

Thèse de doctorat
de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité, ED 562

Institut Jacques Monod UMR 7592 / Équipe « Adhésion cellulaire et mécanique »

Régulation de Yap et de la prolifération cellulaire pendant la migration épithéliale *in vitro*

Simon Begnaud

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par René-Marc Mège

Présentée et soutenue publiquement à Paris le vendredi 22 septembre 2017

Président du jury :	Jean-Marc Di Meglio, Professeur de l'Université Paris Diderot
Rapporteurs :	Corinne Albiges-Rizo, Directeur de Recherche CNRS, Université de Grenoble Guillaume Charras, Professeur de l'Université de Londres
Examineurs :	Elsa Bazellères, Chargée de Recherche CNRS, Université de Marseille Catherine Coirault, Directeur de Recherche INSERM, Université Pierre et Marie Curie
Directeur de thèse :	René-Marc Mège, Directeur de Recherche CNRS, Université Paris Diderot
Membre invité :	Benoit Ladoux, Directeur de Recherche CNRS, Université Paris Diderot



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

RESUME

Régulation de Yap et de la prolifération cellulaire pendant la migration épithéliale *in vitro*

Lors d'une blessure, les cellules migrent et prolifèrent collectivement pour rétablir la continuité de l'épithélium. En migrant, les cellules exercent des forces entre elles ainsi que sur le substrat et de nombreuses études suggèrent un couplage mécanique entre la migration et la prolifération. Récemment découvert, le cofacteur de transcription Yap (Yes-associated protein) est régulé par des signaux mécaniques. L'activation de YAP se traduit par sa rétention nucléaire et augmente la prolifération cellulaire. D'un point de vue mécanique, l'engagement des intégrines dans les adhésions focales, l'aire d'étalement des cellules et la contractilité de l'actomyosine activent YAP. Au contraire, l'engagement des cadhérines dans les jonctions intercellulaires inhibent Yap. A ce jour, les contributions respectives des contacts cellulaires et de l'actomyosine pour la régulation de Yap et de la prolifération restent inexplorées.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés au rôle des adhésions au substrat, des jonctions cellule-cellule, du cytosquelette d'actomyosine et de la tension mécanique inter- et intracellulaire sur l'activation de YAP et sur la prolifération cellulaire pendant la cicatrisation épithéliale.

D'abord, nous avons étudié le rôle de l'étalement cellulaire et des forces transmises par les contacts cellule-substrat sur la régulation de la localisation de Yap. En confinement sur des motifs adhésifs micro-fabriqués, les kératinocytes humains (HaCaT) adoptent un mouvement collectif oscillatoire. En combinant la vidéomicroscopie, la microscopie à force de traction (TFM) et l'analyse quantitative d'images, nous avons d'abord montré que la migration des cellules est alternativement divergente et convergente ce qui régule l'étalement des cellules. Nous avons ensuite montré que l'étalement d'une cellule est corrélé aux forces de traction sur le substrat et à la relocalisation nucléaire de Yap. Bien qu'ils soient encore préliminaires, ces résultats suggèrent que Yap est régulé par les forces transmises aux contacts cellule-substrat pendant la migration épithéliale.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la régulation de Yap et de la prolifération cellulaire pendant la migration épithéliale en absence de contacts cellule-substrat. Pour cela, nous avons forcé la migration de monocouches de cellules HaCaT sur des bandes adhérentes séparées de bandes cytorépulsives. Lorsqu'elles migrent sur les bandes adhérentes, les cellules HaCaT étendent une couche de cellules suspendues au-dessus des bandes cytorépulsives. Les cellules suspendues sont cohésives entre elles mais n'interagissent pas avec le substrat. Dans le feuillet de cellules suspendues, les fibres de stress d'actine se réorganisent à l'échelle du tissu grâce au renforcement des contacts cellule-cellule et la contractilité est augmentée. Ce modèle est le premier qui permet de découpler la contractilité de l'actomyosine et les adhésions cellule-substrat pendant la migration épithéliale. Malgré l'augmentation des contraintes d'étirement, l'absence de contacts cellule-substrat empêche la localisation nucléaire de YAP et inhibe la prolifération des cellules suspendues. En conclusion, l'engagement de contacts cellule-substrat sont nécessaires à la localisation nucléaire de Yap et à l'augmentation de la prolifération pendant la cicatrisation épithéliale *in vitro*.

Ces travaux démontrent que les forces de traction sur le substrat sont associées à la localisation nucléaire de Yap et à l'augmentation de la prolifération pendant la migration épithéliale *in vitro*.

Mots clefs : Yap, migration cellulaire, microfabrication, prolifération, contacts cellule-substrat

ABSTRACT

Yap regulation and cell proliferation during epithelial migration *in vitro*

After a wound, cells both migrate and proliferate collectively to restore epithelial continuity and to heal the wound. While migrating, cells exert forces on the substrate and pull on each other. Several previous studies suggest a mechanical coupling between collective cell migration and proliferation. Recently discovered, the transcription co-factor Yap (Yes-associated protein) is regulated by mechanical signal. Yap activation induces its nuclear retention and cell cycle progression. Integrin engagement on cell-substrate contacts, cell spreading and actin contractility are related to Yap activation. In turn, cadherin engagement and forces in cell-cell contacts induces Yap nuclear exclusion and reduce cell proliferation. Integrins and cadherins anchor actomyosin cytoskeleton and to date, and the respective contributions of cell-substrate adhesions, cell-cell junctions and actin cytoskeleton on regulation Yap and cell proliferation remain unexplored.

In this thesis, we interested in the role of substrate adhesions, cell-cell junctions, actomyosin cytoskeleton and cell mechanical loading on Yap activation and cell proliferation during epithelial wound healing.

First, we aim to understand the role of cell spreading and mechanical loading of cell-substrate contacts on the regulation of Yap localisation. Confined on microfabricated adhesive patterns, human keratinocytes HaCaT adopt an oscillatory collective motion. Combining videomicroscopy, traction force microscopy (TFM) and quantitative image analysis, we show that collective cell movements are alternatively divergent and convergent which regulate local cell spreading. Then, we show that cell spreading correlate with traction forces on the substrate and nuclear localisation of Yap. While it remains preliminary, our data show that forces at cell-substrate contacts and cell spreading induce nuclear localisation of Yap during collective cell movements.

In the second part of the thesis, we interested on Yap localisation and proliferation during epithelial migration in absence of cell-substrate contacts. To do so, we forced migration of monolayer of HaCaT keratinocytes on micropattern comprising alternatively adherent and cytopulsive stripes. While migrating on adherent line, cells extend a multicellular layer over the non-adherent areas. Suspended cells are cohesive with each other but do not engage cell-substrate adhesion. In the suspended cell layer, actin stress fibres reorganise at the tissue level thanks to reinforcement of cell-cell contacts and contractility is increased. This model is the first one that allow to decouple actomyosin contractility and cell-substrate contact during epithelial migration. Despite increased stretching stress, absence of cell-substrate contacts induces Yap cytoplasmic localisation and inhibits cell proliferation. To conclude, cell-substrate contact engagement is necessary to induce Yap nuclear localisation and increase cell proliferation during epithelial wound healing *in vitro*.

This work demonstrates that traction forces through cell-substrate contacts are associated to nuclear localisation of Yap and to increased cell proliferation during epithelial wound healing *in vitro*.

Keywords: Yap, cell migration, micro-fabrication, cell proliferation, cell-substrate contacts

« Science sans conscience n'est que ruine de l'âme »

Pantagruel - F. Rabelais

REMERCIEMENTS

Le parcours jusqu'à la soutenance du Doctorat ès Science, c'est beaucoup de travail mais c'est aussi de nombreuses rencontres. Je prends ici quelques lignes pour faire une liste non-exhaustive des personnes importantes de mon cursus universitaire, scolaire et personnel.

D'abord, je voudrais remercier mes directeurs de thèse, René-Marc Mège et Benoit Ladoux, qui m'ont soutenu dans les hauts et les bas de ces 3 années. Dans leur équipe, j'ai pu travailler dans les meilleures conditions. Merci à vous de votre précieuse expertise dans l'analyse des résultats et dans la mise au point des expériences. A vos côtés, j'ai appris de nombreuses méthodes et techniques expérimentales à l'interface de la physique et de la biologie. Je pense que les bases de science fondamentale que j'ai acquises seront importantes tout au long de ma carrière hospitalo-universitaire de médecin-chercheur.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, Corinne Albiges-Rizo, Catherine Coirault, Elsa Bazellères et Guillaume Charras qui ont accepté d'évaluer les travaux que j'ai réalisés au cours des trois dernières années. Je remercie également les membres de mon comité de thèse, Guillaume Charras, Antoine Guichet et Jean-Charles Cadoret qui ont régulièrement évalué mon travail.

Ensuite, je veux remercier Giuseppe Baldacci, directeur de l'Institut Jacques Monod, pour son accueil et son investissement pour le bon fonctionnement de notre unité de recherche.

Je remercie aussi l'ensemble de l'équipe pédagogique de l'Ecole de l'Inserm (EdI) qui a toujours été disponible quand j'ai eu besoin d'aide. C'est aussi grâce à l'EdI que j'ai fait une pause dans mes études de Médecine pour faire le Doctorat de Science. Merci à l'ancienne et la nouvelle équipe de direction ; Jean-Claude Chottard, Philippe Asher, Boris Barbour et Eric Clauser. Merci à François Amblard qui m'a donné le goût pour la bio-physique et qui a déterminé le choix de mon master 2 et de mon laboratoire de thèse. Merci aussi à l'équipe pédagogique pour votre travail et de votre efficacité ; Barro Sow, Nathalie François et Christine Tanga.

Merci à tous les membres de l'Institut Jacques Monod dans les différentes équipes et plateformes d'avoir été là pour partager le labeur du labo. Pour faire une liste non-exhaustive, je pense à Tamara, Charlene, Julie J, Mickael, Romain, Jonathan, Nori, Karim, Marie, Xavier, France, Sophie, Chloé, Vincent, Juliette, Orestis ...

Merci aussi à vous, Florence pour les relectures de ce manuscrit.

Merci Delphine pour les conseils et les protocoles que tu as dégotés pour moi et qui se sont révélés souvent très utiles (staining β -Caténine, EdU, PH3, ...). Merci pour ces soirées de rigolade au Frog avec Jérém', Vincent, Léo, Bobo et tous les autres. Que de bons souvenirs de cette première année de thèse, encore innocent et immaculé. ;)

Marc-Antoine, on ne s'est pas beaucoup connus au cours de ma thèse mais merci pour ta bonne humeur, ton entrain et tes vannes. ☺

Thank to my colleagues, there was fun every workday. Thanks for being here during worktime and afterhours too. I'm thinking here about Vasilica, Horacio, Chandra, Bibhu, Pierre-Olivier, Julie S, Gautham, Shreyansh and Surabhi. It was fun to know you and your respective cultures.

De bons souvenirs culinaires avec toi Tien en salle de culture où on s'échangeait nos recettes et nos produits. ☺

Hey Mukund! So much good times with you at your place, Barcelona, the lab or in bars. I'm still disappointed I was not here this night of the "famous Pictionary" with Thao and Greg! I wish you the best with your wife, wherever in the world. I hope we'll meet again soon.

Alex Kehren et Hector Roux de Bèze ; polytechniciens et stagiaires du labo. De bons souvenirs avec vous au labo et en dehors. Des fous rires avec Alexandre en essayant de réhabiliter le microscope droit avec MicroManager (température de la reine d'Angleterre, Haha) et pendant les quelques pauses ping-pong. Merci à toi d'avoir accepté de travailler à des horaires pas toujours ouvrées.

Haha, je ferais un bien un paragraphe pour chacun de vous ; les « Baldacci », la team du big boss. Bien plus que des collègues de déjeuner, vous êtes devenus des amis proches pendant ces 3 années ! De la bouffe à la politique en passant par le cinéma, comment imaginer les lunches sans vous, Dji-dji, Jean-Charles, Chrystelle et Fabien ? Je pense aussi à Anne-Lise, Thomas et Su-Jung.

Mélina (ou Causette ?), féministe inconditionnelle, merci pour les discussions scientifiques, tes rires, ta bonne humeur et tes bons conseils. On a passé souvent des soirées et des weekends ensemble au labo pour finir des manipes ou des analyses.

Estelle et Cécile, vous avez supporté mes blagues mauvaises et (très) lourdes jusqu'au bout ! Même moi, j'étais mal à l'aise parfois... Et tout ça, presque sans vous plaindre mais surtout sans me séquestrer ou m'enterrer vif. Officiellement : challenge complete ☑. ;) Grâce à vous ces trois années ont été beaucoup plus fun, merci !!!

Bizuths de l'équipe, partenaires essentiels de l'interminable pause-café de 16h au 3^e étage et principales victimes du racisme pacifique anti-grec et anti-physicien de Thao. Joseph et Alex, puisse votre âme trouver le repos. ☺ Merci à vous deux pour votre soutien pendant la difficile 3^e année de thèse et merci pour vos relectures de ce manuscrit.

Thao... Haha. La bonne humeur à toute épreuves ! Nos soirées déprime au Trac, nos soirées fun au Bootlagers, les pauses café avec Alex et Joseph, le Vietnam, beaucoup de sarcasme et j'en passe : un fin mélange de toi quoi... Que de bons moments avec toi. Tu es une fille courageuse, bosseuse et géniale. Tu es une amie et tu seras bientôt une talentueuse collègue médecin-chercheur.

Jérémy ! Haha ! Que dire ! Grand scientifique, grand rigolo, grand thésard. Tu as activement participé à ma formation. Tu m'as appris la démerde scientifique et tu as été un exemple à suivre tout au long de ma thèse, même après ton départ. Merci pour tout ça. Je te souhaite le meilleur pour la suite en France ou ailleurs, dans ta vie pro et perso. J'espère qu'on sera plus en contact quand tu seras de retour en France.

Adeline, on partage beaucoup de choses ensemble, l'amour de râler, le bureau, le fort caractère, la rigueur scientifique et l'impulsivité. Plus que collègue, on est devenu rapidement amis puis commentateurs râleurs. Je te souhaite tout le meilleur pour ta carrière future.

Gw'eg, Gw'eg !!! Tu comprendras la référence à Evelyn... Haha. Co-thésard, co-bureau, co-galérien et surtout co-mplices. Je crois que c'est avec toi que j'ai partagé le plus de choses pendant ces 3 ans de thèse ; les joies, les peines, les blagues, les bières, le record du haut d'un pont de 180m... Haha. Greg, que du bonheur.

Merci à mes compères du master 2 Physique et Systèmes Biologiques ; Thomas, Michaut, Edouard et Stephifou. On a passé vraiment de bons moments ensemble cette année-là qui ont confirmés mon envie de poursuivre le M2 avec une thèse.

Merci à João, mon colocataire pendant ces deux dernières années. Merci pour les discussions de bistrot qu'on a pu avoir et qui me permettaient de décompresser d'une longue journée de travail. J'admire ton expérience de la vie, ta curiosité et toutes tes compétences (électronique, couture, musique, menuiserie, ...). Let's keep in touch, Vamos manter contato.

Je remercie chaleureusement tous ceux qui ont participé à la cagnotte après le vol de mon ordinateur. Grâce à vous, j'ai pu écrire ma thèse et ces pages de remerciement au calme, à la maison. Je n'incus dans cette liste que ceux que je ne mentionne pas ailleurs : Florence et Guillaume, Amélie et Léon, Thibaut (et AL), Rose (maman de Laure), Sofiane, François Tournilhac, Anne (la femme de JC).

Du collègue au master 2, je veux remercier mes amis proches et mes profs. Merci à Mme. Pinel, M. Baudry et M. Doudain d'avoir attisé ma curiosité pour les sciences au lycée. La bise à mes amis proches, je pense ici à Clém, JuJu, Jeff, Laure et Anne-Lise. Evidemment Cécile, mon binôme du début et sans qui, je serais encore à me lamenter devant mes cours de P1.

Bien qu'on n'ait pas eu de contacts ces dernières années, merci à mes parents pour l'éducation qu'il m'ont inculqués. Malgré une adolescence difficile, c'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui. C'est en suivant votre exemple que je suis devenu curieux, travailleur et persévérant. Merci de toujours m'avoir encouragé et soutenu dans ce que j'ai entrepris. Comme pour moi, les dernières années ont été compliquées pour vous, Antoine et Stéphanie. J'espère que l'avenir sera meilleur. D'où vous êtes, mami, papi, je ne peux qu'imaginer votre fierté et c'est une récompense immense.

Enfin, la meilleure pour la fin, merci Noémie. Tu m'as soutenu pendant les moments difficiles (et les autres), heureusement que tu étais là et heureusement que tu es toujours là. Tu m'as souvent aidé à prendre le recul (et les vacances) dont j'avais besoin. Aujourd'hui, la page de ton internat et la page de ma thèse se tournent. En espérant que le livre soit long, j'ai hâte de faire défiler les prochaines pages à tes côtés.

Merci de me supporter, merci d'être là, merci pour tout.

Je t'aime.

SOMMAIRE

RESUME	3
ABSTRACT	4
REMERCIEMENTS	6
SOMMAIRE	9
LISTE D'ABREVIATIONS.....	12
CHAPITRE I : INTRODUCTION	13
1 MIGRATION CELLULAIRE.....	14
1.1 <i>Migration de cellules individuelles</i>	14
1.1.1 Les contacts cellule-matrice et le cytosquelette	14
1.1.1.1 La matrice extracellulaire et les contacts cellule-matrice.....	14
1.1.1.1.1 La matrice extracellulaire (MEC)	14
1.1.1.1.2 Les contacts cellule-matrice	17
1.1.1.1.3 La mécanotransduction dépendante des contacts cellule-matrice et de la MEC	18
1.1.1.2 Le cytosquelette.....	21
1.1.1.2.1 Les microtubules	22
1.1.1.2.2 Les filaments intermédiaires (FIs).....	22
1.1.1.2.3 L'actomyosine.....	23
1.1.1.2.3.1 La polymérisation de l'actine	23
1.1.1.2.3.2 La régulation de la polymérisation de l'actine	24
1.1.1.2.3.3 L'organisation des filaments d'actine.....	24
1.1.1.2.3.4 La contractilité du cytosquelette d'actomyosine	25
1.1.1.2.3.5 L'organisation de l'actomyosine	25
1.1.1.2.4 La mécanotransduction dépendante du cytosquelette	26
1.1.2 Migration des cellules individuelles.....	28
1.1.2.1 La migration amiboïde	28
1.1.2.2 La migration mésenchymateuse	28
1.1.2.2.1 L'extension de protrusions	30
1.1.2.2.1.1 Les lamellipodes	30
1.1.2.2.1.2 Les filopodes.....	30
1.1.2.2.2 L'adhésion au substrat	31
1.1.2.2.3 La rétraction de l'arrière de la cellule.....	31
1.2 <i>Migration collective et cicatrisation</i>	33
1.2.1 L'épiderme : l'épithélium de la peau	33
1.2.2 Les contacts cellule-cellule	34
1.2.2.1 Les jonctions serrées.....	34
1.2.2.2 Les jonctions communicantes.....	34
1.2.2.3 Les jonctions d'ancrage.....	34
1.2.2.3.1 Les desmosomes.....	35
1.2.2.3.2 Les jonctions adhérentes.....	35
1.2.3 La mécanotransduction dépendante des jonctions cellule-cellule	36
1.2.4 La migration épithéliale.....	38
1.2.4.1 La fermeture par rampement ou « crawling »	38
1.2.4.2 La fermeture en cordon de bourse ou « purse-string »	41
1.2.4.3 La coexistence des deux modes de migration	42
1.2.4.4 La mécanotransduction associée aux épithélia	43
1.2.4.4.1 Couplage mécanique des cellules épithéliales	43
1.2.4.4.2 Les inhibitions de contact	45
1.2.4.4.2.1 L'inhibition de migration par contact (CIL).....	45
1.2.4.4.2.1 L'inhibition de prolifération par contact (CIP).....	46
1.2.4.4.2.1 Vers un couplage mécanique entre la migration et la CIP	47
2 LE COUPLE YAP/TAZ DANS LA CROISSANCE TISSULAIRE	48

2.1	<i>Yap/Taz et la voie de signalisation Hippo</i>	49
2.1.1	L'axe Hippo - Yap/Taz	49
2.1.2	Le couple Yap/Taz pendant l'embryogénèse et à l'âge adulte	50
2.1.3	L'oncogène Yap/Taz, une cible thérapeutique séduisante	51
2.2	<i>La régulation en amont de l'activité transcriptionnelle de Yap/Taz</i>	51
2.2.1	La régulation de Yap/Taz par les facteurs solubles	51
2.2.1.1	Les Récepteurs à activité Tyrosine kinase (RTKs)	51
2.2.1.2	Le récepteur aux cytokine LIFR	52
2.2.1.3	Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)	52
2.2.2	La régulation de Yap/Taz par les contacts cellule-cellule	53
2.2.2.1	La polarité apico-basale et les jonctions serrées	53
2.2.2.2	Les jonctions adhérentes	54
2.2.3	La régulation de Yap/Taz par la mécanique de la cellule et de l'environnement	55
2.2.3.1	La contractilité et l'actine filamenteuse	56
2.2.3.2	Les adhésions focales	57
2.2.3.2.1	Le rôle de Yap/Taz dans la dynamique de l'actine et des adhésions focales	58
	OBJECTIFS DE LA THESE	61
	CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	63
1	PROCEDURES EXPERIMENTALES	64
1.1	<i>Micro-fabrication</i>	64
1.1.1	La micro-impression par contact (μ CP)	64
1.1.1.1	Préparation des tampons ; contrôler la géométrie	64
1.1.1.2	Préparation du substrat ; contrôler la rigidité	64
1.1.1.3	Impression ; contrôler la composition protéique	65
1.1.1.4	Passivation ; confiner les cellules sur le motif imprimé	66
1.1.2	La microscopie à Force de Traction (TFM)	66
1.1.3	La micro-impression par contact (μ CP) sur les substrats de microscopie à force de traction (TFM)	66
1.2	<i>Dispositif d'étirement et de compression</i>	67
1.3	<i>Culture cellulaire</i>	68
1.3.1	Les lignées de kératinocytes HaCaT	68
1.3.2	Les lignées de kératinocytes de souris	68
1.4	<i>Ensemencement des cellules</i>	69
1.5	<i>Marquages fluorescents des cellules</i>	69
1.5.1	Transfections transitoires	69
1.5.2	Drogues et incorporation d'EdU	69
1.5.3	Marquages fluorescents de cellules fixées	69
1.6	<i>Validation du modèle d'étude : Rôle de la composition du substrat et de la densité sur la régulation de Yap des kératinocytes HaCaT</i>	71
2	MICROSCOPIE ET ACQUISITION D'IMAGES	71
2.1	<i>Microscopie à plein champ</i>	71
2.2	<i>Microscopie confocale</i>	72
2.3	<i>Ablation laser</i>	72
2.4	<i>Senseur de force E-cadhérine-TSMod et FRET</i>	74
2.5	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)</i>	74
3	ANALYSE D'IMAGES	75
3.1	<i>Champ de vitesse</i>	75
3.1.1	Particle Image Velocimetry (PIV)	75
3.1.2	Divergence du champ de vitesse	76
3.2	<i>Segmentation</i>	77
3.2.1	Segmentation à partir des images en contraste de phase	77
3.2.2	Segmentation à partir de la fluorescence des noyaux	78
3.2.3	Segmentation manuelle	79
3.3	<i>Estimation de la longueur des filaments d'actine d'un réseau enchevêtré</i>	79
3.4	<i>Microscopie à force de traction (TFM)</i>	80
3.4.1	Forces de traction	80
3.4.2	Méthode d'Inférence Bayésienne des Contraintes (BISM)	81
3.5	<i>Mesure de la localisation de Yap</i>	81

3.6	<i>Analyses statistiques.....</i>	81
CHAPITRE III : RESULTATS – PREMIERE PARTIE.....		83
1	ROLE DE LA MIGRATION EPITHELIALE, DE L'ÉTALEMENT CELLULAIRE ET DES FORCES AUX CONTACTS CELLULE-SUBSTRAT SUR LA REGULATION DE YAP	83
1.1	<i>Les mouvements collectifs oscillants de kératinocytes en confinement</i>	85
1.2	<i>La régulation de Yap au cours de mouvements collectifs</i>	86
1.3	<i>La localisation nucléaire de Yap est corrélée à l'étalement cellulaire.....</i>	87
1.4	<i>La régulation de Yap par les forces de traction et les contraintes mécaniques</i>	90
1.5	<i>Conclusions du chapitre et discussion.....</i>	92
CHAPITRE IV : RESULTATS – DEUXIEME PARTIE.....		95
2	REGULATION DE YAP DANS UNE MONOCOUCHE DE KERATINOCYTES SUSPENDUS DANS UN MODELE DE FERMETURE EPITHELIALE	95
2.1	<i>La fermeture en cordon de bourse de trous non-adhérents</i>	96
2.2	<i>La réorganisation des adhésions focales, des jonctions adhérentes et de l'actine en absence de contacts cellule-substrat</i>	97
2.3	<i>La régulation de Yap au cours de la fermeture de surfaces non-adhérente</i>	100
2.4	<i>Le rôle de l'étirement du tissu sur la régulation de Yap en absence de contacts cellule-substrat.....</i>	101
2.5	<i>Conclusions du chapitre et discussion.....</i>	102
2.6	<i>Résultats complémentaires : le rôle des contacts cellule-substrat sur la déformation et la relaxation du tissu après étirement</i>	104
CHAPITRE V : RESULTATS – TROISIEME PARTIE		109
3	REGULATION DE YAP ET DE LA PROLIFERATION PENDANT LA MIGRATION COLLECTIVE DES KERATINOCYTES...109	
3.1	<i>Le feuillet de kératinocytes suspendus n'engage pas d'adhésion focales avec le substrat 110</i>	
3.2	<i>La régulation de Yap et de la prolifération dans les cellules suspendues</i>	112
3.3	<i>L'aire d'étalement et la compression des cellules suspendues ne sont pas responsables de la relocalisation cytoplasmique de Yap.....</i>	114
3.4	<i>La réorganisation de l'actine F ne permet pas d'expliquer la relocalisation cytoplasmique de Yap dans les cellules suspendues</i>	116
3.5	<i>La stabilisation des jonctions adhérentes peut expliquer la relocalisation cytoplasmique de Yap dans les cellules suspendues</i>	118
3.6	<i>La mise en tension de l'actine et des jonctions adhérentes a des effets opposés sur la régulation de Yap dans les cellules suspendues.....</i>	121
3.7	<i>La régulation de Yap et de la prolifération dans les cellules suspendues</i>	123
3.8	<i>Conclusions du chapitre et discussion.....</i>	126
3.9	<i>Résultats complémentaires : l'expression de la chromatine de cellules soumises à des contraintes mécaniques.....</i>	128
3.10	<i>Résultats complémentaires : les filaments intermédiaires de kératine sont nécessaires à la cohésion de la monocouche de kératinocytes.....</i>	131
CHAPITRE VI : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES		135
RÉFÉRENCES		139
ANNEXES		173
1	REVUE "MECHANICS OF EPITHELIAL TISSUES DURING GAP CLOSURE"	173
2	TRACTION FORCE MICROSCOPY: SUBSTRATE FABRICATION PROTOCOL.....	185
3	KERATINOCYTES FROM KERATIN-DEFICIENT MICE: CELL CULTURE PROTOCOL.....	187
4	KASH-TSMOD: PLASMID GENETIC MAP	190
5	KIT CLICK-IT™; EDU INCORPORATION PROTOCOL.....	191

LISTE D'ABREVIATIONS

μ CP. : <i>Micro-contact printing</i>	Mst1/2. : <i>Macrophage Stimulating 1/2</i>
ADP. : <i>Adénosine Di-Phosphate</i>	MTOC. : <i>Centre organisateur des microtubules</i>
AF. : <i>Adhésion focale</i>	mTOR. : <i>mechanistic Target Of Rapamycin</i>
AP-1. : <i>Activator Protein-1</i>	OR. : <i>Orientation Ratio</i>
Arp2/3. : <i>Actin-related protein 2/3</i>	p120. : <i>Caténine p120</i>
ATP. : <i>Adénosine Tri-Phosphate</i>	P1a. : <i>Plectin isoform 1a</i>
BISM. : <i>Bayesian Inference Stress Method</i>	PKD1. : <i>Phospho-Inositide Dependant Kinase-1</i>
BMP. : <i>Bone Morphogenetic Protein</i>	PDMS. : <i>PolyDiMéthylSiloxane</i>
BPAG1e. : <i>Bullous Penphigoid antigen 1 isoform e</i>	Pi. : <i>Phosphate inorganique</i>
BPAG2. : <i>Bullous Penphigoid antigen 2</i>	PI3K. : <i>Phospho-Inositide 3-kinase</i>
CD151. : <i>Cluster of Differentiation 151</i>	PIP2. : <i>Phosphatidyl-inositol-4,5-diPhosphate</i>
Crb3. : <i>Crumbs3</i>	PIP3. : <i>Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-triPhosphate</i>
Cy3. : <i>Cyanine-3</i>	PIV. : <i>Particle Image Velocimetry</i>
Cy5. : <i>Cyanine-5</i>	ROCK. : <i>Rho-associated protein kinase</i>
Dsc. : <i>Desmocolline</i>	RTK. : <i>Récepteurs à Tyrosine Kinase</i>
Dsg. : <i>Desmoglérine</i>	Scrb. : <i>Scribble</i>
EGF. : <i>Epidermal Growth Factor</i>	Taz. : <i>Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif</i>
EGFR. : <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	TCF. : <i>T Cell Factor</i>
FAK. : <i>Focal Adhesion Kinase</i>	TFM. : <i>Traction Force Microscopy</i>
Fl. : <i>Filament intermédiaire</i>	TGF β . : <i>Transforming Growth Factor β</i>
Fn3. : <i>Fibronectine cellulaire</i>	TNF- α . : <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
GDP. : <i>Guanosine Di-Phosphate</i>	VASP. : <i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
GTP. : <i>Guanosine Tri-Phosphate</i>	VBS. : <i>Vinculin Binding Site</i>
HD. : <i>Hémidesmosome</i>	WASP. : <i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
IL-1. : <i>Interleukin-1</i>	WAVE. : <i>WASP-family verprolin-homologous protein</i>
ILK. : <i>Integrin-Linked Kinase</i>	WW45. : <i>45 KDa WW Domain Protein</i>
Lats1/2. : <i>Large Tumor Suppressor Kinase 1/2</i>	Yap. : <i>Yes-associated protein</i>
LB. : <i>Lame Basale</i>	Yki. : <i>Yorkie</i>
LINC. : <i>Linker of Nucleoskeleton to Cytoskeleton</i>	ZO-1 et ZO-2. : <i>Zonula Occludens-1 et -2</i>
mDia. : <i>Diaphanous-related formin-1</i>	
MEC. : <i>Matrice Extra-Cellulaire</i>	
MELC. : <i>Myosin Essential Light Chain</i>	
MHC. : <i>Myosin Heavy Chain</i>	
MRLC. : <i>Myosin Regulatory Light Chain</i>	

CHAPITRE I : INTRODUCTION

En biologie des vertébrés, on décrit quatre grandes catégories de tissus : le tissu musculaire, le tissu conjonctif, le tissu nerveux et les épithélia. Un épithélium est un tapis cellulaire reposant sur une couche de protéines matricielles, appelée lame basale. Les cellules de ce tissu sont adhérentes entre elles et avec leur substrat. Un des épithéliums les plus importants est l'épiderme de la peau. Par son rôle de barrière, l'épiderme est un épithélium indispensable pour la survie de l'organisme. Il protège les individus des agressions chimiques et mécaniques de l'environnement. Néanmoins, certaines agressions entraînent la rupture de cette barrière protectrice et nécessitent des réparations. Les premières étapes de cicatrisation sont assurées par le système immunitaire. Il est activé localement pour détecter et détruire d'éventuels corps étrangers et débris cellulaires. Dans ce manuscrit, nous ne rentrerons pas dans les détails de la réaction immunitaire. Les étapes suivantes de la cicatrisation sont assurées par les cellules épidermiques. Les cellules à la marge de la blessure migrent et prolifèrent pour recoloniser la zone détruite. En migrant, les cellules exercent des forces entre elles et sur leur substrat. De plus en plus d'études suggèrent un couplage entre les forces mécaniques et l'augmentation de la prolifération des cellules. Récemment, des chercheurs ont découvert que le co-facteur de transcription Yes-associated protein (Yap) est régulé par de tels signaux mécaniques. De façon importante, Yap participe au contrôle de l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Cette découverte capitale place Yap au cœur des mécanismes de mécanotransduction : la transduction d'un signal mécanique en un signal biochimique conduisant à l'expression des gènes. Cependant, à ce jour, les acteurs protéiques et les signaux biomécaniques qui régulent Yap sont mal compris. L'objectif de ce manuscrit de thèse est d'étudier la régulation de Yap par des facteurs biomécaniques dans le contexte de la migration tissulaire.

Dans ce chapitre introductif, nous aborderons les notions de biologie cellulaire et de biomécanique des tissus nécessaires à la compréhension des travaux décrits dans les chapitres suivants. Nous commencerons par décrire les mécanismes de migration de cellules individuelles ainsi que les structures protéiques nécessaires à cette migration. Nous détaillerons ensuite la migration collective de cellules au sein d'un tissu. Dans une deuxième partie, nous exposerons les rôles de Yap pendant le développement embryonnaire et à l'âge adulte puis nous décrirons ce qui est connu de la régulation de Yap par des facteurs biochimiques et biomécaniques.

1 Migration cellulaire

1.1 Migration de cellules individuelles

Au niveau cellulaire, la migration repose sur deux socles : l'établissement de contacts avec le milieu environnant et la génération de forces. Les cellules eucaryotes génèrent des forces grâce à leur cytosquelette qui comporte des structures fibrillaires et des moteurs moléculaires. Les forces générées sont transmises à l'environnement par les contacts cellule-matrices. Après avoir décrit les structures moléculaires qui permettent aux cellules de s'ancrer à leur environnement puis les structures qui permettent aux cellules de générer des forces, nous détaillerons les principaux modes de migrations adoptées par les cellules.

1.1.1 Les contacts cellule-matrice et le cytosquelette

1.1.1.1 La matrice extracellulaire et les contacts cellule-matrice

1.1.1.1.1 La matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire (MEC) est le matériel protéique dans ou sur lequel les cellules reposent. Il est composé d'un grand nombre de protéines de structure et d'adhésion.

La LB est la MEC sur laquelle repose la plupart des épithélia (Rodeck et al., 1980). C'est une fine couche protéique et polysaccharidique de 50 à 100 nm sur laquelle les cellules reposent (Fig. I.1. a) (Glentis et al., 2014). Classiquement, on décompose la LB en 3 couches distinctes visibles en microscopie électronique (Fig. I.1. b) (Katz, 1984; Merker, 1994). La *lamina lucida* est la couche supérieure qui comporte des polysaccharides (Glycosaminoglycanes) et des protéines d'adhésion (collagène, laminine, fibronectine). Elle repose sur la *lamina densa* et la *lamina fibro-reticularis*. Ces deux couches sont constituées de protéoglycanes et de protéines de soutien (collagènes IV et VII).

La LB influence la polarité des cellules en définissant le pôle basal des cellules à l'opposé duquel se différencie le pôle apical. Les protéines et les polysaccharides de la LB sont sécrétés par les cellules épithéliales sus-jacentes et par les fibroblastes du tissu conjonctif sous-jacent. Les fibroblastes sont des cellules dont le rôle principal est la production et le remodelage de la MEC. Les protéines de la LB sont principalement les collagènes et les laminines (Fig. I.1. c, d) (Glentis et al., 2014; Kruegel and Miosge, 2010; Yurchenco and Patton, 2009). Elles forment un réseau protéique interconnecté sur lequel les cellules adhèrent. On trouve également des glycoprotéines et des protéoglycanes comme le néogène et le perlécane, respectivement. Bien qu'ils aient un rôle de stabilisation de la LB et de stockage des facteurs de croissance, ils ne sont pas impliqués dans l'adhésion des cellules. Il existe de nombreuses autres protéines spécifiques des LB des différents organes. A l'âge adulte, la fibronectine n'est pas présente dans la lame basale, mais elle est déposée par les cellules épithéliales et les fibroblastes pendant la cicatrisation et promeut la migration vers la zone détruite en absence de LB (Clark, 1990; Hamill et al., 2012; Lodish et al., 2000).

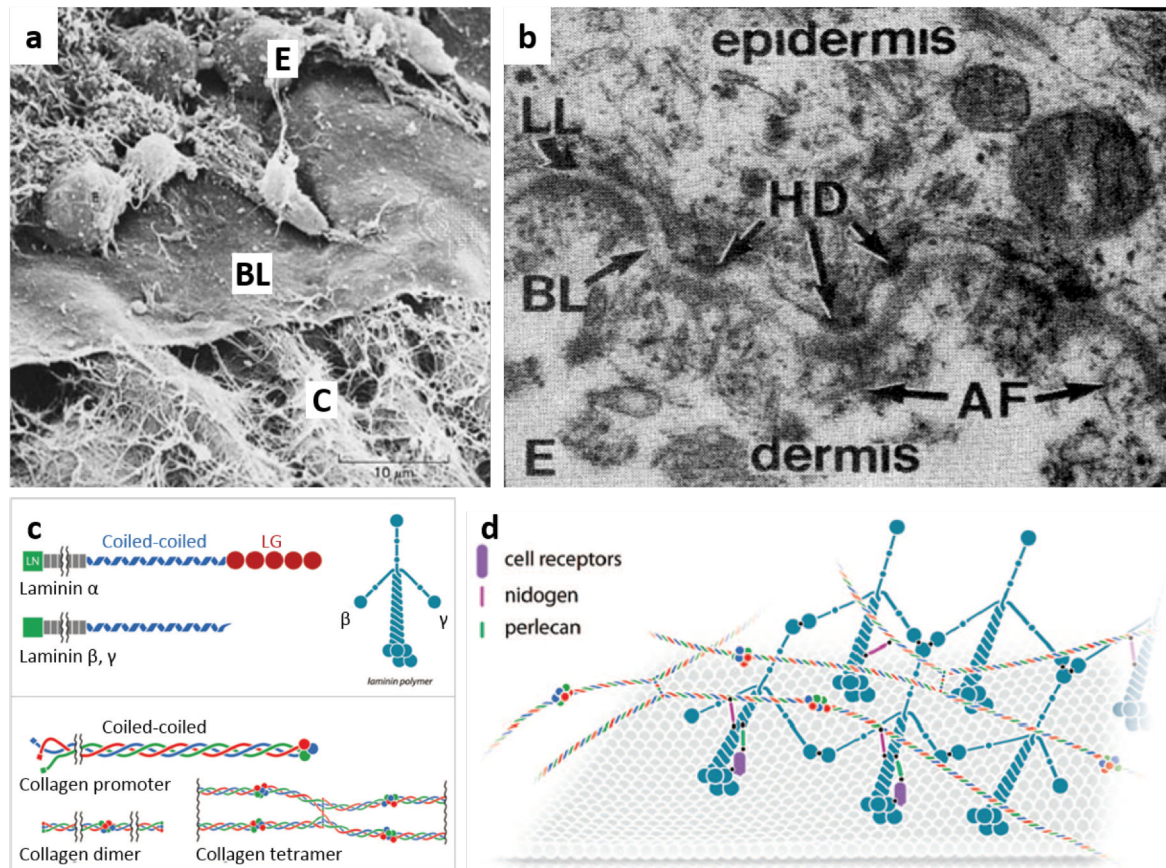


Figure I.1. La lame basale. (a) Image en microscopie électronique à balayage de la cornée d'embryon de poulet. Les cellules épithéliales (E) reposent sur la lame basale (BL) dont le maillage fibrillaire est très serré. En dessous, le tissu conjonctif (C) est composé d'un réseau fibrillaire de collagène dont le maillage est plus large. Image tirée de (Alberts et al., 2002) (b) Image en microscopie électronique à transmission d'une coupe de peau d'un fœtus humain. La lame basale (BL) est un feuillet protéique entre les cellules de l'épiderme (epidermis) et le derme (dermis). On distingue la lamina densa entre les lamina lucida (LL) et fibroreticularis (AF ; Anchoring Fibrils). Les hémidesmosomes (HD) ancrent les cellules à la lame basale. Image tirée de (Rodeck et al., 1980). (c) Polymérisation de la laminine et du collagène. (d) Organisation moléculaire de la lame basale. Le maillage gris représente la membrane plasmique d'une cellule. (c et d) sont tirés de (Glentis et al., 2014).

En tant que composant principal de la peau, des os et des cartilages, les collagènes sont les protéines les plus abondantes chez les vertébrés (Antoine et al., 2014; Mao et al., 2015). La sous unité élémentaire du collagène est la chaîne pro- α et comporte des propeptides à ses extrémités (Fig. I.1. c) (Glentis et al., 2014). La chaîne pro- α est synthétisée dans le réticulum endoplasmique où elle subit des modifications post-traductionnelles puis s'associe avec 2 autres chaînes pro- α pour former le pro-collagène. C'est ce pro-collagène qui est sécrété dans le milieu extracellulaire. Des enzymes de la MEC digèrent le pro-collagène en collagène qui s'assemble en fibrilles. Les cellules ont un rôle important dans l'organisation des fibrilles de collagène. Il existe au moins une vingtaine de gènes codant pour les chaînes pro- α (Kalluri, 2003; Katz, 1984). La combinaison de 3 chaînes pro- α identiques ou différentes définit le type de collagène. Par exemple le collagène I de l'os est constitué de 2 chaînes $\alpha 1(I)$ et 1 chaîne $\alpha 2(I)$ qui s'organisent en gros faisceaux (Antoine et al., 2014). La lame basale est constituée de 2 types de collagène : les collagènes IV et VII. Le collagène IV est non-fibrillaire mais il a la propriété de s'auto-organiser en réseau. Il comporte des domaines reconnus par les intégrines (Glentis et al., 2014; Hamaia and Farndale, 2014). Le collagène VII est un collagène d'ancrage : ses fibrilles fixent la lame basale au tissu conjonctif sous-jacent.

Bien que les collagènes portent des domaines adhésifs pour les cellules, les laminines sont les principales protéines d'adhésion de la LB (Glentis et al., 2014). La laminine est une protéine composée de 3 sous-unités α , β et γ (Fig. I.1. c) (Hohenester and Yurchenco, 2013). Comme le collagène, plusieurs combinaisons sont possibles. La laminine a une structure en croix et porte des motifs sur lesquels les cellules peuvent se fixer. Par exemple, le motif RGD (RGD est l'acronyme des 3 acides aminés : Arginine, Glycine, Asparagine) permet la liaison des intégrines. La laminine s'auto-assemble en un feuillet grâce à des domaines de liaisons à d'autres laminines (Fig. I.1. d). Elle comporte aussi des sites de liaison pour le collagène IV ce qui permet l'interconnexion de ces 2 réseaux de protéines.

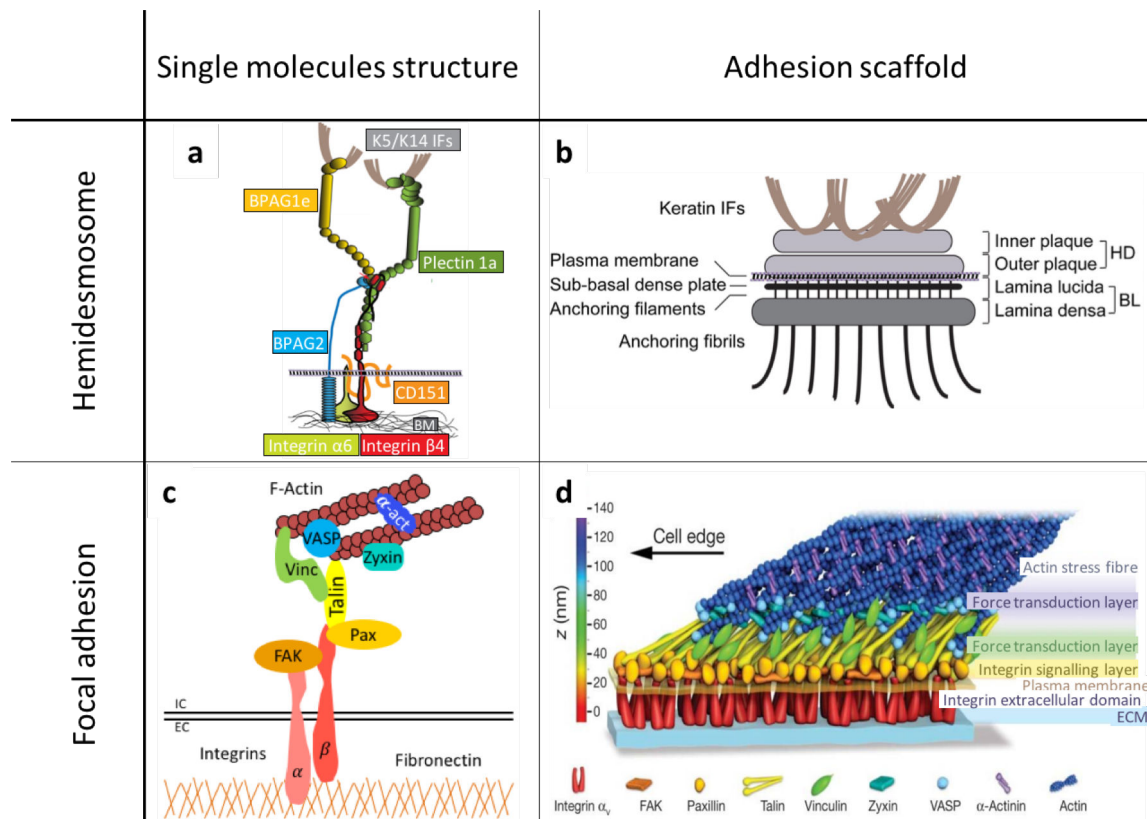


Figure I.2. Les contacts cellule-matrice. (a, b) Les hémidesmosomes ancrent les filaments intermédiaires (FIs) à la matrice extracellulaire. Les intégrines $\alpha_6\beta_4$ et le cd151 sont les protéines transmembranaires qui forment la plaque desmosomale externe des hémidesmosomes dans la peau. La plectine 1a et le BPAG1e forment la plaque desmosomale interne et sont liés directement aux FIs de kératine K5 et K14 dans la peau. Adapté de (Walko et al. 2015). **(c, d)** Les intégrines $\alpha\beta$ sont les protéines transmembranaires des adhésions focales. La taline est une protéine qui relie le cytosquelette d'actine aux intégrines. Le feuillet fonctionnel de signalisation contient les queues cytoplasmiques des intégrines, la kinase des adhésions focale (FAK) et la paxilline. Le feuillet de transduction des forces comporte la taline et la partie N-terminale de la vinculine des adhésions focales. La partie N-terminale de la vinculine est dans le feuillet de régulation de l'actine avec les protéines VASP, α -actinine et zyxine. Tiré de (Kanchanawong et al. 2010).

La fibronectine peut être sécrétée par les cellules mais elle est majoritairement trouvée sous forme soluble, repliée dans le sérum. Les cellules peuvent se fixer à la fibronectine grâce aux nombreux motifs d'adhésion qu'elle contient. Comme la laminine, la fibronectine comporte, par exemple, des motifs RGD sur lesquels les cellules se fixent. Les forces exercées par les cellules sur la fibronectine entraîne son dépliement et expose des domaines cryptiques sur lesquels d'autres molécules de fibronectine se fixent et aboutit à la formation de fibrilles (Klotzsch et al., 2009). La fibronectine comporte aussi des

domaines de liaison aux collagènes ce qui lui permet de s'ancrer à la lame basale ou directement au tissu conjonctif (Kubow et al., 2015). Comme on le verra plus tard, la fibronectine est très importante pendant la cicatrisation. Elle est abondamment disponible dans le sérum et elle peut être rapidement déposée sur le tissu conjonctif en cas de dégradation de la lame basale. Certaines cellules épithéliales en migration comme des cellules de peau peuvent aussi synthétiser et déposer de la fibronectine. Après une blessure, le sang apporte également de nombreuses autres protéines, comme la fibrine, qui favorisent la migration cellulaire (Yakovlev et al., 2014).

1.1.1.1.2 Les contacts cellule-matrice

Les intégrines sont les protéines transmembranaires des jonctions d'ancrage qui relient le cytosquelette à la MEC. A la face intracellulaire, les intégrines interagissent avec le cytosquelette *via* des protéines adaptatrices. Les intégrines sont formées par 2 sous-unités protéiques α et β . A ce jour, on connaît 18 sous-unités α et 8 sous-unités β formant 24 hétérodimères (Takada et al., 2007). Les sous-unités α et β peuvent être en configuration inactive, c'est-à-dire repliée, ou en configuration active, ouverte. Les intégrines peuvent être activées ou inactivées par des signaux intra- ou extracellulaires. On distingue deux types de jonction d'ancrage à la MEC classées en fonction des structures du cytosquelette auxquelles elles sont reliées. Les hémidesmosomes (HDs) relient la lame basale au cytosquelette de kératine alors que les adhésions focales (AFs) assurent l'ancrage du cytosquelette d'actine. Bien qu'il soit généralement admis que les HDs ancrent les cellules statiques et que les adhésions focales prédominent dans les cellules en migration, de récents articles remettent en cause ce paradigme (Tsuruta et al., 2011).

Les hémidesmosomes sont des structures importantes qui ancrent fermement les cellules à la MEC (Walko et al., 2015). Ils sont fréquents dans les cellules épithéliales de la peau. Les protéines transmembranaires des hémidesmosomes sont les intégrines $\alpha 6 \beta 4$, les protéines BPAG2 (Bullous Penphigoid antigen 2) et CD151 (Cluster of Differentiation 151) (Fig. I.2. a). Elles forment la plaque externe de l'HD visible en microscopie électronique (Fig. I.2. b). Elles interagissent du côté cytoplasmique avec la plaque interne de l'hémidesmosome composée des protéines P1a (Plectin isoform 1a) et BPAG1e (Bullous Penphigoid antigen 1 isoform e). Ces protéines interagissent avec le cytosquelette de filaments intermédiaires. P1a se fixe spécifiquement aux kératines épidermiques K5/K14 alors que BPAG1e se fixe aux autres types de filaments intermédiaires comme la vimentine (Fontao et al., 2003; Steinbock et al., 2000). Il est important de noter ici que les HDs sont transitoirement désassemblés dans les couches basales de l'épiderme pour permettre la migration cellulaire pendant la cicatrisation (Hopkinson et al., 2014; Janes and Watt, 2006; Wilhelmsen et al., 2006). Le désengagement des intégrines $\alpha 6 \beta 4$ permet de réguler la prolifération et la survie cellulaire aussi bien pendant la cicatrisation que pendant l'invasion métastatique (Wilhelmsen et al., 2006). En clinique humaine, la dysfonction des HDs est à l'origine de graves maladies de la peau comme les épidermolyses bulleuses et les pemphigoides bulleuses. En effet, l'épiderme est mal ancré à la lame basale et s'en détache en formant de larges bulles (Bruckner-Tuderman, 2010; Fine et al., 2014; Jonkman, 1999).

Contrairement aux HDs, il existe une grande variété de combinaisons de sous-unités α et β composant les intégrines des adhésions focales. Par exemple, les intégrines $\alpha 3 \beta 1$ sont des récepteurs à la fibronectine qui ancrent les cellules épidermiques à la lame basale (Kreidberg, 2000). En revanche, pendant la migration cicatricielle, les intégrines $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 6$ et $\alpha 9 \beta 1$ sont surexprimées et lient la

fibronectine fraîchement déposée (Busk et al., 1992; Kenny and Connelly, 2015). Aux AFs, les intégrines se lient au cytosquelette par l'intermédiaire de protéines comme la taline (Fig. I.2. c). De nombreuses protéines interagissent avec la partie cytoplasmique des intégrines et avec la taline pour réguler la formation, le renforcement et la dissociation des AFs (Chorev et al., 2014; Coló et al., 2012; Hamadi et al., 2005). Les AFs sont des agglomérations allongées d'intégrines et de protéines cytoplasmiques de régulation (Fig. I.2. d). La maturation des AFs entraîne l'augmentation de leur taille, leur réorganisation et le recrutement de la vinculine (Choi et al., 2008). La vinculine est une protéine mécanosensible qui porte un domaine de liaison à l'actine et un autre domaine qui se lie à la taline. Sous l'action de forces générées par la myosine, la taline se déplie et permet la liaison de la vinculine. Liée à la taline, la vinculine se déplie à son tour et se lie aux filaments d'actine ce qui participe au renforcement de l'AF soumise à une force (Carisey and Ballestrem, 2011).

Du côté cytoplasmique des AFs, on distingue 3 couches parallèles à la membrane plasmique, qui se distinguent par leurs fonctions et leurs compositions en protéines (Fig. I.2. d) (Kanchanawong et al., 2010; Liu et al., 2015a). Le premier feuillet est celui de la signalisation intégrine-dépendante. Il est juxtaposé à la membrane plasmique et comporte le domaine intracellulaire des intégrines. On y trouve aussi des régulateurs biochimiques de signalisation comme les protéines paxilline et FAK (Focal Adhesion Kinase). Le deuxième feuillet est le feuillet de la transmission des forces mécaniques. La taline y est importante car elle peut se lier à la fois aux intégrines par son extrémité N-terminale et aux fibres d'actine par son extrémité C-terminale (Goult et al., 2013). Le troisième feuillet est le feuillet de la régulation de l'actine. On y trouve l'extrémité des filaments d'actine ainsi que les protéines VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein), zyxine et α -actinine. VASP favorise l'élongation des filaments d'actine et l' α -actinine connecte les filaments d'actine antiparallèle. La zyxine participe à l'enrichissement en filament d'actine pendant la maturation des adhésions focales (Yoshigi et al., 2005).

1.1.1.1.3 La mécanotransduction dépendante des contacts cellule-matrice et de la MEC

La mécanotransduction est la conversion d'un signal mécanique en un signal biomoléculaire qui se traduit par le changement de phénotype de la cellule en relation ou non avec le changement d'expression de gènes. Les signaux mécaniques transmis aux cellules peuvent être reliés aux propriétés mécaniques de la MEC. L'équipe du professeur Spatz a publié une revue très complète sur les propriétés mécaniques de la MEC (Young et al., 2016).

Bien que les HDs soient aussi des structures mécanosensibles (Zhang et al., 2011), nous nous concentrerons ici sur la mécanosensibilité des AFs qui a été plus largement documentée.

L'AF est sensible aux propriétés biochimiques et mécaniques du substrat comme la nature des protéines d'adhésion, la rigidité, ou l'organisation du réseau de fibres de MEC (Schwartz, 2010). Les intégrines peuvent être en conformation ouverte, active ou en conformation fermée, inactive. L'activation de l'intégrine est extérieure-intérieure quand le signal de déploiement provient de la MEC. Par exemple, la liaison de l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ au peptide RGD dans l'espace extracellulaire entraîne un changement de conformation du domaine intracellulaire et pourrait changer la régulation des voies de signalisation cellulaire (Askari et al., 2009; Puklin-Faucher et al., 2006). En retour, quand le signal d'activation provient du cytoplasme, l'activation est dite intérieure-extérieure. Par exemple, la liaison de la taline sur le domaine cytoplasmique des intégrines entraîne le changement de la conformation

du domaine extracellulaire ce qui augmente son affinité pour la liaison à la MEC (Jin and Varner, 2004; Tadokoro et al., 2003).

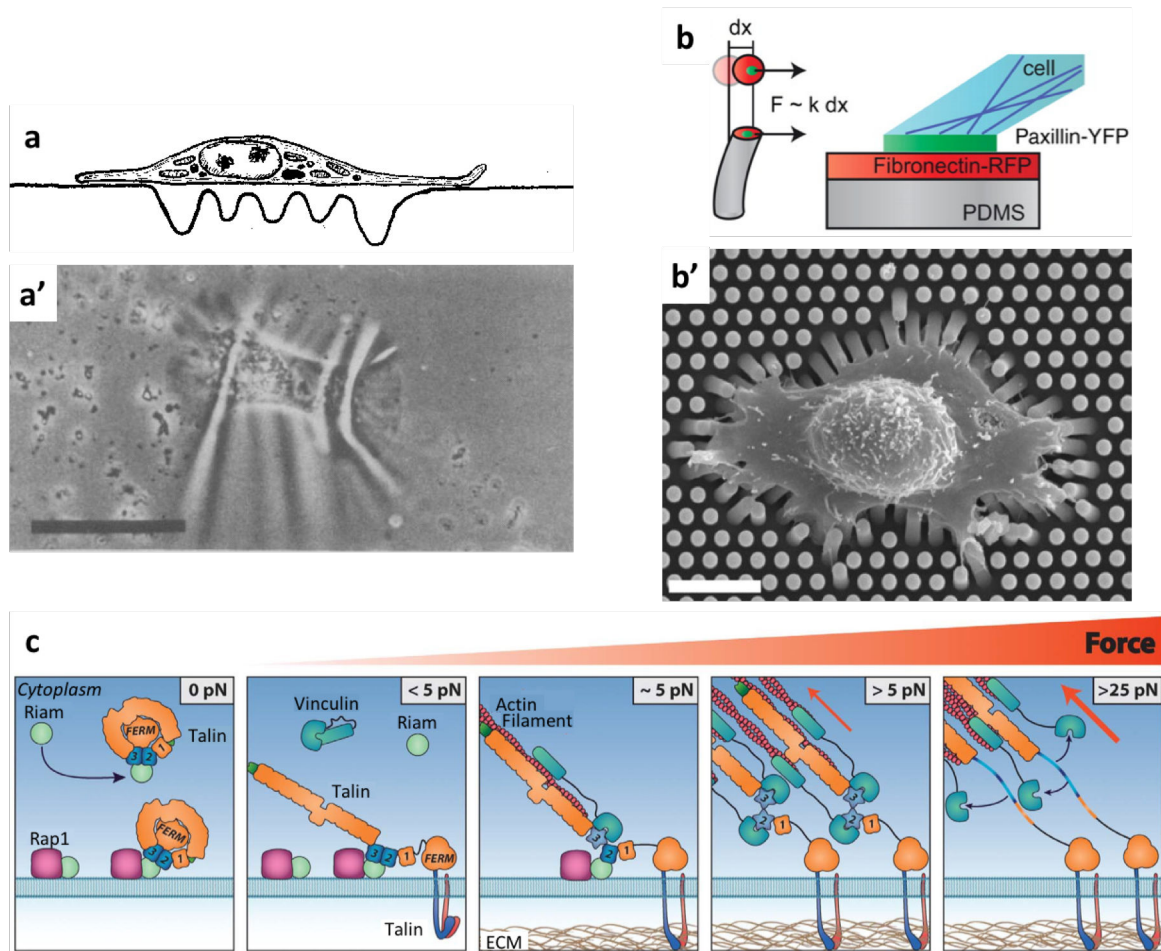


Figure 1.3. Les forces que les cellules exercent sur le substrat sont en permanence « mesurées » par la taline. (a, a') Les forces de traction exercées par une cellule déforme le fin film de silicone sur lequel elle est étalée. Tiré de (Harris et al., 1980). (b, b') Une cellule tire sur un substrat de micro-piliers recouvert de fibronectine à leur sommet. La déflexion de chaque pilier permet de calculer la force qui lui est appliquée. Tiré de (Trichet et al., 2012). (c) Au niveau moléculaire, une force d'environ 5 pN déploie la taline ce qui permet la liaison de la vinculine et le recrutement de fibres d'actine supplémentaires. Quand la force dépasse 25 pN, la taline concède un nouvel événement de dépliement qui détache la vinculine. Tiré de (Yao et al. 2014a).

In vitro, les cellules qui s'étalent sur le substrat exercent des forces de traction sur ce substrat. Par exemple, ensemencées sur un fin film de silicone, les cellules exercent des forces sur le film qui se plisse (Fig. 1.3. a) (Harris et al., 1980). Pour mesurer ces forces, l'équipe du professeur Ladoux a développé un substrat de micro-piliers recouverts à leur sommet de fibronectine. En mesurant, la déflexion d'un pilier, on peut calculer avec précision la force appliquée à son sommet en connaissant la rigidité du matériau du pilier, sa hauteur et son diamètre (Fig. 1.3. b) (Trichet et al., 2012). Les forces de traction sont générées par les fibres de stress d'actine tendues entre deux adhésions focales. L'adhésion focale transmet une force de traction de l'ordre de quelques nanoNewton. La force de traction, l'adhésion focale et la fibre de stress d'actine sont orientées dans la même direction.

La rigidité du substrat est « sentie » par les AFs : contrairement aux cellules cultivées sur un substrat mou de quelques kPa, les cellules cultivées sur une surface rigide (MPa à GPa) établissent de grandes

adhésions focales matures qui recrutent la vinculine (Pelham and Wang, 1997; Trichet et al., 2012; Sarangi et al., 2017). L'AF mature par le recrutement de vinculine et l'augmentation de la force générée sur le substrat (Kanchanawong et al., 2010; Nicolas et al., 2004; Pelham and Wang, 1997; Saez et al., 2005; Yeung et al., 2005). La taline est un acteur majeur de la mécanosensibilité des AFs. Parmi les domaines fonctionnels qu'elle comporte, les domaines R1-R3 contiennent des sites de liaison à la vinculine (VBS ; Vinculin Binding Site) (Goult et al., 2013). En absence de forces mécaniques, les 3 domaines sont repliés et les VBS ne sont pas accessibles (Fig. I.3. c). Quand la taline transmet une force mécanique supérieure à 5 pN entre l'actine et les intégrines, les domaines R1-R3 se déplient et la vinculine se fixe aux VBS (Hirata et al., 2014; del Rio et al., 2009; Yao et al., 2014a). L'enrichissement en vinculine apporte de nouveaux sites de liaison pour les filaments d'actine et augmente les forces transmises par l'adhésion focale sur la MEC (Chen and Dokholyan, 2006; Hirata et al., 2014). La maturation mécanosensible de l'adhésion focale modifie l'organisation du cytosquelette d'actomyosine et change l'expression des gènes (Dupont et al., 2011).

Les adhésions focales sont impliquées dans la modification de l'expression du génome. Par exemple, la « lecture » de la rigidité du substrat par les adhésions focales permet à des cellules souches mésenchymateuses de se différencier en cellules nerveuses sur un substrat mou (0,1-1 kPa) et en cellule osseuse sur un substrat rigide (40 kPa) (Engler et al., 2006). A l'image de la zyxine et de la paxilline, certaines protéines des AFs peuvent être transloquées dans le noyau où elles régulent l'activité de facteurs de transcription (Wang and Gilmore, 2003). De plus, la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase) active le co-facteur de transcription Yap (Yes-Associated Protein) en réponse à l'engagement des intégrines sur la fibronectine ce qui augmente la prolifération cellulaire (Aragona et al., 2013; Benham-Pyle et al., 2015; Dupont et al., 2011; Kim and Gumbiner, 2015).

En conclusion, les HDs et les AFs ancrent mécaniquement le cytosquelette à la MEC. Les forces générées par le cytosquelette et transmises aux contacts cellule-matrice sont à la base de la mécanotransduction. Dans le paragraphe suivant nous décrirons les constituants et les propriétés mécaniques du cytosquelette.

1.1.1.2 Le cytosquelette

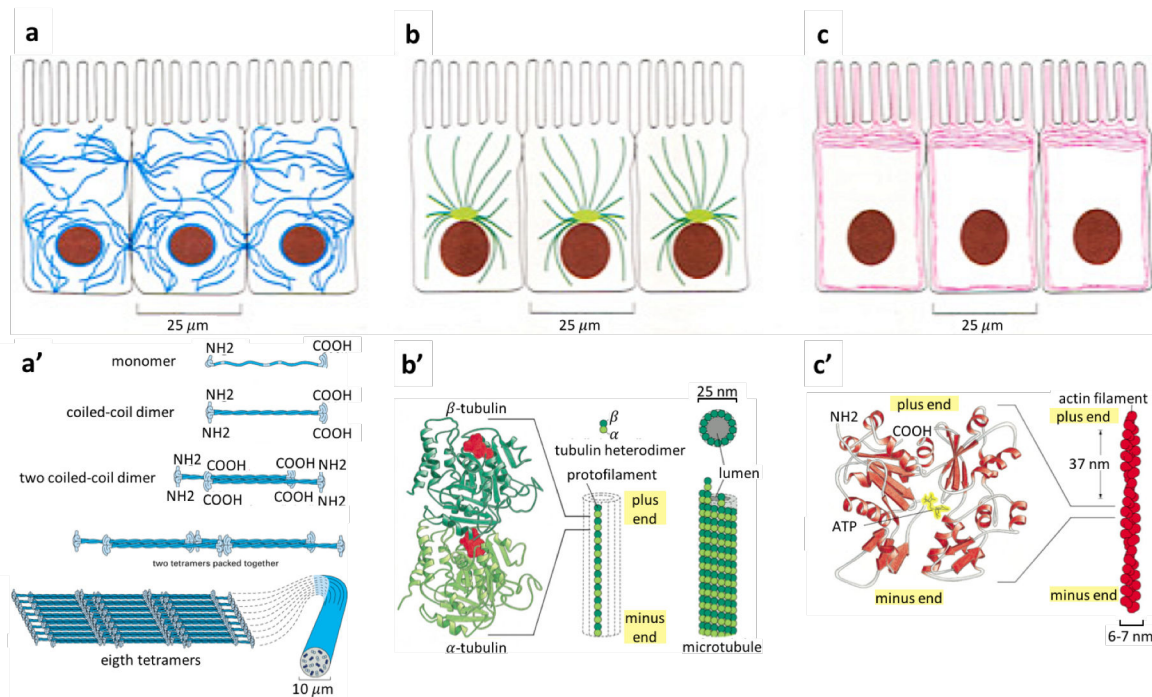


Figure 1.4. Le cytosquelette. (a, b, c) Organisation des filaments intermédiaires dans une cellule épithéliale ciliée (entérocyte) pendant l'interphase. (a) Les filaments intermédiaires sont périnucléaires et se concentrent aux desmosomes et aux hémidesmosomes. (a') Le filament intermédiaire a une structure de type cordage. (b) Les microtubules ont une organisation en étoile dont le centre est le MTOC (Microtubule Organizing Centre), souvent co-localisé avec le centriole. (b') Le microtubule a structure tubulaire. (c) Les microfilaments d'actine sont localisés à la périphérie de la cellule. On note un renforcement du cortex d'actine au pôle apical de la cellule. L'actine structure les cils des cellules entérocytaires. (c') Le filament d'actine a une structure hélicoïdale. Adapté de (Alberts et al., 2002).

Les filaments intermédiaires (FIs), les microtubules et les microfilaments sont les 3 structures fibrillaires qui composent le cytosquelette. Les monomères de FI, la tubuline et l'actine sont les sous-unités protéiques élémentaires qui s'assemblent pour former respectivement ces trois types de filaments (Fig. 1.4.). Bien qu'ils soient enchevêtrés et qu'ils interagissent dans de nombreux contextes (Huber et al., 2015), on peut parler du cytosquelette de FIs, du cytosquelette de microtubules et du cytosquelette d'actine.

Les trois cytosquelettes ont un rôle important dans la migration des cellules. Schématiquement, le cytosquelette d'actine associé aux moteurs moléculaires de myosine II, ou actomyosine, permet de générer les forces nécessaires à la migration cellulaire. Les microtubules sont importants pour la mitose et pour orienter et maintenir la direction de migration des cellules. Les FIs sont responsables de l'élasticité des cellules et participent à la cohésion des tissus.

Bien que le cytosquelette de microtubules ne soit pas directement en relation avec les résultats décrits dans les chapitres suivants, nous avons décidé d'en décrire succinctement les propriétés. Nous détaillerons plus particulièrement les cytosquelettes de FIs et d'actomyosine.

1.1.1.2.1 Les microtubules

Les microtubules sont des tubules très dynamiques de 25 nm d'épaisseur. Ils s'organisent en étoile dans la cellule (Fig. I.4. b) autour du centre organisateur des microtubules (MTOC). Les microtubules sont ubiquitaires et conservés au cours de l'évolution des eucaryotes. Ce sont les acteurs majeurs responsables de la séparation des chromosomes homologues pendant la mitose et de la polarité des cellules en interphase (Howard and Hyman, 2003).

L'unité élémentaire du microtubule est un hétéro-dimère de tubuline α et β (Fig. I.4. b'). Le microtubule a une structure cylindrique creuse composée de 13 protofilaments. La structure tubulaire du microtubule lui confère une grande rigidité (Hirokawa, 1998).

La contribution des microtubules pendant la migration cellulaire n'est pas nécessaire à la compréhension de cette thèse. Pour plus d'informations à ce sujet, nous invitons le lecteur à lire cette revue de la littérature (Etienne-Manneville, 2013).

1.1.1.2.2 Les filaments intermédiaires (FIs)

Le cytosquelette de FIs est un réseau de filaments de 10 nm d'épaisseur. Ce sont des filaments très stables et peu dynamiques.

Les FI comportent de nombreux sous-types dont les unités élémentaires sont codées par 70 gènes. Les sous-types de FIs sont tissus-spécifiques et peuvent être utilisés pour déterminer l'origine tissulaire des métastases cancéreuses (Chu and Weiss, 2002; Lane and Alexander, 1990; Moll, 1998; Nagle, 1994; Schaafsma and Ramaekers, 1994).

Bien que la plupart des FIs soient cytoplasmiques, les lamines sont intra-nucléaires et certaines kératines sont des résidus de cellules mortes qui composent les ongles et les poils (Langbein and Schweizer, 2005; Ullrich and Gordon, 2015). Les FIs cytoplasmiques sont majoritairement organisés autour du noyau (Fig. I.4. a). Les kératines épithéliales sont abondamment présentes dans les cellules épithéliales, les neurofilaments dans les cellules neurales et la vimentine est caractéristique des cellules mésenchymateuses (leucocytes, fibroblastes). Dans la peau, les kératines K5 et K14 sont les plus exprimées (Moll et al., 2008).

L'unité élémentaire du FI est un monomère comportant un domaine central allongé en hélice α (Fig. I.4. a'). L'enroulement parallèle de deux monomères donne naissance à un dimère super-enroulé. Une paire de dimères s'associent de façon antiparallèle et forment un tétramère. Le tétramère est composé de deux dimères pointant dans des directions opposées, ses deux extrémités sont identiques et le FI n'a pas de polarité. Enfin, huit tétramères se lient ensemble par leurs parties latérales pour former le FI. La section d'un FI est donc composée de 32 monomères.

Les FI confèrent aux cellules leurs propriétés mécaniques grâce à leur structure de type cordage (Ramms et al., 2013; Seltsmann et al., 2013a). Ils sont facilement déformés mais très difficile à rompre. Le cytosquelette de filaments intermédiaires est ancré à la MEC et aux cellules voisines grâce aux hémidesmosomes et aux desmosomes, respectivement. La délétion des gènes de kératine chez la souris a permis de mettre en évidence le ramollissement et la diminution de l'élasticité de cellules de peau (Ramms et al., 2013; Seltsmann et al., 2013a). Les filaments de kératine sont très importants pour la cohésion des épithélia et la transmission des contraintes mécaniques. Leur absence ou leur dysfonction se traduit par la rupture des cellules ou leur décollement de la lame basale.

1.1.1.2.3 L'actomyosine

Le cytosquelette d'actomyosine est constitué de microfilaments d'actine et de moteurs moléculaires de myosine II non-musculaire. Ensemble, l'actine et la myosine assurent de nombreuses fonctions comme la contractilité des cellules, le changement de forme, l'extension de protrusions et la migration.

Les microfilaments d'actine ont une structure hélicoïdale de 6-7 nm d'épaisseur. La polymérisation des filaments d'actine est polaire, hautement dynamique et finement régulée (Dominguez and Holmes, 2011). Les filaments peuvent s'organiser en faisceau ou en réseau. Des transitions entre ces deux organisations sont possibles. Le cortex d'actine est le réseau de filaments qui s'organise à la membrane.

1.1.1.2.3.1 La polymérisation de l'actine

L'unité moléculaire élémentaire est la molécule d'actine globulaire (actine G). L'actine G porte soit une molécule d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) ou d'ADP (Adénosine Di-Phosphate). L'actine G-ATP est la forme active qui peut être ajoutée au filament. Quand l'actine G est intégrée dans un filament, l'ATP est hydrolysée en ADP + Pi (Phosphate inorganique). La dépolymérisation du filament libère des molécules d'actine G-ADP. La protéine profiline recycle les monomères d'actine G en favorisant le remplacement de la molécule d'ADP par une molécule d'ATP (Alberts et al., 2002; Wolven et al., 2000). L'actine G est polaire : elle comporte une face négative et une face positive (Fig. I.4. c'). Une face négative d'actine G ne peut interagir qu'avec la face positive d'une autre molécule d'actine G.

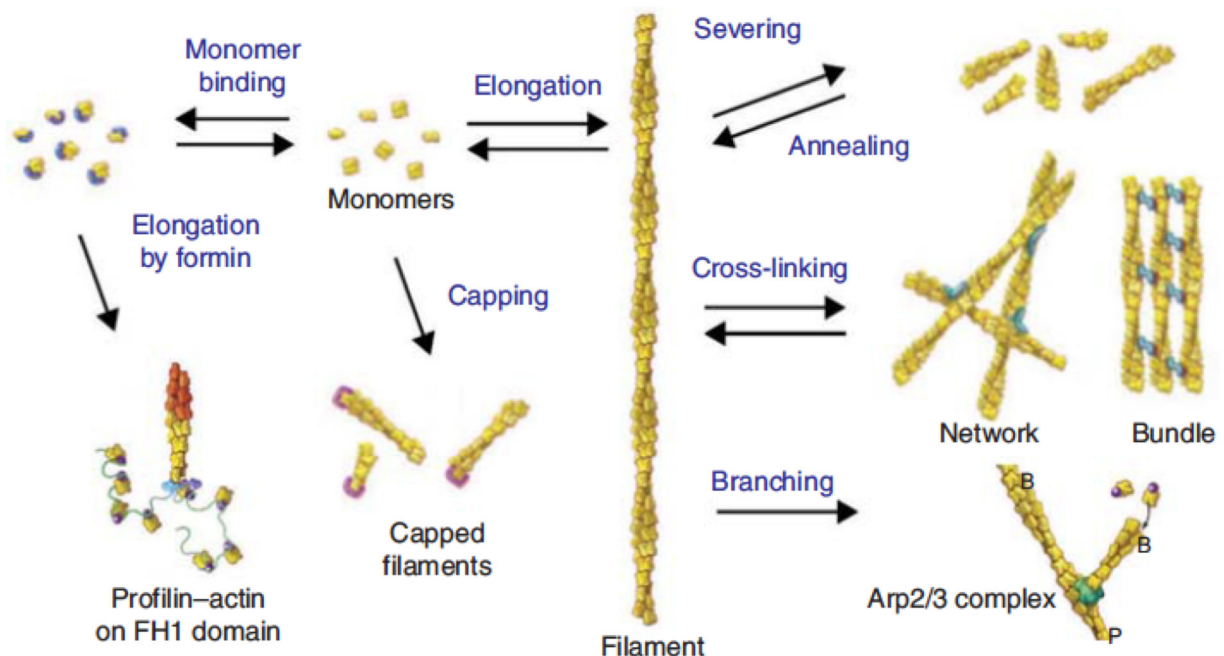


Figure I.5. Fonction des protéines de liaison à l'actine. Dans le cytoplasme, les monomères d'actine peuvent être sous forme libre ou lié à une autre protéine. La formine permet l'élongation d'un filament d'actine. Le filament d'actine peut être désorganisé par dépolymérisation de monomères ou par découpage du filament. Les filaments peuvent être réticulé en réseau ou en faisceaux de filaments parallèles ou anti-parallèles. Enfin, le complexe Arp2/3 favorise l'organisation d'un réseau d'actine branchée. Tiré de (Pollard, 2016).

La succession des monomères d'actine forme les filaments d'actine, ou actine F. A l'image des monomères, les filaments d'actine sont polaires. La polymérisation d'un filament d'actine se fait en 2 étapes *in vitro* : la nucléation est la formation d'un trimère et l'élongation est l'addition des monomères au filament préformé. La polymérisation du filament d'actine est également polaire : des monomères d'actine G-ATP sont ajoutés à l'extrémité positive, ou barbée du filament alors que les monomères d'actine G-ADP se détachent de l'extrémité négative, ou pointue du filament.

1.1.1.2.3.2 La régulation de la polymérisation de l'actine

De nombreuses protéines régulent l'élongation et l'organisation des filaments d'actine (Fig. 1.5.). Ces protéines sont révisées dans cet article (Pollard, 2016).

La protéine profiline se lie à une molécule d'actine G-ATP et facilite l'ajout à un filament d'actine. Au contraire, la thymosine séquestre les monomères d'actine pour empêcher leur addition dans un filament (Safer et al., 1991).

Les protéines de la famille des formines, favorisent la nucléation en stabilisant les dimères et trimères d'actine. Les formines sont des protéines processives qui restent associées à l'extrémité barbée des filaments où elles catalysent l'élongation. De plus les formines catalysent la polymérisation de filaments d'actine organisés en faisceaux.

Le complexe Arp2/3 (Actin-related protein 2/3) se lie sur le côté d'un filament d'actine et initie la nucléation d'un nouveau filament (Chesarone et al., 2010). Arp2/3 favorise une polymérisation d'actine branchée avec un angle de 70° entre les deux filaments (Amann and Pollard, 2001; Mullins et al., 1998; Svitkina and Borisy, 1999).

Les protéines Ena/VASP (Vasodilatator-Stimulated Phosphoprotein) se lient à la partie barbée des fibres d'actine et favorisent leur élongation en interdisant l'accès des protéines de coiffe (« capping proteins » en anglais) dont le rôle est de recouvrir l'extrémité barbée pour empêcher l'addition de nouveaux monomères (Castellano et al., 2001; Havrylenko et al., 2015; Krause and Gautreau, 2014).

1.1.1.2.3.3 L'organisation des filaments d'actine

Des protéines participent à l'organisation des filaments d'actine en faisceaux ou en réseaux. La fimbrine et la fascine se lient aux fibres parallèles, c'est-à-dire orientées dans le même sens, et forment des faisceaux polarisés. L' α -actinine stabilise les faisceaux d'actine dont les fibres sont antiparallèles, c'est-à-dire qu'elles sont orientées dans des sens opposés. Associé aux myosines non musculaires de

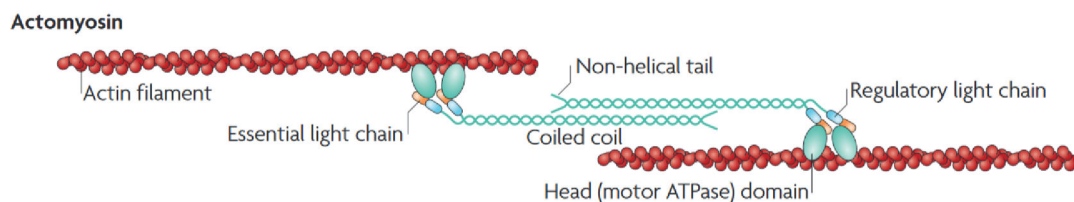


Figure 1.6. La myosine. La myosine est constituée de 2 (chaînes lourdes, en vert), de 2 chaînes légères essentielles (MELC, en orange) et de 2 chaînes légères régulatrices (MRLC, en bleu). La myosine se lie à des filaments d'actine anti-parallèles et permet la génération d'une force contractile. Adapté de (Parsons et al. 2010).

type II, les faisceaux d'actine antiparallèle sont contractiles. La filamine organise l'actine en réseau en connectant 2 fibres qui se croisent. Comme nous l'avons évoqué précédemment, Arp2/3 favorise l'organisation d'un réseau de filaments d'actine branchés. Le rôle des faisceaux et des réseaux d'actine sera décrit dans de plus amples détails dans la partie sur la migration cellulaire individuelle.

1.1.1.2.3.4 La contractilité du cytosquelette d'actomyosine

L'unité motrice de myosine est un complexe protéique comportant 2 chaînes lourdes de myosine (MHC ; Myosin Heavy Chain), 2 chaînes légères régulatrices (MRLC ; Myosin Regulatory Light Chain) et 2 chaînes légères essentielles (MELC ; Myosin Essential Light Chain) (Parsons et al., 2010; Vicente-Manzanares et al., 2009). Les MHC sont composées d'un domaine d'homodimérisation, d'un domaine « bras de levier » assurant l'activité motrice, d'un domaine enzymatique ATPase et d'un domaine de liaison à l'actine F. Les deux MHC sont surenroulées grâce à leurs domaines d'homodimérisation (Fig. 1.6.) (Vicente-Manzanares et al., 2009). Les chaînes MELC et MRLC se fixent sur les chaînes lourdes entre le domaine moteur et le domaine enzymatique. Comme leurs noms l'indiquent, les chaînes légères permettent le fonctionnement et la régulation de l'activité motrice de la chaîne lourde.

Chez les mammifères, on distingue trois isoformes de chaîne lourde de myosine non-musculaire de type II (Golomb et al., 2004). Les myosines non-musculaire de type IIa, IIb et IIc participent à la contractilité des cellules non-musculaires.

La myosine non liée à l'ATP ou à l'ADP est liée avec une très forte affinité à un filament d'actine (Alberts et al., 2002; Kull and Endow, 2013). Une molécule d'ATP se fixe à la myosine ce qui lui permet de se détacher du filament d'actine. L'hydrolyse de l'ATP en ADP + Pi change l'angle du domaine « bras de levier » de la myosine. A ce stade, la myosine est en regard avec une partie du filament d'actine plus proche de l'extrémité positive qu'à l'état initial. La myosine relargue le phosphate inorganique et se lie à la fibre d'actine. La dernière étape est le relargage de l'ADP qui rétablit l'angle initial du domaine « bras de levier » de la myosine en tractant le filament d'actine.

1.1.1.2.3.5 L'organisation de l'actomyosine

L'actomyosine peut s'organiser en cortex, en fibre de stress, en faisceaux parallèles ou en réseau branché d'actine.

Le cortex d'actomyosine est le réseau d'actine et de myosine enchevêtrées qui est apposé à la face cytoplasmique de la membrane plasmique des cellules. Le cortex est ancré à la membrane plasmique grâce à de nombreuses protéines membranaires et transmembranaires (Salbreux et al., 2012).

La protéine Arp2/3 entraîne la formation d'un réseau branché d'actine en permettant la nucléation de néo-filaments sur le côté de filaments préexistants. Le réseau d'actine branché provoque la formation d'une protrusion membranaire plate à l'avant de la cellule en migration ; c'est le lamellipode.

Les fibres de stress sont des faisceaux anti-parallèles et contractiles d'actomyosine. On décrit trois types de fibres de stress en fonction de leur position dans la cellule (Fig. 1.8. b) (Hotulainen and Lappalainen, 2006). Par convention, la face dorsale de la cellule s'oppose à la face ventrale qui est en interaction avec la LB. Les fibres de stress ventrales sont tendues entre deux adhésions focales qui transmettent les forces contractiles au substrat (Sarangi et al., 2017). Les fibres de stress dorsales sont

plus fines et sont localisées aux faces dorsale et latérale de la cellule. Des études récentes montrent que ces fibres sont ancrées sur le noyau via les protéines du complexe LINC (Linker of Nucleoskeleton to Cytoskeleton). Elles peuvent transmettre des forces de compression ou d'étirement sur le noyau (Le et al., 2016; Lombardi and Lammerding, 2011). Enfin, les fibres ou arcs transverses sont situés à l'avant de la cellule, parallèlement au front de migration (Hotulainen and Lappalainen, 2006; Machesky and Hall, 1997; Shemesh et al., 2009).

Les filaments d'actine peuvent s'organiser en faisceaux parallèles qui permettent l'extension de protrusions membranaires linéaires comme les filopodes ou les microvillosités. Les filopodes sont des structures observées pendant la migration cellulaire. Les microvillosités sont des protrusions décrites à la face apicale des cellules intestinales.

En résumé, dans le cytosol des cellules, les quantités d'actine G et d'actine F sont régulées par de nombreuses protéines de régulation de la polymérisation et la dépolymérisation. L'actine F peut s'organiser de 4 façons différentes : en réseau cortical, en réseau branché, en faisceau de filaments parallèles et en faisceaux de filaments antiparallèles. En présence de myosine, les faisceaux de filaments d'actine antiparallèles et le cortex d'actine sont contractiles.

1.1.1.2.4 La mécanotransduction dépendante du cytosquelette

L'organisation et la dynamique des 3 cytosquelettes sont modifiées en relation avec les propriétés mécaniques de l'environnement mécanique des cellules.

En relation avec les complexes d'adhésion cellulaire, l'actomyosine est le principal organe mécanosensible des cellules et se réorganise en fonction de la rigidité du substrat (Fig. I.7. a) (Gupta et al., 2015). En effet, la contractilité de la myosine permet de tester mécaniquement la rigidité du substrat (Ghassemi et al., 2012; Yang et al., 2016). De façon remarquable, la rigidité de fibroblastes en culture suit celle du substrat dans une gamme allant jusqu'à 20 kPa (Solon et al., 2007). De plus, le cortex d'actomyosine des cellules est capable de se rigidifier ou de se ramollir en réponse à une contrainte mécanique répétée (Fig I.7. b, b') (Chaudhuri et al., 2007; Chen et al., 2010a; Haase et al., 2015; Icard-Arcizet et al., 2008; Krishnan et al., 2009; Storm et al., 2005; Watanabe-Nakayama et al., 2011). En appliquant une contrainte mécanique sur le cortex d'actomyosine avec une micropipette, Riveline et associés ont observé la maturation des AFs au voisinage de la perturbation en réponse à l'activation et au renforcement local de l'actomyosine (Balaban et al., 2001; Riveline et al., 2001). L'adaptation rapide des cellules à la rigidité de leur environnement (0,1sec) exclut la possibilité d'une régulation transcriptionnelle (Mitrossilis et al., 2010). Au contraire, les protéines de régulation de l'actomyosine associées aux AFs ajustent localement la contractilité des cellules et réorganisent l'actine en réponse à la rigidité de l'environnement (Fig. I.7. a). En retour, la contractilité de l'actomyosine est nécessaire à la mécanosensibilité des AFs (Kuo, 2013). En accord avec ces observations, l'activité ATPasique de la myosine II est augmentée avec la rigidité du substrat (Kovács et al., 2007). En conclusion, l'actomyosine permet aux cellules de tester les propriétés mécaniques de leur environnement et de s'y adapter. Les AFs ancrent l'actomyosine à la MEC et sont nécessaires aux cellules pour « sentir » les propriétés mécaniques du substrat. En retour, la mécanosensibilité des AFs est dépendant de la contractilité de l'actomyosine.

Ancrée à de nombreux organites cellulaires, l'actomyosine influence de nombreuses fonctions biologiques en changeant ses propriétés mécaniques. Par exemple, on peut spéculer que

l'actomyosine transmet des contraintes mécaniques aux lamines A/C du noyau via les protéines du complexe LINC et influence directement la structure de la chromatine et l'expression des gènes (Lombardi and Lammerding, 2011). L'actomyosine interagit aussi avec l'appareil de Golgi et influence le trafic intracellulaire ce qui pourrait influencer le transport des protéines dans les compartiments cellulaires, la sécrétion de facteurs de croissance et l'endocytose (Guet et al., 2014).

En relation avec la contractilité de l'actomyosine, la rigidité du substrat change la dynamique et l'organisation du cytosquelette de microtubules (Fig. I.7. a) (Myers et al., 2011). De plus, l'organisation des microtubules est différente quand les cellules sont étalées sur un substrat mimant la MEC ou un contact cellule-cellule (Pleasant et al., 2014).

Bien qu'ils soient moins dynamiques que les microtubules ou l'actomyosine, les filaments intermédiaires jouent un rôle important dans la mécanosensibilité des cellules. A titre d'exemple, la vimentine est impliquée dans la sensibilité mécanique des adhésions focales (Gregor et al., 2014).

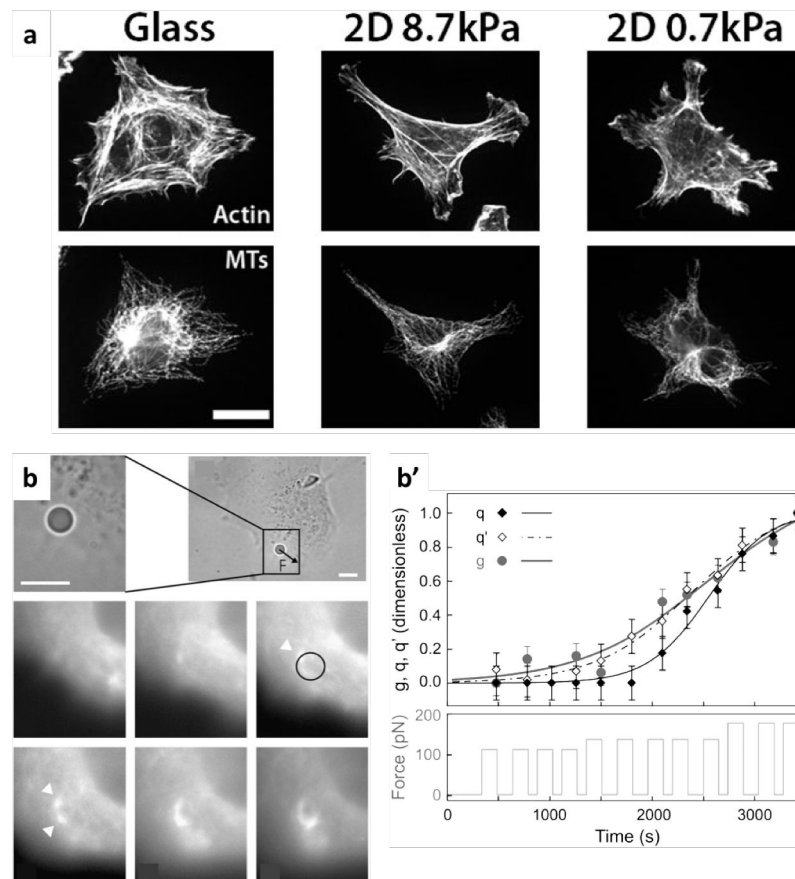


Figure I.7. Mécanotransduction en rapport avec les cytosquelettes d'actine et de microtubule. (a) Organisation des cytosquelettes d'actine (panneau supérieur) et de microtubule (panneau inférieur) de cellules endothéliales cultivées sur des substrats de collagène de 2GPa, 8,7 kPa et 0,7 kPa. Sur un substrat mou, les cellules sont moins étalées, comportent moins de fibre de stress d'actine et les microtubules sont déstabilisés. Tiré de (Myers et al., 2011). (b, b') Une force est appliquée sur une cellule myoblastique de souris C2C12 à l'aide d'une pince optique et d'une micro-bille recouverte de peptide RGD en contact avec la cellule. En réponse à la répétition de la contrainte mécanique, la cellule recrute de l'actine autour de la bille et la rigidité locale de la cellule augmente. (b') q' et q représentent la fluorescence d'actine au cours du temps normalisée ou non, respectivement. g représente l'élasticité locale de la cellule au contact de la bille. Tiré de (Icard-Arcizet et al., 2008).

Récemment, une équipe a montré que les filaments intermédiaires intranucléaires représentés par les lamines A/C, participent au durcissement du noyau en réponse à des contraintes mécaniques *in vitro*

(Guilluy et al., 2014). Le renforcement mécanique du noyau par les lamines protège l'ADN cellulaires des cassures double-brins hautement mutagènes. En effet, en absence des lamines A/C, la déformation du noyau entraîne la rupture de l'enveloppe nucléaire et permet l'interaction des endonucléases cytoplasmique avec l'ADN de la cellule (Raab et al., 2016).

En conclusion, l'actomyosine est une structure hautement dynamique qui permet à la cellule de s'adapter spatialement et temporellement aux propriétés mécaniques de l'environnement ce qui permet de réguler de grandes fonctions cellulaires comme par exemple la migration de cellules individuelles.

1.1.2 Migration des cellules individuelles

Dans la littérature, on décrit 2 modes majeurs de migration cellulaire individuelle (Mierke, 2015). Dans cette partie nous évoquerons brièvement la migration amiboïde puis nous nous intéresserons plus en détail à la migration mésenchymateuse, le mode de migration privilégié des cellules épithéliales.

1.1.2.1 La migration amiboïde

La migration amiboïde est une migration par bourgeonnement (*blebbing*). Elle est utilisée par certains types cellulaires comme les amibes quand l'adhésion au substrat n'est pas possible, par exemple en absence de protéines adhésives de la matrice extracellulaire (Charras and Paluch, 2008; Fackler and Grosse, 2008; Paluch and Raz, 2013). En combinaison, l'absence d'adhésion et le confinement peuvent induire la migration amiboïde de cellules mésenchymateuses (Liu et al., 2015b; Ruprecht et al., 2015). Ce mode de migration est aussi décrit dans certaines lignées de cancer (Friedl, 2004) et chez les cellules immunitaires (Jacobelli et al., 2010). Il repose sur la contractilité du cortex d'actomyosine.

La contraction du cortex d'actomyosine génère une pression hydrostatique dans la cellule supérieure à celle de l'environnement. Une rupture locale des liens entre le cortex d'actine et la membrane plasmique entraîne la formation d'un bourgeon de membrane plasmique. Un flux de cytosol permet l'expansion du bourgeon et diminue de la pression dans la cellule. Dans un deuxième temps, le cortex d'actine se réassemble à la membrane du bourgeon. Quand le cortex d'actine est de nouveau continu, la pression hydrostatique s'accroît à nouveau. La succession des cycles de bourgeonnement de la membrane déplace le centre de masse de la cellule.

1.1.2.2 La migration mésenchymateuse

La migration mésenchymateuse est le mode migration le plus répandu et le mieux décrit. C'est celui utilisé par les cellules mésenchymateuses et de nombreuses lignées cancéreuses métastatiques qui migrent individuellement. La migration mésenchymateuse n'est possible qu'en présence d'adhésions fortes avec le substrat (Blanchoin et al., 2014; Ladoux and Nicolas, 2012). Ce mode de migration repose également sur la contractilité et la polymérisation du cytosquelette d'actine.

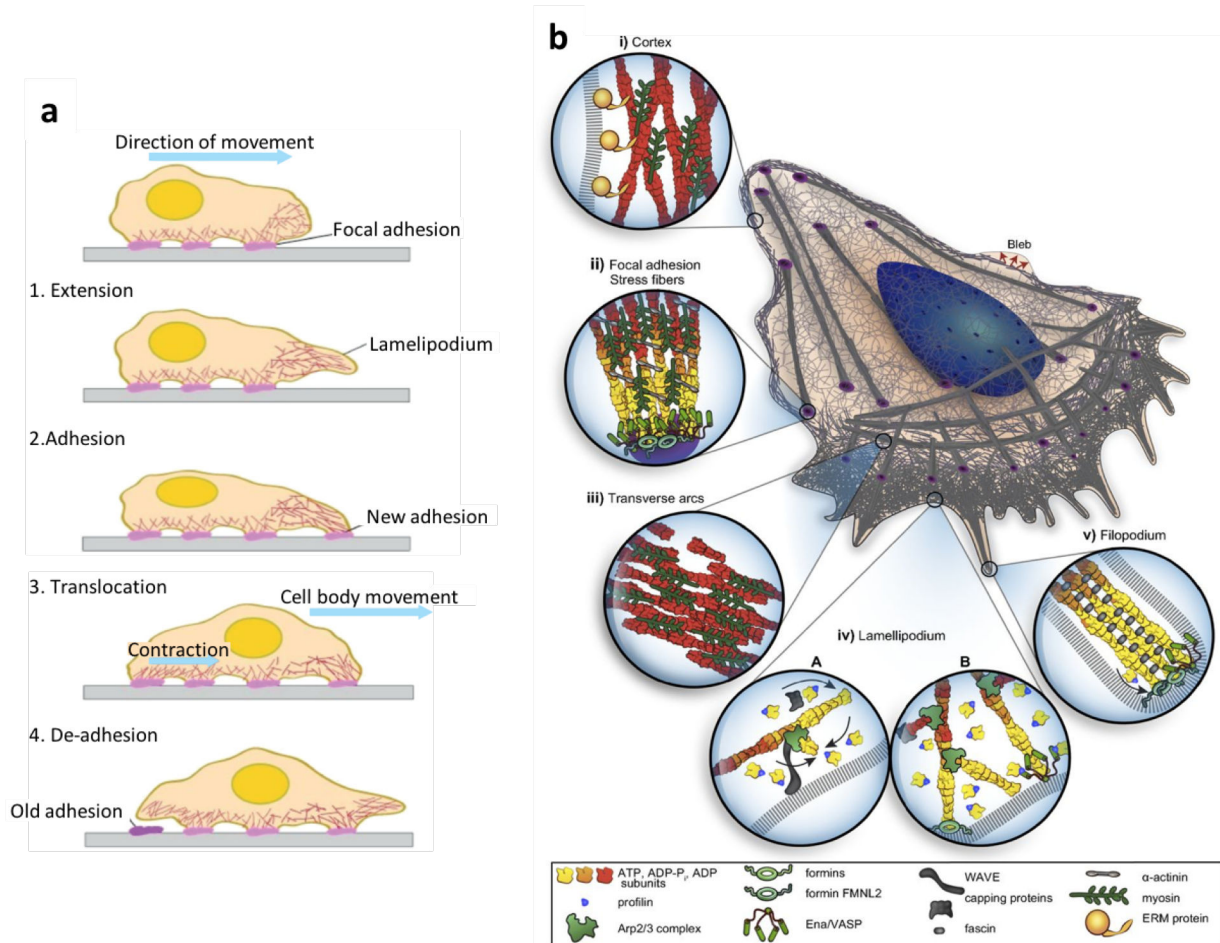


Figure 1.8. La migration mésenchymateuse. **(a)** Les étapes de la migration mésenchymateuse. Extension : la cellule étend des protrusions à l'avant. Adhésion : les protrusions assemblent des points d'ancrage sur le support. Translocation : la cellule se contracte pour déplacer son centre de masse. De-adhésion : Les points d'ancrage à l'arrière de la cellule sont désassemblés. Tiré de (Ladoux and Nicolas, 2012). **(b)** Structure de l'actine d'une cellule en migration. A l'avant, la polymérisation branchée de l'actine dépendante de Arp2/3 permet l'extension du lamellipode. La coopération des protéines VASP et de la fibrine permet l'extension de filopodes. A l'arrière de la cellule, la contraction du cortex d'actomyosine permet la rétraction et le désassemblage des adhésions focales. Dans le corps cellulaire, on distingue les 3 types de fibres de stress tendues entre des adhésions focales : les arcs transverses, les fibres de stress ventrale et les fibres de stress dorsales. Tiré de (Blanchoin et al., 2014).

Le mouvement de la cellule est un processus en 4 étapes qui commence par (1) l'extension de protrusions à l'avant, suivi de (2) l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire puis (3) la rétraction du corps cellulaire à l'arrière grâce à la contractilité du cortex d'actine (Fig. 1.8.a) (Ladoux and Nicolas, 2012).

Les petites GTPases de la superfamille Rho sont les principales protéines de régulation de la migration. Ce sont des protéines capables d'hydrolyser le GTP (Guanosine Tri-Phosphate) en GDP (Guanosine Di-Phosphate) + Pi puis d'échanger le GDP par un GTP. Elles sont actives en présence de GTP et inhibée en présence de GDP. Les GEFs (Guanine Exchange Factor) activent les GTPases en catalysant le remplacement du GDP par une molécule de GTP. En revanche, les GAPs (GTPase Activating Protein) inhibent les GTPases par activation de l'activité catalytique.

On décrit deux types de protrusions pendant la migration mésenchymateuse ; les lamellipodes et les filopodes sont contrôlés par les GTPases Rac1 et Cdc42, respectivement (Fig. 1.8. b). La petite GTPase RhoA contrôle la contractilité de l'actomyosine et participe à la rétraction de l'arrière de la cellule.

1.1.2.2.1 L'extension de protrusions

1.1.2.2.1.1 Les lamellipodes

Le lamellipode est une protrusion membranaire large et plate qui recouvre une grande surface de substrat à l'avant de la cellule (Fig. I.8. b). C'est une structure qui peut être labile et se rétracter rapidement ou se stabiliser par l'engagement d'intégrines dans les adhésions focales (Krause and Gautreau, 2014). La force d'extension du lamellipode repose sur la polymérisation branchée d'actine assurée par le complexe de nucléation Arp2/3 (Takenawa and Suetsugu, 2007). L'élongation des filaments d'actine est permise par l'activation des protéines de la famille Ena/VASP. Ena/VASP empêche l'accès de l'extrémité barbée de l'actine aux protéines de coiffe inhibitrice de la polymérisation (Bear and Gertler, 2009). La polymérisation d'actine à l'avant du lamellipode entraîne la formation d'un flux rétrograde d'actine branchée. La génération d'une force qui étend la membrane plasmique à l'avant du lamellipode n'est possible que par l'ancrage de ce réseau d'actine branchée sur les adhésions focales placées à l'arrière du lamellipode et dans la lamella (Small et al., 2002). La lamella est la zone de transition entre le lamellipode et le corps cellulaire.

Rac1 est le principal régulateur de la formation des lamellipodes ; l'activation de la PI3K (Phospho-Inositide 3-kinase) à la membrane plasmique accroît la concentration locale de PIP3 (Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-triphosphate) ce qui favorise l'activation de Rac1 par les GEF (Krause and Gautreau, 2014). Pendant la migration, un gradient de Rac1-GTP s'établit dans la cellule et détermine un front avant qui oriente la migration. La présence de Rac1-GTP active la kinase JNK (JUN N-terminal kinase) qui phosphoryle et active le complexe WAVE (WASP-family verprolin-homologous protein). Le complexe WAVE active alors les complexes Arp2/3 et VASP qui permettent la formation du lamellipode. L'arrière est déterminé par un gradient de RhoA. Rac1 et RhoA s'auto-inhibent et maintiennent des gradients inverses.

1.1.2.2.1.2 Les filopodes

Le filopode est une protrusion de membrane plasmique fine qui s'étend depuis le lamellipode ou directement depuis le corps cellulaire (Fig. I.8. b) (Arjonen et al., 2011). C'est une structure labile qui teste si l'environnement proche de la cellule permet la migration cellulaire (espace libre, présence de protéines de MEC). Comme pour le lamellipode, la membrane plasmique est déformée par une force issue de la polymérisation d'actine.

Pour former un filopode, plus d'une dizaine de filaments d'actine parallèles sont polymérisés et réticulés par les formines et la fascine, respectivement (Arjonen et al., 2011). La présence de formines à l'extrémité du filopode assure la polymérisation non-branchée du faisceau d'actine et permet l'extension de la membrane plasmique. La protéine VASP empêche la liaison des protéines de coiffe et favorisent la polymérisation (Applewhite et al., 2007). La polarité du faisceau d'actine qui structure le filopode permet à la myosine X de transporter des protéines cargo à l'extrémité du filopode (Bohil et al., 2006; Zhang et al., 2004). On y retrouve un recrutement important d'intégrines qui permettent d'initier la formation des adhésions focales. La phosphorylation dépendante de RhoA des protéines de la famille Ezrine-Radixine-Moesine (ERM) permet l'ancrage de la membrane plasmique au faisceau d'actine (Matsui et al., 1998).

Cdc42 est la protéine régulatrice principale des filopodes. L'activation de la protéine Cdc42 favorise la formation des filopodes par activation des protéines de la famille Ena/VASP. En association avec PIP2 (Phosphatidyl-inositol-4,5-diPhosphate), Cdc42-GTP empêche la polymérisation branchée de l'actine en inhibant le complexe protéique WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) (Takenawa and Miki, 2001).

1.1.2.2.2 L'adhésion au substrat

A l'avant du lamellipode, on retrouve de petites adhésions focales, immatures et labiles qui sont en cours d'assemblage (Fig. I.8. b). A l'arrière du lamellipode et dans la lamella, les adhésions focales sont plus grosses et plus matures. Elles permettent un ancrage ferme sur le substrat que les cellules utilisent pour se tracter vers l'avant (Krause and Gautreau, 2014; Ladoux and Nicolas, 2012).

1.1.2.2.3 La rétraction de l'arrière de la cellule

La rétraction de l'arrière des cellules en migration est assurée par la contractilité du cytosquelette d'actomyosine et le désengagement des intégrines.

La protéine RhoA est le principal régulateur de la contractilité des cellules et agit à la fois sur la polymérisation linéaire de l'actine et sur l'activité des myosines. En effet, RhoA augmente l'activité de la formine mDia (Diaphanous-related formin-1) qui augmente la nucléation et l'élongation de l'actine fibrillaire. En outre, RhoA active la protéine ROCK (Rho-associated protein kinase), responsable de la phosphorylation de MRLC. La phosphorylation de la MRLC augmente l'activité des chaînes lourdes de myosine qui mettent en tension les fibres d'actine.

Il est important de noter que les protéines RhoA et Rac1 sont de forts antagonistes : l'activation locale de l'une empêche l'activation de l'autre. Cependant, dans certains contextes, RhoA est activé à l'avant du lamellipode et induit la polymérisation d'actine dépendante de mDia (Kurokawa and Matsuda, 2005).

En réponse au gradient qui concentre Rac1-GTP à l'avant de la cellule, un gradient inverse concentre RhoA-GTP à l'arrière. C'est pourquoi la rétraction de la cellule prédomine à l'arrière de la cellule pendant la migration (Ridley et al., 2003; Spiering and Hodgson, 2011). En complément d'une contractilité accrue, la coopération de FAK (Focal Adhesion Kinase) et de RhoA à l'arrière de la cellule permet le désengagement des adhésions focales et le détachement de fibroblastes et de cellules de cancer du sein (Carr et al., 2013; Iwanicki et al., 2008).

Après avoir décrit les mécanismes permettant aux cellules de migrer individuellement, nous nous intéresserons à la migration des cellules au sein d'un épithélium. Les interactions moléculaires et mécaniques aux contacts intercellulaires sont déterminantes pour la régulation de cette migration. L'engagement de contacts cellule-cellule change le comportement migratoire individuel des cellules au sein de l'épithélium et affecte la migration de l'ensemble du tissu.

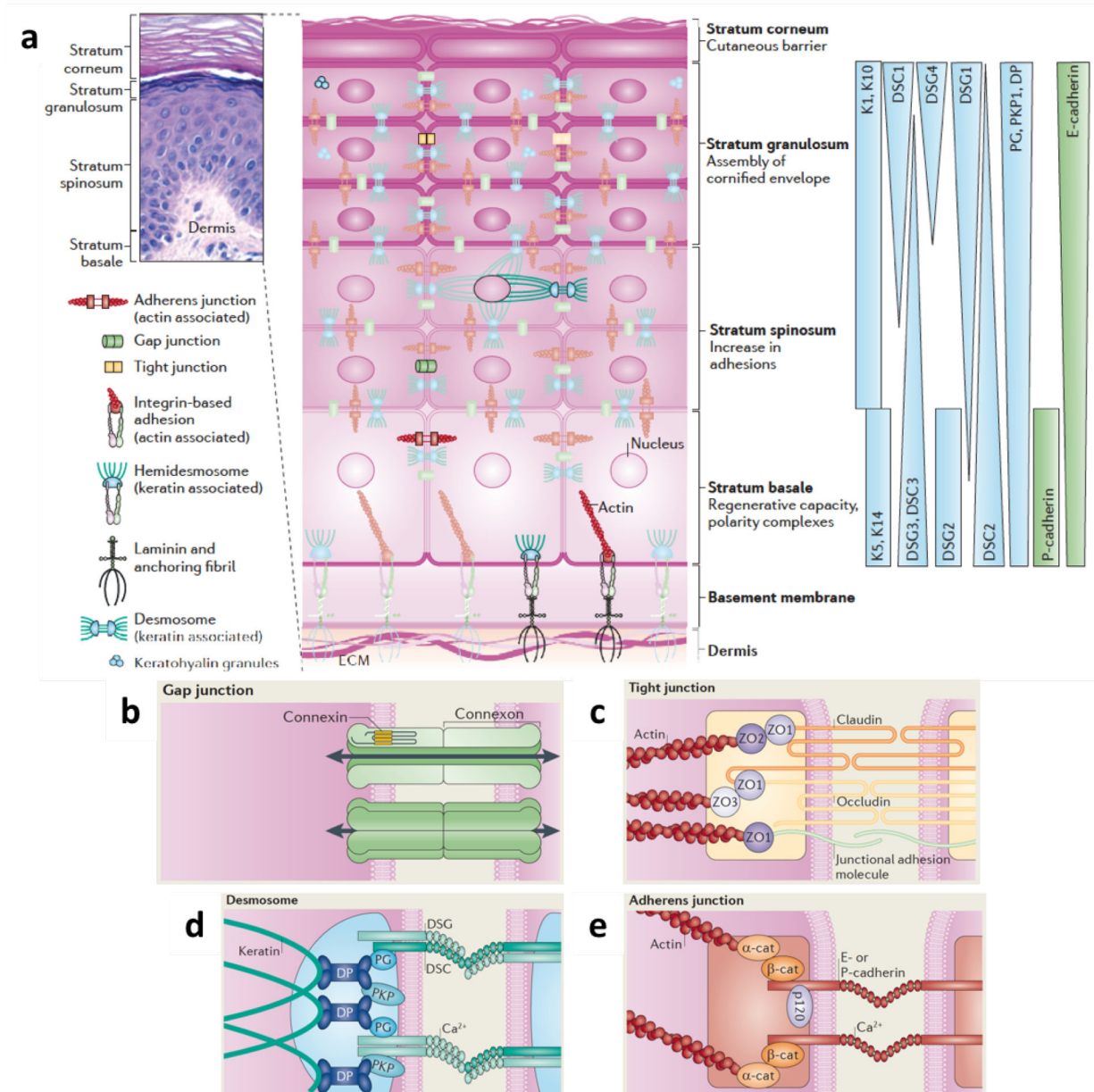


Figure 1.9. L'épiderme et les contacts cellule-cellule. (a) Organisation de l'épiderme. Les cellules de la couche basale de l'épiderme reposent sur la lame basale. Les cellules des couches supérieures sont de plus en plus différenciées et l'expression des filaments intermédiaires de kératine et des protéines des jonctions cellule-cellule sont modifiées. La couche cornée comporte les filaments de kératine et les desmosomes résiduels de cellules ayant évacué leur noyau et tous les organites cellulaires. (b) La jonction communicante. Un hexamère de connexine forme un connexon. L'association de deux connexons de cellules adjacentes forme la jonction communicante. Cette jonction cellule-cellule n'est pas physiquement liée au cytosquelette. (c) La jonction serrée. Les jonctions serrées rendent la jonction intercellulaire imperméable par l'interaction homophile des protéines transmembranaires claudines et occludines. A la face cytoplasmique, ces protéines interagissent avec le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des protéines adaptatrices ZO-1, ZO-2 et ZO-3. (d) Le desmosome. Les desmosomes ancrent mécaniquement les filaments de kératine de cellules adjacentes en présence de Ca^{2+} . Les protéines transmembranaires de cette jonction sont les DSC et DSG. A la face cytoplasmique, elles sont liées aux filaments de kératine via les protéines adaptatrices PG, PKP et DP. (e) La jonction adhérente. En présence de Ca^{2+} , les jonctions adhérentes assurent la continuité mécanique entre les cytosquelettes d'actine de deux cellules adjacentes. Les protéines transmembranaires de la cadherine, la p120 participe à la régulation de voies de signalisation. Abréviations : α -cat/ β -cat/p120 : caténine α / β /p120 ; DP : desmoplakine ; DSC : desmocolline ; DSG : desmogleine ; K1/K10/K5/K14 : kératine 1/10/5/14 ; PG : plakoglobine ; PKP : plakophiline ; ZO-1/-2/-3 : Zonula Occludens-1/-2/-3. Adapté de (Simpson et al., 2011).

1.2 Migration collective et cicatrisation

1.2.1 L'épiderme : l'épithélium de la peau

Les cellules épithéliales s'organisent collectivement en feuillets. Les épithélia sont présents dans tous les organes de l'organisme ; de la peau (épiderme) au système sanguin (endothélium) en passant par les reins (tubules rénaux) et l'intestin (épithélium intestinal). Contrairement aux épithéliums simples qui sont constitués d'une seule couche de cellules, les épithélia stratifiés en comportent plusieurs. Les cellules épithéliales sont très cohésives entre elles et marquent une frontière entre plusieurs compartiments.

L'épithélium de la peau, est le plus important par sa masse (Simpson et al., 2011). Les cellules de l'épiderme sont les kératinocytes (Fig. I.9. a). C'est un épithélium stratifié pavimenteux kératinisé. La couche basale de l'épiderme est le réservoir de kératinocytes prolifératifs qui se divisent et peuplent les couches supérieures (Simpson et al., 2011). Plus un kératinocyte s'éloigne de la couche basale, plus il est différencié. Par exemple, les kératinocytes de la couche basale expriment les kératines K5 et K14 contrairement aux kératinocytes différenciés et non-prolifératif des couches supérieures qui expriment les kératines K1 et K10 (Fuchs and Green, 1980; Langbein and Schweizer, 2005; Wikramanayake et al., 2014). Les kératinocytes de la dernière couche sont ultra-différenciés ; en effet, ils meurent en évacuant tous leurs organites et ne gardent que les filaments de kératine, c'est la couche cornée. De la couche basale à la couche cornée, on trouve la couche épineuse, la couche granuleuse puis la couche claire.

En plus de son rôle de frontière entre l'organisme et l'environnement, l'épiderme a un rôle important de protection contre les agressions physiques (UV, mécanique), chimique et biologique (la flore bactérienne commensale protège des bactéries et mycoplasmes pathogènes). Il a aussi un rôle dans la rétention hydro-sodée et un rôle psychosocial.

Fonctionnellement, la peau est cruciale à la survie de l'organisme. Dans ce contexte, on comprend facilement pourquoi les systèmes de réparations des épithélia, et en particulier ceux de l'épiderme, doivent être rapides et efficace. En cas de coupure ou d'arrachement d'une partie de l'épiderme, les cellules de la couche basale au bord de la blessure s'activent ce qui leur permet de déclencher la migration et d'augmenter leur prolifération. Bien qu'un espace acellulaire soit suffisant, l'activation des kératinocytes est favorisée par le relargage de molécules de dommage cellulaire (IL-1 ; Interleukin-1) et de molécules du système immunitaire (TNF- α ; Tumor Necrosis Factor- α) (Anon et al., 2012; Freedberg et al., 2001). Pour permettre la migration, les kératinocytes activés réorganisent leur cytosquelette de filaments intermédiaires et désassemblent les hémidesmosomes (Hopkinson et al., 2014; Janes and Watt, 2006; Seltsmann et al., 2013b; Wilhelmsen et al., 2006). A l'état stationnaire, les kératinocytes de la couche basale expriment les kératines K5 et K14 alors qu'à l'état activé, ils expriment les kératines K6 et K16 (Freedberg et al., 2001).

Dans cette partie nous détaillerons d'abord les structures protéiques permettant la cohésion des cellules épithéliales et les modes de migration collective. Bien qu'ils soient encore mal compris, nous aborderons ensuite les mécanismes qui permettent l'homéostasie des épithélia en phase stationnaire et pendant la migration.

1.2.2 Les contacts cellule-cellule

Les 3 grandes familles de contacts cellule-cellule qui assurent chacune un rôle différent dans les épithélia (Fig. 1.9. b-e). La structure d'un contact cellule-cellule s'organise autour d'une ou plusieurs protéines transmembranaires qui s'associent en *cis* avec d'autres protéines transmembranaires de la même cellule, et/ou en *trans* avec les protéines des cellules voisines. Les liaisons en *trans* peuvent être homophiles, c'est-à-dire entre deux protéines identiques ou hétérophiles entre deux protéines différentes.

1.2.2.1 Les jonctions serrées

Les jonctions serrées juxtaposent les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes. Dans une cellule, la *zonula occludens* est la ceinture de jonctions serrées qui assure la continuité de la barrière imperméable avec l'ensemble des cellules voisines. Les protéines transmembranaires des jonctions serrées sont les claudines et les occludines qui font des interactions homotypiques avec les claudines et occludines des cellules voisines dans le milieu extracellulaire. Du côté cytoplasmique, elles interagissent avec l'actine par l'intermédiaire des protéines ZO-1 et ZO-2 (Zonula Occludens-1 et -2). Par leur rôle de séparation des compartiments apical et basal, les jonctions serrées sont des marqueurs de polarités cellulaire. Les jonctions serrées sont associées avec d'autres marqueurs de la polarité comme les protéines Crb3 (Crumbs3) et Scrib (Scribble) (Shin et al., 2006).

1.2.2.2 Les jonctions communicantes

La connexine est la protéine transmembranaire qui s'associe en homohexamère pour former un connexon. La jonction communicante est la liaison de 2 connexons de cellules adjacentes qui forme un canal cytoplasmique qui peut être en configuration ouverte ou fermée. Les jonctions communicantes permettent aux cellules d'un tissu d'échanger de petites molécules et de se coordonner chimiquement (Hervé and Derangeon, 2013).

1.2.2.3 Les jonctions d'ancrage

A l'image des contacts cellule-substrat, on compte 2 sortes de jonction d'ancrage : les desmosomes sont associés avec les FI et les jonctions adhérentes sont associées avec le cytosquelette d'actine. Dans les cellules épidermiques, il existe une régulation croisée entre ces deux complexes protéiques ; d'une part, la présence des jonctions adhérentes est requise pour la formation des desmosomes (Gosavi et al., 2011). D'autre part, la perturbation des desmosomes réduit le nombre de jonctions adhérentes (Vasioukhin et al., 2001).

Les cadhérines sont les protéines transmembranaires des desmosomes et des jonctions adhérentes. Bien que les cadhérines puissent faire des liaisons hétérophiles, les liaisons homophiles sont majoritaires et mécaniquement plus solides (Mège et al., 2006; Prakasam et al., 2006). La liaison en *trans* des cadhérines est dépendante de l'ion Ca^{2+} . D'abord décrites pendant la compaction de la morula d'embryons de souris, il est maintenant clair que le rôle des cadhérines n'est pas limité à l'adhésion physique des cellules. En effet, elles jouent un rôle majeur dans des voies de signalisation et dans la mécanotransduction (Hirata et al., 2017; Kim et al., 2011).

Les cadhérines sont composées d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique. Le domaine extracellulaire comporte des domaines répétés EC (Extracellular Cadherin) responsables des liaisons en *trans* et en *cis* des cadhérines et porte des domaines de liaisons au Ca^{2+} (Thiery et al., 2012). La queue cytoplasmique des cadhérines est responsable de la liaison au cytosquelette via des protéines adaptatrices.

1.2.2.3.1 Les desmosomes

Fréquemment exposés à des contraintes mécaniques, le tissu cardiaque et l'épiderme sont abondants en desmosomes. Le tissu nerveux est moins exposé et comporte beaucoup moins de desmosomes (Fawcett, 1961). Les propriétés mécaniques de l'épiderme doivent trouver un équilibre entre la solidité nécessaire à la survie de l'organisme et la malléabilité pour permettre les mouvements de l'individu et la migration du tissu pendant la cicatrisation. Les desmosomes assurent la solidité mécanique du tissu mais sont désassemblés dans certains contextes (Berika and Garrod, 2014).

La desmoglérine (Dsg) et la desmocolline (Dsc) sont les protéines de la famille des cadhérines desmosomales. Chez l'homme, il existe 4 sortes de Dscs et 3 sortes de Dsgs. Les queues cytoplasmiques des cadhérines desmosomales interagissent avec les protéines de la plaque desmosomale comportant les protéines de la famille des desmoplakines, plakoglobines et plakophilines. La plaque desmosomale permet l'ancrage des FI de kératine. Dans l'épiderme de souris, des chercheurs ont montré que le domaine cytoplasmique de la Dsc1 n'est pas nécessaire pour le maintien de l'adhésion (Cheng and Koch, 2004; Chidgey et al., 2001).

Chaque desmosome comporte au moins un type de Dsg et un type de Dsc (Getsios et al., 2004). La reconstruction tridimensionnelle a montré que les desmosomes peuvent être simples ou s'oligomériser (Al-Amoudi et al., 2007; He et al., 2003). Ils peuvent entrer dans un état hyper-adhérent indépendant du Ca^{2+} (Kimura et al., 2007).

Les maladies des desmosomes sont principalement les pemphigoïdes bulleuses dans lesquelles, des auto-anticorps ciblent les queues extracellulaires des Dsg et Dsc et affectent majoritairement l'épiderme (Kitajima, 2013; Waschke, 2008). Elles se caractérisent par la formation de bulles d'épiderme (Lever, 1953). Les pemphigoïdes peuvent être initiées par certains médicaments ou certains insectes vecteurs (Aoki et al., 2004; Yeh et al., 2003).

Les mutations des gènes desmosomaux peuvent affecter le cœur, l'épiderme et les cheveux (Green and Simpson, 2007; McGrath and Wessagowit, 2005). Le rôle des desmosomes dans le cancer a été bien décrit par (Chidgey and Dawson, 2007). De façon intéressante, dans les carcinomes, les desmosomes sont dérégulés mais les gènes des desmosomes ne sont pas mutés (Bazzi and Christiano, 2007; Chidgey and Dawson, 2007).

1.2.2.3.2 Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont des contacts cellule-cellule hautement dynamiques qui permettent la cohésion intercellulaire. C'est un acteur important de la migration collective et de la différenciation pendant l'embryogénèse et la cicatrisation des tissus (Gipson, 1992). Dans les cellules épithéliales polarisées, la *zonula adherens* est une ceinture de jonctions adhérentes qui permet l'ancrage aux cellules voisines. Les jonctions adhérentes se localisent de façon moins abondante sur le reste de la

face latérale de cellules endothéliales ou mammaires (Adams et al., 1996; Yap et al., 2015; Yonemura et al., 1995).

Les cadhérines des jonctions adhérentes sont dites classiques (Angst et al., 2001). Elles sont divisées en deux familles en fonction de la séquence de leur domaine extracellulaire. Les cadhérines de type I sont distribuées largement dans les tissus et portent le nom du tissu où elles ont été identifiées la première fois : E- (épithéliale), N- (neuronale), P- (placentaire), R- (rétine) et VE-cadhérine (endothélium vasculaire). Les cadhérines de type II sont numérotées de 6 à 12 et sont exprimées localement dans le tissu nerveux (Bekirov et al., 2002; Nollet et al., 2000; Price et al., 2002).

Les cellules épithéliales expriment majoritairement la E-cadhérine pour maintenir la cohésion du tissu. Les cellules cancéreuses qui ont subi la transition épithélio-mésenchymateuse expriment la N-cadhérine mais n'exprime plus la E-cadhérine (Gheldof and Berx, 2013). En réorganisant la polarité avant-arrière, l'engagement de la N-cadhérine induit la migration des cellules dans des directions opposées (Mayor and Carmona-Fontaine, 2010).

Dans le cytoplasme, les caténines interagissent avec la queue cytoplasmique des cadhérines. Le couple β -caténine/ α -caténine permet la liaison des cadhérines au cytosquelette d'actine. Les jonctions adhérentes sont stabilisées par la liaison de la caténine p120 (p120) aux cadhérines (Hartsock and Nelson, 2008). La p120 inhibe l'endocytose et le recyclage des cadhérines (Kourtidis et al., 2013). L'interaction de p120 avec les Rho GTPases régule le cytosquelette et la motilité des cellules épithéliales et de fibroblastes (Kourtidis et al., 2013; Noren et al., 2000; Reynolds et al., 1996).

1.2.3 La mécanotransduction dépendante des jonctions cellule-cellule

Les jonctions adhérentes connectent mécaniquement le cytosquelette d'actomyosine de cellules voisines. A l'image de la taline des adhésions focales, l' α -caténine relie mécaniquement une molécule de cadhérine et l'actine ; elle comporte un domaine cryptique de liaison à la vinculine qui est inaccessible en absence de contrainte mécanique. *In vitro*, l'application d'une force de 5pN sur une molécule unique d' α -caténine permet le dépliement du domaine cryptique et la liaison mécanosensible de la vinculine (Fig. I.10. b-b'') (Seddiki et al., 2017; Yao et al., 2014b). *In vivo*, l'inhibition de la contractilité de l'actomyosine empêche le recrutement mécanosensible de la vinculine aux jonctions adhérentes (Yonemura et al., 2010). Le recrutement de la vinculine apporte de nouveaux sites de liaison à l'actine et contribue au renforcement mécanique de la jonction. En retour, de nouvelles molécules de cadhérines sont recrutées ce qui permet de stabiliser la jonction et d'augmenter le couplage mécanique des cellules adjacentes (Collins and Nelson, 2015; le Duc et al., 2010; Ladoux et al., 2010; Liu et al., 2010). En utilisant des billes magnétiques recouvertes de E-cadhérine et en approchant un aimant, Bazellières et associés ont montré qu'une force mécanique permet le recrutement de la vinculine de cellules épithéliales mammaires en culture (Fig. I.10. a-a''). De plus, la rigidité de la jonction adhérente est augmentée ce qui suggère un renforcement local du cytosquelette d'actomyosine. Une bille recouverte de P-cadhérine ne permet pas le recrutement de la vinculine et ne change pas la rigidité de la jonction mais permet de soutenir les contraintes aux contacts intercellulaires (Bazellières et al., 2015). L'étalement de cellules sur un substrat rigide (95 kPa) recouvert de N-cadhérine oppose une forte résistance mécanique et permet l'assemblage de jonctions adhérentes plus grandes que sur un substrat souple (10 kPa) (Ladoux et al., 2010). A titre de comparaison, on précise que l'ordre de grandeur de la rigidité du verre de 1 GPa, celle du caoutchouc

de 1 MPa, celle des os de 100 kPa, celle des muscles de 10 kPa et celle du cerveau de 1 kPa (Engler et al., 2006; Handorf et al., 2015). En conclusion, les jonctions adhérentes sont des structures mécanosensibles qui « sentent » les contraintes transmises aux contacts intercellulaires et y répondent en augmentant leur résistance mécanique. La mécanosensibilité des jonctions adhérentes est dépendante du cytosquelette d'actomyosine.

La mécanosensibilité des jonctions adhérentes est impliquée dans la modification de l'expression du génome en réponse à un signal mécanique. Plusieurs protéines des jonctions adhérentes sont des facteurs de transcription qui peuvent être transloqués dans le noyau pour réguler l'expression de

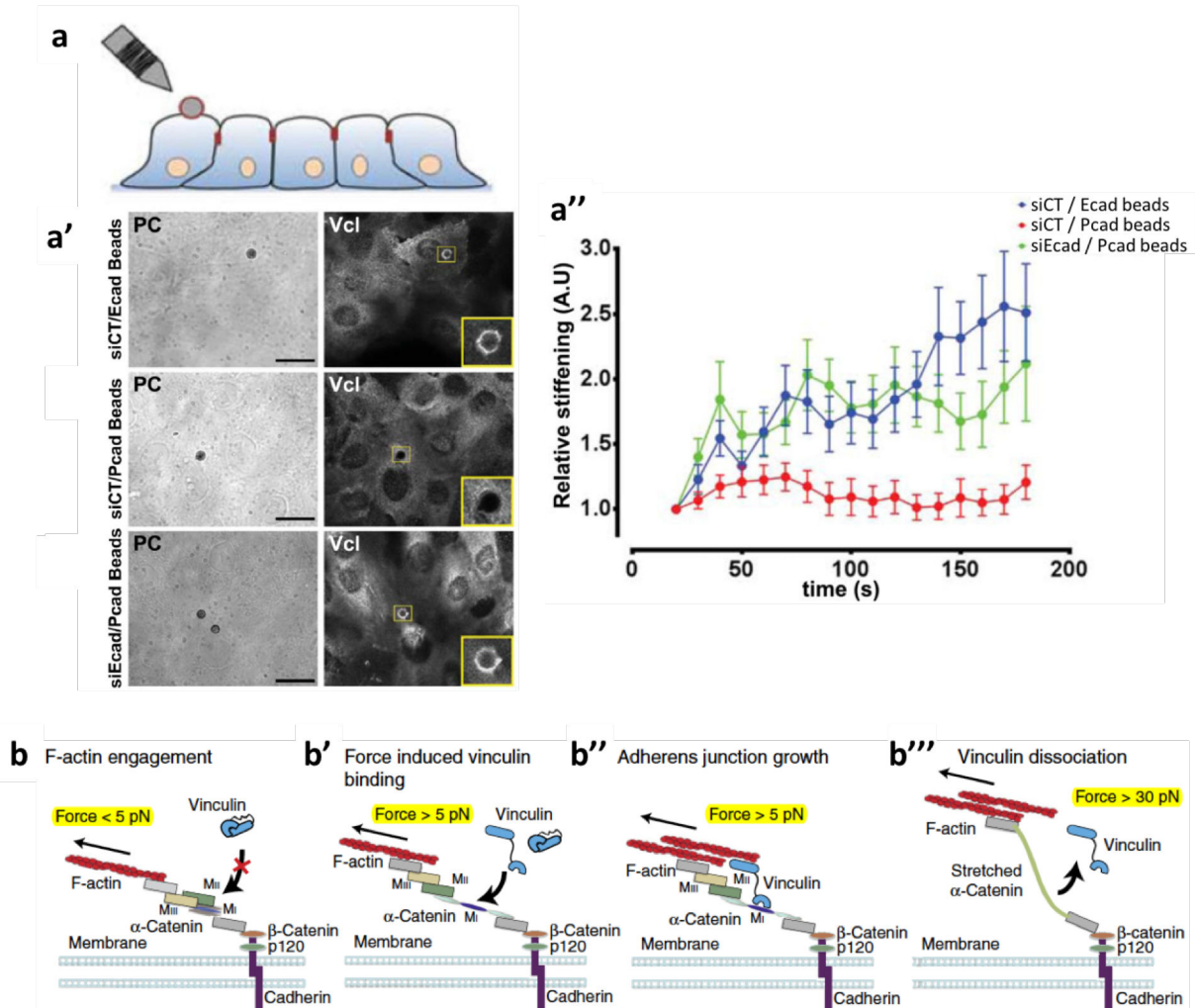


Figure 1.10. Mécanotransduction aux contacts cellule-cellule. (a) Schéma du dispositif expérimental : une bille magnétique recouverte de E- ou P-cadhérine est déposée sur une couche de cellules épithéliales mammaires (MCF10A). Après adhésion à la cellule, une force est appliquée sur la bille à l'aide d'un aimant. (a', a'') Contrairement à une bille recouverte de P-cadhérine (Pcad Beads), l'application d'une force sur une bille recouverte de E-cadhérine (Ecad Beads) permet le recrutement de vinculine par la cellule et l'augmentation de la rigidité locale. Lorsque l'expression de E-cadhérine est diminuée par interférence ARN (siEcad), l'application d'une force sur une bille recouverte de P-cadhérine entraîne le recrutement de vinculine et l'augmentation de la rigidité locale. Tiré de (Bazellères et al., 2015). (b) En association avec la β -caténine, l' α -caténine relie la cadhérine et le cytosquelette d'actomyosine. En absence de force, l' α -caténine est repliée et la vinculine ne peut pas se fixer. (b', b'') Une force supérieure à 5 pN entraîne le dépliement de l' α -caténine ce qui ouvre les domaines cryptiques de liaison à la vinculine (VBD). Les sites de liaison à l'actine apportés par la vinculine permettent le renforcement et la maturation de la jonction adhérente. (b''') Quand la force transmise dépasse 30 pN, l' α -caténine subit un nouvel événement de dépliement qui change la conformation du VBD et entraîne le relargage de la vinculine. Adapté de (Yao et al., 2014b).

gènes cibles (Fernández-Sánchez et al., 2015; Reynolds, 2007). Par exemple, la β -caténine est l'effecteur de la voie de signalisation Wnt qui est dérégulée dans de nombreux cancers. Quand la voie n'est pas activée par des facteurs solubles, le complexe de destruction de la β -caténine n'est pas actif et la β -caténine cytoplasmique et nucléaire est augmentée. Dans le noyau, la β -caténine s'associe au TCF (T Cell Factor) et augmente l'expression de nombreux gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Arend et al., 2013; Krausova and Korinek, 2014; Song et al., 2015). *In vivo*, la stimulation mécanique de cellules intestinales entraîne la localisation nucléaire de la β -caténine et l'expression de ses gènes cibles (Fernández-Sánchez et al., 2015; Whitehead et al., 2008). On peut spéculer que la perturbation mécanique des cellules entraîne la réorganisation des jonctions adhérentes, le relargage de la β -caténine et l'augmentation de la prolifération cellulaire.

En conclusion, la jonction adhérente est une plateforme importante qui permet de réguler à la fois la cohésion des tissus et l'expression du génome en réponse à des contraintes mécaniques. La mécanosensibilité des jonctions adhérentes est importante pendant la migration épithéliale pour renforcer les contacts en tension et réguler des fonctions biologiques comme la prolifération.

1.2.4 La migration épithéliale

Les cellules épithéliales peuvent migrer collectivement *in vitro* et *in vivo* pour recoloniser des espaces acellulaires. Dans la littérature, on décrit 2 modes de fermeture de blessure : la fermeture en cordon de bourse ou *purse-string* et la fermeture par rampement ou *crawling*. Ces modes de fermeture sont importants car ils sont conservés chez de nombreuses espèces aussi bien pendant l'embryogénèse qu'à l'âge adulte. Au sein d'un même tissu, les deux modes de fermeture ne sont pas exclusifs. Nous avons publié une revue de la littérature en 2016 sur la migration des cellules pendant la fermeture de trous épithéliaux (Annexe 1). Nous y listons les conditions expérimentales de précédents travaux dans lesquels les auteurs décrivent l'un, l'autre ou les deux modes de fermeture concomitants (Begnaud et al., 2016).

Le mode de fermeture privilégié par les cellules dépend des propriétés intrinsèques de leurs adhésions intercellulaires et de leur cytosquelette d'actomyosine mais aussi de la taille et de la forme de la blessure (Nier et al., 2015; Vedula et al., 2015).

Dans cette partie nous détaillerons les modes de fermeture et leurs modèles d'étude expérimentaux. Après avoir décrit la migration collective par rampement, nous détaillerons les aspects de la fermeture en cordon de bourse. Nous finirons par décrire les situations dans lesquelles ces deux modes migratoires coexistent.

1.2.4.1 La fermeture par rampement ou « crawling »

La migration collective par rampement requiert l'extension de lamellipodes et de filopodes et induit le changement de la polarité cellulaire d'une polarité apico-basale vers une polarité avant-arrière. Ce mode de fermeture se met en place pendant la réparation d'épithéliums détruits sur une large surface.

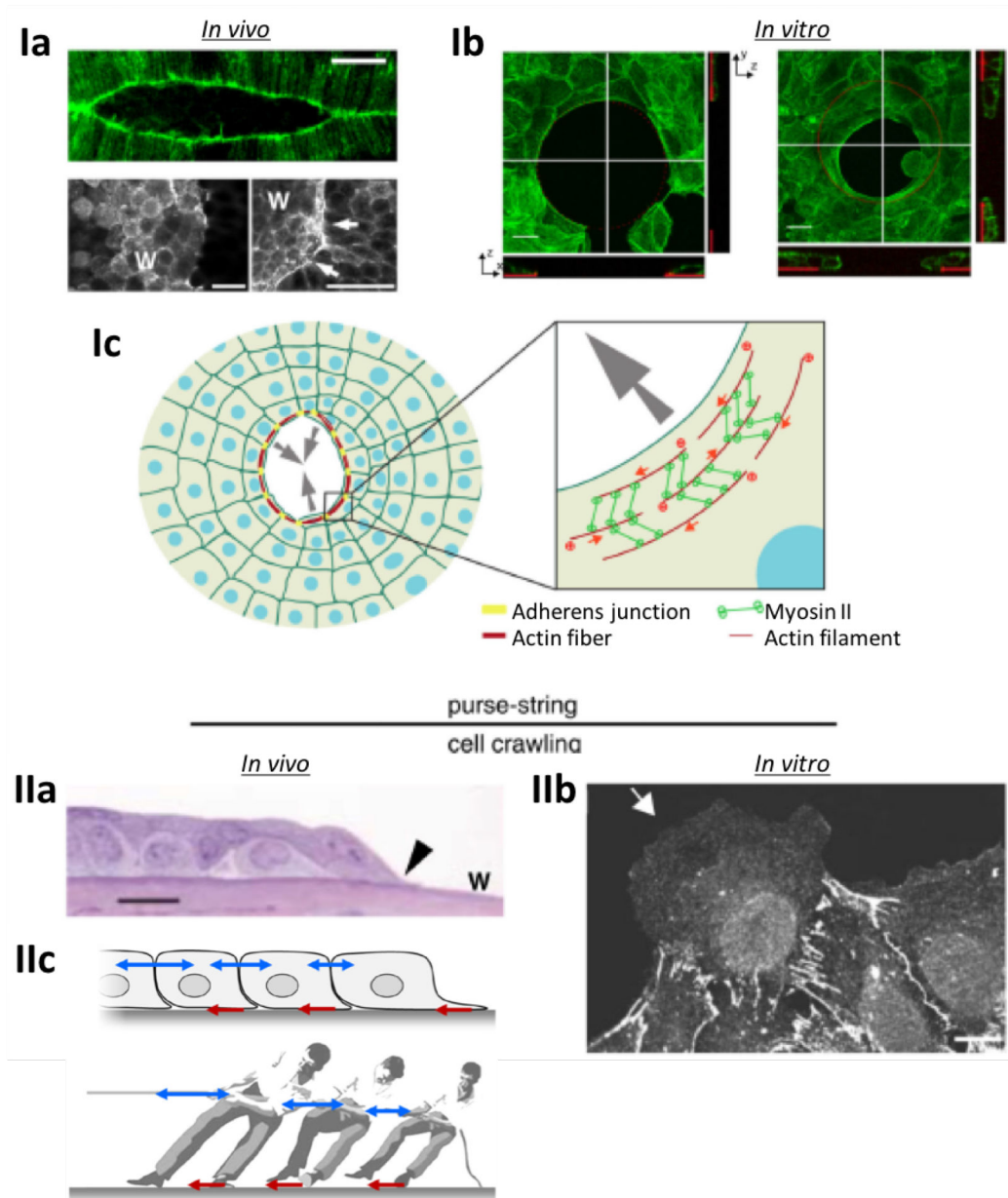


Figure I.11. Fermeture en cordon de bourse et par rampement. (I) La fermeture en cordon de bourse repose sur l'établissement d'un câble contractile d'actomyosine multi-cellulaire (Ic). On décrit ce mécanisme de migration *in vivo* pendant la fermeture dorsale d'un embryon de drosophile (Ia, panneau supérieur : l'actine est marquée en vert), pendant cicatrisation d'un embryon de *Xenopus leavis* (Ia, panneau du bas : marquage de l'actine) ou *in vitro* pendant fermeture de trous épithéliaux non-adhérents (Iib, actine marquée en vert). (II) La migration collective par rampement repose sur l'extension de protrusion au front de migration. A l'arrière, les forces sont transmises aux cellules suiveuses grâce aux jonctions adhérentes (Iib, E-cadhérine marquée en vert ; Iic). On observe la migration collective par rampement *in vivo* pendant la cicatrisation de la cornée de souris (IIa) et *in vitro* pendant la migration de cellules de foie de rat (Iib). En plus d'être tractée par la cellule *leader*, la cellule *follower* étend un lamellipode et tire sur le substrat (Iic). Adapté de (Begnaud et al., 2016; Trepats and Fredberg, 2011).

On observe la fermeture par rampement *in vitro* et *in vivo* après coupure ou poinçonnage à l'emporte-pièce d'un épithélium (Danjo and Gipson, 2002; Lee et al., 2010).

Après la destruction de cellules, de nombreuses molécules intracellulaires sont libérées dans l'environnement extracellulaire et sont captées par les cellules survivantes. Ces molécules peuvent déclencher la migration des cellules survivantes (Freedberg et al., 2001; Matsubayashi et al., 2004). En

cultivant des épithélia dans des pochoirs amovibles, les chercheurs ont montré que les cellules épithéliales sont capables de « sentir » et de déclencher la migration vers un espace acellulaire en absence de signaux de dommages cellulaires ou du système immunitaire (Anon et al., 2012; Block et al., 2004; Nikolić et al., 2006; Poujade et al., 2007).

Parmi les cellules du premier rang au bord de la blessure, seules certaines cellules étendent un lamellipode ; ce sont les cellules dites *leaders* (Fig. I.11. IIa et IIb). Les cellules *followers* sont les cellules des rangs suivants. L'extension du lamellipode des cellules *leaders* pourrait être permis par l'absence de contacts cellule-cellule et par l'engagement des intégrines qui induit la formation d'un gradient d'activation de Rac1 de l'avant vers arrière. Un gradient opposé d'activation de RhoA est induit par les contacts cellule-cellule et augmente la contractilité à l'arrière des cellules *leader* (Levayer and Lecuit, 2008; Priya et al., 2015; Reffay et al., 2014).

Cependant, les cellule *leaders*, ne sont pas les seules à contribuer à la migration de l'épithélium. L'injection d'un dominant-négatif de Rac1 dans le premier rang de cellules n'empêche pas la migration normale de l'épithélium. En revanche, quand les 3 premiers rangs de cellules sont soumis à ce traitement, la migration est abolie (Fenteany et al., 2000). La migration active et dépendante de Rac1 des cellules *followers* est importante pour la migration de l'ensemble de l'épithélium. En effet, sur plusieurs rangs en arrière du front de migration, les cellules *followers* étendent aussi des lamellipodes dits « cryptiques » sous les cellules qui les précèdent (Farooqui and Fenteany, 2005). En cultivant des cellules sur un substrat de faible rigidité (1,3 kPa) et recouvert de billes fluorescentes, l'équipe de X. Trepats a mesuré les forces exercées par les cellules sur un substrat continu. Ces travaux montrent qu'en complément des forces de traction exercées par le lamellipode des cellules *leaders*, les cellules *followers* exercent aussi des forces de traction sur le substrat (Serra-Picamal et al., 2012; Trepats et al., 2009).

Le modèle actuellement admis pour la migration collective par rampement est le modèle du jeu de tir à la corde (« *tug-of-war* ») (Fig. I.11. IIc) : les cellules *leaders* et les cellules *followers* de l'épithélium en migration exercent des forces de traction sur le substrat et joignent leur forces grâce aux jonctions adhérentes (Trepats and Fredberg, 2011) (Fig. I.11. IIb).

Récemment, une étude a proposé un modèle pour expliquer comment le signal de migration pourrait être transmis du rang de cellules *leaders* aux cellules des rangs suivants grâce aux contacts cellule-cellule. Dans une monocouche statique, la protéine Merline (ou Nf2 ; Neurofibromatose de type 2) est localisée aux contacts cellule-cellule et inhibe localement Rac1 ce qui empêche la formation du lamellipode. Le déclenchement de la migration induit l'activation de Rac1 à l'avant de la cellule *leader* qui étend un lamellipode. A l'arrière de la cellule *leader*, les contacts cellule-cellule se mettent sous tension ce qui induit le relargage de Merline à l'avant de la cellule *follower* et lève l'inhibition sur Rac1. Rac1 s'active à l'avant de la cellule *follower* qui émet un lamellipode cryptique sous la cellule qui la précède (Das et al., 2015; Farooqui and Fenteany, 2005). Ce couplage mécanique entre les cellules *leaders* et *followers* pourrait se propager de cellule en cellule et déclencher la migration de cellules à distance du front de migration.

Les jonctions adhérentes sont importantes pour orienter la migration locale des cellules au sein d'un épithélium en migration (Doxzen et al., 2013; Vedula et al., 2012). En effet, pendant la migration collective de cellules endothéliale, Hayer et associés ont montré que les contacts cellule-cellule perpendiculaires à la direction de migration ne sont pas linéaires. En effet, les cellules étendent des

protrusions riches en VE-cadhérine et en actomyosine dans les cellules qui les suivent ce qui leur donne une information sur l'orientation de la migration (Hayer et al., 2016).

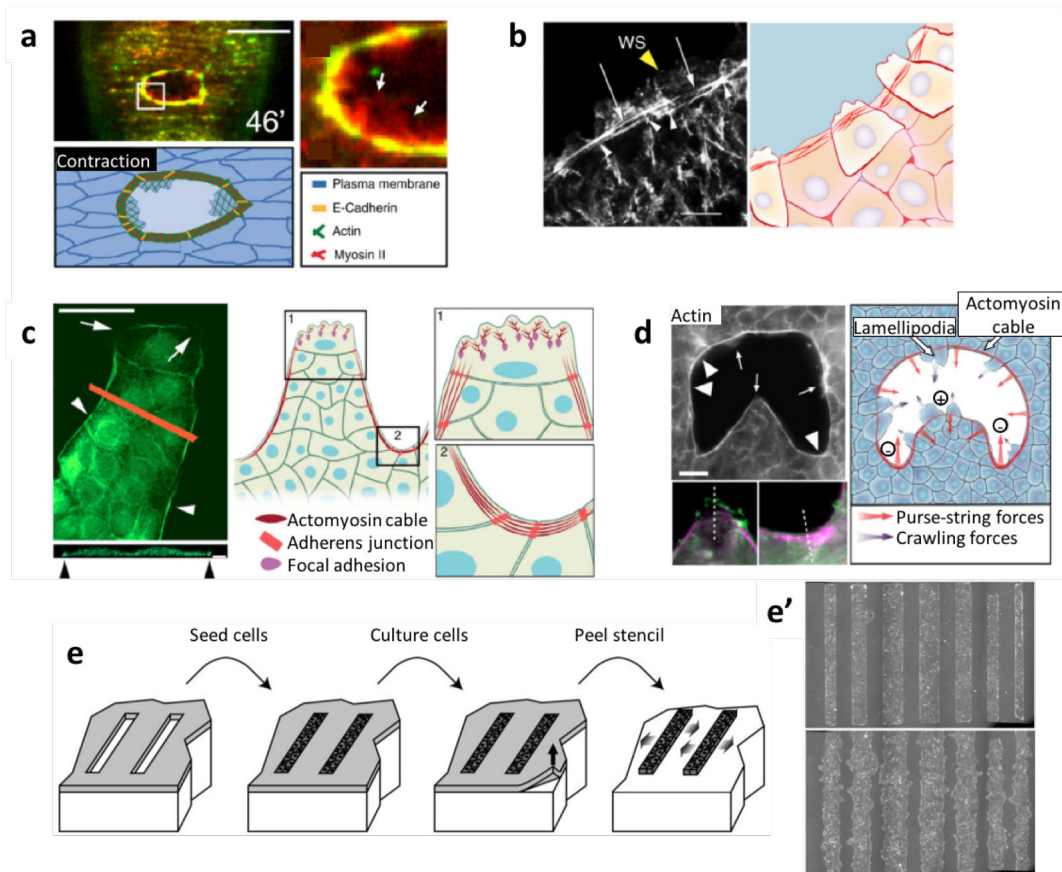
1.2.4.2 La fermeture en cordon de bourse ou « purse-string »

Contrairement à la migration collective par rampement qui repose sur la transmission de forces par les adhésions avec le substrat, la fermeture en cordon de bourse repose sur la transmission de forces aux contacts cellule-cellule, probablement par les jonctions adhérentes (Brock et al., 1996; Campos et al., 2010; Danjo and Gipson, 2002; Florian et al., 2002; Tamada et al., 2007). La fermeture en cordon de bourse est privilégiée pour des blessures peu étendues et pendant l'embryogénèse comme par exemple pendant la fermeture dorsale de l'embryon de drosophile ou l'épibolie pendant l'embryogénèse du poisson zèbre (Fig. I.11. Ia) (Bement et al., 1993; Köppen et al., 2006; Rodriguez-Diaz et al., 2008).

Les cellules au premier rang du front de migration assemblent un câble d'actomyosine autour du trou de l'épithélium. Le câble d'actomyosine a une organisation continue à l'échelle du tissu (Fig. I.11. Ic). A l'image d'un cordon de bourse, la contraction myosine-dépendante du câble permet la fermeture du trou épithélial. Aux contacts cellule-cellule, un renforcement local des jonctions adhérentes pourrait assurer la transmission des forces contractiles d'une cellule à l'autre (Brock et al., 1996; Campos et al., 2010; Danjo and Gipson, 2002; Florian et al., 2002; Tamada et al., 2007). Bien qu'elles ne jouent pas un rôle majeur pendant la fermeture en cordon de bourse, les adhésions focales peuvent être présentes sous le câble d'actomyosine. Contrairement à la migration collective par rampement où elles sont orientées perpendiculairement au front de migration, pendant la fermeture en cordon de bourse, les adhésions focales sont parallèles au front de migration (Brugués et al., 2014; Ravasio et al., 2015).

Les techniques de micro-fabrication ont permis l'étude *in vitro* de la fermeture en cordon de bourse. En effet, on peut forcer les cellules épithéliales de peau ou de rein à la fermeture en cordon de bourse en les cultivant sur une matrice comportant des trous non-adhérents d'une centaine de microns de diamètre (Fig. I.11. Ib) (Grasso et al., 2007; Nier et al., 2015; Vedula et al., 2015). Le diamètre des blessures qui peuvent être réparées par ce mécanisme dépend du type et de l'âge cellulaire. Au-delà d'un diamètre seuil, il est probable que le périmètre de la blessure soit trop grand pour permettre au câble d'actomyosine de s'assembler et de se stabiliser pour générer des forces contractiles.

Contrairement à la migration collective par rampement où les cellules exercent exclusivement des forces de traction sur le substrat, pendant la fermeture en cordon de bourse, les cellules appliquent d'abord des forces de traction excentriques générées par les adhésions focales et les fibres de stress d'actine. Après quelques heures, le câble d'actomyosine en cordon de bourse s'assemble autour du trou non adhérent et commence à se contracter. La contraction du câble génère des forces concentriques qui sont transmises au substrat par la friction des cellules qui ferment le trou.



1.2.4.3 La coexistence des deux modes de migration

De l'embryogénèse à l'âge adulte et dans des conditions expérimentales variées, les deux modes de migration coexistent. De façon remarquable, le câble d'actomyosine et les protrusions sont décrits dans les mêmes cellules ou dans des cellules adjacentes (Fig. I.12. a, b) (Danjo and Gipson, 1998; Refay et al., 2014).

Les études de migration sans dommage cellulaire permettent de générer des fronts de migration initialement rectiligne. De façon surprenante, seules certaines cellules régulièrement espacées le long du front de migration étendent un lamellipode (Fig. I.12 c, e, e'). Ces cellules *leaders* migrent initialement plus vite que le reste de l'épithélium et entraînent dans leur sillage des cellules *followers*.

Le front de migration initialement rectiligne devient rapidement hétérogène avec des protrusions pluricellulaires en « *doigt* ». De façon intéressante, entre les cellules *leaders* à l'avant de deux protrusions adjacentes, les cellules assemblent un câble d'actomyosine qui rappelle celui du cordon de bourse (Fig. I.12 c) (Reffay et al., 2014). La contractilité de ce câble d'actine est dépendant de l'activité de RhoA (Reffay et al., 2014). Dans la protrusion, les activations de RhoA et de Rac1 forment des gradients opposés à l'échelle cellulaire. Ainsi, aux bords latéraux de la protrusion, l'activation de RhoA permet la formation du câble d'actomyosine (Reffay et al., 2014). Bien que les mécanismes qui régulent l'espacement entre deux cellules *leaders* soient encore mal compris, l'ablation du câble d'actomyosine est suivi de l'extension d'un lamellipode et de la formation d'une nouvelle cellule *leader*. Néanmoins, à l'échelle cellulaire comme à l'échelle du tissu, la géométrie du front de migration est importante pour la formation d'un lamellipode ou d'un câble d'actomyosine. Ainsi, une courbure négative permet l'accumulation d'un câble d'actomyosine alors que l'absence de courbure ou une courbure positive favorise l'extension d'un lamellipode (Fig. I.12. d) (Brock et al., 2003; Ravasio et al., 2015; Théry et al., 2006; Vedula et al., 2014a, 2015).

A ce jour, les mécanismes moléculaires qui permettent aux cellules et aux tissus de « sentir » la courbure de leur front de migration restent inconnus. Cependant, on peut spéculer l'implication des protéines à domaine BAR (domaine commun aux protéines Bin, Amphiphysin and Rvs) qui sont sensibles à la courbure des membranes et peuvent réguler le cytosquelette d'actine (Carstanjen et al., 2005; Krugmann et al., 2001; Miki et al., 2000). Par exemple, IRSp53 est une protéine à domaine BAR qui régule l'axe WAVE-Rac1 (Miki et al., 2000). On peut aussi spéculer que le mode de fermeture dépend de la mécanique de l'épithélium et des propriétés du substrat à proximité de la blessure. En effet, en fonction du type cellulaire et des propriétés du substrat, la balance entre les énergies d'adhésion cellule-cellule et cellule-substrat est modifiée ce qui pourrait favoriser la fermeture en cordon de bourse, par rampement ou la coexistence de ces mécanismes.

1.2.4.4 La mécanotransduction associée aux épithélia

1.2.4.4.1 Couplage mécanique des cellules épithéliales

Comme on l'a décrit précédemment, les jonctions adhérentes permettent la cohésion mécanique des cellules. En effet, les forces de traction sur le substrat se localisent à la périphérie d'un groupe de kératinocytes alors qu'en absence de cadhérines, les forces de traction sont relocalisées à la périphérie de chaque cellule du groupe ce qui montre que le couplage mécanique de plusieurs cellules est dépendant des jonctions adhérentes (Mertz et al., 2013).

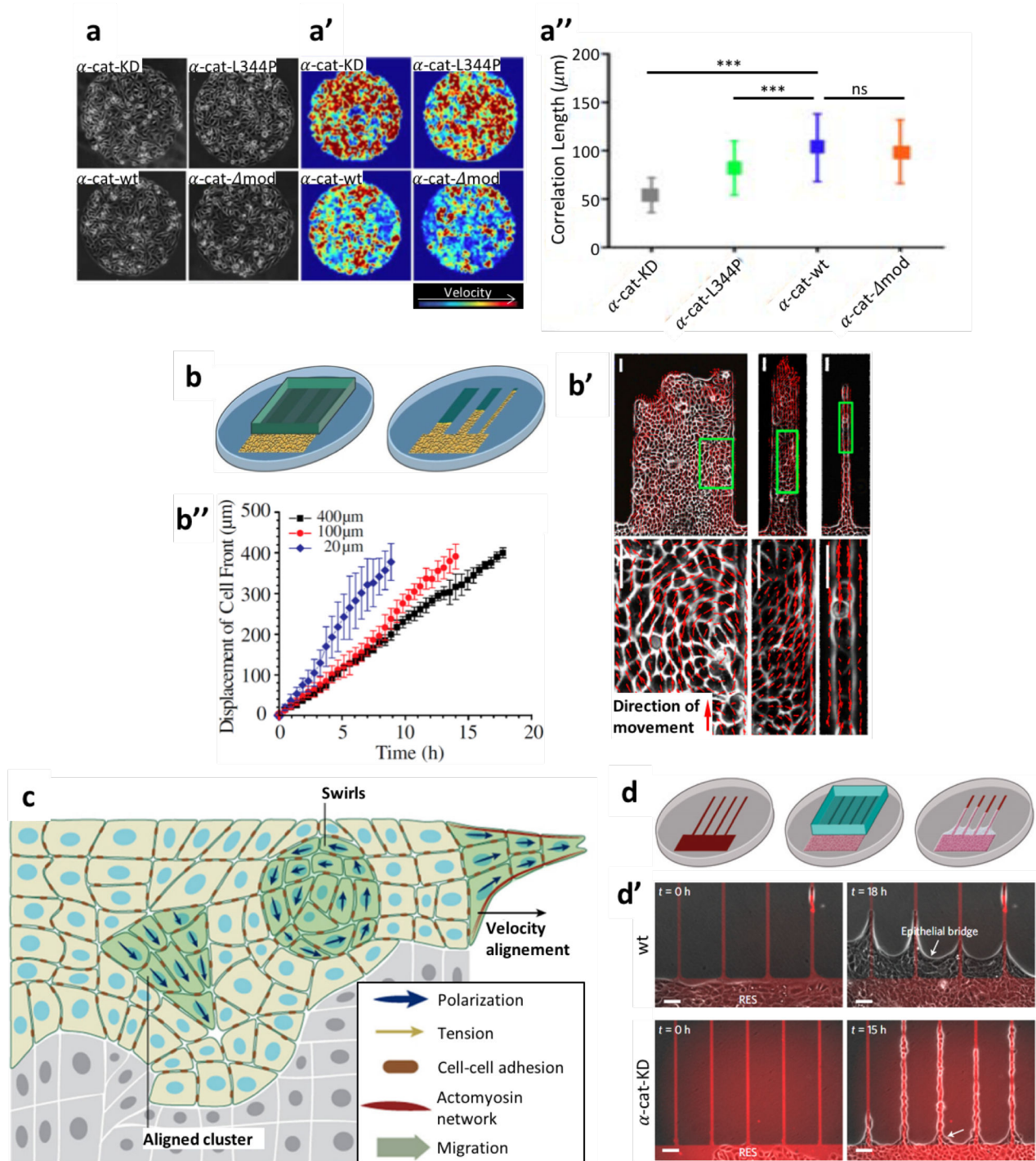


Figure I.13. Coordination et mécanique des cellules épithéliales. (a) Image en contraste de phase de cellules MDCK cultivées à confluence sur des motifs circulaires de fibronectine. (a', a'') Analyse de la vitesse de migration des cellules par PIV (Particle Image Velocimetry : analyse des champs de vitesse). Pour les cellules de type sauvage et celles dont la liaison α -caténine-vinculine est constitutive, la migration est lente et coordonnée. La répression de l' α -caténine (α -cat-KD) ou la suppression de la liaison mécanosensible α -caténine-vinculine (α -cat-L344P) augmente la vitesse de migration mais diminue la coordination des cellules. Tiré de (Seddiki et al., 2017). (b, b'', b''') La migration de cellules MDCK en confinement dans des bande adhérentes de largeur différente. Plus la bande est large, moins les cellules sont confinées et moins le front de migration progresse vite. A partir de 400 μ m de largeur, des motifs de migration rotatoire (vortex) se mettent en place. Tiré de (Vedula et al., 2012). (c) Schéma de coordination des cellules en migration. Bien que des groupes de cellules du tissu migrent de façon linéaire, d'autres groupes de cellules migrent en vortex. Tiré de (Ladoux et al., 2016). (d, d') Si on force une monocouche de kératinocyte à migrer sur des bandes adhérentes (fibronectine en rouge) séparées de bandes non-adhérentes (en gris), les cellules organisent collectivement une couche de cellule suspendue au-dessus de la zone non-adhérente (d', panneau supérieur). La réduction de l'expression de l' α -caténine (α -cat-KD) empêche la formation des ponts suspendus (d', panneau inférieur). Tiré de (Vedula et al., 2014a).

Un épithélium recouvre une surface de substrat plus grande que celle recouverte par une cellule unique. Cette différence de taille permet à l'épithélium de migrer en réponse à un gradient de rigidité qui ne peut pas être détecté par une cellule unique (Sunyer et al., 2016). Dans un épithélium, la migration locale d'un groupe de cellule est influencée par la migration des cellules voisines et par la distance avec les bords de l'épithélium (Fig. I.13. b). En présence de jonctions adhérentes, une cellule est capable de coordonner sa migration avec ses voisines directes mais aussi sur de plus grandes distances en se coordonnant avec les cellules voisines indirectes (voisins de voisins) (Fig. I.13. b, c). En réprimant l' α -caténine ou en empêchant l'interaction mécanosensible α -caténine-vinculine, les cellules migrent individuellement plus vite mais ne sont plus coordonnées (Fig. I.13. a) (Seddiki et al., 2017). La coordination de groupes de cellules donne naissance à des motifs de migration locaux linéaires ou en vortex dans des monocouches en migration dans un confinement linéaire de largeur variable (Fig. I.13. b, c) (Doxzen et al., 2013; Ladoux et al., 2016; Vedula et al., 2012; Zhang et al., 2015). Enfin, la migration d'un épithélium est sensible aux propriétés mécaniques du substrat. Par exemple, la topologie d'un substrat adhérent comportant des micro-sillons de 1 μ m de large oriente la direction de migration collective des cellules (Londono et al., 2014; Zhang et al., 2015).

Les kératinocytes ont de fortes jonctions cellule-cellule. Cultivés sur des motifs de fibronectine particuliers, la migration coordonnée de kératinocytes permet l'établissement et le maintien de ponts épithéliaux suspendus (Fig. I.13. d). Dans la couche de cellules suspendues, les kératinocytes ne font pas d'adhésions avec le substrat mais renforcent leurs jonctions adhérentes. La répression de l' α -caténine ne permet pas l'établissement de ces ponts épithéliaux (Fig. I.13. d). De façon intéressante, dans les mêmes conditions expérimentales, la mécanique de cellules épithéliales de rein (MDCK) ne permet pas l'établissement des ponts suspendus (Vedula et al., 2014a). En cultivant les cellules MDCK à confluence sur une membrane de collagène tendue entre 2 bâtonnets support, l'équipe du professeur Charras a montré que l'on peut forcer la formation d'une monocouche suspendue de cellules MDCK après la digestion enzymatique de la membrane de collagène (Harris et al., 2013). Dans ce modèle, les cellules suspendues ne sont pas en migration.

1.2.4.4.2 Les inhibitions de contact

A l'âge adulte et *in vivo*, les épithélia ne migrent et ne prolifèrent que pour maintenir une densité optimale de cellules (Eisenhoffer and Rosenblatt, 2013; Eisenhoffer et al., 2012; Rosenblatt et al., 2001). Pour maintenir l'homéostasie de l'épithélium, de nombreux signaux inhibent la migration et la prolifération des cellules épithéliales, ce sont les inhibitions de migration (CIL, Contact Inhibition of Locomotion) et de prolifération par contact (CIP, Contact Inhibition of Proliferation), respectivement. De nombreux signaux biochimiques sont impliqués dans la régulation de la CIL et de la CIP comme l'engagement de contacts cellule-cellule ou la densité cellulaire. La création d'un espace acellulaire, par exemple après une blessure, abolit localement à la fois la CIL et la CIP (Park et al., 2017; Zahm et al., 1997).

1.2.4.4.2.1 L'inhibition de migration par contact (CIL)

La CIL est un mécanisme complexe et multi-étape qui a été décrit la première fois par Abercrombie dans les années 50 (Abercrombie, 1967; Abercrombie and Heaysman, 1953, 1954). La CIL est

développée plus en détails que dans ce manuscrit dans diverses revues (Mayor and Carmona-Fontaine, 2010; Roycroft and Mayor, 2016).

La collision de deux cellules migrant l'une vers l'autre, entraîne l'arrêt immédiat de la migration vers la cellule qui fait obstacle. Dans un second temps, les cellules changent leur direction de polarisation en définissant un nouveau front de migration puis migrent éventuellement dans des directions opposées et se détachent (Roycroft and Mayor, 2016). La migration est inhibée dans un épithélium à confluence alors que la libération d'un espace acellulaire déclenche la migration des cellules (Anon et al., 2012; Block et al., 2004; Mayor and Carmona-Fontaine, 2010; Nikolić et al., 2006). Les mécanismes qui permettent aux cellules du premier rang de « sentir » l'espace libre et d'initier la migration restent à ce jour débattus. Comme on l'a expliqué précédemment, l'initiation de la migration des rangs suivants pourrait être permise par la mise en tension des contacts cellule-cellule et le relargage de la Merline (Das et al., 2015). En conclusion, les mécanismes de CIL et d'initiation de la migration des épithélia en réponse à un espace acellulaire restent mal compris.

1.2.4.4.2.1 L'inhibition de prolifération par contact (CIP)

Découverte pour la première fois il a 50 ans, la CIP suscite un intérêt croissant de la communauté scientifique (Eagle and Levine, 1967). *In vitro*, la CIP se définit par la réduction de la prolifération de cellules cultivées à confluence (Motti et al., 2005). *In vivo*, la dérégulation de la CIP est associée avec la croissance tumorale et la carcinogénèse (McClatchey and Yap, 2012). A ce jour, on sait que les jonctions adhérentes jouent un rôle important de rétention de facteurs de prolifération. Par exemple, l'engagement des jonctions adhérentes séquestre la β -caténine aux contacts cellule-cellule. Dans le cancer colorectal, l'augmentation de la concentration cytoplasmique de β -caténine surpasse les capacités de séquestration des jonctions adhérentes et entraîne sa localisation nucléaire où elle augmente la prolifération cellulaire (Munemitsu et al., 1995). Réprimée dans de nombreuses cellules épithéliales cancéreuses, la réexpression de la E-cadhérine inhibe la prolifération cancéreuse (Croix et al., 1998). De plus, plusieurs études ont récemment montré que la E-cadhérine et l' α -caténine sont impliquées dans la rétention membranaire et cytoplasmique du complexe Yap/14-3-3 ce qui inhibe la prolifération cellulaire (Hirata et al., 2017; Kim et al., 2011; Schlegelmilch et al., 2011). Les contacts cellule-cellule peuvent aussi inhiber la prolifération en régulation des récepteurs aux facteurs de croissance. Par exemple, la liaison en cis de E-cadhérine au récepteur EGFR est favorisée par la Merline et inhibe la signalisation issue de EGFR ce qui réduit la prolifération cellulaire (Cole et al., 2008; Curto et al., 2007). En conclusion, l'engagement des contacts cellule-cellule est important pour réguler la prolifération des cellules au sein des épithélia.

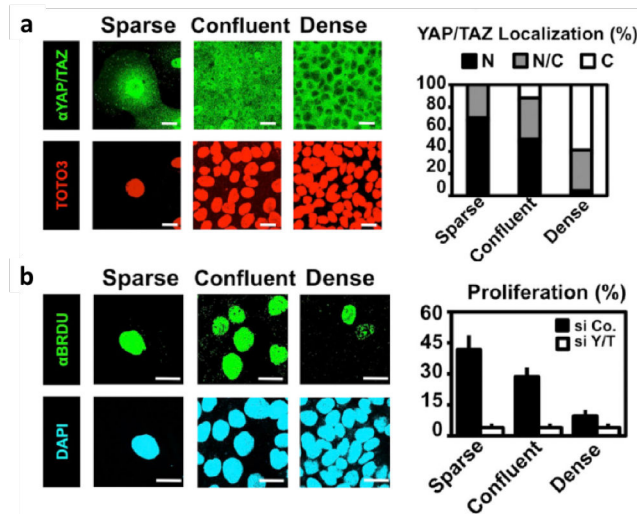


Figure 1.14. Le rôle de Yap/Taz dans la CIP. (a, b) La densité cellulaire contrôle la localisation des protéines Yap/Taz (a) (immunofluorescence de Yap/Taz en vert ; marquage nucléaire en rouge) et la prolifération cellulaire (b) (incorporation de BrdU en vert, marquage nucléaire en bleu). A faible densité cellulaire, Yap/Taz est nucléaire et la prolifération est augmentée. A haute densité, Yap/Taz est cytoplasmique et la prolifération est réduite. L'inhibition de l'expression de Yap/Taz (siY/T) abolit la différence entre la prolifération des cellules à faible ou à grande densité. Tiré de (Dupont et al., 2011).

1.2.4.4.2.1 Vers un couplage mécanique entre la migration et la CIP

Dans de nombreux contextes physiologiques et pathologiques comme l'embryogénèse, l'invasion métastatique et la cicatrisation, la migration des épithélia est associée à l'augmentation de la prolifération cellulaire. Cependant, il ne semble pas que la CIL et la CIP soient régulées par les mêmes voies de signalisation. En effet, pendant la cicatrisation *in vivo* et *in vitro*, les premiers rangs cellulaires migrent mais ne prolifèrent pas. Les cellules en arrière, loin du front de migration prolifèrent mais ne migrent pas. Entre ces deux populations, une troisième population de cellules migre et prolifère en même temps (Park et al., 2017; Zahm et al., 1997). De récentes études montrent que l'organisation du cytosquelette d'actine et plus précisément l'activation de l'axe WAVE-Arp2/3 est associée à la progression du cycle cellulaire (Dang and Gautreau, 2012; Wu et al., 2012). A la lumière de ces découvertes, on peut spéculer que les voies de régulation de la CIL et de la CIP sont interconnectées.

L'absence de CIP pendant la migration cellulaire pourrait être expliquée par le co-facteur de transcription Yap/Taz (Yes-Associated Protein ; Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif). En effet, Yap/Taz régule la prolifération en réponse à la densité cellulaire et à la réorganisation de l'actomyosine, des contacts cellule-substrat et des contacts cellule-cellule (Aragona et al., 2013; Dupont et al., 2011; Hirata et al., 2017, 2017; Nelson et al., 2005; Poujade et al., 2007; Serra-Picamal et al., 2012).

Dans la seconde partie de cette introduction, nous détaillerons les rôles et les voies de régulation biochimique et mécanique de Yap/Taz chez les mammifères.

2 Le couple Yap/Taz dans la croissance tissulaire

Le couple Yap/Taz est l'effecteur de la voie Hippo chez les vertébrés. La voie Hippo a d'abord été découverte chez *Drosophila melanogaster* pour son rôle suppresseur de tumeur et pour son rôle dans le contrôle de la croissance des organes (Harvey et al., 2003; Jia et al., 2003; Justice et al., 1995; Kango-Singh et al., 2002; Lai et al., 2005; Pan, 2010; Pantalacci et al., 2003; Tapon et al., 2002; Udan et al., 2003; Wu et al., 2003; Xu et al., 1995). Chez la drosophile, Yorkie (Yki) est l'orthologue de Yap et Taz chez les vertébrés (Huang et al., 2005; Zhao et al., 2010a). L'activation de la voie Hippo par des régulateurs en amont entraîne la phosphorylation et l'inhibition de l'activité transcriptionnelle des effecteurs.

La voie Hippo et son effecteur Yki sont conservés dans l'évolution de la drosophile aux vertébrés. Dans ce manuscrit, nous nous concentrerons sur la voie Hippo et la régulation du couple Yap/Taz chez les mammifères uniquement.

Après avoir détaillé les acteurs moléculaires et les rôles connus de l'axe Hippo-Yap/Taz, nous exposerons les régulateurs en amont de cette voie de signalisation.

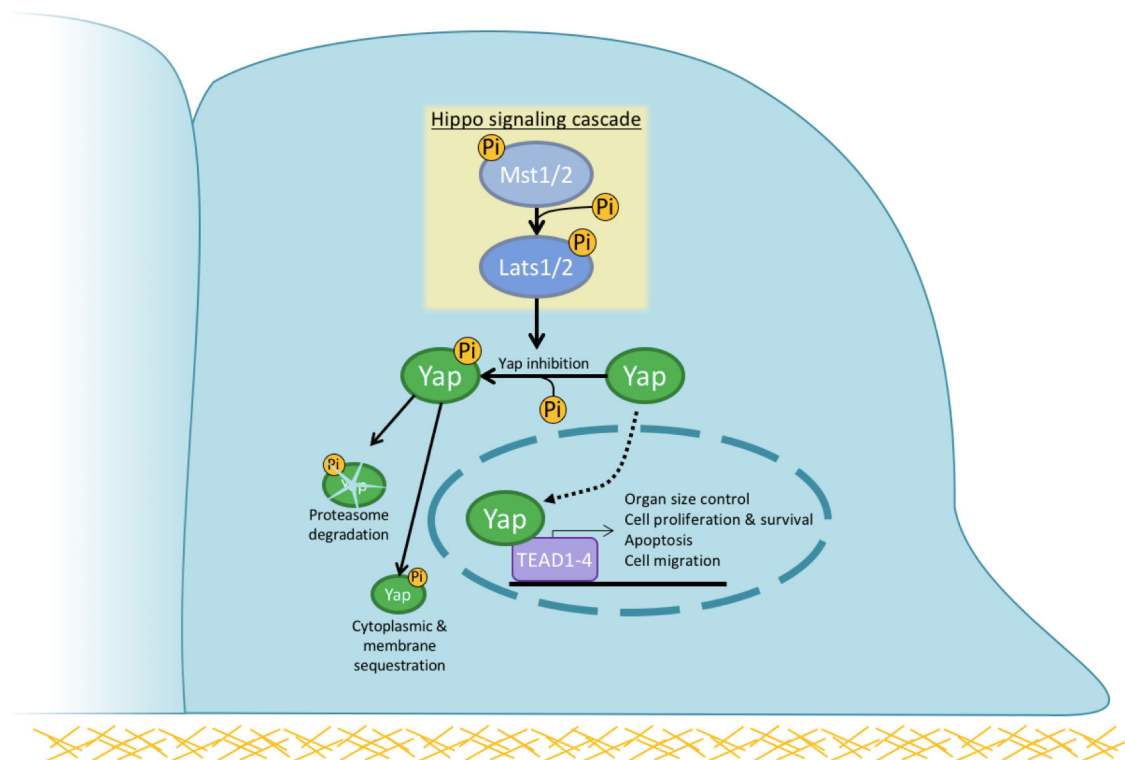


Figure I.15. Schéma de régulation de Yap par la cascade de signalisation Hippo. La forme active de Yap est relocalisée dans le noyau où elle interagit avec des facteurs de transcription comme TEAD1-4 pour activer l'expression de gènes. La forme phosphorylée de Mst1/2 est active et phosphoryle Lats1/2. Phospho-Lats1/2 phosphoryle à son tour Yap qui est alors inhibé par dégradation par le protéasome et par rétention cytoplasmique et membranaire. Pi : Phosphate inorganique.

2.1 Yap/Taz et la voie de signalisation Hippo

2.1.1 L'axe Hippo - Yap/Taz

Le cœur de la voie Hippo est représenté par deux couples de kinases et deux protéines activatrices WW45 (45 KDa WW Domain Protein) et Mob. Les deux couples de kinases sont Mst1/2 (Macrophage Stimulating 1/2) et Lats1/2 (Large Tumor Suppressor Kinase 1/2) (Figure I.15). En association avec WW45, Mst1/2 est activé par phosphorylation en réponse à des signaux régulateurs en amont. L'activation de Mst1/2 permet la phosphorylation et l'activation de Lats1/2. En association avec Mob, Lats1/2 activé permet la phosphorylation inhibitrice de Yap et de Taz. En résumé, l'activation des protéines Mst/Lats de la voie Hippo entraîne l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de Yap/Taz.

La phosphorylation de Yap/Taz induit sa dégradation par le protéasome ou sa séquestration dans le cytoplasme et à la membrane plasmique (Zhao et al., 2010a, 2010b). Bien qu'on ait longtemps pensé que Yap n'avait pas de rôle dans le cytoplasme, une étude récente a montré que Yap cytoplasmique est nécessaire dans la voie de signalisation Wnt. La voie Wnt est une cascade de signalisation qui favorise la prolifération des cellules par la localisation nucléaire de la β -caténine. Quand elle est inactive, la voie Wnt lève l'inhibition sur le complexe de dégradation de la β -caténine ce qui réduit la concentration en β -caténine et diminue la prolifération. Le complexe de dégradation de la β -caténine, n'est fonctionnel qu'en présence de Yap cytoplasmique (Azzolin et al., 2014). La régulation de Yap/Taz par les contacts cellule-cellule sera détaillée plus tard.

La forme non-phosphorylée de Yap/Taz est transloquée dans le noyau par un mécanisme encore inconnu. Yap/Taz ne comporte pas de domaine de liaison à l'ADN et interagit avec la chromatine de façon indirecte en s'associant à des facteurs de transcription. Bien que les protéines TEAD1-4 (TEADs ; TEA Domain family members) soit ses principaux partenaires, Yap/Taz peut aussi interagir avec d'autres facteurs de transcription comme RUNX, p73, KLF4, TBX5 (Piccolo et al., 2014; Rosenbluh et al., 2012; Strano and Blandino, 2007; Vassilev et al., 2001; Yagi et al., 1999; Zhao et al., 2008).

Les protéines TEADs lient les promoteurs des gènes dont elles régulent l'expression. En présence de Yap/Taz, les protéines TEADs s'activent et déclenchent la transcription des gènes situés en aval des promoteurs. Parmi les gènes cibles des facteurs de transcription TEADs, on relève c-Myc, Sox4, CTGF, IGFBP3, ITGB2, Birc2, Birc5, Gli2, Axl, AREG, Cyr61, Hoxa1, Hoxc13 (Pobbati and Hong, 2013). De façon importante, CTGF et Cyr61 sont impliqués dans l'adhésion et la migration des cellules (Babic et al., 1998, 1999; Kireeva et al., 1996). D'autres gènes comme Birc5, Sox4 et c-Myc sont impliqués dans la progression du cycle cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (Bustelo, 2010; Schmidt, 1999).

De façon intéressante, le complexe Yap/Taz-TEAD et la protéine AP-1 (Activator Protein-1) sont fixés à l'ADN sur des locus différents mais ils peuvent interagir grâce à des boucles de chromatine (Zanconato et al., 2015). AP-1 est un oncogène impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire et dans la cancérogénèse (Eferl and Wagner, 2003). Le complexe Yap/Taz/TEAD/AP-1 active la transcription de gènes directement impliqués dans le contrôle de l'entrée en phase S et en mitose (Zanconato et al., 2015).

La régulation de Yap/Taz par les kinases Mst/Lats de la voie Hippo est dite « canonique ». La régulation dite « non-canonique » contrôle l'activité de Yap/Taz indépendamment de ces protéines. Comme on le verra, une troisième catégorie de régulateurs court-circuitent la voie Hippo en régulant Lats indépendamment de Mst.

En conclusion, l'activité transcriptionnelle dépendante du couple Yap/Taz est activée quand Yap/Taz est nucléaire alors qu'elle est inhibée par dégradation ou par exclusion nucléaire de Yap/Taz.

2.1.2 Le couple Yap/Taz pendant l'embryogénèse et à l'âge adulte

De façon générale, l'expression du gène YAP1 permet la synthèse de 8 isoformes de protéines par épissage alternatif regroupés en 2 familles : Yap1 et Yap2 (Gaffney et al., 2012; Sudol, 2013; Sudol et al., 1995). Bien que les différences fonctionnelles soient encore mal comprises, il semble que Yap1 soit majoritairement pro-mitotique alors que Yap2 est plutôt pro-apoptotique (Benham-Pyle et al., 2015; Oka et al., 2008). Dans ce manuscrit, on utilisera la notation YAP pour le gène et la notation Yap pour les protéines. Par convention, la notation Yap se réfère indifféremment à Yap1 et Yap2. Taz (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) se réfère à la protéine codée par le gène WWTR1 (WW domain containing transcription regulator 1), à ne pas confondre avec la protéine Tafazzin dont la nomenclature officielle est TAZ.

De façon intéressante, la surexpression du gène YAP1 chez la souris entraîne une prolifération cellulaire accrue et l'augmentation de volume de multiples organes comme le foie, la peau, l'intestin, les muscles et le cœur (Camargo et al., 2007; Dong et al., 2007; Fischer et al., 2016; Harvey et al., 2013; Heallen et al., 2011; Schlegelmilch et al., 2011). Contrairement aux souris qui n'expriment pas Taz et qui sont viables, l'absence du gène Yap entraîne la mort des souris au stade embryonnaire E8.5 (8,5 jours après le coït) et les blastomères n'exprimant ni Yap ni Taz arrêtent leurs divisions avant le stade morula à 8-16 cellules (stade E2.0 ; 2 jours après le coït) (Hossain et al., 2007; Makita et al., 2008; Morin-Kensicki et al., 2006; Nishioka et al., 2009; Tian et al., 2007). Dès le stade préimplantatoire à 16 cellules, on distingue des cellules externes, à la périphérie de l'embryon et des cellules internes. Yap/Taz est activé dans les cellules externes ce qui permet leur différenciation en cellules du trophoctoderme, nécessaire à l'implantation de l'embryon dans l'utérus. Au contraire, les cellules internes sont comprimées et inhibent Yap/Taz. Elles se différencient en Cellules de la Masse Interne (ICM) à l'origine du futur fœtus (Maître et al., 2016; Nishioka et al., 2009). A un stade embryonnaire plus avancé, Taz participe à la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cellules osseuses ou en cellules adipeuses chez la souris (Hong et al., 2005).

Chez l'adulte, la localisation nucléaire de Yap dans certaines populations cellulaires permet le maintien d'une niche de cellules souches différenciées dans les organes. Ces cellules sont dites unipotentes car elles ne peuvent que s'auto-renouveler ou se différencier en un seul type cellulaire. Par exemple, l'axe Hippo-Yap/Taz est nécessaire à la régénération hépatique après ablation chirurgicale chez la souris (Camargo et al., 2007; Harvey et al., 2013; Michalopoulos and DeFrances, 1997; Pan, 2010). A l'exception des cellules de la couche basale, les cellules de l'épiderme localisent Yap dans le cytoplasme et ne prolifèrent pas. Ainsi, l'homéostasie de l'épiderme est assurée par l'activation de Yap et la prolifération des cellules unipotentes de la couche basale (Totaro et al., 2017). En accord avec ces résultats, la surexpression transitoire de Yap ou de Taz dans des cellules mammaires de souris différenciées et non proliférative induit leur conversion en cellule souche unipotentes. On peut induire cette transformation dans d'autres types cellulaires comme les cellules de glande mammaire, les cellules neuronales et les cellules pancréatiques (Panciera et al., 2016).

En conclusion, l'axe Hippo-Yap/Taz est primordial pour le développement embryonnaire et pour l'homéostasie des tissus à l'âge adulte en maintenant des compartiments de cellules unipotentes.

Contrairement aux protéines Mst1/2 et Lats1/2 qui sont des suppresseurs de tumeur, Yap/Taz est un oncogène dont l'activité favorise la prolifération des cellules. La dérégulation de l'axe Hippo-Yap/Taz est à l'origine de nombreux cancers.

2.1.3 L'oncogène Yap/Taz, une cible thérapeutique séduisante

La dérégulation de l'axe Hippo-Yap/Taz est en relation avec de nombreuses proliférations tumorales et cancéreuses. Par exemple, le gène YAP1 est surexprimé dans le cancer colorectal chez l'homme et pendant la carcinogénèse hépatique humaine et murine (Camargo et al., 2007; Zender et al., 2006). De plus, la présence de Yap dans le noyau de cellules cancéreuses du foie est associée à un mauvais pronostic (Xu et al., 2009). La voie de signalisation Hippo est en interaction fonctionnelle avec de nombreuses autres voies de signalisation impliquées dans le cancer comme Wnt, TGF β -BMP (Transforming Growth Factor β - Bone Morphogenetic Protein), Notch, l'insuline et mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin). Contrairement à ces autres voies de signalisations oncogéniques, la voie Hippo est rarement mutée dans la carcinogénèse humaine. Il est intéressant de remarquer que dans la voie Wnt, Yap a un rôle de suppresseur de tumeur en favorisant la dégradation de la β -Caténine (Azzolin et al., 2014).

La récente découverte de l'implication de l'axe Hippo-Yap/Taz dans la cancérogénèse a apporté un grand nombre de nouvelles cibles thérapeutiques (Liu-Chittenden et al., 2012). En effet, bien que les protéines au cœur de la voie Hippo soient peu nombreuses (6 protéines : Mst1 et 2, Lats1 et 2, WW45, Mob), on compte un grand nombre de protéines régulatrices en amont de la voie Hippo (voie canonique) ou directement en amont de Yap/Taz (voie non-canonique) (Harvey et al., 2013). Pour plus d'information sur le rôle de Yap/Taz dans la carcinogénèse, nous invitons le lecteur à lire les revues suivantes (Harvey et al., 2013; Moroishi et al., 2015; Pan, 2010).

2.2 La régulation en amont de l'activité transcriptionnelle de Yap/Taz

Il existe de nombreuses voies de régulation en amont de Yap/Taz (Meng et al., 2016). Bien qu'il y ait plusieurs interconnexions, on peut classer ces voies de signalisation en 3 familles : (1) la régulation par les facteurs solubles, (2) la régulation par les contacts cellule-cellule et (3) la régulation par la mécanique de la cellule et de l'environnement.

2.2.1 La régulation de Yap/Taz par les facteurs solubles

2.2.1.1 Les Récepteurs à activité Tyrosine kinase (RTKs)

Les récepteurs à tyrosine kinase (RTKs) forment une grande famille de protéines transmembranaires pouvant se lier à des ligands solubles comme EGF (Epidermal Growth Factor), l'insuline ou FGF (fibroblast growth factor) (Elbediwy et al., 2016). La liaison du ligand au RTK entraîne l'homodimérisation et la phosphorylation croisée du récepteur sur des résidus de tyrosine. De nombreux ligands des RTK sont des facteurs de croissance.

La liaison de EGF sur son récepteur EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) entraîne l'activation de la protéine PI3K qui active la protéine PDK1 (Phospho-Inositide Dependant Kinase-1) (Fig. I.16.).

Inhibée par PDK1, la protéine Lats de la voie Hippo ne peut pas phosphoryler Yap/Taz qui est relocalisé dans le noyau où il augmente la prolifération cellulaire. D'abord caractérisée *in vitro*, cette voie de signalisation est aussi pertinente *in vivo* (Elbediwy et al., 2016; Fan et al., 2013; Kim and Gumbiner, 2015). Pour plus d'informations, nous invitons le lecteur à lire la revue suivante (Elbediwy et al., 2016).

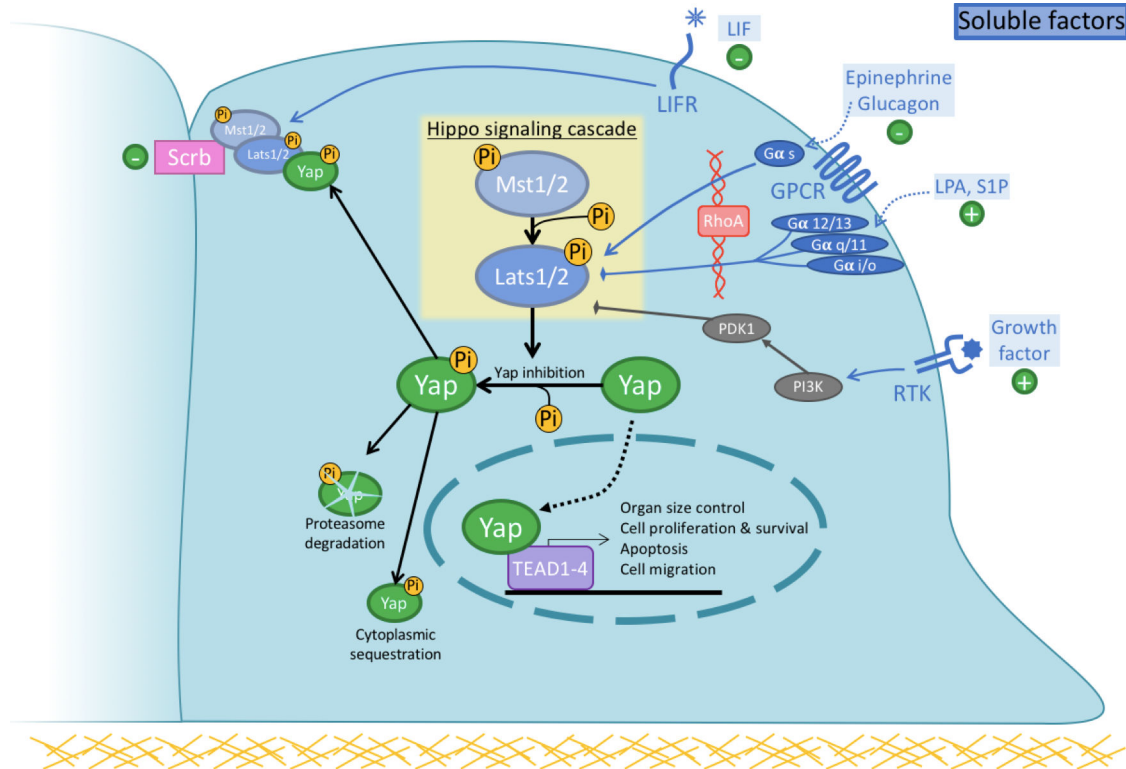


Figure I.16. La régulation de Yap par les facteurs solubles. L'engagement du ligand LIF sur son récepteur inhibe Yap par séquestration du complexe Mst-Lats-Yap par la protéine Scrub. L'activation des GPCRs $G\alpha_s$ par l'épinéphrine ou le glucagon inhibe Yap par activation de Lats en présence de RhoA. En revanche, le LPA et le S1P sont des ligands de GPCRs qui entraîne l'activation de Lats et l'activation de Yap en présence de RhoA. L'engagement de facteurs de croissance sur les Récepteurs à Tyrosine Kinase entraîne l'activation de Yap par inhibition de Lats via l'activation de PI3K et PDK1.

2.2.1.2 Le récepteur aux cytokine LIFR

Le récepteur LIFR (Leukemia Inhibitory Factor Receptor) est une protéine transmembranaire de la famille des récepteurs aux cytokines. Récemment, Chen et collègues ont montré que l'interaction LIF-LIFR est impliquée dans la séquestration du complexe Mst-Lats-Yap/Taz à la membrane par Scrub, une protéine impliquée dans la polarité apico-basale (Fig. I.16.). La perte d'expression de LIFR participe à l'hyperactivation de Yap dans le cancer du sein et au développement de métastases (Chen et al., 2012).

2.2.1.3 Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) sont une famille de récepteurs à 7 domaines transmembranaires. C'est la plus grande famille de récepteurs qui représente plus de 3% du génome et permet aux cellules de détecter la majorité des signaux biochimiques de leur environnement (Bockaert and Pin, 1999; Gershengorn and Osman, 2001). A la face cytoplasmique de la membrane, les

protéines G assurent la transduction du signal biochimique capté par les GPCRs. Les protéines G sont des hétérotrimères composés des sous-unités $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$.

Une récente étude a montré que la stimulation de certaines $G\alpha$ par les GPCRs peut activer ou inhiber Lats1/2 (Fig. I.16.) (Yu et al., 2012a). Par exemple, l'activation du sous-type G_s des $G\alpha$ par l'interaction d'une GPCR avec l'épinéphrine ou le glucagon augmente l'activité des kinases Lats1/2 ce qui entraîne la phosphorylation de Yap/Taz et inhibe la prolifération cellulaire. Au contraire, l'activation des sous-types $G_{12/13}$, $G_{q/11}$ ou $G_{i/o}$ par l'acide lysophosphatidique (LPA) ou la sphingosine 1-phosphate (S1P) inhibe les kinases Lats1/2 et se traduit par l'activation de Yap/Taz et la prolifération cellulaire. La voie de signalisation des GPCRs court-circuite les protéines Mst1/2 de la voie Hippo (Yu et al., 2012a).

Dans le sérum, on compte un grand nombre de facteurs solubles qui permettent la signalisation la communication de cellules distantes. Certains de ces facteurs solubles se lient aux GPCRs et permettent l'activation du co-facteur de transcription MRTF (Myocardin-Related Transcription Factor). En interaction avec le facteur de transcription SRF (Serum Response Factor), l'activation de MRTF permet la transcription de gènes spécifiques. Une étude récente a montré qu'en présence de LPA, le complexe MRTF-SRF se lie à Yap et potentialise l'activité transcriptionnelle dépendante de Yap/TEAD *in vitro* et *in vivo* et de façon indépendante de la voie Hippo (Kim et al., 2017). De plus, Yap/Taz est déphosphorylé par l'addition de sérum dans le milieu de cellules en culture (Yu et al., 2012a).

En conclusion, l'environnement moléculaire et la présence ou non de sérum dans le milieu de cellule en culture influence sensiblement la régulation de Yap/Taz et l'expression de nombreux gènes.

2.2.2 La régulation de Yap/Taz par les contacts cellule-cellule

L'engagement de contacts intercellulaires participe aussi à la régulation de Yap. L'activation de la voie Hippo entraîne la phosphorylation de Yap/Taz et sa rétention dans le cytoplasme et à la membrane plasmique. Dans cette partie, nous décrirons les voies de signalisation qui régulent Yap/Taz à partir des contacts cellule-cellule. Comme nous le verrons, les jonctions intercellulaires sont globalement impliquées dans l'inhibition de Yap/Taz (Fig. I.16.) (Révisés ici (Gumbiner and Kim, 2014; Harvey et al., 2013)). Comme nous l'avons évoqué plus tôt Yap/Taz est un régulateur majeur de l'inhibition de prolifération par contact. En effet, Yap/Taz permet la progression du cycle cellulaire de cellules cultivées *in vitro* à faible densité. A forte densité, Yap/Taz est inhibé et la prolifération cellulaire est réduite (Aragona et al., 2013; Zhao et al., 2007).

2.2.2.1 La polarité apico-basale et les jonctions serrées

Scrb est une protéine de la polarité apico-basale qui séquestre Phospho-Yap/Taz à la membrane en réponse à l'activation du récepteur LIFR et de la voie Hippo (Fig. I.16. et Fig. I.17.) (Chen et al., 2012; Cordenonsi et al., 2011).

Un des représentants majeurs de la polarité apico-basale est la protéine transmembranaire Crb3 du complexe de polarité « Crumbs ». En association avec les protéines PALS1 (ou MPP5 : Membrane Palmitoylated Protein 5), PATJ (Crumbs cell polarity complex component) et Amot (Angiomotone), la protéine Cr3 est responsable de la séquestration membranaire de phospho-Yap (Fig. I.17.) (Chen et al., 2010b; Grzeschik et al., 2010; Ling et al., 2010; Robinson et al., 2010; Schroeder and Halder, 2012;

Varelas et al., 2010). En plus de la séquestration membranaire, l'angiomotine Amot est aussi impliquée dans la séquestration cytoplasmique et la dégradation de phospho-Yap (Chan et al., 2011; Oka et al., 2012; Paramasivam et al., 2011; Varelas et al., 2010; Wang et al., 2011; Zhao et al., 2011).

Enfin, la protéine Zonula Occludens-2 (ZO-2) des jonctions serrées peut interagir avec Yap et Taz. L'équipe du professeur Sudol a montré que ZO-2 est associé à la relocalisation de Yap/Taz de la membrane au cytoplasme et du cytoplasme au noyau (Fig. I.17.). Dans le noyau, ZO-2 facilite le rôle pro-apoptotique de Yap et inhibe l'activité transcriptionnelle de Taz (Oka et al., 2010, 2012; Remue et al., 2010).

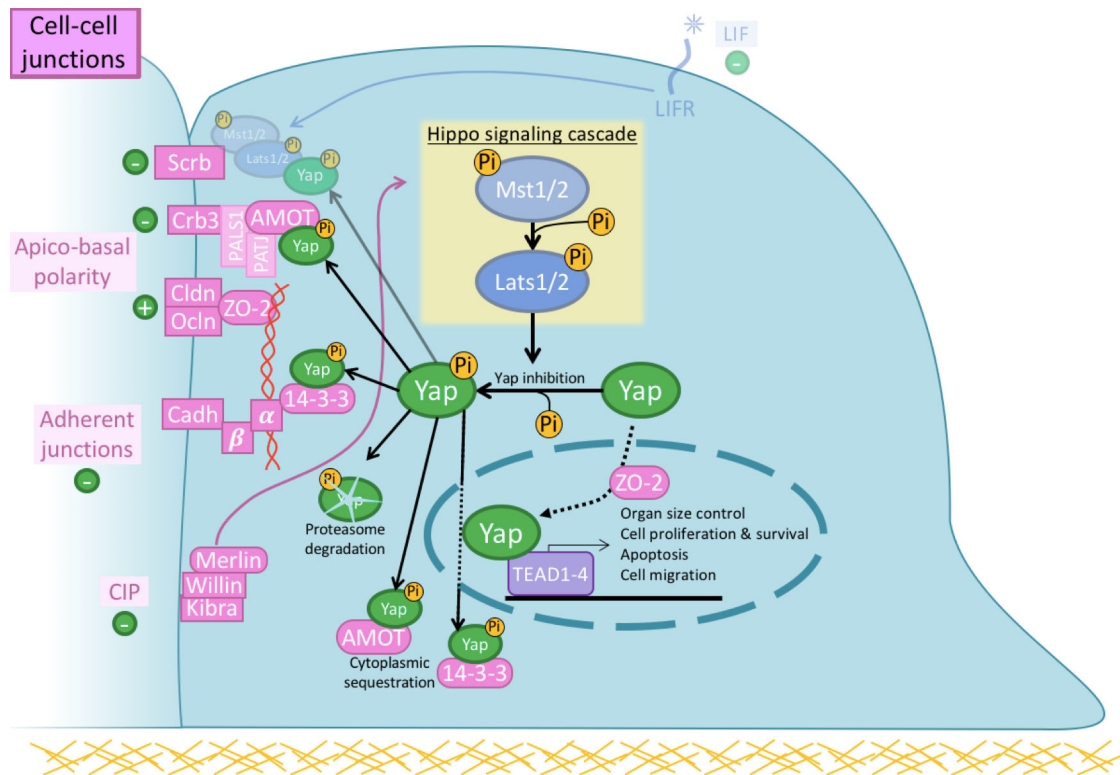


Figure I.17. La régulation de Yap par les contacts cellulaires. L'engagement du ligand LIF sur son récepteur inhibe Yap par séquestration du complexe Mst-Lats-Yap à la membrane par la protéine Scrb. La protéine AMOT séquestre Yap dans le cytoplasme et à la membrane grâce au complexe de polarité apicobasal Crb3-PALS1-PATJ. En présence d'actine, l' α -caténine séquestre le complexe 14-3-3-Yap aux jonctions adhérentes. Yap est inhibé par 14-3-3 indépendamment des jonctions adhérentes par séquestration cytoplasmique. Le complexe Kibra-Willin-Merline active la voie Hippo ce qui inhibe Yap en présence de contact cellule-cellule. Le seul signal en relation avec les contacts cellule-cellule qui active Yap est la protéine ZO-2 des jonctions serrées. ZO-2 favorise la localisation nucléaire de Yap.

2.2.2.2 Les jonctions adhérentes

En plus de permettre l'établissement et le maintien des jonctions serrées, les jonctions adhérentes sont importantes pour la séquestration de phospho-Yap/Taz à la membrane. De plus, les jonctions adhérentes inhibent les phosphatases antagonistes de Lats qui réactivent phospho-Yap/Taz par déphosphorylation (Schroeder and Halder, 2012).

La cadhérine et l' α -caténine inhibent Yap/Taz et participent à l'homéostasie de l'épiderme et du follicule pileux, la régénération hépatique et le développement des dents (Cosgrove et al., 2016; Herr

et al., 2014; Kim et al., 2011; Li et al., 2016; Schlegelmilch et al., 2011; Silvis et al., 2011). La ré-expression de la E-cadhérine dans des cellules de cancer du sein restaure l'exclusion nucléaire de Yap à forte densité cellulaire et rétablit l'inhibition la CIP (Kim et al., 2011).

Comportant un domaine de liaison pour l' α -caténine, la protéine 14-3-3 est impliquée dans la séquestration aux jonctions adhérentes mais aussi dans la séquestration cytoplasmique de Yap/Taz (Fig. I.17.). En effet, la forme phosphorylée de Yap/Taz interagit avec une grande affinité avec la protéine 14-3-3. L'interaction avec 14-3-3 empêche la localisation nucléaire de Yap/Taz (Dong et al., 2007; Hong et al., 2005; Sudol et al., 2013).

L'engagement des jonctions adhérentes dans un contact intercellulaire n'est pas suffisant pour l'exclusion nucléaire de Yap/Taz. A l'aide de billes magnétiques recouverte de E-cadhérine, Hirata et associés ont montré que l'application d'une force mécanique sur les jonctions adhérentes potentialise l'inhibition de Yap et de la prolifération. Ainsi, l'inhibition de Yap dans une monocouche de cellule dépend des forces contractiles générées par les cytosquelettes d'actomyosine et transmises par les jonctions adhérentes (Hirata et al., 2017).

En association avec les contacts cellule-cellule, le complexe protéique Kibra-Willin-Merline (Merline est aussi appelée Nf2) est impliqué dans l'activation de la voie Hippo et l'inhibition de Yap/Taz par des mécanismes mal compris chez les mammifères (Fig. I.17.) (Das et al., 2015; Grusche et al., 2010).

En conclusion, les contacts cellule-cellule inhibent globalement l'activité transcriptionnelle de Yap.

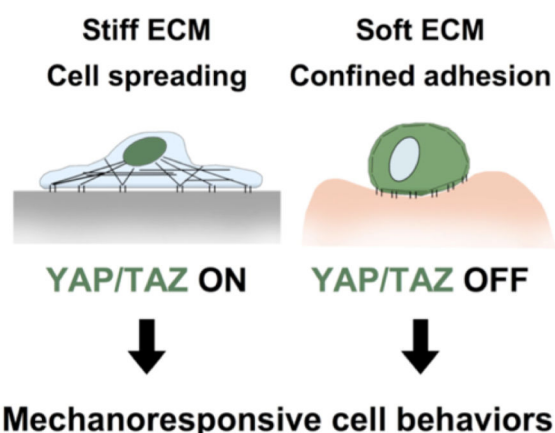


Figure I.18. Régulation de Yap/Taz par les signaux mécaniques. A gauche : sur un substrat rigide, les cellules s'étalent et organisent des fibres de stress d'actomyosine. Yap/Taz est relocalisé dans le noyau où il augmente l'expression de gènes spécifiques. Sur un substrat souple, le cytosquelette d'actomyosine est désorganisé, Yap/Taz est relocalisé dans le cytoplasme et la transcription des gènes est abolie. Tiré de (Dupont et al., 2011).

2.2.3 La régulation de Yap/Taz par la mécanique de la cellule et de l'environnement

En 2011, l'équipe du professeur Piccolo a découvert pour la première fois que l'activation de Yap/Taz répond à des signaux mécaniques (Fig. I.18.).

Ces signaux mécaniques régulent Yap/Taz par une voie dépendante de l'organisation fibrillaire de l'actine mais indépendante de la voie Hippo (Dupont et al., 2011). Cette découverte a ouvert un nouveau champ de recherche très prometteur qui pourrait permettre d'expliquer le contrôle de la prolifération cellulaire par des signaux mécaniques générés aussi bien à l'échelle cellulaire qu'à l'échelle tissulaire.

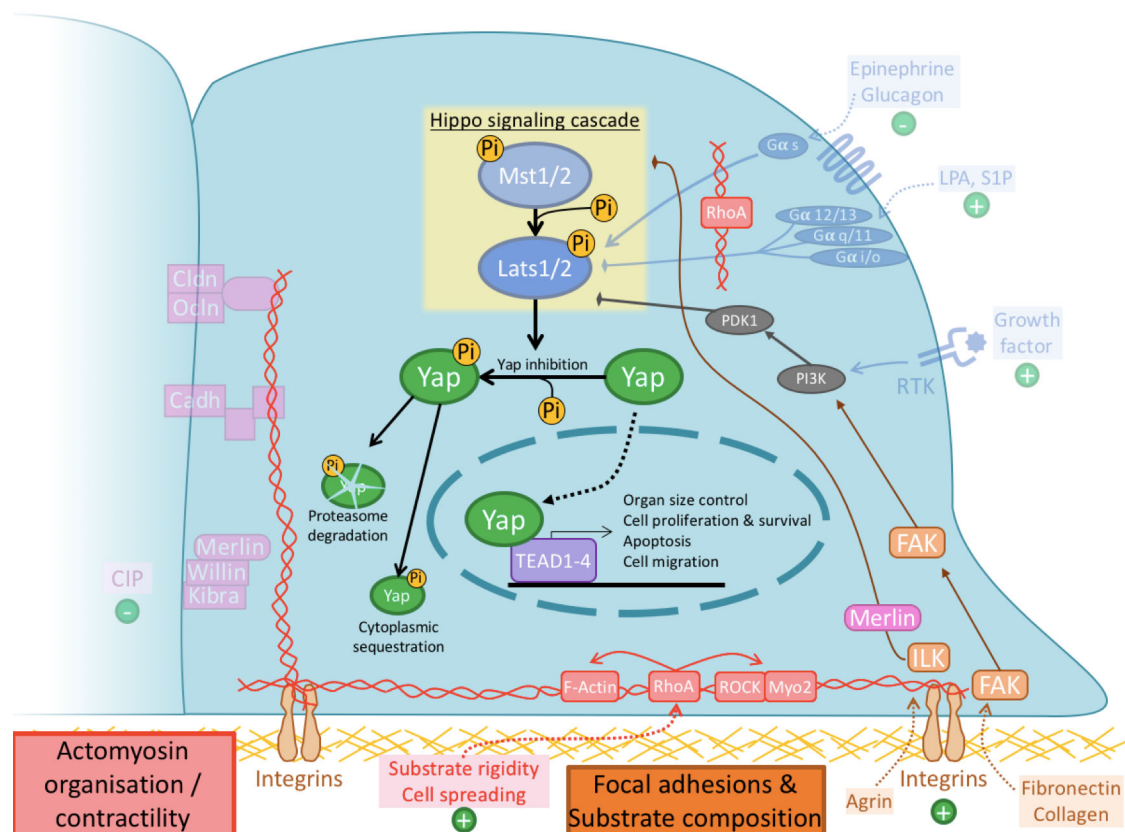


Figure I.19. La régulation de Yap par l'actomyosine et par les adhésions focales. RhoA favorise à la fois l'élongation et la contractilité du cytosquelette d'actomyosine. L'activité de RhoA est nécessaire à la régulation de la voie Hippo par les GPCRs. La surexpression de RhoA entraîne la localisation nucléaire de Yap alors que l'inhibition de RhoA favorise la localisation cytoplasmique de Yap. La contractilité de l'actine potentialise l'inhibition de Yap par les jonctions adhérentes. Il existe au moins 2 cascades de signalisation qui permettent l'activation de Yap. La voie FAK-PI3K-PDK1 inhibe Lats par une voie similaire au RTKs. La voie ILK-Hippo inhibe la voie Hippo en présence de la protéine Merline.

2.2.3.1 La contractilité et l'actine filamenteuse

Comme on l'a décrit plus tôt, l'étalement des cellules et la rigidité du substrat sont des facteurs qui changent l'organisation et la contractilité du cytosquelette d'actomyosine (Fig. I.19.). Dans un effort de compréhension des mécanismes moléculaires qui régulent Yap/Taz par des signaux mécaniques, plusieurs équipes se sont intéressées au cytosquelette d'actomyosine.

Bien que la communauté scientifique s'accorde sur l'importance d'un rapport élevé d'actine F par rapport à l'actine G pour l'activation de Yap/Taz, le rôle de la contractilité de l'actomyosine reste largement débattu (Aragona et al., 2013; Das et al., 2016; Yu et al., 2012a). En utilisant des outils optogénétiques, l'équipe du professeur Trepas a montré que l'augmentation de la contractilité par activation de la protéine RhoA entraîne la localisation nucléaire de Yap. En retour, ils ont induit la localisation cytoplasmique de Yap par inhibition de RhoA (Valon et al., 2017). A ce jour, la régulation de l'activité de Yap en réponse à des signaux mécaniques reste mal comprise. Cependant, on sait que l'organisation filamenteuse de l'actine entraîne la rétention nucléaire de Yap/Taz alors que la désorganisation de ces filaments est associée à un équilibre de Yap/Taz entre le cytoplasme et le noyau (Aragona et al., 2013; Dupont et al., 2011).

Les forces exogènes subies par les cellules régulent également Yap. Contrairement à la compression qui induit l'exclusion nucléaire de Yap, l'étirement de cellules épithéliales *in vitro* induit la relocalisation nucléaire de Yap et la levée de la CIP (Benham-Pyle et al., 2015; Saw et al., 2017).

En conclusion, la régulation de l'activité transcriptionnelle de Yap/Taz est sensible à l'organisation du cytosquelette d'actomyosine.

2.2.3.2 Les adhésions focales

Yap/Taz nucléaire est associé à de nombreux signaux mécaniques comme un substrat rigide, un étalement important de la cellule ou une faible densité cellulaire. En retour, Yap/Taz est cytoplasmique en réponse à un substrat mou (0,7 kPa), à un étalement faible de la cellule ou une grande densité cellulaire (Dupont et al., 2011; Zhao et al., 2007). Une étude récente a montré que l'étalement de la cellule et la rigidité du substrat régulent la différenciation des cellules épidermiques. L'activation mécanique de Yap/Taz entraîne l'inhibition de l'expression de Notch, un facteur de différenciation épidermique ce qui permet aux cellules de garder leur unipotence. Au contraire, quand les cellules sont cultivées sur un substrat mou, Yap/Taz est inhibé ce qui entraîne l'expression de Notch et la différenciation des cellules qui arrêtent de proliférer (Totaro et al., 2017).

Contrairement aux jonctions adhérentes, les adhésions focales favorisent la localisation nucléaire de Yap/Taz par deux voies biochimiques récemment caractérisées : la voie FAK-Src-PI3K-PDK1 et la voie ILK-Hippo (Fig. I.19.).

Yap peut être localisé dans le noyau de cellule cultivées sur un substrat de fibronectine ou de collagène mais pas sur un substrat de poly-L-Lysine ou de laminine (Kim and Gumbiner, 2015). L'engagement des intégrines dans les adhésions focales induit l'activation de la FAK (Focal Adhesion Kinase) qui phosphoryle les protéines de la famille Src (abréviation de Sarcome). La phosphorylation de la PI3K (Phospho-Inositide 3-Kinase) par Src entraîne l'activation de la protéine PDK1 (Phospho-Inositide–dependent protein kinase 1) (Fan et al., 2013). La PDK1 inhibe la protéine Lats de la voie Hippo et lève l'inhibition sur Yap/Taz. Nous remarquons ici que la cascade de signalisation PI3K-PDK1-Lats peut être activée soit par les RTK ou par l'axe Adhésions Focales-FAK-Src.

La voie ILK-Hippo est l'autre voie de régulation de la voie Hippo par les adhésions focales et elle dépend de la présence d'agrine dans la MEC (Chakraborty et al., 2017). L'agrine est une grosse protéine de type protéoglycane (Rupp et al., 1991). En présence d'agrine, ILK (Integrin-Linked Kinase) qui interagit avec la sous-unité $\beta 1$ des intégrines, inhibe la voie Hippo et permet l'activation de Yap/Taz (Hannigan et al., 1996; Serrano et al., 2013). La déplétion génétique et l'inhibition pharmacologique de ILK dans les cancers du sein, de la prostate ou du colon réactive la voie Hippo et réduit l'activité transcriptionnelle de Yap. Bien qu'on ne sache pas comment ILK inhibe la voie Hippo, l'activation de la protéine Merline (ou nf2) est nécessaire à cette voie de signalisation (Serrano et al., 2013). On peut ajouter que l'interaction entre les protéines de la voie Hippo et la protéine ILK est importante pour la prolifération des cellules artérielles pulmonaires (Kudryashova et al., 2016). Bien que de plus longues investigations devront le confirmer, on peut spéculer que ILK inhibe les protéines de la voie Hippo par séquestration aux adhésions focales.

La topographie du substrat de cellules endothéliales joue aussi un rôle sur la régulation de Yap. En effet, l'organisation micrométrique de la MEC avec des fibrilles plus épaisses et des pores plus larges

change l'organisation du cytosquelette d'actomyosine, désorganise les jonctions intercellulaires et favorise la localisation nucléaire de Yap (Mascharak et al., 2017).

En absence d'adhésions avec le substrat, les cellules épithéliales entrent en apoptose, c'est l'anoïkis (Paoli et al., 2013). Récemment, Zhao et associés ont montré qu'en absence de contacts avec le substrat, la voie Hippo de cellules épithéliales mammaires est activée ce qui induit l'apoptose des cellules. Dans les cellules cancéreuses, la voie Hippo est dérégulée et Yap est nucléaire ce qui entraîne la prolifération des cellules (Zhao et al., 2012).

En conclusion, la composition et la mécanique de la MEC sont importantes pour l'activation de Yap/Taz et pour la régulation de la prolifération cellulaire.

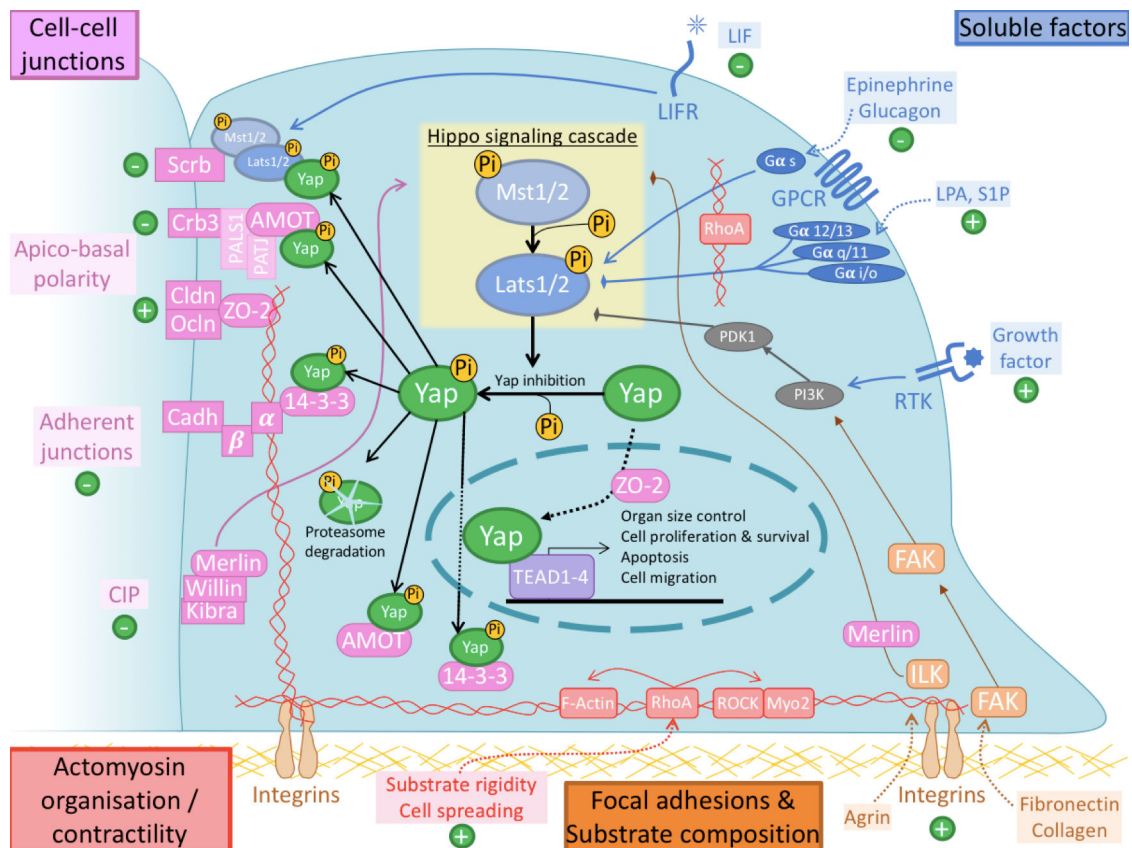


Figure I.20. Schéma récapitulatif de régulation de Yap par la cascade de signalisation Hippo (en jaune) ; par les facteurs solubles (en bleu) ; par les contacts cellule-cellule (en rose) et par le cytosquelette d'actomyosine et les adhésions focales en rouge et en orange). La figure intègre l'ensemble des voies de régulations de Yap connues et illustre leur intrication et leur complexité. Les signes « + » et « - » en vert indiquent l'activation et l'inhibition de Yap par les différentes contributions, respectivement. Abréviations : Cdh : Cadhérines ; α : α -caténine ; β : β -caténine ; Pi : Phosphate inorganique.

2.2.3.2.1 Le rôle de Yap/Taz dans la dynamique de l'actine et des adhésions focales

Parmi les cibles transcriptionnelles de Yap/Taz, on compte de nombreuses protéines des adhésions focales et de la MEC comme les intégrines $\beta 2$, la sous-unité $\alpha 5$ de la laminine 511 et la zyxine (Hansen et al., 2015). En accord avec ces informations, l'activation de Yap permet le remodelage de la MEC et la stabilisation des adhésions focales (Calvo et al., 2013; Nardone et al., 2017). De plus, l'activation de Yap favorise l'expression d'une RhoGAP qui inhibe l'activité de RhoA, déstabilise l'actine F et augmente l'invasion métastatique (Qiao et al., 2017).

En conclusion, Yap est en amont d'importantes fonctions biologiques comme la différenciation, la survie et la prolifération cellulaire aussi bien au stade embryonnaire qu'à l'âge adulte. Il est régulé par un grand nombre de signaux dont certains sont d'origine biochimique et d'autre sont d'origine mécanique (Fig. I.20.). Cependant, la régulation de Yap est complexe et reste mal comprise.

OBJECTIFS DE LA THESE

La migration épithéliale est un processus biologique conservé au cours de l'évolution et indispensable depuis le stade embryonnaire pour la morphogénèse et jusqu'à l'âge adulte pour la cicatrisation des tissus épithéliaux. Dans de nombreux contextes physiologiques ou pendant l'invasion métastatique, la migration cellulaire collective s'accompagne d'une prolifération accrue des cellules (Clark and Vignjevic, 2015; Guirao et al., 2015; Park et al., 2017; Zahm et al., 1997).

D'une part, l'initiation de la migration cellulaire collective remanie les propriétés mécaniques des cellules en réorganisant le cytosquelette, les contacts cellule-substrat et les contacts cellule-cellule. D'autre part, le couple Yap/Taz régule la prolifération cellulaire en réponse aux signaux mécaniques des cellules.

En conséquence, Yap/Taz est rapidement devenu un candidat moléculaire pour expliquer l'augmentation de la prolifération des cellules épithéliales en migration. Les adhésions focales, les jonctions adhérentes et le cytosquelette d'actomyosine sont des structures moléculaires mécanosensibles importantes pour expliquer la régulation mécanique de Yap/Taz lors de la migration cellulaire. Cependant, ces trois structures sont couplées fonctionnellement et la perturbation de l'une d'elle perturbe les deux autres ce qui en complique l'étude.

En lien avec le cytosquelette d'actine, le rôle des jonctions adhérentes sur la régulation mécanique de Yap a déjà été évaluée qualitativement et quantitativement (Hirata et al., 2017; Kim et al., 2011; Silvis et al., 2011). Ainsi, on sait que la transmission de forces par les jonctions adhérentes potentialise leur effet inhibiteur sur la régulation de la prolifération cellulaire par Yap (Dupont et al., 2011; Hirata et al., 2017; Zhao et al., 2007).

Cependant, à ce jour, le rôle de l'étalement cellulaire et de la mécanique des contacts cellule-substrat sur la régulation de Yap et sur la prolifération restent largement inexplorés pendant la migration cellulaire au sein d'un épithélium. En effet, jusqu'à très récemment, il n'existait pas de système expérimental permettant la migration de cellules cohésives en absence de contacts cellule-matrice.

En utilisant un modèle *in vitro* de migration épithéliale suspendue développé par notre laboratoire (Vedula et al., 2014a, 2015), nous avons pu, pour la première fois¹, découpler les contributions

¹ Il existe deux systèmes expérimentaux permettant l'étude de monocouches de cellules en suspension mais dans lesquelles les cellules ne migrent pas. Tout d'abord, en 2013, l'équipe du professeur Charras a développé une méthode astucieuse permettant de suspendre une monocouche épithéliale entre deux micro-capillaires. Après avoir cultivé des cellules épithéliales à confluence sur un feuillet de collagène tendu entre 2 micro-capillaires, la dégradation enzymatique du collagène donne naissance à une monocouche de cellules suspendues, cohésives entre elles mais dénuées de contacts avec des protéines de matrice-extracellulaire (MEC) (Harris et al., 2013). Le deuxième modèle expérimental a été développé par l'équipe du professeur Gartner en 2015. Des cellules sont cultivées à confluence sur une surface creusée de larges sillons de 100 µm à intervalles réguliers et recouverte de collagène. Après 36h de culture, les cellules initialement étalées au fond des sillons se décolent et forment une monocouche de cellules suspendues au-dessus du sillon. Dans ce système, l'absence de collagène et/ou de contacts cellule-matrice à la face basale des cellules suspendues reste incertaine (Broaders et al., 2015).

respectives de l'étalement des cellules, des contacts cellule-substrat, des contacts cellule-cellule et de la mécanique du cytosquelette d'actomyosine sur la régulation de Yap et de la prolifération pendant la migration épithéliale collective.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de répondre aux questions suivantes :

- (1) Quel est le rôle de l'étalement cellulaire et des forces de traction sur la régulation de Yap pendant les mouvements collectifs d'une monocouche épithéliale ?
- (2) Comment la localisation de Yap et la prolifération cellulaire sont-elles régulées dans un modèle de cicatrisation épithéliale suspendue *in vitro* ?

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Dans cette partie, nous expliquerons succinctement les méthodes expérimentales et le matériel utilisé au cours de cette thèse. Après avoir énuméré les microscopes que nous avons utilisés pour les acquisitions, nous détaillerons les procédures utilisées pour l'analyse qualitative et quantitative des images. Pour plus de détails sur les procédures expérimentales et le traitement des images, nous invitons le lecteur à consulter les méthodes publiées auxquels nous faisons référence et les protocoles joints en annexe.

1 Procédures expérimentales

1.1 Micro-fabrication

1.1.1 La micro-impression par contact (μ CP)

La micro-impression par contact (μ CP ; micro-contact printing) permet de dessiner une forme géométrique au fond de la boîte de culture ou sur une lamelle de verre. Cette méthode hautement reproductible permet de contrôler la géométrie et la composition protéique de la surface sur laquelle les cellules adhèrent. Le protocole de μ CP que nous avons utilisé a été publié précédemment (Fink et al., 2007; Vedula et al., 2014b).

La μ CP repose sur le même principe que le tampon encreur de bureau : on enduit un tampon d'encre que l'on applique sur une feuille de papier. Pour la μ CP, les reliefs du tampon sont micrométriques, l'encre est une protéine de matrice extracellulaire et la feuille de papier est le fond de la boîte de culture.

1.1.1.1 Préparation des tampons ; contrôler la géométrie

La préparation des tampons se fait en deux étapes. D'abord la photolithographie permet de fabriquer le moule du futur tampon. Dans un second temps, on fabrique les tampons à usage unique par lithographie molle.

Nous ne détaillerons pas la photolithographie dans ce manuscrit (détaillée dans cet article (Vedula et al., 2014b)). Au cours de cette thèse, nous avons utilisé des moules (ou wafer) conçus par la plateforme de micro-fabrication du *Mechanobiology Institute* (MBI) de Singapour. Avant la première utilisation puis une fois par an, les moules sont incubés sous vide pendant 2h avec du trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane (Sigma 448931 ; Santa Cruz Biotechnology SC-251303). Cette étape facilite le démoulage des tampons fabriqués en lithographie molle.

La lithographie molle consiste à la fabrication du tampon avec un élastomère de PDMS (Sylgard 184 Dow Corning DC184-1.1). Le PDMS est un élastomère initialement liquide qui se solidifie en présence de réticulant et par une cure de 2h à 80°C. On prépare un mélange 10:1 de PDMS:réticulant (Sylgard 184 Dow Corning DC184-1.1). Le mélange liquide est déposé sur les moules rigides et en épouse les reliefs micrométriques. Après un dégazage de 20 minutes dans une cloche à vide, le PDMS est traité pendant 2h à 80°C et se rigidifie avec une constante d'élasticité d'environ 2 MPa (Johnston et al., 2014).

1.1.1.2 Préparation du substrat ; contrôler la rigidité

Les boîtes et les lamelles de verre utilisées pour la μ CP sont recouvertes d'une fine couche de PDMS. Pour cela, des lamelles de verre de 28 ou 32mm de diamètre sont lavées en bain d'éthanol 96%, traitées aux ultrasons, séchées puis revêtues d'une couche de PDMS:réticulant et cuites au four pendant plus de 2h. On utilise le *Spin Coater* pour étaler à 0,5 g de mélange sur une lamelle ou sur une boîte de Pétri de 3,5 mm (Cycle 1 : 18 s à 500 tours par minutes ; Cycle 2 : 60 s à 5000 tours par minutes). Cette fine couche de PDMS améliore la reproductibilité des résultats et permet de contrôler

la rigidité du substrat des cellules. Après réticulation, le PDMS a une rigidité d'environ 2 MPa (Johnston et al., 2014).

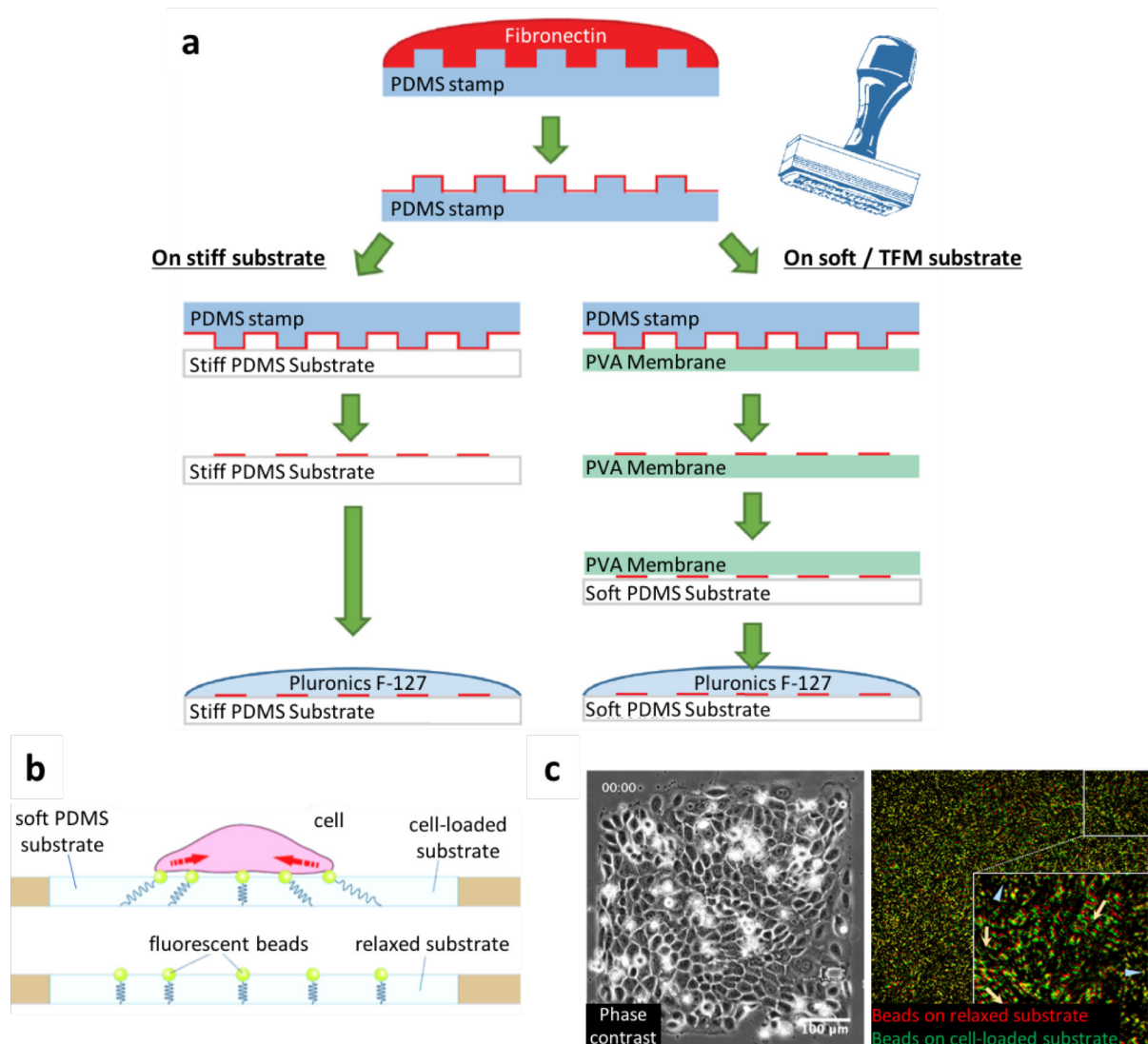


Figure II.1. Micro-fabrication. (a) Schéma du protocole de micro-impression par contact. Les moules sont recouverts de fibronectine puis sont appliqués directement sur le substrat rigide (à gauche). Pour combiner la micro-impression par contact et la microscopie à force de traction (à droite), les moules recouverts de fibronectine sont appliqués sur une membrane de poly-vinyl alcool (PVA). La membrane de PVA est ensuite déposée sur le substrat puis dissoute. Tiré de la thèse de Doctorat de Grégoire Peyret. (b) La microscopie à force de traction (TFM). Les cellules sont étalées sur un substrat transparent, élastique et recouvert de billes fluorescentes. Les forces de tractions des cellules déforment le substrat et déplacent les billes (en haut). A la fin de l'expérience, les cellules sont détruites et le substrat reprend sa forme initiale. En connaissant le module élastique du substrat, on peut calculer les forces de traction en mesurant le déplacement des billes. Adapté de [http://cytomorpholab.com]. (c) Des kératinocytes HaCaT sont ensemencés sur un carré de fibronectine microimprimé sur un substrat de TFM. A gauche, image en contraste de phase. A droite, superposition de l'image des billes sur le substrat relaxé (rouge) et de l'image des billes avec des cellules (vert). Entre les deux images, les billes se déplacent localement sur le substrat (flèches). Les billes sont fixes en absence de cellule ou quand les forces de traction s'équilibrent (tête de flèche).

1.1.1.3 Impression ; contrôler la composition protéique

Les tampons sont incubés 1h à température ambiante (RT) dans un mélange de 50 ng/mL de fibronectine plasmatique humaine (Millipore FC010-5MG) et de 25 ng/mL de fibronectine conjuguée à Cy3 (Cyanine-3 ; GE Healthcare PA23001) ou Cy5 (Cyanine-5 ; GE Healthcare PA25001). Ils sont

ensuite rincés à l'eau, séchés et directement appliqués sur les lamelles recouvertes de PDMS et préalablement activées par 20 minutes de traitement à l'UV-Ozone (Fig. II.1. a).

1.1.1.4 Passivation ; confiner les cellules sur le motif imprimé

La dernière étape empêche les cellules d'adhérer sur le substrat à l'extérieur des motifs de fibronectine micro-imprimés. Pour cela, on incube les substrats micro-imprimés dans une solution de pluronics F-127 (Sigma-Aldrich P2443-1KG) dilué à 2% dans de l'eau pendant 1h. Le pluronics F-127 est un polymère polyol tensio-actif qui s'adsorbe au PDMS hydrophobe et crée une brosse moléculaire non-adhérente pour les cellules. Il ne peut pas s'adsorber sur les motifs de fibronectine hydrophile (Fig. II.1. a). Enfin, les substrats sont rincés à l'eau, séchés et conservés au maximum 1 semaine à 4°C avant étalement des cellules.

1.1.2 La microscopie à Force de Traction (TFM)

La microscopie à force de traction (TFM ; Traction Force Microscopy) repose sur la fabrication d'un substrat élastique très souple de quelques kPa, transparent et recouvert de billes fluorescentes. Les forces de traction appliquées par les cellules adhérentes sur le substrat peuvent être calculées en mesurant le déplacement des billes fluorescentes au cours du temps (Fig. II.1. b et c) (Benigno et al., 2002; Butler et al., 2002; Vedula et al., 2014a; Wang and Lin, 2007; Wang and Pelham, 1998; Yu et al., 2012b). Nous avons utilisé un protocole publié précédemment (Vedula et al., 2014a; Yu et al., 2012b) (cf. Annexe 2).

Les composants A et B de PDMS Dow Corning Toray (cf. table ci-dessous, Dow Corning Toray 02534959 et 02534967) sont mélangés dans les proportions détaillées ci-dessous pour obtenir la rigidité souhaitée (Table II.1.) (Kenry et al., 2015). On dispose 0,3 g de ce mélange transparent dans des boîtes de culture de 3,5mm (fluorodishes World Precision Instrument, Inc FD35-100). Les boîtes sont incubées une nuit à température ambiante puis 10 minutes à 70-80°C. Elles sont ensuite traitées 10 minutes à température ambiante avec une solution de 10% de 3-aminopropyltriethoxsilane (Sigma-Aldrich A3648) diluée dans de l'éthanol à 96%. Les boîtes sont ensuite rincées à l'éthanol à 96% puis séchées à 80°C pendant 10 minutes. Après dilution à 2:1000 dans de l'eau, sonication et filtration à 450 nm, les billes fluorescentes de 200 nm (Invitrogen F8810) sont incubées sur les substrats pendant 10 min puis rincées à l'eau.

Mélange A:B	Rigidité obtenue
5:5	15 kPa
5:6	30 kPa

Table II.1. Rigidité du substrat obtenue par mélange des composants A et B du PDMS Dow Corning Toray

1.1.3 La micro-impression par contact (μ CP) sur les substrats de microscopie à force de traction (TFM)

Les tampons de PDMS ne peuvent pas être directement appliqués sur les substrats de TFM car ils sont trop fragiles. On utilise une μ CP indirecte (Fig. II.1. a). Le motif de fibronectine est d'abord imprimé sur une membrane de PVA (Poly-Vinyl Alcohol ; Sigma-Aldrich P8136-250G). La membrane de PVA est

découpée et déposée sur le substrat de TFM de manière à mettre les motifs de fibronectine en contact avec le PDMS Dow Corning Toray. La membrane de PVA est dissoute dans l'eau et les motifs de fibronectine s'adsorbent sur le substrat de TFM.

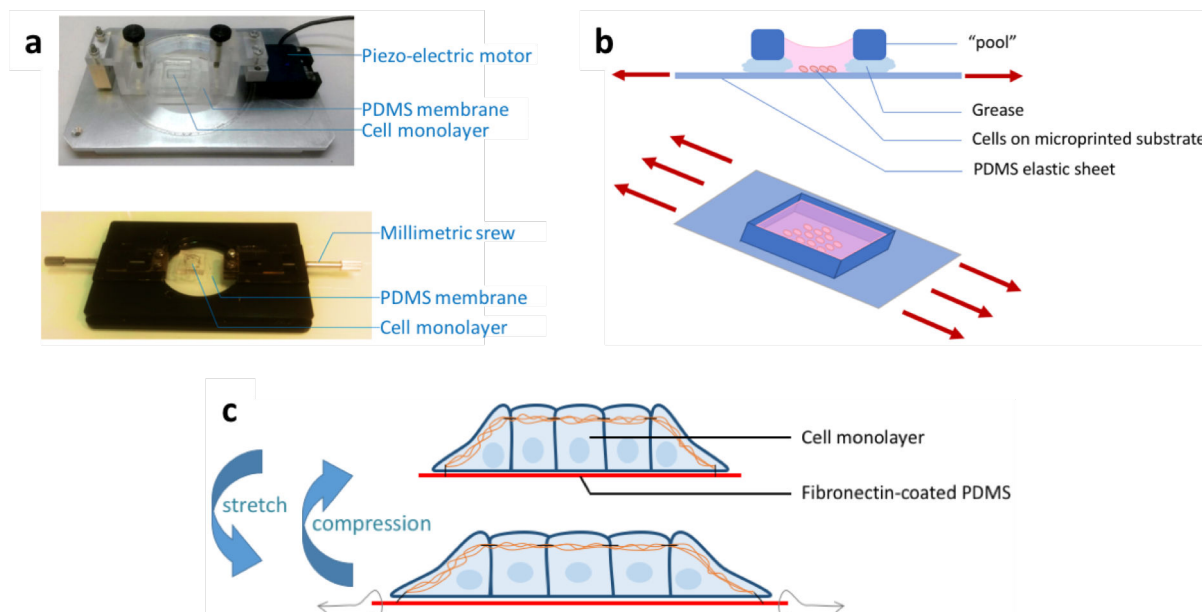


Figure II.2. Dispositif d'étirement et de compression des cellules. (a) Photos des dispositifs d'étirement de membrane contrôlé manuellement (bas) ou par ordinateur (haut). (b) Schéma en coupe (haut) et en perspective (bas) de la culture de cellules sur une membrane étirable de PDMS. Le milieu de culture est ajouté dans une « piscine » de PDMS déposé sur la membrane étirable. Entre la « piscine » et la membrane étirable, on dispose de la graisse pour assurer l'étanchéité. (c) Schéma en coupe de l'étirement ou de la compression des cellules.

1.2 Dispositif d'étirement et de compression

Nous disposons de deux dispositifs d'étirement de membrane montés sur une platine de microscope et fabriqués par nos soins au laboratoire (Fig. II.2. a). L'un des dispositifs permet d'étirer la membrane de PDMS manuellement et l'autre comporte un moteur piézoélectrique piloté par ordinateur (PI actionneur M-663 et contrôleur C-867).

Une membrane de PDMS étirable d'environ 200 μm d'épaisseur est découpée à l'aide d'un scalpel monté sur une imprimante (Graphtec Cutting plotter CE6000-40). Les étapes de micro-impression par contact sont les mêmes sur la membrane de PDMS que celles décrites précédemment sur une lame de verre. On découpe une « piscine » dans un bloc de PDMS de 0,5mm d'épaisseur pour faire un réservoir de milieu de culture. La graisse (Dow Corning 01018817) disposée entre la « piscine » et la membrane de PDMS assure l'étanchéité et le glissement pour la déformation homogène de la membrane lors de l'étirement (Fig. II.2. b).

La membrane est montée sur le dispositif d'étirement. Pour les expériences de compression, les cellules sont étalées sur une membrane pré-étirée et la relaxation de la membrane comprime les cellules (Fig. II.2. c). Pour les expériences d'étirement, les cellules sont étalées sur une membrane non-déformée. L'étirement de la membrane déforme les cellules cultivées dessus. La déformation ϵ est mesurée avec la longueur initiale L_i et la longueur finale L_f de la membrane :

$$\varepsilon = \frac{|V_f - V_i|}{V_i}$$

1.3 Culture cellulaire

1.3.1 Les lignées de kératinocytes HaCaT

Les cellules de la lignée HaCaT sont des kératinocytes humains spontanément immortalisés. Cette lignée de type « sauvage » (HaCaT WT) a été établie dans les années 80 ((Boukamp et al., 1988) ; don de D. Delacour). Nous avons utilisé plusieurs lignées de cellules HaCaT génétiquement modifiées qui expriment un gène d'intérêt couplé à un rapporteur fluorescent.

Les lignées de kératinocytes HaCaT E-Cadherin-Emerald et HaCaT MRLC-Emerald ont été établies par Pan Meng (MBI, Singapore), sont maintenues sans sélection antibiotique et n'ont pas encore fait l'objet d'une publication. Les cellules ont été transfectées par électroporation avec le système Néon et les plasmides sont un don de M. Davidson (Addgene #54072 et #54146).

Les lignées de kératinocytes HaCaT F-Tractine-GFP et HaCaT Life-Actine-GFP ont été établies par Tamara Advedissian (équipe Poirier de l'Institut Jacques Monod) par transfection à la lipofectamine, sont maintenues sans sélection antibiotique et n'ont pas fait l'objet d'une publication. Les plasmides sont un don de D. Mullins et R. Yasuda, respectivement (Addgene #58473 et #21948).

La lignée de kératinocytes HaCaT Histone H2B-GFP a été établie par transfection à la lipofectamine dans l'équipe par Grégoire Peyret. Cette lignée est maintenue sans sélection antibiotique et n'a pas fait l'objet d'une publication. Les plasmides sont un don de G. Wahl (Addgene #11680).

La lignée de kératinocytes HaCaT E-Cadherin-TSMod a été établie par Charlène Gayard par transfection avec de la lipofectamine et n'ont pas encore fait l'objet d'une publication. Les cellules sont cultivées avec 500 µg/mL de Généticine (Life Technologies 10131019). Le plasmide utilisé est celui de la publication suivante (Borghi et al., 2012).

Les cellules des lignées HaCaT sont entretenues dans le milieu DMEM (Life Technologies 31966) supplémenté de 10 % de Sérum de Veau Foetal (FBS ; Life Technologies 10270) et 1 % d'un cocktail Pénicilline-Streptomycine (PS ; Life Technologies 15140) dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂ et à atmosphère humide. A 60-90 % de confluence, les cellules sont rincées au PBS et décollées en trypsine (Life Technologies 14190 et 25300). Pour les expériences de vidéomicroscopie, les cellules sont cultivées dans du milieu Fluorobrite (Life Technologies A18967-01) supplémenté de 10 % FBS et 1 % PS. Pour les expériences d'étirement et de compression, le Fluorobrite est supplémenté de 10 % de FBS, 1 % de PS et 25 mM de Hepes (Pan Biotech P05-01100).

1.3.2 Les lignées de kératinocytes de souris

Les lignées de kératinocytes issus de souris de type sauvages (WT) (Vijayaraj et al., 2009) ou déficientes en kératines K5 et K14 (K5-KO) (Seltmann et al., 2013b) ont été établies par le laboratoire de T. Magin (Universität Leipzig). Ces cellules sont cultivées dans un milieu de culture FAD sans Ca²⁺ et supplémenté en sérum, en facteurs de croissance et en antibiotique (cf. protocole détaillé : Annexe 3).

Les cellules sont cultivées sur des boîtes de culture recouvertes de Collagène I (Sigma-Aldrich C3867). 48 h avant chaque expérience, les kératinocytes sont activés par 1,2 mM de Ca^{2+} .

1.4 Ensemencement des cellules

Les cellules sont toujours trypsinées la veille de l'étalement sur les substrats micro-fabriqués. Le jour de l'étalement, les cellules sont rincées en PBS puis décollées en trypsine. Après inhibition de la trypsine avec du milieu complet, les cellules sont comptées, centrifugées puis resuspendues à 10^6 cellules/mL dans du milieu complet. On dépose 200 à 500 μL de la solution cellulaire sur les substrats micro-fabriqués puis on laisse les cellules adhérer pendant 15 min à 1 h dans l'incubateur. Les cellules non-attachées sont rincées par un flux de milieu complet. Les cellules sont incubées une nuit dans l'incubateur.

1.5 Marquages fluorescents des cellules

1.5.1 Transfections transitoires

Les transfections ont été réalisées avec l'électroporateur Néon en suivant le protocole du fournisseur (Invitrogen Neon™ Transfection System MPK10025). La veille de la transfection, les cellules sont trypsinées. Le jour de la transfection, deux millions de cellules sont resuspendues dans 100 μL de tampon de transfection R avec 2 à 4 μg d'ADN (Table II.2.). Le programme d'électroporation comporte 2 impulsions électriques de 1200 V pendant 20 ms. Après une nuit en incubateur dans le milieu DMEM supplémenté de 10% de FBS, les cellules sont rincées et utilisées pour étalement sur les motifs de fibronectine. Les plasmides utilisés sont détaillés ci-dessous.

Plasmide	Origine
pEGFP-C3-hYAP1	don de M. Sudol (Addgene #17843)
TBS-mCh	don de F. Camargo (Schlegelmilch et al., 2011)
KASH-TSMod	don de N. Borghi (carte du plasmide en Annexe 4)

Table II.2. Constructions génétiques utilisées et références.

1.5.2 Drogues et incorporation d'EdU

L'inhibiteur de ROCK, Y27632 (Sigma-Aldrich Y0503-1MG), est utilisé à une concentration de 20 μM pour les expériences d'étirement et à 25 μM dans les ponts suspendus. Les expériences d'incorporation d'EdU ont été réalisées conformément au protocole du fournisseur (Click-It™, Thermo Fisher Scientific C10337, cf. protocole en Annexe 5). Les cellules sont incubées 15 minutes en présence d'EdU puis fixées immédiatement.

1.5.3 Marquages fluorescents de cellules fixées

Les cellules sont fixées en 2 étapes. D'abord, elles sont fixées dans un mélange 1:1 de formaldéhyde 4% (PFA ; Thermo-Fisher 28908) et de milieu de culture pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite, elles sont fixées dans 4% de formaldéhyde dilué dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) pendant 10-15 minutes à température ambiante. Les cellules sont perméabilisées par une solution de

PBS Triton X 0,2% + BSA 0,2% (Sigma-Aldrich T8787-100ML et A-7906) diluée dans du PBS pendant 15 minutes à température ambiante. Les anticorps primaires et secondaires sont incubés 3h à température ambiante ou une nuit à 4°C aux dilutions détaillées dans le tableau ci-dessous (Table II.3.). Après incubation, les anticorps sont rincés trois fois 10 minutes avec du PBS pendant 10 minutes.

L'actine F est marquée par une dilution à 1:200 de phalloïdine conjuguée à un fluorochrome (Rhodamine Sigma-Aldrich P1951 ; Alexa 647 Life Technologies A22287). L'actine G est marquée par la DNase I conjuguée au fluorochrome Alexa 488 (Invitrogen D12371). L'intercalant DAPI est dilué à 1:10000 pour le marquage nucléaire des cellules fixées (DAPI Molecular Probes D3571). Les lamelles sont montées sur une lame de verre avec du Mowiol 4-88 (Aldrich 81381-250G) pour observation.

Anticorps	Dilution	Référence
anti-paxillin	1:200	Millipore 05-41A
anti-talin	1:200	Millipore 05-385
anti-vinculin	1:200	Sigma-Aldrich V4139 et V9131
anti-β-catenin	1:200	Sigma-Aldrich C2206 et BD Biosciences 610156
anti-E-Cadherin	1:200	BD Bioscience 610181 et Cell Signalling 3195S
anti-P-Cadherin	1:200	Millipore 05-916
Anti-Fn3	1:200	Abcam ab18265
anti-phospho-Histone H3	1:200	Millipore 06-570
anti-H3K27me3	1:500	Abcam ab6002
anti-YAP	1:200	Santa Cruz Biotechnology sc-101199
anti-Phospho-YAP	1:200	Cell Signaling 4911S
chèvre anti-souris A488	1:400	Life technologies A11001
chèvre anti-lapin A488	1:400	Life technologies A11008
chèvre anti-souris A658	1:400	Life technologies A11004
chèvre anti-lapin A568	1:400	Life technologies A11011
donkey anti-souris A647	1:400	Life technologies A21571
donkey anti-lapin A647	1:400	Life technologies A31573

Table II.3. Anticorps primaires et secondaires utilisées et références.

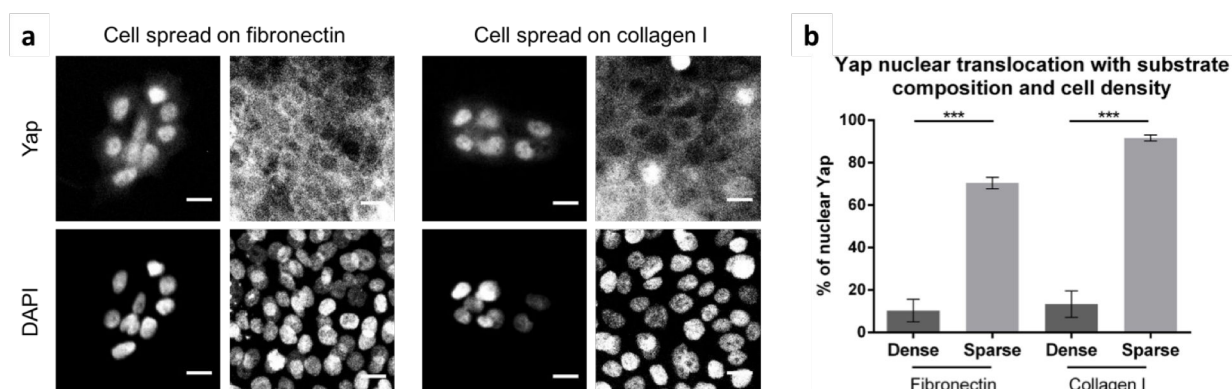


Figure II.3. Yap est régulé par la densité des kératinocytes cultivés sur substrat de fibronectine ou de collagène I. (a) Yap est nucléaire dans les cellules cultivées à faible densité (100 cellules/mm²) sur un substrat de fibronectine ou de collagène I. Yap est cytoplasmique dans les cellules cultivées à densité importante (2000 cellules/mm²). (b) Pourcentage de cellule pour lesquelles Yap est nucléaire. Barres d'échelle : 10 µm.

1.6 Validation du modèle d'étude : Rôle de la composition du substrat et de la densité sur la régulation de Yap des kératinocytes HaCaT

La densité cellulaire et l'étalement des cellules participent à la régulation mécanique de Yap de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes murins, les cellules épithéliales mammaires humaines ou les cellules souches mésenchymateuse (Aragona et al., 2013; Dupont et al., 2011; Zhao et al., 2007). Cependant, la régulation mécanique de Yap de kératinocytes HaCaT *in vitro* n'a jamais été explorée. De plus, le rôle de la composition du substrat sur la régulation de Yap par la densité cellulaire n'a jamais été rigoureusement examiné (Benham-Pyle et al., 2015). Pour valider la pertinence de notre modèle d'étude, nous avons cultivé pendant 24 heures les kératinocytes HaCaT en îlots de cellules (100 cellules/mm²) ou en monocouche de densité importante (2000 cellules/mm²) sur des substrats recouverts de fibronectine ou de collagène I (Fig. II.3. a). Les cellules sont ensuite fixées et immunomarquées pour Yap. Dans les kératinocytes cultivés en îlots, Yap est nucléaire sur un substrat de collagène ou de fibronectine (Fig. II.3. a). Yap est cytoplasmique dans les kératinocytes cultivés en monocouches cellulaires denses sur fibronectine et sur collagène I. Ces résultats démontrent que l'ensemencement de kératinocytes HaCaT sur des substrats de fibronectine micro-imprimées est un modèle pertinent pour étudier la régulation mécanique de Yap.

2 Microscopie et acquisition d'images

2.1 Microscopie à plein champ

Avec de la lumière transmise à travers l'échantillon, la microscopie par contraste de phase renforce les contrastes et facilite les analyses d'images. La microscopie à épifluorescence intègre le signal fluorescent réfléchi sur toute la hauteur des cellules. Elle permet d'analyser quantitativement les images indépendamment du plan focal d'acquisition. Nous avons utilisé les systèmes de microscopie à plein champ suivant pour observer des échantillons vivants et fixés.

Système	Propriétaire	Objectifs utilisés
Nikon Biostation	Equipe Ladoux/Mège	20x (10x, 20x, 40x par commutation des lentilles de tube) ; NA 0.5
Olympus IX81	Equipe Ladoux/Mège	UPLFLN 10X2PH ; UPLFLN 20XPH ; CPLFLN 10XPH
Olympus BX53	Equipe Ladoux/Mège	UPLFLN 10X2PH ; UPLFLN 20XPH ; CPLFLN 10XPH
Leica DMI6000	ImagoSeine Institut Jacques Monod	HXC PL FLUOTAR 10x/0,3 Ph1 (506507)
Axio Observer Z.1	ImagoSeine Institut Jacques Monod	Plan-Neofluar 10x/0,3 Ph1 (440331)

Table II.4. Microscopes à plein champ et références des objectifs utilisés.

2.2 Microscopie confocale

La microscopie confocale permet de faire des coupes optiques d'échantillons transparents et d'observer à haute résolution plusieurs plans focaux au sein des cellules. C'est à l'aide de ces microscopes que nous avons réalisé les expériences d'ablation laser, de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) et de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Nous avons utilisé les systèmes de microscopie confocale suivant pour observer des échantillons vivants et fixés (Table II.5.).

Système	Propriétaire	Objectifs utilisés	Techniques
Zeiss LSM 780 Balayage	ImagoSeine Institut Jacques Monod	Plan Apo 40x/1,3 Oil DIC (420762-9800) Plan Apo 63x/1,4 Oil DIC (420782-9900)	Imagerie live et fixé FRAP FRET
Leica DMI8 CSU-W1 Spinning Disk	ImagoSeine Institut Jacques Monod	HC Plan Apo 63x/1,4 Oil CS2 (506350)	Imagerie live
Zeiss LSM880NLO Balayage	UMR3215 Biologie du Développement Institut Curie	Plan Apo 40X/1,3 NA Oil	Ablation Laser Laser biphoton Mai-Tai Spectraphysics

Table II.5. Microscopes confocaux et références des objectifs utilisés.

2.3 Ablation laser

L'ablation laser permet de couper des tissus en focalisant un puissant laser qui brûle les cellules. Le laser balaye une région d'intérêt pour couper le tissu de façon rectiligne. Le laser à bi-photon focalise la coupe dans le plan d'observation et permet de ne pas détruire la cellule ou le tissu sur toute sa hauteur. Dans nos expériences, la région d'intérêt choisie pour la coupe est un rectangle de 5*100 pixels soit 2,1*42 µm. La vitesse du système permet d'enregistrer la première image au minimum 150 à 200 ms après la coupe laser.

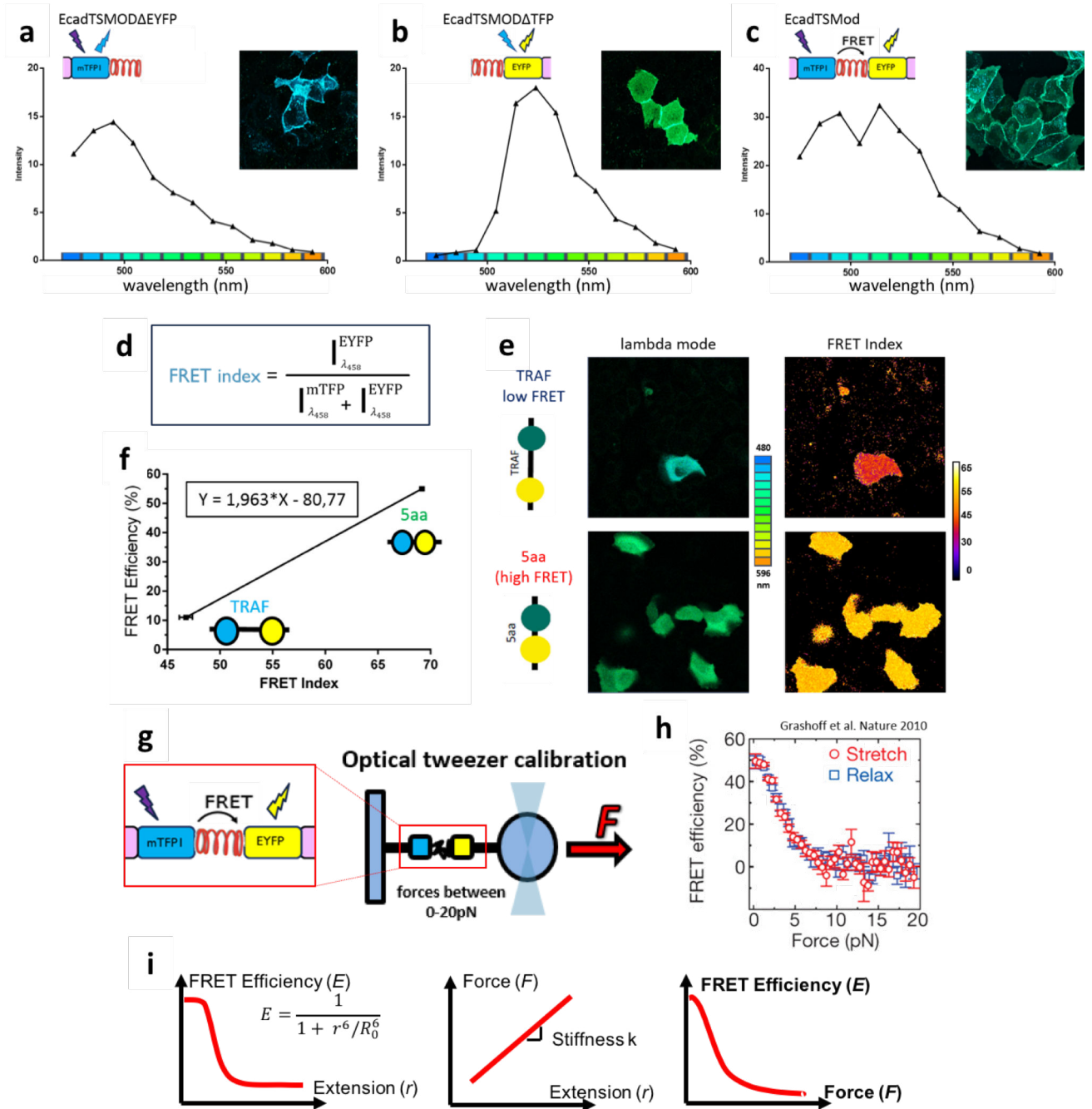


Figure II.4. Calibration du FRET de la construction TSMOD. (a-c) Le mode lambda correspond à la détection simultanée des longueurs d'ondes de 480 à 596 nm. On sait qu'à 480 nm, l'émission de YFP est négligeable devant mTFP (a, b). En connaissant la forme de la courbe d'émission de mTFP seul (a) et la valeur absolue de l'intensité d'émission à 480 nm en présence des deux fluorochromes (c), on peut inférer l'intensité d'émission de mTFP pour chaque longueur d'onde. L'intensité lumineuse restante est émise par YFP. (c, d) L'index FRET est calculé à partir de l'intensité de fluorescence des fluorochromes mTFP et YFP et il est proportionnel à l'efficacité de FRET E (e). Les kératinocytes HaCaT sont transfectés avec les constructions TRAF ou Saa dont l'efficacité de FRET est de 11 et 55%, respectivement. (f) Après avoir calculé leurs indices FRET, on détermine la fonction affine entre l'efficacité de FRET E et l'index FRET des kératinocytes HaCaT et avec l'objectif 40x du microscope. (g) Le TSMOD est construit d'un peptide aux l'extrémités duquel on place les fluorochromes mTFP et YFP. Le peptide se comporte comme un ressort moléculaire, c'est-à-dire que son extension est proportionnelle à la force appliquée. (h-j) Le peptide TSMOD est fixé au support par une extrémité et à une bille à l'autre extrémité. A l'aide d'une pince optique, on étire sur le TSMOD et on mesure la relation entre la force appliquée et l'efficacité de FRET E . (g, h, j) tirés de (Borghi et al., 2012; Grashoff et al., 2010).

2.4 Senseur de force E-cadhérine-TSMod et FRET

Le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) permet d'évaluer la proximité de deux fluorochromes (Periasamy, 2001). Pour cela, on illumine l'échantillon avec la longueur d'onde d'excitation d'un fluorochrome donneur. En se désexcitant, le fluorochrome donneur libère un photon de la longueur d'onde d'excitation du fluorochrome accepteur. Plus les deux fluorochromes sont proches, plus la probabilité que l'accepteur capte un photon émis par le donneur est grande et plus l'efficacité de FRET est élevée. L'efficacité de FRET dépend directement de la distance entre les fluorochromes. Dans notre construction, le donneur FRET est le fluorochrome mTFP (monomeric Teal Fluorescent Protein) et l'accepteur est YFP (Yellow Fluorescent Protein). Au microscope, on veut mesurer l'index FRET qui correspond à la fraction de YFP excités par rapport à l'ensemble des fluorochromes excités. Cependant, les longueurs d'onde d'émission de YFP et de mTFP se superposent (Fig. II.4. a-c). Pour mesurer les contributions respectives des deux fluorochromes, on utilise le mode spectral ou mode lambda du microscope. Le mode lambda du microscope permet d'enregistrer l'intensité de 13 longueurs d'ondes échelonnées entre 480 et 596 nm. Ce mode permet de mesurer l'intensité lumineuse en fonction de la longueur d'onde d'émission des fluorochromes mTFP et YFP séparément et excité avec leur longueur d'onde d'excitation respective (Fig. II.4. a-c). A 480 nm, l'intensité YFP est négligeable devant celle de mTFP. Quand les fluorochromes sont combinés pour mesurer un transfert d'énergie FRET, seul mTFP contribue à l'intensité lumineuse à 480 nm (Fig. II.4. a,b). En connaissant la valeur absolue de l'intensité à 480 nm, on peut calculer la contribution de mTFP et en déduire la contribution de YFP pour chaque longueur d'onde. Ainsi, on peut mesurer l'index FRET qui correspond à la fraction de YFP excité sur l'ensemble des fluorochrome excités (Fig. II.4. d). L'index FRET est proportionnel à l'efficacité de FRET. Pour déterminer la relation entre l'index FRET et l'efficacité de FRET de kératinocytes HaCaT observés avec l'objectif 40x du microscope on utilise les constructions TRAF et 5aa. TRAF et 5aa sont des constructions protéiques dont la distance entre les fluorochromes mTFP et YFP est parfaitement connue et dont on peut calculer l'efficacité de FRET à 11% et 55%, respectivement (Fig. II.4. i). En mesurant, l'index FRET des constructions TRAF et 5aa, on détermine la fonction affine qui donne l'efficacité de FRET à partir de l'index FRET (Fig. II.4. e,f).

La construction TSMod est un senseur de force qui repose sur le transfert d'énergie FRET. Entre les deux fluorochromes de FRET, on place le peptide (GPGGA)₈ qui se comporte comme un ressort moléculaire : son extension est directement proportionnelle à la force avec laquelle il est étiré (Fig. II.4. g). En fixant TSMod entre le support et une bille optique, on peut mesurer la relation entre l'efficacité de FRET et la force appliquée (Fig. II.4. h).

2.5 Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

Pour les expériences de FRAP, une zone circulaire de 59 pixels (soit 4 µm) de diamètre est photo-blanchie par 30 cycles successifs d'illumination avec la puissance du laser Argon réglée au maximum. Une image est enregistrée toutes les secondes. 10 images sont enregistrées avant l'acquisition et 400 images sont enregistrées immédiatement après. Pour l'analyse des résultats, nous avons édité une macro ImageJ qui mesure le rapport d'intensité entre la zone photo-blanchie et une zone non photo-blanchie à chaque acquisition. Cette analyse ratiométrique permet d'éliminer le photo-blanchiment inhérent à l'illumination de l'échantillon toutes les secondes. Dans un second temps, le rapport d'intensité est normalisé pour être égal à 1 sur la dernière acquisition avant le photo-blanchiment et

égal à 0 sur la première image après le photo-blanchiment. Après photo-blanchiment les courbes sont ajustée par une double exponentielle.

3 Analyse d'images

3.1 Champ de vitesse

3.1.1 Particle Image Velocimetry (PIV)

La Vélocimétrie par images de particules (PIV ; Particle Image Velocimetry) est une méthode d'analyse d'image utilisée pour l'étude de la dynamique des fluides. Elle permet de détecter et d'analyser qualitativement et quantitativement le champ de vitesse d'un ensemble en mouvement enregistré sur deux images successives. Cette technique a été adaptée à l'étude des mouvements collectifs de cellules (Pawar et al., 2014; Poujade et al., 2007; Raffel et al., 1998; Supatto et al., 2005). Pour les analyses de PIV, nous avons utilisé l'algorithme MatPIV 1.6.1 de l'environnement de programmation Matlab (MathWorks) (Sveen and Cowen, 2004). Pour la PIV, on utilise les séquences de photos de microscopie à contraste de phase.

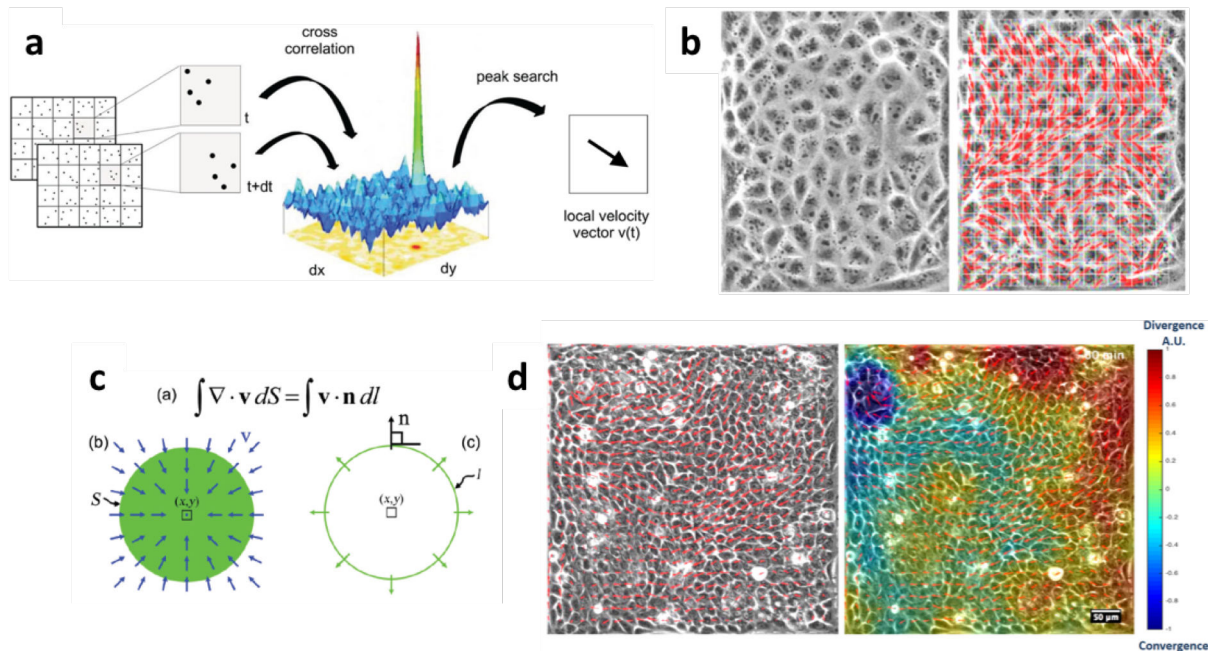


Figure II.5. Particle Image Velocimetry (PIV) et Divergence. (a) Principe de l'analyse de PIV. On fait une corrélation croisée de deux fenêtres d'interrogation aux temps t et $t+dt$. Pour chaque translation (dx, dy) entre les fenêtres d'interrogation, on obtient un coefficient de corrélation. Quand la translation est équivalente au déplacement de l'objet, le coefficient de corrélation atteint un maximum. En connaissant l'intervalle de temps dt entre deux images, on peut en déduire le vecteur vitesse $v(t)$ local des cellules. Adapté de (Pawar et al., 2014). (b) Cellules épithéliales de rein de chien (MDCK) en culture. Les fenêtres d'interrogation sont en blanc et les vecteurs vitesse sont en rouge. Courtoisie d'Estelle Gauquelin. (c) Principe de l'analyse de la divergence du champ de vitesse. Tiré de (Zehnder et al., 2015). (d) Kératinocytes humain (HaCaT) en culture. Les flèches rouges représentent le champ de vitesse. A droite, un champ de vitesse localement divergent est coloré en rouge et un champ de vitesse localement convergent est coloré en bleu. Tiré des résultats expérimentaux de la thèse.

Le principe de la PIV repose sur la corrélation croisée de deux photos consécutives enregistrées aux temps t et $t+dt$ (Fig. II.5. a, b). Les deux images sont découpées en fenêtres d'interrogation carrées de dl pixels de côté. On fait une corrélation croisée entre une fenêtre d'interrogation au temps t et au temps $t+dt$. Pour chaque translation (dx, dy) entre ces deux fenêtres d'interrogation, on mesure un coefficient de corrélation. On fait de même pour toutes les translations possibles en x et en y . Quand la translation est la même que le déplacement physique de l'objet entre les temps t et $t+dt$, le coefficient de corrélation atteint un maximum. En connaissant la durée de l'intervalle de temps dt , on peut déterminer le vecteur vitesse $v(t)$ de l'objet.

Le logiciel de PIV permet de calculer le champ de vitesse d'une monocouche de cellules au cours du temps (Fig. II.5. b). On peut faire varier plusieurs paramètres en fonction de la question à laquelle on veut répondre. Par exemple, une fenêtre d'interrogation plus petite que la taille moyenne d'une cellule détectera les mouvements intracellulaires.

Nous avons utilisé une fenêtre d'interrogation de 64 pixels soit environ 40 microns. Avec ces paramètres, la fenêtre d'interrogation est de l'ordre de grandeur de deux à trois cellules et détecte les mouvements d'un groupe cellulaire. Pour augmenter la fidélité des résultats et le nombre de points, toutes les fenêtres d'interrogation se chevauchent de 50%.

3.1.2 Divergence du champ de vitesse

Munis du champ de vitesse des cellules calculé avec la PIV, nous avons étudié la divergence du champ de vitesse des cellules. En collaboration avec Grégoire Peyret et Marc-Antoine Fardin, nous avons transcrit dans l'environnement de programmation MatLab une méthode précédemment publiée (Zehnder et al., 2015).

Schématiquement, on définit un cercle de diamètre D et d'aire S que l'on place sur le champ de vecteur vitesse (Fig. II.5. c). On mesure la composante radiale et tangentielle de chaque vecteur inclus dans le disque virtuel et on attribue une valeur de divergence locale en fonction de l'orientation des vecteurs. Si l'ensemble des vecteurs pointent vers le centre du disque, le mouvement est convergent et la valeur attribuée est -1. Si l'ensemble des vecteurs pointent à l'opposé du centre du disque, le mouvement est divergent et la valeur attribuée est 1. Si l'ensemble des vecteurs sont tangents au disque ou si les vecteurs convergents compensent les vecteurs divergents (flux laminaire), la valeur attribuée est 0. Pour plus de détails, le lecteur est invité à se référer à l'article suivant (Zehnder et al., 2015). Nous avons essayé plusieurs diamètres D pour le cercle. Un diamètre de 50 pixels (environ 32 microns) permet d'obtenir des résultats satisfaisants de divergence du champ de vecteurs vitesse obtenu par PIV.

Pour chaque couple d'images successives, on obtient un champ de vitesses et un champ de divergence des vitesses. La divergence donne des résultats sous forme d'une image dont chaque pixel correspond à une fenêtre d'interrogation de PIV. Pour obtenir des images de divergence de même dimension que les images de cellules (Fig. II.5. d), nous avons appliqué une interpolation bicubique.

3.2 Segmentation

3.2.1 Segmentation à partir des images en contraste de phase

Nous avons développé une méthode de segmentation des images de cellules en contraste de phase avec le logiciel ImageJ. Après quelques mois, un logiciel de segmentation utilisant une méthode similaire a été publié par le laboratoire du professeur Eaton (Etournay et al., 2016). Nous avons utilisé majoritairement ce logiciel nommé TissueMiner pour segmenter des cellules sur des images en contraste de phase (Fig. II.6. a).

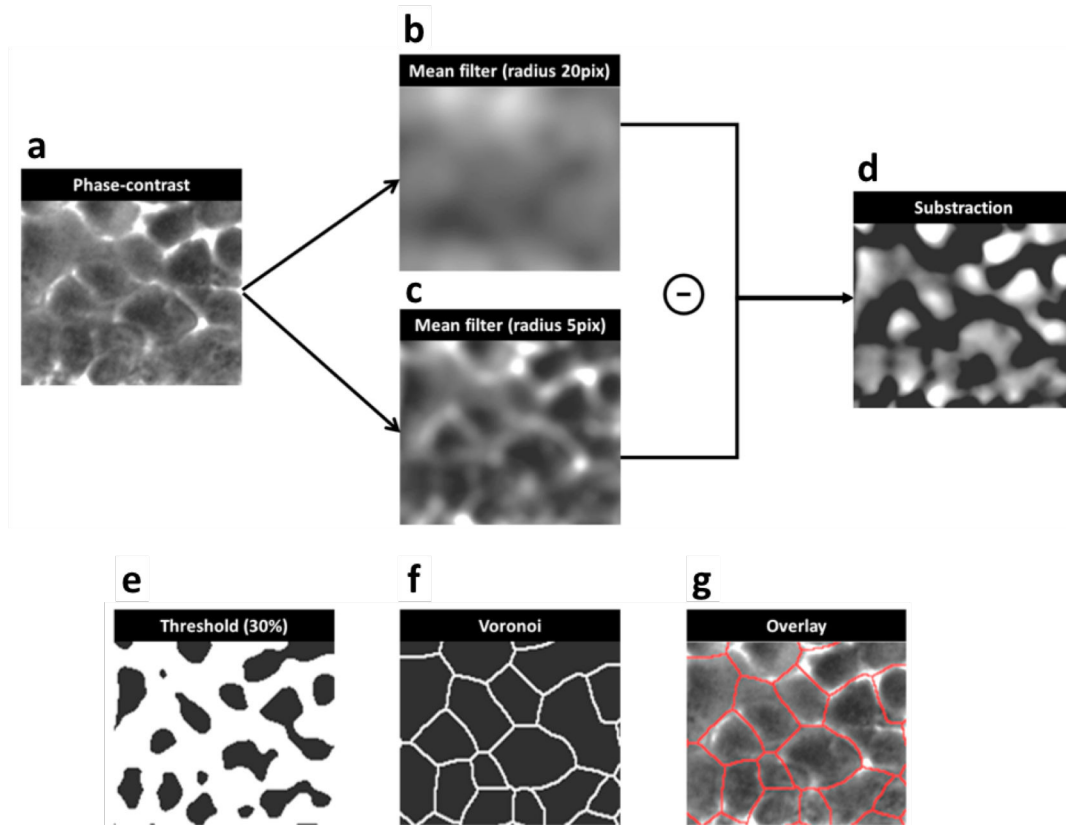


Figure II.6. Segmentation d'images en contraste de phase de monocouche cellulaire. Une image de cellule HaCaT en contraste de phase (a) est lissée par un filtre moyen large (b) ou étroit (c). La soustraction des images filtrées (d) et l'application d'un masque (e) individualise un objet par corps cellulaire. Après avoir filtré les petits objets, les bords des cellules (f) sont extrapolés en utilisant la fonction « Voronoi » d'ImageJ. La superposition (g) de l'image en contraste de phase et de la segmentation permet d'apprécier l'efficacité de la méthode.

D'une part (1), l'image en contraste de phase des cellules est lissée par un filtre moyen dont le rayon est de l'ordre de grandeur de la taille d'une cellule (environ 20 pixels). Un filtre moyen remplace la valeur de chaque pixel par la valeur moyenne des pixels de son entourage (« Filters > Mean »). L'entourage peut concerner les voisins du premier rang (1 pixel) ou ceux des 10 premiers rangs (20 pixels) (Fig. II.6. b). D'autre part (2), la même image est lissée par un filtre moyen dont le rayon est de l'ordre de grandeur de l'épaisseur des contacts cellule-cellule (environ 5 pixels) (Fig. II.6. c). La soustraction de l'image (1) par l'image (2) donne une nouvelle image (3) dans laquelle les corps cellulaires sont représentés par des pixels de valeur non-nulle (Fig. II.6. d). Après avoir appliqué un seuil d'intensité (Threshold) sur l'image (3), on peut individualiser un « objet » par cellule en utilisant la fonction « Watershed » d'ImageJ (Fig. II.6. e). Enfin, on peut interpoler la forme et l'aire des cellules

en utilisant la fonction « Voronoi » (Fig. II.6. f). La superposition de l'image en contraste de phase et de l'image de segmentation permet d'évaluer l'efficacité de la méthode (Fig. II.6. g).

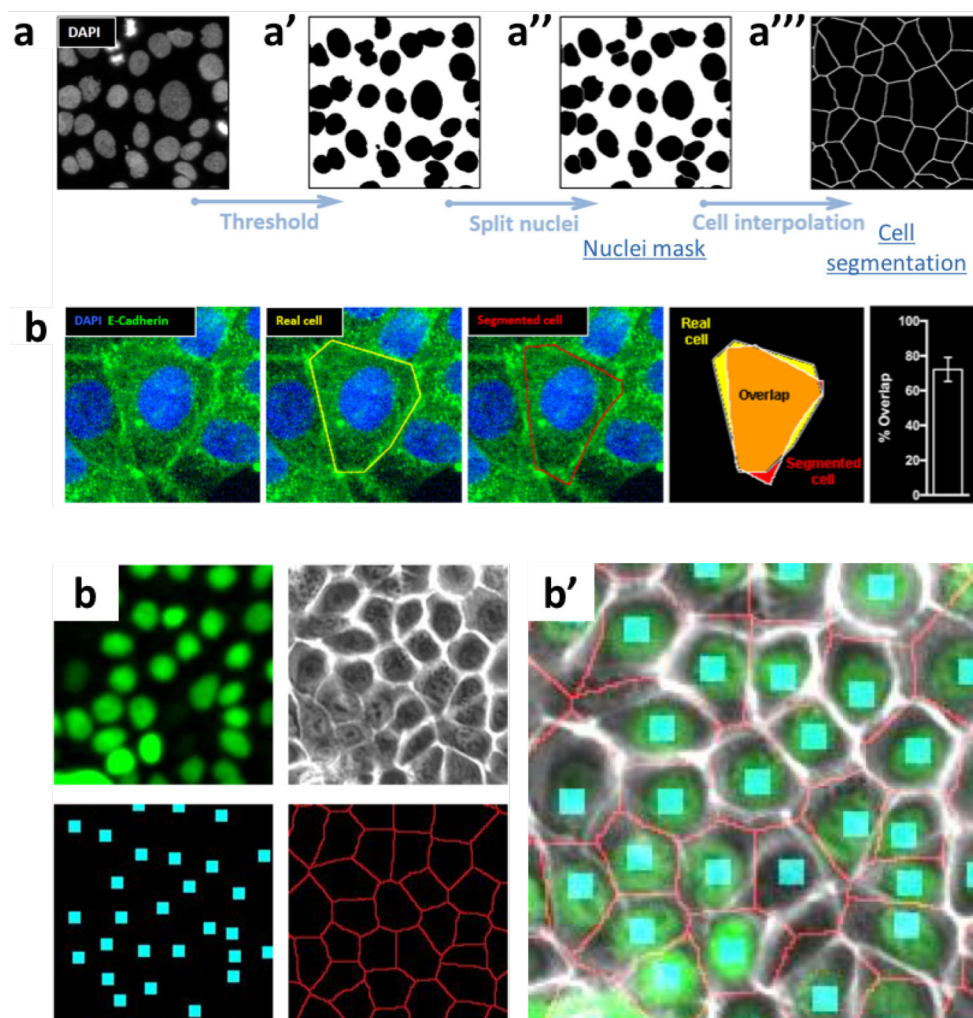


Figure II.7. Segmentation à partir de la fluorescence des noyaux. (a) Méthode de segmentation par seuil d'intensité. Les contrastes et la qualité de l'image de fluorescence des noyaux est d'abord optimisée (a) puis on réalise un seuil d'intensité pour créer un masque binaire (a'). Les noyaux sont individualisés par « Watershed » et filtrés en taille (a''). Le « Voronoi » permet d'extrapoler les bords des cellules (a'''). (b) Analyse du recouvrement entre la forme réelle des cellules et la forme extrapolée par la segmentation. En jaune, le tracé de la forme réelle de la cellule marquée pour la E-cadhérine (vert). En rouge, le tracé des bords détectés par la méthode de segmentation. (c) Méthode de segmentation par détection de pic d'intensité. Les noyaux des cellules HaCaT sont marqués par l'expression de l'histone H2B-GFP (vert). Chaque noyau est détecté par la fonction « Find Maxima » d'ImageJ et marqué d'un point bleu. Les bords des cellules sont extrapolés avec la fonction « Voronoi » d'ImageJ (rouge). (c') Superposition de l'image en contraste de phase des cellules (gris), du marquage nucléaire (vert), de la détection des noyaux (bleu) et des bords extrapolés (rouge).

3.2.2 Segmentation à partir de la fluorescence des noyaux

La segmentation à partir de la fluorescence des noyaux est aisée car on peut facilement extraire un « objet » par cellule. Après avoir traité les contrastes et l'intensité des images de fluorescence nucléaire, soit (1) on applique un seuil d'intensité (fonction *Threshold* d'ImageJ) afin que chaque objet puisse être superposée à un noyau, soit (2) on fait une détection de pic d'intensité avec la fonction

Find Maxima d'ImageJ. Dans un second temps, on utilise les fonctions *Watershed* et *Voronoi* pour extrapoler les bords des cellules.

Pour les images de cellule fixées et marquées au DAPI, nous avons utilisé le seuillage d'intensité (1) pour détecter au mieux la forme des noyaux (*Threshold*) (Fig. II.7. a). Cette méthode est très efficace pour étudier l'aire de la cellule et l'intensité d'une protéine dans le cytoplasme. En effet, on trouve environ 75% de chevauchement entre la cellule détectée et la cellule réelle marquées pour l'E-cadhérine (Fig. II.7. b).

$$\text{Chevauchement} = \frac{\text{Réelle} \cup \text{Segmentée}}{\text{Réelle} \cap \text{Segmentée}}$$

Pour la segmentation des cellules au cours du temps, on utilise la fluorescence de l'Histone H2B qui marque les noyaux (Fig. II.7. b). La fluorescence des noyaux est variable entre les cellules et au cours du temps et dans ce cas, la méthode par détection d'un pic d'intensité est meilleure (*Find Maxima*). De plus, cette méthode permet de minimiser les erreurs sur un grand nombre d'acquisitions. Chaque noyau détecté est enregistré sous la forme d'un objet dont la taille et la forme sont invariables. Après avoir segmenté l'image on peut suivre une cellule au cours du temps (données non montrées). Sur l'image au temps t , on choisit une particule et on détermine les coordonnées de son centre de masse (x, y) . Sur l'image au temps $t+dt$, on détecte la particule qui couvre le pixel de coordonnée (x, y) . Cette méthode de suivi est simple mais donne de bons résultats.

3.2.3 Segmentation manuelle

Pour l'analyse de la localisation de Yap-GFP, nous avons besoin d'avoir l'aire et la forme précise de la cellule et des noyaux. Nous avons donc détourné manuellement le corps cellulaire et les noyaux des cellules transfectées avec Yap-GFP. Les cellules choisies sont représentatives.

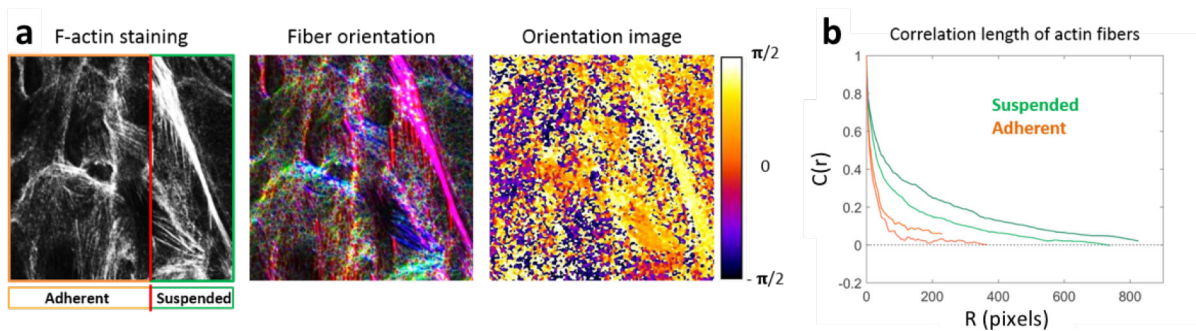


Figure II.8. Mesure de l'orientation et estimation de la longueur des fibres d'actine. (a) Détection de l'orientation locale des filaments d'actine à l'aide du plugin OrientationJ d'ImageJ. **(b)** Mesure de la longueur de corrélation à partir de l'image d'orientation où chaque pixel a la valeur d'un angle.

3.3 Estimation de la longueur des filaments d'actine d'un réseau enchevêtré

Pour mesurer relativement la longueur des filaments d'actine, on utilise le plugin OrientationJ d'ImageJ développé par Daniel Sage (Püspöki et al., 2016). En utilisant la détection d'un gradient gaussien dans une fenêtre d'interrogation de 1 pixel, le plugin mesure une valeur d'angle pour chaque pixel de l'image (Fig. II.8. a). Quand il n'y a pas de fibre d'actine, la valeur d'angle du pixel est

déterminée par le bruit. Sur une fibre d'actine rectiligne tous les pixels ont la même valeur d'angle. En utilisant l'environnement de programmation Matlab, on mesure la longueur de corrélation des angles (Fig. II.8. b). En d'autres termes, on analyse les images où les pixels ont la valeur d'un angle. On calcule la corrélation entre la valeur d'un pixel et celle de ses plus proches voisins $C(1)$. On calcule ensuite la corrélation entre ce même pixel et les voisins des rangs supérieurs. La corrélation $C(r)$ décroît avec la distance des voisins r . Cette analyse est itérée sur tous les pixels de l'image. En absence de fibre, la corrélation $C(r)$ décroît très rapidement avec la distance r . En revanche, la présence de fibre diminue la vitesse de décroissance des fibres d'actine. La longueur de corrélation est mesurée de façon indépendante sur des images de cellules suspendues puis sur des images de cellules adhérentes.

3.4 Microscopie à force de traction (TFM)

3.4.1 Forces de traction

Pour mesurer les forces de traction, nous avons utilisé un algorithme adapté par Grégoire Peyret et Estelle Gauquelin (doctorants au sein de l'équipe) (Martiel et al., 2015; Wang and Lin, 2007).

Pour de meilleurs résultats, on enregistre 3 images des billes à chaque acquisition : 1 image au plan focal des billes et 1 image à 2 μm au-dessus et en-dessous de ce plan focal. A la fin de l'expérience, les cellules sont détruites par ajout de 500 μL de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) dilué à 10% dans le milieu de culture. Après quelques minutes, les cellules sont complètement détachées et le substrat est relaxé. On enregistre alors une image de référence du substrat sans cellule.

Pour chaque point de temps, les images des 3 plans focaux sont moyennées. On obtient la séquence d'images des billes du substrat pendant l'expérience. La dernière image de cette séquence correspond au substrat de référence sans cellule. Les séquences d'images sont alignées avec une précision infra-pixellaire à l'aide du plugin ImageJ *Template Matching and Slice Alignment* (Tseng et al., 2012). On utilise ensuite la fonction *Auto Local Threshold* d'ImageJ pour optimiser les contrastes.

Pour analyser le déplacement local des billes, on utilise l'algorithme de PIV *matPIV 1.6.1*. Ici, l'algorithme mesure le déplacement local des billes par rapport à l'image de référence du substrat. La fenêtre d'interrogation que nous avons choisie est de 48 pixels (soit 30 microns). Pour chaque fenêtre d'interrogation, on obtient le déplacement des billes par rapport aux deux dimensions de l'image (X , Y). La superposition entre deux fenêtres d'interrogation consécutives est de 50%.

Les résultats sont des fichiers textes du déplacement des billes. Ils sont convertis en forces dans les deux dimensions de l'image (F_x , F_y) par le plugin ImageJ « FTTC_ » (Tseng et al., 2012). L'application d'une force ponctuelle déforme le substrat élastique sur une zone de rayon R . Le plugin « FTTC_ » déconvolue le déplacement des billes pour extraire les forces appliquées localement. Les paramètres du plugin FTTC sont le facteur de régularisation λ fixé par défaut à 10^{-10} , le module élastique du substrat en Pa, la taille du pixel et le coefficient de Poisson fixé par défaut à 0,5. On peut calculer la magnitude de la force F_{mag} avec la formule suivante.

$$F_{mag} = \sqrt{F_x^2 + F_y^2}$$

3.4.2 Méthode d'Inférence Bayésienne des Contraintes (BISM)

En collaboration avec plusieurs membres de l'équipe (J. d'Alessandro, G. Peyret et E. Gauquelin) et avec l'équipe de P. Marcq (Nier et al., 2016; Saw et al., 2017), nous avons calculé les contraintes locales au sein de la monocouche de cellule à partir des forces de traction des cellules sur le substrat (TFM) en utilisant la méthode d'inférence bayésienne des contraintes (BISM; Bayesian Inference Stress Method). Cette méthode n'est pas dépendante de la rhéologie du tissu. Pour plus d'informations, nous invitons le lecteur à lire l'article suivant (Nier et al., 2016).

3.5 Mesure de la localisation de Yap

Le rapport nucléo-cytoplasmique (RNC) de YAP est défini par la moyenne d'intensité par pixel de Yap dans le noyau sur la moyenne d'intensité par pixel de Yap dans le cytoplasme. La localisation est définie comme suit (Table II.6.).

Localisation	RNC de Yap
Nucléaire	>1.05
Nucléaire et Cytoplasmique	≤ 1.05 et ≥ 0.95
Cytoplasmique	<0.95

Table II.6. Localisation nucléaire de Yap en fonction du rapport nucléo-cytoplasmique (RNC).

3.6 Analyses statistiques

On utilise GraphPad Prism 6 pour les analyses statistiques. Pour les analyses qualitatives (localisation de YAP, index réplicatif et index mitotique) nous avons utilisé le test du χ^2 . Pour les analyses statistiques semi-quantitatives, nous avons utilisé les tests non-paramétriques de Mann-Whitney (comparaison des intensités). Pour les analyses de corrélation et de régression linéaire, nous avons utilisé la méthode de Spearman. Pour les analyses de recouvrement après photo-blanchiment (FRAP), les courbes sont approximées par une double exponentielle. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

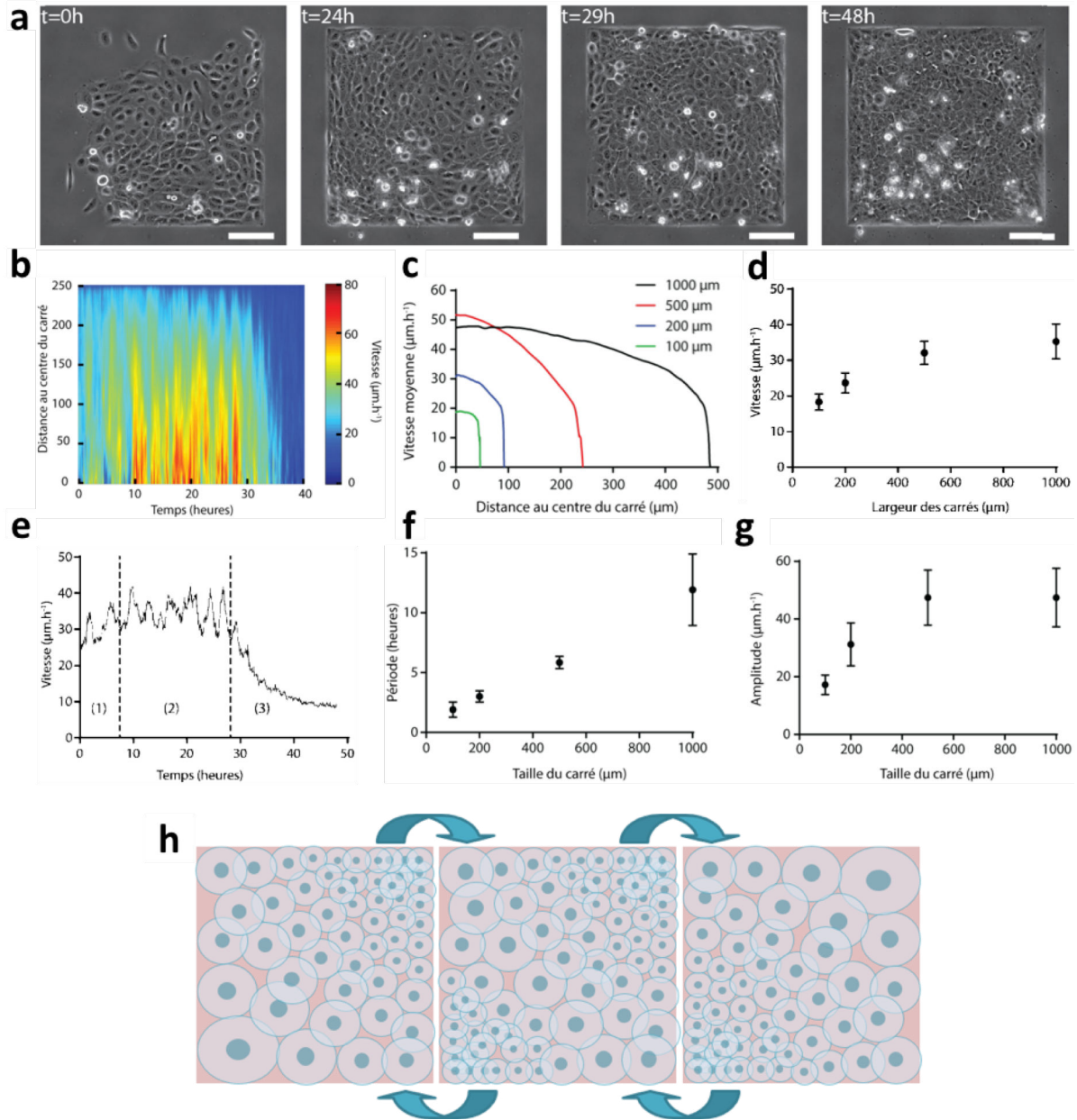
CHAPITRE III : RESULTATS – PREMIERE PARTIE

1 Rôle de la migration épithéliale, de l'étalement cellulaire et des forces aux contacts cellule-substrat sur la régulation de Yap

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au rôle de l'étalement cellulaire, des forces de traction sur le substrat et des contraintes mécaniques au sein de la monocouche sur la régulation de Yap pendant la migration épithéliale.

En effet, d'une part, l'étalement d'une cellule est corrélée aux forces de traction qu'elle exerce sur son support (Rape et al., 2011; Reinhart-King et al., 2003; Saez et al., 2010; Tan et al., 2003; Wang et al., 2002). D'autre part, la régulation de Yap répond à l'étalement d'une cellule sur le substrat mais aussi à la densité cellulaire en partie grâce à l'engagement de contacts cellule-cellule (Aragona et al., 2013; Dupont et al., 2011; Zhao et al., 2007).

Pour étudier l'effet de ces paramètres sur la régulation de Yap au cours de la migration épithéliale, nous avonsensemencé une monocouche de kératinocytes HaCaT en confinement sur des motifs de fibronectine carrés de 500 μm de côté. Après quelques heures en culture, les cellules adoptent un mouvement collectif oscillant (Thèse de Doctorat de Grégoire Peyret). Dans ce modèle, l'étalement des cellules et les forces de traction sur le substrat oscillent avec le tissu ce qui permet d'évaluer leurs contributions respectives pour la régulation de Yap pendant la migration épithéliale.



1.1 Les mouvements collectifs oscillants de kératinocytes en confinement

Ces mouvements collectifs oscillants ont été étudiés par Grégoire Peyret au cours de sa thèse (article en préparation). Un autre modèle d'oscillations de cellules épithéliales MDCK en confinement a récemment été publié par une autre équipe (Notbohm et al., 2016). Dans ce paragraphe, nous présentons brièvement les résultats obtenus par le Dr. Peyret et nécessaires à la compréhension du modèle d'étude.

Les kératinocytes HaCaT sont étalés sur des motifs carrés de fibronectine de 500 et 1000 μm de côté à une densité de 1000 à 1500 cellules par mm^2 . Après l'étalement complet, les cellules forment un groupe cohésif de cellules sur chaque motif de fibronectine (Fig. III.1 a). Au cours du temps, les kératinocytes se divisent et la densité cellulaire augmente. La durée du cycle cellulaire des kératinocytes HaCaT est d'environ 20 d'heures (Boukamp et al., 1988). Pour étudier la migration des kératinocytes en confinement, on utilise l'analyse de Vélocimétrie par images de particules (PIV) (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes).

On observe un gradient de vitesse de migration tel qu'au centre du motif de fibronectine la vitesse est maximale alors qu'elle est nulle aux bords (Fig. III.1. b, c). La vitesse moyenne de migration augmente avec la taille du confinement avant d'atteindre un maximum de 35 $\mu\text{m}/\text{h}$ pour les carrés de 500 et 1000 μm de côté (Fig. III.1. c, d). En analysant la vitesse des cellules au centre du motif de fibronectine, on distingue 3 phases de migration (Fig. III.1 e). La phase pré-confluente commence dès que les cellules sont étalées et engagent des contacts cellule-cellule. A ce stade, la densité cellulaire est légèrement inférieure à la densité de confluence ; le motif de fibronectine n'est pas recouvert par des cellules sur toute sa surface. La vitesse de migration de la monocouche augmente progressivement. La phase confluyente commence dès que les cellules recouvrent l'ensemble du patron de fibronectine. C'est pendant cette phase que les cellules adoptent un comportement migratoire oscillant. Elles se déplacent périodiquement d'un bord à l'autre du motif de fibronectine ce qui se traduit par les oscillations des composantes du vecteur vitesse mesurées au centre de la monocouche. La phase confluyente dure environ 20 heures. La phase sur-confluente succède à la phase confluyente. La densité cellulaire a doublé, les oscillations périodiques s'arrêtent et la vitesse des cellules diminue progressivement. On décrit ces phases de migration collective quand les kératinocytes sontensemencés sur une surface de fibronectine carrée de 100, 200, 500 et 1000 μm de côté.

Pour décrire les oscillations migratoires de la phase confluyente, G. Peyret a étudié le déplacement des cellules au centre du carré. La période des oscillations augmente linéairement avec la taille du carré et sans saturation (Fig. III.1 f). Entre les confinements de 500 et 1000 μm , la période est multipliée par 2 ($T_{500\mu\text{m}}=6\text{h}$ et $T_{1000\mu\text{m}}=12\text{h}$) (Fig. III.1 f). L'amplitude des oscillations augmente avec la taille du confinement avant d'atteindre un plateau quand la taille du motif de fibronectine dépasse 500 μm de côté. Ainsi pour les carrés de 500 et 1000 μm , l'amplitude maximale est d'environ 45 $\mu\text{m}/\text{h}$ (Fig. III.1 g). Grâce aux oscillations du tissu, la densité des cellules est variable au sein de la monocouche à chaque instant. De plus, l'aire d'étalement d'une cellule subit des cycles d'expansion et de contraction au cours du temps (Fig. III.1. h).

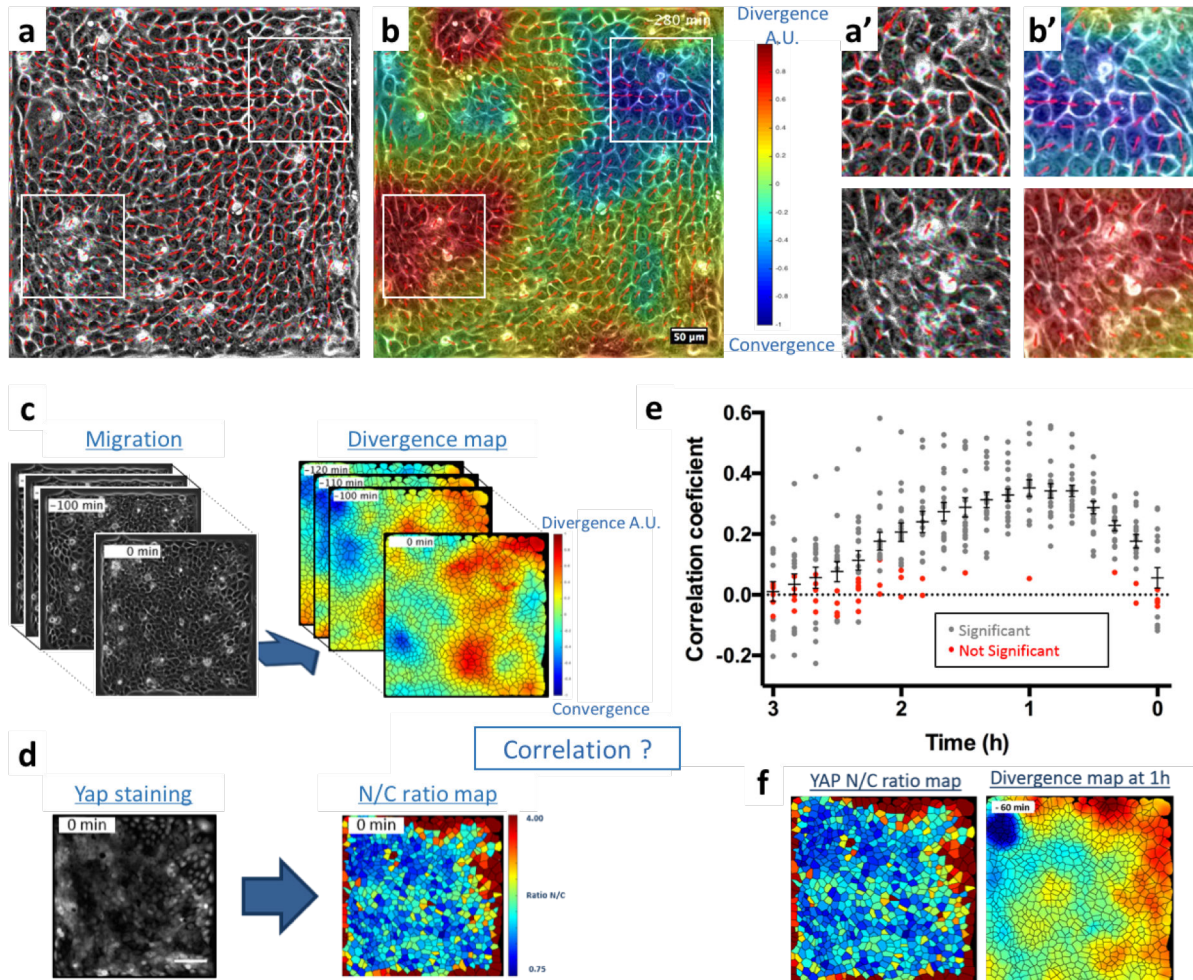


Figure III.2. La migration convergente et divergente permet de prédire la régulation de Yap avec 1 heure d'avance. (a) Superposition de l'image en contraste de phase de kératinocytes confiné dans un carré de fibronectine de 500 µm et du champ des vecteurs vitesse (rouge). (b) Superposition de l'image (a) et de la divergence du champ de vitesse. (a', b') Gros plans des images (a,b) illustrant des zones de divergence (bas) ou de convergence (haut) du champ de vitesse. (c) Pour n acquisitions en contraste de phase, on obtient $n-1$ cartes de divergence du vecteur vitesse. (d) A la sortie du microscope les échantillons sont fixés et immunomarké pour Yap. On segmente automatiquement les cellules et on obtient une valeur de RNC pour chaque cellule. (e) Corrélation de Pearson entre le RNC de Yap à la fin de l'expérience et la divergence de la migration à chaque acquisition. Chaque point représente 1 carré de cellules sur 2 expériences indépendantes. (f) Cartes de couleur du RNC de Yap et de la divergence de la migration 1h avant la fixation des cellules.

1.2 La régulation de Yap au cours de mouvements collectifs

La migration d'une monocouche épithéliale induit des variations de l'aire d'étalement des cellules (Guirao et al., 2015; Notbohm et al., 2016; Zehnder et al., 2015). Pour comprendre comment la migration des kératinocytes en confinement régule l'aire d'étalement des cellules, nous avons utilisé un outil d'analyse d'image qui permet de détecter les régions où la migration est localement convergente ou divergente (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes et (Zehnder et al., 2015)). A partir du champ de vecteur vitesse détecté par l'algorithme de PIV (Fig. III.2 a), on peut détecter des mouvements convergents et divergents (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes). Pendant la phase de migration oscillante, on distingue des zones où la migration est localement convergente et des zones où la migration est localement divergente (Fig. III.2 b).

Pour comprendre la dynamique de régulation de Yap par la migration épithéliale, nous avons mesuré la corrélation entre la régulation de Yap à la fin de l'expérience et la divergence de la migration en amont. Pour cela, nous avons enregistré la migration des kératinocytes en confinement toutes les 10 minutes pendant 3 heures, soit 19 acquisitions. L'échantillon est ensuite fixé avant la fin de la phase oscillante, dès la sortie du microscope, puis immunomarcqué pour Yap. En utilisant la segmentation des images à partir des noyaux (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes), nous avons extrait automatiquement le rapport nucléo-cytoplasmique (RNC) de Yap de chaque cellule (Fig. III.3. d). Après la segmentation, chaque cellule est définie par une région d'intérêt. On mesure la divergence moyenne au sein de cette région d'intérêt pour les 18 acquisitions en amont de la fixation des cellules (Fig. III.3. c). Pour chaque cellule segmentée, on obtient une valeur de RNC de Yap et 18 valeurs de divergence qui décrivent le comportement migratoire local pendant 3 heures avant la fixation. Enfin, on mesure la corrélation entre le RNC de Yap et la divergence locale à chaque acquisition de l'ensemble des cellules (Fig. III.3. e). On obtient un pic de corrélation entre le RNC de Yap et la divergence 60 minutes avant la fixation. Pour confirmer visuellement ce résultat, nous avons construit deux cartes dont le code couleur représente le RNC de Yap où la valeur de divergence 60 minutes avant la fixation (Fig. III.3. f). Les zones où la migration est divergente 60 minutes avant la fixation sont bien corrélées avec les zones où le RNC de Yap est élevé (en rouge). En retour, les zones de migration convergente sont corrélées aux zones où le RNC de Yap est faible. On obtient des résultats similaires avec des kératinocytes ensemencés sur des carrés de fibronectine de 500 et de 1000 μm de côté (données non montrées). De façon complémentaire, on note que le RNC de Yap dans cellules au bord du carré est plus élevé que dans les cellules au centre de la monocouche (Fig. III.2. d, f).

Ces résultats démontrent que lors des mouvements collectifs des kératinocytes en confinement, l'accumulation nucléaire de Yap peut être prédite par des événements antérieurs de divergence locale, avec un délai de 60 minutes. En contrepartie, la localisation cytoplasmique de Yap peut être prédite par des événements antérieurs de convergence locale, avec un délai de 60 minutes. Les modes de migration divergents et convergents sont respectivement associés à l'augmentation et à la diminution de l'aire d'étalement des cellules (Zehnder et al., 2015). La densité cellulaire locale est inversement proportionnelle à l'aire d'étalement d'une cellule au sein d'une monocouche. Par conséquent, les modes de migration divergents et convergents diminuent et augmentent la densité cellulaire locale, respectivement. Ces résultats suggèrent que la localisation de Yap pourrait être contrôlée par l'aire d'étalement des cellules ou par la densité cellulaire locale.

1.3 La localisation nucléaire de Yap est corrélée à l'étalement cellulaire

Une grande aire d'étalement est associée à la localisation nucléaire de Yap pour des cellules isolées (Dupont et al., 2011). Pour explorer le rôle de l'étalement sur la régulation de Yap dans une monocouche de cellule, nous avons fixé les kératinocytes pendant les oscillations du tissu et co-marqué la protéine Yap et les noyaux des cellules (Fig. III.3. a). Grâce à la segmentation automatique à partir des noyaux (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes), nous avons extrait automatiquement l'aire et le RNC de Yap de chaque cellule. Le rapport nucléo-cytoplasmique (RNC) de Yap est faible dans les zones où la densité cellulaire est importante et où l'aire d'étalement est grande (Fig. III.3. a). Plus l'aire d'étalement d'une cellule est grande, plus le RNC de Yap est élevé sans effet de seuil (Fig. III.3. b). On obtient des résultats similaires pour des kératinocytes étalés sur des carrés de 500 et de 1000 μm (données non montrées).

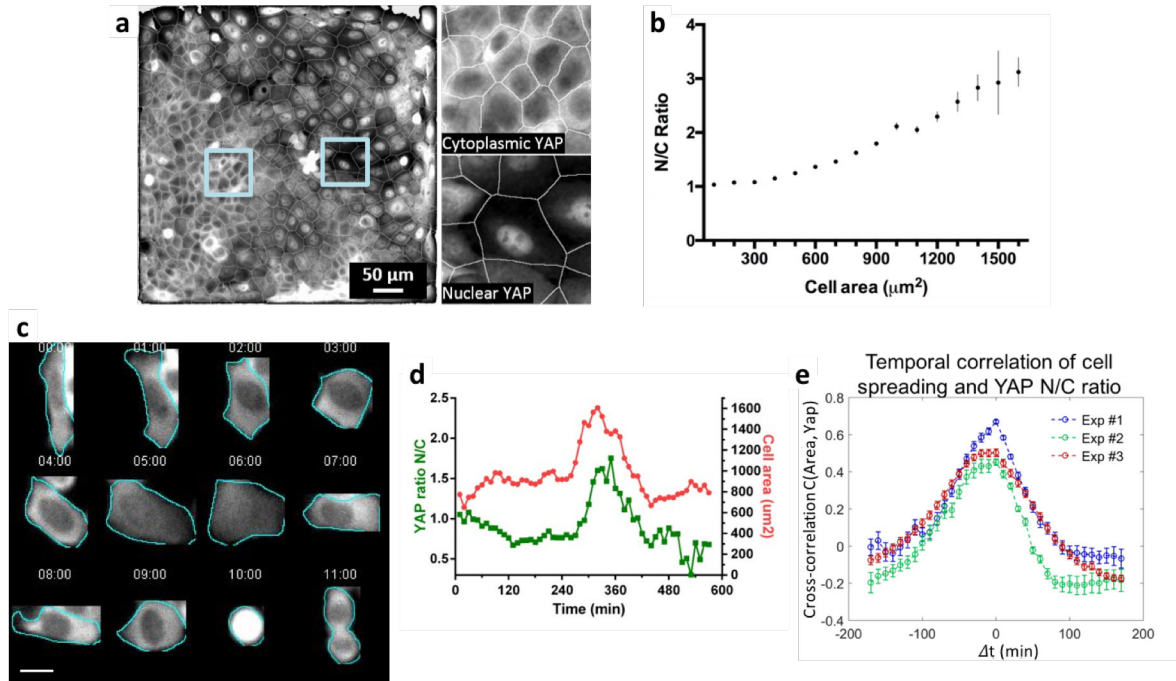


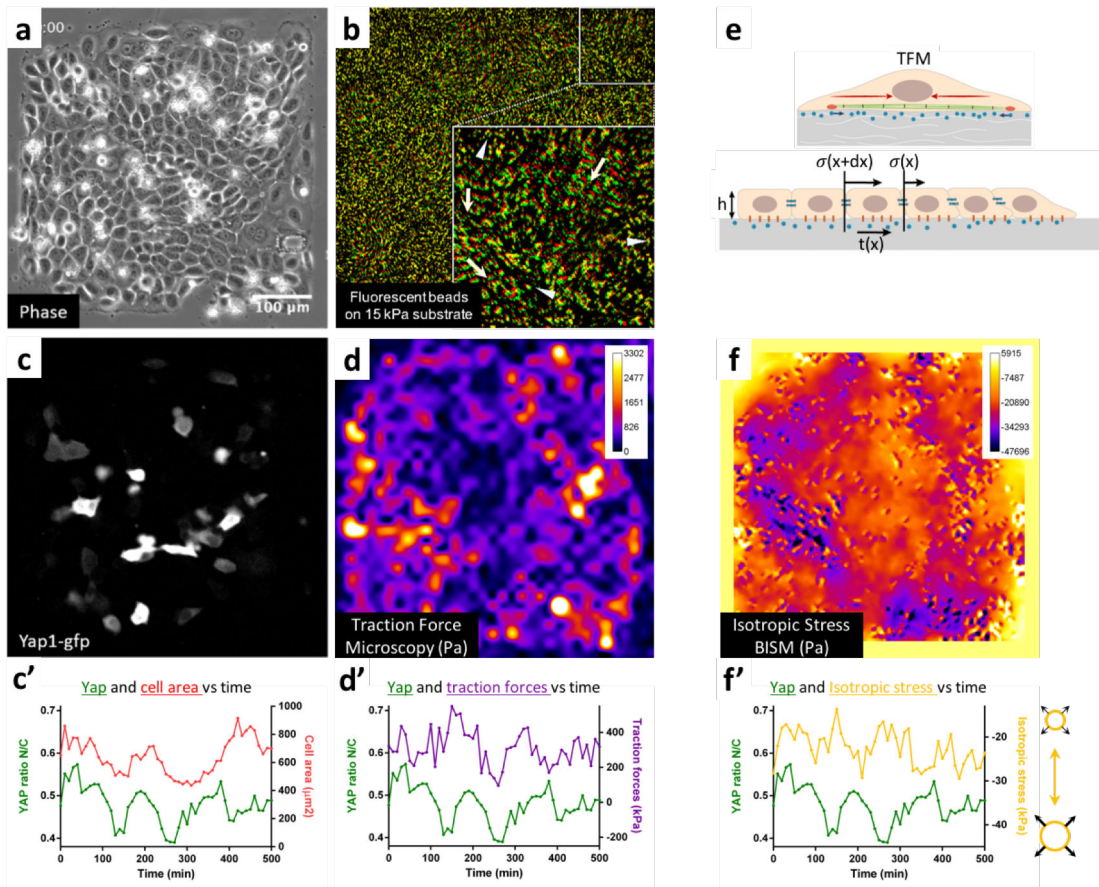
Figure III.3. La relocalisation nucléaire de Yap est corrélée à l'aire d'étalement des cellules d'une monocouche. (a) Immunomarquage de Yap de cellules cultivées sur un carré de fibronectine de 500 µm de côté et fixées pendant la phase oscillante. On note que l'étalement des cellules est dépendant de la densité locale de la monocouche. Les bords des cellules (en blanc) sont obtenus par segmentation automatique à partir des noyaux (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes). A droite, les zooms illustrent la localisation de Yap dans des zones localement dense ou non (cytoplasmic Yap et nuclear Yap, respectivement). **(b)** Rapport nucléocytoplasmique de Yap en fonction de l'aire d'étalement des cellules. **(c)** Yap-GFP au cours du temps (heures:minutes) pendant les oscillations. Barre d'échelle : 20 µm **(d)** Le rapport nucléocytoplasmique de Yap et l'aire d'étalement d'une cellule représentative au cours du temps. **(e)** Corrélation croisée de l'aire d'étalement et du rapport nucléocytoplasmique de Yap de 24 cellules réparties sur 3 expériences indépendantes.

Le délai nécessaire à la régulation d'une protéine permet d'évaluer si le mécanisme de régulation est post-traductionnel (quelques minutes) ou s'il nécessite de changer l'expression des gènes (quelques heures). Pour estimer la dynamique de la régulation de Yap par l'étalement cellulaire, nous avons mesuré simultanément l'aire d'étalement et le RNC de Yap-GFP de kératinocytes HaCaT vivants (Fig. III.3. c, d). La surexpression d'une protéine dans les cellules peut être modérément toxique (Kim and Eberwine, 2010). Pour l'analyse des résultats, nous n'avons considéré que les cellules viables pendant toute la durée de l'expérience et capables de faire au moins une mitose. Grâce aux oscillations du tissu, l'étalement des cellules est variable et l'augmentation de l'aire d'étalement des cellules s'accompagne de l'augmentation du RNC de Yap-GFP (Fig. III.3. c). Pour mesurer le délai entre la variation de l'aire d'étalement et la variation du RNC, on mesure la corrélation croisée de l'aire et du RNC de Yap en fonction du temps. Pour cela, on décale une courbe par rapport l'autre dans la dimension temporelle et à chaque décalage on mesure un coefficient de corrélation. La corrélation croisée entre les courbes d'aire et de RNC atteint un maximum quand le décalage temporel est nul (Fig. III.3. e). On peut conclure que la régulation de Yap par l'étalement des cellules est un processus rapide dont la dynamique est inférieure à l'intervalle entre 2 acquisitions, c'est-à-dire 10 minutes.

Ensemble, ces résultats démontrent que la régulation de la localisation de Yap par l'aire d'étalement de la cellule est similaire pour des cellules individuelles ou au sein d'un tissu. De plus, le pic d'accumulation nucléaire de Yap par l'étalement est décalé de moins de 10 minutes du pic d'étalement de la cellule, suggérant que la localisation de Yap est contrôlée par l'étalement de la

cellule via un mécanisme post-traductionnel. En conclusion, les mouvements collectifs des kératinocytes régulent la localisation de Yap *via* l'étalement cellulaire. Dans ce modèle, l'engagement des contacts cellule-cellule permet l'organisation des mouvements collectifs oscillants (Thèse de Doctorat de Grégoire Peyret).

On peut maintenant expliquer les résultats précédents : pendant les phases de divergence, l'aire d'étalement des kératinocytes est augmentée en 60 minutes par la migration cellulaire collective et entraîne une rapide relocalisation nucléaire de Yap. De façon réciproque, pendant les phases de convergence, l'aire d'étalement est diminuée en 60 minutes par la migration cellulaire collective et entraîne la relocalisation cytoplasmique de Yap.



1.4 La régulation de Yap par les forces de traction et les contraintes mécaniques

Nous venons de montrer que dans une monocouche épithéliale en mouvement, la localisation de Yap est corrélée avec l'étalement des cellules. L'aire d'étalement de cellules individuelles est corrélée aux forces de tractions sur le substrat (Dupont et al., 2011; Rape et al., 2011; Reinhart-King et al., 2003; Saez et al., 2010; Tan et al., 2003; Wang et al., 2002). Au sein d'un épithélium en migration, une cellule exerce des forces de traction sur le substrat mais aussi sur ses voisines via les contacts intercellulaires (Anon et al., 2012; Borghi et al., 2012; Serra-Picamal et al., 2012).

Pour examiner le rôle des forces de tractions sur la régulation de la localisation de Yap lors des mouvements collectifs, nous avons cultivé des kératinocytes HaCaT exprimant transitoirement Yap-GFP en confinement carré et sur un substrat de TFM (Fig. III.4. a-c) (cf. Matériel et Méthodes). En mesurant le déplacement des billes du substrat de TFM et en connaissant son élasticité, on peut mesurer la magnitude des forces de traction (Fig. III.4. d). En segmentant manuellement le contour des cellules et du noyau, on peut mesurer simultanément le RNC de Yap-GFP, l'aire d'étalement et les forces de traction sous une cellule (Fig. III.4 c', d'). Sur un substrat de TFM de 15 kPa, les variations du RNC de Yap sont corrélées¹ avec les variations de l'aire d'étalement des cellules, avec un délai inférieur à 10 minutes (Fig. III.4 c') ce qui est en accord avec les résultats obtenus préalablement sur un substrat de PDMS d'environ 2 MPa (Fig. III.3. d, e).

De plus, les variations du RNC de Yap sont corrélées avec les variations des forces de traction des cellules sur le substrat (Fig. III.4 d'). L'augmentation et la diminution des forces de tractions précèdent l'augmentation et la diminution du RNC de Yap, respectivement, avec un délai qui reste à préciser. En conclusion, l'augmentation des contraintes générées par un épithélium en mouvement augmente les forces de traction exercées par les cellules au travers des contacts cellule-substrat ce qui entraîne la localisation nucléaire de Yap. En retour, la diminution des forces de traction via les contacts cellule-substrat est associée à la localisation cytoplasmique de Yap.

Ensemble, ces résultats montrent que le RNC de Yap d'une cellule est corrélé à la fois à son aire d'étalement mais aussi aux forces de traction qu'elle exerce sur le substrat.

Un épithélium en migration génère des contraintes qui sont transmises de proche en proche par les cellules à l'échelle du tissu (Serra-Picamal et al., 2012). Ces contraintes s'appliquent à la fois sur l'actomyosine des cellules ce qui est associé à la localisation nucléaire de Yap (Benham-Pyle et al., 2015; Dupont et al., 2011) mais aussi sur les contacts intercellulaires ce qui est associé à la localisation cytoplasmique de Yap (Bazellères et al., 2015; Hirata et al., 2017). Brièvement, dans un modèle à une dimension, la force de traction sur le substrat $t(x)$ correspond au produit de la hauteur de la monocouche h et de la dérivée spatiale des contraintes $\sigma(x)$ (Fig. III.4. e) (Notbohm et al., 2016) :

$$t(x) = h \times \frac{\sigma(x + dx) - \sigma(x)}{dx}$$

¹ Notons que les résultats suivants sont en cours d'analyse au moment de la rédaction de ces lignes. Faute de temps, nous montrons les données préliminaires qui devront être analysées plus en détail et éventuellement confirmées en répétant l'expérience.

En connaissant les forces de traction sur le substrat et en considérant la hauteur de la monocouche constante, on peut extraire les contraintes générées au sein du tissu. Pour étudier les contributions relatives des contraintes sur l'actomyosine et des contraintes sur les jonctions intercellulaires sur la régulation de Yap, nous avons mesuré les contraintes t_{xx} et t_{yy} dans les deux dimensions de la monocouche en utilisant la méthode d'inférence bayésienne des contraintes (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes) (Nier et al., 2016). Cette méthode permet de calculer les contraintes de pression isotrope dans la monocouche cellulaire directement à partir de la déformation du substrat TFM par les cellules. La contrainte de pression isotrope p est définie par la moitié de la trace du tenseur des contraintes :

$$p = -\frac{1}{2} \text{trace}(\sigma) = -\frac{1}{2} (\sigma_{xx} + \sigma_{yy})$$

Les contraintes de pression isotrope calculées au sein de la monocouche sont négatives indiquant que les cellules sont sous tension mécanique (Fig. III.4 f, f'). Bien que ces résultats soient encore préliminaires, les variations du RNC de Yap semblent négativement corrélées aux variations des contraintes de pression subies par une cellule (Fig. III.4 f'). Une diminution des contraintes d'étirement serait corrélée à la diminution du RNC de Yap (Fig. III.4 f'). En retour, une augmentation des contraintes d'étirement serait corrélée à l'augmentation du RNC de Yap.

Ensemble, ces résultats suggèrent que les contraintes d'étirement générées par les mouvements oscillants des kératinocytes en confinement sont associées à la localisation nucléaire de Yap. Ainsi, la contribution de mise en tension de l'actomyosine sur la localisation de Yap pourrait prédominer sur la contribution des forces aux contacts cellule-cellule.

En conclusion, pendant les mouvements collectifs oscillants des kératinocytes, l'augmentation de l'aire d'étalement d'une cellule, des forces de traction qu'elle génère sur le substrat et des contraintes d'étirement sont associées à la localisation nucléaire de Yap. En retour, la localisation cytoplasmique de Yap se succède à la diminution de l'aire d'étalement d'une cellule, des forces de traction ou des contraintes d'étirement. De façon intéressante, la mise en tension d'une cellule est associée à la localisation nucléaire de Yap en dépit de l'augmentation des forces sur les contacts cellule-cellule.

La localisation nucléaire de Yap est associée à l'entrée en phase S du cycle cellulaire ce qui suggère que la prolifération est régulée à la fois par l'étalement local, par les forces de traction sur le substrat et par les contraintes d'étirement de la monocouche pendant la migration épithéliale. De plus, la localisation nucléaire de Yap régule l'expression de nombreux gènes impliqués par exemple dans la migration cellulaire et les adhésions cellulaires. On peut spéculer que l'alternance de l'activation et de l'inhibition de Yap est associée à l'alternance des phases de migration divergente et convergente et aux oscillations périodiques de la monocouche en confinement.

1.5 Conclusions du chapitre et discussion

Dans cette partie, nous avons montré que les kératinocytes HaCaT cultivés en confinement sur des motifs carrés de fibronectine développent des mouvements collectifs oscillants. Nous avons découvert qu'au cours des oscillations, des groupes de cellules migrent localement de façon divergente puis convergente. De façon intéressante, la migration divergente (convergente) est corrélée à la localisation nucléaire (cytoplasmique) de Yap avec 60 minutes de délai. Ces mouvements divergents/convergents s'accompagnent de variations locales de l'aire d'étalement des cellules et de la localisation nucléaire/cytoplasmique de Yap. Une importante (faible) aire d'étalement est corrélée avec une rapide relocalisation nucléaire (cytoplasmique) de Yap. La régulation de Yap et de l'étalement des cellules n'est pas dépendant de la période des oscillations. En effet, en confinement de 500 ou 1000 μm , le délai obtenu entre la migration et la régulation de Yap est toujours de 60 minutes (données non montrées) alors que la période des oscillations est multipliée par 2. Nos données préliminaires suggèrent que la relocalisation nucléaire de Yap est associée aux forces transmises par les contacts cellule-substrat et aux contraintes d'étirement au sein de la monocouche. Ces résultats suggèrent que la régulation de la localisation nucléaire de Yap par les contraintes sur l'actomyosine et les forces de traction sur le substrat surpasse la contribution des forces aux contacts cellule-cellule. En conclusion, la régulation mécanique de Yap dans une monocouche de kératinocytes en confinement est associée à l'étalement des cellules, aux forces de traction sur le substrat et aux contraintes d'étirement à l'échelle du tissu.

En étirant le substrat de culture de cellules épithéliales adhérentes, Benham-Pyle et associés ont montré que la déformation de la monocouche par des forces exogènes entraîne la relocalisation nucléaire de Yap (Benham-Pyle et al., 2015). On peut spéculer que la déformation biaxiale du substrat étirable augmente de façon importante les forces sur les contacts cellule-substrat, les contraintes au sein de la monocouche mais aussi l'aire d'étalement des cellules. Ces forces sont probablement plus importantes que celle générées par les cellules dans un contexte physiologique. Notre étude a permis d'explorer la régulation de Yap par les forces de traction et par les contraintes interne du tissu, ce qui permet de mieux comprendre la régulation physiologique de Yap. De plus, nous avons examiné la régulation de Yap en fonction de données quantifiées sur l'aire d'étalement des cellules, sur l'amplitude des forces de traction et sur les contraintes générées au sein de la monocouche.

Pour tenter de montrer que les localisations nucléaire et cytoplasmique de Yap sont associées à la régulation de l'expression des gènes cibles du complexe Yap/TEAD, nous avons utilisé le rapporteur d'activité TBS-mCh (données non montrées) (Schlegelmilch et al., 2011). Cependant, l'expression de cette construction dans le modèle de kératinocytes en confinement, n'a pas permis d'observer de cycles d'activation et d'inhibition de l'activité transcriptionnelle de Yap associés à la localisation nucléaire et cytoplasmique de Yap. Il est probable qu'après transcription et traduction, le rapporteur d'activité mCh reste stable dans la cellule plus longtemps que la durée entre deux cycles de localisation nucléaire de Yap. Pour étudier les cycles d'activation de la transcription dépendante de Yap il faudrait, par exemple, utiliser une GFP déstabilisée (dGFP) dont la demi-vie dans la cellule est inférieure à 30 minutes (Li et al., 1998). Pour évaluer le rôle de la localisation nucléaire de Yap sur l'entrée dans le cycle cellulaire, nous avons mesuré l'index réplcatif des cellules par incorporation d'EdU pendant 15 minutes puis fixation des cellules. Avec cette méthode, nous n'avons pas pu montrer de corrélation entre l'incorporation d'EdU et l'aire d'étalement des cellules. En effet, il est probable que l'entrée en phase S après la relocalisation nucléaire de Yap ne soit pas immédiate (Benham-Pyle et al., 2015). Pour

étudier la dynamique de la régulation de la prolifération par la localisation nucléaire de Yap dans des cellules vivantes, il serait intéressant d'insérer un rapporteur fluorescent par CRISPR sur un marqueur endogène de prolifération comme par exemple les protéine Ki67, E2F ou certaines cyclines exprimées transitoirement pendant le cycle cellulaire (Hochegger et al., 2008; Ren et al., 2002).

Pour tester le rôle de l'alternance de l'activation et de l'inhibition de Yap sur les oscillations du tissu, il serait intéressant de réprimer l'expression de Yap par interférence à ARN. En effet, l'activation de Yap régule l'expression de nombreuses cibles dont certaines, comme Birc2, CTGF et Cyr61, régulent l'adhésion au substrat et l'invasion métastatique (Babic et al., 1998, 1999; Kireeva et al., 1996). De plus, la surexpression de TEAD-1, un facteur de transcription partenaire de Yap modifie la contractilité de cellules musculaires (Tsika et al., 2008). Pour ces raisons, l'activation de Yap dans un groupe de cellules largement étalées pourrait changer la mécanique locale du tissu, induire la migration convergente du groupe de cellule concerné et réduire l'aire d'étalement.

Nos résultats démontrent que les forces de traction transmises par les contacts cellule-substrat sont associées à la relocalisation mécanosensible de Yap dans le noyau. Sachant que les cellules sont cultivées sur de la fibronectine, il est très probable que ces contacts soient médiés par les récepteurs intégrines des adhésions focales (Kim and Gumbiner, 2015; Serrano et al., 2013). Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier la localisation de Yap et les forces de traction de kératinocytes cultivés en confinement sur un substrat de poly-L-lysine. En effet, l'adhésion des cellules à un substrat de poly-L-lysine ne dépend pas des intégrines (Bao and Strömblad, 2002). Cependant, cette méthode pourrait ne pas être compatible avec les mouvements collectifs oscillant des kératinocytes. Pour étudier le rôle des forces aux adhésions focales sur la régulation mécanique de Yap, on pourrait également évaluer la localisation nucléaire de Yap en fonction du nombre et de la maturité des adhésions focales en marquant par exemple la vinculine. Pour rappel, la vinculine est recrutée aux adhésions focales soumises à des forces (Yao et al., 2014a).

Pour comprendre les mécanismes moléculaires qui permettent la régulation mécanique de Yap, nos résultats suggèrent qu'il faut s'intéresser aux protéines régulatrices associées aux adhésions focales mais aussi aux jonctions adhérentes. Les adhésions focales sont des structures qui répondent à des contraintes mécanique par le dépliement de la taline et le recrutement mécanosensible de la vinculine (Hirata et al., 2014; Sarangi et al., 2017; Yao et al., 2014a). De plus, les kinases qui régulent les adhésions focales Src, FAK et ILK sont également associées à la localisation nucléaire de Yap en réponse à l'adhésion des cellules au substrat (Felsenfeld et al., 1999; Kim and Gumbiner, 2015; Kudryashova et al., 2016; Serrano et al., 2013; von Wichert et al., 2008). Il serait intéressant d'étudier si l'activité des kinases FAK et ILK est corrélée aux contraintes mécaniques sur les adhésions focales. Dans un second temps, il serait intéressant de déterminer les partenaires de liaison communs entre la taline/vinculine et les kinases FAK/ILK. Les partenaires de liaison communs pourraient permettre d'expliquer comment le changement de conformation de la taline ou le recrutement de la vinculine permet d'activer les kinases FAK et ILK en amont de la localisation nucléaire de Yap et de l'augmentation de la prolifération cellulaire.

Enfin, il serait intéressant d'évaluer le rôle de la voie Hippo dans la régulation mécanique de Yap par les forces de traction sur le substrat. Pour cela, nous pourrions évaluer le rôle des forces de traction sur la régulation de Yap de kératinocytes dont l'expression des protéines de la voie Hippo (Mst1/2, Lats1/2) a été réprimée. Nous pourrions également évaluer la phosphorylation inhibitrice de Yap par la voie Hippo sur le résidu S127 par immunomarquage.

CHAPITRE IV : RESULTATS – DEUXIEME PARTIE

2 Régulation de Yap dans une monocouche de kératinocytes suspendus dans un modèle de fermeture épithéliale

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les forces de traction sur le substrat et les contraintes au sein du tissu sont associées à la relocalisation nucléaire de Yap pendant les mouvements collectifs d'un tissu en confinement. Au contraire, les forces transmises par les jonctions adhérentes sont associées à la relocalisation cytoplasmique de Yap et à la CIP (Hirata et al., 2017; Kim et al., 2011; Schlegelmilch et al., 2011; Silvis et al., 2011). Dans un modèle de fermeture épithéliale non-adhérente, Vedula et associés ont montré que l'extension d'un feuillet cellulaire suspendu est impliquée dans l'établissement de contraintes d'étirement à l'échelle de quelques cellules (Vedula et al., 2015). Ces contraintes sont générées par la contractilité de l'actomyosine et transmises entre les cellules voisines par les jonctions intercellulaires. La contractilité de l'actomyosine est associée à la localisation nucléaire de Yap (Dupont et al., 2011; Valon et al., 2017) alors que l'absence de contacts cellule-substrat et le renforcement des jonctions cellule-cellule (Hirata et al., 2017; Kim and Gumbiner, 2015; Kim et al., 2011; Serrano et al., 2013) devraient conduire à la localisation cytoplasmique de Yap. A ce jour, les contributions relatives de la contractilité de l'actomyosine, des contacts cellule-substrat et des contacts cellule-cellule sur la régulation de la localisation de Yap restent inexplorées.

Dans ce chapitre, nous nous sommes donc intéressés aux rôles respectifs de la contractilité de l'actomyosine et du renforcement des jonctions cellule-cellule sur la régulation de Yap en absence de contacts cellule-substrat. Pour cela, nous avons étudié la localisation de Yap au cours de la fermeture non-adhérente.

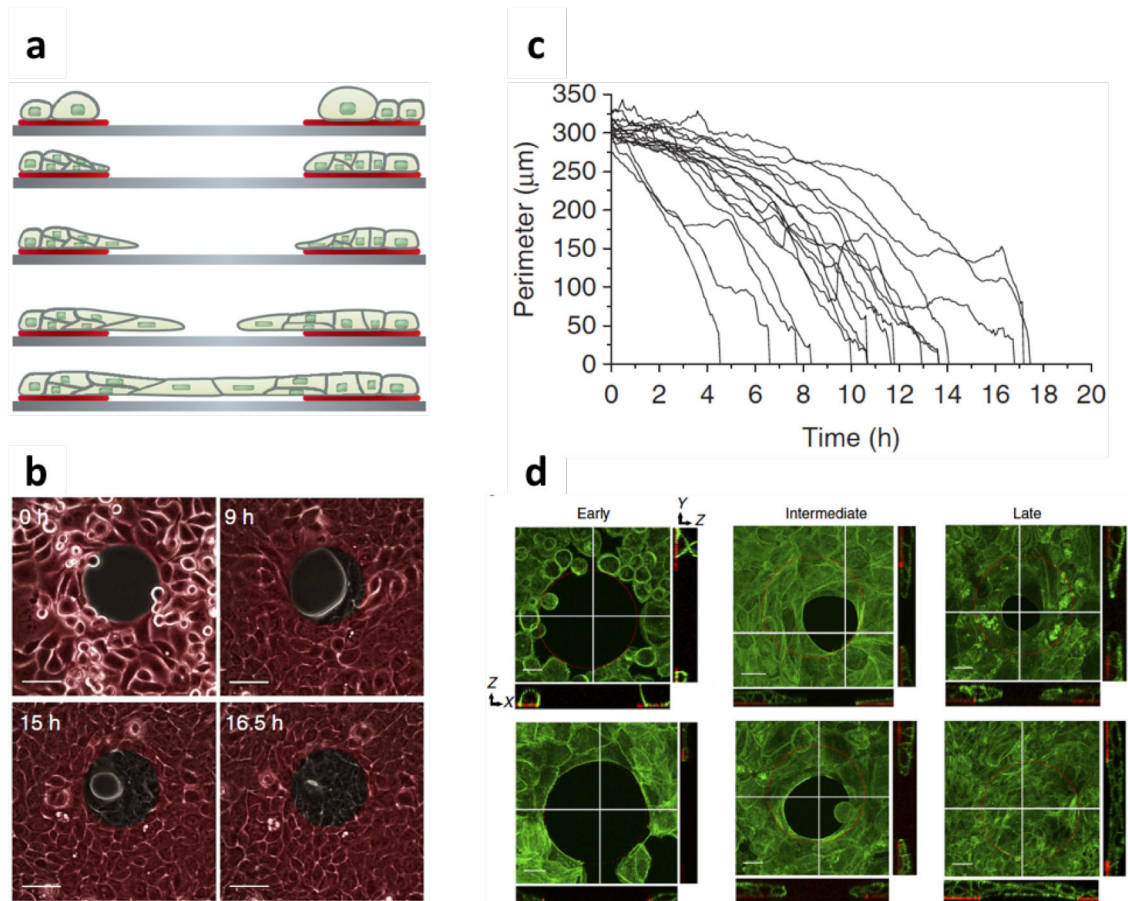


Figure IV.1. La fermeture d'un trou non-adhérent par les kératinocytes HaCaT en confinement. (a, b) Schéma en coupe et image en contraste de phase de la fermeture non-adhérente par les kératinocytes HaCaT. Les kératinocytes sont étalés sur un substrat de fibronectine (en rouge) comportant un trou circulaire de 100 μm de diamètre. **(c)** La dynamique de fermeture des trous non adhérents. L'ensemble des trous non adhérents sont fermé après 20h en culture. **(d)** Pendant la fermeture non-adhérente, les cellules organisent un câble d'actine (en vert) multicellulaire autour du trou. La contraction du câble permet la fermeture du trou. Tiré de (Vedula et al., 2015). Barre d'échelle, (b) 50 μm , (d) 20 μm .

2.1 La fermeture en cordon de bourse de trous non-adhérents

Le modèle de fermeture d'une surface non-adhérente a été développé au sein de l'équipe dans le but d'étudier la fermeture épithéliale en cordon de bourse (Vedula et al., 2015). Dans ce paragraphe, nous décrivons les résultats obtenus précédemment et qui permettent de comprendre le modèle d'étude.

Les kératinocytes humains HaCaT sont ensemencés à confluence sur un carré de fibronectine de 900 μm de côté comportant, en son centre, un trou circulaire non-adhérent de 100 μm de diamètre (Fig. IV.1. a, b). Quelques heures après avoir atteint la confluence, les kératinocytes organisent un câble multicellulaire d'actomyosine contractile autour du trou. La contraction du câble permet la fermeture en cordon de bourse par un feuillet de kératinocytes suspendus (Fig. IV.1. b-c).

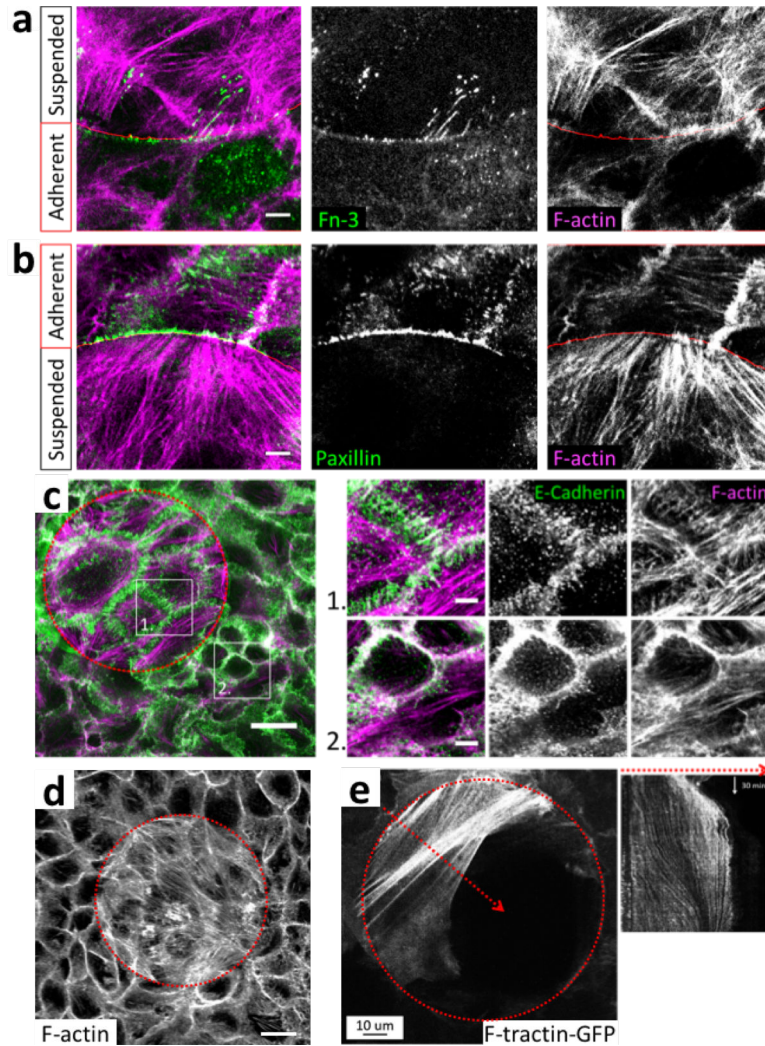


Figure IV.2. La réorganisation de l'actine et des jonctions adhérentes en absence de contacts cellule-substrat. (a) La fibronectine cellulaire Fn3 (vert) et l'actine F (magenta) à la face ventrale des kératinocytes HaCaT. La fibronectine est déposée sur le substrat adhérent. De rares agrégats de Fn3 se forment dans le trou non-adhérent. Au bord du trou (rouge), Fn3 est co-localisée avec les extrémités des fibrilles d'actine. Dans le trou, il n'y a pas de co-localisation entre l'extrémité des fibrilles d'actine et Fn3. Barre d'échelle 5 μm. (b) La paxilline (vert) et l'actine F (magenta) à la face ventrale des kératinocytes HaCaT. La paxilline est co-localisée avec l'extrémité des fibres d'actine. La paxilline se localise sur la surface adhérente et se concentre au bord du trou non-adhérent (rouge). Il n'y a pas de paxilline en regard des cellules suspendues. Barre d'échelle 5 μm. (c) La E-cadherine (vert) des cellules adhérentes s'organise de façon linéaire au jonctions intercellulaires. Les jonctions des cellules suspendues se réorganisent en *doigts de cadherine* co-localisés avec des fibres d'actine F (magenta). Barres d'échelle : à gauche 20 μm, à droite 5 μm. (d) L'actine F des cellules adhérentes se localise au cortex et dans les fibres de stress ventrales. Après fermeture complète, l'actine F des cellules suspendues se réorganise en longues fibres ancrées de part et d'autre du trou non-adhérent. Barre d'échelle 20 μm. (e) A gauche : les kératinocytes de la lignée HaCaT F-tractine-GFP pendant la fermeture du trou non adhérent. A droite : le kymographe au long de la flèche rouge montre un flux d'actine du bord vers le centre du trou.

2.2 La réorganisation des adhésions focales, des jonctions adhérentes et de l'actine en absence de contacts cellule-substrat

Avant d'examiner la localisation de Yap en absence de contact cellule-substrat, nous nous sommes intéressés à l'organisation des adhésions focales, des jonctions adhérentes et de l'actine. En effet, la localisation nucléaire de Yap est associée à l'engagement de forces sur les contacts cellule-substrat, à l'organisation fibrillaire de l'actine et aux contraintes mécaniques soutenues par l'actomyosine (cf.

Chapitre III) (Kim and Gumbiner, 2015; Serrano et al., 2013). En contrepartie, les contraintes soutenues par les jonctions adhérentes aux contacts cellule-cellule provoquent la localisation cytoplasmique de Yap (Hirata et al., 2017).

Pour s'assurer que les cellules suspendues n'engagent pas de contacts avec le substrat pendant la fermeture sur surface non-adhérente, nous avons observé au microscope confocal le co-marquage de la fibronectine cellulaire (Fn3) et de l'actine F de kératinocytes fixés 38 heures après l'ensemencement sur le motif de fibronectine. En effet, les kératinocytes sont capables de synthétiser et de sécréter la fibronectine de la MEC (O'Keefe et al., 1985, 1987). L'anticorps anti-Fn3 reconnaît la fibronectine cellulaire mais ne reconnaît pas la fibronectine plasmatique du motif micro-imprimé. Des agrégats de Fn3 sont déposés à la partie basale des cellules adhérentes (Fig. IV.2. a). De rares agrégats de fibronectine sont aussi déposés à la face ventrale des cellules suspendues ; cependant, il est peu probable que ces agrégats permettent l'adhésion des cellules car la Fn3 n'est pas co-localisée avec les filaments d'actine (Fig. IV.2. a). En effet, les fibrilles de fibronectine déposées par les cellules épithéliales s'orientent généralement parallèlement aux fibres de stress d'actine (Tiwari et al., 2016). Il est très probable que les agrégats de Fn3 soient intégrés dans des vésicules intracellulaires apposées à la face ventrale des cellules. Nous avons aussi réalisé des immunomarquages de paxilline, marqueur des adhésions focales. La paxilline est absente de la face ventrale des cellules non-adhérente (Fig. IV.2. b). Cependant, les adhésions focales se densifient au bord du trou, sur le motif de fibronectine, où s'ancrent les fibres de stress des cellules suspendues. Les autres adhésions focales se distribuent aux extrémités des fibres de stress ventrales des cellules adhérentes.

Les kératinocytes du feuillet suspendu sont cohésifs entre eux mais n'engagent donc pas de contacts avec le substrat. Pour étudier l'organisation des jonctions adhérentes dans la monocouche de cellules suspendues, nous avons marqué la E-cadhérine. La E-cadhérine des cellules adhérentes co-localise avec l'actine corticale aux contacts intercellulaires (Fig. IV.2. c). Les contacts intercellulaires des cellules adhérentes sont linéaires. Les contacts des cellules suspendues sont réorganisés en digitations perpendiculaires à la limite cellule-cellule (Fig. IV.2. c). Le marquage E-cadhérine est renforcé dans ces digitations que nous désignerons « *doigts de cadhérine* » en référence à des structures semblables décrites pendant la formation d'une jonction entre deux kératinocytes ou aux jonctions de cellules endothéliales en migration (Hayer et al., 2016; Vasioukhin et al., 2000). Ces structures en *doigts de cadhérine* co-localisent avec les extrémités des câbles d'actine de deux cellules voisines (Fig. IV.2. c).

Les adhésions focales et les jonctions adhérentes sont des structures d'adhésion cellulaire qui permettent l'ancrage des filaments d'actine (Kanchanawong et al., 2010; Simpson et al., 2011). La fermeture épithéliale non-adhérente induit la réorganisation des complexes d'adhésion et sollicite l'actomyosine. Pour étudier l'organisation des fibres d'actine des cellules suspendues, nous avons marqué l'actine F de cellules fixées après la fermeture épithéliale. L'actine F des cellules adhérentes est organisée en fibres de stress ventrales et en réseau cortical aux contacts intercellulaires (Fig. IV.2. c, d). Après la fermeture non-adhérente, le cortex d'actine des cellules suspendues n'est pas détectable aux contacts cellule-cellule (Fig. IV.2. d). Cependant, l'actine ventrale des cellules suspendues s'organise en longues fibres multicellulaires d'un bord à l'autre du trou. Les fibres d'actine ont une organisation continue à l'échelle de 2 à 4 cellules (Fig. IV.2. c, d). L'actine F à la face ventrale des cellules suspendues s'organise à l'échelle multicellulaire en un réseau enchevêtré. Un réseau d'actine F similaire s'organise à la face dorsale de la monocouche (données non montrées). Entre ces

deux réseaux, le plan médian des cellules renferme les noyaux et l'actine F est absente ou faiblement marquée aux jonctions intercellulaire (données non montrées).

Pour étudier la dynamique de l'actine pendant la fermeture en cordon de bourse, nous avons utilisé une lignée de kératinocytes HaCaT exprimant la F-tractine-GFP, un marqueur de l'actine F (Belin et al., 2014). Pour des raisons techniques, nous nous sommes concentrés sur l'étude du réseau d'actine ventral des cellules suspendues (Fig. IV.2. d, e). En effet, le réseau d'actine ventral s'organise parallèlement au plan du substrat ce qui en simplifie l'observation. Au contraire, le réseau d'actine dorsal est incliné par rapport au plan du substrat.

Nous avons observé que les fibres d'actine s'organisent parallèlement au bord libre des cellules suspendues (Fig. IV.2. e). Pour représenter la dynamique de l'actine au cours du temps, nous avons réalisé un kymographe de F-tractine-GFP (Fig. IV.2. e). Au cours du temps, un flux de fibres d'actine se met en place depuis le bord et vers le centre du trou (Fig. IV.2. e). Ce flux antérograde enrichit le câble d'actomyosine dont la contraction permet la progression de la fermeture en cordon de bourse.

En conclusion, après la fermeture du trou non-adhérent, des câbles d'actine s'organisent à l'échelle de quelques cellules et sont ancrés sur la fibronectine au bord du trou non-adhérent par de nombreuses adhésions focales. Aux jonctions intercellulaires, les extrémités des câbles d'actomyosine

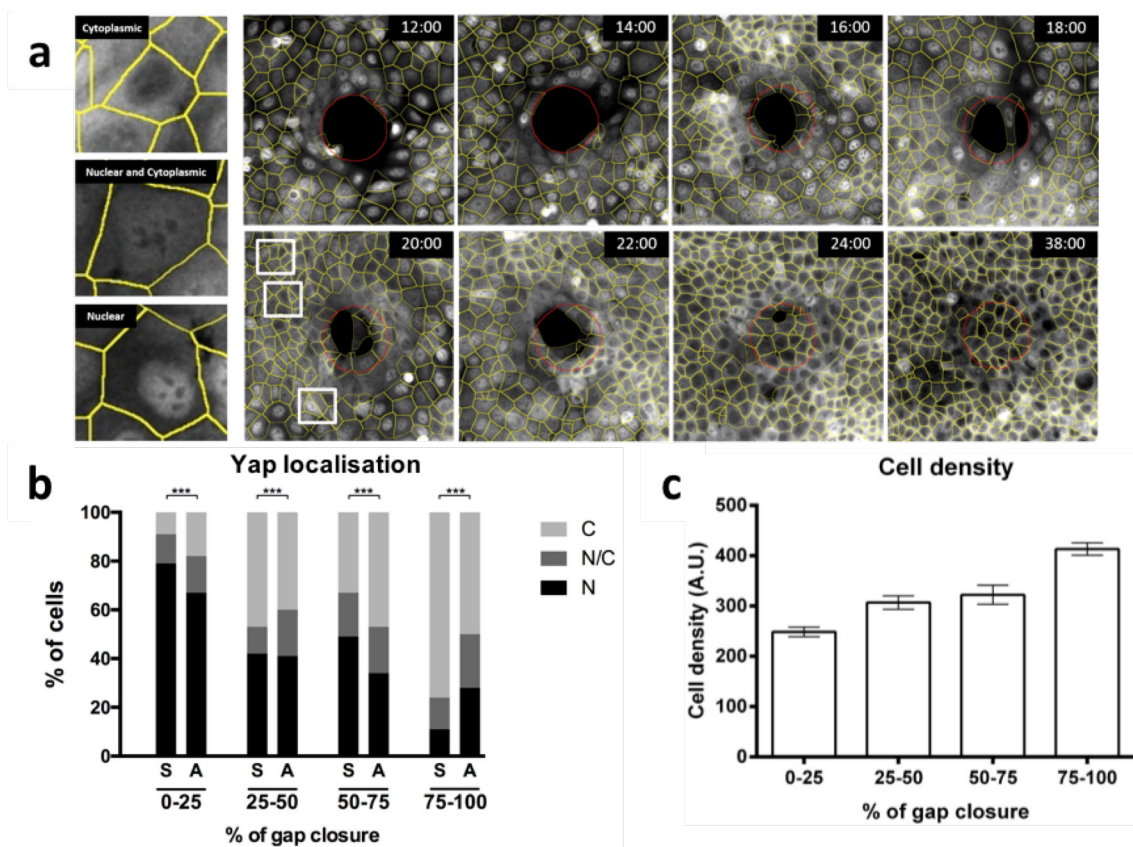


Figure IV.3. Yap n'est pas régulé par les contacts cellule-substrat au cours de la fermeture épithéliale non-adhérente. (a) Localisation de Yap au cours de la fermeture épithéliale non-adhérente. Le temps indiqué en heures:minutes correspond au nombre d'heures après ensemencement des kératinocytes HaCaT sur le motif de fibronectine. En jaune, le contour des cellules détectées par segmentation automatique. En rouge, le bord du trou non adhérent de 100 μ m. A gauche, les gros plans représentent de haut en bas la localisation cytoplasmique, nucléaire et cytoplasmique et nucléaire de Yap. **(b)** Localisation de Yap de cellules suspendues (S) et adhérentes (A) en fonction du taux de fermeture. S : cellules suspendues ; A : cellules adhérentes ; C : Yap cytoplasmique ; N/C : Yap cytoplasmique et nucléaire ; N : Yap nucléaire. **(c)** Densité cellulaire en fonction du taux de fermeture.

issus de cellules adjacentes sont associés à la réorganisation en *doigt de cadhérine* des jonctions adhérentes. Pendant la fermeture du trou, un flux d'actine antérograde se met en place et participe probablement au renforcement du câble d'actomyosine décrit pendant la fermeture en cordon de bourse (Begnaud et al., 2016; Vedula et al., 2015). De plus, la réorganisation de l'actine à l'échelle multicellulaire et la réorganisation des jonctions adhérentes en doigts de cadhérines suggère que ces structures soutiennent d'importantes tensions mécaniques.

2.3 La régulation de Yap au cours de la fermeture de surfaces non-adhérente

Nous avons montré dans le chapitre précédent que les forces transmises par les cellules sur le substrat et les contraintes au sein du tissu sont corrélées à la relocalisation nucléaire de Yap. Au cours de la fermeture en cordon de bourse, l'actine se réorganise à l'échelle de plusieurs cellules en câbles contractiles (Begnaud et al., 2016). Les jonctions adhérentes permettent probablement la transmission des forces aux contacts cellule-cellule (Borghi et al., 2012; Vedula et al., 2015). L'organisation de l'actine en fibre et la contractilité de l'actomyosine sont corrélées à la localisation nucléaire et à l'activation de Yap (Das et al., 2016; Dupont et al., 2011; Valon et al., 2017). A l'inverse, l'absence d'adhésions focales et les forces sur les jonctions cellule-cellule sont des signaux associés à la localisation cytoplasmique et à l'inhibition de Yap (Hirata et al., 2017; Schlegelmilch et al., 2011; Silvis et al., 2011).

Dans les cellules suspendues pendant la fermeture d'une surface non-adhérente, la contractilité et la réorganisation de l'actine en fibre de stress devrait contribuer à la localisation nucléaire de Yap alors que l'absence d'adhésions focales et l'engagement des jonctions adhérentes devraient provoquer la localisation cytoplasmique de Yap. Pour comprendre comment sont intégrés les signaux mécaniques qui permettent la régulation de Yap en absence d'adhésion cellule-substrat, nous avons immunomarcqué Yap dans des cellules fixées pendant et après la fermeture épithéliale non-adhérente. Nous avons fixé des échantillons à intervalles réguliers pendant la fermeture non-adhérente et nous avons fixé un dernier échantillon 38 heures après l'ensemencement, c'est-à-dire bien après fermeture complète (Fig. IV.1 et Fig. IV.3. a). En utilisant la segmentation automatique des cellules, nous avons étudié la localisation de Yap en fonction de la fermeture du trou (Fig. IV.3. a). Yap est majoritairement localisé dans le noyau des cellules suspendues quand la fermeture du trou est comprise entre 0 et 25% ou entre 50 et 75% (Fig. IV.3. b). Quand le trou est fermé de 25 à 50%, la répartition des cellules suspendues dans les groupes « Yap nucléaire » (N), « Yap cytoplasmique » (C) et « Yap nucléaire et cytoplasmique » (N/C) est significativement différente de la répartition de Yap des cellules adhérentes. Cependant, il est difficile de déterminer si Yap est plus souvent nucléaire ou cytoplasmique dans les cellules suspendues par rapport aux cellules adhérentes car la différence repose essentiellement sur la proportion de cellule N/C (Fig. IV.3. b). La localisation cytoplasmique de Yap est plus importante pour les cellules suspendues quand le trou est fermé de 75 à 100% (Fig. IV.3. b). Au cours de la fermeture, Yap a tendance à être relocalisé du noyau vers le cytoplasme aussi bien pour les cellules suspendues que pour les cellules adhérentes (Fig. IV.3. b). En revanche, il n'est pas possible de déterminer si l'intensité de cet effet diffère nettement entre cellules suspendues et adhérentes. La relocalisation de Yap du noyau vers le cytoplasme au cours de la fermeture est corrélée à l'augmentation de la densité cellulaire (Fig. IV.3. c). Il est donc possible que les différences de localisation de Yap entre les cellules suspendues et adhérentes soient masquées par l'augmentation de la densité cellulaire et la relocalisation cytoplasmique de Yap au cours de la fermeture.

En conclusion, nos expériences ne permettent pas de démontrer l'existence d'une relocalisation nucléaire ou cytoplasmique de Yap spécifique de la fermeture non-adhérente. La relocalisation cytoplasmique de Yap au cours de la fermeture non-adhérente pourrait plutôt être corrélée avec l'augmentation de la densité de la monocouche épithéliale. L'absence de résultats clairs sur la régulation de Yap pourrait être expliquée par plusieurs autres limitations techniques que nous discuterons à la fin du chapitre.

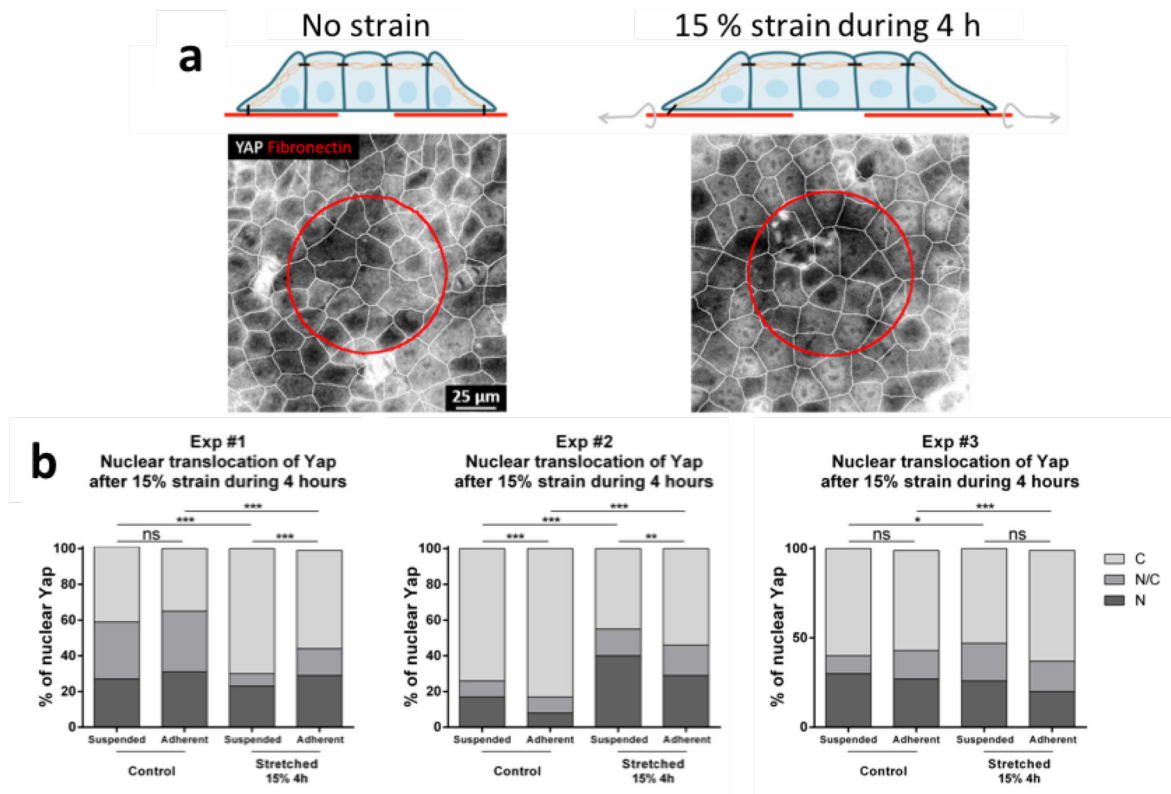


Figure IV.4. L'absence de contacts cellule-substrat n'a pas d'effets reproductibles sur la régulation de Yap après l'étirement mécanique du tissu. (a) 40 heures après l'ensemencement des kératinocytes HaCaT, l'ensemble des trous non-adhérents sont fermés. On applique un étirement uniaxial de 15 % pendant 4 heures puis on fixe les cellules et on fait l'immunomarquage de Yap. Les bords des cellules segmentés sont représentés en blanc et le bord du trou non-adhérent en rouge. **(b)** Quantification de la localisation de Yap avec (Stretched 15% 4h) et sans (Control) étirement au cours de 3 expériences indépendantes. C : Yap cytoplasmique ; N/C : Yap cytoplasmique et nucléaire ; N : Yap nucléaire.

2.4 Le rôle de l'étirement du tissu sur la régulation de Yap en absence de contacts cellule-substrat

Benham-Pyle et associés ont montré qu'un étirement bi-axial de 15% pendant 4 heures induit la localisation nucléaire de Yap de cellules MDCK cultivées à confluence sur un substrat de fibronectine ou de collagène I (Benham-Pyle et al., 2015). Pour étudier le rôle de la déformation mécanique des cellules sur la régulation de Yap en absence de contacts cellule-substrat, nous avons transposé le modèle de fermeture de trous non-adhérents sur une membrane de PDMS étirable (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes). Après la fermeture complète des trous, on applique un étirement uni-axial de 15% pendant 4 heures. Les kératinocytes sont ensuite immédiatement fixés puis Yap est observé par immunomarquage (Fig. IV.4. a). Après avoir réalisé 3 expériences indépendantes, nous avons mesuré la localisation de Yap dans les cellules suspendues et adhérentes ayant subi un étirement de 15%

pendant 4h (Stretched 15% 4h) ou non (Control) (Fig. IV.4. b). Dans l'expérience 1 et 3, il n'y a pas de différence significative de localisation de Yap entre les cellules Control adhérentes et suspendues, alors que dans l'expérience 2, Yap est relocalisé dans le noyau des cellules Control suspendues. Dans l'expérience 3, la localisation de Yap des cellules suspendues et étirées n'est pas significativement différente à celle des cellules adhérentes et étirées. Dans l'expérience 1, l'étirement des cellules suspendues entraîne la relocalisation cytoplasmique de Yap alors que dans l'expérience 2, l'étirement des cellules suspendues entraîne la relocalisation nucléaire de Yap. Enfin, dans l'expérience 2, l'étirement des cellules suspendues et des cellules adhérentes entraîne la relocalisation nucléaire de Yap alors que dans les expériences 1 et 3, l'étirement des cellules suspendues et des cellules adhérentes entraîne la relocalisation cytoplasmique de Yap.

En conclusion, l'étirement des cellules adhérentes et suspendues induit des effets non-reproductibles sur la régulation de Yap. L'absence de reproductibilité peut être expliquée par les limites techniques du modèle que nous discuterons à la fin du chapitre.

2.5 Conclusions du chapitre et discussion

En conclusion, nos résultats suggèrent qu'après fermeture du trou non-adhérent, le cytosquelette d'actine, les adhésions focales et les jonctions adhérentes se réorganisent en réponse à l'absence de contacts cellule-substrat. Les adhésions focales se concentrent sur le bord du motif adhérent où elles ancrent des câbles d'actine multicellulaires tendus d'un bord à l'autre du trou non-adhérent. La continuité des câbles d'actine aux contacts cellule-cellule est associée à la réorganisation des jonctions en *doigt de cadhérines*. Au cours de la fermeture non-adhérente, un flux antérograde d'actine se met en place et il participe probablement au renforcement du câble d'actomyosine dont la contraction permet la fermeture en cordon de bourse (Vedula et al., 2015). Les fibres de stress d'actine sont tendues entre deux jonctions adhérentes ou entre une jonction adhérente et une adhésion focale. On peut spéculer que ces fibres de stress génèrent des forces de traction sur les contacts cellulaires et participent à la régulation locale de la polymérisation et de la contractilité de l'actomyosine (Kobielak et al., 2004; Lecuit and Yap, 2015; Rossier et al., 2010).

La stabilisation de l'actine F et l'engagement aux intégrines dans les adhésions focales sont associées à la localisation nucléaire de Yap alors que le renforcement des jonctions adhérentes est associé à la localisation nucléaire de Yap (Hirata et al., 2017; Kim and Gumbiner, 2015; Serrano et al., 2013). En absence de contacts cellule-substrat, la régulation de Yap reste difficilement interprétable pendant et après la fermeture non-adhérente. En effet, nos résultats ne dégagent pas de tendance claire sur la relocalisation nucléaire ou cytoplasmique de Yap. L'étirement de la monocouche épithéliale ne permet pas non plus de dégager de tendance claire sur la régulation de Yap en absence de contacts cellule-substrat. Pour expliquer nos résultats, il est important de remarquer que les cellules suspendues « vraies » qui n'engagent aucun contact avec le substrat sont rares pendant et après la fermeture du trou non-adhérent. Pour multiplier le nombre de cellules suspendues, l'augmentation du diamètre du trou non-adhérent serait peu efficace car elle réduit la probabilité de fermeture (Vedula et al., 2015). Nous avons donc inclus toutes les cellules partiellement suspendues dans le groupe « cellules suspendues ». Ceci pourrait expliquer la variabilité des résultats. On peut ajouter que la fermeture complète des trous non-adhérents est associée à une densité importante des cellules ce qui favorise la localisation cytoplasmique de Yap (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes) (Aragona et

al., 2013; Zhao et al., 2007). Enfin, nous avons montré dans le chapitre précédent que les forces sur les contacts cellule-substrat sont importantes pour la relocalisation nucléaire de Yap. On peut spéculer que l'engagement des contacts cellule-substrat est nécessaire à la localisation nucléaire de Yap. Si cette hypothèse est vraie, Yap serait relocalisé dans le cytoplasme des cellules suspendues mais aussi dans le cytoplasme des cellules adhérentes dont la densité est importante. Ainsi, il ne serait pas surprenant de ne pas observer de différence claire entre la localisation de Yap dans les cellules adhérentes ou suspendues. Pour évaluer plus précisément l'activité transcriptionnelle de Yap, il serait intéressant d'utiliser le rapporteur d'activité transcriptionnelle de Yap, TBS-mCh, ou de mesurer les indices réplicatifs et mitotiques des cellules suspendues et adhérentes.

2.6 Résultats complémentaires : le rôle des contacts cellule-substrat sur la déformation et la relaxation du tissu après étirement

In vivo, les cellules épithéliales en migration sont soumises à des forces d'étirement et de compression à l'échelle du tissu. En réponse à de telles perturbations mécaniques, les cellules se déforment (Guirao et al., 2015). Après une déformation, la relaxation des cellules au sein du tissu leur permet de reprendre une forme et une aire d'étalement optimale. Pour explorer le rôle des contacts cellule-substrat sur la relaxation des cellules après une déformation, nous avons transposé le modèle de fermeture non-adhérente sur une membrane étirable. En utilisant la segmentation d'image, nous avons examiné le rôle des contacts cellule-substrat et de l'actomyosine sur la dynamique de relaxation des cellules après un étirement. Les kératinocytes HaCaT sont ensemencés sur une surface de fibronectine comportant plusieurs trous circulaires de 100 μm de diamètre et micro-imprimée sur une membrane étirable de PDMS (Fig. IV.5 a). Quarante heures après l'ensemencement, les cellules recouvrent tous les trous non-adhérents.

Après qu'une image ait été enregistrée, la membrane de PDMS est étirée de 10, 15 et 20% de façon uniaxiale puis on enregistre une image toutes les 5 minutes pendant la phase de relaxation du tissu (Fig. IV.5. b). En utilisant la segmentation d'image en contraste de phase (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes), nous avons quantifié l'orientation du plus grand axe des cellules pendant la relaxation du tissu (Fig. IV.5. c, d). L'orientation des cellules est isotrope avant l'étirement. Immédiatement après l'étirement de la membrane de PDMS, les cellules s'orientent dans le sens de la déformation. Enfin, après plusieurs heures, les cellules se réorganisent et leur orientation est à nouveau isotrope (Fig. IV.5. b, c, d). Pour quantifier l'évolution de l'anisotropie du tissu au cours du temps, nous avons mesuré un rapport d'orientation (OR ; Orientation Ratio) défini par le rapport entre le nombre de cellules orientées dans le sens de l'étirement et le nombre de cellule orientée perpendiculairement (Fig. IV.5. e, f). Avant l'étirement, l'orientation des cellules est isotrope et le rapport d'orientation tend vers 1 (Fig. IV.5. c-f). Le rapport d'orientation augmente quand les cellules s'orientent dans le sens de l'étirement et il est proche de 2 immédiatement après un étirement de 20 % des cellules adhérentes. (Fig. IV.5. f). Pendant la relaxation du tissu, il suit une décroissance exponentielle (Fig. IV.5. f, g). Ainsi, le logarithme du rapport d'orientation en fonction du temps est une fonction affine que l'on détermine par régression linéaire (Fig. IV.5. g). La pente de la droite correspond au temps caractéristique τ de la relaxation du rapport d'orientation du tissu. Plus le temps caractéristique τ est grand, plus le retour à l'état isotrope est long et donc plus les cellules se réorientent lentement (Fig. IV.5. f). Plus la membrane de PDMS est étirée, plus le rapport d'orientation initial des cellules adhérentes est élevé ($OR_{10\%} \approx 1,4$; $OR_{15\%} \approx 1,8$; $OR_{20\%} \approx 2,0$) (Fig. IV.5. h). Le temps caractéristique τ de relaxation de l'orientation des cellules diminue avec le taux d'étirement de la membrane de PDMS ($\tau_{10\%} \approx 17\text{h}03\text{min}$; $\tau_{15\%} \approx 15\text{h}36\text{min}$; $\tau_{20\%} \approx 12\text{h}57\text{min}$). Après l'étirement, le rapport d'orientation initial des cellules suspendues est plus grand que celui des cellules adhérentes mais il n'est pas dépendant du taux d'étirement de la membrane de PDMS ($OR_{10,15,20\%} \approx 2,5$) (Fig. IV.5. i-k). Le temps caractéristique de relaxation de l'orientation des cellules suspendues ne dépend pas du taux d'étirement de la membrane de PDMS ($\tau_{10,15,20\%} \approx 8\text{h}41\text{min}$).

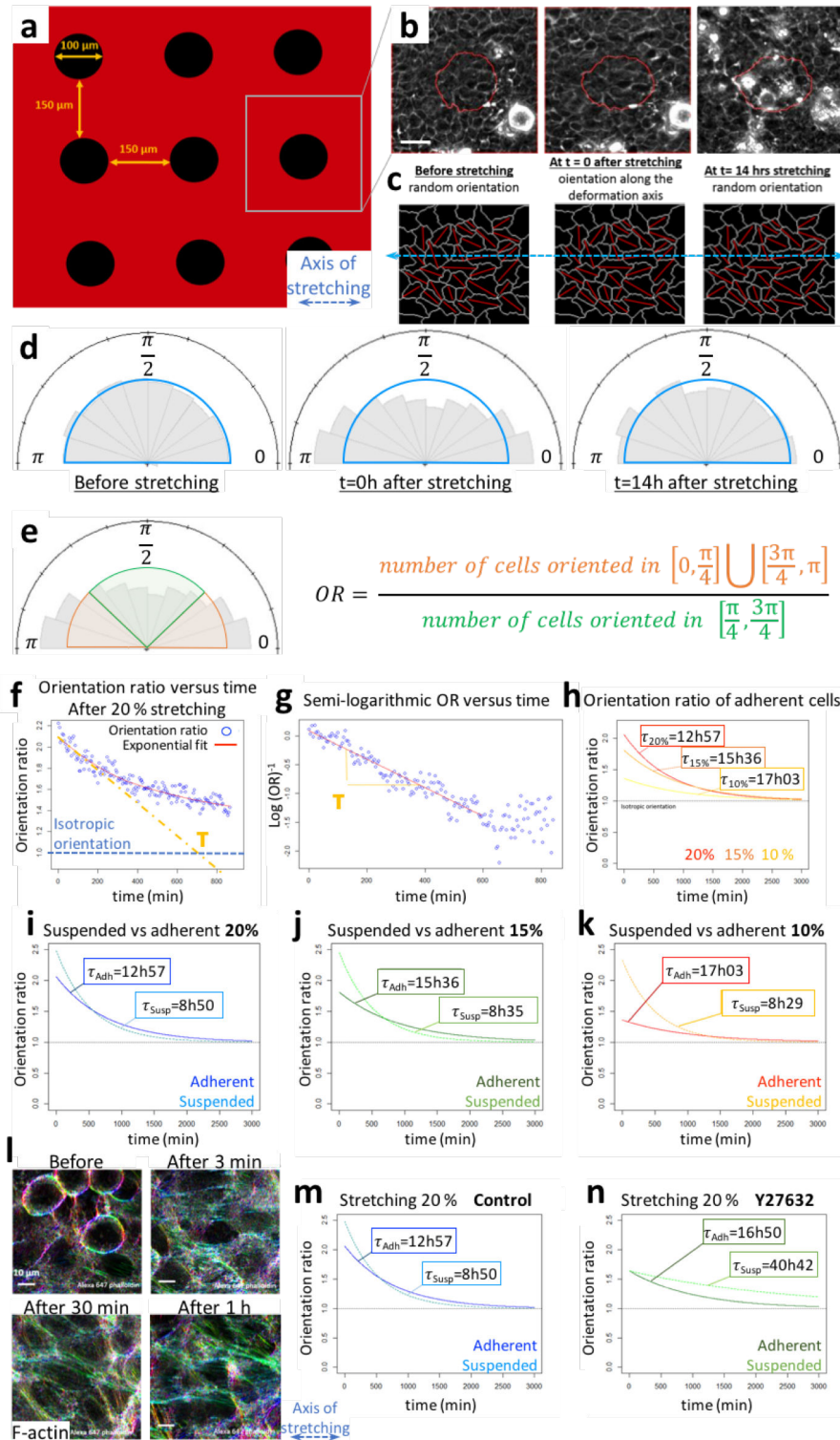


Figure IV.5. Déformation et relaxation de kératinocytes HaCaT après une déformation uniaxiale. (a) Motif de fibronectine (rouge) comportant plusieurs trous non-adhérents (noir) de 100 μm de diamètre et espacés de 150 μm . Barre d'échelle 50 μm . (b) Image en contraste de phase des cellules avant, immédiatement après et 14h après un étirement uniaxial de 20% (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes). (c) Schéma de la déformation et de l'alignement des cellules dans l'axe d'étirement. (d) Distribution de l'orientation des cellules avant et après l'étirement. (e) Le rapport d'orientation OR quantifie la proportion de cellules orientées dans l'axe de l'étirement. (f, g) Relaxation des cellules après l'application d'un étirement de 20%. La décroissance de OR suit une loi exponentielle. (h) Relaxation de cellules adhérentes en fonction du taux d'étirement. (i-k) Relaxation des cellules adhérentes et des cellules suspendues pour un taux d'étirement de 20% (i), 15% (j) et 10% (k). (l) Marquage de l'actine F dorsale de kératinocytes adhérents avant et après un étirement de 20%. Les couleurs représentent l'orientation des fibres d'actine. Les fibres d'actine s'orientent parallèlement à l'axe d'étirement en quelques minutes après la déformation. (m, n) Relaxation de cellules adhérentes et suspendues après un étirement en présence (n) ou non (m) de l'inhibiteur de ROCK Y27632.

Ces données préliminaires que nous avons obtenues sur l'orientation initiale et la relaxation de l'orientation des cellules du tissu en réponse à l'étirement uniaxial du tissu indiquent que les cellules suspendues sont plus déformables que les cellules adhérentes. Cependant, la déformation initiale des cellules suspendues n'est pas dépendante du taux d'étirement alors que celle des cellules adhérentes augmente avec le taux d'étirement. De plus, la vitesse de relaxation des cellules adhérentes augmente avec le taux d'étirement initial du tissu alors que la vitesse de relaxation des cellules suspendues est indépendante du taux d'étirement. Ensemble, ces résultats démontrent que la déformation initiale du tissu et la vitesse de relaxation sont mécanosensibles et que cette mécanosensibilité dépend de l'engagement de contact cellule-substrat. De plus, l'engagement des contacts cellule-substrat limite la déformation et ralentit la vitesse de relaxation.

En réponse à l'étirement mécanique du substrat, les fibres de stress de cellules endothéliales cultivées individuellement s'orientent perpendiculairement à la direction de la déformation (Hayakawa et al., 2001; Wang et al., 2001). Pour examiner la réorganisation de l'actine dans les kératinocytes soumis à un étirement, nous avons marqué l'actine F des cellules avant l'étirement et au cours de la relaxation ; 3, 30 et 60 minutes après étirement de 20%. En réponse à l'étirement de la membrane de PDMS, les fibres d'actomyosine des kératinocytes au sein de l'épithélium se réorganisent parallèlement au sens de la déformation (Fig. IV.5. l). Pour évaluer le rôle de l'actomyosine sur la relaxation de l'orientation des kératinocytes après un étirement, nous avons inhibé la contractilité dépendante de ROCK avec la drogue Y27632. Après un étirement de 20 %, l'inhibition de ROCK réduit le rapport d'orientation initial des cellules adhérentes ($OR_{20\%,Y27} \approx 1,6$) et des cellules suspendues ($OR_{20\%,Y27} \approx 1,6$) (Fig. IV.5. m, n). De façon intéressante, l'inhibition de la contractilité dépendante de ROCK abolit la différence entre le rapport d'orientation initial des cellules adhérentes et celui des cellules suspendues. Les temps caractéristiques de relaxation de l'orientation des cellules adhérentes ($\tau_{20\%,control} \approx 12h57min$; $\tau_{20\%,Y27} \approx 16h50min$) et suspendues ($\tau_{20\%,control} \approx 8h50min$; $\tau_{20\%,Y27} \approx 42h40min$) sont augmentés par l'inhibition de la contractilité d'un rapport 1,3 et 4,8 ; respectivement. En conclusion, l'inhibition de la contractilité de l'actomyosine réduit le rapport d'orientation initial des cellules mais aussi la vitesse de relaxation de l'orientation après un étirement indépendamment de l'engagement de contacts cellule-substrat. On peut en conclure que dans la monocouche de kératinocytes, les fibres d'actine se réorientent dans le sens de l'étirement mécanique. La contractilité de l'actomyosine augmente la déformabilité des cellules après l'étirement du tissu mais accélère la vitesse de relaxation ce qui permet à la monocouche de rejoindre l'état isotrope plus rapidement.

Les adhésions focales sont mécanosensibles et sont associées à de nombreuses protéines régulatrices de la polymérisation et de la contractilité de l'actomyosine (Kuo, 2013; Nicolas et al., 2004; Yoshigi et al., 2005). Les cellules suspendues sont plus déformables que les cellules adhérentes ce qui permet de spéculer que l'engagement de contacts cellule-substrat réorganise le cytosquelette d'actomyosine en réponse à l'étirement du substrat afin de limiter la déformation initiale des cellules. Cependant, la déformation initiale des cellules adhérentes est diminuée par l'inhibition de la contractilité de l'actomyosine. Il semble donc que la contractilité favorise l'allongement initial des cellules ce qui est surprenant. Pour expliquer cette observation, on peut spéculer qu'en absence de contractilité, la déformation de la face ventrale des cellules adhérentes n'est pas transmise au reste de la cellule. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer la forme des cellules en 3 dimensions après l'étirement de la monocouche.

La vitesse de relaxation des cellules suspendues est indépendante du taux d'étirement alors que la vitesse de relaxation des cellules adhérentes augmente avec le taux d'étirement ce qui suggère que la vitesse de relaxation des cellules est déterminée par un mécanisme mécanosensible et qui dépend de l'engagement des contacts cellule-substrat.

L'inhibition de la contractilité de l'actomyosine réduit la vitesse de relaxation des cellules suspendues et adhérentes d'un facteur de 4,8 et 1,3 ; respectivement. On peut en conclure que la contribution de la contractilité de l'actomyosine pour la relaxation du tissu est plus importante en absence de contacts cellule-substrat.

De façon générale, il semble que la vitesse de relaxation des cellules soit assez bien corrélée à la déformation initiale des cellules adhérentes et suspendues. En absence de contractilité, la vitesse de relaxation des cellules suspendues est plus lente que celle des cellules adhérentes alors que la déformation initiale est comparable. Ensemble, ces résultats démontrent une synergie entre la contractilité et les contacts cellule-substrat pour permettre la relaxation des cellules après un étirement.

En conclusion, nos résultats montrent que les contacts cellule-substrat réduisent la déformation initiale et la vitesse de relaxation des kératinocytes mais permettent aux cellules de s'adapter au taux d'étirement. La contractilité de l'actomyosine augmente à la fois la déformation initiale des cellules et la vitesse de relaxation des cellules. Enfin, il existe une synergie entre les contacts cellule-substrat et la contractilité de l'actomyosine qui augmente la vitesse de relaxation des cellules au sein d'un tissu étiré.

CHAPITRE V : RESULTATS – TROISIEME PARTIE

3 Régulation de Yap et de la prolifération pendant la migration collective des kératinocytes

Dans ce chapitre, nous avons exploité un autre modèle de cellules suspendues développé préalablement au laboratoire et qui mime la cicatrisation de la peau *in vitro* (Vedula et al., 2014a). Dans ce modèle, la monocouche de kératinocytes étend de larges feuillets cellulaires suspendus. Nous nous sommes intéressés à la régulation de Yap et de la prolifération pendant ce type de cicatrisation épithéliale *in vitro*.

La migration des cellules de peau est un aspect essentiel de la cicatrisation après une blessure et s'accompagne d'une augmentation de la prolifération cellulaire locale (Park et al., 2017; Zahm et al., 1997). En migrant collectivement, les cellules exercent des forces entre elles et sur le substrat, ce qui déforme les cellules et remodèle l'organisation et la contractilité de leur cytosquelette d'actomyosine (Guirao et al., 2015; Poujade et al., 2007; Reffay et al., 2014; Serra-Picamal et al., 2012). La mécanosensibilité des cellules leur permet de réguler l'activité du cofacteur de transcription Yap en réponse à ces signaux biomécaniques. L'activation de Yap se traduit par la rétention nucléaire de Yap et l'augmentation de la prolifération cellulaire alors que la localisation cytoplasmique de Yap est associée à l'inhibition de la prolifération et à la quiescence cellulaire (Panciera et al., 2016; Schlegelmilch et al., 2011). En plus des signaux biochimiques capté par des récepteurs membranaires (GPCRs, RTK, LIFR), plusieurs signaux biomécaniques ont été associés à la régulation de la prolifération dépendante de Yap. La localisation nucléaire de Yap et l'augmentation de la prolifération sont associées à des signaux comme l'engagement des adhésions focales sur le substrat (Kim and Gumbiner, 2015; Serrano et al., 2013), une grande surface d'étalement ou une densité cellulaire faible (Aragona et al., 2013; Wada et al., 2011; Zhao et al., 2007), une fraction d'actine F élevée par rapport à l'actine G et l'organisation de fibres de stress d'actine (Aragona et al., 2013; Das et al., 2016; Reddy et al., 2013; Wada et al., 2011) et la contractilité du cytosquelette et les contraintes d'étirement (Aragona et al., 2013; Benham-Pyle et al., 2015; Dupont et al., 2011; Valon et al., 2017). Au contraire, l'engagement et la mise en tension des jonctions adhérentes (Aragona et al., 2013; Benham-Pyle et al., 2015; Hirata et al., 2017; Kim et al., 2011; Schlegelmilch et al., 2011; Silvis et al., 2011) et la compression des cellules (Maître et al., 2016; Saw et al., 2017) sont associés à la relocalisation cytoplasmique de Yap et à l'inhibition de la prolifération. Ces signaux mécaniques sont interdépendants et la modification de l'un d'eux entraîne la réorganisation des autres. A ce jour, les contributions relatives des signaux les uns par rapport aux autres pour la régulation de Yap n'a jamais été établie. En cultivant des kératinocytes sur des substrats microfabriqués, nous avons étudié les contributions relatives des signaux biomécaniques sur la régulation de Yap et de la prolifération dans un modèle de migration épithéliale *in vitro* qui mime la cicatrisation épidermique.

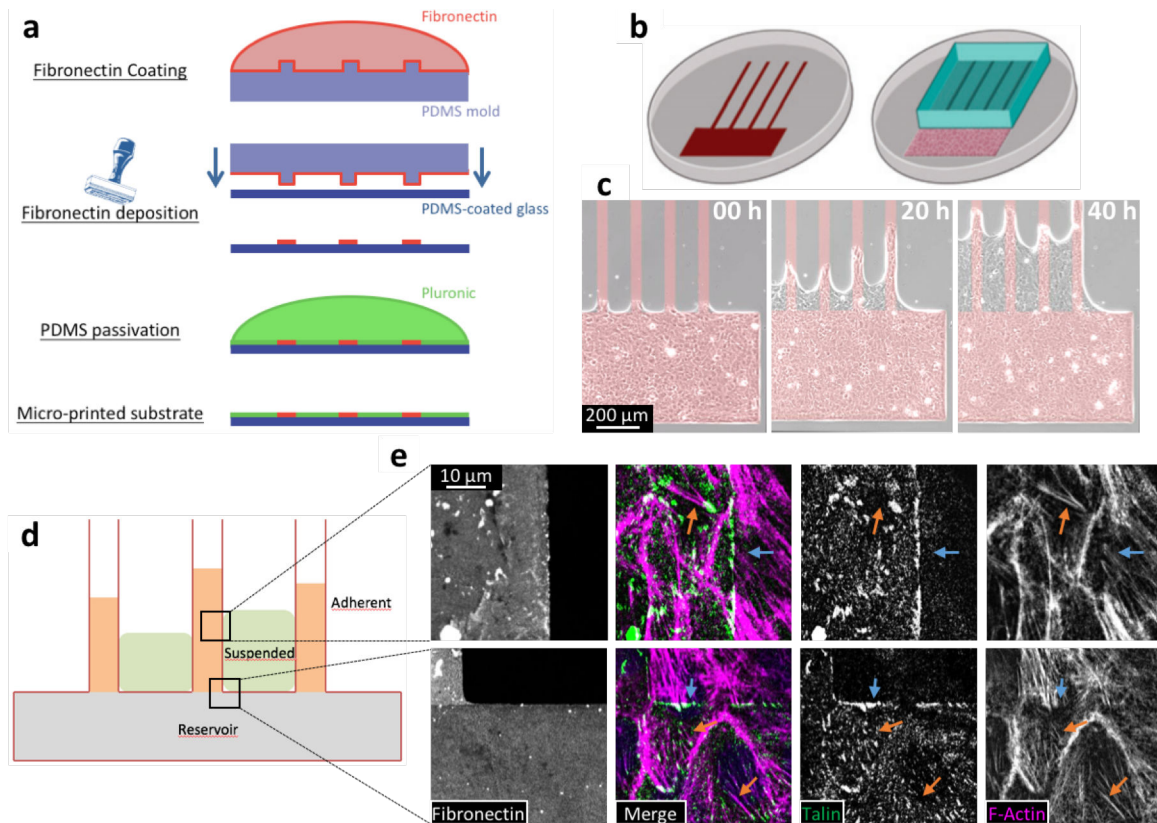


Figure V.1. Établissement de ponts épithéliaux suspendus. (a) La micro-impression par contact repose sur le même principe que le tampon encreur de bureau. On enduit de fibronectine (rouge) un tampon comportant des reliefs micrométriques de géométrie contrôlée. Le tampon est ensuite appliqué sur une surface plane sur laquelle il transfère la fibronectine par contact : seule la fibronectine déposée sur les reliefs du tampon sont transférés sur le substrat. Les surfaces non-imprimées de fibronectine sont rendue cytorépulsives avec du pluronic F-127 (vert). (b) Géométrie du motif de fibronectine (rouge). On appose un bloc de PDMS pour ensemercer les kératinocytes HaCaT spécifiquement dans le réservoir. (c) La levée du bloc permet l'initiation de la migration. Les kératinocytes migrants sur les bandes de fibronectine (rouge) étendent un feuillet de cellules au-dessus du substrat non-adhérent (gris). (d) On distingue 3 populations de cellules : les cellules adhérentes (orange), les cellules suspendues (vert) et les cellules du réservoir (gris). (e) La fibronectine-Cy3 n'est pas déposée à l'extérieur du motif, dans la zone de cellule suspendues. L'actine F (magenta) s'organise en fibres de stress (flèches orange) dont les extrémités se co-localisent avec la taline des adhésions focales. Les adhésions focales marquées par la taline (vert) se concentrent au bord du motif non adhérent (flèches bleues).

3.1 Le feuillet de kératinocytes suspendus n'engage pas d'adhésion focales avec le substrat

Pour étudier la régulation de Yap pendant la cicatrisation de la peau, nous avons cultivé des kératinocytes HaCaT sur un substrat de fibronectine microfabriqué dont la géométrie mime celle de la MEC après une blessure (Fig. V.1. a, b) (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes) (Vedula et al., 2014a). Ce modèle *in vitro* a été développé précédemment dans l'équipe et entraîne la formation de ponts épithéliaux suspendus. La forme géométrique du substrat est la combinaison de bandes de fibronectine de 50 μm espacées de 100 μm et d'un rectangle de fibronectine (Fig. V.1. b). Les bandes de fibronectine parallèles miment des lambeaux de MEC résiduels après une blessure. L'espace de 100 μm entre les bandes de fibronectine est cytorépulsif. En apposant un bloc de PDMS sur les bandes de fibronectine, on enseme les cellules à confluence dans le rectangle (Fig. V.1. b, c). La migration est initiée sur les bandes de fibronectine 12 à 18 heures après l'ensemencement en enlevant le bloc de PDMS (Fig. V.1. c). En 10 heures, les kératinocytes en migration sur les bandes adhérentes étendent

une couche de cellules suspendues au-dessus de l'espace non-adhérent (Fig. V.1. c). Les échantillons sont fixés ou observés au microscope entre 36 et 48 heures après la levée du bloc de PDMS. On distinguera trois populations de cellules (Fig. V.1. d). Les cellules du réservoirensemencées dans le rectangle de fibronectine sont statiques alors que les cellules adhérentes migrent sur les bandes de fibronectine. A l'inverse, les cellules suspendues sont étendues en monocouche au-dessus des bandes cytorépulsives. Pour contrôler la précision de l'impression par micro-contact, la fibronectine utilisée pour l'impression par microcontact est conjuguée fluorochrome Cy3 ou Cy5. Aucune fluorescence n'est détectée à l'extérieur du motif de fibronectine (Fig. V.1. e) ce qui permet de conclure que la zone cytorépulsive ne contient pas de fibronectine.

Pour confirmer que les cellules suspendues n'engagent pas de contacts avec le substrat, nous avons fixé et immunomarcué les cellules 48 heures après l'initiation de la migration et observé la distribution de la taline et de l'actine F à la face ventrale des cellules par microscopie confocale. La taline s'accumule en points focaux dans les cellules adhérentes mais pas dans les cellules suspendues (Fig. V.1. e). Les points focaux marqués pour la taline sont co-localisés avec les extrémités des fibres d'actine et s'accumulent sur le bord du motif adhérent de fibronectine (Fig. V.1. e). En conclusion, les points focaux sont confinés sur le motif adhérent de fibronectine ce qui montre que les cellules adhérentes engagent des adhésions focales sur le substrat mais pas les cellules suspendues.

Les techniques de microfabrication permettent d'imprimer un motif de fibronectine de géométrie contrôlée et de maîtriser le territoire d'ensemencement des cellules. Après l'initiation de la migration, des cellules migrent sur des pistes de fibronectine séparées d'un espace cytorépulsif. En migrant, les cellules adhérentes entraînent la formation d'un pont multicellulaire de cellules suspendues, qui n'engagent pas d'adhésions focales avec le substrat, au-dessus de l'espace cytorépulsif. Plus généralement, on peut spéculer que les cellules suspendues n'engagent pas de contacts cellule-substrat.

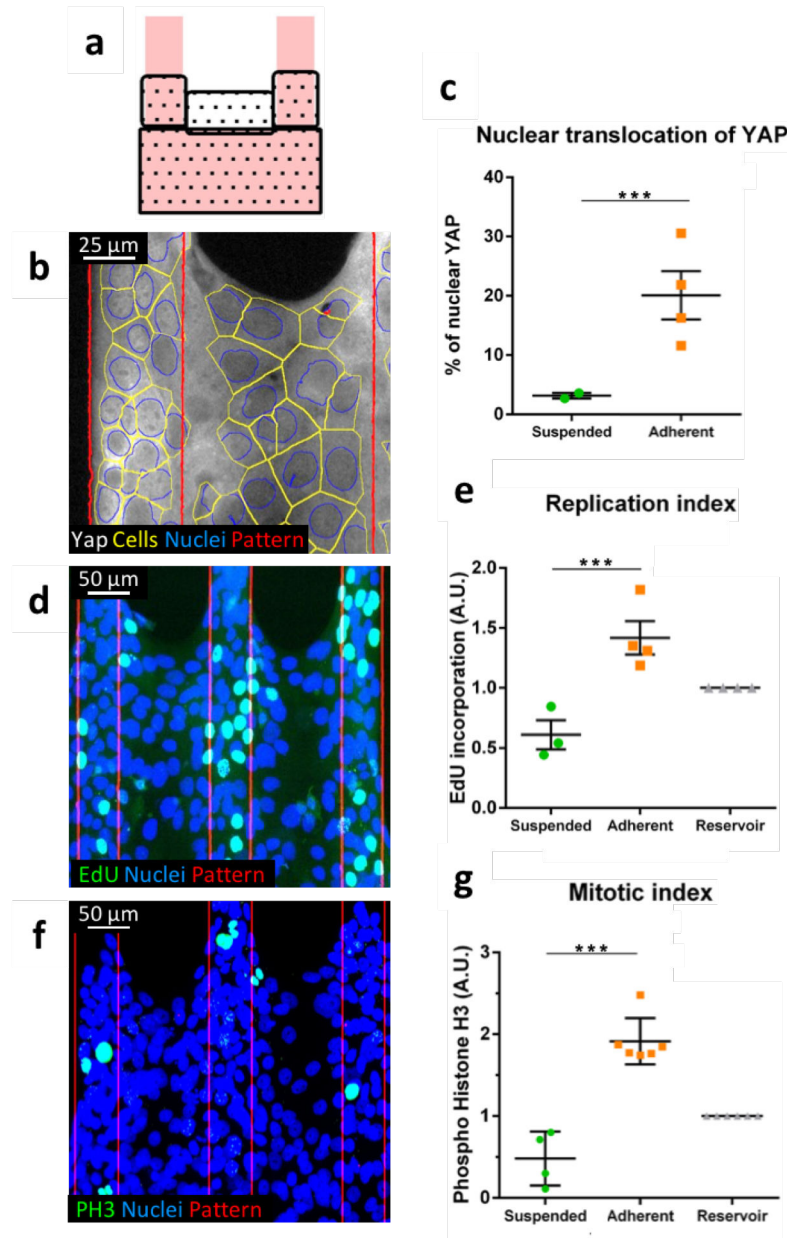


Figure V.2. La localisation nucléaire de Yap et la prolifération sont réduites dans les cellules suspendues. (a) Schéma du motif de fibronectine. (b) Immunomarquage de Yap (gris) dans les cellules suspendues et dans les cellules adhérentes. (c) Pourcentage de cellules dont Yap est nucléaire. (d) Incorporation d'EdU (vert) dans l'ADN (bleu) des cellules en phase S. (e) Quantification de l'index réplcatif. (f) Marquage de l'histone 3 phosphorylé (PH3) (vert) dans le noyau (bleu) des cellules en mitose. (g) Quantification de l'index mitotique. (a, b, d, f) Le bord du motif de fibronectine est représenté en rouge. (c, e, g) Chaque point représente une expérience où plus de 1000 cellules ont été analysées. Test statistique du χ^2 . (e, g) Chaque point est normalisé par l'index réplcatif/mitotique des cellules du réservoir.

3.2 La régulation de Yap et de la prolifération dans les cellules suspendues

Dans le modèle *in vitro* mimant la cicatrisation de la peau, la migration des kératinocytes entraîne la formation de feuillets multicellulaires suspendus. Pour examiner la régulation de Yap dans ce modèle *in vitro*, nous avons fixé et immunomarqué Yap dans le modèle de cicatrisation *in vitro* 48 heures après l'initiation de la migration par levée du bloc de PDMS (Fig. V.2. a, b). La localisation de Yap est détectée par la segmentation automatique des cellules et des noyaux (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes). Dans les cellules suspendues, Yap est principalement cytoplasmique alors que dans les cellules

adhérentes Yap est nucléaire ou à la fois nucléaire et cytoplasmique (Fig. V.2. a, b). La localisation nucléaire de Yap dans les cellules suspendues est significativement inférieure à la localisation nucléaire de Yap des cellules adhérentes (Fig. V.2. c). On peut en conclure que Yap est relocalisé dans le cytoplasme des cellules du feuillet suspendu.

Pour évaluer la prolifération des cellules dans le modèle de cicatrisation *in vitro*, les cellules en phase S et en mitose ont été révélées par l'incorporation d'EdU et par l'immunomarquage de la phospho-histone 3 (PH3), 48 heures après l'initiation de la migration (Limsirichaikul et al., 2009; Tapia et al., 2006). La proportion de cellules suspendues qui ont incorporé l'EdU en 15 minutes est significativement inférieure à la proportion de cellules adhérentes (Fig. V.2. d, e). La proportion de cellules positives pour PH3 est également plus faible dans les ponts suspendus que dans les cellules adhérentes (Fig. V.2. f, g). En conclusion, la proportion de cellules en phase S et en mitose dans les ponts suspendus est significativement inférieure à celle des cellules adhérentes ce qui suggère que les kératinocytes suspendus prolifèrent moins que les kératinocytes adhérents.

Ensemble, ces résultats démontrent que la formation d'une monocouche de cellule suspendues entraîne la relocalisation cytoplasmique de Yap et inhibe la prolifération cellulaire pendant la cicatrisation épidermique.

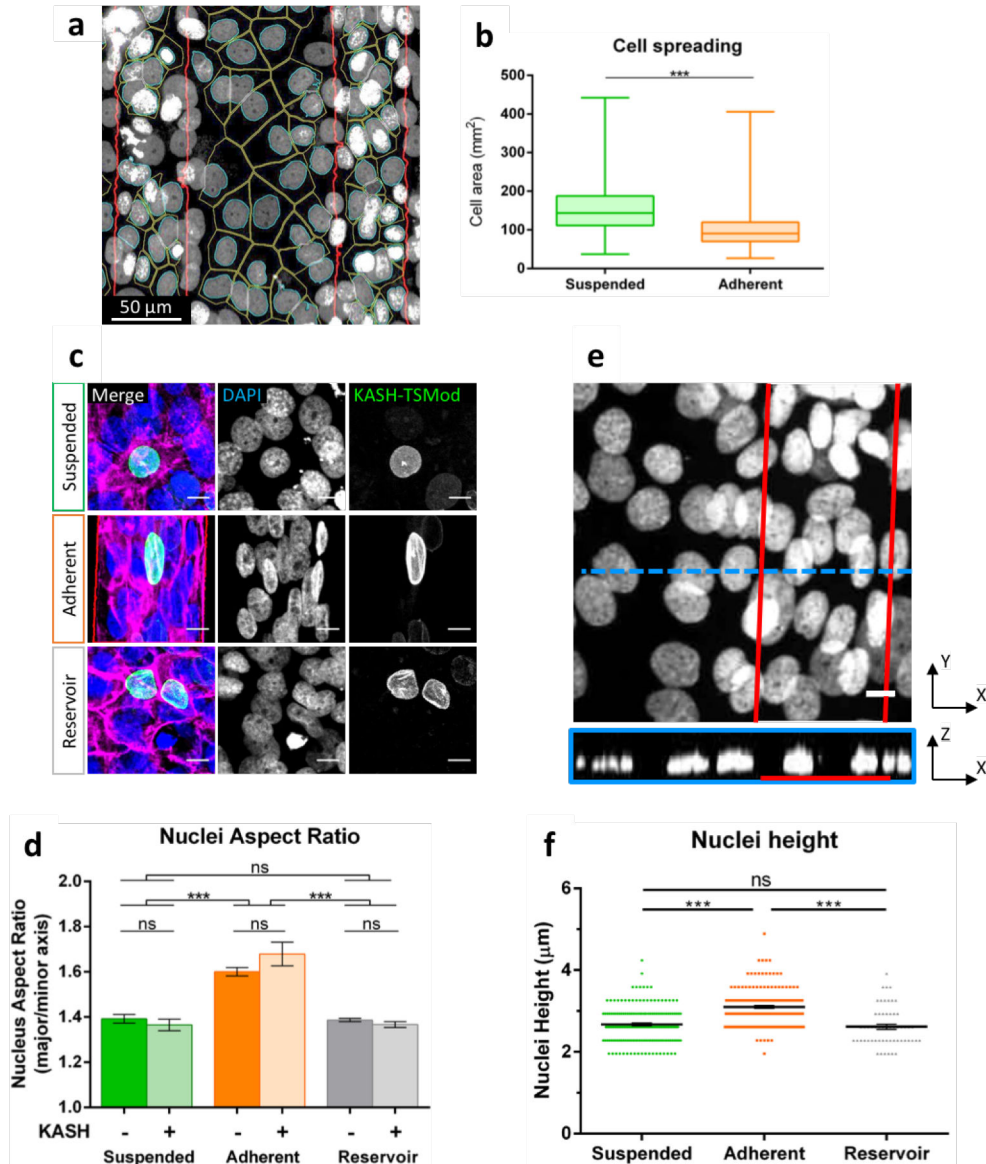


Figure V.3. Les cellules suspendues sont plus étendues que les cellules adhérentes. (a) Marquage des noyaux cellulaires au DAPI (contours en bleu). En jaune, les contours cellulaires détectés par la segmentation permettent de mesurer l'aire des cellules. En rouge, les bords du motif de fibronectine. **(b)** Quantification de l'aire des cellules suspendues et adhérentes. Les cellules suspendues sont plus étalées et donc moins denses. **(c, d)** Les noyaux (bleu) des cellules adhérentes sont plus allongés (i.e. rapport d'aspect plus élevé) que ceux des cellules suspendues et des cellules du réservoir. L'expression du domaine KASH-TSMod (vert) ne change pas la déformation des noyaux. En rouge, les bords du motif de fibronectine. **(e, f)** La déformation des noyaux des cellules adhérentes s'accompagne de l'augmentation de leur hauteur. En rouge, les bords du motif de fibronectine.

3.3 L'aire d'étalement et la compression des cellules suspendues ne sont pas responsables de la relocalisation cytoplasmique de Yap

Nous venons de démontrer que Yap était relocalisé dans le cytoplasme des cellules suspendues. Nous avons voulu savoir si cette relocalisation était régulée par l'aire d'étalement et la densité locale des cellules. Pour cela, nous avons mesuré l'aire moyenne des cellules suspendues après segmentation automatique des cellules (Fig. V.3. a) (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes). L'aire projetée des cellules suspendues est plus importante que celle des cellules adhérentes (Fig. V.3. b). En conclusion, les

cellules suspendues sont plus étalées indiquant qu'elles sont moins denses que les cellules adhérentes. Ainsi, la relocalisation cytoplasmique de Yap et l'inhibition de la prolifération dans les cellules suspendues ne semble pas dépendre de l'aire d'étalement ou de la densité locale des cellules.

Nous avons ensuite cherché à savoir si les contraintes de compression pouvaient permettre d'expliquer la relocalisation cytoplasmique de Yap dans les cellules suspendues. Le taux de déformation des noyaux permet d'estimer l'état de compression ou d'étirement des cellules (Neelam et al., 2016; Raab et al., 2016; Tremblay et al., 2013). Pour estimer les contraintes auxquelles les cellules sont soumises, nous avons mesuré le rapport d'aspect des noyaux des cellules marquées au DAPI. Le rapport d'aspect des noyaux des cellules suspendues et des cellules du réservoir ($1,39 \pm 0,02$ et $1,39 \pm 0,01$; respectivement ; moyenne $\pm$ erreur type) est significativement inférieur à celui des noyaux des cellules adhérentes ($1,6 \pm 0,02$) (Fig. V.3. c, d). Cette déformation dans le plan du substrat de culture s'accompagne de l'augmentation significative de la hauteur des noyaux des cellules adhérentes (Fig. V.3. e, f). En conclusion, les noyaux des cellules suspendues et des cellules du réservoir sont moins déformés que les noyaux des cellules adhérentes. Ces résultats suggèrent que les cellules suspendues sont soumises à des contraintes anisotropes moins importantes que les cellules adhérentes. Cependant, ces résultats ne permettent pas de conclure si les noyaux des cellules adhérentes se déforment sous l'action de contraintes de compression ou d'étirement.

Pour déterminer la nature des contraintes qui déforment les noyaux des cellules adhérentes mais pas ceux des cellules suspendues, nous avons exprimé une forme mutante dominant-négatif de nesprine, KASH-TSMod. Dans cette construction, le domaine TSMod sert de rapporteur fluorescent d'expression. La nesprine est une protéine du complexe LINC qui permet l'ancrage des fibres d'actine sur le noyau (Gundersen and Worman, 2013; Luxton et al., 2010; Neelam et al., 2015; Petrie et al., 2014; Starr and Fridolfsson, 2010). Si les noyaux sont étirés par le cytosquelette d'actomyosine, la perturbation des interactions actine-noyau doit réduire la déformation des noyaux. Parmi les cellules exprimant KASH-TSMod, le rapport d'aspect des noyaux des cellules suspendues et des cellules du réservoir est significativement inférieur au rapport d'aspect des noyaux des cellules adhérentes (Fig. V.3. c, d). Dans les cellules suspendues, adhérentes et du réservoir, le rapport d'aspect des noyaux des cellules exprimant KASH-TSMod n'est pas significativement différent du rapport d'aspect des noyaux des cellules contrôles (Fig. V.3. c, d). Ainsi, l'expression du domaine KASH-TSMod ne change pas le rapport d'aspect des noyaux des cellules des populations suspendues, adhérentes et du réservoir. Ces résultats suggèrent que les noyaux des cellules adhérentes sont déformés par une contrainte de compression.

En conclusion, les cellules suspendues ont une aire d'étalement plus importante que les cellules adhérentes et par conséquent, la densité des cellules suspendues est inférieure à la densité des cellules adhérentes. De plus, les contraintes de compression subies par les cellules suspendues semblent être inférieures à celles subies par les cellules adhérentes. Ensemble, ces résultats suggèrent que la relocalisation cytoplasmique de Yap dans les cellules suspendues ne peut être expliqué ni par l'aire d'étalement des cellules ni par les contraintes de compression.

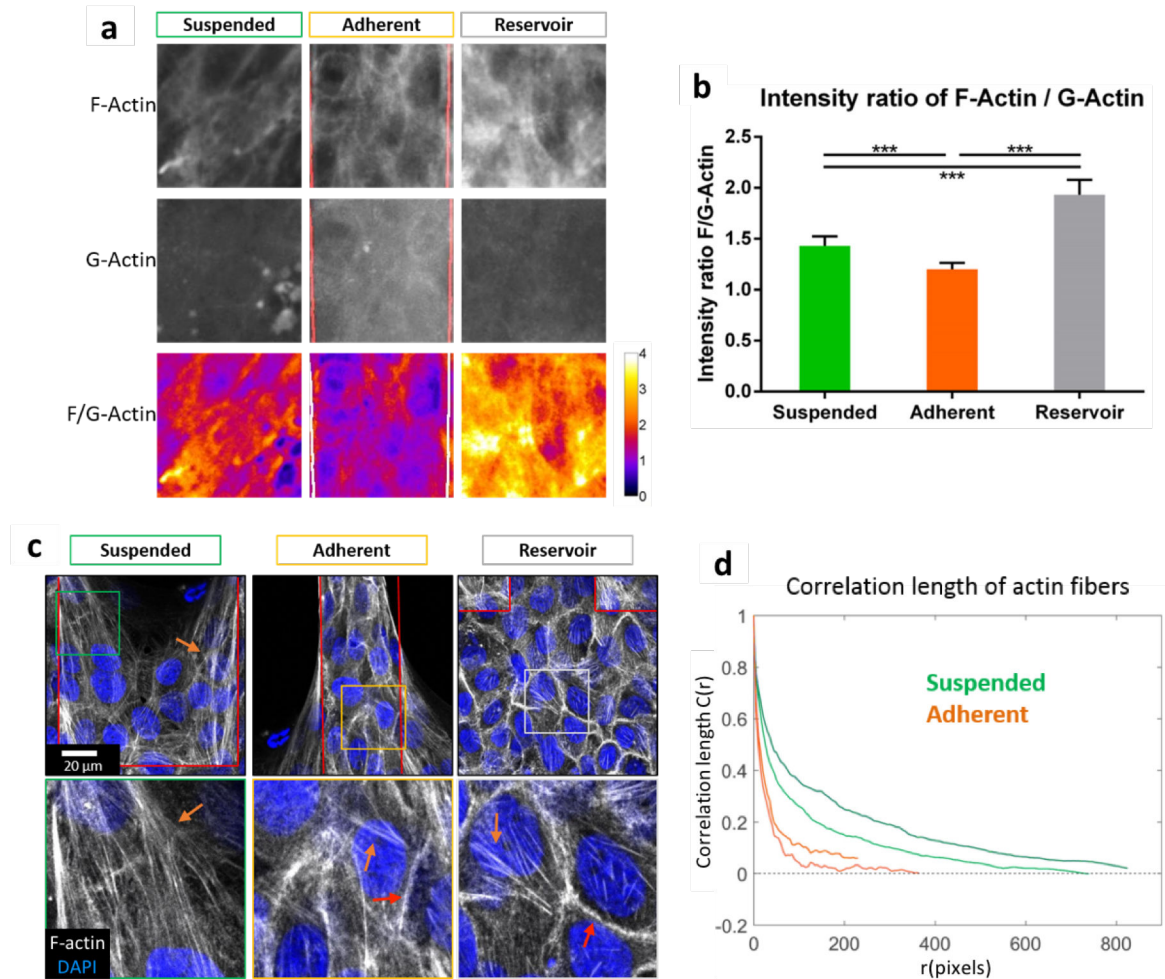


Figure V.4. Augmentation de la fraction d'actine filamenteuse et réorganisation de l'actine des cellules suspendues. (a) Marquage de l'actine F et de l'actine G. Calcul du rapport d'actine F/G. **(b)** Quantification du rapport d'actine F/G des cellules suspendues, adhérente et du réservoir. **(c)** Organisation de l'actine F à la face ventrale des cellules. Pour les cellules du réservoir, les fibres de stress ventrale (flèches orange) s'organisent au sein de cellules individuelles. Le cortex d'actine est visible aux jonctions intercellulaires (flèches rouges). Dans les cellules suspendues, les fibres d'actine s'organisent à l'échelle du tissu et le cortex d'actine n'est pas détectable. En rouge, les bords du motif de fibronectine. Panneau du bas : gros plans du panneau du haut **(d)** Quantification de la longueur des fibres d'actine. A chaque pixel, on attribue une valeur qui correspond à l'orientation des fibres dans son entourage. La longueur de corrélation du paramètre d'orientation permet d'estimer la longueur relative des fibres d'actine de cellules adhérente ou suspendues (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes).

3.4 La réorganisation de l'actine F ne permet pas d'expliquer la relocalisation cytoplasmique de Yap dans les cellules suspendues

Les cellules suspendues ont une aire d'étalement plus importante que les cellules adhérentes. Le changement de la forme des cellules s'accompagne de la réorganisation du cytosquelette d'actomyosine (Pollard and Cooper, 2009; Théry et al., 2006). Nous avons donc voulu évaluer la contribution de l'organisation de l'actine sur la régulation de Yap et de la prolifération.

En effet, l'augmentation de la quantité d'actine F par rapport à la quantité d'actine G augmente la localisation nucléaire de Yap dans des cellules individuelles (Das et al., 2016). De plus, la localisation nucléaire de Yap est corrélée à la présence de fibres de stress d'actine (Aragona et al., 2013; Reddy et al., 2013; Wada et al., 2011). Dans notre modèle, le rapport entre l'actine F et l'actine G pourrait

expliquer la relocalisation cytoplasmique de Yap dans les cellules suspendues. Pour évaluer les quantités relatives d'actine F et G, nous avons fixé les cellules 48 heures après l'initiation de la migration et co-marqué l'actine F et l'actine G avec la phalloïdine et la DNase I, respectivement (Fig. V.4. a). L'acquisition d'images au microscope plein champ nous a permis d'intégrer la fluorescence sur toute la hauteur des cellules et de calculer le rapport des intensités de fluorescence qui reflète le rapport de quantité entre l'actine F et l'actine G (actine F/G). Le rapport d'actine F/G des cellules suspendues est significativement plus grand que celui des cellules adhérentes (Fig. V.4. b). Le rapport d'actine F/G des cellules du réservoir est significativement plus important que celui des cellules suspendues et que celui des cellules adhérentes. On peut en conclure que l'augmentation relative d'actine F par rapport à l'actine G dans les cellules suspendues ne permet pas d'expliquer la relocalisation cytoplasmique de Yap et l'inhibition de la prolifération.

L'actine F des cellules peut s'organiser en réseau ou en faisceaux d'actine. L'organisation de l'actine F en fibres de stress est associée à la localisation nucléaire de Yap et à l'augmentation de la prolifération. Pour examiner l'organisation de l'actine F, nous avons observé le marquage d'actine filamenteuse au microscope confocal. Dans les cellules adhérentes et les cellules du réservoir, les fibres de stress ventrales sont moins grandes que la taille des cellules et ne sont pas en interaction avec les contacts intercellulaires ; de l'actine F corticale se localise également aux jonctions cellule-cellule (Fig. V.4. c). Dans les cellules suspendues, les fibres de stress ventrales sont plus nombreuses et s'organisent à l'échelle du tissu (Fig. V.4. c). Une fibre d'actine issue d'une cellule est prolongée par une fibre d'actine de la cellule voisine. Le marquage de l'actine F corticale est absent des jonctions intercellulaires. Pour estimer la longueur sur laquelle les fibres de stress s'organisent, nous avons détecté automatiquement l'orientation locale des fibres d'actine puis nous avons mesuré la longueur de corrélation du paramètre d'orientation (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes). La longueur de corrélation du paramètre d'orientation des fibres d'actine des cellules suspendues est plus grande que celle des cellules adhérentes (Fig. V.4. d). A la face dorsale des cellules suspendues, on observe un autre réseau de fibres de stress d'actine organisées à l'échelle du tissu (données non montrées). Les noyaux des cellules suspendues sont localisés dans le plan médial où le marquage d'actine F est faible et s'organise dans l'ensemble du cytoplasme. En conclusion, les fibres d'actine des cellules suspendues s'organisent à l'échelle multicellulaire sur une plus longue distance que les fibres de stress des cellules adhérentes et du réservoir. Le marquage d'actine F est absent aux jonctions des cellules suspendues alors qu'il est présent aux jonctions intercellulaires des cellules adhérentes et des cellules du réservoir. Dans les cellules suspendues, les extrémités des fibres de stress de deux cellules adjacentes sont co-localisés au contact cellule-cellule. Ces résultats montrent que les fibres de stress des cellules suspendues sont plus denses et se réorganisent à l'échelle multicellulaire.

Ensemble, ces résultats montrent que les cellules suspendues ont un rapport d'actine F/G plus élevé et un réseau de fibres de stress plus important que les cellules adhérentes ce qui permet d'exclure que l'organisation de l'actine des cellules suspendues régule la relocalisation cytoplasmique de Yap et l'inhibition de la prolifération.

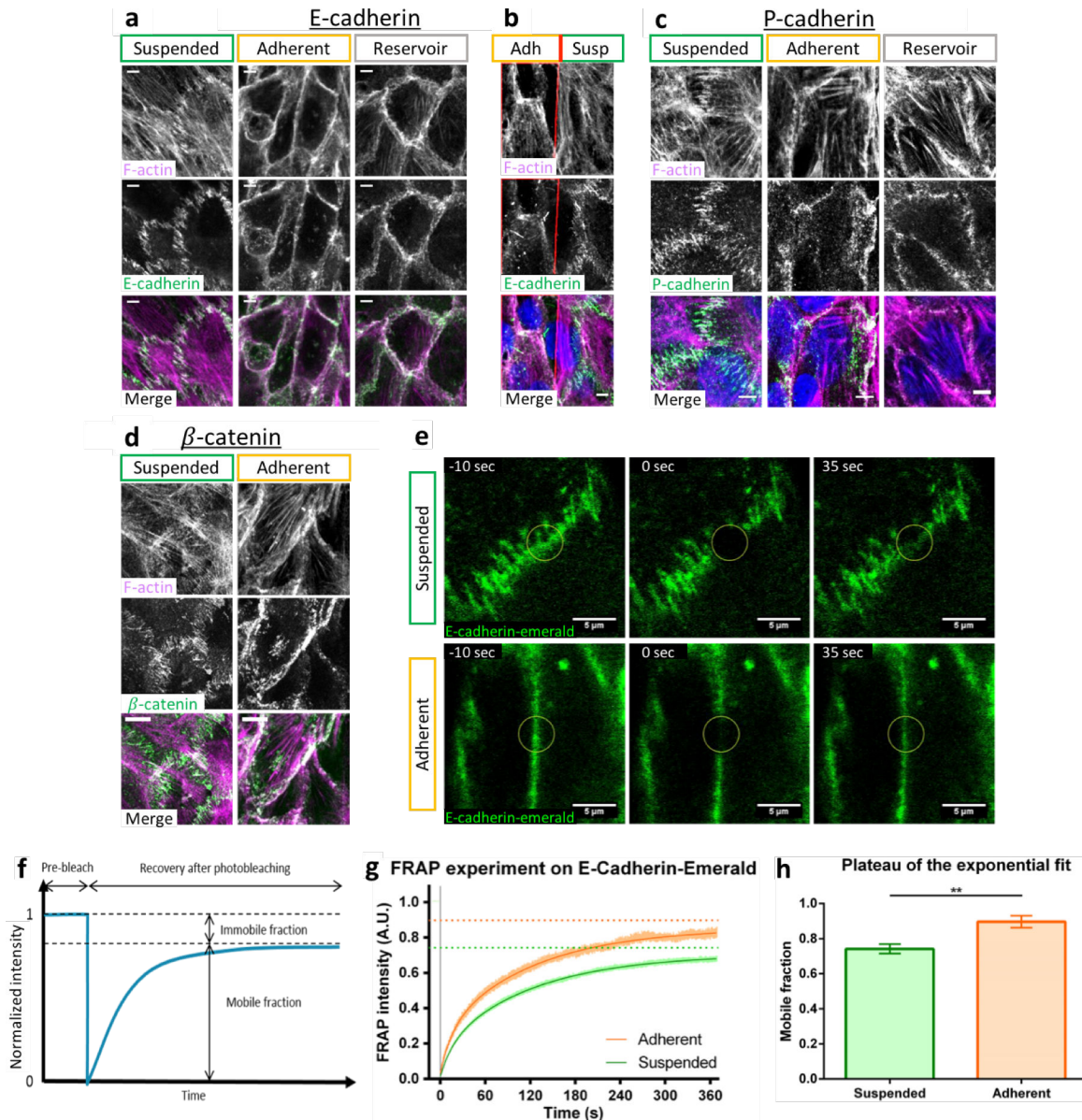


Figure V.5. Réorganisation en *doigts de cadhérine* et stabilisation des jonctions adhérentes des cellules suspendues. Titre. (a, c, d) Immunomarquage de la E-cadherine (a), P-cadherine (c) ou β-caténine (d) avec l'actine F. Les jonctions intercellulaires des cellules adhérentes et du réservoir sont linéaires. Les jonctions des cellules suspendues se réorganisent en *doigts de cadhérine* co-localisés aux fibres d'actine issues des deux cellules adjacentes. (b) Au sein d'une cellule à cheval sur le bord du motif de fibronectine, on observe un phénotype « suspendu » au-dessus de la zone non-adhérente et un phénotype « adhérent » en regard du motif de fibronectine. En rouge, le bord du motif de fibronectine. (e) Expériences de FRAP sur des kératinocytes HaCaT E-cadherine-Emerald. On photoblanchit la fluorescence d'une zone circulaire de 4 μm de diamètre puis on enregistre le retour de la fluorescence. (f) Le retour de la fluorescence après photoblanchiment suit une fonction exponentielle. Le plateau définit la fraction mobile et la fraction immobile de la protéine étudiée. (g, h) La fraction mobile de E-cadherine-Emerald est plus importante dans les jonctions cellule-cellule des cellules adhérentes. Barres d'échelles : 5 μm.

3.5 La stabilisation des jonctions adhérentes peut expliquer la relocalisation cytoplasmique de Yap dans les cellules suspendues

Nous avons ensuite voulu comprendre le rôle des contacts intercellulaires des cellules suspendues sur la relocalisation cytoplasmique de Yap. En effet, l'engagement des jonctions adhérentes dans les contacts cellule-cellule entraîne la relocalisation de Yap dans le cytoplasme et inhibe la prolifération cellulaire (Benham-Pyle et al., 2015; Kim et al., 2011; Schlegelmilch et al., 2011; Silvis et al., 2011). Pour évaluer le rôle des jonctions adhérentes sur la régulation de Yap et de la prolifération en absence de

contact cellule-substrat, nous avons immunomarcqué la E-cadhérine, la P-cadhérine ou la β -caténine avec l'actine F. Les jonctions intercellulaires des cellules adhérentes et du réservoir sont linéaires. Aux contacts cellule-cellule, la E-cadhérine, la P-cadhérine et la β -caténine sont co-localisées avec l'actine corticale (Fig. V.5. a, c, d). Les jonctions intercellulaires des cellules suspendues sont réorganisées en digitations perpendiculaires en *doigts de cadhérine* aux contacts cellule-cellule (Fig. V.5. a, c, d). Ces *doigts de cadhérine* co-localisent avec le point d'intersection des fibres d'actine des cellules adjacentes. Les cellules qui chevauchent le bord du motif de fibronectine sont en partie suspendues et en partie adhérentes (Fig. V.5. b). La partie adhérente a des jonctions intercellulaires linéaires où la E-cadhérine et l'actine F sont co-localisées. La partie suspendue réorganise ses contacts cellule-cellule en *doigts de cadhérine* où les digitations de E-cadhérine sont co-localisées avec les extrémités des fibres de stress (Fig. V.5. b). Les fibres de stress de la partie suspendue sont nombreuses et sont co-localisées à une extrémité avec le bord du motif adhérent de fibronectine et à l'autre extrémité avec la E-cadhérine d'un contact cellule-cellule. En conclusion, la continuité des fibres de stress d'actine entre deux cellules suspendues est associée à la réorganisation du contact en *doigts de cadhérine* et à l'accumulation de la E-cadhérine, de la P-cadhérine et de la β -caténine. L'organisation de l'actine et des contacts cellule-cellule est régulé à l'échelle subcellulaire par la nature adhérente ou cytorépulsive du substrat. Ces résultats suggèrent que les fibres d'actine sont ancrées aux contacts cellule-cellule par des jonctions adhérentes. L'engagement des jonctions adhérentes des cellules suspendues pourrait permettre d'expliquer la relocalisation cytoplasmique de Yap et l'inhibition de la prolifération des cellules suspendues.

Pour confirmer ces résultats et pour évaluer quantitativement la fraction de E-cadhérine engagée dans des jonctions adhérentes, nous avons réalisé des expériences de FRAP sur les contacts cellule-cellule de kératinocytes HaCaT exprimant la E-cadhérine-Emerald, en migration sur le motif de fibronectine depuis 48 heures. La E-cadhérine-Emerald d'une jonction intercellulaire est photoblanchie dans une région circulaire de 4 μ m puis on enregistre le retour de l'intensité fluorescence au cours du temps (Fig. V.5. e, f). Le retour de l'intensité de fluorescence suit une loi exponentielle qui atteint un plateau en plusieurs minutes. Le plateau correspond à la fraction mobile de E-cadhérine-Emerald qui n'est pas engagée dans des interactions adhésives (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes). La fraction mobile de E-cadhérine-Emerald des cellules suspendues ($0,90 \pm 0,04$; moyenne $\pm$ erreur type) est inférieure à celle des cellules adhérentes ($0,74 \pm 0,03$) (Fig. V.4. e, f). En conclusion, dans les cellules suspendues, la proportion de E-cadhérine engagée dans des interactions intercellulaires aux contacts cellule-cellule est plus grande que la proportion de E-cadhérine engagée dans les jonctions *adherens* des cellules adhérentes. Ainsi, l'engagement plus important de la E-cadhérine dans les jonctions intercellulaires des cellules suspendues pourrait contribuer à la régulation de la localisation cytoplasmique de Yap et l'inhibition de la prolifération dans ces cellules.

En résumé, les contacts intercellulaires des cellules suspendues se réorganisent en *doigts de cadhérines* et sont co-localisés avec les fibres de stress d'actine de deux cellules voisines. Cette organisation est similaire à celle observée dans les cellules suspendues au-dessus d'un trou non adhérent (cf. Chapitre IV). De plus, la fraction de E-cadhérine engagée dans les jonctions intercellulaires est plus importante dans les cellules suspendues que dans les cellules adhérentes. Ensemble, ces résultats suggèrent que les jonctions adhérentes des cellules suspendues sont plus sous tension que celles des cellules adhérentes. L'engagement des cadhérines dans les contacts intercellulaires pourrait permettre d'expliquer la relocalisation cytoplasmique de Yap et l'inhibition de la prolifération des cellules suspendues.

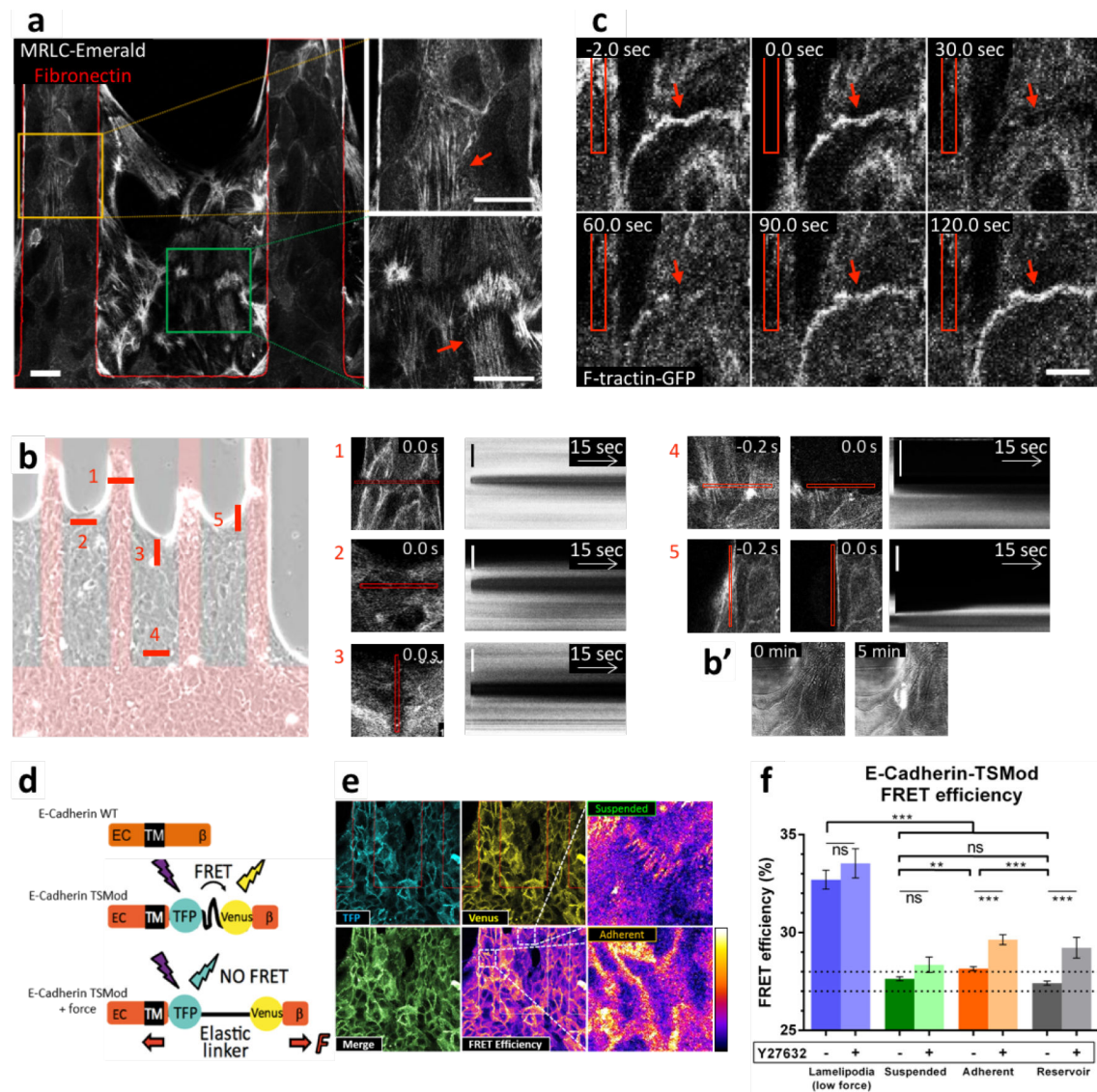


Figure V.6. La contractilité dépendante de ROCK augmente la tension mécanique des cellules suspendues. (a) Organisation de la MRLC-Emerald à la face ventrale de cellules suspendues et adhérentes. La MRLC-Emerald des cellules adhérentes s'organise en fibres de stress ventrale à l'échelle de cellules individuelles et aux jonctions intercellulaires. La MRLC-Emerald des cellules suspendues s'organise à l'échelle multicellulaire en longues fibres mais elle est absente des jonctions intercellulaires. La MRLC-Emerald à la face ventrale des cellules est plus intense dans les cellules suspendues. Barre d'échelle : 20 μ m. **(b)** Ablation laser de kératinocytes HaCaT F-tractine-GFP. À gauche, une image en contraste de phase schématise les régions (rouge) choisies pour les ablations laser. À droite, une image de la fluorescence de la F-tractine-gfp immédiatement après la coupe laser et le kymographe associé. La rétraction après ablation laser est plus rapide pour les cellules suspendues que pour les cellules adhérentes (b1-b5). La rétraction après ablation laser des cellules suspendues est plus importante au bord de la zone suspendue qu'au centre (b2-b5). Barre d'échelle : 20 μ m. **(b')** Images en transmission avant et après l'ablation montrent que l'ablation laser ne détruit pas la monocouche suspendues (b5) **(c)** L'ablation laser au bord de la zone adhérente (zoom de l'image b5) induit la disparition du cortex d'actine en 30 secondes des cellules adhérentes à distance de la coupe. Le cortex est réassemblé entre 60 et 90 secondes après l'ablation laser. Barre d'échelle : 5 μ m. **(d)** Schéma de la E-cadhérine et de la construction E-cadhérine-TSMod. L'application d'une force sur la E-cadhérine-TSMod réduit le FRET. **(e)** Images en microscopie confocale de la fluorescence des kératinocytes HaCaT E-cadhérine-TSMod et efficacité de FRET. **(f)** Efficacité de FRET dans le lamellipode (la E-cadhérine diffuse dans la membrane plasmique : pas de force et grande efficacité FRET) et aux jonctions intercellulaires de cellules suspendues, adhérentes et du réservoir avec ou sans Y27632 qui inhibe la contractilité dépendante de ROCK.

3.6 La mise en tension de l'actine et des jonctions adhérentes a des effets opposés sur la régulation de Yap dans les cellules suspendues

La réorganisation de l'actine F et des jonctions adhérentes des cellules suspendues que nous avons décrit précédemment suggèrent que les cellules soutiennent d'importantes contraintes mécaniques. La mise en tension des cellules et la contractilité de l'actomyosine sont associées à la localisation nucléaire de Yap et à l'augmentation de la prolifération alors que la mise en tension des jonctions adhérentes est associée à la localisation cytoplasmique de Yap et à l'inhibition de la prolifération (Benham-Pyle et al., 2015; Dupont et al., 2011; Hirata et al., 2017; Valon et al., 2017). Pour évaluer la contractilité des cellules suspendues nous avons utilisé trois approches différentes. Nous avons examiné l'organisation de la chaîne légère régulatrice de myosine (MRLC), mesuré la relaxation du tissu après ablation laser et estimé les forces transmises par les molécules de cadhérine.

Pour étudier l'organisation de la MRLC, les kératinocytes MRLC-Emerald sont observés par vidéomicroscopie confocale 36 heures après l'initiation de la migration sur le motif de fibronectine. A la face ventrale, l'intensité de fluorescence de MRLC-Emerald est plus dense dans les cellules suspendues que dans les cellules adhérentes (Fig. V.6. a). La MRLC-Emerald des cellules adhérentes s'organise en fibres ventrales à l'échelle de cellules individuelles et aux jonctions intercellulaire. Dans les cellules suspendues, la MRLC-Emerald s'organise en longues fibres à l'échelle du tissu mais elle est absente aux contacts cellule-cellule. Ainsi, la MRLC-Emerald est plus abondante dans les cellules suspendues et se réorganise en fibres à l'échelle multicellulaire alors que la MRLC-Emerald des cellules adhérentes est organisées en fibres plus courte que la taille d'une cellule. On peut en conclure que la MRLC a une organisation similaire à celle de l'actine F et il est probable que l'actine et la MRLC soient co-localisées. L'abondance de la MRLC dans les cellules suspendues suggère que le réseau d'actomyosine génère une tension mécanique plus importante que celle soutenue par l'actomyosine des cellules adhérentes.

Pour confirmer quantitativement que la tension du réseau d'actomyosine est augmentée dans les cellules suspendues, nous avons réalisé des expériences d'ablation laser, en utilisant une lignée de kératinocytes HaCaT exprimant la F-tractine-GFP. Nous avons incisé le réseau d'actine ventral de cellules vivantes 36 heures après l'initiation de la migration. Le laser bi-photon utilisé pour l'ablation permet de couper les fibres d'actine dans un plan focal sans couper les cellules sur l'ensemble de leur hauteur ce qui permet de conserver l'intégrité mésoscopique de la monocouche de cellules suspendue (Fig ; V.6. b') (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes). L'acquisition d'une image toutes les 150 ms après l'incision laser permet d'évaluer la rétraction de l'actine. L'ablation laser¹ de l'actine dans les cellules suspendues entraîne une rétraction des bords de coupe plus rapide que dans les cellules adhérentes (Fig. V.6. b1-b5). A l'avant du pont suspendu, l'incision perpendiculaire ou parallèle à la direction de migration du tissu entraîne une vitesse de rétraction équivalente (Fig. V.6. b2, b3). L'incision des cellules suspendues le long du motif de fibronectine entraîne la relaxation asymétrique des bords de coupe de l'actine. Du côté du motif de fibronectine, la rétraction est lente alors que du côté du pont suspendu, la rétraction est instantanée. Le bord de coupe sort du champ du microscope en moins de

¹ Les résultats suivants sont préliminaires car l'expérience n'a pas encore été reproduite, faute de temps. De plus, les résultats montrés ne sont pas quantifiés car le disque dur contenant les données brutes a été volé pendant la rédaction de ce manuscrit et peu après l'expérience. Les résultats décrits ont été observés après au minimum 2 coupes laser dans une région équivalente.

150-200 ms, c'est-à-dire avant la première acquisition après l'ablation laser (Fig. V.6. b4, b5). Cette rétraction immédiate des bords de coupe est similaire à proximité des cellules du réservoir (Fig. V.6. b4) et des cellules adhérentes (Fig. V.6. b4). L'incision de cellules suspendues à proximité du bord du motif de fibronectine entraîne également le désassemblage rapide du cortex d'actine de cellules adhérentes situées à distance du site de coupe. Le cortex est réassemblé entre 60 et 90 secondes après l'ablation laser (Fig. V.6. c). En conclusion, la rétraction de l'actine dans les cellules suspendues est plus rapide que dans les cellules adhérentes. La rétraction des fibres d'actine est plus rapide au bord de la monocouche suspendue qu'au centre.

Ensemble, ces résultats suggèrent que la tension soutenue par l'actomyosine est plus importante dans les cellules suspendues que dans les cellules adhérentes ce qui confirme que l'augmentation de l'expression de la MRLC dans les cellules suspendues est associée à l'augmentation de la contractilité de l'actomyosine. Dans les cellules suspendues, la réorganisation en *doigts de cadhérine* des contacts cellule-cellule est associée à la réorganisation des fibres de stress à l'échelle multicellulaire et à l'augmentation de la contractilité de l'actomyosine ce qui suggère que les jonctions adhérentes des cellules suspendues transmettent des forces mécaniques, générées par les fibres de stress d'actomyosine, plus importantes.

Pour évaluer quantitativement la tension sur les jonctions adhérentes, nous avons cultivé des kératinocytes exprimant la E-cadhérine-TSMod sur le motif de fibronectine. Les forces transmises par la E-cadhérine-TSMod engagée dans une jonction intercellulaire diminue l'efficacité de FRET (Fig. V.6. d) (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes) (Borghi et al., 2012; Grashoff et al., 2010). Au contraire, dans le lamellipode, la E-cadhérine-TSMod n'est pas engagée dans un contact cellule-cellule et l'efficacité de FRET est maximale (Borghi et al., 2012). La fluorescence de la E-cadhérine-TSMod est observée dans les kératinocytes HaCaT vivants par microscopie confocale 36 heures après l'initiation de la migration. L'intensité de fluorescence des fluorochromes TFP et Venus du domaine TSMod permet de calculer l'efficacité de FRET (Fig. V.6. e, f) (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes). L'efficacité de FRET de la E-cadhérine-TSMod est significativement plus importante dans lamellipode ($32,7 \pm 0,5$ U.A. ; moyenne $\pm$ erreur type) qu'aux contacts cellule-cellule des cellules adhérentes ($28,2 \pm 0,1$ U.A.) (Fig. V.6. f). L'efficacité FRET est significativement plus faible aux jonctions intercellulaires des cellules suspendues ($27,6 \pm 0,1$) qu'aux jonctions intercellulaires des cellules adhérentes ($28,2 \pm 0,1$ U.A.) (Fig. V.5. e, f). Il n'y a pas de différence entre l'efficacité de FRET de la E-cadhérine-TSMod aux jonctions intercellulaires des cellules suspendues et des cellules du réservoir ($27,6 \pm 0,1$ et $27,4 \pm 0,1$ U.A., respectivement). En conclusion, le FRET de la E-cadhérine-TSMod est significativement plus faible dans les cellules suspendues et les cellules du réservoir que dans les cellules adhérentes. On peut en conclure que la force moyenne transmise par les molécules de E-cadhérine aux jonctions adhérentes des cellules suspendues est significativement plus importante que celle transmise par les molécules de E-cadhérine des cellules adhérentes.

Le traitement des préparations par la drogue Y27632 qui inhibe la contractilité de l'actomyosine dépendante de ROCK augmente significativement le FRET de la E-cadhérine-TSMod aux contacts cellule-cellule des cellules adhérentes et du réservoir. Aux jonctions cellule-cellule des kératinocytes suspendus, le traitement avec Y27632 n'augmente pas significativement l'efficacité de FRET de la E-cadhérine-TSMod. On peut en conclure que la contractilité de l'actomyosine augmente la force transmise par la E-cadhérine des jonctions intercellulaires des cellules adhérentes et des cellules du réservoir. En revanche, la force transmise par les molécules de E-cadhérine aux jonctions des cellules suspendues n'est pas dépendante de la contractilité de l'actomyosine générée par l'activité de ROCK.

On peut spéculer que les tensions sur les contacts des cellules suspendues sont maintenues par la contractilité de l'actomyosine par une voie de signalisation indépendante de ROCK.

En conclusion, la myosine MRLC des cellules suspendues est renforcée et adopte une organisation fibrillaire similaire à celle de l'actine. L'ablation laser des fibres d'actomyosine des cellules suspendues entraîne une rétraction des bords de coupe plus rapide que dans les cellules adhérentes. Dans les cellules suspendues, les forces transmises les jonctions adhérentes sont plus importantes que dans les cellules adhérentes. Ensemble, ces résultats montrent que l'actomyosine est plus sous tension dans les cellules suspendues que dans les cellules adhérentes. De plus, les jonctions intercellulaires des cellules suspendues sont soumises à des contraintes plus importantes que celles des cellules adhérentes. L'augmentation de la contractilité de l'actomyosine et la mise en tension des kératinocytes ne permet pas d'expliquer la translocation cytoplasmique de Yap dans les cellules suspendues. En revanche, l'augmentation des contraintes transmises par les jonctions adhérentes pourrait contribuer à la relocalisation cytoplasmique de Yap dans les cellules suspendues.

3.7 La régulation de Yap et de la prolifération dans les cellules suspendues

Nous venons de montrer que les contacts cellule-cellule ont un rôle plus important que l'organisation et la contractilité de l'actomyosine pour la régulation de la localisation de Yap et de la prolifération des kératinocytes suspendus dans le modèle de cicatrisation *in vitro*. L'engagement des contacts cellule-substrat est associé à la localisation nucléaire de Yap (Hannigan et al., 1996; Kim and Gumbiner, 2015; Kudryashova et al., 2016; Serrano et al., 2013). Pour évaluer le rôle des contacts cellule-substrat sur la régulation de la localisation de Yap, nous avons ajouté des carrés de fibronectine dans la zone cytoréulsive du motif de fibronectine décrit précédemment (Fig. V.7. a). Les kératinocytes HaCaT sont d'abord ensemencés dans le réservoir puis l'initiation de la migration est déclenchée par levée du bloc de PDMS. Les kératinocytes migrent sur les bandes de fibronectine et étendent une monocouche cellulaire alternativement suspendue et adhérente dans la zone cytoréulsive comportant les carrés de fibronectine. Les kératinocytes de cette monocouche seront désignés par l'appellation cellules « suspendues + carrés ». Quarante-huit heures après l'initiation de la migration sur les motifs adhérents micro-imprimés avec ou sans carrés de fibronectine, les cellules sont fixées et immunomarquées pour Yap. Les images sont segmentées et la localisation de Yap est mesurée automatiquement (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes). La taille, la forme et l'espacement des carrés de fibronectine est telle que la majorité des cellules « suspendues + carrés » chevauchent le bord d'un carré de fibronectine et sont donc à la fois suspendue et adhérente (Fig. V.7. b). La proportion de cellules « suspendues + carrés » où Yap est nucléaire est significativement plus importante que celle des cellules suspendues (Fig. V.7. b, c). En conclusion, la présence de carrés de fibronectine dans la zone des cellules suspendues augmente la localisation nucléaire de Yap ce qui suggère que l'engagement de contacts cellule-substrat par les cellules « suspendues + carrés » entraîne la relocalisation nucléaire de Yap.

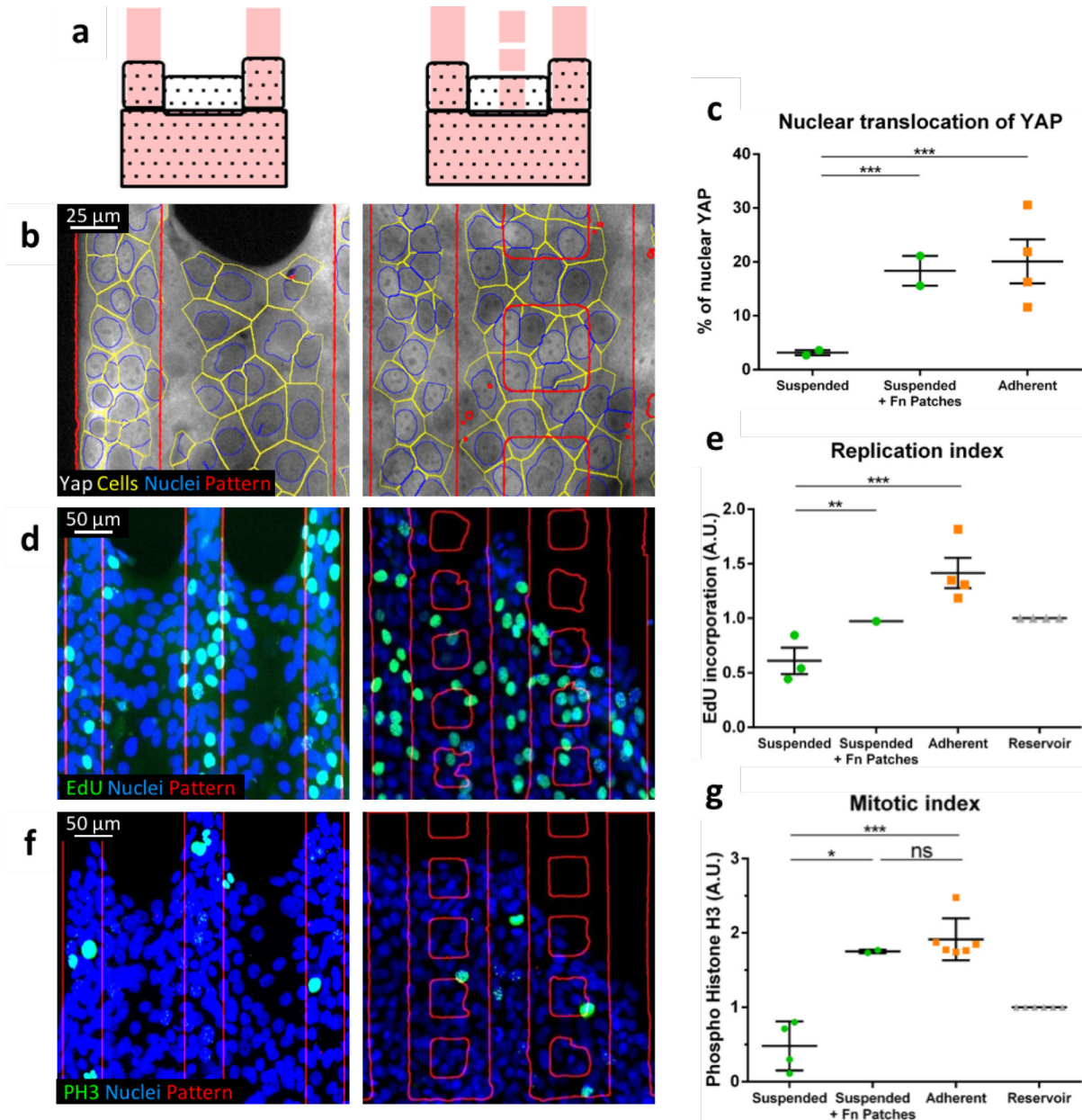


Figure V.7. La localisation nucléaire de Yap et la prolifération sont réduites en absence d'adhésion avec le substrat. (a) Schéma des motifs de fibronectine utilisés. A droite, le motif intègre des carrés de fibronectine qui rétablissent l'engagement d'adhésions cellule-substrat pour les cellules suspendues. **(b)** Image de l'immunomarquage de Yap dans les cellules suspendues ou « suspendues + carrés » et dans les cellules adhérentes. **(c)** Pourcentage de cellules dont Yap est nucléaire. **(d)** Incorporation d'EdU dans l'ADN des cellules en phase S. **(e)** Quantification de l'index réplcatif. **(f)** Marquage de l'histone 3 phosphorylée des cellules en mitoses. **(g)** Quantification de l'index mitotique. (a, b, d, f) Le motif de fibronectine est représenté en rouge. (c, e, g) Chaque point représente une expérience où plus de 1000 cellules ont été analysées. La localisation de Yap et les indices réplcatif et mitotique des cellules adhérentes sont comparables entre des 2 motifs de fibronectine et ont été regroupé par soucis de clarté. Test statistique du χ^2 . (e, g) Chaque expérience est normalisée par l'index réplcatif/mitotique des cellules du réservoir.

Pour déterminer si l'augmentation de la localisation nucléaire de Yap des cellules « suspendues + carrés » est associée à l'augmentation de la prolifération, nous avons évalué la proportion de cellules en phase S et en mitose par incorporation d'EdU pendant 15 minutes et par immunomarquage de PH3 48 heures après l'initiation de la migration sur le motif adhérent microimprimé avec et sans les carrés

de fibronectine. La proportion de noyaux qui ont incorporé l'EdU est significativement¹ plus importante dans la population de cellules « suspendues + carrés » que dans la population de cellules suspendues (Fig. V.7. d, e). La proportion de noyaux positifs pour PH3 est également significativement plus importante pour la population de cellules « suspendues + carrés » que dans la population de cellules suspendues (Fig. V.7. f, g). Ainsi, la proportion de noyaux positifs pour l'EdU et PH3 est plus importante pour les cellules « suspendues + carrés » que pour les cellules suspendues et on peut en conclure que la relocalisation nucléaire de Yap par l'engagement des contacts cellule-substrats est associée à l'augmentation de la proportion de cellule en phase S et en mitose et à l'augmentation de la prolifération cellulaire.

En conclusion, l'addition de carrés de fibronectine dans la zone cytorepulsive entraine la formation d'une monocouche « suspendues + carrés » où les cellules sont partiellement suspendues mais engagent aussi des contacts cellules-substrat. La localisation nucléaire de Yap et la prolifération des cellules « suspendues + carrés » est augmentée par rapport aux cellules suspendues. Ces résultats montrent que l'absence de contacts cellule-substrat participe à la localisation cytoplasmique de Yap dans cellules suspendues du modèle de cicatrisation *in vitro*.

¹ Dans la figure V.7. e, on note que l'expérience d'incorporation d'EdU dans les cellules « suspendues + carrés » est préliminaire et qu'elle n'a pas encore été reproduite.

3.8 Conclusions du chapitre et discussion

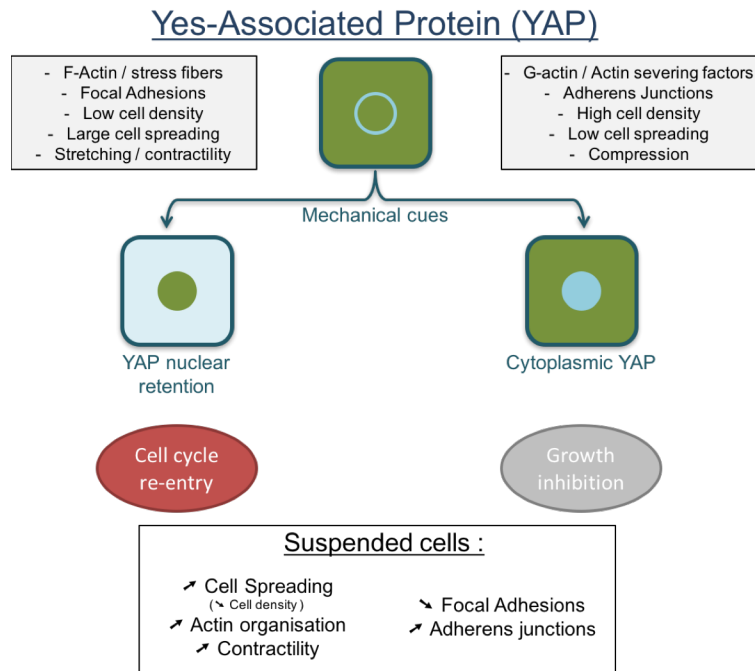


Figure V.8. Les signaux mécaniques qui régulent Yap dans les cellules suspendues. Selon la littérature, l'organisation de l'actine F, l'engagement des adhésions focales, une densité faible, un étalement important et la contractilité des cellules participent à la localisation nucléaire de Yap et à l'augmentation de la prolifération cellulaire. Au contraire, l'augmentation de l'actine G, l'engagement des jonctions adhérentes, une densité importante, une aire d'étalement faible ou la compression des cellules entraînent la localisation cytoplasmique de Yap et l'inhibition de la prolifération. Dans les cellules suspendues, l'augmentation de l'aire d'étalement des cellules, de l'actine F et de la contractilité devrait relocaliser Yap dans le noyau et augmenter la prolifération alors que l'absence d'adhésions focales et le renforcement des jonctions adhérentes devrait relocaliser Yap dans le cytoplasme et inhiber la prolifération.

En conclusion, la migration des kératinocytes dans un modèle de cicatrisation *in vitro* entraîne l'extension d'une monocouche de cellules suspendues qui n'engage pas de contacts cellule-substrat. Les cellules suspendues sont moins denses et semblent moins comprimées que les cellules adhérentes. L'absence de contacts cellule-substrat d'un feuillet de kératinocytes entraîne la réorganisation des fibres de stress d'actine à l'échelle multicellulaire et la formation de structures en *doigts de cadhérine* perpendiculaires à la jonction cellule-cellule. Les *doigts de cadhérine* ancrent les câbles d'actine issus de deux cellules voisines. La contractilité de l'actomyosine du feuillet de cellules suspendues est augmentée ce qui amplifie les contraintes mécaniques transmises par les jonctions cellule-cellule.

Le renforcement des jonctions adhérentes et l'absence d'adhésions focales sont associés à la localisation cytoplasmique de Yap et à l'inhibition de la prolifération (Aragona et al., 2013; Benham-Pyle et al., 2015; Hannigan et al., 1996; Hirata et al., 2017; Kim and Gumbiner, 2015; Kudryashova et al., 2016; Schlegelmilch et al., 2011; Serrano et al., 2013; Silvis et al., 2011). L'augmentation de l'aire d'étalement des cellules, les contraintes d'étirement et l'organisation fibrillaire du cytosquelette d'actomyosine sont associées à la localisation nucléaire de Yap et à l'augmentation de la prolifération (Aragona et al., 2013; Benham-Pyle et al., 2015; Das et al., 2015; Dupont et al., 2011; Reddy et al., 2013; Valon et al., 2017; Wada et al., 2011; Zhao et al., 2007). Dans le modèle de kératinocytes suspendus, les contributions des jonctions adhérentes et des adhésions focales prédominent pour la régulation de Yap. En effet, malgré l'augmentation de l'aire d'étalement cellulaire, la réorganisation

de l'actomyosine et les contraintes d'étirement, Yap est cytoplasmique dans les cellules suspendues et la prolifération cellulaire est diminuée.

Dans le noyau, Yap active les facteurs de transcription TEAD1-4 qui déclenchent l'entrée dans le cycle cellulaire (Benham-Pyle et al., 2015; Schlegelmilch et al., 2011). La localisation cytoplasmique de Yap empêche l'activation des facteurs de transcription et réduit la prolifération cellulaire. Pour évaluer le rôle de Yap sur l'inhibition de la prolifération des cellules suspendues, il serait intéressant de transfecter les kératinocytes avec TBS-mCh, un rapporteur d'activité transcriptionnelle de Yap (Schlegelmilch et al., 2011). Dans le chapitre III, nous avons montré que les forces sur les contacts cellule-substrat sont associées à la localisation nucléaire de Yap. Pour confirmer ce résultat, il serait intéressant de déposer des billes magnétiques recouvertes de fibronectine sur les cellules suspendues. Après adhésion des cellules aux billes, on peut générer une force mécanique quantifiable via les contacts cellule-substrats et mesurer la localisation de Yap (après fixation ou en cellule vivantes avec Yap-GFP). C'est en utilisant des billes magnétiques recouvertes de E-cadhérine-Fc que Hirata et associés ont montré que les forces sur les jonctions adhérentes entraînent la relocalisation cytoplasmique de Yap (Hirata et al., 2017).

Nous avons montré que l'engagement de contacts cellule-substrat, probablement les adhésions focales, augmente la localisation nucléaire de Yap et la prolifération. Pour confirmer le rôle des adhésions focales dans la régulation de la Yap des cellules suspendues, il serait intéressant d'activer les intégrines des cellules suspendues en ajoutant l'ion Mn^{2+} dans le milieu de culture. Mn^{2+} entraîne l'activation de nombreuses intégrines des adhésions focales (Ye et al., 2012). Cette expérience pourrait permettre d'évaluer le rôle de l'activation des adhésions focales en absence de forces mécaniques sur la régulation de Yap et de la prolifération.

Aux bords du feuillet de cellules suspendues, les contraintes de tensions de l'actine sont plus importantes qu'au centre de la monocouche. De façon surprenante, les forces transmises par la E-cadhérine-TSMod aux bords du feuillet suspendu ne sont pas différentes de celles au centre de la monocouche (données non montrées). Il est probable que le senseur de force TSMod ne soit pas assez sensible pour détecter ces différences. Pour évaluer la distribution de la myosine activée par rapport à la distribution des contraintes d'étirement, il serait intéressant de co-marquer l'actine F, la MRLC phosphorylée et la MRLC totale.

3.9 Résultats complémentaires : l'expression de la chromatine de cellules soumises à des contraintes mécaniques

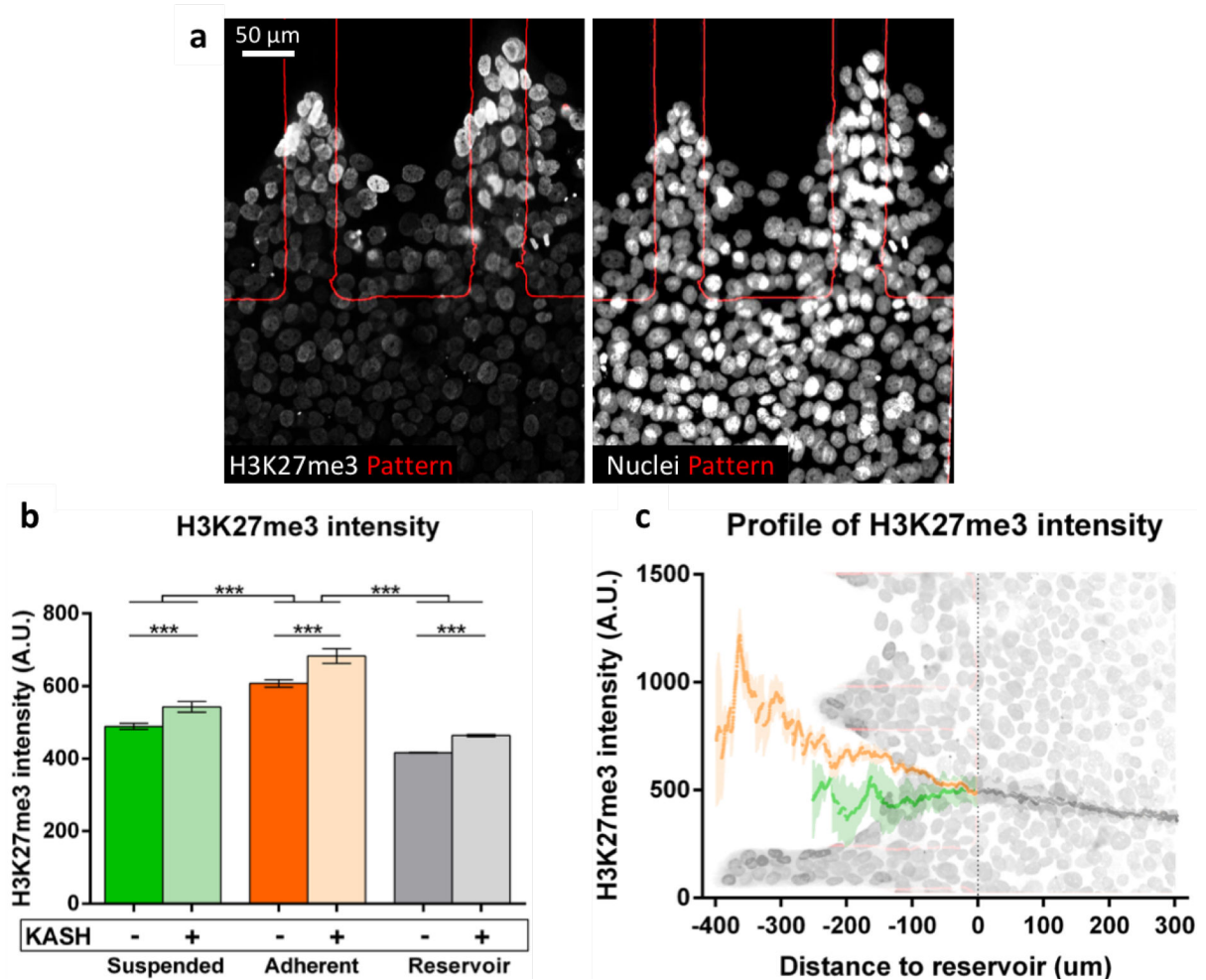


Figure V.9. La chromatine des cellules du front de migration adhérent est réprimée. (a) A gauche : immunomarquage de la méthylation H3K27me3. A droite : marquage nucléaire au DAPI. Les bords du motif de fibronectine sont en rouge. (b) La méthylation H3K27me3 est plus représentée dans la chromatine des cellules adhérentes que dans celle des cellules suspendues et du réservoir. La perturbation de l'ancrage des fibres d'actine au noyau par l'expression de KASH-TSMod augmente la méthylation H3K27me3 dans les trois populations cellulaires. (c) Profil d'intensité du marquage de la méthylation H3K27me3. Les cellules du front de migration adhérent activent Yap. La méthylation H3K27me3 diminue graduellement pour les cellules à l'arrière du front de migration.

Dans cette partie, nous avons voulu évaluer si les contraintes mécaniques générées lors de la cicatrisation de la peau agissent sur d'autres aspects de la régulation génique.

Une étude récente montre que l'étirement mécanique de cellules épidermiques primaires augmente l'activité du complexe de répression Polycomb qui est responsable de la tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me3) (Le et al., 2016). La méthylation H3K27me3 marque l'euchromatine accessible mais non-transcrite (Riising et al., 2014). Le et co-auteurs proposent que l'étirement des cellules induit la polymérisation de l'actine F ce qui diminue la quantité d'actine G dans la cellule. Par conséquent, la diminution de la quantité d'actine G nucléaire réduit l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase II et augmente la proportion d'euchromatine non-transcrite, marquée par le complexe de répression Polycomb par la méthylation H3K27me3. D'autre part, les

fibres d'actine cytoplasmique et les lamines A/C (LMNA/C) s'ancrent aux enveloppes nucléaires externe et interne, respectivement, grâce à la protéine Emerine (Emd). L'augmentation des fibres d'actine cytoplasmique entraîne la rétention de la protéine Emd sur l'enveloppe nucléaire externe. Sur l'enveloppe nucléaire interne, la diminution de la quantité d'Emd augmente la méthylation H3K27me3 de l'euchromatine non-transcrite par le complexe de repression Polycomb. En conclusion, le modèle proposé par Le et coauteurs explique comment les contraintes d'étirement et l'augmentation de l'actine F sont associées à l'inhibition de la transcription de l'euchromatine marquée par l'augmentation de la méthylation H3K27me3 dans des cellules épidermiques primaires (Le et al., 2016).

Pour évaluer le rôle des contraintes mécaniques sur la régulation de l'activité transcriptionnelle de l'euchromatine pendant la cicatrisation, nous avons immunomarcqué H3K27me3 dans les kératinocytes cultivés sur le motif de fibronectine, 48 heures après l'initiation de la migration. Le marquage H3K27me3 de l'euchromatine des cellules suspendues et des cellules du réservoir est plus faible que celui des cellules adhérentes (Fig. V.9. a, b). En mesurant le profil d'intensité du marquage H3K27me3, nous avons observé un gradient d'intensité depuis les cellules à l'avant du front de migration et vers le réservoir pour les cellules adhérentes mais pas pour les cellules suspendues (Fig. V.9. c). Dans le réservoir, le gradient d'intensité du marquage H3K27me3 est moins abrupt et il est orienté depuis les cellules suspendues et adhérentes et vers l'arrière du réservoir. En conclusion, le marquage de la méthylation H3K27me3 est moins représentée dans le noyau des cellules suspendues que dans le noyau des cellules adhérentes. De plus, la méthylation H3K27me3 de l'euchromatine des cellules adhérentes à l'avant du front est plus importante qu'à distance du front de migration. On peut en conclure que la transcription de l'euchromatine des cellules suspendues est augmentée alors que la transcription de l'euchromatine des cellules adhérente est diminuée. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'absence de contacts cellule-substrat dans les cellules suspendues est associée à la transcription de l'euchromatine alors que la migration des cellules sur le substrat de fibronectine inhibe l'expression de l'euchromatine. Ainsi, dans ce modèle, l'augmentation des fibres de stress et des contraintes mécaniques d'étirement dans les cellules suspendues sont associées à la réduction de la méthylation H3K27me3 et à l'augmentation de l'expression de l'euchromatine.

Pour étudier le rôle de l'interaction entre l'actine F et l'enveloppe nucléaire sur l'expression de l'euchromatine pendant la cicatrisation, nous avons exprimé le mutant de nesprine KASH-TSMod dans les kératinocytes cultivés sur le motif de fibronectine mimant la cicatrisation. La construction TSMod est utilisée à titre de rapporteur d'expression fluorescent. Dans les noyaux des cellules suspendues, adhérentes et du réservoir, l'expression de KASH-TSMod augmente l'intensité du marquage de H3K27me3 par rapport à celui des noyaux des cellules contrôle (Fig. V.9. b). L'intensité du marquage H3K27me3 dans les noyaux des cellules suspendues et du réservoir est inférieure à celle dans les noyaux des cellules adhérentes. En conclusion, l'expression de KASH-TSMod augmente la méthylation H3K27me3 dans les noyaux des trois populations de cellule mais conserve les différences d'expression entre les cellules suspendues, adhérentes et du réservoir. On peut en conclure que l'interaction entre l'actine et le noyau diminue la méthylation H3K27me3 et augmente l'expression de l'euchromatine pendant la cicatrisation épithéliale.

Ensemble, ces résultats suggèrent que l'augmentation de la fraction d'actine F par rapport à l'actine G dans les cellules suspendues augmente les interactions actine-noyau ce qui augmente l'expression de l'euchromatine et diminue la méthylation H3K27me3. En conclusion, la régulation de l'expression de l'euchromatine en réponse à l'étirement des cellules proposé par Le et associé ne permet pas

d'expliquer la régulation de l'expression de l'euchromatine dans les kératinocytes HaCaT cultivés sur le motif de fibronectine mimant la cicatrisation épithéliale.

Plusieurs arguments permettent d'expliquer les différences entre les deux modèles. D'abord, le modèle cellulaire utilisée est différent entre les deux études et la régulation de l'expression de l'euchromatine est hautement dépendant du type cellulaire. Les cellules utilisées par Le et associés sont des cellules épidermiques primaires qui sont probablement plus proches de la physiologie que les kératinocytes immortalisés de la lignée HaCaT. Ensuite, nous avons étudié la présence du marqueur de répression transcriptionnelle H3K27me3 en fonction des contraintes endogènes générées par les cellules alors que Le et associés ont appliqué contraintes d'étirement exogènes qui s'écartent des conditions physiologiques. Enfin, le modèle de cicatrisation *in vitro* permet l'étude de cellules en migration alors que l'étude rapportée par Le et associés s'intéresse à des cellules qui ne migrent pas. En conclusion, les contraintes d'étirement ont des effets opposés sur la régulation de l'expression de l'euchromatine dans le modèle publié par Le et associés et dans le modèle de cicatrisation épithéliale *in vitro*.

3.10 Résultats complémentaires : les filaments intermédiaires de kératine sont nécessaires à la cohésion de la monocouche de kératinocytes

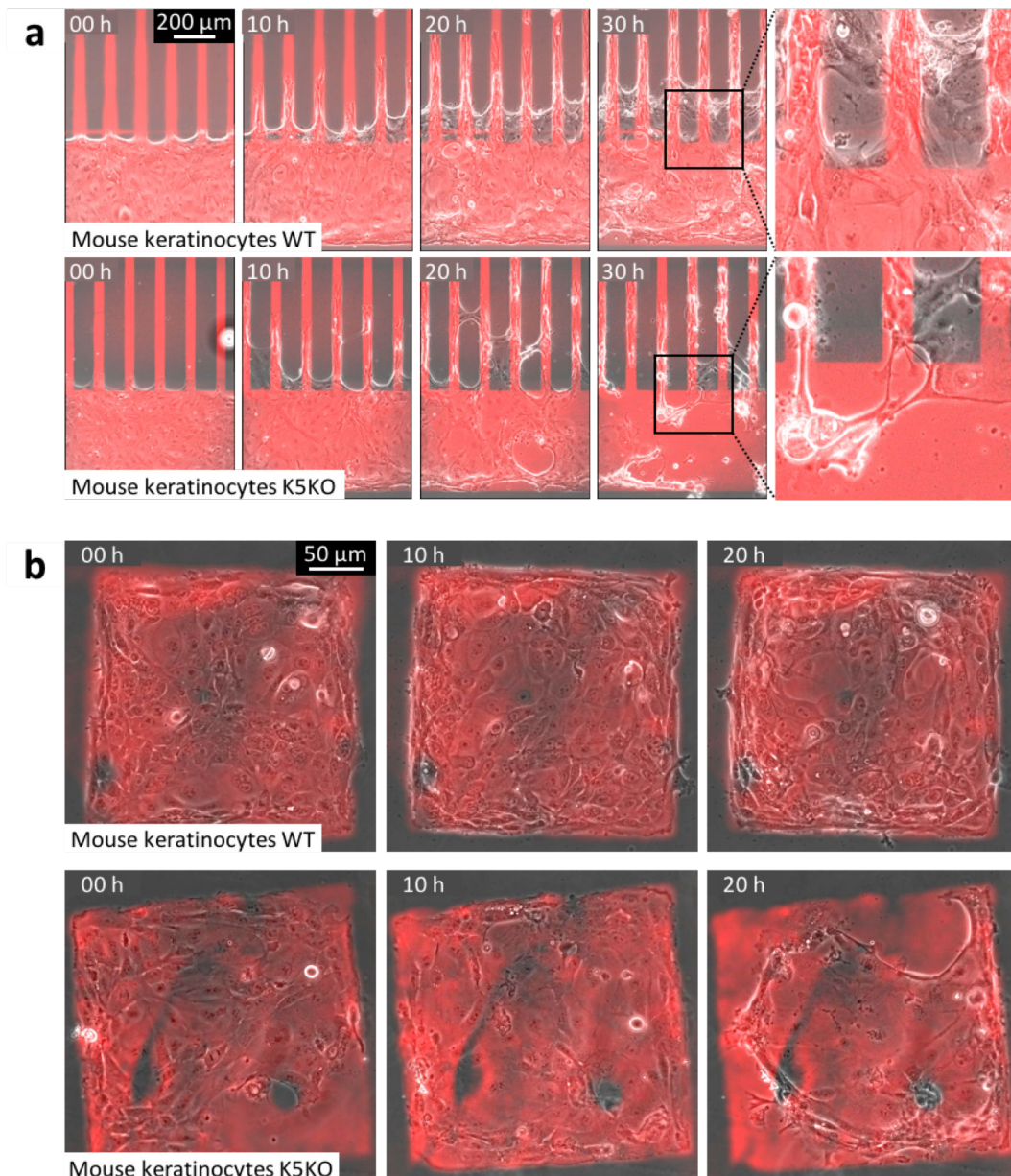


Figure V.10. Les kératinocytes de souris déficients en kératine peuvent établir des ponts suspendus. (a) Migration des kératinocytes de souris contrôle (WT, panneau du haut) ou déficient en kératine (K5KO, panneau du bas) sur le motif fibronectine du modèle de ponts suspendus. L'absence de kératines est compatible avec l'établissement de ponts épithéliaux suspendus mais l'épithélium n'est pas cohésif et collapse en agrégats cellulaires. **(b)** Kératinocytes de souris WT (haut) et K5KO (bas) confiné dans un carré de fibronectine de 500 µm. **(a, b)** Le manque de cohésion concerne aussi bien les cellules adhérentes que les cellules suspendues. En rouge, le motif de fibronectine.

Nous avons démontré que les jonctions adhérentes des kératinocytes suspendus sont soumises à des contraintes importantes générées par la contractilité de l'actomyosine. Cependant, parmi les lignées cellulaires étudiées au laboratoire, la formation des ponts suspendus n'est possible que pour les kératinocytes et les cellules épithéliales de cornée qui expriment abondamment les filaments intermédiaires de kératines K5/K14 et K12/K14, respectivement (Fuchs and Green, 1980; Tanifuji-Terai

et al., 2006). Les cellules de rein de chien (MDCK), qui expriment les filaments intermédiaires de kératine K8/K18 (Pasdar et al., 1991), migrent sur les bandes de fibronectine mais n'établissent pas de ponts suspendus. Les filaments intermédiaire de kératine des kératinocytes sont impliqués dans la répartition des contraintes mécaniques de l'épithélium (Ramms et al., 2013; Seltsmann et al., 2013a). *In vivo*, la mutation des gènes des kératines se traduit par la fragilité mécanique des kératinocytes et de la peau et entraîne des pathologies sévères comme l'épidermolyse bulleuse simple (*epidermolysis bullosa simplex*) (Chamcheu et al., 2011). Pour évaluer le rôle des filaments intermédiaires de kératine dans la formation des ponts suspendus de kératinocytes, nous avons forcé la migration de kératinocytes issus de souris de type sauvage (WT) ou déficientes en kératine K5 et K14 (K5KO) sur les motifs de fibronectine mimant la cicatrisation épithéliale *in vitro* (Seltsmann et al., 2013b; Vijayaraj et al., 2009).

Après l'initiation de la migration, les kératinocytes de souris sauvages établissent des ponts suspendus comparables à ceux obtenus avec les kératinocytes humains de la lignée HaCaT. La cohésion des ponts suspendus et de la monocouche de cellules dans le réservoir est maintenue au-delà de 30 heures après l'initiation de la migration (Fig. V.10. a). 10 heures après l'initiation de la migration, les kératinocytes K5KO établissent des ponts suspendus comparables à ceux observés avec les cellules WT. Cependant, après 20 heures de migration, les ponts suspendus de cellules K5KO sont déstabilisés et se disloquent en formant des agrégats de cellule en regard des bandes adhérentes de fibronectine (Fig. V.10. a). La cohésion de la monocouche de kératinocytes K5KO du réservoir est altérée 20 heures après l'initiation de la migration et entraîne la formation d'agrégats cellulaires à 30 heures. En conclusion, les kératinocytes de souris WT établissent des ponts suspendus qui sont stables au moins 30 heures alors que les kératinocytes de souris K5KO établissent des ponts suspendus qui se disloquent dès 20 heures après l'initiation de la migration. La monocouche de kératinocytes du réservoir est également déstabilisée. Ces résultats permettent de conclure que les filaments intermédiaires de kératines sont importants pendant la cicatrisation épithéliale pour la cohésion des ponts multicellulaires suspendus de kératinocytes. Les kératines sont également importantes pour la cohésion de la monocouche de kératinocytes adhérents à distance du front de migration.

Pour confirmer que les filaments intermédiaires de kératine sont importants pour la cohésion de monocouches adhérentes de kératinocytes, nous avons cultivé les kératinocytes de souris WT et K5KO en confinement sur des carrés de fibronectine de 500 μ m pendant 20 heures (Fig. V.10. b). Les kératinocytes WT maintiennent la cohésion du tissu pendant plus de 20 heures après l'ensemencement alors que la cohésion de la monocouche de kératinocytes K5KO est déstabilisée (Fig. V.10. b). En conclusion, contrairement aux kératinocytes WT, la monocouche de kératinocytes K5KO ne reste pas cohésive au-delà de 20 heures de culture. On peut en conclure que les filaments intermédiaires de kératine sont indispensables à la stabilité de l'épiderme en absence de blessure et de cicatrisation.

En conclusion, les kératinocytes de souris WT et de souris K5KO étendent des ponts suspendus dans le modèle de cicatrisation épidermique *in vitro*. Cependant, contrairement aux kératinocytes de souris WT, les ponts suspendus de kératinocytes K5KO sont rapidement déstabilisés après l'initiation de la migration. Ensemble, ces résultats démontrent que les filaments intermédiaires de kératine K5 et K14 ne sont pas nécessaires à l'établissement des ponts suspendus mais ils sont nécessaires au maintien de la cohésion de la monocouche épithéliale suspendue. Ensemble, ces résultats suggèrent que les

filaments intermédiaires de kératines des kératinocytes permettent de maintenir l'intégrité du tissu épidermique pendant la cicatrisation après une blessure mais aussi à l'homéostasie en absence de blessure. En absence de filaments intermédiaires de kératine, les kératinocytes peuvent étendre des ponts suspendus ce qui suggère que l'absence de formation des ponts suspendus par les cellules MDCK ne peut pas être expliquée par la nature des filaments intermédiaires de kératine que les cellules MDCK expriment.

CHAPITRE VI : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de cette thèse démontrent que les forces transmises aux contacts cellule-substrat sont associées à la relocalisation nucléaire de Yap et à la prolifération cellulaire pendant la cicatrisation épithéliale *in vitro*. De plus, nous avons montré que le renforcement des contacts cellule-cellule en absence de contacts cellule-substrat est associé à la localisation cytoplasmique de Yap et à l'inhibition de la prolifération.

La localisation nucléaire de Yap de cellules cultivées *in vitro* est associée à l'aire d'étalement, à la rigidité et à la composition du substrat (Dupont et al., 2011; Kim and Gumbiner, 2015). En parallèle, l'aire d'étalement, la rigidité et la composition du substrat sont corrélés aux forces de traction exercées par les adhésions focales (Borghi et al., 2012; Kubow et al., 2015; Trichet et al., 2012; Wang et al., 2002). L'adhésion des cellules à la fibronectine de la MEC est principalement médiée par les intégrines des adhésions focales (Lodish et al., 2000; Toda et al., 1987). Pour la première fois à notre connaissance, nos résultats démontrent que les forces transmises par les contacts cellule-substrat, probablement les adhésions focales, sont directement associées à la relocalisation nucléaire du cofacteur de transcription Yap.

La sous-unité $\beta 1$ des intégrines est communes aux intégrines réceptrices du collagène et de la fibronectine (McCall-Culbreath and Zutter, 2008; Schaffner et al., 2013). La localisation nucléaire de Yap est associée à l'étalement des cellules sur un substrat de collagène ou de fibronectine mais pas sur un substrat de laminine ou de poly-L-lysine (Kim and Gumbiner, 2015). La maturation d'une adhésion focale se caractérise par l'augmentation de sa taille, le recrutement de vinculine et l'augmentation des forces transmises au substrat (Hirata et al., 2014; Oakes et al., 2012; Sarangi et al., 2017). Pour déterminer rigoureusement la nature des contacts cellule-substrat impliqués dans la régulation de Yap en réponse aux forces de traction de kératinocytes cultivés en confinement sur un motif de fibronectine, il serait intéressant d'évaluer la distribution de la vinculine des adhésions focales. On pourrait également évaluer simultanément la localisation de Yap et les forces transmises sur les adhésions focales en utilisant la construction vinculine-TSMod (Grashoff et al., 2010) ou en plaçant le capteur de force TSMod au sein de la sous-unité $\beta 1$.

Les forces de traction des cellules sont générées par la contractilité de l'actomyosine et transmises au substrat par les adhésions focales (Geiger et al., 2009; Sarangi et al., 2017). La vinculine se lie à la taline des adhésions focales sous tension ce qui permet la régulation mécanosensible de plusieurs voies de signalisation (Carisey and Ballestrem, 2011; Carisey et al., 2013; Hernández-Varas et al., 2015; Hirata et al., 2014; del Rio et al., 2009; Yao et al., 2014a). De façon importante, la vinculine et la FAK sont en compétition pour la liaison à la paxilline (Turner, 2000). L'extinction de l'expression de la vinculine augmente le recrutement et l'activité de la FAK aux adhésions focales et augmente la survie cellulaire (Subauste et al., 2004). En parallèle, la kinase FAK est associée à la localisation nucléaire de Yap par inhibition de la voie Hippo (Kim and Gumbiner, 2015; Serrano et al., 2013). Dans les adhésions focales sous tension, on peut spéculer que le recrutement mécanosensible de la vinculine sur la taline

libère des sites de liaison sur la paxilline ce qui permet le recrutement de la FAK. Ainsi, la FAK serait indirectement activée par les forces sur les adhésions focales et permettrait l'augmentation de la prolifération cellulaire par activation de Yap. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer l'activité de FAK en fonction des forces transmises par les adhésions focales et de la localisation de Yap, par exemple, en cultivant des cellules sur des substrats de rigidité différente.

Le rôle de la voie Hippo reste contesté dans régulation de Yap par des facteurs mécaniques (Chakraborty et al., 2017; Dupont et al., 2011; Wada et al., 2011; Zhao et al., 2012). L'activation des kinases Mst1/2 et Lats1/2 de la voie Hippo induit la phosphorylation de Yap sur la serine 127 (phospho-YAP-Ser127). Pour évaluer le rôle de cette voie de signalisation sur la régulation de Yap en absence de contacts cellule-substrat, il serait intéressant d'étudier la localisation de Yap après avoir réprimé les kinases Mst1/2 et Lats1/2 de la voie Hippo ou la proportion de phospho-Yap-Ser127.

L'engagement des jonctions adhérentes d'un épithélium participent à la CIP par activation de la voie Hippo et l'inhibition de Yap (Benham-Pyle et al., 2015; Li et al., 2016; Silvis et al., 2011). Plus précisément, la localisation cytoplasmique de Yap et l'inhibition de la croissance du feuillet cellulaire sont associées aux forces transmises par les cadhérines des jonctions adhérentes (Hirata et al., 2017). Dans le chapitre III, nous avons montré que les contraintes au sein du tissu sont associées à la relocalisation cytoplasmique de Yap. Pour montrer que les contraintes au sein du tissu sont associées à la mise en tension des jonctions adhérentes, il serait intéressant de mesurer les forces transmises par la E-cadhérine-TSMod simultanément à la localisation de Yap-GFP dans les cellules vivantes. Le co-marquage de l'épitope $\alpha 18$ de l' α -caténine et de Yap de cellules fixées permettrait d'obtenir des informations similaires. L'épitope $\alpha 18$ est accessible aux anticorps uniquement par le dépliement de l' α -caténine en réponse à une force (Nagafuchi and Tsukita, 1994; Yonemura et al., 2010).

Bazellères et associées ont montré que la concentration de P-cadhérine, mais pas de E-cadhérine, est corrélée aux tensions intercellulaires (Bazellères et al., 2015). Dans le chapitre V, nous avons montré que le FRET de la E-cadhérine-TSMod des contacts intercellulaires suspendus est significativement diminué par rapport aux contacts des cellules adhérentes. Ces résultats permettent de conclure que les contraintes sur la E-cadhérine sont plus importantes dans les cellules suspendues. Cependant, la différence de FRET que nous avons obtenue est faible (1%). En consultant la courbe de calibration du module TSMod (cf. Chapitre II : Matériel et Méthodes), une différence de 1% d'efficacité de FRET correspond à une différence de force de l'ordre du femto-Newton (fN). La P-cadhérine est présente aux jonctions des cellules suspendues et co-localise avec les extrémités des fibres d'actines de cellules voisines (Fig. V.3. c). Il est possible que les tensions générées par l'actomyosine (Fig. V.5. b) soit transmises aux jonctions adhérentes principalement par la P-cadhérine, et non par la E-cadhérine. Pour valider cette hypothèse, on pourrait mesurer les forces transmises aux contacts intercellulaires grâce à une construction P-cadhérine-TSMod.

Les fibres d'actomyosine sont ancrées à la fois aux adhésions focales et aux jonctions adhérentes et permettent la régulation croisée de ces complexes d'adhésion (Borghi et al., 2010; Mui et al., 2016). La contractilité de l'actomyosine est impliquée à la fois dans l'activation de Yap par les adhésions focales et dans l'inhibition de Yap par les jonctions adhérentes (Chapitre III et Chapitre V) (Aragona et al., 2013; Das et al., 2016; Hirata et al., 2017). Il est probable que la contractilité de l'actomyosine n'ait qu'un rôle indirect sur la régulation de la localisation Yap et la prolifération cellulaire en régulant les forces transmises aux adhésions focales et aux jonctions adhérentes.

Dans un tissu épithélial, Yap régule la CIP en réponse aux forces générées par l'actomyosine et transmises par les adhésions focales et par les jonctions adhérentes. La défaillance des mécanismes de contrôle de la prolifération entraîne la croissance tumorale et le cancer. La croissance des tumeurs est associée à l'engagement des intégrines (Levental et al., 2009) alors que la réexpression de la E-cadhérine inhibe la prolifération cancéreuses (Croix et al., 1998). En accord avec la littérature et avec nos résultats, la relocalisation nucléaire de Yap et la prolifération sont augmentées par les forces sur les contacts cellule-substrat et inhibées par les forces sur les jonctions adhérentes (Hirata et al., 2017). Ensemble, ces données suggèrent que la prolifération des cellules épithéliales est contrôlée par la balance entre forces aux adhésions focales et aux jonctions adhérentes.

In vitro, les forces de traction d'un îlot cellulaire ou d'une monocouche en confinement sont maximales à la périphérie du tissu (Maruthamuthu et al., 2011). Les jonctions adhérentes assurent la transmission des contraintes au sein de l'îlot (Mertz et al., 2012, 2013). Les cellules à la périphérie du groupe de cellules prolifèrent plus que les autres (Nelson et al., 2005). En mesurant le RNC de Yap de kératinocytes en confinement, nous avons observé que Yap est nucléaire dans les cellules du bord du motif de fibronectine (quantifications non montrées, cf. Fig. III.4 d et f). A la lumière de nos résultats, la localisation nucléaire de Yap et l'augmentation de la prolifération des cellules au bord d'un îlot pourraient être expliquées à la fois par la diminution de la surface des contacts cellule-cellule et par l'augmentation des forces de traction sur le substrat. Au contraire, dans le reste de l'îlot, la diminution de la prolifération s'explique par la diminution des forces de traction et des contraintes sur les jonctions adhérentes maximale.

In vivo, les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme sont en interaction avec la LB et sont unipotents. Le maintien de l'unipotence des kératinocytes basaux permet d'assurer l'homéostasie du tissu en renouvelant continuellement les kératinocytes des couches supérieures (Simpson et al., 2011). En effet, les kératinocytes des couches supérieures se sont engagés dans la voie de différenciation terminale et ont perdu leur unipotence (Simpson et al., 2011). La localisation nucléaire de Yap permet le maintien de l'unipotence des kératinocytes basaux (Schlegelmilch et al., 2011; Totaro et al., 2017). On peut rétablir l'unipotence de cellules différenciées par la réexpression transitoire de Yap (Totaro et al., 2017). Nos résultats apportent des compléments sur le mécanisme de régulation de Yap et de la prolifération dans la peau. Le modèle de cellules suspendues démontre que les contacts cellule-substrat sont nécessaires à la localisation nucléaire de Yap et à la prolifération des kératinocytes de la couche basale. En absence de contacts cellule-substrat, Yap est cytoplasmique et la prolifération est inhibée dans les cellules des couches supérieures. De plus, l'augmentation des contraintes sur les adhésions focales des kératinocytes de la couche basale pendant la cicatrisation pourrait augmenter la localisation nucléaire de Yap et la prolifération.

De façon plus générale, la régulation de Yap par les forces engagées sur les adhésions focales pourrait permettre de réguler la prolifération et la différenciation cellulaire au cours de la migration cellulaire pendant l'embryogénèse, la cicatrisation épithéliale ou l'invasion métastatique (Le et al., 2016; Totaro et al., 2017).

L'ensemble de cette thèse tend à démontrer que les contraintes sur les adhésions focales sont associées à la relocalisation nucléaire de Yap et à l'augmentation de la prolifération pendant la cicatrisation épithéliale. Au contraire, les contraintes aux jonctions adhérentes sont associées à la relocalisation cytoplasmique de Yap. La contractilité de l'actomyosine est probablement importante

pour réguler Yap en exerçant des contraintes sur les contact cellule-substrat ou sur les jonctions intercellulaires. De façon plus marginale, nous avons montré que les contacts cellules substrat et la contractilité de l'actomyosine agissent en synergie pendant la relaxation d'un tissu après une déformation mécanique.

RÉFÉRENCES

- Abercrombie, M. (1967). Contact inhibition: the phenomenon and its biological implications. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 26, 249.
- Abercrombie, M., and Heaysman, J.E. (1953). Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. I. Speed of movement of chick heart fibroblasts in relation to their mutual contacts. *Exp. Cell Res.* 5, 111–131.
- Abercrombie, M., and Heaysman, J.E. (1954). Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. II. Monolayering of fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 6, 293–306.
- Adams, C.L., Nelson, W.J., and Smith, S.J. (1996). Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 135, 1899–1911.
- Al-Amoudi, A., Diez, D.C., Betts, M.J., and Frangakis, A.S. (2007). The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature* 450, 832–837.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Raff, M., and Roberts, K. (2002). *Molecular Biology of the Cell 4th Edition: International Student Edition* (Routledge).
- Amann, K.J., and Pollard, T.D. (2001). The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat. Cell Biol.* 3, 306–310.
- Angst, B.D., Marcozzi, C., and Magee, A.I. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell Sci.* 114, 629–641.
- Anon, E., Serra-Picamal, X., Hersen, P., Gauthier, N.C., Sheetz, M.P., Trepac, X., and Ladoux, B. (2012). Cell crawling mediates collective cell migration to close undamaged epithelial gaps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 10891–10896.
- Antoine, E.E., Vlachos, P.P., and Rylander, M.N. (2014). Review of Collagen I Hydrogels for Bioengineered Tissue Microenvironments: Characterization of Mechanics, Structure, and Transport. *Tissue Eng. Part B Rev.* 20, 683–696.
- Aoki, V., Millikan, R.C., Rivitti, E.A., Hans-Filho, G., Eaton, D.P., Warren, S.J., Li, N., Hilario-Vargas, J., Hoffmann, R.G., and Diaz, L.A. (2004). Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, (Elsevier), pp. 34–40.
- Applewhite, D.A., Barzik, M., Kojima, S., Svitkina, T.M., Gertler, F.B., and Borisy, G.G. (2007). Ena/VASP Proteins Have an Anti-Capping Independent Function in Filopodia Formation. *Mol. Biol. Cell* 18, 2579–2591.
- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giulitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., and Piccolo, S. (2013). A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors. *Cell* 154, 1047–1059.

- Arend, R.C., Londoño-Joshi, A.I., Straughn, J.M., and Buchsbaum, D.J. (2013). The Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer: a review. *Gynecol. Oncol.* **131**, 772–779.
- Arjonen, A., Kaukonen, R., and Ivaska, J. (2011). Filopodia and adhesion in cancer cell motility. *Cell Adhes. Migr.* **5**, 421–430.
- Askari, J.A., Buckley, P.A., Mould, A.P., and Humphries, M.J. (2009). Linking integrin conformation to function. *J. Cell Sci.* **122**, 165–170.
- Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., et al. (2014). YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* **158**, 157–170.
- Babic, A.M., Kireeva, M.L., Kolesnikova, T.V., and Lau, L.F. (1998). CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 6355–6360.
- Babic, A.M., Chen, C.-C., and Lau, L.F. (1999). Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin $\alpha\beta$ 3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2958–2966.
- Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., and Addadi, L. (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell Biol.* **3**, 466–472.
- Bao, W., and Strömblad, S. (2002). Use of an Immobilized Monoclonal Antibody to Examine Integrin α 5 β 1 Signaling Independent of Cell Spreading. *Biol. Proced. Online* **4**, 81–87.
- Bazellères, E., Conte, V., Elosegui-Artola, A., Serra-Picamal, X., Bintanel-Morcillo, M., Roca-Cusachs, P., Muñoz, J.J., Sales-Pardo, M., Guimerà, R., and Trepas, X. (2015). Control of cell–cell forces and collective cell dynamics by the intercellular adhesome. *Nat. Cell Biol.* **17**, 409–420.
- Bazzi, H., and Christiano, A.M. (2007). Broken hearts, woolly hair, and tattered skin: when desmosomal adhesion goes awry. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 515–520.
- Bear, J.E., and Gertler, F.B. (2009). Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. *J. Cell Sci.* **122**, 1947–1953.
- Begnaud, S., Chen, T., Delacour, D., Mège, R.-M., and Ladoux, B. (2016). Mechanics of epithelial tissues during gap closure. *Curr. Opin. Cell Biol.* **42**, 52–62.
- Bekirov, I.H., Needleman, L.A., Zhang, W., and Benson, D.L. (2002). Identification and localization of multiple classic cadherins in developing rat limbic system. *Neuroscience* **115**, 213–227.
- Belin, B.J., Goins, L.M., and Mullins, R.D. (2014). Comparative analysis of tools for live cell imaging of actin network architecture. *Bioarchitecture* **4**, 189–202.

- Bement, W.M., Forscher, P., and Mooseker, M.S. (1993). A novel cytoskeletal structure involved in purse string wound closure and cell polarity maintenance. *J. Cell Biol.* **121**, 565–578.
- Benham-Pyle, B.W., Pruitt, B.L., and Nelson, W.J. (2015). Mechanical strain induces E-cadherin-dependent Yap1 and β -catenin activation to drive cell cycle entry. *Science* **348**, 1024–1027.
- Beningo, K.A., Lo, C.-M., and Wang, Y.-L. (2002). Flexible polyacrylamide substrata for the analysis of mechanical interactions at cell-substratum adhesions. *Methods Cell Biol.* **69**, 325–339.
- Berika, M., and Garrod, D. (2014). Desmosomal adhesion in vivo. *Cell Commun. Adhes.* **21**, 65–75.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* **94**, 235–263.
- Block, E.R., Matela, A.R., SundarRaj, N., Iszkula, E.R., and Klarlund, J.K. (2004). Wounding Induces Motility in Sheets of Corneal Epithelial Cells through Loss of Spatial Constraints ROLE OF HEPARIN-BINDING EPIDERMAL GROWTH FACTOR-LIKE GROWTH FACTOR SIGNALING. *J. Biol. Chem.* **279**, 24307–24312.
- Bockaert, J., and Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **18**, 1723–1729.
- Bohil, A.B., Robertson, B.W., and Cheney, R.E. (2006). Myosin-X is a molecular motor that functions in filopodia formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 12411–12416.
- Borghi, N., Lowndes, M., Maruthamuthu, V., Gardel, M.L., and Nelson, W.J. (2010). Regulation of cell motile behavior by crosstalk between cadherin- and integrin-mediated adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 13324–13329.
- Borghi, N., Sorokina, M., Shcherbakova, O.G., Weis, W.I., Pruitt, B.L., Nelson, W.J., and Dunn, A.R. (2012). E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell–cell contacts upon externally applied stretch. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 12568–12573.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**, 761–771.
- Broaders, K.E., Cerchiari, A.E., and Gartner, Z.J. (2015). Coupling between apical tension and basal adhesion allow epithelia to collectively sense and respond to substrate topography over long distances. *Integr. Biol.* **7**, 1611–1621.
- Brock, A., Chang, E., Ho, C.-C., LeDuc, P., Jiang, X., Whitesides, G.M., and Ingber, D.E. (2003). Geometric determinants of directional cell motility revealed using microcontact printing. *Langmuir* **19**, 1611–1617.

- Brock, J., Midwinter, K., Lewis, J., and Martin, P. (1996). Healing of incisional wounds in the embryonic chick wing bud: characterization of the actin purse-string and demonstration of a requirement for Rho activation. *J. Cell Biol.* **135**, 1097–1107.
- Bruckner-Tuderman, L. (2010). Dystrophic epidermolysis bullosa: pathogenesis and clinical features. *Dermatol. Clin.* **28**, 107–114.
- Brugués, A., Anon, E., Conte, V., Veldhuis, J.H., Gupta, M., Colombelli, J., Muñoz, J.J., Brodland, G.W., Ladoux, B., and Trepap, X. (2014). Forces driving epithelial wound healing. *Nat. Phys.* **10**, 683–690.
- Busk, M., Pytela, R., and Sheppard, D. (1992). Characterization of the integrin alpha v beta 6 as a fibronectin-binding protein. *J. Biol. Chem.* **267**, 5790–5796.
- Bustelo, X.R. (2010). A transcriptional cross-talk between RhoA and c-Myc inhibits the RhoA/Rock-dependent cytoskeleton. *Small GTPases* **1**, 69–74.
- Butler, J.P., Tolić-Nørrelykke, I.M., Fabry, B., and Fredberg, J.J. (2002). Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**, C595–605.
- Calvo, F., Ege, N., Grande-Garcia, A., Hooper, S., Jenkins, R.P., Chaudhry, S.I., Harrington, K., Williamson, P., Moeendarbary, E., Charras, G., et al. (2013). Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **15**, 637–646.
- Camargo, F.D., Gokhale, S., Johnnidis, J.B., Fu, D., Bell, G.W., Jaenisch, R., and Brummelkamp, T.R. (2007). YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Curr. Biol.* **17**, 2054–2060.
- Campos, I., Geiger, J.A., Santos, A.C., Carlos, V., and Jacinto, A. (2010). Genetic Screen in *Drosophila melanogaster* Uncovers a Novel Set of Genes Required for Embryonic Epithelial Repair. *Genetics* **184**, 129–140.
- Carisey, A., and Ballestrem, C. (2011). Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 157–163.
- Carisey, A., Tsang, R., Greiner, A.M., Nijenhuis, N., Heath, N., Nazgiewicz, A., Kemkemer, R., Derby, B., Spatz, J., and Ballestrem, C. (2013). Vinculin Regulates the Recruitment and Release of Core Focal Adhesion Proteins in a Force-Dependent Manner. *Curr. Biol.* **23**, 271–281.
- Carr, H.S., Zuo, Y., Oh, W., and Frost, J.A. (2013). Regulation of FAK activation, breast cancer cell motility and amoeboid invasion by the RhoA GEF Net1. *Mol. Cell. Biol.* MCB.00175-13.
- Carstanjen, D., Yamauchi, A., Koornneef, A., Zang, H., Filippi, M.-D., Harris, C., Towe, J., Atkinson, S., Zheng, Y., Dinuer, M.C., et al. (2005). Rac2 regulates neutrophil chemotaxis, superoxide production, and myeloid colony formation through multiple distinct effector pathways. *J. Immunol.* **174**, 4613–4620.

- Castellano, F., Le Clainche, C., Patin, D., Carlier, M.F., and Chavrier, P. (2001). A WASp-VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *EMBO J.* **20**, 5603–5614.
- Chakraborty, S., Njah, K., Pobbati, A.V., Lim, Y.B., Raju, A., Lakshmanan, M., Tergaonkar, V., Lim, C.T., and Hong, W. (2017). Agrin as a mechanotransduction signal regulating YAP through the Hippo pathway. *Cell Rep.* **18**, 2464–2479.
- Chamcheu, J.C., Siddiqui, I.A., Syed, D.N., Adhami, V.M., Liovic, M., and Mukhtar, H. (2011). Keratin Gene Mutations in Disorders of Human Skin and its Appendages. *Arch. Biochem. Biophys.* **508**, 123–137.
- Chan, S.W., Lim, C.J., Chong, Y.F., Pobbati, A.V., Huang, C., and Hong, W. (2011). Hippo pathway-independent restriction of TAZ and YAP by angiomin. *J. Biol. Chem.* **286**, 7018–7026.
- Charras, G., and Paluch, E. (2008). Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 730–736.
- Chaudhuri, O., Parekh, S.H., and Fletcher, D.A. (2007). Reversible stress softening of actin networks. *Nature* **445**, 295–298.
- Chen, Y., and Dokholyan, N.V. (2006). Insights into Allosteric Control of Vinculin Function from Its Large Scale Conformational Dynamics. *J. Biol. Chem.* **281**, 29148–29154.
- Chen, C., Krishnan, R., Zhou, E., Ramachandran, A., Tambe, D., Rajendran, K., Adam, R.M., Deng, L., and Fredberg, J.J. (2010a). Fluidization and resolidification of the human bladder smooth muscle cell in response to transient stretch. *PloS One* **5**, e12035.
- Chen, C.-L., Gajewski, K.M., Hamaratoglu, F., Bossuyt, W., Sansores-Garcia, L., Tao, C., and Halder, G. (2010b). The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 15810–15815.
- Chen, D., Sun, Y., Wei, Y., Zhang, P., Rezaeian, A.H., Teruya-Feldstein, J., Gupta, S., Liang, H., Lin, H.-K., Hung, M.-C., et al. (2012). LIFR is a breast cancer metastasis suppressor upstream of the Hippo-YAP pathway and a prognostic marker. *Nat. Med.* **18**, 1511–1517.
- Cheng, X., and Koch, P.J. (2004). In vivo function of desmosomes. *J. Dermatol.* **31**, 171–187.
- Chesarone, M.A., DuPage, A.G., and Goode, B.L. (2010). Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 62–74.
- Chidgey, M., and Dawson, C. (2007). Desmosomes: a role in cancer? *Br. J. Cancer* **96**, 1783–1787.
- Chidgey, M., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Cruchley, A., Hail, C., Kirk, S., Merritt, A., North, A., Tselepis, C., Hewitt, J., et al. (2001). Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation. *J Cell Biol* **155**, 821–832.

- Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., and Horwitz, A.R. (2008). Actin and α -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1039–1050.
- Chorev, D.S., Moscovitz, O., Geiger, B., and Sharon, M. (2014). Regulation of focal adhesion formation by a vinculin-Arp2/3 hybrid complex. *Nat. Commun.* *5*, ncomms4758.
- Chu, P.G., and Weiss, L.M. (2002). Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* *40*, 403–439.
- Clark, R.A. (1990). Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. *J. Invest. Dermatol.* *94*, 128S–134S.
- Clark, A.G., and Vignjevic, D.M. (2015). Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr. Opin. Cell Biol.* *36*, 13–22.
- Cole, B.K., Curto, M., Chan, A.W., and McClatchey, A.I. (2008). Localization to the Cortical Cytoskeleton Is Necessary for Nf2/Merlin-Dependent Epidermal Growth Factor Receptor Silencing. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 1274–1284.
- Collins, C., and Nelson, W.J. (2015). Running with neighbors: coordinating cell migration and cell–cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* *36*, 62–70.
- Coló, G.P., Hernández-Varas, P., Lock, J., Bartolomé, R.A., Arellano-Sánchez, N., Strömblad, S., and Teixidó, J. (2012). Focal adhesion disassembly is regulated by a RIAM to MEK-1 pathway. *J Cell Sci* *125*, 5338–5352.
- Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., Inui, M., Montagner, M., Parenti, A.R., Poletti, A., et al. (2011). The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* *147*, 759–772.
- Cosgrove, B.D., Mui, K.L., Driscoll, T.P., Caliari, S.R., Mehta, K.D., Assoian, R.K., Burdick, J.A., and Mauck, R.L. (2016). N-cadherin adhesive interactions modulate matrix mechanosensing and fate commitment of mesenchymal stem cells. *Nat. Mater.* *15*, 1297–1306.
- Croix, B.S., Sheehan, C., Rak, J.W., Flørenes, V.A., Slingerland, J.M., and Kerbel, R.S. (1998). E-cadherin–dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1. *J. Cell Biol.* *142*, 557–571.
- Curto, M., Cole, B.K., Lallemand, D., Liu, C.-H., and McClatchey, A.I. (2007). Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J. Cell Biol.* *177*, 893–903.
- Dang, I., and Gautreau, A. (2012). Evidence for a cell cycle checkpoint that senses branched actin in the lamellipodium. *BioEssays* *34*, 1021–1024.
- Danjo, Y., and Gipson, I.K. (1998). Actin “purse string” filaments are anchored by E-cadherin-mediated adherens junctions at the leading edge of the epithelial wound, providing coordinated cell movement. *J. Cell Sci.* *111* (Pt 22), 3323–3332.

- Danjo, Y., and Gipson, I.K. (2002). Specific transduction of the leading edge cells of migrating epithelia demonstrates that they are replaced during healing. *Exp. Eye Res.* **74**, 199–204.
- Das, A., Fischer, R.S., Pan, D., and Waterman, C.M. (2016). YAP Nuclear Localization in the Absence of Cell-Cell Contact Is Mediated by a Filamentous Actin-dependent, Myosin II- and Phospho-YAP-independent Pathway during Extracellular Matrix Mechanosensing. *J. Biol. Chem.* **291**, 6096–6110.
- Das, T., Safferling, K., Rausch, S., Grabe, N., Boehm, H., and Spatz, J.P. (2015). A molecular mechanotransduction pathway regulates collective migration of epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* **17**, 276–287.
- Dominguez, R., and Holmes, K.C. (2011). Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* **40**, 169–186.
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed, M.F., Anders, R.A., Maitra, A., and Pan, D. (2007). Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* **130**, 1120–1133.
- Doxzen, K., Vedula, S.R.K., Leong, M.C., Hirata, H., Gov, N.S., Kabla, A.J., Ladoux, B., and Lim, C.T. (2013). Guidance of collective cell migration by substrate geometry. *Integr. Biol.* **5**, 1026–1035.
- le Duc, Q., Shi, Q., Blonk, I., Sonnenberg, A., Wang, N., Leckband, D., and de Rooij, J. (2010). Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *J. Cell Biol.* **189**, 1107–1115.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **474**, 179–183.
- Eagle, H., and Levine, E.M. (1967). Growth regulatory effects of cellular interaction. *Nature* **213**, 1102–1106.
- Eferl, R., and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 859–868.
- Eisenhoffer, G.T., and Rosenblatt, J. (2013). Bringing balance by force: live cell extrusion controls epithelial cell numbers. *Trends Cell Biol.* **23**, 185–192.
- Eisenhoffer, G.T., Loftus, P.D., Yoshigi, M., Otsuna, H., Chien, C.-B., Morcos, P.A., and Rosenblatt, J. (2012). Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature* **484**, 546–549.
- Elbediwy, A., Vincent-Mistiaen, Z.I., and Thompson, B.J. (2016). YAP and TAZ in epithelial stem cells: A sensor for cell polarity, mechanical forces and tissue damage. *Bioessays* **38**, 644–653.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**, 677–689.

- Etienne-Manneville, S. (2013). Microtubules in cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 471–499.
- Etournay, R., Merkel, M., Popović, M., Brandl, H., Dye, N.A., Aigouy, B., Salbreux, G., Eaton, S., and Jülicher, F. (2016). TissueMiner: A multiscale analysis toolkit to quantify how cellular processes create tissue dynamics. *Elife* 5, e14334.
- Fackler, O.T., and Grosse, R. (2008). Cell motility through plasma membrane blebbing. *J. Cell Biol.* 181, 879–884.
- Fan, R., Kim, N.-G., and Gumbiner, B.M. (2013). Regulation of Hippo pathway by mitogenic growth factors via phosphoinositide 3-kinase and phosphoinositide-dependent kinase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 2569–2574.
- Farooqui, R., and Fenteany, G. (2005). Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement. *J Cell Sci* 118, 51–63.
- Fawcett, D.W. (1961). Intercellular bridges. *Exp. Cell Res.* 8, 174–187.
- Felsenfeld, D.P., Schwartzberg, P.L., Venegas, A., Tse, R., and Sheetz, M.P. (1999). Selective regulation of integrin--cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src. *Nat. Cell Biol.* 1, 200–206.
- Fenteany, G., Janmey, P.A., and Stossel, T.P. (2000). Signaling pathways and cell mechanics involved in wound closure by epithelial cell sheets. *Curr. Biol.* 10, 831–838.
- Fernández-Sánchez, M.E., Barbier, S., Whitehead, J., Béalle, G., Michel, A., Latorre-Ossa, H., Rey, C., Fouassier, L., Claperon, A., Brullé, L., et al. (2015). Mechanical induction of the tumorigenic [bgr]-catenin pathway by tumour growth pressure. *Nature* 523, 92–95.
- Fine, J.-D., Bruckner-Tuderman, L., Eady, R.A.J., Bauer, E.A., Bauer, J.W., Has, C., Heagerty, A., Hintner, H., Hovnanian, A., Jonkman, M.F., et al. (2014). Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J. Am. Acad. Dermatol.* 70, 1103–1126.
- Fink, J., Théry, M., Azoune, A., Dupont, R., Chatelain, F., Bornens, M., and Piel, M. (2007). Comparative study and improvement of current cell micro-patterning techniques. *Lab. Chip* 7, 672–680.
- Fischer, M., Rikeit, P., Knaus, P., and Coirault, C. (2016). YAP-Mediated Mechanotransduction in Skeletal Muscle. *Front. Physiol.* 7.
- Florian, P., Schöneberg, T., Schulzke, J.D., Fromm, M., and Gitter, A.H. (2002). Single-cell epithelial defects close rapidly by an actinomyosin purse string mechanism with functional tight junctions. *J. Physiol.* 545, 485–499.
- Fontao, L., Favre, B., Riou, S., Geerts, D., Jaunin, F., Saurat, J.-H., Green, K.J., Sonnenberg, A., and Borradori, L. (2003). Interaction of the bullous pemphigoid antigen 1 (BP230) and

desmoplakin with intermediate filaments is mediated by distinct sequences within their COOH terminus. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1978–1992.

Freedberg, I.M., Tomic-Canic, M., Komine, M., and Blumenberg, M. (2001). Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 633–640.

Friedl, P. (2004). Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 14–23.

Fuchs, E., and Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* **19**, 1033–1042.

Gaffney, C.J., Oka, T., Mazack, V., Hilman, D., Gat, U., Muramatsu, T., Inazawa, J., Golden, A., Carey, D.J., Farooq, A., et al. (2012). Identification, basic characterization and evolutionary analysis of differentially spliced mRNA isoforms of human YAP1 gene. *Gene* **509**, 215–222.

Geiger, B., Spatz, J.P., and Bershadsky, A.D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 21–33.

Gershengorn, M.C., and Osman, R. (2001). Minireview: Insights into G Protein-Coupled Receptor Function Using Molecular Models 1. *Endocrinology* **142**, 2–10.

Getsios, S., Huen, A.C., and Green, K.J. (2004). Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 271–281.

Ghassemi, S., Meacci, G., Liu, S., Gondarenko, A.A., Mathur, A., Roca-Cusachs, P., Sheetz, M.P., and Hone, J. (2012). Cells test substrate rigidity by local contractions on submicrometer pillars. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 5328–5333.

Gheldof, A., and Berx, G. (2013). Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **116**, 317–336.

Gipson, I.K. (1992). Adhesive mechanisms of the corneal epithelium. *Acta Ophthalmol. Suppl.* **13–17**.

Glentis, A., Gurchenkov, V., and Vignjevic, D.M. (2014). Assembly, heterogeneity, and breaching of the basement membranes. *Cell Adhes. Migr.* **8**, 236–245.

Golomb, E., Ma, X., Jana, S.S., Preston, Y.A., Kawamoto, S., Shoham, N.G., Goldin, E., Conti, M.A., Sellers, J.R., and Adelstein, R.S. (2004). Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J. Biol. Chem.* **279**, 2800–2808.

Gosavi, P., Kundu, S.T., Khapare, N., Sehgal, L., Karkhanis, M.S., and Dalal, S.N. (2011). E-cadherin and plakoglobin recruit plakophilin3 to the cell border to initiate desmosome assembly. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 1439–1454.

Goult, B.T., Zacharchenko, T., Bate, N., Tsang, R., Hey, F., Gingras, A.R., Elliott, P.R., Roberts, G.C.K., Ballestrem, C., Critchley, D.R., et al. (2013). RIAM and vinculin binding to talin are

mutually exclusive and regulate adhesion assembly and turnover. *J. Biol. Chem.* 288, 8238–8249.

Grashoff, C., Hoffman, B.D., Brenner, M.D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M.T., McLean, M.A., Sligar, S.G., Chen, C.S., Ha, T., et al. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* 466, 263–266.

Grasso, S., Hernández, J.A., and Chifflet, S. (2007). Roles of wound geometry, wound size, and extracellular matrix in the healing response of bovine corneal endothelial cells in culture. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 293, C1327–C1337.

Green, K.J., and Simpson, C.L. (2007). Desmosomes: new perspectives on a classic. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2499–2515.

Gregor, M., Osmanagic-Myers, S., Burgstaller, G., Wolfram, M., Fischer, I., Walko, G., Resch, G.P., Jörgl, A., Herrmann, H., and Wiche, G. (2014). Mechanosensing through focal adhesion-anchored intermediate filaments. *FASEB J.* 28, 715–729.

Grusche, F.A., Richardson, H.E., and Harvey, K.F. (2010). Upstream regulation of the hippo size control pathway. *Curr. Biol.* 20, R574–R582.

Grzeschik, N.A., Parsons, L.M., Allott, M.L., Harvey, K.F., and Richardson, H.E. (2010). Lgl, aPKC, and Crumbs regulate the Salvador/Warts/Hippo pathway through two distinct mechanisms. *Curr. Biol.* 20, 573–581.

Guet, D., Mandal, K., Pinot, M., Hoffmann, J., Abidine, Y., Sigaut, W., Bardin, S., Schauer, K., Goud, B., and Manneville, J.-B. (2014). Mechanical role of actin dynamics in the rheology of the Golgi complex and in Golgi-associated trafficking events. *Curr. Biol.* 24, 1700–1711.

Guilluy, C., Osborne, L.D., Van Landeghem, L., Sharek, L., Superfine, R., Garcia-Mata, R., and Burridge, K. (2014). Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat. Cell Biol.* 16, 376–381.

Guirao, B., Rigaud, S.U., Bosveld, F., Bailles, A., López-Gay, J., Ishihara, S., Sugimura, K., Graner, F., and Bellaïche, Y. (2015). Unified quantitative characterization of epithelial tissue development. *eLife* 4, e08519.

Gumbiner, B.M., and Kim, N.-G. (2014). The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth. *J Cell Sci* 127, 709–717.

Gundersen, G.G., and Worman, H.J. (2013). Nuclear positioning. *Cell* 152, 1376–1389.

Gupta, M., Sarangi, B.R., Deschamps, J., Nematbakhsh, Y., Callan-Jones, A., Margadant, F., Mège, R.-M., Lim, C.T., Voituriez, R., and Ladoux, B. (2015). Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing. *Nat. Commun.* 6, 7525.

Haase, S., Zimmermann, D., Olshina, M.A., Wilkinson, M., Fisher, F., Tan, Y.H., Stewart, R.J., Tonkin, C.J., Wong, W., Kovar, D.R., et al. (2015). Disassembly activity of actin-depolymerizing factor (ADF) is associated with distinct cellular processes in apicomplexan parasites. *Mol. Biol. Cell* 26, 3001–3012.

- Hamadi, A., Bouali, M., Dontenwill, M., Stoeckel, H., Takeda, K., and Rondé, P. (2005). Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. *J. Cell Sci.* *118*, 4415–4425.
- Hamaia, S., and Farndale, R.W. (2014). Integrin recognition motifs in the human collagens. *Adv. Exp. Med. Biol.* *819*, 127–142.
- Hamill, K.J., Hopkinson, S.B., Hoover, P., Todorović, V., Green, K.J., and Jones, J.C.R. (2012). Fibronectin expression determines skin cell motile behavior. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 448–457.
- Handorf, A.M., Zhou, Y., Halanski, M.A., and Li, W.-J. (2015). Tissue Stiffness Dictates Development, Homeostasis, and Disease Progression. *Organogenesis* *11*, 1–15.
- Hannigan, G.E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M.G., and others (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta1-integrin-linked protein kinase. *Nature* *379*, 91.
- Hansen, C.G., Moroishi, T., and Guan, K.-L. (2015). YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond. *Trends Cell Biol.* *25*, 499–513.
- Harris, A.K., Wild, P., and Stopak, D. (1980). Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* *208*, 177–179.
- Harris, A.R., Bellis, J., Khalilgharibi, N., Wyatt, T., Baum, B., Kabla, A.J., and Charras, G.T. (2013). Generating suspended cell monolayers for mechanobiological studies. *Nat. Protoc.* *8*, 2516–2530.
- Hartsock, A., and Nelson, W.J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.* *1778*, 660–669.
- Harvey, K.F., Pfleger, C.M., and Hariharan, I.K. (2003). The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* *114*, 457–467.
- Harvey, K.F., Zhang, X., and Thomas, D.M. (2013). The Hippo pathway and human cancer. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 246–257.
- Havrylenko, S., Noguera, P., Abou-Ghali, M., Manzi, J., Faqir, F., Lamora, A., Guérin, C., Blanchoin, L., and Plastino, J. (2015). WAVE binds Ena/VASP for enhanced Arp2/3 complex-based actin assembly. *Mol. Biol. Cell* *26*, 55–65.
- Hayakawa, K., Sato, N., and Obinata, T. (2001). Dynamic Reorientation of Cultured Cells and Stress Fibers under Mechanical Stress from Periodic Stretching. *Exp. Cell Res.* *268*, 104–114.
- Hayer, A., Shao, L., Chung, M., Joubert, L.-M., Yang, H.W., Tsai, F.-C., Bisaria, A., Betzig, E., and Meyer, T. (2016). Engulfed cadherin fingers are polarized junctional structures between collectively migrating endothelial cells. *Nat. Cell Biol.* *18*, 1311–1323.

He, W., Cowin, P., and Stokes, D.L. (2003). Untangling desmosomal knots with electron tomography. *Science* 302, 109–113.

Heallen, T., Zhang, M., Wang, J., Bonilla-Claudio, M., Klysik, E., Johnson, R.L., and Martin, J.F. (2011). Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science* 332, 458–461.

Hernández-Varas, P., Berge, U., Lock, J.G., and Strömblad, S. (2015). A plastic relationship between vinculin-mediated tension and adhesion complex area defines adhesion size and lifetime. *Nat. Commun.* 6, 7524.

Herr, K.J., Tsang, Y.N., Ong, J.W.E., Li, Q., Yap, L.L., Yu, W., Yin, H., Bogorad, R.L., Dahlman, J.E., Chan, Y.G., et al. (2014). Loss of α -catenin elicits a cholestatic response and impairs liver regeneration. *Sci. Rep.* 4, 6835.

Hervé, J.-C., and Derangeon, M. (2013). Gap-junction-mediated cell-to-cell communication. *Cell Tissue Res.* 352, 21–31.

Hirata, H., Tatsumi, H., Lim, C.T., and Sokabe, M. (2014). Force-dependent vinculin binding to talin in live cells: a crucial step in anchoring the actin cytoskeleton to focal adhesions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 306, C607-620.

Hirata, H., Samsonov, M., and Sokabe, M. (2017). Actomyosin contractility provokes contact inhibition in E-cadherin-ligated keratinocytes. *Sci. Rep.* 7.

Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279, 519–526.

Hochegger, H., Takeda, S., and Hunt, T. (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 910–916.

Hohenester, E., and Yurchenco, P.D. (2013). Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adhes. Migr.* 7, 56–63.

Hong, J.-H., Hwang, E.S., McManus, M.T., Amsterdam, A., Tian, Y., Kalmukova, R., Mueller, E., Benjamin, T., Spiegelman, B.M., Sharp, P.A., et al. (2005). TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 309, 1074–1078.

Hopkinson, S.B., Hamill, K.J., Wu, Y., Eisenberg, J.L., Hiroyasu, S., and Jones, J.C.R. (2014). Focal Contact and Hemidesmosomal Proteins in Keratinocyte Migration and Wound Repair. *Adv. Wound Care* 3, 247–263.

Hossain, Z., Ali, S.M., Ko, H.L., Xu, J., Ng, C.P., Guo, K., Qi, Z., Ponniah, S., Hong, W., and Hunziker, W. (2007). Glomerulocystic kidney disease in mice with a targeted inactivation of *Wwtr1*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 1631–1636.

Hotulainen, P., and Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J. Cell Biol.* 173, 383–394.

- Howard, J., and Hyman, A.A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* 422, 753–758.
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., and Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 122, 421–434.
- Huber, F., Boire, A., López, M.P., and Koenderink, G.H. (2015). Cytoskeletal crosstalk: when three different personalities team up. *Curr. Opin. Cell Biol.* 32, 39–47.
- Icard-Arcizet, D., Cardoso, O., Richert, A., and Hénon, S. (2008). Cell stiffening in response to external stress is correlated to actin recruitment. *Biophys. J.* 94, 2906–2913.
- Iwanicki, M.P., Vomastek, T., Tilghman, R.W., Martin, K.H., Banerjee, J., Wedegaertner, P.B., and Parsons, J.T. (2008). FAK, PDZ-RhoGEF and ROCKII cooperate to regulate adhesion movement and trailing-edge retraction in fibroblasts. *J Cell Sci* 121, 895–905.
- Jacobelli, J., Friedman, R.S., Conti, M.A., Lennon-Dumenil, A.-M., Piel, M., Sorensen, C.M., Adelstein, R.S., and Krummel, M.F. (2010). Confinement-optimized three-dimensional T cell amoeboid motility is modulated via myosin IIA-regulated adhesions. *Nat. Immunol.* 11, 953–961.
- Janes, S.M., and Watt, F.M. (2006). New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. *Nat. Rev. Cancer* 6, 175–183.
- Jia, J., Zhang, W., Wang, B., Trinko, R., and Jiang, J. (2003). The *Drosophila* Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis. *Genes Dev.* 17, 2514–2519.
- Jin, H., and Varner, J. (2004). Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br. J. Cancer* 90, 561–565.
- Johnston, I.D., McCluskey, D.K., Tan, C.K.L., and Tracey, M.C. (2014). Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for microfluidics and microengineering. *J. Micromechanics Microengineering* 24, 35017.
- Jonkman, M.F. (1999). Hereditary skin diseases of hemidesmosomes. *J. Dermatol. Sci.* 20, 103–121.
- Justice, R.W., Zilian, O., Woods, D.F., Noll, M., and Bryant, P.J. (1995). The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev.* 9, 534–546.
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 422–433.
- Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A.M., Ramko, E.B., Davidson, M.W., Hess, H.F., and Waterman, C.M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* 468, 580–584.

Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., Verstreken, P., Hiesinger, P.R., Bellen, H.J., and Halder, G. (2002). Shar-pei mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in *Drosophila*. *Development* **129**, 5719–5730.

Katz, S.I. (1984). The epidermal basement membrane: structure, ontogeny and role in disease. *Ciba Found. Symp.* **108**, 243–259.

Kenny, F.N., and Connelly, J.T. (2015). Integrin-mediated adhesion and mechano-sensing in cutaneous wound healing. *Cell Tissue Res.* **360**, 571–582.

Kenry, Leong, M.C., Nai, M.H., Cheong, F.C., and Lim, C.T. (2015). Viscoelastic Effects of Silicone Gels at the Micro- and Nanoscale. *Procedia IUTAM* **12**, 20–30.

Kim, N.-G., and Gumbiner, B.M. (2015). Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK–Src–PI3K pathway. *J Cell Biol* **210**, 503–515.

Kim, T.K., and Eberwine, J.H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 3173–3178.

Kim, N.-G., Koh, E., Chen, X., and Gumbiner, B.M. (2011). E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 11930–11935.

Kim, T., Hwang, D., Lee, D., Kim, J.-H., Kim, S.-Y., and Lim, D.-S. (2017). MRTF potentiates TEAD-YAP transcriptional activity causing metastasis. *EMBO J.* **36**, 520–535.

Kimura, T.E., Merritt, A.J., and Garrod, D.R. (2007). Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 775–781.

Kireeva, M.L., Mo, F.-E., Yang, G.P., and Lau, L.F. (1996). Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1326–1334.

Kitajima, Y. (2013). New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **29**, 1–13.

Klotzsch, E., Smith, M.L., Kubow, K.E., Muntwyler, S., Little, W.C., Beyeler, F., Gourdon, D., Nelson, B.J., and Vogel, V. (2009). Fibronectin forms the most extensible biological fibers displaying switchable force-exposed cryptic binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18267–18272.

Kobielak, A., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2004). Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat. Cell Biol.* **6**, 21–30.

Köppen, M., Fernández, B.G., Carvalho, L., Jacinto, A., and Heisenberg, C.-P. (2006). Coordinated cell-shape changes control epithelial movement in zebrafish and *Drosophila*. *Development* **133**, 2671–2681.

- Kourtidis, A., Ngok, S.P., and Anastasiadis, P.Z. (2013). p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **116**, 409.
- Kovács, M., Thirumurugan, K., Knight, P.J., and Sellers, J.R. (2007). Load-dependent mechanism of nonmuscle myosin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 9994–9999.
- Krause, M., and Gautreau, A. (2014). Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 577–590.
- Krausova, M., and Korinek, V. (2014). Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell. Signal.* **26**, 570–579.
- Kreidberg, J.A. (2000). Functions of alpha3beta1 integrin. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 548–553.
- Krishnan, R., Park, C.Y., Lin, Y.-C., Mead, J., Jaspers, R.T., Trepatt, X., Lenormand, G., Tambe, D., Smolensky, A.V., Knoll, A.H., et al. (2009). Reinforcement versus fluidization in cytoskeletal mechanoresponsiveness. *PloS One* **4**, e5486.
- Kruegel, J., and Miosge, N. (2010). Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **67**, 2879–2895.
- Krugmann, S., Jordens, I., Gevaert, K., Driessens, M., Vandekerckhove, J., and Hall, A. (2001). Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53: Mena complex. *Curr. Biol.* **11**, 1645–1655.
- Kubow, K.E., Vukmirovic, R., Zhe, L., Klotzsch, E., Smith, M.L., Gourdon, D., Luna, S., and Vogel, V. (2015). Mechanical forces regulate the interactions of fibronectin and collagen I in extracellular matrix. *Nat. Commun.* **6**, 8026.
- Kudryashova, T.V., Goncharov, D.A., Pena, A., Kelly, N., Vanderpool, R., Baust, J., Kobir, A., Shufesky, W., Mora, A.L., Morelli, A.E., et al. (2016). HIPPO–Integrin-linked Kinase Cross-Talk Controls Self-Sustaining Proliferation and Survival in Pulmonary Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **194**, 866–877.
- Kull, F.J., and Endow, S.A. (2013). Force generation by kinesin and myosin cytoskeletal motor proteins. *J. Cell Sci.* **126**, 9–19.
- Kuo, J.-C. (2013). Mechanotransduction at focal adhesions: integrating cytoskeletal mechanics in migrating cells. *J. Cell. Mol. Med.* **17**, 704–712.
- Kurokawa, K., and Matsuda, M. (2005). Localized RhoA Activation as a Requirement for the Induction of Membrane Ruffling. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4294–4303.
- Ladoux, B., and Nicolas, A. (2012). Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Rep. Prog. Phys.* **75**, 116601.
- Ladoux, B., Anon, E., Lambert, M., Rabodzey, A., Hersen, P., Buguin, A., Silberzan, P., and Mege, R.-M. (2010). Strength dependence of cadherin-mediated adhesions. *Biophys. J.* **98**, 534–542.

Ladoux, B., Mège, R.-M., and Trepât, X. (2016). Front–Rear Polarization by Mechanical Cues: From Single Cells to Tissues. *Trends Cell Biol.* 26, 420–433.

Lai, Z.-C., Wei, X., Shimizu, T., Ramos, E., Rohrbaugh, M., Nikolaidis, N., Ho, L.-L., and Li, Y. (2005). Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell* 120, 675–685.

Lane, E.B., and Alexander, C.M. (1990). Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Semin. Cancer Biol.* 1, 165–179.

Langbein, L., and Schweizer, J. (2005). Keratins of the Human Hair Follicle¹¹This article is dedicated with gratitude to Werner W. Franke on the occasion of his 65th birthday. His pioneering work on epithelial and hair keratins has been pivotal to our own investigations in this field. *Int. Rev. Cytol.* 243, 1–78.

Le, H.Q., Ghatak, S., Yeung, C.-Y.C., Tellkamp, F., Günschmann, C., Dieterich, C., Yeroslaviz, A., Habermann, B., Pombo, A., Niessen, C.M., et al. (2016). Mechanical regulation of transcription controls Polycomb-mediated gene silencing during lineage commitment. *Nat. Cell Biol.* 18, 864–875.

Lecuit, T., and Yap, A.S. (2015). E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics. *Nat. Cell Biol.* 17, 533–539.

Lee, J., Wang, Y.-L., Ren, F., and Lele, T.P. (2010). Stamp wound assay for studying coupled cell migration and cell debris clearance. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 26, 16672–16676.

Levayer, R., and Lecuit, T. (2008). Breaking down EMT. *Nat. Cell Biol.* 10, 757–759.

Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., et al. (2009). Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin signaling. *Cell* 139, 891–906.

Lever, W.F. (1953). Pemphigus. *Medicine (Baltimore)* 32, 1–123.

Li, C.-Y., Hu, J., Lu, H., Lan, J., Du, W., Galicia, N., and Klein, O.D. (2016). α E-catenin inhibits YAP/TAZ activity to regulate signalling centre formation during tooth development. *Nat. Commun.* 7, ncomms12133.

Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C.C., and Kain, S.R. (1998). Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J. Biol. Chem.* 273, 34970–34975.

Limsirichaikul, S., Niimi, A., Fawcett, H., Lehmann, A., Yamashita, S., and Ogi, T. (2009). A rapid non-radioactive technique for measurement of repair synthesis in primary human fibroblasts by incorporation of ethynyl deoxyuridine (EdU). *Nucleic Acids Res.* 37, e31–e31.

Ling, C., Zheng, Y., Yin, F., Yu, J., Huang, J., Hong, Y., Wu, S., and Pan, D. (2010). The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 10532–10537.

- Liu, J., Wang, Y., Goh, W.I., Goh, H., Baird, M.A., Ruehland, S., Teo, S., Bate, N., Critchley, D.R., Davidson, M.W., et al. (2015a). Talin determines the nanoscale architecture of focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E4864–E4873.
- Liu, Y.-J., Le Berre, M., Lautenschlaeger, F., Maiuri, P., Callan-Jones, A., Heuzé, M., Takaki, T., Voituriez, R., and Piel, M. (2015b). Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells. *Cell* **160**, 659–672.
- Liu, Z., Tan, J.L., Cohen, D.M., Yang, M.T., Sniadecki, N.J., Ruiz, S.A., Nelson, C.M., and Chen, C.S. (2010). Mechanical tugging force regulates the size of cell–cell junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 9944–9949.
- Liu-Chittenden, Y., Huang, B., Shim, J.S., Chen, Q., Lee, S.-J., Anders, R.A., Liu, J.O., and Pan, D. (2012). Genetic and pharmacological disruption of the TEAD–YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev.* **26**, 1300–1305.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000). *Cell-Matrix Adhesion*.
- Lombardi, M.L., and Lammerding, J. (2011). *Keeping the LINC: the importance of nucleocytoskeletal coupling in intracellular force transmission and cellular function* (Portland Press Limited).
- Londono, C., Loureiro, M.J., Slater, B., Lückner, P.B., Soleas, J., Sathananthan, S., Aitchison, J.S., Kabla, A.J., and McGuigan, A.P. (2014). Nonautonomous contact guidance signaling during collective cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 1807–1812.
- Luxton, G.W.G., Gomes, E.R., Folker, E.S., Vintinner, E., and Gundersen, G.G. (2010). Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement. *Science* **329**, 956–959.
- Machesky, L.M., and Hall, A. (1997). Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac-and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J. Cell Biol.* **138**, 913–926.
- Maître, J.-L., Turlier, H., Illukkumbura, R., Eismann, B., Niwayama, R., Nédélec, F., and Hiiragi, T. (2016). Asymmetric division of contractile domains couples cell positioning and fate specification. *Nature* **536**, 344–348.
- Makita, R., Uchijima, Y., Nishiyama, K., Amano, T., Chen, Q., Takeuchi, T., Mitani, A., Nagase, T., Yatomi, Y., Aburatani, H., et al. (2008). Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **294**, F542–553.
- Mao, M., Alavi, M.V., Labelle-Dumais, C., and Gould, D.B. (2015). Type IV Collagens and Basement Membrane Diseases: Cell Biology and Pathogenic Mechanisms. *Curr. Top. Membr.* **76**, 61–116.

- Martiel, J.-L., Leal, A., Kurzawa, L., Balland, M., Wang, I., Vignaud, T., Tseng, Q., and Théry, M. (2015). Measurement of cell traction forces with ImageJ. *Methods Cell Biol.* *125*, 269–287.
- Maruthamuthu, V., Sabass, B., Schwarz, U.S., and Gardel, M.L. (2011). Cell-ECM traction force modulates endogenous tension at cell–cell contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4708–4713.
- Mascharak, S., Benitez, P.L., Proctor, A.C., Madl, C.M., Hu, K.H., Dewi, R.E., Butte, M.J., and Heilshorn, S.C. (2017). YAP-dependent mechanotransduction is required for proliferation and migration on native-like substrate topography. *Biomaterials* *115*, 155–166.
- Matsubayashi, Y., Ebisuya, M., Honjoh, S., and Nishida, E. (2004). ERK activation propagates in epithelial cell sheets and regulates their migration during wound healing. *Curr. Biol.* *14*, 731–735.
- Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1998). Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J. Cell Biol.* *140*, 647–657.
- Mayor, R., and Carmona-Fontaine, C. (2010). Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends Cell Biol.* *20*, 319–328.
- McCall-Culbreath, K.D., and Zutter, M.M. (2008). Collagen receptor integrins: rising to the challenge. *Curr. Drug Targets* *9*, 139–149.
- McClatchey, A.I., and Yap, A.S. (2012). Contact inhibition (of proliferation) redux. *Curr. Opin. Cell Biol.* *24*, 685–694.
- McGrath, J.A., and Wessagowit, V. (2005). Human hair abnormalities resulting from inherited desmosome gene mutations. *Keio J. Med.* *54*, 72–79.
- Mège, R.-M., Gavard, J., and Lambert, M. (2006). Regulation of cell–cell junctions by the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* *18*, 541–548.
- Meng, Z., Moroishi, T., and Guan, K.-L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* *30*, 1–17.
- Merker, H.J. (1994). Morphology of the basement membrane. *Microsc. Res. Tech.* *28*, 95–124.
- Mertz, A.F., Banerjee, S., Che, Y., German, G.K., Xu, Y., Hyland, C., Marchetti, M.C., Horsley, V., and Dufresne, E.R. (2012). Scaling of traction forces with the size of cohesive cell colonies. *Phys. Rev. Lett.* *108*, 198101.
- Mertz, A.F., Che, Y., Banerjee, S., Goldstein, J.M., Rosowski, K.A., Revilla, S.F., Niessen, C.M., Marchetti, M.C., Dufresne, E.R., and Horsley, V. (2013). Cadherin-based intercellular adhesions organize epithelial cell–matrix traction forces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 842–847.
- Michalopoulos, G.K., and DeFrances, M.C. (1997). Liver regeneration. *Science* *276*, 60–66.

- Mierke, C.T. (2015). Physical view on migration modes. *Cell Adhes. Migr.* **9**, 367–379.
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* **408**, 732–735.
- Mitrossilis, D., Fouchard, J., Pereira, D., Postic, F., Richert, A., Saint-Jean, M., and Asnacios, A. (2010). Real-time single-cell response to stiffness. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 16518–16523.
- Moll, R. (1998). CYTOKERATINS AS MARKERS OF DIFFERENTIATION IN THE DIAGNOSIS OF EPITHELIAL TUMORS. *Subcell. Biochem.* **31**, 205–262.
- Moll, R., Divo, M., and Langbein, L. (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 705.
- Morin-Kensicki, E.M., Boone, B.N., Howell, M., Stonebraker, J.R., Teed, J., Alb, J.G., Magnuson, T.R., O’Neal, W., and Milgram, S.L. (2006). Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of Yap65. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 77–87.
- Moroishi, T., Hansen, C.G., and Guan, K.-L. (2015). The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 73–79.
- Motti, M.L., Califano, D., Baldassarre, G., Celetti, A., Merolla, F., Forzati, F., Napolitano, M., Tavernise, B., Fusco, A., and Viglietto, G. (2005). Reduced E-cadherin expression contributes to the loss of p27kip1-mediated mechanism of contact inhibition in thyroid anaplastic carcinomas. *Carcinogenesis* **26**, 1021–1034.
- Mui, K.L., Chen, C.S., and Assoian, R.K. (2016). The mechanical regulation of integrin-cadherin crosstalk organizes cells, signaling and forces. *J. Cell Sci.* **129**, 1093–1100.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 6181–6186.
- Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., and Polakis, P. (1995). Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 3046–3050.
- Myers, K.A., Applegate, K.T., Danuser, G., Fischer, R.S., and Waterman, C.M. (2011). Distinct ECM mechanosensing pathways regulate microtubule dynamics to control endothelial cell branching morphogenesis. *J. Cell Biol.* **192**, 321–334.
- Nagafuchi, A., and Tsukita, S. (1994). The Loss of the Expression of α Catenin, the 102 kD Cadherin Associated Protein, in Central Nervous Tissues during Development. *Dev. Growth Differ.* **36**, 59–71.
- Nagle, R.B. (1994). A review of intermediate filament biology and their use in pathologic diagnosis. *Mol. Biol. Rep.* **19**, 3–21.

Nardone, G., Oliver-De La Cruz, J., Vrbsky, J., Martini, C., Pribyl, J., Skládal, P., Pešl, M., Caluori, G., Pagliari, S., Martino, F., et al. (2017). YAP regulates cell mechanics by controlling focal adhesion assembly. *Nat. Commun.* **8**.

Neelam, S., Chancellor, T.J., Li, Y., Nickerson, J.A., Roux, K.J., Dickinson, R.B., and Lele, T.P. (2015). Direct force probe reveals the mechanics of nuclear homeostasis in the mammalian cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 5720–5725.

Neelam, S., Hayes, P.R., Zhang, Q., Dickinson, R.B., and Lele, T.P. (2016). Vertical uniformity of cells and nuclei in epithelial monolayers. *Sci. Rep.* **6**, srep19689.

Nelson, C.M., Jean, R.P., Tan, J.L., Liu, W.F., Sniadecki, N.J., Spector, A.A., and Chen, C.S. (2005). Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11594–11599.

Nicolas, A., Geiger, B., and Safran, S.A. (2004). Cell mechanosensitivity controls the anisotropy of focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 12520–12525.

Nier, V., Deforet, M., Duclos, G., Yevick, H.G., Cochet-Escartin, O., Marcq, P., and Silberzan, P. (2015). Tissue fusion over nonadhering surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 9546–9551.

Nier, V., Jain, S., Lim, C.T., Ishihara, S., Ladoux, B., and Marcq, P. (2016). Inference of Internal Stress in a Cell Monolayer. *Biophys. J.* **110**, 1625–1635.

Nikolić, D.L., Boettiger, A.N., Bar-Sagi, D., Carbeck, J.D., and Shvartsman, S.Y. (2006). Role of boundary conditions in an experimental model of epithelial wound healing. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **291**, C68–C75.

Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R.O., Ogonuki, N., et al. (2009). The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophoblast from Inner Cell Mass. *Dev. Cell* **16**, 398–410.

Nollet, F., Kools, P., and Van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.* **299**, 551–572.

Noren, N.K., Liu, B.P., Burridge, K., and Kreft, B. (2000). p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J. Cell Biol.* **150**, 567–580.

Notbohm, J., Banerjee, S., Utuje, K.J.C., Gweon, B., Jang, H., Park, Y., Shin, J., Butler, J.P., Fredberg, J.J., and Marchetti, M.C. (2016). Cellular Contraction and Polarization Drive Collective Cellular Motion. *Biophys. J.* **110**, 2729–2738.

Oakes, P.W., Beckham, Y., Stricker, J., and Gardel, M.L. (2012). Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template. *J Cell Biol* **196**, 363–374.

Oka, T., Mazack, V., and Sudol, M. (2008). Mst2 and Lats kinases regulate apoptotic function of Yes kinase-associated protein (YAP). *J. Biol. Chem.* **283**, 27534–27546.

Oka, T., Remue, E., Meerschaert, K., Vanloo, B., Boucherie, C., Gfeller, D., Bader, G.D., Sidhu, S.S., Vandekerckhove, J., Gettemans, J., et al. (2010). Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *Biochem. J.* **432**, 461–478.

Oka, T., Schmitt, A.P., and Sudol, M. (2012). Opposing roles of angiomin-like-1 and zona occludens-2 on pro-apoptotic function of YAP. *Oncogene* **31**, 128–134.

O’Keefe, E.J., Payne, R.E., Russell, N., and Woodley, D.T. (1985). Spreading and Enhanced Motility of Human Keratinocytes on Fibronectin. *J. Invest. Dermatol.* **85**, 125–130.

O’Keefe, E.J., Woodley, D.T., Falk, R.J., Gammon, W.R., and Briggaman, R.A. (1987). Production of Fibronectin by Epithelium in a Skin Equivalent. *J. Invest. Dermatol.* **88**, 634–639.

Paluch, E.K., and Raz, E. (2013). The role and regulation of blebs in cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 582–590.

Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev. Cell* **19**, 491–505.

Panciera, T., Azzolin, L., Fujimura, A., Biagio, D.D., Frasson, C., Bresolin, S., Soligo, S., Basso, G., Bicciato, S., Rosato, A., et al. (2016). Induction of Expandable Tissue-Specific Stem/Progenitor Cells through Transient Expression of YAP/TAZ. *Cell Stem Cell* **19**, 725–737.

Pantalacci, S., Tapon, N., and Léopold, P. (2003). The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* **5**, 921–927.

Paoli, P., Giannoni, E., and Chiarugi, P. (2013). Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* **1833**, 3481–3498.

Paramasivam, M., Sarkeshik, A., Yates, J.R., Fernandes, M.J., and McCollum, D. (2011). Angiomin family proteins are novel activators of the LATS2 kinase tumor suppressor. *Mol. Biol. Cell* **22**, 3725–3733.

Park, S., Gonzalez, D.G., Guirao, B., Boucher, J.D., Cockburn, K., Marsh, E.D., Mesa, K.R., Brown, S., Rompolas, P., Haberman, A.M., et al. (2017). Tissue-scale coordination of cellular behaviour promotes epidermal wound repair in live mice. *Nat. Cell Biol.* **19**, 155–163.

Parsons, J.T., Horwitz, A.R., and Schwartz, M.A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 633–643.

Pasdar, M., Krzeminski, K.A., and Nelson, W.J. (1991). Regulation of desmosome assembly in MDCK epithelial cells: coordination of membrane core and cytoplasmic plaque domain assembly at the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **113**, 645–655.

Pawar, S.K., Abrahams, R.H., Deen, N.G., Padding, J.T., van der Gulik, G.-J., Jongsma, A., Innings, F., and Kuipers, J.A.M. (2014). An experimental study of dynamic jet behaviour in a scaled cold flow spray dryer model using PIV. *Can. J. Chem. Eng.* **92**, 2013–2020.

- Pelham, R.J., and Wang, Y. I (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 13661–13665.
- Periasamy, A. (2001). Fluorescence resonance energy transfer microscopy: a mini review. *J. Biomed. Opt.* *6*, 287–291.
- Petrie, R.J., Koo, H., and Yamada, K.M. (2014). Generation of compartmentalized pressure by a nuclear piston governs cell motility in a 3D matrix. *Science* *345*, 1062–1065.
- Piccolo, S., Dupont, S., and Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.* *94*, 1287–1312.
- Plestant, C., Strale, P.-O., Seddiki, R., Nguyen, E., Ladoux, B., and Mège, R.-M. (2014). Adhesive interactions of N-cadherin limit the recruitment of microtubules to cell–cell contacts through organization of actomyosin. *J Cell Sci* *127*, 1660–1671.
- Pobbati, A.V., and Hong, W. (2013). Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer Biol. Ther.* *14*, 390–398.
- Pollard, T.D. (2016). Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *8*.
- Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* *326*, 1208–1212.
- Poujade, M., Grasland-Mongrain, E., Hertzog, A., Jouanneau, J., Chavrier, P., Ladoux, B., Buguin, A., and Silberzan, P. (2007). Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 15988–15993.
- Prakasam, A.K., Maruthamuthu, V., and Leckband, D.E. (2006). Similarities between heterophilic and homophilic cadherin adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 15434–15439.
- Price, S.R., Garcia, N.V.D.M., Ranscht, B., and Jessell, T.M. (2002). Regulation of motor neuron pool sorting by differential expression of type II cadherins. *Cell* *109*, 205–216.
- Priya, R., Gomez, G.A., Budnar, S., Verma, S., Cox, H.L., Hamilton, N.A., and Yap, A.S. (2015). Feedback regulation through myosin II confers robustness on RhoA signalling at E-cadherin junctions. *Nat. Cell Biol.* *17*, 1282–1293.
- Puklin-Faucher, E., Gao, M., Schulten, K., and Vogel, V. (2006). How the headpiece hinge angle is opened: New insights into the dynamics of integrin activation. *J. Cell Biol.* *175*, 349–360.
- Püspöki, Z., Storath, M., Sage, D., and Unser, M. (2016). Transforms and Operators for Directional Bioimage Analysis: A Survey. In *Focus on Bio-Image Informatics*, W.H. De Vos, S. Munck, and J.-P. Timmermans, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 69–93.
- Qiao, Y., Chen, J., Lim, Y.B., Finch-Edmondson, M.L., Seshachalam, V.P., Qin, L., Jiang, T., Low, B.C., Singh, H., Lim, C.T., et al. (2017). YAP Regulates Actin Dynamics through ARHGAP29 and Promotes Metastasis. *Cell Rep.* *19*, 1495–1502.

- Raab, M., Gentili, M., de Belly, H., Thiam, H.-R., Vargas, P., Jimenez, A.J., Lautenschlaeger, F., Voituriez, R., Lennon-Duménil, A.-M., Manel, N., et al. (2016). ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science* **352**, 359–362.
- Raffel, D.-I.M., Willert, D.C.E., and Kompenhans, D.J. (1998). Physical and technical background. In *Particle Image Velocimetry*, (Springer Berlin Heidelberg), pp. 13–60.
- Ramms, L., Fabris, G., Windoffer, R., Schwarz, N., Springer, R., Zhou, C., Lazar, J., Stiefel, S., Hersch, N., Schnakenberg, U., et al. (2013). Keratins as the main component for the mechanical integrity of keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 18513–18518.
- Rape, A.D., Guo, W., and Wang, Y. (2011). The regulation of traction force in relation to cell shape and focal adhesions. *Biomaterials* **32**, 2043–2051.
- Ravasio, A., Cheddadi, I., Chen, T., Pereira, T., Ong, H.T., Bertocchi, C., Brugues, A., Jacinto, A., Kabla, A.J., Toyama, Y., et al. (2015). Gap geometry dictates epithelial closure efficiency. *Nat. Commun.* **6**, 7683.
- Reddy, P., Deguchi, M., Cheng, Y., and Hsueh, A.J.W. (2013). Actin Cytoskeleton Regulates Hippo Signaling. *PLoS ONE* **8**.
- Reffay, M., Parrini, M.-C., Cochet-Escartin, O., Ladoux, B., Buguin, A., Coscoy, S., Amblard, F., Camonis, J., and Silberzan, P. (2014). Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells. *Nat. Cell Biol.* **16**, 217–223.
- Reinhart-King, C.A., Dembo, M., and Hammer, D.A. (2003). Endothelial Cell Traction Forces on RGD-Derivatized Polyacrylamide Substrata [?] *Langmuir* **19**, 1573–1579.
- Remue, E., Meerschaert, K., Oka, T., Boucherie, C., Vandekerckhove, J., Sudol, M., and Gettemans, J. (2010). TAZ interacts with zonula occludens-1 and-2 proteins in a PDZ-1 dependent manner. *FEBS Lett.* **584**, 4175–4180.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A., and Dynlacht, B.D. (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G2/M checkpoints. *Genes Dev.* **16**, 245–256.
- Reynolds, A.B. (2007). p120-catenin: Past and present. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* **1773**, 2–7.
- Reynolds, A.B., Daniel, J.M., Mo, Y.-Y., Wu, J., and Zhang, Z. (1996). The novel catenin p120 cas binds classical cadherins and induces an unusual morphological phenotype in NIH3T3 fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **225**, 328–337.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704–1709.

- Riising, E., Comet, I., Leblanc, B., Wu, X., Johansen, J., and Helin, K. (2014). Gene Silencing Triggers Polycomb Repressive Complex 2 Recruitment to CpG Islands Genome Wide. *Mol. Cell* 55, 347–360.
- del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M., and Sheetz, M.P. (2009). Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* 323, 638–641.
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D. (2001). Focal contacts as mechanosensors. *J. Cell Biol.* 153, 1175–1186.
- Robinson, B.S., Huang, J., Hong, Y., and Moberg, K.H. (2010). Crumbs regulates Salvador/Warts/Hippo signaling in *Drosophila* via the FERM-domain protein Expanded. *Curr. Biol.* 20, 582–590.
- Rodeck, C.H., Eady, R.A.J., and Gosden, C.M. (1980). PRENATAL DIAGNOSIS OF EPIDERMOLYSIS BULLOSA LETALIS. *The Lancet* 315, 949–952.
- Rodriguez-Diaz, A., Toyama, Y., Abravanel, D.L., Wiemann, J.M., Wells, A.R., Tulu, U.S., Edwards, G.S., and Kiehart, D.P. (2008). Actomyosin purse strings: renewable resources that make morphogenesis robust and resilient. *HFSP J.* 2, 220–237.
- Rosenblatt, J., Raff, M.C., and Cramer, L.P. (2001). An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin-and myosin-dependent mechanism. *Curr. Biol.* 11, 1847–1857.
- Rosenbluh, J., Nijhawan, D., Cox, A.G., Li, X., Neal, J.T., Schafer, E.J., Zack, T.I., Wang, X., Tsherniak, A., Schinzel, A.C., et al. (2012). β -Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell* 151, 1457–1473.
- Rossier, O.M., Gauthier, N., Biais, N., Vonnegut, W., Fardin, M.-A., Avigan, P., Heller, E.R., Mathur, A., Ghassemi, S., Koeckert, M.S., et al. (2010). Force generated by actomyosin contraction builds bridges between adhesive contacts. *EMBO J.* 29, 1055–1068.
- Roycroft, A., and Mayor, R. (2016). Molecular basis of contact inhibition of locomotion. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 1119–1130.
- Rupp, F., Payan, D.G., Magill-Solc, C., Cowan, D.M., and Scheller, R.H. (1991). Structure and expression of a rat agrin. *Neuron* 6, 811–823.
- Ruprecht, V., Wieser, S., Callan-Jones, A., Smutny, M., Morita, H., Sako, K., Barone, V., Ritsch-Marte, M., Sixt, M., Voituriez, R., et al. (2015). Cortical Contractility Triggers a Stochastic Switch to Fast Amoeboid Cell Motility. *Cell* 160, 673–685.
- Saez, A., Buguin, A., Silberzan, P., and Ladoux, B. (2005). Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformations or forces? *Biophys. J.* 89, L52-54.

- Saez, A., Anon, E., Ghibaudo, M., Roure, O. du, Meglio, J.-M.D., Hersen, P., Silberzan, P., Buguin, A., and Ladoux, B. (2010). Traction forces exerted by epithelial cell sheets. *J. Phys. Condens. Matter* 22, 194119.
- Safer, D., Elzinga, M., and Nachmias, V.T. (1991). Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J. Biol. Chem.* 266, 4029–4032.
- Salbreux, G., Charras, G., and Paluch, E. (2012). Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. *Trends Cell Biol.* 22, 536–545.
- Sarangi, B.R., Gupta, M., Doss, B.L., Tissot, N., Lam, F., Mège, R.-M., Borghi, N., and Ladoux, B. (2017). Coordination between Intra- and Extracellular Forces Regulates Focal Adhesion Dynamics. *Nano Lett.* 17, 399–406.
- Saw, T.B., Doostmohammadi, A., Nier, V., Kocgozlu, L., Thampi, S., Toyama, Y., Marcq, P., Lim, C.T., Yeomans, J.M., and Ladoux, B. (2017). Topological defects in epithelia govern cell death and extrusion. *Nature* 544, 212–216.
- Schaafsma, H.E., and Ramaekers, F.C.S. (1994). Cytokeratin subtyping in normal and neoplastic epithelium: basic principles and diagnostic applications. *Pathol. Annu.* 29, 21–62.
- Schaffner, F., Ray, A.M., and Dontenwill, M. (2013). Integrin $\alpha 5 \beta 1$, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors. *Cancers* 5, 27–47.
- Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszk, J., Rodriguez, J.R., Zhou, D., Kreger, B.T., Vasioukhin, V., Avruch, J., Brummelkamp, T.R., et al. (2011). Yap1 acts downstream of α -catenin to control epidermal proliferation. *Cell* 144, 782–795.
- Schmidt, E.V. (1999). The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene* 18.
- Schroeder, M.C., and Halder, G. (2012). Regulation of the Hippo pathway by cell architecture and mechanical signals. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, (Elsevier), pp. 803–811.
- Schwartz, M.A. (2010). Integrins and Extracellular Matrix in Mechanotransduction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2.
- Seddiki, R., Strale, P.-O., Peyret, G., Yao, M., Yan, J., Ladoux, B., and Mege, R.-M. (2017). Force-Dependent Binding Of Vinculin To α -Catenin Regulates Cell-Cell Contacts Stability And Collective Cell Behavior. *bioRxiv* 117762.
- Seltmann, K., Fritsch, A.W., Käs, J.A., and Magin, T.M. (2013a). Keratins significantly contribute to cell stiffness and impact invasive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 18507–18512.
- Seltmann, K., Roth, W., Loschke, F., Lederer, M., Hüttelmaier, S., and Magin, T.M. (2013b). Keratins mediate localization of hemidesmosomes and repress cell motility. *J. Invest. Dermatol.* 133, 181–190.

- Serrano, I., McDonald, P.C., Lock, F., Muller, W.J., and Dedhar, S. (2013). Inactivation of the Hippo tumour suppressor pathway by integrin-linked kinase. *Nat. Commun.* 4.
- Serra-Picamal, X., Conte, V., Vincent, R., Anon, E., Tambe, D.T., Bazellieres, E., Butler, J.P., Fredberg, J.J., and Trepatt, X. (2012). Mechanical waves during tissue expansion. *Nat. Phys.* 8, 628–634.
- Shemesh, T., Verkhovsky, A.B., Svitkina, T.M., Bershadsky, A.D., and Kozlov, M.M. (2009). Role of Focal Adhesions and Mechanical Stresses in the Formation and Progression of the Lamellum Interface. *Biophys. J.* 97, 1254–1264.
- Shin, K., Fogg, V.C., and Margolis, B. (2006). Tight Junctions and Cell Polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 207–235.
- Silvis, M.R., Kreger, B.T., Lien, W.-H., Klezovitch, O., Rudakova, G.M., Camargo, F.D., Lantz, D.M., Seykora, J.T., and Vasioukhin, V. (2011). α -catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. *Sci Signal* 4, ra33–ra33.
- Simpson, C.L., Patel, D.M., and Green, K.J. (2011). Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 565–580.
- Small, J.V., Stradal, T., Vignat, E., and Rottner, K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *TRENDS Cell Biol.* 12.
- Solon, J., Levental, I., Sengupta, K., Georges, P.C., and Janmey, P.A. (2007). Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys. J.* 93, 4453–4461.
- Song, L., Liu, D., Wang, B., He, J., Zhang, S., Dai, Z., Ma, X., and Wang, X. (2015). miR-494 suppresses the progression of breast cancer in vitro by targeting CXCR4 through the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncol. Rep.* 34, 525–531.
- Spiering, D., and Hodgson, L. (2011). Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adhes. Migr.* 5, 170–180.
- Starr, D.A., and Fridolfsson, H.N. (2010). Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 421–444.
- Steinbock, F.A., Nikolic, B., Coulombe, P.A., Fuchs, E., Traub, P., and Wiche, G. (2000). Dose-dependent linkage, assembly inhibition and disassembly of vimentin and cytokeratin 5/14 filaments through plectin's intermediate filament-binding domain. *J Cell Sci* 113, 483–491.
- Storm, C., Pastore, J.J., MacKintosh, F.C., Lubensky, T.C., and Janmey, P.A. (2005). Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature* 435, 191–194.
- Strano, S., and Blandino, G. (2007). YAP1 meets tumor suppression. *Mol. Cell* 27, 863–864.
- Subauste, M.C., Pertz, O., Adamson, E.D., Turner, C.E., Junger, S., and Hahn, K.M. (2004). Vinculin modulation of paxillin–FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *J. Cell Biol.* 165, 371–381.

- Sudol, M. (2013). YAP1 oncogene and its eight isoforms. *Oncogene* 32, 3922.
- Sudol, M., Bork, P., Einbond, A., Kastury, K., Druck, T., Negrini, M., Huebner, K., and Lehman, D. (1995). Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *J. Biol. Chem.* 270, 14733–14741.
- Sudol, M., Gelman, I.H., and Zhang, J. (2013). YAP1 Uses Its Modular Protein Domains and Conserved Sequence Motifs to Orchestrate Diverse Repertoires of Signaling. In *The Hippo Signaling Pathway and Cancer*, M. Oren, and Y. Aylon, eds. (Springer New York), pp. 53–70.
- Sunyer, R., Conte, V., Escribano, J., Elosegui-Artola, A., Labernadie, A., Valon, L., Navajas, D., García-Aznar, J.M., Muñoz, J.J., Roca-Cusachs, P., et al. (2016). Collective cell durotaxis emerges from long-range intercellular force transmission. *Science* 353, 1157–1161.
- Supatto, W., Débarre, D., Moulia, B., Brouzés, E., Martin, J.-L., Farge, E., and Beaurepaire, E. (2005). In vivo modulation of morphogenetic movements in *Drosophila* embryos with femtosecond laser pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1047–1052.
- Sveen, J.K., and Cowen, E.A. (2004). Quantitative imaging techniques and their application to wavy flows. *Adv. Coast. Ocean Eng.* 9, 1.
- Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* 145, 1009–1026.
- Tadokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., de Pereda, J.M., Ginsberg, M.H., and Calderwood, D.A. (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302, 103–106.
- Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol.* 8, 215.
- Takenawa, T., and Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J. Cell Sci.* 114, 1801–1809.
- Takenawa, T., and Suetsugu, S. (2007). The WASP–WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 37–48.
- Tamada, M., Perez, T.D., Nelson, W.J., and Sheetz, M.P. (2007). Two distinct modes of myosin assembly and dynamics during epithelial wound closure. *J. Cell Biol.* 176, 27–33.
- Tan, J.L., Tien, J., Pirone, D.M., Gray, D.S., Bhadriraju, K., and Chen, C.S. (2003). Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 1484–1489.
- Tanifuji-Terai, N., Terai, K., Hayashi, Y., Chikama, T., and Kao, W.W.-Y. (2006). Expression of keratin 12 and maturation of corneal epithelium during development and postnatal growth. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 545–551.

- Tapia, C., Kutzner, H., Mentzel, T., Savic, S., Baumhoer, D., and Glatz, K. (2006). Two mitosis-specific antibodies, MPM-2 and phospho-histone H3 (Ser28), allow rapid and precise determination of mitotic activity. *Am. J. Surg. Pathol.* **30**, 83–89.
- Tapon, N., Harvey, K.F., Bell, D.W., Wahrer, D.C., Schiripo, T.A., Haber, D.A., and Hariharan, I.K. (2002). *salvador* Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* **110**, 467–478.
- Théry, M., Pépin, A., Dressaire, E., Chen, Y., and Bornens, M. (2006). Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil. Cytoskeleton* **63**, 341–355.
- Thiery, J.P., Engl, W., Viasnoff, V., and Dufour, S. (2012). Biochemical and biophysical origins of cadherin selectivity and adhesion strength. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 614–619.
- Tian, Y., Kolb, R., Hong, J.-H., Carroll, J., Li, D., You, J., Bronson, R., Yaffe, M.B., Zhou, J., and Benjamin, T. (2007). TAZ Promotes PC2 Degradation through a SCF β -Trcp E3 Ligase Complex. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6383–6395.
- Tiwari, A., Kumar, R., Ram, J., Sharma, M., and Luthra-Guptasarma, M. (2016). Control of fibrotic changes through the synergistic effects of anti-fibronectin antibody and an RGDS-tagged form of the same antibody. *Sci. Rep.* **6**, srep30872.
- Toda, K., Tuan, T.L., Brown, P.J., and Grinnell, F. (1987). Fibronectin receptors of human keratinocytes and their expression during cell culture. *J. Cell Biol.* **105**, 3097–3104.
- Totaro, A., Castellan, M., Battilana, G., Zanconato, F., Azzolin, L., Giullitti, S., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2017). YAP/TAZ link cell mechanics to Notch signalling to control epidermal stem cell fate. *Nat. Commun.* **8**, 15206.
- Tremblay, D., Andrzejewski, L., Leclerc, A., and Pelling, A.E. (2013). Actin and microtubules play distinct roles in governing the anisotropic deformation of cell nuclei in response to substrate strain. *Cytoskeleton* **70**, 837–848.
- Trepat, X., and Fredberg, J.J. (2011). Plithotaxis and emergent dynamics in collective cellular migration. *Trends Cell Biol.* **21**, 638–646.
- Trepat, X., Wasserman, M.R., Angelini, T.E., Millet, E., Weitz, D.A., Butler, J.P., and Fredberg, J.J. (2009). Physical forces during collective cell migration. *Nat. Phys.* **5**, 426–430.
- Trichet, L., Le Digabel, J., Hawkins, R.J., Vedula, S.R.K., Gupta, M., Ribault, C., Hersen, P., Voituriez, R., and Ladoux, B. (2012). Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 6933–6938.
- Tseng, Q., Duchemin-Pelletier, E., Deshiere, A., Balland, M., Guillou, H., Filhol, O., and Théry, M. (2012). Spatial organization of the extracellular matrix regulates cell–cell junction positioning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 1506–1511.

- Tsika, R.W., Schramm, C., Simmer, G., Fitzsimons, D.P., Moss, R.L., and Ji, J. (2008). Overexpression of TEAD-1 in transgenic mouse striated muscles produces a slower skeletal muscle contractile phenotype. *J. Biol. Chem.* **283**, 36154–36167.
- Tsuruta, D., Hashimoto, T., Hamill, K.J., and Jones, J.C.R. (2011). Hemidesmosomes and focal contact proteins: functions and cross-talk in keratinocytes, bullous diseases and wound healing. *J. Dermatol. Sci.* **62**, 1–7.
- Turner, C.E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat. Cell Biol.* **2**, E231-236.
- Udan, R.S., Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., and Halder, G. (2003). Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat. Cell Biol.* **5**, 914–920.
- Ullrich, N.J., and Gordon, L.B. (2015). Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Handb. Clin. Neurol.* **132**, 249–264.
- Valon, L., Marín-Llauradó, A., Wyatt, T., Charras, G., and Trepatt, X. (2017). Optogenetic control of cellular forces and mechanotransduction. *Nat. Commun.* **8**, ncomms14396.
- Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B.G., Rossant, J., and Wrana, J.L. (2010). The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF- β -SMAD pathway. *Dev. Cell* **19**, 831–844.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M., and Fuchs, E. (2000). Directed Actin Polymerization Is the Driving Force for Epithelial Cell–Cell Adhesion. *Cell* **100**, 209–219.
- Vasioukhin, V., Bowers, E., Bauer, C., Degenstein, L., and Fuchs, E. (2001). Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1076–1085.
- Vassilev, A., Kaneko, K.J., Shu, H., Zhao, Y., and DePamphilis, M.L. (2001). TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev.* **15**, 1229–1241.
- Vedula, S.R.K., Leong, M.C., Lai, T.L., Hersen, P., Kabla, A.J., Lim, C.T., and Ladoux, B. (2012). Emerging modes of collective cell migration induced by geometrical constraints. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 12974–12979.
- Vedula, S.R.K., Hirata, H., Nai, M.H., Toyama, Y., Trepatt, X., Lim, C.T., Ladoux, B., and others (2014a). Epithelial bridges maintain tissue integrity during collective cell migration. *Nat. Mater.* **13**, 87–96.
- Vedula, S.R.K., Ravasio, A., Anon, E., Chen, T., Peyret, G., Ashraf, M., and Ladoux, B. (2014b). Microfabricated Environments to Study Collective Cell Behaviors. *Methods Cell Biol.* **120**, 235–252.
- Vedula, S.R.K., Peyret, G., Cheddadi, I., Chen, T., Brugués, A., Hirata, H., Lopez-Menendez, H., Toyama, Y., De Almeida, L.N., Trepatt, X., et al. (2015). Mechanics of epithelial closure over non-adherent environments. *Nat. Commun.* **6**.

- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 778–790.
- Vijayaraj, P., Kröger, C., Reuter, U., Windoffer, R., Leube, R.E., and Magin, T.M. (2009). Keratins regulate protein biosynthesis through localization of GLUT1 and -3 upstream of AMP kinase and Raptor. *J. Cell Biol.* *187*, 175–184.
- Wada, K.-I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., and Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 3907–3914.
- Walko, G., Castañón, M.J., and Wiche, G. (2015). Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res.* *360*, 529–544.
- Wang, J.H.-C., and Lin, J.-S. (2007). Cell traction force and measurement methods. *Biomech. Model. Mechanobiol.* *6*, 361.
- Wang, Y., and Gilmore, T.D. (2003). Zyxin and paxillin proteins: focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear. *Biochim. Biophys. Acta* *1593*, 115–120.
- Wang, Y.-L., and Pelham, R.J. (1998). [39] Preparation of a flexible, porous polyacrylamide substrate for mechanical studies of cultured cells. *Methods Enzymol.* *298*, 489–496.
- Wang, J.H.-C., Goldschmidt-Clermont, P., Wille, J., and Yin, F.C.-P. (2001). Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching. *J. Biomech.* *34*, 1563–1572.
- Wang, N., Ostuni, E., Whitesides, G.M., and Ingber, D.E. (2002). Micropatterning tractional forces in living cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* *52*, 97–106.
- Wang, W., Huang, J., and Chen, J. (2011). Angiomotin-like proteins associate with and negatively regulate YAP1. *J. Biol. Chem.* *286*, 4364–4370.
- Waschke, J. (2008). The desmosome and pemphigus. *Histochem. Cell Biol.* *130*, 21–54.
- Watanabe-Nakayama, T., Machida, S., Harada, I., Sekiguchi, H., Afrin, R., and Ikai, A. (2011). Direct detection of cellular adaptation to local cyclic stretching at the single cell level by atomic force microscopy. *Biophys. J.* *100*, 564–572.
- Whitehead, J., Vignjevic, D., Fütterer, C., Beaurepaire, E., Robine, S., and Farge, E. (2008). Mechanical factors activate β -catenin-dependent oncogene expression in APC1638N/+ mouse colon. *HFSP J.* *2*, 286–294.
- von Wichert, G., Krndija, D., Schmid, H., von Wichert, G., Haerter, G., Adler, G., Seufferlein, T., and Sheetz, M.P. (2008). Focal adhesion kinase mediates defects in the force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton linkages in metastatic colon cancer cell lines. *Eur. J. Cell Biol.* *87*, 1–16.
- Wikramanayake, T.C., Stojadinovic, O., and Tomic-Canic, M. (2014). Epidermal Differentiation in Barrier Maintenance and Wound Healing. *Adv. Wound Care* *3*, 272–280.

- Wilhelmsen, K., Litjens, S.H.M., and Sonnenberg, A. (2006). Multiple Functions of the Integrin $\alpha 6\beta 4$ in Epidermal Homeostasis and Tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2877–2886.
- Wolven, A.K., Belmont, L.D., Mahoney, N.M., Almo, S.C., and Drubin, D.G. (2000). In vivo importance of actin nucleotide exchange catalyzed by profilin. *J. Cell Biol.* **150**, 895–904.
- Wu, C., Asokan, S.B., Berginski, M.E., Haynes, E.M., Sharpless, N.E., Griffith, J.D., Gomez, S.M., and Bear, J.E. (2012). Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis. *Cell* **148**, 973–987.
- Wu, S., Huang, J., Dong, J., and Pan, D. (2003). hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* **114**, 445–456.
- Xu, M.Z., Yao, T.-J., Lee, N.P., Ng, I.O., Chan, Y.-T., Zender, L., Lowe, S.W., Poon, R.T., and Luk, J.M. (2009). Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **115**, 4576–4585.
- Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R.A., and Yu, W. (1995). Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* lats gene encodes a putative protein kinase. *Development* **121**, 1053–1063.
- Yagi, R., Chen, L.-F., Shigesada, K., Murakami, Y., and Ito, Y. (1999). A WW domain-containing Yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *EMBO J.* **18**, 2551–2562.
- Yakovlev, S., Mikhailenko, I., Tsurupa, G., Belkin, A.M., and Medved, L. (2014). Polymerisation of fibrin α C-domains promotes endothelial cell migration and proliferation. *Thromb. Haemost.* **112**, 1244–1251.
- Yang, B., Lieu, Z.Z., Wolfenson, H., Hameed, F.M., Bershadsky, A.D., and Sheetz, M.P. (2016). Mechanosensing Controlled Directly by Tyrosine Kinases. *Nano Lett.* **16**, 5951–5961.
- Yao, M., Goult, B.T., Chen, H., Cong, P., Sheetz, M.P., and Yan, J. (2014a). Mechanical activation of vinculin binding to talin locks talin in an unfolded conformation. *Sci. Rep.* **4**, 4610.
- Yao, M., Qiu, W., Liu, R., Efremov, A.K., Cong, P., Seddiki, R., Payre, M., Lim, C.T., Ladoux, B., Mège, R.-M., et al. (2014b). Force-dependent conformational switch of α -catenin controls vinculin binding. *Nat. Commun.* **5**.
- Yap, A.S., Gomez, G.A., and Parton, R.G. (2015). Adherens junctions revisualized: Organizing cadherins as nanoassemblies. *Dev. Cell* **35**, 12–20.
- Ye, F., Kim, C., and Ginsberg, M.H. (2012). Reconstruction of integrin activation. *Blood* **119**, 26–33.
- Yeh, S.W., Ahmed, B., Sami, N., and Razzaque Ahmed, A. (2003). Blistering disorders: diagnosis and treatment. *Dermatol. Ther.* **16**, 214–223.

- Yeung, T., Georges, P.C., Flanagan, L.A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., and Janmey, P.A. (2005). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil. Cytoskeleton* **60**, 24–34.
- Yonemura, S., Itoh, M., Nagafuchi, A., and Tsukita, S. (1995). Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *J. Cell Sci.* **108** (Pt 1), 127–142.
- Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A., and Shibata, M. (2010). alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat. Cell Biol.* **12**, 533–542.
- Yoshigi, M., Hoffman, L.M., Jensen, C.C., Yost, H.J., and Beckerle, M.C. (2005). Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *J Cell Biol* **171**, 209–215.
- Young, J.L., Holle, A.W., and Spatz, J.P. (2016). Nanoscale and mechanical properties of the physiological cell-ECM microenvironment. *Exp. Cell Res.* **343**, 3–6.
- Yu, F.-X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J.L., Lian, I., Wang, L.H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., et al. (2012a). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* **150**, 780–791.
- Yu, H., Xiong, S., Tay, C.Y., Leong, W.S., and Tan, L.P. (2012b). A novel and simple microcontact printing technique for tacky, soft substrates and/or complex surfaces in soft tissue engineering. *Acta Biomater.* **8**, 1267–1272.
- Yurchenco, P.D., and Patton, B.L. (2009). Developmental and Pathogenic Mechanisms of Basement Membrane Assembly. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 1277–1294.
- Zahm, J.M., Kaplan, H., Hérard, A.L., Doriot, F., Pierrot, D., Somelette, P., and Puchelle, E. (1997). Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium. *Cell Motil. Cytoskeleton* **37**, 33–43.
- Zanconato, F., Forcato, M., Battilana, G., Azzolin, L., Quaranta, E., Bodega, B., Rosato, A., Bicciato, S., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2015). Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1218–1227.
- Zehnder, S.M., Wiatt, M.K., Uruena, J.M., Dunn, A.C., Sawyer, W.G., and Angelini, T.E. (2015). Multicellular density fluctuations in epithelial monolayers. *Phys. Rev. E* **92**, 32729.
- Zender, L., Spector, M.S., Xue, W., Flemming, P., Cordon-Cardo, C., Silke, J., Fan, S.-T., Luk, J.M., Wigler, M., Hannon, G.J., et al. (2006). Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell* **125**, 1253–1267.
- Zhang, H., Berg, J.S., Li, Z., Wang, Y., L\ang, P., Sousa, A.D., Bhaskar, A., Cheney, R.E., and Strömblad, S. (2004). Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* **6**, 523–531.

Zhang, H., Landmann, F., Zahreddine, H., Rodriguez, D., Koch, M., and Labouesse, M. (2011). A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis. *Nature* 471, 99–103.

Zhang, Q., Dong, H., Li, Y., Zhu, Y., Zeng, L., Gao, H., Yuan, B., Chen, X., and Mao, C. (2015). Microgrooved Polymer Substrates Promote Collective Cell Migration To Accelerate Fracture Healing in an in Vitro Model. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 23336–23345.

Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., et al. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 21, 2747–2761.

Zhao, B., Lei, Q.-Y., and Guan, K.-L. (2008). The Hippo–YAP pathway: New connections between regulation of organ size and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 638–646.

Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.-Y., and Guan, K.-L. (2010a). A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF β -TRCP. *Genes Dev.* 24, 72–85.

Zhao, B., Li, L., Lei, Q., and Guan, K.-L. (2010b). The Hippo–YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev.* 24, 862–874.

Zhao, B., Li, L., Lu, Q., Wang, L.H., Liu, C.-Y., Lei, Q., and Guan, K.-L. (2011). Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev.* 25, 51–63.

Zhao, B., Li, L., Wang, L., Wang, C.-Y., Yu, J., and Guan, K.-L. (2012). Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev.* 26, 54–68.

ANNEXES

- 1 Revue “*Mechanics of epithelial tissues during gap closure*”



Mechanics of epithelial tissues during gap closure

Simon Begnaud¹, Tianchi Chen², Delphine Delacour¹,
René-Marc Mège¹ and Benoît Ladoux^{1,2}

The closure of gaps is crucial to maintaining epithelium integrity during developmental and repair processes such as dorsal closure and wound healing. Depending on biochemical as well as physical properties of the microenvironment, gap closure occurs through assembly of multicellular actin-based contractile cables and/or protrusive activity of cells lining the gap. This review discusses the relative contributions of ‘purse-string’ and cell crawling mechanisms regulated by cell–substrate and cell–cell interactions, cellular mechanics and physical constraints from the environment.

Addresses

¹ Institut Jacques Monod (IJM), CNRS UMR 7592 & University Paris Diderot, Paris, France

² Mechanobiology Institute (MBI), National University of Singapore, Singapore

Corresponding authors: Mège, René-Marc (rene-marc.mege@ijm.fr) and Ladoux, Benoît (benoit.ladoux@ijm.fr)

Current Opinion in Cell Biology 2016, 42:52–62

This review comes from a themed issue on **Cell dynamics**

Edited by **Kenneth M Yamada** and **Roberto Mayor**

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 28th April 2016

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2016.04.006>

0955-0674/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Epithelia have important roles in shaping tissues and organs during embryogenesis, as well as in protecting tissues from homeostasis loss during wound healing [1]. Many physiological and pathological processes involve the (re-)sealing of epithelial gaps. From single cell apoptosis to macroscopic wound, discontinuities of the epithelial barrier occur continuously throughout the lifetime of organisms and in various scales and geometries.

Our review hence focuses on how epithelium maintains its own integrity by examining diverse gap closure scenarios. Such discontinuities can arise either intrinsically (e.g. ventral closure and dorsal closure during development, cell extrusion during homeostasis maintenance) or extrinsically (e.g. physical and chemical injury, infection). Due to its physiological importance, a wide range of studies has strived to elucidate the mechanism of epithelial gap closure with both *in vivo* and *in vitro* techniques.

Various morphogenetic events require the collective migration of neighboring epithelium into an opening to form a continuous monolayer, including *D. melanogaster* dorsal closure, *C. elegans* ventral enclosure, eyelid closure, neural tube closure and trachea invagination [2,4[•],5[•],6]. In all these processes, an actin cable assembles apically to form a contractile ‘purse-string’, and actin-based structures drive basal protrusion [7–10]. Lessons learnt from other gap closure processes studied *in vitro*, thanks to their striking similarities, helped understand the analysis of tissue morphogenesis *in vivo* [3].

Wound healing takes place during embryogenesis but also during adult life after a stress, for instance a skin cut, asthma or acute lung injury in the airway system. Independent of the tissue, healing processes share similarities [11]. However, due to its prevalence and tissue accessibility, epidermal wound healing has been the most studied: a multi-step process including tissue growth and remodeling leading to the reconstruction of the wounded area [12]. In adult skin injuries, re-epithelization can last days, during which activated keratinocytes migrate collectively over the wound area, dragging their own basal lamina as they move forward [13]. Keratinocytes in the front remodel the underlying ECM by secreting proteolytic enzymes such as metalloproteinases and depositing new ECM proteins [14]. Cell crawling seems to be more prominent here, with leader cells extending broad lamellipodia [15–17]. Interestingly, wound healing mechanisms vary with the age of the tissue. Much attention has been devoted to the study of embryonic wound healing due to its lack of scarring, reminiscent of gap closure events during morphogenesis, typically by a purse-string mechanism including rapid recruitment and assembly of actin and myosin into a thick cable in neighboring cells around the wound [18–20].

Finally, a particular case of epithelial gap closure is apoptotic cell extrusion, in which a dying cell is excluded from an epithelial monolayer. Cell extrusion also occurs recurrently in adulthood during tissue turnover and homeostatic processes [21–23]. When one or more cells undergo apoptosis, a purse-string mechanism triggers contraction that squeezes the apoptotic cell out of the epithelium.

From the examples discussed above, it appears that two main mechanisms contribute to the restoration of the epithelial integrity: (1) acto-myosin cable contraction in a purse-string manner and (2) cell crawling driven by

lamellipodial and/or filopodial protrusions. Sometimes one mechanism dominates but often the two are both present and not mutually exclusive, making it challenging to distinguish their individual contributions [24,25] (Tables 1 and 2). Fortunately, recent development of *in vitro* approaches allowed great progress in the understanding of the relative and synergistic effects of the two mechanisms as well as their regulation, by means of applying mechanical and geometrical constraints [25*,26*,27**,28*,29,30*,31].

The acto-myosin purse-string in epithelial gap closure

The purse-string mechanism is defined as the accumulation of actin and myosin II forming a contractile cable surrounding the rim of the gap [19]. It is involved in a large variety of situations related to epithelial gap closure.

Single cell wounding is a critical event that must be quickly addressed to avoid leakage of intracellular components and subsequent cell death [32]. Cell repair by purse-string mechanism is conserved from embryonic to adult tissue cells of mammalian and non-mammalian origin [33–37]. As observed in wounded *Xenopus* oocyte, actin and myosin II accumulate at the injury site within the first minute, and then progressively segregate to form two concentric rings surrounding the rim of the gap [33,38]. A repertoire of small GTPases Rho, Rac and Cdc42 localize circumferentially around the gap and actively regulate the reorganization of acto-myosin cytoskeleton in a spatiotemporal manner [39]. During fly early embryo cell repair, the acto-myosin ring colocalize with E-cadherin at the plasma membrane [20]. In this situation, microtubules play an important role in organizing the acto-myosin ring [20,34,37] and in guiding vesicular transport to the injury site.

For gap closure events involving multiple cells and therefore epithelium healing, a supracellular purse-string has been reported to form in all cells at the wound border (Figure 1Ia). In this case, acto-myosin accumulates at the wound margin, but junctional acto-myosin also participates in the healing process [40]. Acto-myosin fibers are linked between neighboring cells, presumably through adherens and/or tight junctions [41–45], such that the supracellular cables can build-up and maintain tension across several cells. In this way, the contraction of the acto-myosin cable can drive the collective movement of the wound edge cells into the void [45] (Figure 1Ic). A complex spatiotemporal function of Rho GTPases signaling in controlling the closure has been reported [39,45–47].

Purse-string mechanism is mainly found in the closure of small monolayer defects during wound healing or cell extrusion [45,48]. The study of a pure purse-string mechanism *in vitro* has been challenging since it requires preventing cell adhesion and matrix-based migration.

However, recent studies have managed to implement *in vitro* models where epithelial gap closure can occur over non-adherent surfaces [49**,50**] (Figure 1Ib). Here, the contraction of a multicellular actin cable is efficient enough to close large-scale gaps, while the cells at the edge of the pattern are still attached to the ECM. Geometrical cues such as size and curvature of the gap matters, as well as intact intercellular junctions [28*,49**]. Interestingly, it appears that the maximal gap size that can be closed via purse-string differs among different cell types, such as keratinocytes and kidney epithelial cells, possibly due to differences in cytoskeleton and intercellular adhesion associated mechanical properties [28*,49**,50**]. In the case of skin cells, force measurements revealed that they are first exerting traction forces on the substrate that point away from the gap. Once the cells have extended over the gap, as the contractile ‘purse-string’ cables form across the leading edge cells, the radial component of the force reverts direction with a maximal radial force of proximately 4 μ N [48]. These cables contract rapidly, leading to the formation of a suspended cell sheet over the gap and complete closure of the wound. The ‘tug-of-war’ mechanism identified in this study provides a clear demonstration of how cells exert directional forces to facilitate epithelial gap closure.

The role of cell crawling in epithelial gap closure

The crawling mechanism requires the extension of a lamellipodium by leading edge cells, often switching from apico-basal polarity to front-rear polarity [51] (Figure 1IIa and IIb). This process was initially described in monolayer wounding experiments using mechanical removal of a strip of cells, that is, manual scraping with pipette tip or razor blade [16,52,53]. Other studies performed with damage-free stencil removal and surface patterning techniques have shown that gap closure can in fact be triggered by the mere presence of free space [16,54]. The geometry and the size of these gaps can be easily varied with reproducibility [29,30*,55]. First-row cells extend lamellipodia and crawl into the free space in a Rac1-dependent manner [52]. However, cells positioned rows behind the leading edge also extend unusual lamellipodia, so called ‘cryptic’, under the cell ahead [56]. Moreover, advanced image analysis showed that cells at back of the epithelial cell sheet are also motile [53]. Interestingly, when only the first row of cells are subjected to a dominant negative form of Rac1, closure proceeds normally as cells behind the leading edge, with normal levels of Rac1 activity, can jostle through the first row of cells and become leader cells. Nevertheless, the closure is abrogated when the dominant negative form of Rac1 is expressed in the three first rows of cells at the edge [52]. Therefore, although the role of leader cells remains crucial to locally orient and drive collective epithelial migration [57,58], the closure is not necessarily

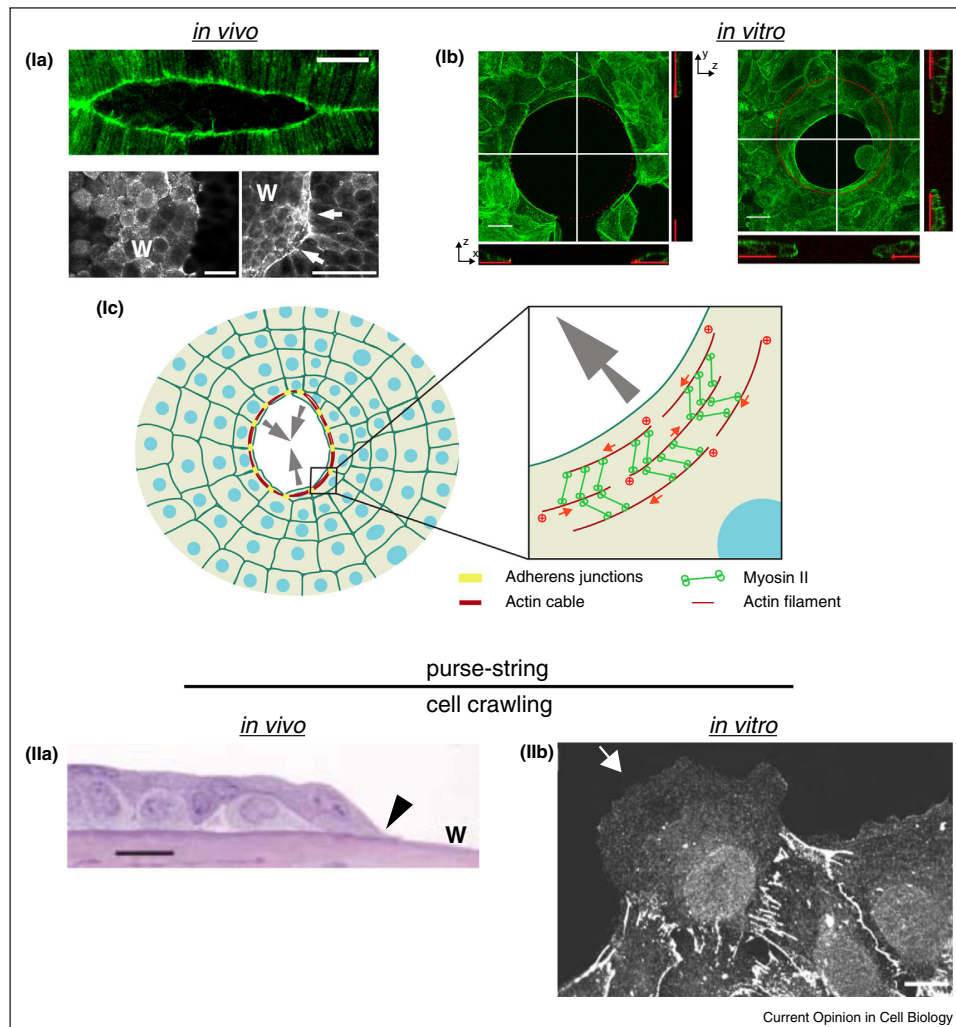
Mechanism of closure	Cell line	Method for gap production	Size of gap	Time/speed of closure	Comments	Reference
Purse-string	Four days chick embryo	Mechanical wound	0.5 mm diameter, $\approx$ squared	10–15 μ m/h		Martin <i>et al.</i> , 1992 [19]
Purse-string	Chick embryo stage 23	Mechanical wound	500 μ m long, 70 μ m wide	6 h	Rho-dependent Rac-independent	Brock <i>et al.</i> , 1996 [42]
Purse-string	Xenopus oocyte	Laser ablation	$\approx$ 10 μ m infra-cellular	?	Regulation by concentric exclusive rings of Cdc42/Rhoa	Benink <i>et al.</i> , 2005 [90]
Purse-string	Caco2	Mechanical wound	Few cells size, tens of μ m in diameter	30–45 min	MLCK and ROCK dependant	Russo <i>et al.</i> , 2005 [46]
Purse-string	MDCK (Madine-Darby Canine Kidney cells)	Laser ablation	1–3 cells size	30–60 min	MLCK ROCK dependant, actin cable anchored at tight junctions	Tamada <i>et al.</i> , 2007 [45]
Purse-string	Xenopus oocyte	Laser ablation	Infra-cellular	?	Fusion of actomyosin cables, adherens junction role	Clark <i>et al.</i> , 2009 [40]
Purse-string	Early drosophila embryo	Laser ablation	Hundreds μ m ² infra-cellular	4 μ m ² /s	E-cadherin anchors actomyosin at membrane	Abreu-blanco <i>et al.</i> , 2011 [20]
Purse-string	Drosophila embryos: Early Late Xenopus embryos	Laser ablation	$<$ 5 μ m width, $\approx$ 5 μ m long	Fast then slow regime: 40 then $<$ 5 μ m ² /min 15 then $<$ 5 μ m ² /min ?	Actin cable + medial acto-myosin network	Fernandez-Gonzalez <i>et al.</i> , 2013 [91]
Purse-string		Excision	$>$ 50 μ m		Inositol kinase tune Ca ²⁺ wave, RhoA, Cdc42 and Rac1 activity	Soto <i>et al.</i> , 2013 [92]
Purse-string + cell contraction	Blastoderm of early chick embryos	Laser ablation Mechanical wound	$<$ 10 μ m $\approx$ 100 μ m, circular	10 min (50% in 30 s)	No change in aspect ratio	Wyczalkowski <i>et al.</i> , 2013 [93]
Purse-string	HaCaT	Microscalpel Non-adherent gap	$\approx$ 200 μ m, elliptical 100 μ m diam, circular	$>$ 10 min 4–17 h	Fluctuation during closure	Vedula <i>et al.</i> , 2015 [49**]
Purse-string	MDCK	Non-adherent gap	5–75 μ m diam, circular	24 to $>$ 72 h	Fluctuation actively contribute to closing	Nier <i>et al.</i> , 2015 [50**]
Purse-string	Stratified corneal epithelial cell	Mechanical wound	1 mm, circular	48 h 0.20–0.36 μ m/min	No proliferation in actively migrating cells	Gonzalez-Andrades <i>et al.</i> , 2016 [94]
Cell crawling	MDCK	Mechanical wound	100–200 μ m wide, 500–1000 μ m long	$\approx$ 18 h	Rac dependant	Fenteany <i>et al.</i> , 2000 [52]
Cell crawling	Corneal epithelium (<i>in vivo</i>)	Mechanical wound	2–2.5 mm	$\approx$ 18 h	notable cell jostling	Danjo and Gipson 2002 [89]
Cell crawling	MDCK	Mechanical wound	250 μ m wide	6 h	Src and ERK activation (2 waves)	Matsubayashi <i>et al.</i> , 2004 [53]
Cell crawling	Primary culture of corneal cells	Mechanical wound	1 mm wide, 11 mm long	$\approx$ 15 h	EGFR and JNK activation	Block <i>et al.</i> , 2004 [95]
		Agarose removal			EGFR activation, not JNK	

Table 1 (Continued)

Mechanism of closure	Cell line	Method for gap production	Size of gap	Time/speed of closure	Comments	Reference
Cell crawling + actin accumulation	Airway epithelial cells 16HBE	Mechanical wound	678 ± 14 µm wide	15–20 h	Rho and Rac dependant at appropriate concentrations	Desai <i>et al.</i> , 2004 [47]
Cell crawling	MDCK	PDMS removal (=clean gap) PDMS ripping (=damaged border) Mechanical wound PDMS stencil removal	Infinite	10 µm/h 30 µm/h leader cells, <10 µm/h followers	1 MAPK wave 2 MAPK waves	Nikolic <i>et al.</i> , 2006 [54]
Cell crawling	MDCK	PDMS stencil removal	≈400 µm wide, cm long	≈40 h		Poujade <i>et al.</i> , 2007 [16] Lee <i>et al.</i> , 2010 [96]
Cell migration	Human oesophageal epithelial cells het1a	Cell squeezing with PDMS stamps	250 µm, square	15 h		Anon <i>et al.</i> , 2012 [29]
Cell crawling	MDCK	PDMS stencil removal	Tens to thousands of µm ²	10–350 min	In small gaps, passive closure w/o cell protrusion nor purse-string	
Cell crawling	Bovine corneal endothelial cell BCEC-L	Mechanical wound (conservative of basement membrane for BCEC-L)	Tens of µm	6 h	Healing dependant on electrical and ionic modification migration depends on Sodium channel except for BAEC cells	Justet <i>et al.</i> , 2013 [97]
	MDCK (+purse-string) Rabbit corneal epithelial cells RCEp Bovine aortal endothelial cells BAEC			16 h 6 h 12 h		
Cell crawling	Chick embryo lens epithelium explants	Microsurgery conservative for ECM	2 mm	3 days	Vimentin (not actin) is predominant in lamellipodia	Menko <i>et al.</i> , 2014 [98]
Cell crawling	MDCK (HaCaT)	PDMS stencil removal	500 µm width	≈25 µm/h	Merlin (nif2) coordinate collective migration	Das <i>et al.</i> , 2015 [99]
Cell crawling	MDCK	Plastic stencil removal	5 mm diam colonies on coll I	Observation after 2–3 days	Leader cell coordinate finger-like structure migration (PI3K, integrin β1 and Rac1 dependant)	Yamaguchi <i>et al.</i> , 2015 [100]

Mechanism of closure	Cell line	Method for gap production	Size of gap	Time/speed of closure	Comments	Reference
Purse-string + cell crawling	Caco2	Mechanical wound	1–8 cell diam (<100 μm)	2–6 h	<8 cells diam: purse string >8 cells diam: crawling	Bement <i>et al.</i> , 1993 [10]
Purse-string + lamellipodia	Mouse corneal epithelium	Mechanical wound	4 mm ²	24 h	Actin cable anchored at adherens junctions	Danjo <i>et al.</i> , 1998 [41]
1st purse-string, 2nd cell crawling	T84 colon carcinoma cells	Pipette tip aspiration	0.018 mm ² , 400 cells size	120–150 min	Dependant on integrin activation	Lotz <i>et al.</i> , 2000 [101]
1st purse-string, 2nd cell crawling	Epithelial-like cells in <i>Xenopus</i> embryo	Microsurgery	≈ 0.2 mm ² , square	60–90 min	Small wounds close at faster rate than larger wounds	Davidson <i>et al.</i> , 2002 [88]
Purse-string + lamellipodia + filopodia	Ventral epithelial cells of <i>Drosophila</i> embryo	Laser ablation mechanical wound	10 cells diam, ≈ 800 μm^2 , ≈ 15 μm diam, $\approx$ circular	120 min, 7 $\mu\text{m}^2/\text{min}$	KO RhoA x2 slower but closes Rac independent Cdc42 no final zipping adherens junction	Wood <i>et al.</i> , 2002 [3]
Syncytium formation + lamellipodia	<i>Drosophila</i> larvae	Mechanical wound	100 μm 6 cells size	24–60 h	JNK dependent	Galko <i>et al.</i> , 2004 [102]
Purse-string OR cell crawling	Bovine corneal endothelial cells	Mechanical wound (ECM removal)	150 μm or 2 mm, linear <10 cells, circular	W/o ECM, 6.25 $\mu\text{m}/\text{h}$	W/o ECM, purse string W/ECM cell crawling Irrespective of wound size	Grasso <i>et al.</i> , 2007 [103]
Actin polymerization	<i>C. elegans</i>	Mechanical wound (ECM maintenance) Laser ablation mechanical wound	20 and 40 μm diam	W/ECM, ≈ 15 $\mu\text{m}/\text{h}$ 2 h	Negatively regulated by myosin	Xu <i>et al.</i> , 2011 [104]
Purse-string + lamellipodia	Skin cells of medaka fish (<i>Oryzias latipes</i>)	Explant growth ≈ 10 μm^2	Infinite	3 h	Purse string dependant on RhoA ROCK and MyoII activity	Morita <i>et al.</i> , 2011 [105]
Purse-string + lamellipodia + filopodia	Late <i>Drosophila</i> embryo	Laser ablation	≈ 50 μm width Hundreds μm^2 , circular	1–4 h ≈ 1 h	4 steps (expansion, coalescence, contraction, closure) irrespective of the initial wound size	Abreu-Blanco <i>et al.</i> , 2012 [24]
Purse-string + cell crawling	Human corneal limbal epithelial cells	Agarose inserts digestion	Hundreds of μm	11 h	Negative curvature = purse-string positive or no curvature = crawling EGF-dependant cell crawling	Klarlund, 2012 [26*]
Purse-string + cell crawling	HaCaT, primary human keratinocytes and corneal epithelial cells	ECM geometry + stencil removal	Non-adherent 100–120 μm width	≈ 30 h	Actin cable and crawling leader cells pull on suspended cell monolayers	Vedula <i>et al.</i> , 2014 [28*]
Purse-string + cell crawling	MDCK HEK-HT	Stencil removal	50 μm , circular	5vh, ≈ 300 $\mu\text{m}^2/\text{h}$ 3 h, ≈ 500 $\mu\text{m}^2/\text{h}$	Rac1 and RhoA dependent	Cochet-Escartin <i>et al.</i> , 2014 [30*]

Figure 1



Contractile actin cable (Purse-string) or cell crawling mechanisms for epithelial gap closure both *in vivo* and *in vitro* situations. **(Ia)** Top panel: Actin labeling during embryonic dorsal closure of *D. melanogaster*. Scale bar: 20 μm (from [87]). Bottom panel: Actin staining during *Xenopus laevis* wound healing. W: wound; scale bar: 50 μm (from [88]). **(Ib)** Actin staining of HaCaT keratinocytes covering a cyto-repulsive area *in vitro* (Top and side views; left: before gap closure; right: during gap closure; fibronectin: red; from [49**]). **(Ic)** Scheme of purse-string gap closure. Cell at the gap margin assemble a supracellular contractile actin cable. Adherens junctions insure actin cable continuity between adjacent cells. Inset: Myosin II proteins cross-link actin filaments and insure contractility. **(IIa)** Light micrograph of the leading edge of healing mouse corneal epithelium. Arrowhead: lamellipodium; w: wound; scale bar: 25 μm (from [89]). **(IIb)** E-cadherin staining of a leader cell at the wound margin of rat liver epithelium cultured *in vitro*. scale bar: 10 μm .

Source: From Ref. [15] 'Copyright (2003) National Academy of Sciences, U.S.A.

only led by the leader cells [59,60]. Along this line, particle-based computational simulations relying on the migratory capacity of cells can describe *in silico* coordinated cell movements, as well as the appearance of leader cells at the boundary of cell monolayers [61,62]. In fact,

these stimulations have shown that the cell crawling behavior is sufficient to account for gap closure [63].

Controversy remains as to what triggers the activation of the protrusive machinery. In studies where cell death

58 Cell dynamics

occurs due to the closure process, damage-induced factors can initiate the response through ERK signaling pathway, whereas under conditions without damage, cell crawling may be induced by the presence of free space and self-polarization alone [53,54,64–67]. Along this line, the role of front cells is also important in coordinating the polarization of a migrating tissue through their interactions with their physical environment and neighboring cells as recently reviewed in [68].

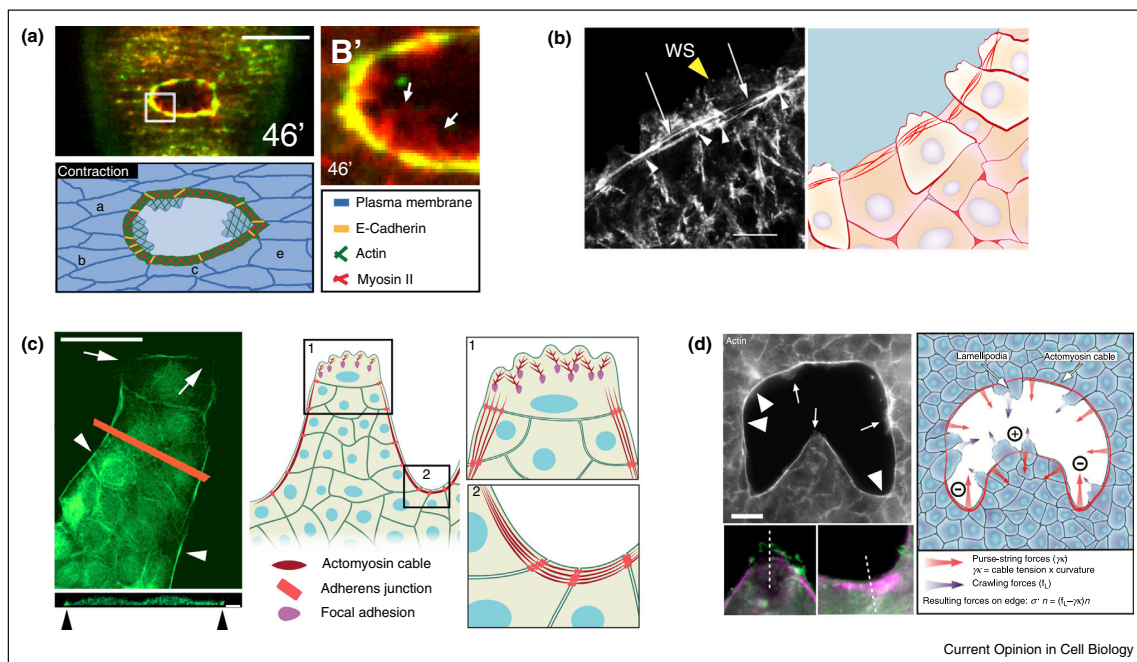
Coexistence and interplay between cell crawling and purse-string

Cell crawling and purse-string are both important for closing epithelial gaps, and one can be favored over the other depending on the experimental conditions, including the presence of dead factors, gap size and geometry. Importantly, the two mechanisms are not

mutually exclusive (Table 2). For instance, even though wound healing has been shown to mainly depend on purse-string in embryos, the presence of cellular protrusions has also been reported, and both mechanisms are required for efficient closure [3,10,69] (Figure 2a,b). Interestingly, the mode of closure appears to depend on the curvature of the wounded edge [25*].

In vitro systems have provided a novel understanding of the physical and mechanical parameters involved in epithelial gap closure [25*,26*,27*,70*]. The coexistence of cell crawling and actin-based cable contractility has been reported to be crucial for promoting optimal wound closure. Moreover, in model wounds or scratches, the leading edge repolarizes and transforms into crawling cells, with the appearance of leader cells harboring a large forward lamellipodium [15,16]. However, along the side

Figure 2



Combination of contractile cables and cell crawling for gap closure. (a) Top: the actomyosin cable and the actin-based lamellipodia (arrows) participate in embryonic gap closure. Myosin and actin are displayed green and red, respectively; scale bar: 20 μm. Bottom: schema of *D. melanogaster* embryo wound healing during contraction phase (from [24]). (b) Left: F-actin staining of the leading edge of adult mouse corneal epithelium during wound healing. At the wound margin cells extend lamellipodial protrusions (yellow arrowheads) and take a part in the assembly of the supracellular actin cable (white arrows). Note the actin reinforcement at the intercellular contacts (white arrowheads). WS: wound surface, scale bar: 10 μm (from [41]). Right: Scheme of epithelial adult mouse corneal wound healing. (c) Organization of a finger-like protrusion. At the tip of the protrusion, the leader cell extends large lamellipodia (arrows). At wound border and between two leader cells, follower cells assemble a supracellular actomyosin cable (arrowheads). Pictures show F-actin staining of the protrusive front of a kidney epithelium *in vitro*; top and side views; scale bar: 50 μm and 5 μm respectively (from [70*]). (d) Local curvature of the epithelium edge induces either lamellipodia extension (arrow) or actomyosin cable assembly (arrowhead). The amplitude of curvature is correlated with the predominance of the lamellipodia or actin cable (from [25*]); grey: F-actin; purple: phospho-myosin light chain; green: cortactin; scale bar: 20 μm). At the edge of the tissue, the force balance relies on the stress, σ , normal to the edge and the contributions of the crawling forces due to lamellipodium extension, f_L , and purse-string forces, $\gamma\kappa$, where γ is the line tension and κ the local curvature ($\kappa=1/R$).

of the protrusive front and in between two leader cells, the assembly of a supracellular actomyosin cable is frequently observed preventing new leader cell formation [70*] (Figure 2c). This cable is reminiscent of the one observed in purse-string process, and its formation also depends on RhoA activity [70*].

Brugues *et al.* studied how actomyosin cables and actin-based protrusions generate mechanical forces during wound repair [27**]. Cells adjacent to the wound generate radial traction forces pointing either away from the wound or into the wound. The inward pointing forces coincide with the position of protrusions, whereas outward pointing forces coincide with the position of actomyosin cables. Interestingly, the forces generated by the contraction of the actomyosin cable around the wound are also transmitted to the substrate. Cells transmit forces to the substrate through specialized structures known as focal adhesions (FAs) [71,72]. During epithelial gap closure, it appears that FA orientation is mostly parallel to the wound edge under the actomyosin cable but perpendicular in cell protrusions [25*,27**].

The shape of the wound, and in particular the direction of the local curvature of the gap, may be a key determinant of the modes of epithelial gap closure (Figure 2d). Negative curvature, that is, concave border, is related to actin cable assembly and purse-string-based closure, whereas positive curvature, that is, convex border, favors cell crawling [25*,26*,73,74*]. A recent study explored the roles of two gap-closing mechanisms and described how the relative contributions of the two mechanisms are affected by gap geometry [25*]. Cells predominantly crawl at positive curvature, whereas purse-string and crawling mechanisms additively operate to fill the gap in areas of negative curvature, thus leading to faster tissue velocity (Figure 2). To summarize, these two mechanisms can act in concert to close gaps consisted of both concave and convex regions and their relative contribution depends on the local curvature.

Conclusions and perspectives

Purse-string and cell crawling mechanisms have been proposed to drive epithelial gap closure, but a clear picture of their respective functions is masked by the complexity of the closure process and the variety of conditions. However, recent *in vitro* and *in vivo* experiments have shown that physical constraints, such as local tissue curvature are crucial to the regulation of gap closure mechanisms [25*,27**,70*]. Such coupling could be mediated by a differential organization of the actin cortex depending on the shape of the cell membrane, but also by a differential distribution of curvature-sensing proteins, such as BAR domain proteins [75].

Interestingly, components of cell–cell adhesion, such as E-cadherin, are also dynamically redistributed at the

wound edge, which could be mediated by contractile forces exerted by the actomyosin cable [3,42,76,77**]. Cadherin-based adhesions have been implicated in the transmission of intercellular, as well as in cell–substrate forces [78,79,80*,81], making them indispensable players in the mechanical regulation of multicellular gap closure.

Finally, it would be of great interest to systematically characterize the closure of gaps, depending on the mechanical properties of the surrounding environment, such as how the stiffness of the substrate may affect epithelial wound healing [82,83]. Aside from the passive mechanical properties of the ECM, other cells in the wound micro-environment can also actively provide mechanical cues to the epithelium. Recent works suggest that contraction of underlying cells drives *Drosophila* dorsal closure or *Zebrafish* epiboly [84]. Similarly, myofibroblasts in the dermis beneath an injured epidermis can contract and help the sealing of wounds [85,86].

Venturing into the realm between biology and physics should help us better understand the mechanics guiding epithelial gap closure. With the recent advances in *in vitro* techniques, we have the means to unveil more hidden mysteries in the process.

Acknowledgements

The authors thank Luis Almeida, Ester Anon, Chwee Teck Lim, Andrea Ravasio, Xavier Trepas and SRK. Vedula for helpful discussions. The authors would also like to thank Chun Xi Wong from MBI Science Communication Core for his help in the illustrations. Financial supports from the Human Frontier Science Programme (grant RGP0040/2012), the European Research Council under the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013)/ERC grant agreement no 617233, the Mechanobiology Institute and the LABEX 'Who am I?' are gratefully acknowledged. T.C. acknowledges the NUS-USPC programme for a graduate student fellowship.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Lecuit T, Lenne PF: **Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**:633-644.
2. Martin P, Parkhurst SM: **Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis.** *Development* 2004, **131**:3021-3034.
3. Wood W, Jacinto A, Grose R, Woolner S, Gale J, Wilson C, Martin P: **Wound healing recapitulates morphogenesis in *Drosophila* embryos.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**:907-912.
4. Behrmdt M, Salbreux G, Campinho P, Hauschild R, Oswald F, Roensch J, Grill SW, Heisenberg CP: **Forces driving epithelial spreading in zebrafish gastrulation.** *Science* 2012, **338**:257-260.
- Role of actomyosin cable contraction during tissue morphogenesis.
5. Heller E, Kumar KV, Grill SW, Fuchs E: **Forces generated by cell intercalation tow epidermal sheets in mammalian tissue morphogenesis.** *Dev Cell* 2014, **28**:617-632.
- Demonstration of the mechanical role played by cell intercalation during eyelid closure.

60 Cell dynamics

6. Hashimoto H, Robin FB, Sherrard KM, Munro EM: **Sequential contraction and exchange of apical junctions drives zippering and neural tube closure in a simple chordate.** *Dev Cell* 2015, **32**:241-255.
7. Harden N: **Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in *Drosophila*.** *Differentiation* 2002, **70**:181-203.
8. Williams-Masson EM, Malik AN, Hardin J: **An actin-mediated two-step mechanism is required for ventral enclosure of the *C. elegans* hypodermis.** *Development* 1997, **124**:2889-2901.
9. Nishimura T, Honda H, Takeichi M: **Planar cell polarity links axes of spatial dynamics in neural-tube closure.** *Cell* 2012, **149**:1084-1097.
10. Bement WM, Forscher P, Mooseker MS: **A novel cytoskeletal structure involved in purse string wound closure and cell polarity maintenance.** *J Cell Biol* 1993, **121**:565-578.
11. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT: **Wound repair and regeneration.** *Nature* 2008, **453**:314-321.
12. Shaw TJ, Martin P: **Wound repair at a glance.** *J Cell Sci* 2009, **122**:3209-3213.
13. Grinnell F: **Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation.** *J Cell Sci* 1992, **101**(Pt 1):1-5.
14. Toriseva M, Kahari VM: **Proteinases in cutaneous wound healing.** *Cell Mol Life Sci* 2009, **66**:203-224.
15. Omelchenko T, Vasiliev JM, Gelfand IM, Feder HH, Bonder EM: **Rho-dependent formation of epithelial leader cells during wound healing.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:10788-10793.
16. Poujade M, Grasland-Mongrain E, Hertzog A, Jouanneau J, Chavrier P, Ladoux B, Buguin A, Silberzan P: **Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:15988-15993.
17. Khalil AA, Friedl P: **Determinants of leader cells in collective cell migration.** *Integr Biol* 2010, **2**:568-574.
18. Martin P: **Wound healing — aiming for perfect skin regeneration.** *Science* 1997, **276**:75-81.
19. Martin P, Lewis J: **Actin cables and epidermal movement in embryonic wound healing.** *Nature* 1992, **360**:179-183.
20. Abreu-Blanco MT, Verboon JM, Parkhurst SM: **Cell wound repair in *Drosophila* occurs through three distinct phases of membrane and cytoskeletal remodeling.** *J Cell Biol* 2011, **193**:455-464.
21. Marínari E, Mehonic A, Curran S, Gale J, Duke T, Baum B: **Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit tissue overcrowding.** *Nature* 2012, **484**:542-545.
22. Eisenhoffer GT, Loftus PD, Yoshigi M, Otsuna H, Chien CB, Morcos PA, Rosenblatt J: **Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia.** *Nature* 2012, **484**:546-549.
23. Andrade D, Rosenblatt J: **Apoptotic regulation of epithelial cellular extrusion.** *Apoptosis* 2011, **16**:491-501.
24. Abreu-Blanco MT, Verboon JM, Liu R, Watts JJ, Parkhurst SM: ***Drosophila* embryos close epithelial wounds using a combination of cellular protrusions and an actomyosin purse string.** *J Cell Sci* 2012, **125**:5984-5997.
25. Ravasio A, Cheddadi I, Chen T, Pereira T, Ong HT, Bertocchi C, Bragues A, Jacinto A, Kabla AJ, Toyama Y et al.: **Gap geometry dictates epithelial closure efficiency.** *Nat Commun* 2015, **6**:7683.
 Demonstration of the influence of geometrical constraints on the mutual coupling between purse-string and cell crawling during *in vitro* epithelial closure.
26. Klarlund JK: **Dual modes of motility at the leading edge of migrating epithelial cell sheets.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:15799-15804.
 One of the first reports of correlation between geometry and organization of the leading front of epithelial cells.
27. Bragues A, Anon E, Conte V, Veldhuis JH, Gupta M, Colombelli J, Munoz JJ, Brodland GW, Ladoux B, Trepas X: **Forces driving epithelial wound healing.** *Nat Phys* 2014, **10**:684-691.
 Correlation between traction forces and the modes of closure during wound healing.
28. Vedula SRK, Hirata H, Nai MH, Bragues A, Toyama Y, Trepas X, Lim CT, Ladoux B: **Epithelial bridges maintain tissue integrity during collective cell migration.** *Nat Mater* 2014, **13**:87-96.
 One of the reports revealing the formation of suspended cell sheets as a mechanism of wound healing during collective cell migration.
29. Anon E, Serra-Picamal X, Hersen P, Gauthier NC, Sheetz MP, Trepas X, Ladoux B: **Cell crawling mediates collective cell migration to close undamaged epithelial gaps.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:10891-10896.
30. Cochet-Escartin O, Ranft J, Silberzan P, Marcq P: **Border forces and friction control epithelial closure dynamics.** *Biophys J* 2014, **106**:65-73.
 Experiments and model that describe tissue forces during epithelial gap closure.
31. Ben Amar M, Wu M: **Re-epithelialization: advancing epithelium frontier during wound healing.** *J R Soc Interf/R Soc* 2014, **11**:20131038.
32. Bement WM, Yu HY, Burkel BM, Vaughan EM, Clark AG: **Rehabilitation and the single cell.** *Curr Opin Cell Biol* 2007, **19**:95-100.
33. Mandato CA, Bement WM: **Contraction and polymerization cooperate to assemble and close actomyosin rings around *Xenopus* oocyte wounds.** *J Cell Biol* 2001, **154**:785-797.
34. Mandato CA, Bement WM: **Actomyosin transports microtubules and microtubules control actomyosin recruitment during *Xenopus* oocyte wound healing.** *Curr Biol* 2003, **13**:1096-1105.
35. Miyake K, McNeil PL, Suzuki K, Tsunoda R, Sugai N: **An actin barrier to resealing.** *J Cell Sci* 2001, **114**:3487-3494.
36. Godin LM, Vergen J, Prakash YS, Pagano RE, Hubmayr RD: **Spatiotemporal dynamics of actin remodeling and endomembrane trafficking in alveolar epithelial type I cell wound healing.** *Am J Physiol* 2011, **300**:L615-L623.
37. Togo T: **Disruption of the plasma membrane stimulates rearrangement of microtubules and lipid traffic toward the wound site.** *J Cell Sci* 2006, **119**:2780-2786.
38. Bement WM, Mandato CA, Kirsch MN: **Wound-induced assembly and closure of an actomyosin purse string in *Xenopus* oocytes.** *Curr Biol* 1999, **9**:579-587.
39. Abreu-Blanco MT, Verboon JM, Parkhurst SM: **Coordination of Rho family GTPase activities to orchestrate cytoskeleton responses during cell wound repair.** *Curr Biol* 2014, **24**:144-155.
40. Clark AG, Miller AL, Vaughan E, Yu HYE, Penkert R, Bement WM: **Integration of single and multicellular wound responses.** *Curr Biol* 2009, **19**:1389-1395.
41. Danjo Y, Gipson IK: **Actin 'purse string' filaments are anchored by E-cadherin-mediated adherens junctions at the leading edge of the epithelial wound, providing coordinated cell movement.** *J Cell Sci* 1998, **111**(Pt 22):3323-3332.
42. Brock J, Midwinter K, Lewis J, Martin P: **Healing of incisional wounds in the embryonic chick wing bud: characterization of the actin purse-string and demonstration of a requirement for Rho activation.** *J Cell Biol* 1996, **135**:1097-1107.
43. Campos I, Geiger JA, Santos AC, Carlos V, Jacinto A: **Genetic screen in *Drosophila melanogaster* uncovers a novel set of genes required for embryonic epithelial repair.** *Genetics* 2010, **184**:129-140.
44. Florian P, Schoneberg T, Schulzke JD, Fromm M, Gitter AH: **Single-cell epithelial defects close rapidly by an actomyosin purse string mechanism with functional tight junctions.** *J Physiol* 2002, **545**:485-499.
45. Tamada M, Perez TD, Nelson WJ, Sheetz MP: **Two distinct modes of myosin assembly and dynamics during epithelial wound closure.** *J Cell Biol* 2007, **176**:27-33.

46. Russo JM, Florian P, Shen L, Graham WV, Tretiakova MS, Gitter AH, Mersny RJ, Turner JR: **Distinct temporal-spatial roles for rho kinase and myosin light chain kinase in epithelial purse-string wound closure.** *Gastroenterology* 2005, **128**:987-1001.
47. Desai LP, Aryal AM, Ceacareanu B, Hassid A, Waters CM: **RhoA and Rac1 are both required for efficient wound closure of airway epithelial cells.** *Am J Physiol* 2004, **287**:L1134-L1144.
48. Rosenblatt J, Raff MC, Cramer LP: **An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism.** *Curr Biol* 2001, **11**:1847-1857.
49. Vedula SRK, Peyret G, Cheddadi I, Chen T, Bragues A, Hirata H, Lopez-Menendez H, Toyama Y, de Almeida LN, Treppe X et al.: **Mechanics of epithelial closure over non-adherent environments.** *Nat Commun* 2015, **6**:6111.
- Closure of epithelial gaps exclusively driven by a purse-string mechanism.
50. Nier V, Deforet M, Duclos G, Yevick HG, Cochet-Escartin O, Marcq P, Silberzan P: **Tissue fusion over nonadhering surfaces.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, **112**:9546-9551.
- Closure of MDCK epithelial gaps exclusively driven by a purse-string mechanism.
51. Theveneau E, Mayor R: **Collective cell migration of epithelial and mesenchymal cells.** *Cell Mol Life Sci* 2013, **70**:3481-3492.
52. Fenteany G, Janmey PA, Stossel TP: **Signaling pathways and cell mechanics involved in wound closure by epithelial cell sheets.** *Curr Biol* 2000, **10**:831-838.
53. Matsubayashi Y, Ebisuya M, Honjoh S, Nishida E: **ERK activation propagates in epithelial cell sheets and regulates their migration during wound healing.** *Curr Biol* 2004, **14**:731-735.
54. Nikolic DL, Boettiger AN, Bar-Sagi D, Carbeck JD, Shvartsman SY: **Role of boundary conditions in an experimental model of epithelial wound healing.** *Am J Physiol-Cell Physiol* 2006, **291**:C68-C75.
55. Vedula SRK, Ravasio A, Anon E, Chen T, Peyret G, Ashraf M, Ladoux B: **Microfabricated environments to study collective cell behaviors.** *Methods Cell Biol* 2014, **120**:235-252.
56. Farooqui R, Fenteany G: **Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement.** *J Cell Sci* 2005, **118**:51-63.
57. Reffay M, Petitjean L, Coscoy S, Grasland-Mongrain E, Amblard F, Buguin A, Silberzan P: **Orientation and polarity in collectively migrating cell structures: statics and dynamics.** *Biophys J* 2011, **100**:2566-2575.
58. Vedula SRK, Ravasio A, Lim CT, Ladoux B: **Collective cell migration: a mechanistic perspective.** *Physiology* 2013, **28**:370-379.
59. Serra-Picamal X, Conte V, Vincent R, Anon E, Tambe DT, Bazellieres E, Butler JP, Fredberg JJ, Treppe X: **Mechanical waves during tissue expansion.** *Nat Phys* 2012, **8**:U628-U666.
60. Vedula SRK, Leong MC, Lai TL, Hersen P, Kabla AJ, Lim CT, Ladoux B: **Emerging modes of collective cell migration induced by geometrical constraints.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:12974-12979.
61. Kabla AJ: **Collective cell migration: leadership, invasion and segregation.** *J R Soc Interf/R Soc* 2012, **9**:3268-3278.
62. Sepulveda N, Petitjean L, Cochet O, Grasland-Mongrain E, Silberzan P, Hakim V: **Collective cell motion in an epithelial sheet can be quantitatively described by a stochastic interacting particle model.** *PLoS Comput Biol* 2013, **9**:e1002944.
63. Lee P, Wolgemuth CW: **Crawling cells can close wounds without purse strings or signaling.** *PLoS Comput Biol* 2011:7.
64. Altan ZM, Fenteany G: **c-Jun N-terminal kinase regulates lamellipodial protrusion and cell sheet migration during epithelial wound closure by a gene expression-independent mechanism.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **322**:56-67.
65. Mine N, Iwamoto R, Mekada E: **HB-EGF promotes epithelial cell migration in eyelid development.** *Development* 2005, **132**:4317-4326.
66. Dupin I, Camand E, Etienne-Manneville S: **Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity.** *J Cell Biol* 2009, **185**:779-786.
67. Desai RA, Gao L, Raghavan S, Liu WF, Chen CS: **Cell polarity triggered by cell-cell adhesion via E-cadherin.** *J Cell Sci* 2009, **122**:905-911.
68. Mayor R, Etienne-Manneville S: **The front and rear of collective cell migration.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016, **17**:97-109.
69. Garcia-Fernandez B, Campos I, Geiger J, Santos AC, Jacinto A: **Epithelial resealing.** *Int J Dev Biol* 2009, **53**:1549-1556.
70. Reffay M, Parrini MC, Cochet-Escartin O, Ladoux B, Buguin A, Coscoy S, Amblard F, Camonis J, Silberzan P: **Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells.** *Nat Cell Biol* 2014, **16**:217-223.
- Demonstration of the importance of leader cell formation in the mechanics of collective cell migration during wound healing.
71. Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, Mahalu D, Safran S, Bershadsky A, Addadi L et al.: **Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**:466-472.
72. Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, Ramko EB, Davidson MW, Hess HF, Waterman CM: **Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions.** *Nature* 2010, **468**:580-584.
73. Rolli CG, Nakayama H, Yamaguchi K, Spatz JP, Kemkemer R, Nakanishi J: **Switchable adhesive substrates: revealing geometry dependence in collective cell behavior.** *Biomaterials* 2012, **33**:2409-2418.
74. Rausch S, Das T, Soine JR, Hofmann TW, Boehm CH, Schwarz US, Boehm H, Spatz JP: **Polarizing cytoskeletal tension to induce leader cell formation during collective cell migration.** *Biointerphases* 2013, **8**:32.
- Demonstration of the importance of geometrical cues on tissue polarization.
75. Scita G, Confalonieri S, Lappalainen P, Suetsugu S: **IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions.** *Trends Cell Biol* 2008, **18**:52-60.
76. Zulueta-Coarasa T, Tamada M, Lee EJ, Fernandez-Gonzalez R: **Automated multidimensional image analysis reveals a role for Abl in embryonic wound repair.** *Development* 2014, **141**:2901-2911.
77. Wu SK, Gomez GA, Michael M, Verma S, Cox HL, Lefevre JG, Parton RG, Hamilton NA, Neufeld Z, Yap AS: **Cortical F-actin stabilization generates apical-lateral patterns of junctional contractility that integrate cells into epithelia.** *Nat Cell Biol* 2014, **16**:167-178.
- Role of intercellular junctions on the regulation of actomyosin contractility throughout the apical-lateral axis of junctions.
78. Ladoux B, Anon E, Lambert M, Rabodzey A, Hersen P, Buguin A, Silberzan P, Mege RM: **Strength dependence of cadherin-mediated adhesions.** *Biophys J* 2010, **98**:534-542.
79. Chu YS, Thomas WA, Eder O, Pincet F, Perez E, Thiery JP, Dufour S: **Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42.** *J Cell Biol* 2004, **167**:1183-1194.
80. Bazellieres E, Conte V, Elosegui-Artola A, Serra-Picamal X, Bintanel-Morcillo M, Roca-Cusachs P, Munoz JJ, Sales-Pardo M, Guimera R, Treppe X: **Control of cell-cell forces and collective cell dynamics by the intercellular adhesome.** *Nat Cell Biol* 2015, **17**:409-420.
- Role of intercellular forces during collective cell migration and wound healing.
81. Mertz AF, Che Y, Banerjee S, Goldstein JM, Rosowski KA, Revilla SF, Niessen CM, Marchetti MC, Dufresne ER, Horsley V: **Cadherin-based intercellular adhesions organize epithelial cell-matrix traction forces.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:842-847.

62 Cell dynamics

82. Ng MR, Besser A, Danuser G, Brugge JS: **Substrate stiffness regulates cadherin-dependent collective migration through myosin-II contractility.** *J Cell Biol* 2012, **199**:545-563.
83. Pelham RJ, Wang YL: **Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:13661-13665.
84. Solon J, Kaya-Copur A, Colombelli J, Brunner D: **Pulsed forces timed by a ratchet-like mechanism drive directed tissue movement during dorsal closure.** *Cell* 2009, **137**:1331-1342.
85. Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G: **Tissue repair, contraction, and the myofibroblast.** *Wound Repair Regen: Off Publ Wound Healing Soc Eur Tissue Repair Soc* 2005, **13**:7-12.
86. Hinz B: **Formation and function of the myofibroblast during tissue repair.** *J Invest Dermatol* 2007, **127**:526-537.
87. Woolner S, Jacinto A, Martin P: **The small GTPase Rac plays multiple roles in epithelial sheet fusion — dynamic studies of Drosophila dorsal closure.** *Dev Biol* 2005, **282**:163-173.
88. Davidson LA, Ezin AM, Keller R: **Embryonic wound healing by apical contraction and ingression in *Xenopus laevis*.** *Cell Motil Cytoskeleton* 2002, **53**:163-176.
89. Danjo Y, Gipson IK: **Specific transduction of the leading edge cells of migrating epithelia demonstrates that they are replaced during healing.** *Exp Eye Res* 2002, **74**:199-204.
90. Benink HA, Bement WM: **Concentric zones of active RhoA and Cdc42 around single cell wounds.** *J Cell Biol* 2005, **168**:429-439.
91. Fernandez-Gonzalez R, Zallen JA: **Wounded cells drive rapid epidermal repair in the early Drosophila embryo.** *Mol Biol Cell* 2013, **24**:3227-3237.
92. Soto X, Li J, Lea R, Dubaissi E, Papalopulu N, Amaya E: **Inositol kinase and its product accelerate wound healing by modulating calcium levels, Rho GTPases, and F-actin assembly.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:11029-11034.
93. Wyczalkowski MA, Varner VD, Taber LA: **Computational and experimental study of the mechanics of embryonic wound healing.** *J Mech Behav Biomed Mater* 2013, **28**:125-146.
94. Gonzalez-Andrades M, Alonso-Pastor L, Mauris J, Cruzat A, Dohlman CH, Argueso P: **Establishment of a novel in vitro model of stratified epithelial wound healing with barrier function.** *Scientific Rep* 2016, **6**:19395.
95. Block ER, Matela AR, SundarRaj N, Iszkula ER, Klarlund JK: **Wounding induces motility in sheets of corneal epithelial cells through loss of spatial constraints: role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor signaling.** *J Biol Chem* 2004, **279**:24307-24312.
96. Lee J, Wang YL, Ren F, Lele TP: **Stamp wound assay for studying coupled cell migration and cell debris clearance.** *Langmuir* 2010, **26**:16672-16676.
97. Justet C, Evans F, Vasilskis E, Hernandez JA, Chifflet S: **ENaC contribution to epithelial wound healing is independent of the healing mode and of any increased expression in the channel.** *Cell Tissue Res* 2013, **353**:53-64.
98. Menko AS, Bleaken BM, Libowitz AA, Zhang L, Stepp MA, Walker JL: **A central role for vimentin in regulating repair function during healing of the lens epithelium.** *Mol Biol Cell* 2014, **25**:776-790.
99. Das T, Safferling K, Rausch S, Grabe N, Boehm H, Spatz JP: **A molecular mechanotransduction pathway regulates collective migration of epithelial cells.** *Nat Cell Biol* 2015, **17**:276-287.
Role of merlin, accumulated at cell-cell junctions, in coordinating collective migration of tens of cells through polarization of Rac1.
100. Yamaguchi N, Mizutani T, Kawabata K, Haga H: **Leader cells regulate collective cell migration via Rac activation in the downstream signaling of integrin beta1 and PI3K.** *Scientific Rep* 2015, **5**:7656.
101. Lotz MM, Rabinovitz I, Mercurio AM: **Intestinal restitution: progression of actin cytoskeleton rearrangements and integrin function in a model of epithelial wound healing.** *Am J Pathol* 2000, **156**:985-996.
102. Galko MJ, Krasnow MA: **Cellular and genetic analysis of wound healing in Drosophila larvae.** *PLoS Biol* 2004, **2**:E239.
103. Grasso S, Hernandez JA, Chifflet S: **Roles of wound geometry, wound size, and extracellular matrix in the healing response of bovine corneal endothelial cells in culture.** *Am J Physiol* 2007, **293**:C1327-C1337.
104. Xu S, Chisholm AD: **A Gα₁₂-Ca²⁺ signaling pathway promotes actin-mediated epidermal wound closure in *C. elegans*.** *Curr Biol* 2011, **21**:1960-1967.
105. Morita T, Tsuchiya A, Sugimoto M: **Myosin II activity is required for functional leading-edge cells and closure of epidermal sheets in fish skin ex vivo.** *Cell Tissue Res* 2011, **345**:379-390.

2 Traction force microscopy: substrate fabrication protocol

Traction Force Microscopy Protocol

Preparation of PDMS

1. For 100 μm thickness, measure 0.07 to 0.1 g per dish. ($\rightarrow$ 0.3g instead)
2. Mix components A to B (PDMS CY52-276) according to stiffness requirements. Note A to B ratios:
 - 5:5 approx. 15kPa
 - 5:6 approx. 30kPa
 - 6:5 approx. 3kPa
3. When adding A to B, mix thoroughly and quickly. No need to de-gas (it will cure)
4. Let it overnight in Fluorodish at room temperature to let it flatten.
5. Incubate at 80 deg. C for 1 hrs. (30min at 70°C according to sylgard) (10min can be enough if you have let it outside overnight).

Silanisation

6. Silanise PDMS using (3-aminopropyltriethoxsilane – Sigma cat. No. A3648). Dilute silane in 100% lab grade ethanol (96% ethanol is fine) to make a 10% solution (e.g. 100 μl silane into 1 ml ethanol). Be sure that it is well mixed. Add 1.5-2ml per dish.
7. Incubate at RT for 5 to 10 min.
8. Rinse and decant with 100% ethanol 3X. (optional)
9. Dry in oven for approx. 10min.

Attaching Fluorescent Beads to PDMS Surface

10. Dilute fluorescent beads (Invitrogen F8803) 2:1000 in Millipore water (e.g. 18 μl in 9 ml water). Sonicate, filter (0.45 μm filter, beads are 200nm large) and add approx. 3 ml per dish.
11. Incubate at RT for 5 to 10 min.
12. Rinse with Millipore water 3X. (optional)
13. Dry in oven for 10 minutes. Briefly check under fluorescence microscope to look at distribution of beads.
14. If required, Tris 100mM 20 min to passivate the beads.
15. Rinse with Millipore water 3X.
16. Dry in oven for 10-15 min.
17. Samples can be stored

Patterning using PVA membrane

18. Dilute PVA approximately at wt.2% (4%). To make one membrane in a 94 mm petri dish, prepare 20ml (10ml) of the solution. It's easier to dilute a 2% but take more time to dry.
19. Put it overnight in oven followed by magnetic stirring at 90°C for 2h-3h to dissolve PVA particles if needed.
20. Use a 0.45 μm filter to remove remaining particles
21. Poured your solution in a 94 mm petri dish and let it dry under a laminar hood. Can take some time (2 days). Open the lid but not too much, otherwise you'll have wrinkle on the surface.
22. Prepare your PDMS stamp and your 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronectin solution. Incubate 1h

23. Wash and dry your stamp with an air gun.
24. Stamp on the PVA membrane. "Draw" the outline of the stamp with a scalpel without cutting the membrane. Remove the stamp and cut the membrane.
25. Put very gently the PVA membrane on the soft PDMS
26. Let in contact for 1h at RT.
27. Dissolve the membrane with PBS, pluronics or water. If you also need to block outside the pattern, you can directly use pluronics F127 1% to do it. Wash after 30min and add fresh pluronics for 30 more minutes.
28. Don't let the soft PDMS dry once it had been wet.

3 Keratinocytes from keratin-deficient mice: Cell culture protocol

Keratinocytes from keratin-deficient mice

19.10.2012 TM

General

Cells were derived from strain C57Bl6 on 3T3J2 feeders and spontaneously immortalized (Turksen (ed.) Epidermal Cells, Methods in Molecular Biology 585, chapter 5). Keratinocytes are highly adherent, and grow optimally on collagen I-coated dishes. To maintain their proliferative potential, Ca^{2+} in the serum must be adjusted to 50 μM . Avoid low density as they require cell-cell contact. Also, avoid prolonged time in suspension; loss of cell-matrix contact induces anoikis. Typical split ratio is 1:2, not more than 1:3! Cells are grown at 37°C. We use cell culture plastic from TPP (also possible), cell culture grade water and high quality serum (PAA Gold).

Thawing and plating cells

Coat a 6 cm dish with 90-120 μl of collagen I working solution per cm^2 growth area. Leave at 37°C for 30 min. Aspirate and rinse dish 2 x with PBS.

Thaw 1 freezing vial containing 1.5-2 million cells quickly by incubation in 37°C water bath and immediately transfer to sterile bench. Transfer cells into 50 ml plastic tube containing 10 ml of pre-warmed medium. Shake gently to mix and spin for 5 min at 1.000 rpm (RT). Re-suspend in 6 ml of medium and disperse cells by pipetting up and down a few times. Afterwards plate cells on collagen-coated 6 cm dish. Change medium next day. If they are confluent, split 1:2 and plate them onto a 6 cm dish until confluence. If large amounts of cell are required, switch to 10 cm dishes (to go from 6 to 10 cm means 1:3 splitting).

If you receive cells that stably re-express keratins (by lentiviral gene transfer), cells should always be cultured in selection (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of puromycin-or other, information is provided) medium. The frozen stocks we ship contain 95-99 % of stable transfectants. Regularly check presence of transfected keratins (e.g K5 or K6) by immunofluorescence and by Western blotting.

Subculture

Passage cells only when they are confluent (appr. 4-5 mill. cells on 10 cm dish). Typical split is 1:2, therefore coat 2 plates for each plate to be trypsinized (every 4-5 days). Aspirate media and wash cells with PBS (Ca^{2+} and Mg^{2+} -free). Add 2 ml of trypsin solution per 6 cm dish (3 for 10 cm dish) (0.025 % trypsin/0.02% EDTA in PBS). Incubate cells for 7-8 min at 37°C until cells detach. Check detachment of cells by microscopy. Add same amount of fresh media and pipette the cells up and down several times to neutralize the trypsin/EDTA. Pellet the cells by low speed centrifugation (1000 rpm for 4 minutes, RT), aspirate media, resuspend cells in 10 ml of fresh media and replat them into 2 dishes. Add media up to 6 ml on 6 cm and 10 ml on 10 cm dish. Cells should not be seeded lower than 30.000 cells per cm^2 .

Induction of terminal differentiation by addition of Ca^{2+}

Terminal differentiation of keratinocytes can be induced by culturing cells in FAD media containing high content of calcium. In general 2 million cells were seeded into a 10 cm collagen coated dish. When cells are used for calcium shift experiments the normal FAD media is changed to FAD+ Media containing 1.2 mM CaCl_2 on the next day. Experiments in high calcium are performed 3 days after plating and 48-50h after the calcium shift. (FAD+ - Differentiation media FAD media containing 1.2 mM CaCl_2)

Freezing

Cryopreserve keratinocytes at 2×10^6 cells per vial. Trypsinize cells as described, spin down as above and resuspend 2×10^6 cells in freeze solution (90 % FCS Gold (Chelex treated) and 10% DMSO). To freeze, fill the cells into a cryotube and transfer it in a Nalgene freezing box immediately. Add 250 ml isopropanol in Nalgene freezing container. Place Nalgene container into -80°C ON (or at least 4 hrs). Thereafter, transfer cells to liquid nitrogen container.

Media, coatings, supplements:

Keratinocytes are routinely cultured in the presence of 10 % Chelex-treated serum.

FAD - Cell culture media

To prepare 500 ml of complete media, set up as follows:

DMEM/Ham's F12, low Calcium (50 μM) Biochrom F.-9092 (US sales: Cedarlane Laboratories U.S.A.)

50 ml	FCS (Chelex-treated !)	- PAA A15-151 (500ml)
5 ml	Glutamax [100x]	- Invitrogen 35050-038 (500ml)
5 ml	Pyruvate [100x]	- PAA S11-003 (100ml)
2,5 ml	Penicillin/Streptomycin	- Invitrogen 15140-122 (100mg)
2 ml	Adenin [250x]	- Sigma A8626-5G (5g)
500 μl	EGF [1000x]	- Invitrogen 53003-018 (100 μg)
500 μl	Insulin [1000x]	- Sigma-Aldrich I-9278 (5ml)
250 μl	Hydrocortison [2000x]	- Sigma-Aldrich H4001-1G (1g)
5 μl	Choleratoxin [10^{-5}M]	- Sigma C-8052 (1mg)

Preparation of stock solutions

Adenine (Sigma A8626-5G): stock (250x): 45mM in 0.05 N HCl; storage: -20°C

2ml stock/ 460ml media > final concentration 0.18mM

Hydrocortison (Sigma-Aldrich H4001-1G): stock. (2000x): 1mg/ml in EtOH; storage: -20°C

250 μl stock/ 460ml media > end concentration 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Insulin (Sigma-Aldrich I-9278): stock. 5 mg/ml; storage: -20°C

0.5ml stock/ 460ml media > final concentration 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

EGF (Invitrogen 53003-018): stock. (1000x): 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in FAD Media; storage: -20°C

0.5ml stock/ 460ml media > final concentration 10ng/ml

Cholera toxin (Sigma C-8052): stock. (10-5M): 1mg/1,18ml sterile water; storage: 4°C

50 μl stock/ 500ml media > final concentration 10-10M

Glutamax (Invitrogen 35050-038): stock. (100x): 200mM; storage: -20°C

5ml stock/ 500ml media > final concentration 2mM

Pen/Strep (Invitrogen): stock. (100x); storage: -20°C

2,5 ml stock/ 500ml media > final concentration 100U/ml P., 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ S.

Pyruvate [100x] (PAA S11-003), final conc. 1 x.

Penicillin/Streptomycin (Invitrogen 15140-122). Use at 1 x for final conc.

Collagen I (BD Biosciences 354236) Use at $\sim 0,045 \text{ mg}/\text{ml}$ 0,02 N acetic acid for final conc.

Use 90-120 μl of per cm^2 growth area.

Preparation of collagen I

Prepare always fresh in sterile bottle!

Stock solution 4,27 [3,91] mg/ml collagen I in 0,02 N acetic acid

Final solution: 0,5 ml stock solution
 42,7 ml 0,02 N acetic acid

Prepare 0.02 N acetic acid from concentrated stock, using cell culture grade water. 0.02 N acetic acid is prepared from stock: to 500 ml of cell culture grade water, add 570 µl of concentrated acetic acid.

Use the following amounts of final solutions:

75 cm ² flask	6-7 ml
10 cm dish	6-7 ml
25 cm ² flask	3-4 ml
6 cm dish	2-3 ml
6 well	1 ml
3,5 cm dish	1 ml
24 well	0.25 ml

Serum

We routinely use FCS Gold (PAA A15-151). To lower Ca²⁺ concentration in the serum, it is treated with neutralized Chelex 100 (Bio-Rad) 5g/ 50ml FBS as described below.

Rinsing and neutralizing Chelex 100

1. Add 500ml Milli-Q dH₂O 500ml to flask or beaker
2. Add 100g Chelex (Bio-Rad) while stirring.
3. Turn off stirrer and let Chelex settle for 30 min.
4. Adjust pH to 7.35-7.4 with HCL (3-6 M)
5. Pour off dH₂O while being careful not pour off any Chelex
6. Again, wash one time with Milli-Q dH₂O: add dH₂O, stir 5 min, let Chelex settle for 30 min, then pour off dH₂O
7. Wash two times with 500 ml PBS as in step 6. On the last wash with PBS, stabilize the pH to 7.35-7.4 before letting Chelex settle.
8. Pour off PBS carefully.

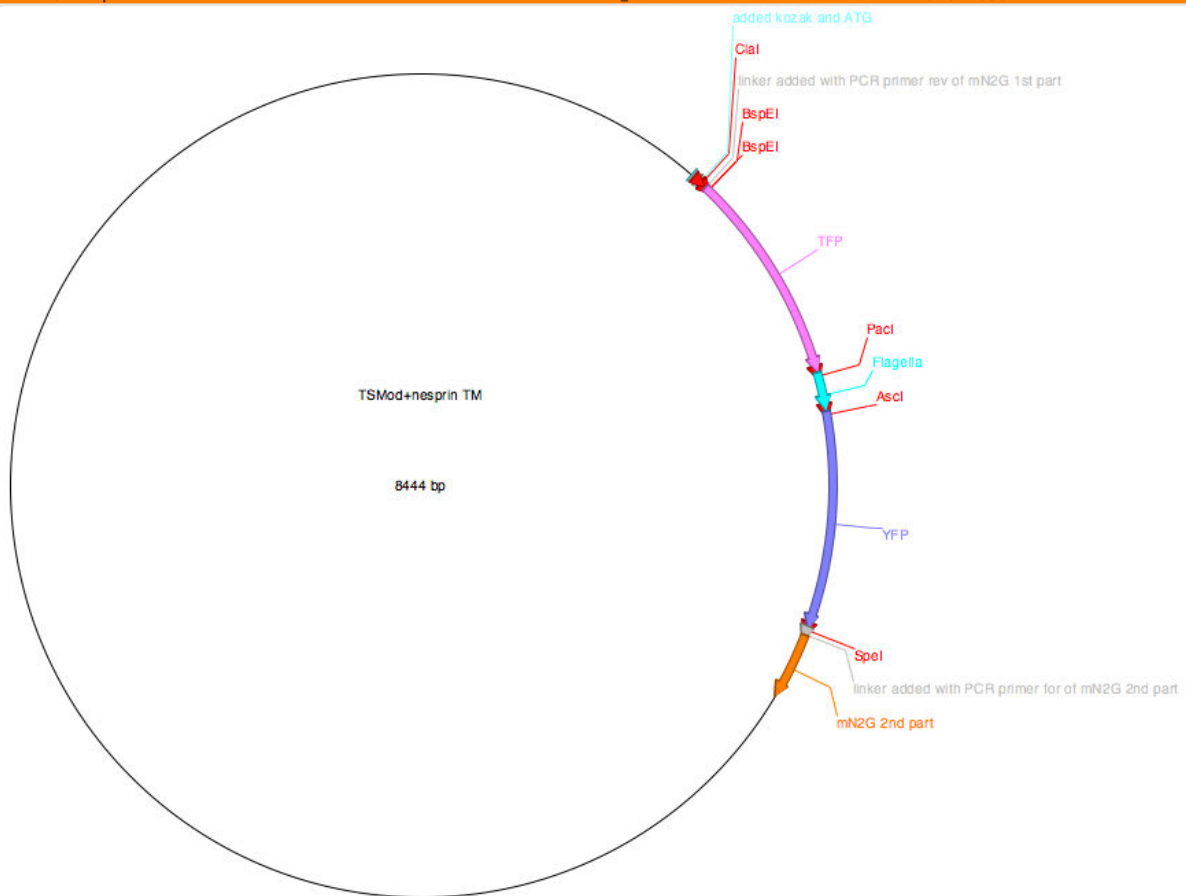
Preparing chelexed Serum

9. Add 500ml of cold (4°C) FBS to 100g Chelex (in a flask or beaker)
10. Stir 1h at 4°C in the darkness (wrap with aluminum foil)
11. Filter FBS once through a 0.45 µm filter to remove remaining resin and again through a 0.22 µm filter to sterilize.
12. Set aside a sample to check that the pH is in a range of 7.35-7.4.
13. Label, aliquot into 15ml or 50ml sterile containers and store at -20°C in the dark.

4 KASH-TSMod: Plasmid genetic map

TSMod+nesprin TM

Feature	Direction	Type	Location ↓
added kozak and ATG	>>>	misc_feature	983..994
ClaI	>>>	misc_feature	995..1000
linker added with PCR primer rev of mN2G 1st part	>>>	misc_feature	1001..1024
BspEI	>>>	misc_feature	1025..1030
BspEI	>>>	misc_feature	1025..1030
TFP	>>>	misc_feature	1031..1735
PacI	>>>	misc_feature	1736..1744
Flagella	>>>	misc_feature	1745..1864
Ascl	>>>	misc_feature	1865..1873
YFP	>>>	misc_feature	1874..2587
SpeI	>>>	misc_feature	2588..2593
linker added with PCR primer for of mN2G 2nd part	>>>	misc_feature	2594..2617
mN2G 2nd part	>>>	misc_feature	2618..2830



5 Kit Click-It™; Edu incorporation protocol

KIT CLICK-IT EdU INVITROGEN THERMO FISHER SCIENTIFIC C10337 MARQUAGE SUR CELLULES

Solutions stock :

- Component A= EdU: Resuspendre l'EdU 5mg dans 2ml de DMSO ou NaCl 0,9%. Donc solution stock à 10mM (10- 2M) ; aliquots de 10 ou 100ul.
- Component B= Alexa Fluor Azide: Alexa Fluor resuspendre dans 70ul de DMSO ; aliquots de 10ul.
- Component D = Reaction buffer : 4 ml dans 36ml d'H₂O = 40ml, 1 bouteille à 4°C.
- Component F = Buffer additive : diluer de 10X à 1X dans H₂O (400mg dans 2ml d'H₂O); aliquots de 50ul. Stock à -20°C.

Manip :

- 2ul d'EdU dans 1ml de milieu frais.
- Transférer les lamelles de verre dans des plaques à 6 puits.
- A 1ml de vieux milieu, ajouter 1ml de milieu frais + EdU (working concentration 10uM).
- Pulse : 15min
- Enlever le milieu EdU
- Rincage PBS1X
- Fixation PFA 4% pendant 15 minutes.
- 1 lavage PBS.
- Perméabilisation 5 min au TX-100 0,5%, et préparation du Cocktail.
- 1 lavage PBS.
- Ajouter le cocktail pour détection de l'EdU, en obscurité. Cocktail (500 ul) pour une lamelle :

Cocktail	500ul	200ul	100ul
D=1X Click-iT reaction buffer (4°C)	430	172	86
CuSO ₄ (4°C) (vial du kit)	20	8	4
B=Alexa Fluor (-20°C, sortir à l'avance)	2	1	0,5
F= Reaction buffer additive (-20°C)	50	20	10

- Incuber pendant 30 min. à température ambiante et en absence de lumière.
----- Protéger autant que possible de la lumière à partir de maintenant -----
- 1 lavage PBS.
- (si combiné avec immunomarquages, à faire à ce moment là : saturation avec saponine 0.025% + BSA 1% pendant 30 min., incubation des anticorps primaires pendant la nuit dilués en saponine 0.025% + BSA 1%...).
- Hoechst pendant 20 min
- 1 lavage PBS
- 1 lavage H₂O MQ.
- Montage avec du Mowiol.

Date d'édition : Tuesday 17 October 2017

