymeric strutures in two-photon lithography. *IEEE transaction on nanotechnology*. **16**.

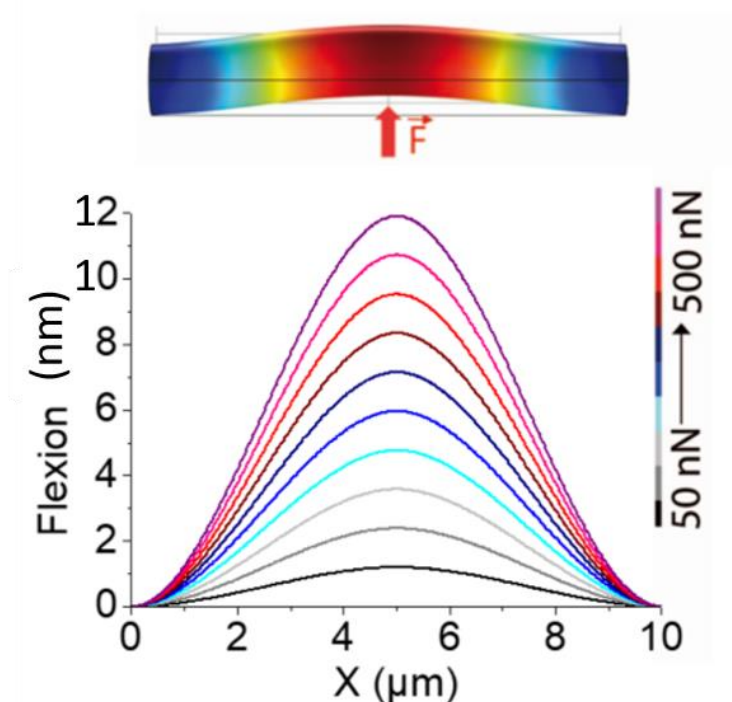


Figure 9 : Simulation pour déterminer la raideur d'une poutre. Au-dessus, une poutre de $1.5 \mu\text{m}$ de diamètre et de $10 \mu\text{m}$ de longueur dont les deux extrémités sont encastrées se déforme sous l'action d'une force normale à la surface de la poutre appliquée au centre de celle-ci. Sur le graphique est représentée la déformée de la poutre en fonction de l'amplitude de la force appliquée. Les forces appliquées vont de 50 à 500 nN par pas de 50 nN.

Pour simuler la déflexion des poutres du réseau, le module « beam » du logiciel commercial COMSOL a été utilisé. En résolvant les équations reliant les forces appliquées sur un matériau élastique et linéaire, à la déformation, il a été possible d'évaluer la constante de raideur des poutres du réseau. Pour ce faire, une poutre de $10 \mu\text{m}$ de long et de $1.5 \mu\text{m}$ de diamètre est modélisée, les extrémités sont fixées, voir figure 9. Trois paramètres définissant le matériau sont nécessaires pour simuler la déformation sous une contrainte. Ils sont indiqués par l'utilisateur dans le logiciel :

- La densité du matériau : les valeurs de la densité de l'IP-Dip reportées dans la littérature sont comprises entre 1183 kg.m^{-3} et 1370 kg.m^{-3} ^{10&11}. Nous avons choisi de la fixer à 1280 kg.m^{-3} .

¹⁰ Lemma ED et al. (2017) Mechanical properties tunability of three-dimensional polymeric structures in two-photon lithography. *IEEE transaction on nanotechnology*. **16**.

¹¹ Nanoscribe GmbH. (2013) Safety Data Sheet: IP-Dip Photoresist. Karlsruhe, Germany: Nanoscribe GmbH.

- Le coefficient de poisson fixé à 0.45.
- Le module de Young fixé à 0.88 MPa.

Sur le graphique de la figure 9 est représenté la déformée des poutres en fonction de la force appliquée au centre de la poutre. Pour une force de 500 nN, localisée au centre de la poutre, le déplacement maximum observé est de 12 nm. Nous pouvons également observer que le déplacement maximum est directement proportionnel à la force. La constante de raideur de la poutre est donc de 42 nN/nm.

3.3. Analyse des déformations des poutres du réseau 3D par les macrophages

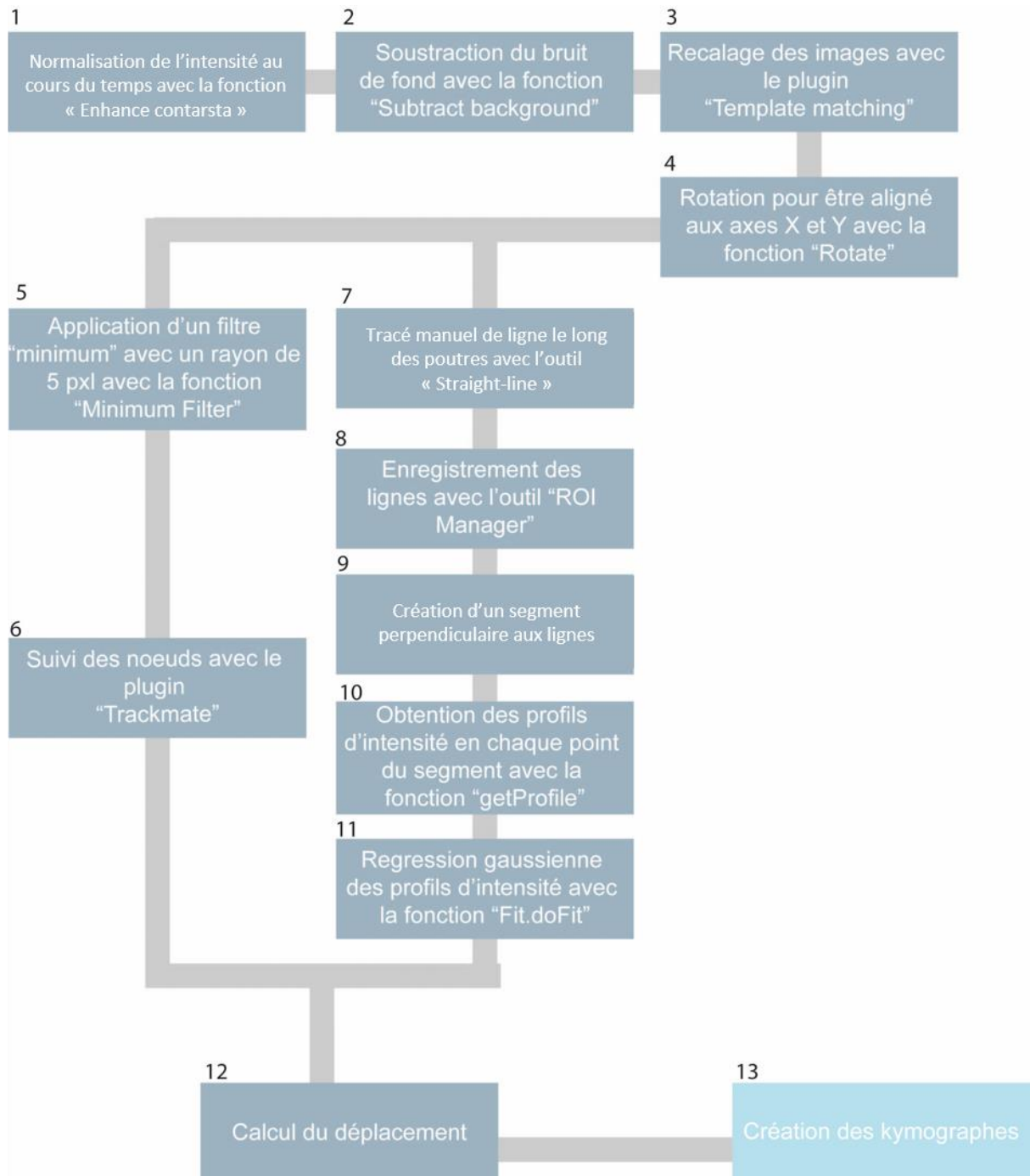


Figure 10 : Schéma de la séquence des traitements appliquée aux images acquises. (1-4) Prétraitements des images à l'aide du logiciel d'imageJ. (5-6) Traitement d'images permettant de suivre les nœuds du réseau. (7-11) Traitement d'images permettant de mesurer le mouvement des poutres du réseau. (12-13) Calcul des mouvements des nœuds et des poutres et création des kymographes.

3.3.1. Traitement d'images appliqués aux vidéos pour l'analyse des déformations : Déformées des poutres & suivi des nœuds du réseau

Une image du réseau est prise tous les 2 μm sur 20 μm de hauteur et toutes les 2 minutes. Après deux heures d'acquisition, la cellule est lysée en ajoutant un détergent (SDS). Une dernière série d'images est acquise sur l'axe z. Ceci permet d'avoir à la position du réseau non contraint. Ce processus est décrit sur la figure 11.

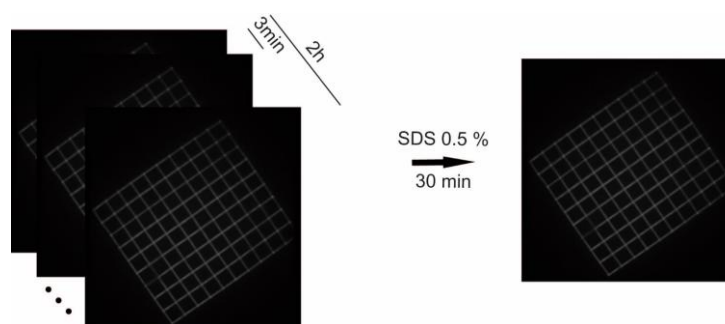


Figure 11 : Acquisition des images. Une pile d'images des réseaux est acquise toutes les 2 minutes pendant 2 heures, puis les cellules sont lysées avec un détergent (SDS), une image référence du réseau sans contrainte est finalement acquise.

Le plan ayant la meilleure focalisation du niveau 1 est sélectionné pour l'étude de la déformation des poutres dans le but d'obtenir le meilleur suivi des piliers. Le contraste de l'image est augmenté en utilisant le plugin « Enhance contrast » d'imageJ avec un taux de saturation de 0.3 %, étape 1 de la figure 10. L'image de la figure 12a est une image du réseau après acquisition. L'image de la figure 12b est le résultat après augmentation du contraste. Le programme utilisé normalise l'image en recalculant la valeur de l'intensité du pixel de façon à utiliser l'intervalle d'intensité le plus grand (0-255 pour une image en 8 bits). Le bruit de fond est soustrait en utilisant le programme « subtract background » avec un diamètre de 50 pixels. Le résultat de ces deux étapes est montré sur l'image 12c, il s'agit de l'étape 2 de la figure 10. Puis les images sont recalées les unes par rapport aux autres en utilisant le programme « Template matching », étape 3 de la figure 10. Cette étape est nécessaire pour palier au mouvement léger (quelques μm) mais présent du microscope au cours du temps. Enfin une rotation est appliquée aux images de façon à ce que la grille soit alignée sur les axes X et Y, le résultat final est montré sur l'image d de la figure 12. Il s'agit de l'étape 4 de la figure 10.

L'analyse des déformations de la grille se fait en trois parties: le suivi des nœuds, le suivi des poutres et la création d'un kymographe. Un kymographe correspond à une séquence d'images/de mesures au cours du temps. Dans notre cas l'abscisse représentera la position le long de la poutre, les

ordonnées le temps et la couleur indiquera l'amplitude du déplacement de la poutre. Ces kymographes permettent donc de visualiser le mouvement des poutres et des nœuds au cours du temps. L'algorithme (étape 5 à 13 du traitement d'images figure 10), permettant de réaliser cette analyse a été développé par Mouhanad Babi doctorant dirigé par le Professeur Jose Moran-Mirabel de l'université McMaster situé au Canada.

Pour suivre le mouvement des nœuds, un filtre minimum avec un rayon de 5 pixels est appliqué sur la séquence d'images, étape 5 de la figure 10. Ceci permet une discrimination plus facile des intersections des segments qui composent les nœuds. Ces derniers sont ensuite détectés sur chaque image et reliés dans le temps en utilisant le programme « Trackmate » d'ImageJ, étape 6. Seuls les nœuds qui sont suivis sur toute la durée de la séquence sont gardés. Les coordonnées des nœuds au cours du temps sont finalement stockées dans un fichier.

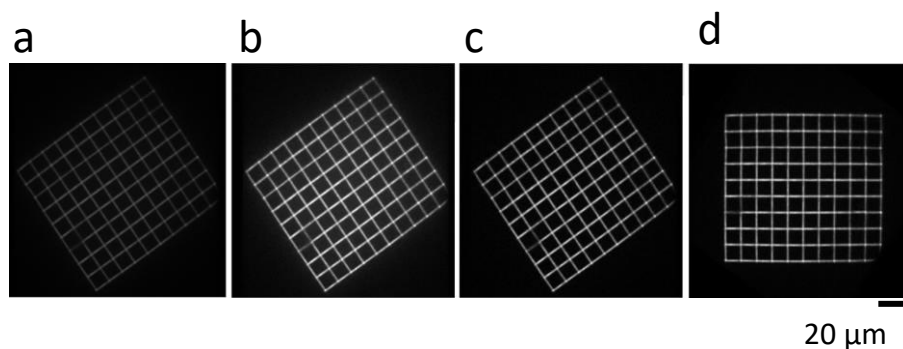


Figure 12 : Traitement des séquences d'images prés traitées avec le logiciel Image J pour obtenir le déplacement des poutres. (a) Image d'origine. (b) Le contraste de l'image est augmenté en utilisant le plugin « Enhance contrast » d'ImageJ. (c) Le bruit de fond est soustrait en utilisant le plugin « subtract background ». (d) Les images sont recalées les unes par rapport aux autres en utilisant le plugin « Template matching ».

Des lignes horizontales et verticales sont tracées manuellement le long des poutres sur ImageJ, étape 7 de la figure 10. Ces lignes sont ensuite enregistrées avec à l'aide du « ROI manager » de FIJI, étape 8. Pour chaque point de chaque ligne, une routine trace un segment de 41 pixels de long et de 1 pixel de large, perpendiculaire aux lignes précédemment tracées, étape 9 de la figure 10. Le profil d'intensité le long du segment est obtenu grâce à la fonction « getProfil » du logiciel ImageJ, étape 10 de la figure 10. Puis une régression gaussienne est réalisée avec la fonction « Fit.dofit » du logiciel ImageJ, étape 11 de la figure 10. Cette opération est répétée pour toutes les images de la séquence. Le maximum de la gaussienne donne alors la coordonnée (X pour les poutres verticales, Y pour les horizontales) du point du segment étudié au temps t. Le suivi au cours du temps de cette coordonnée permet de suivre le déplacement du segment point par point, étape 12 de la figure 10. Les coordonnées de tous les points au cours du temps sont sauvegardées dans un fichier.

La dernière image de la séquence correspond à la position du réseau sans contrainte. Les déplacements des poutres horizontales sont obtenus en soustrayant leur ordonnée de la dernière image à leurs ordonnées des autres images. De même, les déplacements des poutres verticales sont obtenus en soustrayant les abscisses de la dernière image aux abscisses des autres images.

La visualisation des déplacements des nœuds se fait également grâce à des kymographes, étape 13 de la figure 10. Ils sont créés sur MATLAB. Pour une poutre horizontale, les nœuds adjacents sont présentés de part et d'autre de la poutre. Seuls les mouvements verticaux des nœuds sont alors représentés (et horizontaux pour les poutres verticales). Une matrice temps-distance est générée séparément pour la poutre et les nœuds, puis un seul kymographe est généré. Les abscisses représentent les coordonnées horizontales ou verticales de la poutre et les ordonnées le temps, la couleur représente l'amplitude du déplacement horizontal ou vertical de la poutre et des nœuds. Si la poutre est déplacée vers les X/Y positifs alors la couleur est jaune, orange ou rouge selon l'intensité du déplacement. Si la poutre est déplacée vers les X/Y négatifs alors la couleur est verte, cyan ou bleue selon l'intensité du mouvement.

La mesure du mouvement de 8 poutres non contraintes donne un déplacement centré autour de la position originale avec un écart-type de 26 nm (voir figure 13). Lorsque les poutres ne subissent aucune contrainte, ces légers déplacements observés correspondent aux bruits inhérents à notre mesure et aux traitements d'images effectués. Nous fixons donc la limite de détection d'un déplacement significatif à 26 nm. La même mesure a été réalisée sur les nœuds, nous trouvons alors un écart type caractéristique de 38 nm qui nous donne un nouveau seuil de significativité pour le déplacement éventuel d'un nœud à 38 nm (voir figure 13). Il est intéressant de noter que ces mesures étant dépendantes de la qualité du recalage effectué, elles doivent être effectuées pour chaque expérience.

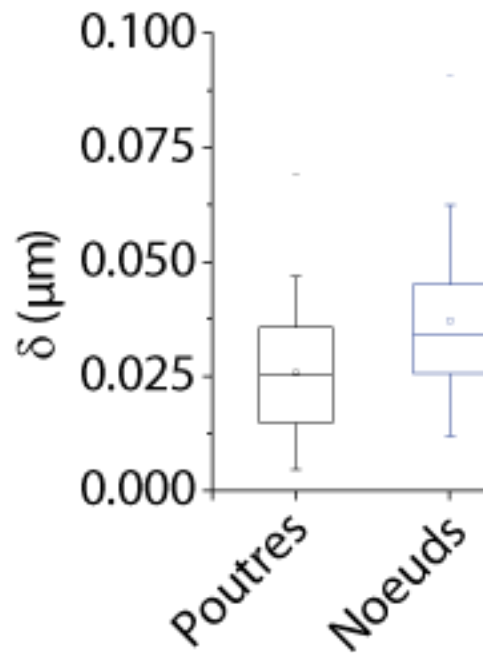


Figure 13 : Limite de détection du mouvement des poutres et des nœuds qui ne sont pas en contact avec les cellules. Nous représentons ici l'écart-type δ autour de la position d'origine des poutres et des nœuds. Cet écart-type représentatif du bruit de mesure et des traitements d'images est de 26 nm en moyenne pour les poutres et de 38 nm pour les nœuds avec un écart-type (écart-type de l'écart-type) de 16 et 17 nm respectivement. Les barres horizontales correspondent aux max et min, le grand carré correspond à l'encadrement de 70 % des valeurs, les barres verticales l'écart-type, le petit carré la moyenne et la grande barre, la médiane.

3.3.2. Déformées de la maille

Une deuxième méthode permet de mettre en évidence les efforts exercés par la cellule sur la structure du réseau 3D. Il s'agit de mesurer la variation de l'aire d'une face de la maille cubique du réseau. En mesurant la variation de l'aire d'une face d'une maille, c'est-à-dire en faisant la soustraction de l'aire à un temps t (A_t) par l'aire de la maille quand elle ne subit aucune contrainte (A_{ref}) et en divisant le résultat par A_t (2), il est possible de remonter à une déformation relative de la face en question $\varepsilon(t)$.

$$\varepsilon(t) = \frac{A_t - A_{ref}}{A_{ref}} \quad (2)$$

3.4. Observation et caractérisation de la migration 3D au sein du réseau Tridimensionnel.

3.4.1. Invasion de l'échafaudage par les cellules

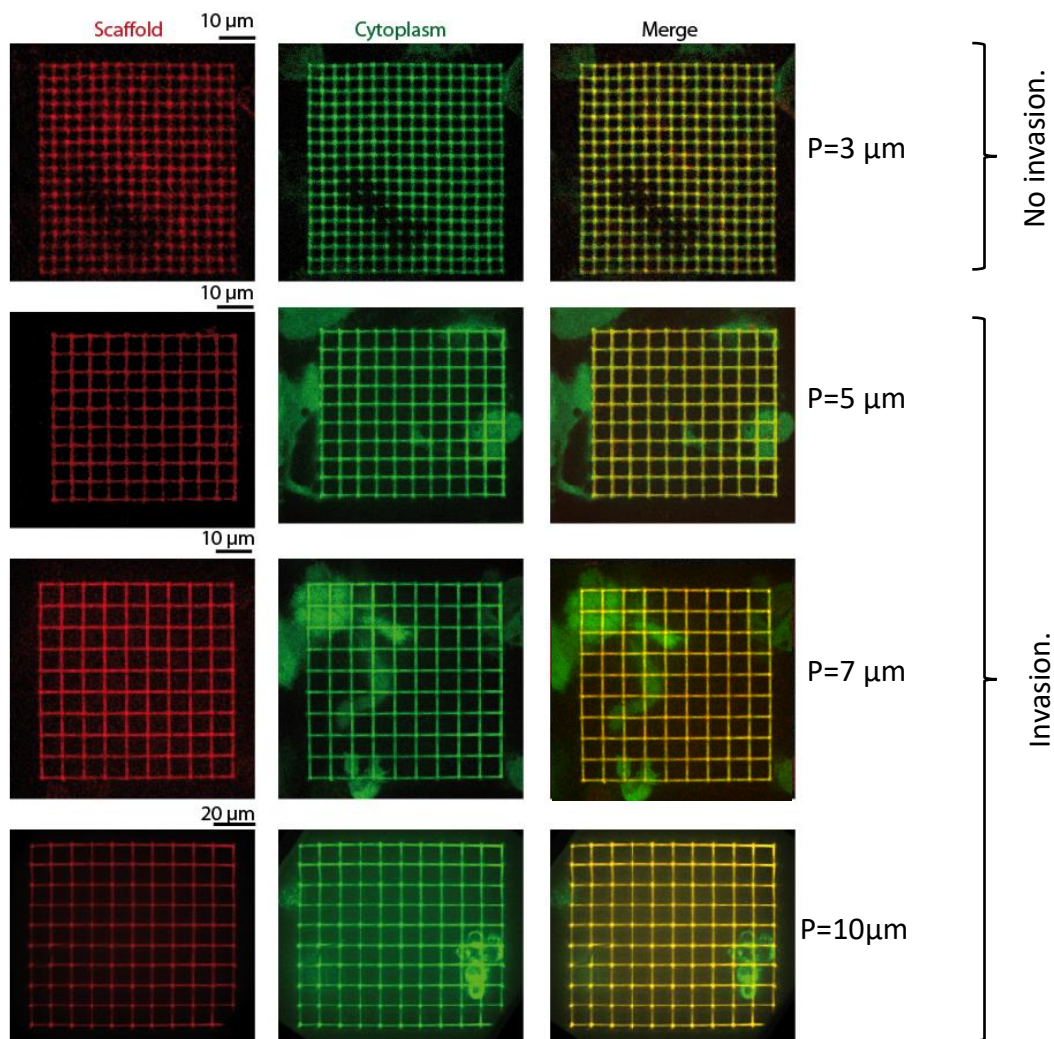


Figure 14 : Invasion des réseaux 3D par les macrophages. Images en fluorescence des réseaux envahis pas les macrophages. De haut en bas, les réseaux avec des périodes de 3, 5, 7 et 10 μm. De gauche à droite, en rouge les images des réseaux, en vert les images des du cytoplasme cellules. En vert et jaune, la fusion des images précédentes.

Après un marquage fluorescent des cytoplasmes cellulaires, une goutte de milieu contenant les macrophages est déposée sur la lamelle de verre sur laquelle les réseaux 3D ont été fabriqués. Les observations après 24 heures de culture ont montré que les macrophages étaient capables, sans aucun

stimulus, d'envahir les réseaux dont la période est de 5, 7 ou 10 μm . Ceci est observable sur les images de la figure 14, panel du centre et de droite. Aucun macrophage n'a été observé dans les réseaux de période de 3 μm , alors que certains touchent la paroi extérieure du réseau. Cette expérience a été réalisée à 3 reprises.

Une acquisition des images tous les micromètres permet de faire des reconstructions 3D du réseau et de la cellule. La figure 15 montre deux vues : soit par le dessous de la lame de verre soit une vue latérale du réseau après reconstruction 3D. Ces reconstructions permettent de visualiser la cellule et de la positionner correctement au sein du réseau 3D. Nous pouvons voir sur la figure 18 et notamment sur la vue latérale que la cellule en vert s'étend sur deux niveaux du réseau. Malheureusement seuls les niveaux 0 et 1 sont observables. Nous avons acquis des images sur ces deux niveaux uniquement, car le signal fluorescent n'est pas suffisamment important et résolu au-delà de ces deux niveaux et surexposer les cellules au laser pour augmenter ce signal pourrait conduire à une photo toxicité.

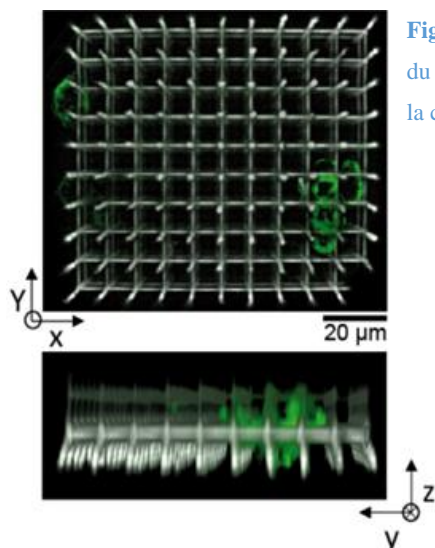


Figure 15 : Vue 3D d'un réseau envahie par un macrophage. En haut, vue 3D du dessous du réseau. En bas, vue latérale du réseau. Le réseau apparaît en blanc, la cellule en vert.

L'observation des macrophages par microscopie électronique à balayage (MEB) après 24 heures de culture cellulaire et fixation permet de bien visualiser l'invasion des réseaux tridimensionnels par les macrophages. La figure 19 montre 4 images MEB de macrophages fixés dans des réseaux de période de 10 μm . Les macrophages placent l'essentiel du corps cellulaire à l'intérieur de deux mailles et forment clairement des protrusions qui contactent les poutres suspendues. Deux types de contacts sont observables :

- La cellule fait un contact tout le long d'une poutre, seulement sur une moitié ou moins de la surface du cylindre. Le contact se situe du côté intérieur de la maille où se trouve la cellule. Voir la flèche bleue sur la figure 19.
- La cellule fait un contact étroit avec une poutre qui encercle cette dernière. Voir la flèche rouge sur la figure 19.

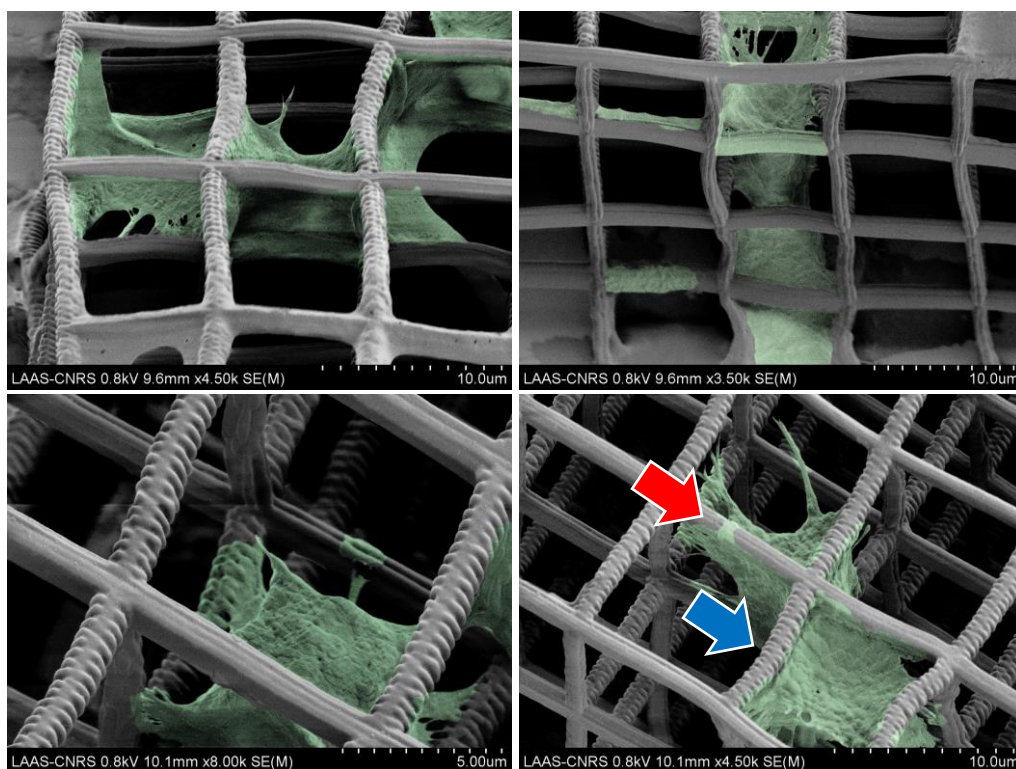


Figure 16 : Images par microscopie électronique à balayage des macrophages fixés dans les réseaux après 24h de culture cellulaire. Les macrophages ont été colorisés par traitement d'images en vert. On peut observer que les macrophages s'étendent sur plusieurs mailles du réseau et font des contacts avec différentes poutres du réseau. La flèche A pointe un exemple typique de contact long, la flèche B pointe un exemple typique de contact encerclant.

Ces deux observations, par MEB et par microscopie optique en fluorescence, nous ont permis d'observer des macrophages vivants ou fixés ayant migré 24 heures dans les treillis tridimensionnels, avec une période égale à $5\text{ }\mu\text{m}$ ou plus. Une dernière observation par immunofluorescence a été réalisée pour caractériser plus finement les contacts des macrophages avec les poutres du réseau.

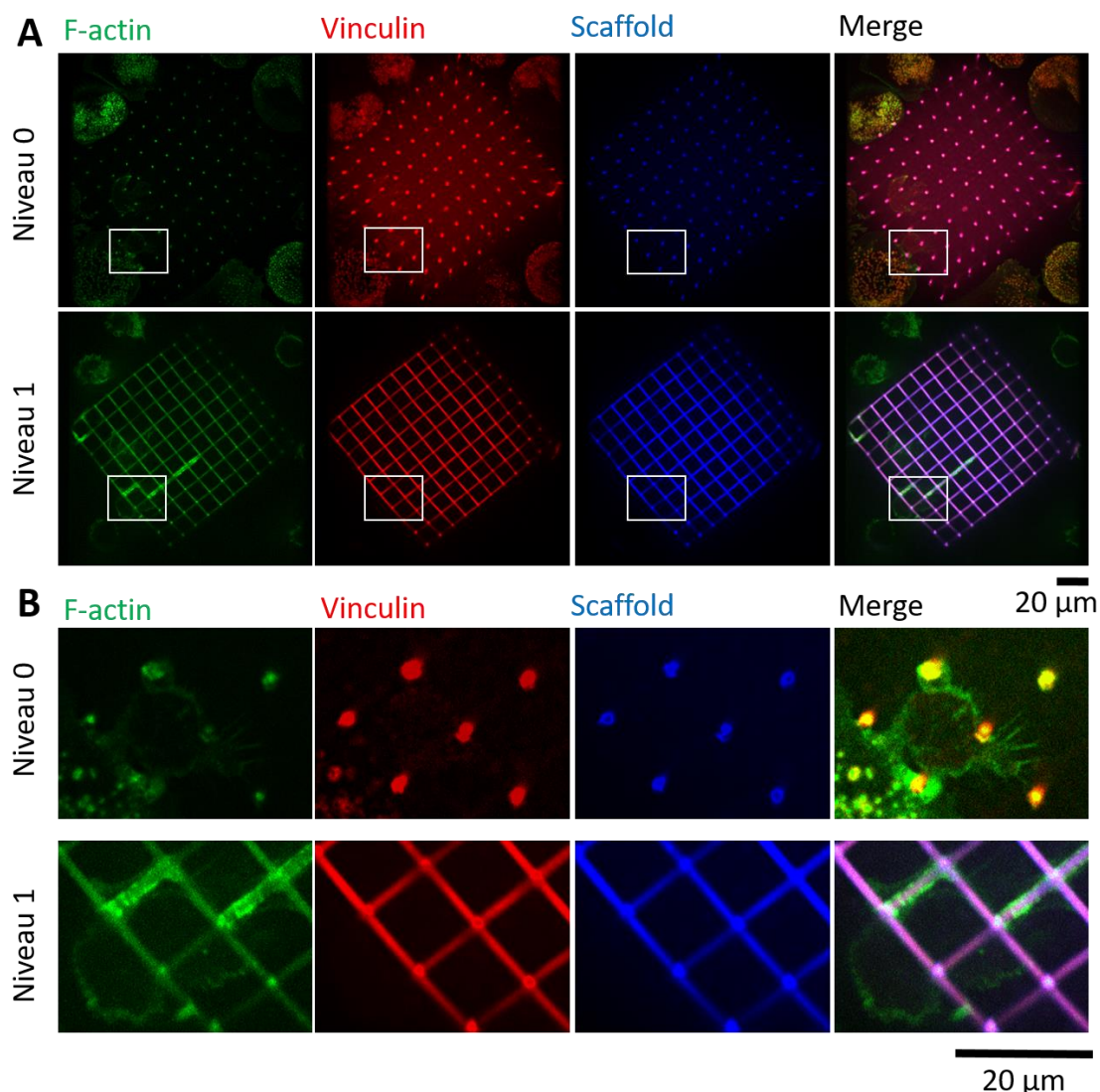


Figure 17 : Observation par immunofluorescence de réseaux de période 10 μm et des macrophages. (A) La première ligne correspond à l'intensité fluorescente acquise sur la lamelle de verre. Le réseau est autofluorescent pour toutes les longueurs d'onde utilisées. En vert, nous observons l'actine filamenteuse qui forme le cœur des podosomes, en rouge nous observons la vinculine que nous retrouvons dans l'anneau des podosomes. En bleu, nous observons le réseau. À droite nous observons la fusion des trois longueurs d'onde. (B) Zoom sur un macrophage étant partiellement rentré dans le réseau.

Deux protéines ont été marquées pour caractériser les éventuelles structures d'adhésion des macrophages dans les réseaux. L'actine filamenteuse, visible sur la première colonne de la figure 17 et la vinculine, montrée sur la deuxième colonne. Ces protéines sont notamment utilisées par les macrophages pour former leur podosome, structure subcellulaire d'adhésion présentée dans le paragraphe 1.2. du chapitre 1. La vinculine est concentrée dans l'anneau du podosome alors que l'actine filamenteuse est située dans le corps du podosome. Ces structures sont observables pour des macrophages migrant en 2D sur la lamelle de verre. Nous pouvons également les observer pour les macrophages se trouvant dans le réseau, mais ayant une partie adhérente à la lamelle de verre à l'extérieur du réseau. L'actine filamenteuse est aussi repérable sur les poutres du réseau, observable

sur la figure 17 première image de la deuxième ligne. Nous observons un surlignage de certaines poutres du réseau par l'actine filamenteuse. Cette observation est à rapprocher des observations au microscope électronique de la figure 16 où nous avons caractérisé des contacts larges occupant des poutres complètes. La vinculine que nous pouvons observer au sein des macrophages situés sur lamelle de verre n'est pas observable au sein du réseau et sur les poutres. Le réseau étant lui-même fluorescent à la longueur d'onde utilisée pour observer la vinculine, nous pouvons supposer que ce signal gêne la visibilité de la vinculine dont le signal est plus faible où alors que les macrophages impliqués dans l'invasion du réseau 3D ne génèrent aucune structure riche en vinculine.

Nous n'avons pas pu observer distinctement de posodomes sur les poutres du réseau, en revanche la forte présence d'actine filamenteuse le long de certaines poutres suggère que les macrophages utilisent cet élément du cytosquelette pour migrer de manière originale au sein de ces treillis 3D.

Nous nous intéressons désormais au suivi tridimensionnel de la migration des macrophages.

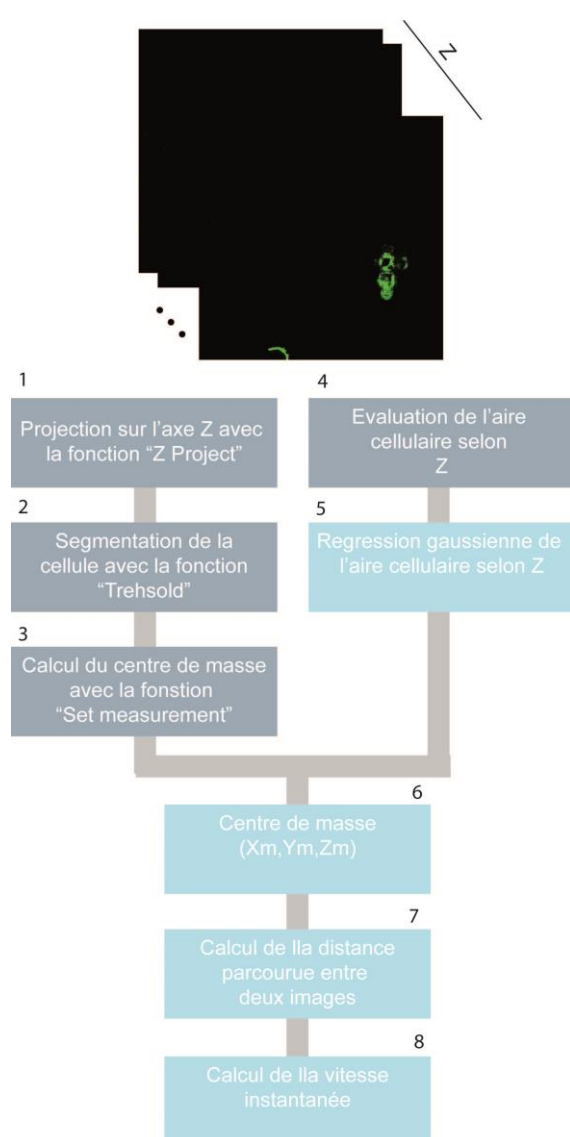


Figure 18 : Vision schématique du traitement d'images pour le suivi d'un macrophage. (1-3) Traitement d'image réalisé pour déterminer les coordonnées X et Y du centre de masse de la cellule. (4 et 5) Traitement d'images réalisé pour déterminer la coordonnée Z du centre de masse. (6-8) Suivi du centre de masse de la cellule au cours du temps, évaluation de la distance parcourue entre chaque image et sa vitesse.

Les cellules sont marquées avec un marqueur du cytoplasme cellulaire nommé « cell tracker ». Une image du réseau est acquise tous les microns sur 30 μm de hauteur. Cette séquence d'acquisition se répète toutes les 2 minutes, voir figure 18. Pour suivre le mouvement de la cellule dans le plan XY, à chaque instant, une image est reconstituée en prenant l'intensité maximale de chaque couple (X, Y) le long de l'axe Z (bloc 1 de la figure 18). Cela permet d'avoir une projection plane de la cellule. Cette image est segmentée (bloc 2) : les pixels les plus lumineux, qui représentent la cellule sont passés à 1 et les autres à 0. Le centre de masse de

la cellule est évalué à l'aide de la fonction « center of mass » du logiciel imageJ (bloc 2). Cette fonction calcule la moyenne pondérée par l'intensité de fluorescence des coordonnées de la sélection (ici, la cellule). Tous les pixels de la cellule valent 1 grâce à la segmentation.

Pour évaluer la position en Z, à chaque instant, toutes les images en Z sont segmentées. Le nombre de pixels (donc l'aire) représentant la cellule est alors évalué pour chaque image se trouvant sur cet axe Z (bloc 5). Plus nous nous rapprochons du centre de la cellule, plus le nombre de pixels représentant la cellule sera grand. La courbe représentant le nombre de pixels cellulaires le long de l'axe z forme une distribution. Pour trouver, la position du centre de masse sur l'axe z, une gaussienne est ajustée sur cette courbe. Le maximum de la gaussienne est pris pour la coordonnée Z du centre de masse de la cellule. Ceci est fait pour toutes les séquences d'images en Z au cours du temps. Nous connaissons alors le mouvement parcouru par la cellule sur cet axe.

Enfin la distance parcourue entre deux images est calculée grâce à l'équation 3, étape 7 :

$$d_t = \sqrt{(x_{t+1} - x_t)^2 + (y_{t+1} - y_t)^2 + (z_{t+1} - z_t)^2} \quad (3)$$

La vitesse instantanée est calculée en divisant d_t par l'intervalle de temps (2 minutes) entre les deux images, bloc 8. La trajectoire typique selon les trois axes X, Y et Z d'une cellule migrant dans un réseau de période 10 μm est donnée sur le graphique de la figure 19. Nous voyons sur ce graphique que le macrophage parcourt quelques micromètres principalement selon l'axe Y et Z pendant 110 minutes.

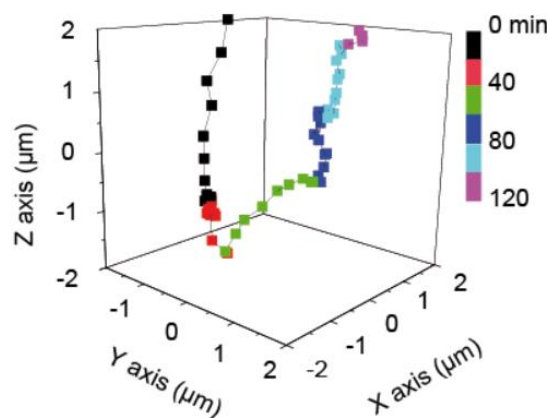


Figure 19 : Suivi de la migration cellulaire. Le graphique, montre la distance parcourue selon les axes X, Y et Z par un macrophage humain migrant dans un réseau de 10 μm de période. La couleur indique l'échelle du temps.

Le calcul de la vitesse instantanée a été réalisé pour deux cellules de donneurs différents. La distance parcourue entre deux images est de 0.24 μm en moyenne pour l'une et 0.48 μm pour l'autre dans les trois directions. Sachant que les images ont été prises avec un intervalle de 2 min, cela revient

à une vitesse instantanée de 7 et 14 $\mu\text{m/h}$. Ces vitesses de migration sont proches des vitesses typiques de macrophages migrant dans des gels (voir chapitre 1).¹²

Nos observations montrent que le macrophage migre réellement en 3D au sein de ces réseaux et ne reste pas positionné dans un seul plan de l'édifice. Cette migration ne s'effectue pas à vitesse constante, nous observons sur l'exemple de la figure 19 un ralentissement du déplacement sur la plage rouge (de 20 à 40 minutes), phase qui correspond d'ailleurs à un changement de direction de mouvement en Z. Dans nos expériences, les macrophages sondés évoluent dans un environnement 3D complexe dont les indices mécaniques évoluent constamment au cours de leur migration. La progression des macrophages réclame une adaptation permanente au contexte 3D ce qui contraste fortement avec une migration 2D sur une surface homogène pour laquelle l'environnement mécanique du macrophage est constant. Ainsi la migration au sein de ces réseaux 3D propose à chaque instant un problème nouveau à la cellule qui doit s'adapter par une démarche continue de résolution du problème mécanique qui lui est proposé. Les phases de ralentissement observées sont probablement la trace de situations mécaniques compliquées qui ont nécessité une réorganisation importante du cytosquelette cellulaire. Ceci suggère l'intérêt que pourrait revêtir une étude plus approfondie et systématique sur une large population cellulaire de la dynamique de migration des macrophages au sein de ces réseaux afin d'essayer par exemple de comprendre quelles sont les géométries spatiales qui posent problème à la migration pour une taille de porosité du réseau fixé (par exemple pour une période de 10 μm). Nous n'avons pas eu le temps matériel pour entreprendre ce genre d'études et nous nous sommes focalisés sur la démonstration que ce type de réseau déformable pouvait être exploité afin de mesurer les efforts mécaniques exercés par la cellule lors de sa migration 3D.

¹² Van Goethem, E et al. (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages : differential involvement of proteases and podosome-like structures. *Journal of Immunology*. **184**, 1049-1061

3.4.2. Déformation du réseau par un macrophage

Les macrophages migrent avec succès dans des réseaux de périodes allant de 5 à 10 μm . L'objectif est maintenant d'observer la déformation des poutres liée à cette activité migratoire. Cette partie du chapitre s'appuiera sur une expérience unique et sur l'analyse des forces de migration d'une seule cellule. Cela constituera une preuve de concept de l'approche poursuivie. Pour cela, nous avons sélectionné une séquence particulière d'un macrophage humain migrant au sein d'un réseau de période 10 μm .

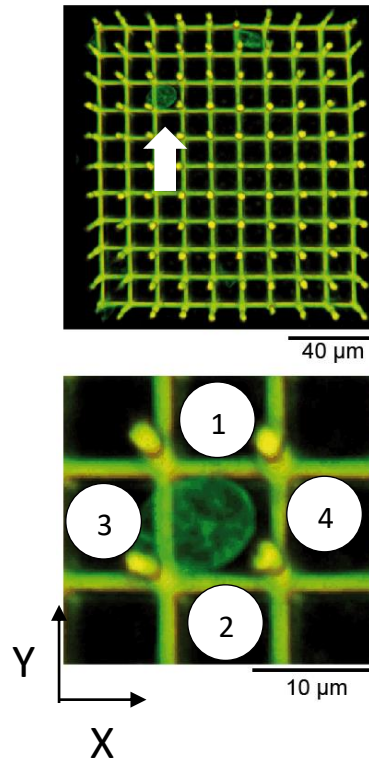


Figure 20 : Vue tridimensionnelle du noyau cellulaire dans un treillis cubique de 10 μm de période. En haut, reconstitution d'une vue tridimensionnelle des niveaux 0 et 1 du réseau. Deux noyaux des macrophages, marqués au Hoechst, sont présents entre la lamelle de verre et du niveau 1 du réseau. En bas, zoom sur l'un des noyaux de la cellule repérée par une flèche et numérotation des poutres encadrant le noyau.

Après 24 heures de culture dans le réseau tridimensionnel, pendant 2 heures toutes les 2 minutes une série d'images est acquise : soient 29 images tous les 500 nm en Z (depuis la lamelle de verre vers le haut du treillis). Nous avons utilisé un marquage Hoechst pour observer le noyau de nos cellules. Ce marquage permet d'affirmer que le déplacement des poutres est lié à la présence d'une seule cellule et non plusieurs. Dans l'expérience choisie, deux cellules avaient envahi le treillis après 24 heures de culture. La reconstruction 3D du réseau et des noyaux est montrée dans la figure 20, panel du haut. Ces deux macrophages sont suffisamment loin l'un de l'autre pour pouvoir étudier leur impact sur le réseau de façon indépendante. Notre étude va se concentrer sur le macrophage qui est le plus au centre

du treillis, pointé par une flèche blanche sur la figure 20. Le noyau du macrophage se trouvant entre le niveau 0 et le niveau 1 du réseau est observable en vue agrandie sur le panel du bas de la figure 20. Nous pouvons remarquer que le diamètre du noyau est proche de $10\text{ }\mu\text{m}$, soit la période du réseau.

Les quatre poutres nommées 1, 2, 3 et 4 sur la figure 20 et qui entourent le noyau seront étudiées par la suite. Les nœuds formés par ces 4 poutres seront également étudiés dans la partie suivante.

Evaluation des déplacements des nœuds & des poutres

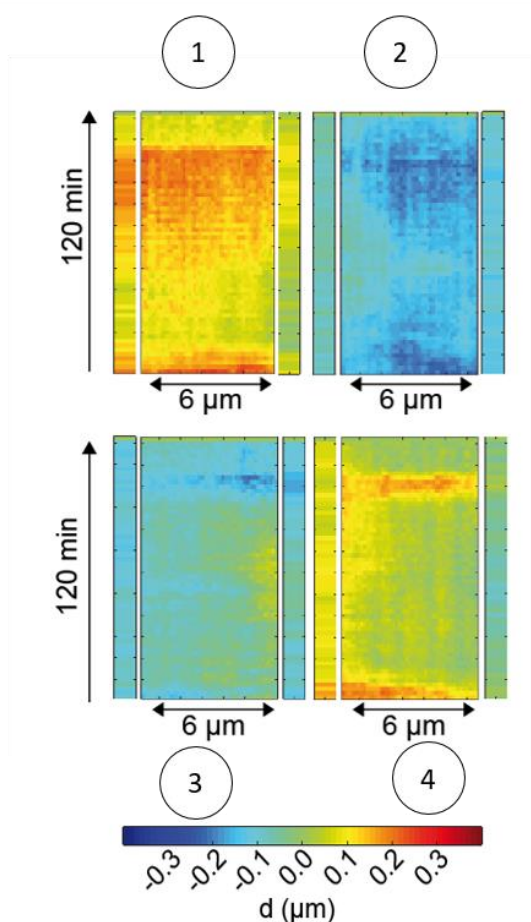


Figure 21 : Kymographes des déformations des poutres et des nœuds adjacents au cours du temps. Les abscisses représentent la position latérale de la poutre. Sur chacun des kymographes qui montrent le mouvement des poutres numéroté de 1 à 4 (Fig. 20) est représenté le mouvement normal à l'axe des poutres selon l'ordonnée. Le mouvement normal des nœuds adjacents est représenté de part et d'autre de la poutre. Enfin, l'échelle de couleur indique le sens de la déformation ainsi que l'intensité selon l'échelle en dessous des kymographes.

La déformation des poutres au cours du temps est représentée sur la figure 21. Le kymographe 1 de cette figure représente le mouvement selon l'axe Y de la poutre 1 définie sur la figure 20, au cours du temps, ainsi que le mouvement selon le même axe des nœuds adjacents sous la forme des bandes de couleur plus étroites situées de part et d'autre de la poutre. Poutres et nœuds sont arbitrairement définis en choisissant pour la poutre une région de $6\text{ }\mu\text{m}$ centré sur celle-ci et pour les nœuds adjacents des régions de $2\times 2\text{ }\mu\text{m}$. D'après ce premier kymographe, la poutre est poussée vers les X positifs (axe défini sur la figure 20). Nous remarquons également que la cellule a poussé sur cet axe à deux moments distincts, au début de la séquence puis une centaine de minutes plus tard. Lors de la deuxième poussée, le nœud à gauche de la poutre a également été déplacé selon l'axe X et dans le même sens. D'après le kymographe de la poutre 2, figure 20 et 21, la poutre est poussée vers les X négatifs. On peut remarquer également que la cellule pousse au début de l'acquisition puis environ 100 minutes plus tard, c'est-à-dire en même temps que sur la poutre 1. Les nœuds adjacents sont également poussés dans le même sens avec cependant une amplitude plus faible. La cellule examinée a donc tendance à écartier vers l'extérieur de manière synchronisée les poutres 1 et 2. Le même constat peut être fait pour les poutres 3 et 4, la cellule pousse ces poutres vers l'extérieur de la face

du treillis entourée par les poutres 1,2,3 et 4. Cette cellule a donc tendance à agrandir la face du treillis comprise entre les poutres 1,2,3 et 4.

Ces mesures nous permettent d'affirmer que la cellule applique des forces de poussée sur la structure et non des forces de traction sur les poutres. Cet effort mécanique provoque un agrandissement de l'aire de la face de la maille au sein de laquelle se trouve le centre de masse de la cellule.

Dans notre cas d'étude, il est possible d'évaluer la déformation relative d'une face du treillis telle que nous l'avons définie dans la partie 3.3.3. Nous obtenons une déformation de la surface de la face considérée de 5 % en moyenne et de 10 % au maximum. L'évolution au cours du temps de l'aire de la maille est donnée par le graphique de la figure 22. D'après cette courbe, nous pouvons observer que la surface de la maille est maximale à deux instants de la séquence sélectionnée : au début et une centaine de minutes après. Cela est concordant avec les observations décrites dans la partie précédente.

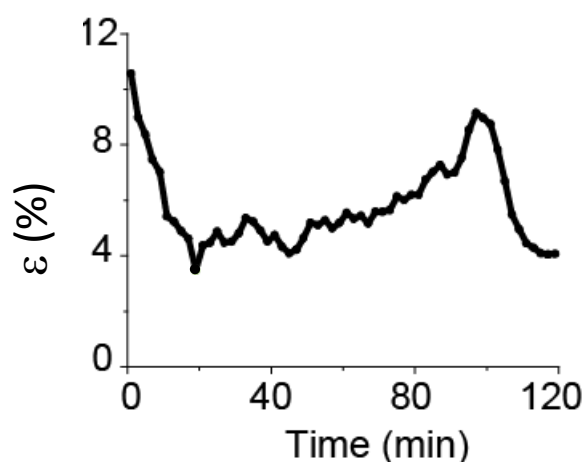


Figure 22 : Evolution de la déformation relative de la face du treillis définie par les poutres 1, 2, 3 et 4 au cours de la migration du macrophage en son sein.

3.4.3. Evaluation des forces cellulaires dans le contexte 3D

Les mouvements des poutres 1, 2, 3 et 4 enregistrés dans le plan (X, Y) montrent que la cellule applique des forces de poussée sur les 4 poutres d'une même face d'une des mailles du réseau. Les mouvements selon l'axe z n'ont pas été mesurés pour des raisons de résolution (1 image tous les 500 nm pour des déplacements de 300 nm). Pour évaluer les forces appliquées sur une maille 3D, nous sommes conduits à faire l'hypothèse suivante : la cellule applique des forces uniformes dans les trois directions (X, Y et Z). C'est-à-dire que nous faisons une extrapolation de nos résultats en formulant l'hypothèse que la cellule applique également des forces de poussée dans la direction perpendiculaire à la lamelle.

Un treillis tridimensionnel cubique formé de poutres cylindriques rectilignes, tel que nous l'avons fabriqué n'est pas un milieu continu, car il contient des éléments solides : les poutres et les nœuds et des espaces vides entre ceux-ci. Il s'agit d'un milieu périodiquement poreux. Cependant, de

nombreuses simulations mécaniques^{13,14,15,16} ont montré que la réponse élastique de ces réseaux périodiques microfabriqués peut être décrite par un milieu élastique continu, dont la rigidité apparente dépend du module élastique du matériau constituant les poutres, de la structure de la maille choisie (ici cubique) et de la densité massique du réseau qui décrit donc sa porosité. Notre objectif étant de décrire la force de poussée globale générée par un macrophage en migration 3D confinée, nous avons choisi de représenter la réponse élastique du réseau entourant la cellule par celle d'un matériau plein, élastique et continu présentant des constantes élastiques apparentes (module de Young et module de Poisson). Nous allons dans un premier temps essayer d'évaluer ces constantes élastiques apparentes puis nous les utiliserons pour évaluer la contrainte de poussée exercée par le macrophage sur le réseau qui l'entoure.

Nous faisons donc une correspondance entre une maille cubique de notre réseau et un cube plein de même dimension. Ce cube doit être décrit par le même module de Young et le même coefficient de poisson que celui de la maille réelle (et donc différent de ceux de l'IP-Dip). Ce cube subirait alors des forces de poussées normales à ses faces vers l'extérieur.

Les propriétés mécaniques d'une maille du réseau.

Les propriétés mécaniques d'une maille d'un réseau cubique de période 10 μm , tel que fabriqué par lithographie optique biphotonique sont déterminées grâce à des simulations réalisées avec le logiciel Comsol. Pour ce faire, une maille 3D du réseau est modélisée à l'aide du logiciel en respectant les dimensions de la structure en IP-Dip (1,5 μm de diamètre pour les poutres cylindriques et 10 μm de longueur), voir figure 23. Une force dirigée dans la direction des Z positifs, répartie sur la surface des 4 demi-cylindres des 4 poutres de la face supérieure du cube (plan d'équation $Z=10\text{ }\mu\text{m}$) est appliquée. La face inférieure du cube (plan $Z=0\text{ }\mu\text{m}$) est fixe. Cette force génère une contrainte uniaxiale de traction (σ_{zz}) de 10 kPa, voir référentiel sur la figure 23. Cette contrainte sollicite la maille. L'allongement résultant de la maille selon l'axe Z (δz) et la contraction de la maille selon l'axe X (δx) obtenus par la simulation sont respectivement de 5.12 nm et 1.8 nm.

¹³ Jivkov PJ and Yates, JR. (2012). Elastic behaviour of a regular lattice for meso-scale modelling of solids. *Solids and Structures*. **49**, 3089-3099.

¹⁴ Bückmann, t et al. (2012). Tailored 3D Mechanical Metamaterials Made by Dip-in Direct-Laser-Writing Optical Lithography. *Advance Materials*. **24**, 2710-2714.

¹⁵ Bauer J et al. (2013). High-strength cellular ceramic composites with 3D microarchitecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **111**, 2453-2458

¹⁶ Meza LR et al. (2017). Reexamining the mechanical property space of the three-dimensional lattice architecture. *Acta Materialia*. **140**, 424-432.

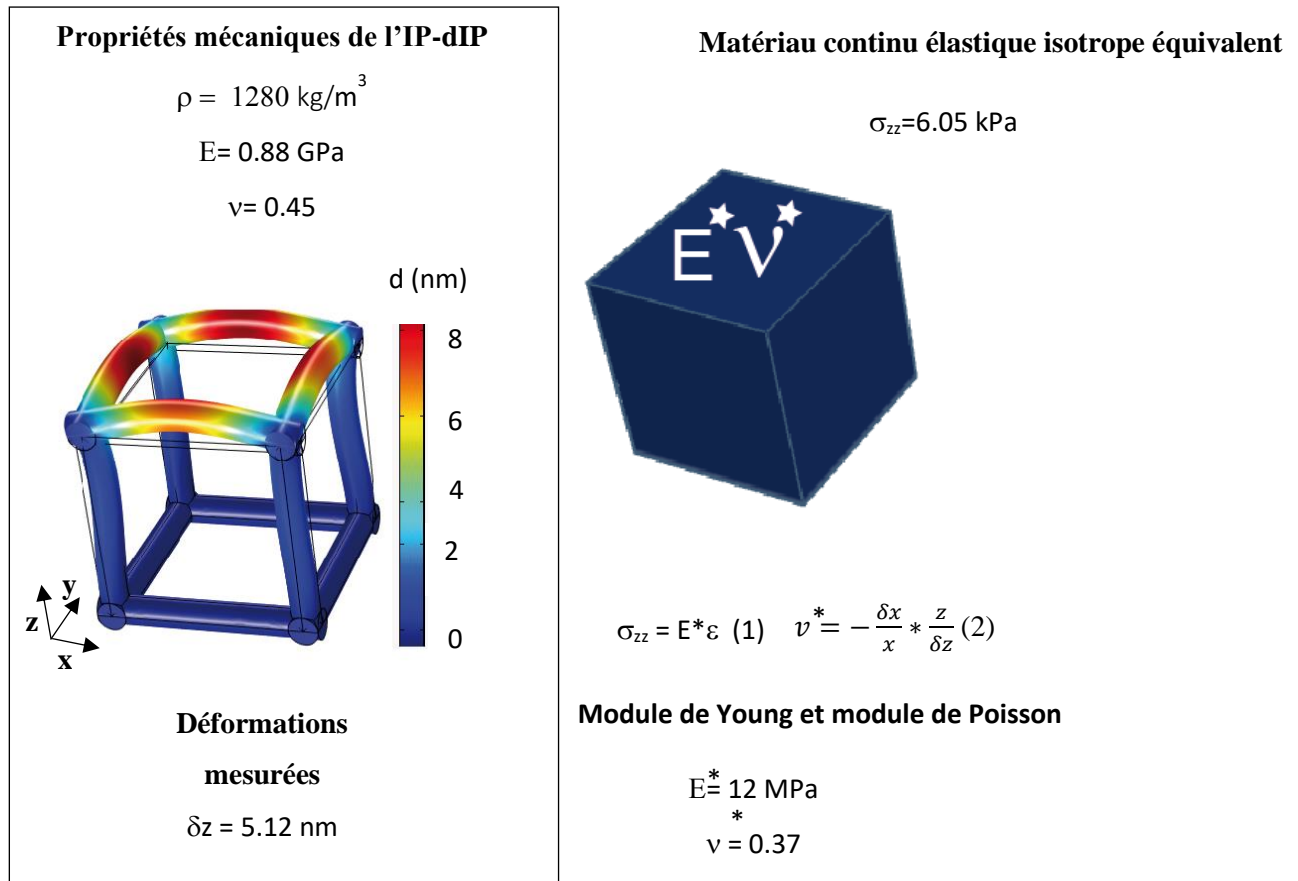


Figure 23 : Propriétés mécaniques d'une maille du réseau. À gauche, la simulation de la mise en tension uniaxiale d'une maille selon l'axe Z avec une contrainte de 10 kPa a été réalisée avec le logiciel Comsol. Cette simulation est réalisée avec les paramètres indiqués : la densité (ρ), le module de Young (E), le coefficient de poisson (ν) de l'IP-Dip et les dimensions mesurées d'une maille du réseau. À droite, un cube plein, continu, isotrope et élastique possédant les mêmes propriétés mécaniques qu'une maille du réseau est représenté. La même force qui met la maille en tension est appliquée selon l'axe Z pour mettre également ce cube en tension. On applique alors une contrainte équivalente de 6.05 kPa répartie sur la totalité de la surface de la face supérieure du cube. Le module de Young (E^*) et le coefficient de poisson (ν^*) de ce cube sont alors obtenus. On trouve un module de Young de 12MPa et un coefficient de poisson de 0.37.

Ces deux valeurs permettent de déterminer le module de Young d'un cube plein ayant les mêmes propriétés mécaniques que la maille, et subissant la même force de traction appliquée sur sa face supérieure. La contrainte équivalente sur cette face est alors de 6.05 kPa. Les lois de l'élasticité linéaire (équations 1 et 2 de la figure 23) permettent de déterminer respectivement le module de Young apparent et le module de poisson apparent de ce cube plein. Nous obtenons un module de Young de 12MPa et un module de Poisson de 0.37. Nous faisons donc désormais l'hypothèse que notre réseau 3D se comporte mécaniquement comme un matériau continu isotrope élastique ayant un module de Young apparent de 12 MPa et un module de Poisson de 0.37.

Expérimentalement nous avons mesuré uniquement la déformation d'une face dans un plan (X,Y) et nous ne connaissons pas la déformation dans la direction Z. Nous ne savons pas dire par exemple, si la maille considérée dans nos mesures s'allonge le long de la direction Z ou se contracte suivant cette direction. Afin d'évaluer l'effort mécanique appliquée par la cellule sur le treillis nous sommes donc obligés d'effectuer des hypothèses mécaniques simplificatrices qui prennent en compte l'une ou l'autre de ces possibilités. Dans la première hypothèse, nous supposons que la poussée observée dans le plan (X,Y) existe également dans la direction Z. Cette hypothèse conduit à considérer un tenseur des contraintes isotropes ($\sigma_{xx}=\sigma_{yy}=\sigma_{zz}=\sigma$) qui va donc allonger la maille dans la direction Z. Dans la seconde hypothèse, nous supposons que la poussée ne s'exerce que dans le plan (X,Y) et qu'aucune contrainte n'est appliquée suivant Z conduisant à un tenseur des contraintes biaxial ($\sigma_{xx}=\sigma_{yy}=\sigma$ et $\sigma_{zz}=0$) et donc un rétrécissement de la maille suivant l'axe Z. La situation réelle est plus complexe mais nous pensons que les valeurs de contraintes obtenues avec ces deux hypothèses

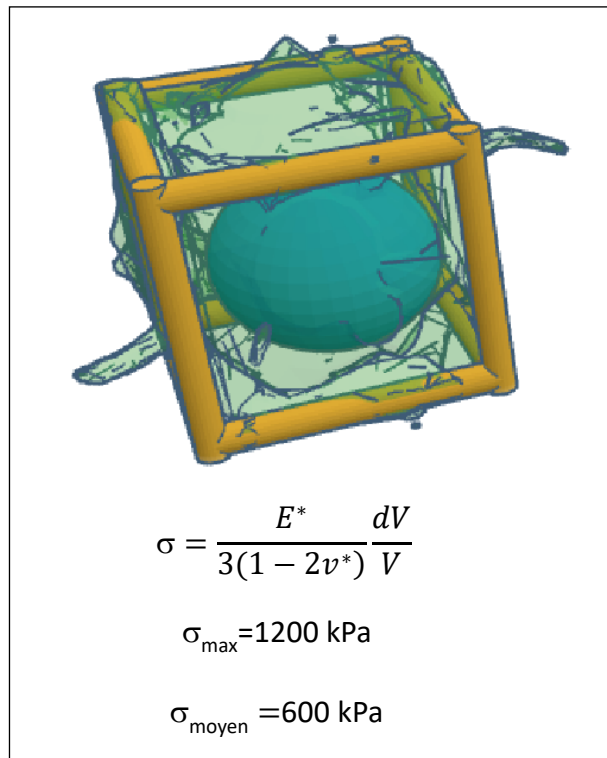


Figure 24 : Evaluation des forces cellulaires sur une maille du réseau. En supposant que la cellule applique des efforts identiques dans les trois directions X, Y et Z, on peut évaluer la contrainte appliquée à la maille en fonction du module de Young apparent (E^*), du coefficient de Poisson (ν^*) et de la variation de volume de la maille. La contrainte appliquée par la cellule d'après les mesures réalisées est de 600 kPa en moyenne et de 1200 kPa au maximum.

extrêmes fourniront un encadrement réaliste de la contrainte générée par la cellule en migration 3D.

Dans le cas du tenseur isotrope correspondant à la situation imagée sur la figure 24, les lois de l'élasticité des milieux continus permettent de calculer la contrainte à partir de la variation du volume du cube. Nos mesures indiquent que la surface d'une face de la maille se déforme comme indiqué sur la figure 22, avec une déformation moyenne dS/S de 5% et un maximum de déformation de 10%. Pour une sollicitation mécanique isotrope cela conduirait à une déformation relative du volume de la maille (dV/V) de 7.5% en moyenne et de 15 % au maximum. La relation de la figure 24 donne alors une contrainte de poussée isotrope moyenne de 600 kPa et une valeur maximale de 1200 kPa.

Dans le cas du tenseur biaxial, la contrainte de poussée biaxiale s'obtient à partir de la déformation de la face du cube dS/S selon la relation suivante : $\sigma = \frac{E^*}{2(1-\theta^*)} \frac{dS}{S}$. Nous obtenons dans ce cas une contrainte de poussée biaxiale moyenne de 480 kPa et une valeur maximale de 960 kPa.

L'ordre de grandeur que nous retenons donc est que la cellule exerce une contrainte de poussée sur le treillis d'environ 500 kPa au cours de la séquence migratoire analysée avec de brèves poussées plus intenses pouvant atteindre environ 1 MPa. Cet ordre de grandeur est compatible avec ce que nous attendions à partir de la simulation simple d'une poutre isolée et encastrée, telle que présentée sur la figure 9. Nous avons montré que la constante de raideur d'une telle poutre est de 42 nN/nm. Ainsi pour déplacer cette poutre de 0.25 μm ce qui correspond à ce que nous mesurons expérimentalement en moyenne, il faudrait appliquer une force ponctuelle de 10.5 μN au centre de la poutre (voir figure 9). Si nous répartissons cette même force sur la demi-surface du cylindre correspondant à cette poutre nous obtenons alors une contrainte de poussée de 430 kPa, qui est proche de notre estimation. Cette manière de répartir la force sur la demi surface totale du cylindre est compatible avec les structures d'adhérence présentées sur les images de microscopie électronique de la figure 16 (contacts longs non entourants). Ainsi, nous pensons que ces structures particulières, observées uniquement dans la situation de notre treillis tri-dimensionnel, qui concentrent de l'actine-F fibrillaire, génèrent sur ces poutres des forces typiques de l'ordre de 10 μN . L'ordre de grandeur de ces forces est imposant si on le compare à la poussée locale exercée par un seul podosome qui est de quelques dizaines de nN (voir chapitre 1), mais il est compatible avec l'ordre de grandeur de forces cellulaires mesurées de manière moins locale. Lemma et al.¹⁷ rapporte ainsi des forces de migration de cellules cancéreuses invasives comprises entre 1.8 μN et 40 μN . De même, les forces d'étalement de cellules endothéliales ont été évaluées à 2.5 μN par Hammer et al.¹⁸ Il est cependant important de

¹⁷ Lemma, ED et al. (2017) Microenvironmental stiffness of 3D polymeric structures to study invasive rates of cancer cells. *Advanced healthcare materials*, 1700888.

¹⁸ Reinhart-King, CA et al. (2005). The dynamics and Mechanis of Endothelial cell spreading. *Biophysical Journal*. **89**, 676-689.

rappeler ici que ces estimations ont été obtenues en considérant un module de rigidité de la résine IP-Dip constitutive de nos treillis 3D, de 0.88 GPa. Cette valeur a été extraite de mesures de la littérature sur des structures microfabriquées à 3D mais avec des paramètres d'écriture différents de ceux que nous avons utilisés. La mesure de la rigidité réelle des poutres polymérisées dans nos conditions de fabrication n'a pas pu être réalisée et il faut donc encore rester prudent sur la précision de nos estimations.

3.5. Conclusion

La microfabrication de treillis cubiques, avec des périodes variant de 5 à 10 μm , a permis l'étude de la migration des macrophages dans un environnement tridimensionnel permettant à la fois le confinement des cellules et la mesure des forces de migration. Pour des réseaux de 3 μm de période, les macrophages ne peuvent pas infiltrer ces treillis. Des pores de 6.25 μm^2 ne permettent donc pas l'invasion du treillis par les macrophages humains que nous avons étudiés.

En jouant sur les paramètres d'écriture des structures, il a été possible de moduler les propriétés mécaniques du réseau, et de les rendre suffisamment flexibles pour permettre aux macrophages de les déformer lors de leur migration

Nous avons choisi d'utiliser comme valeur du module de Young de la résine utilisée pour former le treillis la valeur dont les paramètres d'écriture de l'IP-Dip étudiée sont les plus proches de nos paramètres d'écriture. Cependant cette valeur impacte directement notre évaluation des forces de migration. En l'absence d'une étude propre sur la mesure du module de Young de l'IP-Dip après polymérisation avec nos paramètres d'écriture nous pensons donc avoir généré des mesures des forces cellulaires semi-quantitatives et non absolues. Il serait donc intéressant à l'avenir de mesurer le module de Young et le coefficient de Poisson de l'IP-Dip pour pouvoir remonter avec plus de certitude aux forces cellulaires mises en jeu. De plus, les différentes études utilisant l'IP-Dip et ses propriétés mécaniques montrent que ces dernières peuvent varier selon les différents paramètres d'écriture. Une étude plus détaillée de ces variations serait intéressante et pourrait être utile pour de nombreuses applications, comme changer la rigidité des structures sans changer leur géométrie. Cela permettrait également d'étudier l'influence de la rigidité du substrat sur la migration cellulaire. Il serait par exemple possible d'induire une anisotropie de rigidité dans la structure et de constater l'influence de celle-ci sur la direction de migration des macrophages.

La mesure des mouvements selon l'axe z à l'aide d'un microscope possédant une meilleure résolution axiale permettrait de valider l'hypothèse faite pour aboutir à nos résultats à savoir que la cellule applique des forces isotropes dans les trois directions.

L'étude de l'amplitude et des directions des forces cellulaires pourrait mener à mieux comprendre les différents modes de migration (amiboïde, mésenchymateux) et d'éventuellement étudier les paramètres contrôlant la transition d'un mode à l'autre en fonction de la porosité du treillis et/ou de sa rigidité mécanique. Le deuxième paramètre important pour ces différents types de migration est l'adhérence de la cellule sur le substrat. Dans nos expériences nous avons choisi de ne pas fonctionnaliser les poutres du réseau pour provoquer de l'adhérence cellulaire. Nous montrons que sans traitement adhésif intentionnel, les macrophages humains sont capables de migrer par poussée au sein de ce type de réseau. Fonctionnaliser les micros dispositifs avec des traitements de surface pour

inhiber complètement ou promouvoir l'adhérence pourrait permettre d'étudier plus finement les forces déployées dans les différents modes de migration.

Ces micro réseaux 3D permettent d'étudier les forces cellulaires (intensité relative, direction) et pourraient donc permettre de mettre en lumière des différences de comportement entre deux populations de cellules. Une expérience tout à fait naturelle à mener devra par exemple comparer des macrophages soumis à des molécules inhibant l'actine filamenteuse à des cellules non exposées à ces molécules.

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma du réseau avec une période de 10 μm . En haut à gauche, vue globale du treillis tridimensionnel. En haut à droite, zoom sur l'une des mailles du réseau, avec le diamètre (d) des poutres, et la période (p) de la maille. En bas, définition des niveaux du réseau. Le niveau 0 correspond au niveau de la lamelle de verre, puis le niveau 1 le niveau juste après la lamelle de verre et ainsi de suite jusqu'à atteindre le dernier, le plus éloigné de la lamelle de verre, nommé niveau 4.	87
Figure 2 : La lamelle de verre sur laquelle est déposée la résine (IP-Dip) est retournée sur le porte échantillon. L'objectif est en contact avec la résine. Cette dernière sert également de milieu d'immersion.....	88
Figure 3 : Principe de fonctionnement du Nanoscribe®. À gauche, l'ordinateur communique avec la plateforme piézoélectrique, les miroirs galvanométriques, la caméra et le laser pour piloter la position du point focal du laser pour fabriquer la structure. À droite, schéma du laser polymérisant la résine. Adapté du manuel d'instruction du Nanoscribe®.	90
Figure 4 : Anisotropie de polymérisation. A gauche, la direction de polymérisation, indiquée par la ligne bleue, est parallèle à des poutres et perpendiculaire aux autres. A droite, l'angle entre la polymérisation et les poutres est de 45° , de cette manière aucune anisotropie est introduite entre les poutres des plans (X, Y).....	91
Figure 5 : Schéma de la déformation des structures après séchage. A gauche, la structure est encore encerclée d'éthanol et non déformée. A droite est représentée la structure après le séchage de l'éthanol, les flancs sont déformés.	92
Figure 6 : Images MEB des réseaux 3D. A gauche, vue de dessus des réseaux. A droite, vue en diagonale des réseaux. De haut en bas, les réseaux avec des périodes de 3, 5, 7 et 10 μm sont présentés.	93
Figure 7 : Mesure de la période (p) et du diamètre (d) des poutres du réseau. En haut à gauche, schéma d'une maille du réseau, en haut à droite, résultats des mesures de la période (p) et du diamètre (d) des poutres, l'écart type (sd) est donné dans la dernière ligne du tableau. En bas à gauche, image de microscopie par fluorescence d'un réseau de période 7 μm , la ligne rouge indique là où a été mesuré le profil d'intensité de fluorescence selon l'axe Y, présenté en bas à droite.....	94
Figure 8 : Observation du niveau 1 d'un réseau de période 3 μm par microscopie de fluorescence. L'absence de polymérisation par endroits est due à la création de bulles lors du passage du laser sur l'interface résine/lamelle de verre.	95
Figure 9 : Simulation pour déterminer la raideur d'une poutre. Au-dessus, une poutre de 1.5 μm de diamètre et de 10 μm de longueur dont les deux extrémités sont encastrées se déforme sous l'action d'une force normale à la surface de la poutre appliquée au centre de celle-ci. Sur le graphique est	

représentée la déformée de la poutre en fonction de l'amplitude de la force appliquée. Les forces appliquées vont de 50 à 500 nN par pas de 50 nN.	98
Figure 10 : Schéma de la séquence des traitements appliquée aux images acquises. (1-4) Prétraitements des images à l'aide du logiciel d'imageJ. (5-6) Traitement d'images permettant de suivre les nœuds du réseau. (7-11) Traitement d'images permettant de mesurer le mouvement des poutres du réseau. (12-13) Calcul des mouvements des nœuds et des poutres et création des kymographes.	100
Figure 11 : Acquisition des images. Une pile d'images des réseaux est acquise toutes les 2 minutes pendant 2 heures, puis les cellules sont lysées avec un détergent (SDS), une image référence du réseau sans contrainte est finalement acquise.....	101
Figure 12 : Traitement des séquences d'images prés traitées avec le logiciel Image J pour obtenir le déplacement des poutres. (a) Image d'origine. (b) Le contraste de l'image est augmenté en utilisant le plugin « Enhance contrast » d'imageJ. (c) Le bruit de fond est soustrait en utilisant le plugin « subtract background. (d) Les images sont recalées les unes par rapport aux autres en utilisant le plugin « Template matching ».....	102
Figure 13 : Limite de détection du mouvement des poutres et des nœuds qui ne sont pas en contact avec les cellules. Nous représentons ici l'écart-type δ autour de la position d'origine des poutres et des nœuds. Cet écart-type représentatif du bruit de mesure et des traitements d'images est de 26 nm en moyenne pour les poutres et de 38 nm pour les nœuds avec un écart-type (écart-type de l'écart-type) de 16 et 17 nm respectivement. Les barres horizontales correspondent aux max et min, le grand carré correspond à l'encadrement de 70 % des valeurs, les barres verticales l'écart-type, le petit carré la moyenne et la grande barre, la médiane.	104
Figure 14 : Invasion des réseaux 3D par les macrophages. Images en fluorescence des réseaux envahis pas les macrophages. De haut en bas, les réseaux avec des périodes de 3, 5, 7 et 10 μm . De gauche à droite, en rouge les images des réseaux, en vert les images des du cytoplasme cellules. En vert et jaune, la fusion des images précédentes.	105
Figure 15 : Vue 3D d'un réseau envahie par un macrophage. En haut, vue 3D du dessous du réseau. En bas, vue latérale du réseau. Le réseau apparaît en blanc, la cellule en vert.....	106
Figure 16 : Images par microscopie électronique à balayage des macrophages fixés dans les réseaux après 24h de culture cellulaire. Les macrophages ont été colorisés par traitement d'images en vert. On peut observer que les macrophages s'étendent sur plusieurs mailles du réseau et font des contacts avec différentes poutres du réseau. La flèche A pointe un exemple typique de contact long, la flèche B pointe un exemple typique de contact encerclant.....	107
Figure 17 : Observation par immunofluorescence de réseaux de période 10 μm et des macrophages. (A) La première ligne correspond à l'intensité fluorescente acquise sur la lamelle de verre. Le réseau est autofluorescent pour toutes les longueurs d'onde utilisées. En vert, nous observons l'actine filamenteuse qui forme le cœur des podosomes, en rouge nous observons la vinculine que nous	

retrouvons dans l'anneau des podosomes. En bleu, nous observons le réseau. À droite nous observons la fusion des trois longueurs d'onde. (B) Zoom sur un macrophage étant partiellement rentré dans le réseau..... 108

Figure 18 : Vision schématique du traitement d'images pour le suivi d'un macrophage. (1-3) Traitement d'image réalisé pour déterminer les coordonnées X et Y du centre de masse de la cellule. (4 et 5) Traitement d'images réalisé pour déterminer la coordonnée Z du centre de masse. (6-8) Suivi du centre de masse de la cellule au cours du temps, évaluation de la distance parcourue entre chaque image et sa vitesse. 109

Figure 19 : Suivi de la migration cellulaire. Le graphique, montre la distance parcourue selon les axes X, Y et Z par un macrophage humain migrant dans un réseau de 10 μm de période. La couleur indique l'échelle du temps..... 110

Figure 20 : Vue tridimensionnelle du noyau cellulaire dans un treillis cubique de 10 μm de période. En haut, reconstitution d'une vue tridimensionnelle des niveaux 0 et 1 du réseau. Deux noyaux des macrophages, marqués au Hoechst, sont présents entre la lamelle de verre et du niveau 1 du réseau. En bas, zoom sur l'un des noyaux de la cellule repérée par une flèche et numérotation des poutres encadrant le noyau..... 112

Figure 21 : Kymographes des déformations des poutres et des nœuds adjacents au cours du temps. Les abscisses représentent la position latérale de la poutre. Sur chacun des kymographes qui montrent le mouvement des poutres numéroté de 1 à 4 (Fig. 20) est représenté le mouvement normal à l'axe des poutres selon l'ordonnée. Le mouvement normal des nœuds adjacents est représenté de part et d'autre de la poutre. Enfin, l'échelle de couleur indique le sens de la déformation ainsi que l'intensité selon l'échelle en dessous des kymographes. 113

Figure 22 : Evolution de la déformation relative de la face du treillis définie par les poutres 1, 2, 3 et 4 au cours de la migration du macrophage en son sein. 115

Figure 23 : Propriétés mécaniques d'une maille du réseau. À gauche, la simulation de la mise en tension uniaxiale d'une maille selon l'axe Z avec une contrainte de 10 kPa a été réalisée avec le logiciel Comsol. Cette simulation est réalisée avec les paramètres indiqués : la densité (ρ), le module de Young (E), le coefficient de poisson (ν) de l'IP-Dip et les dimensions mesurées d'une maille du réseau. À droite, un cube plein, continu, isotrope et élastique possédant les mêmes propriétés mécaniques qu'une maille du réseau est représenté. La même force qui met la maille en tension est appliquée selon l'axe Z pour mettre également ce cube en tension. On applique alors une contrainte équivalente de 6.05 kPa répartie sur la totalité de la surface de la face supérieure du cube. Le module de Young (E^*) et le coefficient de poisson (ν^*) de ce cube sont alors obtenus. On trouve un module de Young de 12MPa et un coefficient de poisson de 0.37. 117

Figure 24 : Evaluation des forces cellulaires sur une maille du réseau. En supposant que la cellule applique des efforts identiques dans les trois directions X, Y et Z, on peut évaluer la contrainte appliquée à la maille en fonction du module de Young apparent (E^*), du coefficient de Poisson (ν^*) et

de la variation de volume de la maille. La contrainte appliquée par la cellule d'après les mesures réalisées est de 600 kPa en moyenne et de 1200 kPa au maximum. 118

Conclusion Générale

Les macrophages migrent dans les tissus pour accomplir leur rôle d'agent du système immunitaire, par exemple, phagocyter des bactéries ou réparer les tissus endommagés. La régulation de cette activité est dépendante de l'environnement au travers duquel ils évoluent. Ce micro-environnement peut présenter des caractéristiques topologiques et mécaniques fortement variables en fonction de contextes pathologiques particuliers. Ainsi sa rigidité mécanique apparente, sa géométrie non plane de nature tridimensionnelle, le confinement spatial qu'il peut imposer à la cellule sont des déterminants importants qu'il faut étudier de manière originale. Comprendre les mécanismes de migration mis en place par ce type de cellule pour s'adapter aux différents environnements rencontrés est un enjeu important, à la fois de nature fondamentale, mais également de nature appliquée. Si l'on songe à découvrir des molécules ou des moyens thérapeutiques permettant de moduler la migration de ces macrophages dans les différents contextes pathologiques où leur activité aide à la propagation de la maladie.

Pour répondre à ces problématiques, nous avons présenté dans cette thèse des recherches réalisées pour mesurer les forces mécaniques exercées par des macrophages humains sur des micro-environnements reconstitués *ex vivo* et permettant outre la mesure des efforts mécaniques cellulaires la reconstitution d'un environnement structuré dans les trois directions de l'espace et induisant un confinement spatial important. Grâce à l'utilisation des microtechnologies de salle blanche nous avons ainsi fabriqué des microenvironnements riches et complexes pour étudier la migration cellulaire d'une manière originale qui se démarque des études déjà réalisées sur des substrats plans bidimensionnels, peu représentatifs, selon nous, des conditions physiologiques. En effet, la structuration d'une surface de silicium à l'aide de procédés de photolithographie et de gravure sèche a permis de fabriquer un moule avec des motifs microscopiques qui a permis de générer ces micro-environnements cellulaires particuliers. Ainsi l'utilisation de procédés développés au départ pour la fabrication des micro et nano composants pour l'électronique s'est révélé être une solution pour fabriquer des capteurs mécaniques répondant aux cahiers des charges imposés par les problématiques biologiques que nous soulevons.

Le premier dispositif qui a été conçu et fabriqué pour étudier les forces générées par des macrophages humains lors d'une migration spatialement confinée est constitué de microcanaux fluidiques de dimensions contrôlées équipés de micropiliers déformables, servant de capteurs de forces. Nous avons ensuiteensemencé des macrophages humains à l'intérieur de ces dispositifs, puis observé finement la flexion des micropiliers engendrée par les forces cellulaires appliquées par les macrophages lors de leur migration au sein de ces canaux. Grâce au développement d'un algorithme permettant l'analyse des images, nous avons pu évaluer les forces générées dans différentes zones cellulaires et révéler que les cellules redirigent les forces de pression de l'intérieur vers l'extérieur

lorsque le degré de confinement spatial augmente. Ces forces de poussée sont de l'ordre de quelques nN. Nous révélons ainsi un mécanisme de migration très particulier, peu sensible à l'adhérence du micro-environnement et n'impliquant pas les forces de traction largement décrites dans les études antérieures sur des surfaces planes bidimensionnelles, non représentatives des contextes physiologiques au sein desquels les macrophages sont amenés à migrer. Ces résultats illustrent les prévisions faites par le docteur Malawista, sur le mode de migration nommé « Chimeying », qui prévoit que sous fort confinement les cellules utilisent des forces de poussée pour se mouvoir.

Certains axes d'amélioration pourraient être mis en place :

- Imager les sites de poussée des cellules vivantes par transfection, pour localiser les protéines utilisées sur ces points afin de pouvoir calculer de manière plus exacte la force appliquée par la cellule.
- Tester certaines molécules actives sur la dynamique du cytosquelette pour observer leurs effets et leurs impacts sur les cellules et leur migration confinée.
- Concevoir de nouveaux canaux qui se rétrécissent au fur et à mesure que les cellules progressent dans le canal. Cela permettrait d'observer la réorganisation du cytosquelette quand la cellule change de mode de migration, et de comparer l'amplitude des forces appliquées par une cellule selon le mode de migration ou le degré de confinement spatial.

Pour aller au-delà de cette première étude et afin de bien mettre en avant les particularités d'une migration au sein d'un environnement réellement tridimensionnel, nous avons également développé dans cette thèse des réseaux tridimensionnels périodiques obtenus par une méthode de lithographie optique à deux photons. Les motifs de ces réseaux possèdent des dimensions caractéristiques de l'échelle cellulaire (structures de l'ordre du micron et périodicité de l'ordre de 10 μm). Ils sont composés de poutres suspendues qui peuvent être déformées par les cellules vivantes qui migrent au sein de ces treillis tridimensionnels. En enregistrant de nombreuses séquences vidéo des déformations de l'échafaudage lorsque des macrophages humains les infiltrent, nous avons pu étudier l'activité mécanique des macrophages au cours temps lorsqu'ils évoluent au sein de ces micro-environnements complexes, et de géométrie non plane. . L'étude de la migration des macrophages dans ces environnements a montré qu'ils ne migraient pas dans des réseaux cubiques de période 3 μm , soit au sein de pores cubiques de 6.25 μm^2 . Cependant, avec des réseaux de périodes allant de 5 à 10 μm , les macrophages envahissent les structures. La migration des macrophages dans les réseaux de 10 μm de période a engendré la déformation des poutres. La mesure de ces déformations a permis de remonter aux forces globales d'un macrophage. Ainsi, sur une séquence particulière, représentative des observations effectuées, grâce à la connaissance de la rigidité mécanique du matériau constituant le treillis, de la théorie de l'élasticité linéaire et d'une méthode de calcul aux éléments finis, nous évaluons la force cellulaire globale d'un macrophage lorsqu'il migre dans un microenvironnement 3D.

De manière assez similaire au chapitre 2, nous révélons une migration qui procède par une poussée cellulaire contre les obstacles de son environnement (les poutres) et non par adhérence et traction. Contrairement à la méthode développée au chapitre 2 qui permet de mesurer les forces appliquées en certains points de la cellule, ici nous sommes capables d'évaluer la contrainte globale qu'exerce toute la cellule sur son environnement élastique. Nous obtenons des contraintes de poussée de l'ordre de xxx kPa. Pour ce faire, la connaissance des propriétés mécaniques de l'IP-Dip (module de Young et coefficient de poisson) s'est avérée nécessaire. L'étude bibliographique menée lors de cette thèse a mis en évidence que ces connaissances ne sont pas complètement établies et présentent de larges variations. Les valeurs du module de Young de la résine utilisée varient selon les paramètres de polymérisation utilisés et le coefficient de poisson de ce matériau est mal connu. La caractérisation mécanique de la résine utilisée pour fabriquer ces réseaux mériterait donc d'être réalisée. Les propriétés mécaniques de ces matériaux ne pourront jamais être étudiées à l'échelle macroscopique dans les mêmes conditions de polymérisation que celles utilisées lors de leur structuration à l'échelle microscopique. Il faudrait donc chercher le moyen d'évaluer les propriétés mécaniques de micro-objets fabriqués par lithographie à deux photons et d'étudier ces paramètres en fonction des conditions de polymérisation.

Connaître l'influence de ces conditions de polymérisation pourrait également permettre de maîtriser la rigidité des structures sans changer leur géométrie. Ainsi on pourrait regarder l'influence de la rigidité du substrat sur la migration cellulaire lorsque les cellules migrent dans des géométries tridimensionnelles identiques, mais de rigidité mécanique variable. Il serait aussi possible d'induire une anisotropie de rigidité dans la structure et de regarder l'influence de celle-ci sur la direction de migration des macrophages. Pour finir, fonctionnaliser les réseaux avec des traitements de surface pour inhiber ou promouvoir l'adhérence cellulaire pourrait éventuellement permettre d'influencer les mécanismes mis en place par la cellule et donc de mieux comprendre les différents modes de migration.

Pour conclure, nous pensons que les nouvelles approches développées dans ce travail de recherche sont encore largement perfectibles, mais qu'elles permettent d'étudier des macrophages humains ou d'autres types cellulaires qui migrent dans des environnements tridimensionnels judicieusement reconstitués. Nous espérons que ces méthodes sauront inspirer d'autres chercheurs pour les utiliser, les perfectionner et ainsi de comprendre les différents modes migratoires des cellules du système immunitaire.

Résumé

Au cours des deux dernières décennies, des études ont été réalisées pour mesurer les forces mécaniques exercées par des cellules vivantes sur leur environnement. Cela a conduit au développement de diverses techniques ingénieuses qui ont principalement été réalisées pour comprendre la façon dont les cellules exercent des forces pendant leur migration sur des substrats bidimensionnels (2D).

Cependant, *in vivo*, les cellules migrent à travers des environnements tridimensionnels (3D) et les mécanismes utilisés pour migrer en 3D diffèrent significativement de ceux de la migration 2D. A titre d'exemple, les cellules confinées en 3D rencontrant des constriction ont besoin de déformer leur noyau, leur organelle le plus grand et le plus rigide. En 2D, les noyaux ne sont pas des facteurs limitants pour la migration. Il est donc nécessaire de développer des outils pour comprendre comment les cellules migrent en 3D. En particulier, des études doivent être menées pour déterminer comment les cellules appliquent des forces en fonction du niveau de confinement auquel elles se trouvent confrontées.

Pour répondre à cette question difficile, nous avons développé deux types de micro-dispositifs. Tout d'abord, nous avons conçu et fabriqué un dispositif de microfluidique pour étudier les forces générées par les cellules pendant une migration confinée. Ce dispositif est constitué de microcanaux de dimensions contrôlées équipés de micropiliers, servant de capteurs de forces. Ces capteurs de forces présentent une sensibilité de l'ordre de 70 pN. Nous avons ensuite introduit dans le dispositif des macrophages humains, cellules du système immunitaire, à l'intérieur du dispositif et évalué la flexion des micropiliers engendrée par les forces cellulaires appliquées lors de leur migration. Grâce au développement d'un algorithme permettant l'analyse des images, nous avons pu évaluer les forces générées dans différentes zones cellulaires et révéler que les cellules redirigent les forces de pression de l'intérieur vers l'extérieur lorsque le degré de confinement augmente. Cette observation suggère un mode de migration très spécifique lié au confinement spatial qui est basé sur l'appui sans adhésion sur les obstacles de l'environnement.

Dans un deuxième temps nous avons fabriqué des réseaux tri-dimensionnels obtenus par une méthode de lithographie bi-photonique 3D. Les motifs de ces réseaux possèdent des dimensions caractéristiques de l'échelle cellulaire (1-10 μm) et sont composés de poutres suspendues qui peuvent être courbés par les cellules vivantes qui migrent au sein du treillis tri-dimensionnel. En enregistrant une séquence vidéo des déformations de l'échafaudage, nous pouvons étudier l'activité mécanique de la cellule dans l'espace et le temps pendant sa migration 3D. Nos résultats montrent que les macrophages sont capables de pénétrer dans des réseaux de géométrie cubique lorsque la période du réseau est supérieure à 5 μm et que le support de migration lui-même peut être utilisé comme capteur pour mesurer les forces exercées par les cellules. Grâce à la mesure de la rigidité du matériau constituant le treillis 3D et des modélisations de la déformation élastique de la structure 3D, nous avons pu évaluer que la contrainte mécanique globale qu'exerce un macrophage sur son microenvironnement est de l'ordre de 500 kPa.

Grâce à la combinaison de la microfabrication, l'imagerie cellulaire et l'analyse automatisée des images, nous sommes parvenus à quantifier les efforts mécaniques cellulaires mis en jeu lors de la migration de macrophages humains au sein d'environnements confinés et nous mettons ainsi en lumière la mécanique spécifique des cellules migrant en 3D.