



**HAL**  
open science

# Maturation et mise en compétition de monocouches cellulaires

Simon Garcia

► **To cite this version:**

Simon Garcia. Maturation et mise en compétition de monocouches cellulaires. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066438 . tel-01598867

**HAL Id: tel-01598867**

**<https://theses.hal.science/tel-01598867>**

Submitted on 30 Sep 2017

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

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

# Université Pierre et Marie Curie

École doctorale n° 564 : Physique en Île-de-France

Laboratoire PhysicoChimie Curie / Équipe Physicobiologie aux méso-échelles

## Maturation et mise en compétition de monocouches cellulaires

**Simon GARCIA**

Thèse de doctorat de Physique

Dirigée par **Pascal SILBERZAN**

Présentée et soutenue publiquement le 28 septembre 2015

### Jury

Mme Sylvie COHEN-ADDAD,	Professeur des universités,	Présidente du jury
M. Thierry MORA,	Chargé de recherche,	Examineur
M. Xavier NOBLIN,	Chargé de recherche,	Rapporteur
Mme Catherine QUILLIET,	Maître de conférences,	Rapporteuse
M. Jean-Paul RIEU,	Professeur des universités,	Examineur
M. Pascal SILBERZAN,	Directeur de recherche,	Directeur de thèse

**Laboratoire PhysicoChimie Curie**  
UMR 168 CNRS/UPMC/Institut Curie  
Institut Curie – Centre de Recherche  
11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 PARIS, FRANCE



*“Now these points of data make a beautiful line.”*

Jonathan COULTON, “Still Alive”.

*Cette thèse est dédiée à mes grands-parents, Asunción et Cándido GARCÍA.*



# Remerciements

J'ai eu l'occasion de le dire le jour de la soutenance, une thèse c'est aussi un travail d'équipe. Ce travail et son heureuse issue n'auraient pas pu avoir lieu sans l'aide et le soutien de tout un tas de gens, que je tiens à remercier céans.

Mes premiers mercis vont aux membres de mon jury, qui ont accepté de faire de moi un docteur : Catherine et Xavier, mes rapporteurs, ainsi que Jean-Paul, Sylvie et en particulier mon tuteur Thierry, qui a suivi cette thèse au rythme plus ou moins régulier de nos comités de thèse.

Ma reconnaissance va enfin au dernier membre de ce jury, mais non le moindre. Merci donc à Pascal de m'avoir accueilli en stage puis en thèse, d'avoir dirigé ces recherches pendant plus de quatre ans, d'avoir été présent et disponible pour répondre à toutes mes questions, de m'avoir aidé et soutenu quand ma motivation flanchait. Merci pour la liberté et l'autonomie qu'il m'a laissé avoir au laboratoire, y compris lorsque ma thèse a bifurqué dans une direction inattendue qui représente aujourd'hui l'essentiel de cet ouvrage. Ma formation en tant que scientifique lui doit beaucoup.

Merci également à Axel, l'autre chef de cette équipe, pour sa grande aide et ses conseils, qu'il s'agisse de recherche ou d'enseignement. Merci à Isabelle de m'avoir poussé à prendre du recul à chaque fois que j'en manquais et à aller de l'avant. Merci aussi pour les discussions diverses, professionnelles ou personnelles, qui ont émaillé ces dernières années.

Travailler pendant plusieurs années sur un même projet pourrait être rébarbatif si une bonne ambiance d'équipe ne venait compenser les moments creux. J'ai eu la chance d'être bien entouré pendant ma thèse. Merci à Maxime et Olivier pour leur disponibilité lors de mes débuts, merci à Daniel pour les interminables pauses-café passées à s'indigner en chœur et imaginer un monde qui tourne un peu plus rond, merci à Hannah pour sa propension à me trouver des surnoms seyants et à me faire découvrir d'autres GARCIA plus ou moins recommandables, merci à Guillaume d'avoir tenté de me faire courir et merci à Sarah pour les fréquents bonbons et les plus rares sorbets. Merci à tous ceux-là pour la très agréable vie quotidienne au laboratoire.

Merci aussi aux stagiaires venus temporairement prêter leur sang neuf à l'équipe, notamment Adrien, en stage en même temps que moi, Sophie et Anaïs, qui ont dû me souffrir comme encadrant (sans se plaindre!), mais aussi Quentin, très sympathique bien qu'atrocement jeune.

Toujours dans l'équipe, merci enfin à Guillaume d'avoir occupé l'autre bureau de notre *friendly office*. Merci pour les photomontages de qualité, les duos approximatifs, les blagues pourries, les expériences à base de ventilateur, le pinot noir du midi et tout le reste. Ma thèse aurait été radicalement différente, et en l'occurrence radicalement moins bien, s'il n'avait pas été là. *Arrivederci*. #bromance

Ma thèse a fait appel à des techniques variées que j'étais loin de maîtriser à l'origine. Je remercie grandement Sylvie, Fanny, John pour la culture cellulaire et la biologie moléculaire.

Merci aussi à Rémy et Benoît de l'atelier pour les divers coups de main dans le perfectionnement de nos microscopes. Merci aux équipes des plates-formes d'imagerie de l'Institut Curie, en particulier les deux Olivier qui m'ont rendu maints services. Et parce que la vie au laboratoire, ce n'est pas que de la recherche, merci à Brigitte, Nicole, Agnès, Laurence et Karen pour leur aide dans tous les autres aspects, notamment administratifs, de cette thèse.

Merci à Nir GOV, Édouard HANNEZO, Jens ELGETI, Jean-François JOANNY pour ce travail de collaboration de longue haleine. Ma thèse serait bien moins aboutie aujourd'hui sans leur contribution essentielle. Merci à Françoise BROCHARD et son équipe de m'avoir accordé leur confiance. Merci à Jacques PROST pour l'échange très intéressant que nous avons eu. Merci à Jacques CAMONIS, Maria Carla PARRINI et leur équipe pour les lignées cellulaires gracieusement mises à notre disposition. Merci à Karine LAUD-DUVAL et son équipe pour cette collaboration qui, bien que n'ayant hélas pas été menée à terme faute de temps, a été très agréable. Merci à Philippe MARCQ et Thomas RISLER pour les différentes discussions, scientifiques ou non, que nous avons pu avoir.

Merci à tous les compagnons de galère que j'ai pu côtoyer au laboratoire pendant cette thèse, en particulier (mais en vrac) : Sandrine, Marine, Mathias, Kévin, Joël, Mathieu, Léo, Simon, Mélanie, Marie, Perrine, Mohamed, Alexandre, Nada ainsi que Fabrice, mon cher représentant et collègue de portail.

Merci aussi à tous les amis qui m'ont accompagné dans cette thèse, parfois sans trop le savoir. Merci à Antoine, Jérémy, Loïc, Sylvain et Adrien, mes comparses physiciens, pour les parties de cartes ou de pétanque, et les conseils que j'aurais dû suivre. Merci aux improvisateurs de la LIKA avec qui j'ai pu jouer, à qui j'ai fait cours, ou avec qui j'ai pu faire des tours de ronds-points à Carcans. Merci en particulier à META (Cyril, Ouardane, Andréa, Yohan, Cécilia, Haroun, Ayman et Arnaud) et à toute la bande de Wooo (Benjamin, Marc, Jérémie, Thomas, Charles-Pierre, Gaétan, Nicolas et Simon). Merci à Anthony, à Aymeric, à Benoît, à Claire, à Clément, à Geneviève, à Julien, à Maël, à Marie, à Nicolas, à Thibaud, à Valentine et à Yoann qui ne font pas partie des catégories précédentes, mais que je tiens à faire apparaître ici. Merci à John-Éric et à Marie-Cécilia de n'avoir pas soutenu avant moi. Merci à Dorian pour son blog très utile et pour sa page de garde. Merci aux Cachanais de tous poils, avec qui j'ai régulièrement, bien que virtuellement, conversé, à BLR ou à Poitiers, dans la piscine ou en général. Merci aux anciens du BdA ou de manière plus générale aux vieux de l'école, que j'ai hélas moins vus au cours de cette thèse, mais toujours avec grand plaisir. Merci aussi à mes anciens 1A.

Merci aux Toulousains et assimilés, aux anciens de Fermat pour les bières, les concerts du 14 Juillet ou les ferias biterroises, à l'incalculable brochette de feu UCDLP, et tout particulièrement Olivier, qui a le chic pour m'embarquer pour mon plus grand plaisir dans la totalité de ses projets complètement dingues.

Je terminerai ces remerciements par ma famille, grâce à qui je suis arrivé jusqu'ici. Dans les moments de doute ou d'exaspération, ce sont eux qui m'ont permis de me reprendre et de continuer. Merci donc à mes parents, Laurence et Alain, ma sœur Manon et mon frère Pierre pour cette aide continuelle. Merci pour la relecture, pour les multiples répétitions et pour le pot de soutenance « pantagruélique » qu'ils ont orchestré avec maestria. Merci au mec de ma sœur, qui fait aussi partie de la famille. Merci également à mes oncles, tantes et cousins, qui ont suivi autant que possible mon avancée dans ce travail.

Merci enfin à Éloïse, toutes les femmes de ma vie (sauf deux), pour son indéfectible soutien, merci d'avoir su me supporter quand j'étais insupportable, d'avoir de l'optimisme pour deux et eu en toutes circonstances confiance en moi, quand bien même j'en manquais.

# Avant-propos

Les mouvements cellulaires collectifs jouent un rôle fondamental dans de nombreux phénomènes biologiques : le développement embryonnaire, la régénération de tissus après une blessure ou encore la progression d'un cancer dans un organisme. Pour autant, les mécanismes fondamentaux régissant ces mouvements sont toujours mal connus. Mon travail de thèse est une tentative de réponse, évidemment très partielle, à ces questionnements.

Cette thèse rend compte du travail de recherche que j'ai effectué durant mon doctorat au sein de l'équipe *Physicobiologie aux méso-échelles* du laboratoire PhysicoChimie Curie. Elle se compose de quatre chapitres dans lesquels la lectrice ou le lecteur trouvera, dans l'ordre :

- un état des connaissances relatives à ce travail de thèse ;
- le détail des techniques, méthodes et matériels utilisés ;
- la première partie des résultats, concernant les mouvements collectifs dans des monocouches de cellules d'une lignée issue d'un poumon humain lors de leur maturation ;
- la seconde partie des résultats, concernant une mise en compétition pour l'espace de monocouches de cellules de lignées issues d'un rein humain.

Sauf mention contraire, ce travail est sous licence Creative Commons – Attribution – Pas d'Utilisation Commerciale – Pas de Modification – 4.0 International. Les figures adaptées ou tirées d'œuvres tierces, identifiées comme tel par la présence d'une référence bibliographique, sont soumises au droit d'auteur.



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



## Glossaire des lignées cellulaires

Ce glossaire succinct liste les différents sigles utilisés pour désigner les lignées cellulaires dont il est question dans cette thèse :

<b>HBEC</b>	( <i>Human Bronchial Epithelial Cells</i> ), lignée épithéliale stable peu cohésive dérivée de cellules primaires issues de poumons sains humains.
<b>HEK-HT</b>	Lignée stable dérivée de cellules embryonnaires de rein humain ( <i>Human Embryonic Kidney</i> ).
<b>MCF-7</b>	( <i>Michigan Cancer Foundation – 7</i> ), lignée épithéliale de cellules mammaires humaines atteintes d'un cancer métastatique.
<b>MCF10A</b>	( <i>Michigan Cancer Foundation – 10A</i> ), lignée épithéliale stable non cancéreuse dérivée de cellules mammaires humaines.
<b>MDCK</b>	( <i>Madin-Darby Canine Kidney</i> ), lignée épithéliale stable très cohésive dérivée de cellules de rein d'un chien adulte.
<b>NIH/3T3</b>	Lignée fibroblastique stable dérivée de cellules d'embryon de souris ( <i>NIH Swiss Mice</i> ).
<b>NRK</b>	( <i>Normal Rat Kidney</i> ), lignée épithéliale stable peu cohésive dérivée de cellules de rein d'un rat adulte.

# Table des matières

<b>Avant-propos</b>	<b>7</b>
<b>1 État de l'art</b>	<b>11</b>
1.1 Épithéliums . . . . .	12
1.2 Mouvement collectif . . . . .	20
1.3 Coexistence et compétition . . . . .	32
1.4 Transition de <i>jamming</i> . . . . .	43
<b>2 Matériels et méthodes</b>	<b>57</b>
2.1 Biologie cellulaire . . . . .	58
2.2 Dispositifs expérimentaux . . . . .	60
2.3 Analyse d'images . . . . .	63
2.4 Vélocimétrie par image de particules (PIV) . . . . .	67
<b>3 Mouvements cellulaires collectifs dans une monocouche</b>	<b>73</b>
3.1 Structure spatiale . . . . .	74
3.2 Ralentissement du mouvement et évolution des corrélations . . . . .	76
3.3 Analyse en termes d'agrégats effectifs . . . . .	81
3.4 Différentes routes vers le ralentissement . . . . .	91
3.5 Hétérogénéités dynamiques . . . . .	95
3.6 Trajectoires virtuelles . . . . .	98
3.7 Différents types cellulaires . . . . .	100
<b>4 Compétition pour l'espace entre types normal et transformé</b>	<b>103</b>
4.1 Étude préliminaire . . . . .	104
4.2 Position et largeur des fronts . . . . .	107
4.3 Étude du champ de vitesse . . . . .	113
<b>Conclusion</b>	<b>121</b>
<b>Annexes</b>	<b>I</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>LXIX</b>



# Chapitre 1

## État de l'art

### Sommaire

---

<b>1.1</b>	<b>Épithéliums</b>	<b>12</b>
1.1.1	Cellules épithéliales	12
1.1.2	Tissus épithéliaux	17
<b>1.2</b>	<b>Mouvement collectif</b>	<b>20</b>
1.2.1	Migration collective <i>in vivo</i>	21
1.2.2	Expériences <i>in vitro</i>	24
1.2.3	Modélisation théorique	26
<b>1.3</b>	<b>Coexistence et compétition</b>	<b>32</b>
1.3.1	Ségrégation cellulaire	32
1.3.2	Compétition cellulaire	35
1.3.3	Mécanismes de la compétition	40
<b>1.4</b>	<b>Transition de <i>jamming</i></b>	<b>43</b>
1.4.1	Introduction du concept de <i>jamming</i>	43
1.4.2	Jamming cellulaire	48

---

Dans ce chapitre premier, le lecteur trouvera un état des connaissances relatives aux sujets de ce travail de thèse, nécessaires à la bonne compréhension de ce dernier. Nous donnerons notamment une description des cellules et tissus épithéliaux, puis nous étudierons quelques phénomènes collectifs mis en jeu par les systèmes cellulaires. Nous aborderons ensuite les situations où plusieurs types de cellules coexistent et verrons comment elles interagissent. Enfin, nous retracerons un historique de la transition de *jamming*, et des études récentes qui l'appliquent aux populations de cellules.

## 1.1 Épithéliums

Les organismes vivants sont un assemblage complexe de multiples organes aux fonctions diverses. Les animaux sont de ce point de vue-là de remarquables machineries qui impliquent de nombreux échanges avec l'extérieur ou entre constituants. Une des fonctions principales des *épithéliums* réside dans la protection de ces organes vis-à-vis du milieu qui les entoure (air ambiant, sang, lymphe, etc.). L'exemple le plus notable est évidemment la peau, mais de nombreux tissus épithéliaux servent de bordure à des organes en contact avec des cavités : l'intestin, l'estomac, les voies respiratoires ou encore la vessie. Les tissus épithéliaux<sup>1</sup> constituent un des quatre grands types de tissus cellulaires chez les animaux – avec les tissus nerveux, les tissus conjonctifs et les tissus musculaires, dont les caractéristiques et fonctions physiologiques sont radicalement différentes.

La fonction de revêtement des tissus épithéliaux implique de posséder des cellules jointives, au contraire des tissus conjonctifs dont les cellules sont séparées par de la matrice extracellulaire. Cette propriété leur permet d'assurer le maintien et l'étanchéité de l'organe dont ils forment la frontière, mais également de pouvoir réguler et choisir les substances échangées avec le milieu environnant, en gérant sélectivement les flux, dans les deux sens de circulation. Certains épithéliums assurent également une fonction glandulaire, via la sécrétion de substances, à laquelle nous ne nous intéresserons toutefois pas ici.

Dans cette partie, nous nous attacherons à décrire plus avant les caractéristiques de ces cellules épithéliales, et des tissus qu'elles composent.

### 1.1.1 Cellules épithéliales

Avant de s'intéresser aux caractéristiques d'un tissu épithélial dans sa totalité, nous nous penchons dans cette section sur les caractéristiques individuelles des cellules qui le composent : leur cytosquelette, les contacts qu'elles établissent avec la surface sur laquelle elles évoluent, et enfin leur mouvement sur celle-ci, conséquence des points précédents.

#### Cytosquelette

La plupart des propriétés mécaniques des cellules eucaryotes animales (dont les cellules épithéliales), ainsi que leur interaction physique avec l'extérieur, sont dues à leur cytosquelette.

---

1. Le mot est pris dans cette thèse dans son sens le plus large. On peut également désigner de manière plus précise ces tissus en fonction des milieux qu'ils délimitent. Ainsi, on nomme *endothéliums* les tissus recouvrant l'intérieur des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les *mésothéliums*, quant à eux, se situent au bord des cavités closes de l'organisme, par exemple les cavités pleurale ou abdominale. Dans cette nomenclature, les *épithéliums* (au sens restreint) sont uniquement ceux qui sont au contact de cavités ouvertes, c'est-à-dire du milieu extérieur. On les retrouve dans la peau ou dans les muqueuses respiratoire, digestive et uro-génitale.

Celui-ci garantit que la cellule aura une forme correcte, pourra résister aux contraintes extérieures, et que ses composants internes seront bien organisés. Surtout, il permet à toutes ces caractéristiques de s'adapter à un changement de situation, voire à provoquer celui-ci que ce soit via le déplacement de la cellule ou au cours de la mitose. En effet, le cytosquelette est un ensemble très dynamique, en évolution constante. Il s'agit d'un réseau de filaments de protéines, dont nous présentons les trois types principaux ici (voir figure 1.1) :

- Les *filaments d'actine* ou *microfilaments*, sont issus de la polymérisation de monomères d'actine (actine globulaire, dite « actine G »). Cette actine filamenteuse (également appelée « actine F ») a une structure en double hélice de pas 37 nm et de diamètre compris entre 5 et 8 nm. L'asymétrie de structure des monomères les fait s'imbriquer toujours dans le même sens, induisant une polarité du filament : ses deux bouts présentent une différence de cinétique réactionnelle, qui leur donne leur nom. Dans la cellule, les filaments ont tendance à polymériser du côté de l'extrémité (+), ou extrémité « barbue », et à dépolymériser du côté de l'extrémité (-), ou extrémité dite « pointue »<sup>2</sup>.

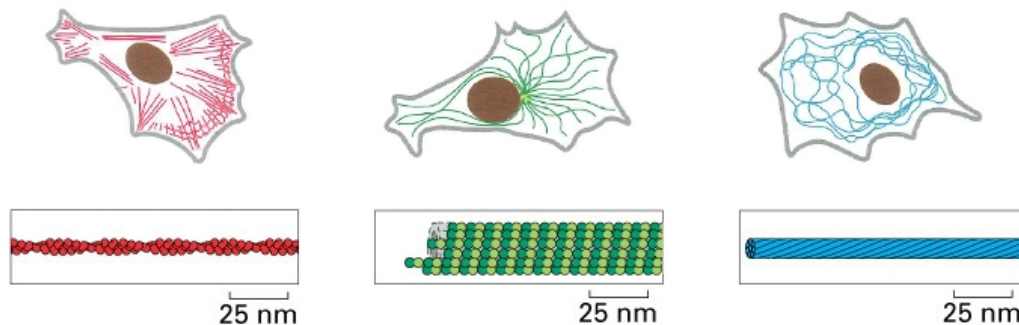


Figure 1.1 – Structure et assemblage dans la cellule des trois types principaux de filaments du cytosquelette. En rouge sont représentés les microfilaments d'actine, en vert les microtubules (tous liés au centrosome dans la cellule) et en bleu les filaments intermédiaires. Schémas adaptés de [1] et [2].

Ces filaments sont répartis dans toute la cellule, mais majoritairement présents dans le cortex situé sous la membrane plasmique où ils aident à la migration. Ils possèdent une souplesse relative : leur longueur de persistance est d'environ 15  $\mu\text{m}$ , soit l'ordre de grandeur d'une taille cellulaire [3]. Ils peuvent également former des réseaux ou des faisceaux par le biais de protéines de pontage, ou de complexes de nucléation venant s'accrocher à des filaments déjà existants. Ces filaments constituent enfin le support de moteurs moléculaires, les myosines, qui s'en servent pour se déplacer vers le bout (+), et ainsi transporter des constituants de la cellule (cas de la myosine I) ou encore à contracter des faisceaux d'actine en se liant à des paires de filaments de sens opposés pour les faire glisser l'un par rapport à l'autre (cas de la myosine II).

- Les *microtubules* sont de longs filaments très rigides, d'une longueur de persistance millimétrique. Ils sont constitués de 13 protofilaments qui s'alignent parallèlement pour former

2. La réalité de ce phénomène est plus complexe. En principe, les deux réactions sont plus rapides à l'extrémité (+). Pour autant, on a ici un phénomène actif : les monomères d'actine sont porteurs d'une molécule d'adénosine triphosphate (ATP) qui augmente fortement l'affinité de liaison avec le polymère, mais qui s'hydrolyse en adénosine diphosphate (ADP) peu après la polymérisation, d'où la différence de cinétique observée.

des cylindres creux de 25 nm de diamètre extérieur. Ces protofilaments sont issus de la polymérisation d'hétérodimères de tubuline, eux-mêmes formés d'un monomère de tubuline  $\alpha$  et de tubuline  $\beta$ . La partie  $\beta$  des dimères en solution vient s'accrocher à la partie  $\alpha$  des dimères des protofilaments, ce qui provoque – à l'instar des filaments d'actine – une polarisation du microtubule dans son ensemble : on désigne par (+) l'extrémité du côté  $\beta$  des dimères. La polymérisation s'effectue à l'extrémité (+), alors que l'extrémité (-) de tous les microtubules de la cellule sont accrochés à une structure unique nommée centrosome. Alors que la polymérisation est graduelle, la dépolymérisation se fait par à coups (on parle de « catastrophe »), et l'on se réfère à ce phénomène sous le nom d'instabilité dynamique<sup>3</sup>.

Les microtubules jouent un rôle important dans la séparation des chromosomes lors de la mitose. Deux moteurs moléculaires sont associés aux microtubules, les kinésines et les dynéines, qui se meuvent respectivement vers le (+) et le (-). Ces moteurs assurent le convoyage dans les deux sens de vésicules lipidiques de transport ou encore d'organites trop gros pour diffuser passivement jusqu'à destination.

- Les *filaments intermédiaires*, enfin, ont des structures très dépendantes du type cellulaire. Ils sont composés de protéines fibreuses qui s'assemblent les unes aux autres pour former des structures en forme de corde possédant un diamètre d'environ 10 nm. Ces filaments sont à la fois très flexibles (de longueur de persistance de l'ordre de 1  $\mu$ m) et très solides. Dans les cellules épithéliales, ils sont majoritairement constitués de cytokératine et relient les jonctions intercellulaires entre elles, permettant ainsi de consolider l'épithélium et de le faire résister aux contraintes mécaniques.

Ce cytosquelette donne sa structure à la cellule, lui permet de réagir à des forces extérieures, ou encore de générer les siennes afin de se mouvoir grâce aux adhésions qu'elle développe sur le substrat, que nous allons maintenant décrire.

### Adhésion au substrat

On l'a dit, dans les organismes, les épithéliums constituent les couches extérieures des organes. Pour autant, ils ne reposent pas directement sur les tissus conjonctifs qu'ils protègent, mais sur une *lame basale*. Il s'agit d'une couche fine de matrice extracellulaire, à savoir un réseau de protéines (collagène, fibronectine, laminine...) servant de soutien structural et de point d'ancrage au tissu épithélial. *In vitro*, les surfaces de culture, ou substrats, sont souvent traitées pour imiter l'existence de cette lame basale. Cependant, les cellules, sécrétant elles-mêmes ces macromolécules, peuvent en fait se passer de ce traitement et s'accrocher à des surfaces moins habituelles, comme du verre nu, une fois qu'elles y ont produit de la matrice. L'ancrage des cellules à la matrice se fait via plusieurs types de contacts :

- Les *complexes d'adhésion* ont pour rôle de connecter les filaments d'actine de la cellule aux protéines de la matrice extracellulaire. Cet accrochage est réalisé au moyen de protéines transmembranaires : les intégrines. La région extracellulaire de ces hétérodimères reconnaît et s'attache directement aux molécules de la matrice. La partie des intégrines située du

---

3. De manière analogue au cas des microfilaments, l'explication du détail de ces événements se trouve dans le fait que la partie  $\beta$  du dimère est porteuse d'une molécule de guanosine triphosphate (GTP) qui peut s'hydrolyser en guanosine diphosphate (GDP). Tant que l'extrémité (+) est porteuse de GTP, la polymérisation se fait. Si l'hydrolyse de la GTP en GDP est plus rapide que la polymérisation, la structure est déstabilisée et dépolymérise jusqu'à une zone riche en GTP, où la polymérisation reprend (« sauvetage ») [4].

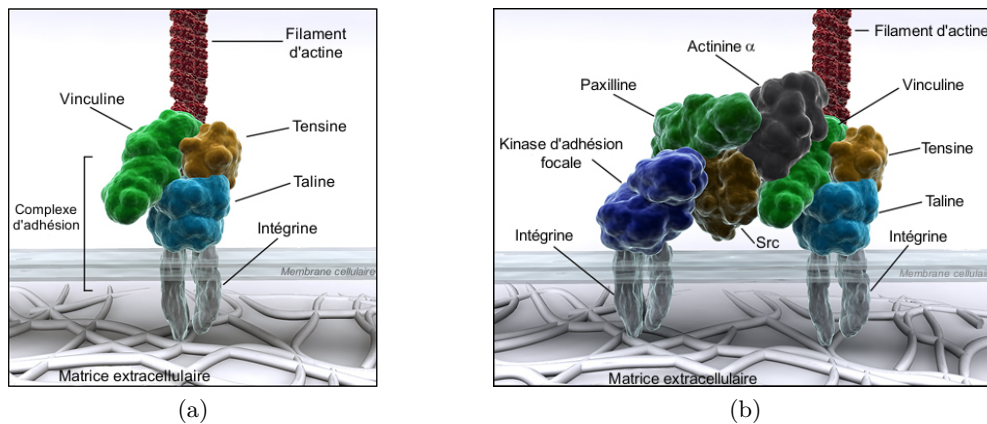


Figure 1.2 – Représentations, adaptées de [5], de la structure d'un complexe d'adhésion (a) et de celle d'une adhésion focale (b).

côté du cytoplasme est elle liée à un complexe protéique comportant de la vinculine (voir figure 1.2a). Cette dernière protéine permet d'attacher le complexe aux microfilaments et d'ainsi compléter la chaîne entre substrat et cytosquelette. On les trouve à l'avant des cellules en migration. Les *adhésions focales* sont des versions matures de ces contacts (lorsqu'ils ne se désassemblent pas). Le complexe grossit pour comporter plus d'intégrines liées à la matrice. Du côté cytoplasmique viennent se rajouter de nouvelles protéines dont la kinase Src (voir figure 1.2b). L'activation de cette dernière via des interactions mécaniques aide à favoriser cette maturation et le grossissement du complexe, ce qui confère également aux adhésions focales un rôle de capteurs de force [6]. Les adhésions focales sont plus grandes et moins dynamiques que les complexes d'adhésion, attachées à d'épais faisceaux d'acto-myosine et ont tendance à s'opposer à la migration cellulaire, là où les complexes d'adhésion l'accompagnent au contraire.

- Les *hémidesmosomes* sont un autre type de contact entre cellule et substrat, souvent comparés à des rivets. Ils impliquent une forme bien spécifique d'intégrine qui accroche la lame basale à une plaque de protéines (plakoglobine et desmoplakine) dans le cytoplasme. Ces plaques servent de points d'ancrage pour un autre type de composants du cytosquelette : les filaments intermédiaires de kératine.

Ce sont ces adhésions entre les cellules épithéliales et leur substrat qui vont permettre le déplacement de celles-ci sur la surface, comme nous allons le voir.

## Mouvement

La motilité des cellules adhérant à un substrat est fondée sur le développement de protrusions dans le sens de la direction de migration. Ces structures sont des extensions cellulaires de faible épaisseur, soutenues par la polymérisation de nombreux filaments d'actine. Ces protrusions sont de deux types [7]. Les *filopodes* sont des structures cylindriques où les microfilaments forment des faisceaux parallèles qui permettent notamment à la cellule de sonder son environnement. Les *lamellipodes* sont des protrusions étalées où les microfilaments forment des réseaux branchés et qui sont d'une importance cruciale pour la migration (voir figure 1.3).



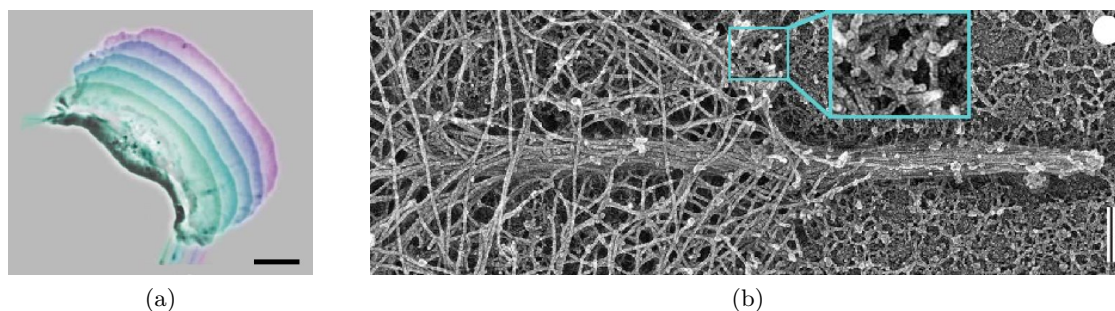


Figure 1.3 – (a) Mouvement d'un kératocyte dans le sens de son lamellipode. Superposition d'images en contraste de phase.  $\Delta t = 15$  s, barre d'échelle :  $10\ \mu\text{m}$ . Adapté de [8]. (b) Image en microscopie électronique d'un filopode émergeant du réseau branché d'actine d'un lamellipode (voir détail encadré). Barre d'échelle :  $200\ \text{nm}$ . Adapté de [9].

Cette migration est traditionnellement décrite par la répétition d'un cycle de plusieurs étapes (voir figure 1.4) :

- Tout d'abord, à l'avant de la cellule, la polymérisation des filaments d'actine proches de la membrane plasmique va exercer une force sur celle-ci, provoquant sa déformation et la création de la protrusion.
- Cette protrusion va ensuite former des complexes d'adhésion avec le substrat, petits et instables, dont certains disparaissent aussitôt. Ceux qui restent permettent de créer de nouveaux points d'ancrage du cytosquelette d'actine au substrat.
- Certains faisceaux du réseau d'actine, que l'on appelle fibres de tension, vont se contracter sous l'action des moteurs moléculaires. Ceci va provoquer un déplacement du noyau et du cytoplasme dans la direction du lamellipode, ce qui va induire un décrochage des adhésions focales situées à l'arrière de la cellule. La contraction des fibres de tension va également entraîner la rétraction de l'arrière de la cellule, et détacher les adhésions qui s'y trouvent. En définitive, la totalité de la cellule a avancé, le cycle peut recommencer.

Il est possible d'étudier le déplacement de cellules épithéliales isolées sur leur substrat. On observe ainsi que la migration de ces cellules peut être orientée de diverses manières.

Ainsi, la diffusion de certaines substances chimiques (normalement émises par l'organisme) en un point du substrat permet l'établissement d'un gradient de concentration qui sera détecté par les récepteurs spécifiques en surface des cellules. La polymérisation d'actine se fera alors préférentiellement dans une direction parallèle au gradient pour déclencher le mouvement de la cellule dans cette direction (vers la substance, ou au contraire dans la direction opposée). Ce phénomène est désigné sous le nom de chimiotactisme [11].

Les propriétés du substrat peuvent également se révéler fondamentales dans le choix de la direction de migration. Notamment, les cellules migreront préférentiellement vers les zones du substrat où l'adhésion est maximale (haptotactisme), suivant par exemple les gradients de matrice extracellulaire [12]. Des cellules adhérentes passeront également préférentiellement d'un substrat très mou à un substrat plus rigide (durotactisme) [13] ou, dans le cas d'une raideur anisotrope du substrat, se dirigeront le long de la direction de raideur maximale [14].

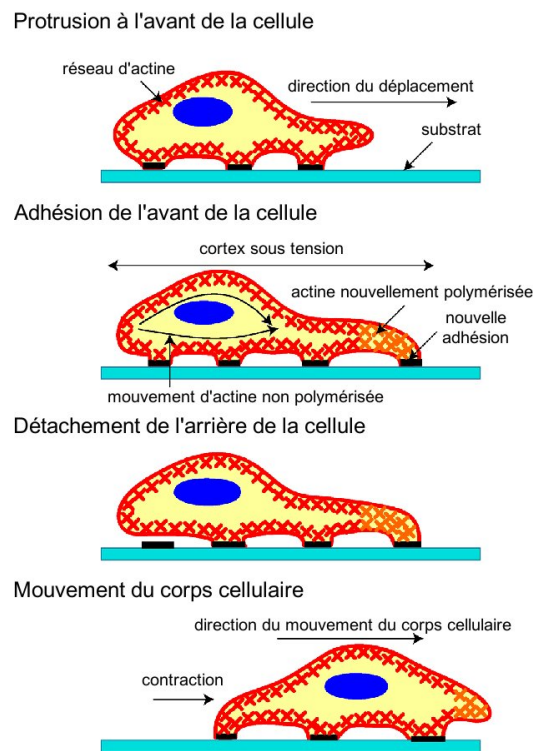


Figure 1.4 – Représentation schématique des étapes de la migration cellulaire. Adapté de [10].

### 1.1.2 Tissus épithéliaux

Les caractéristiques des cellules individuelles ayant été étudiées, intéressons-nous maintenant au tissu qu'elles composent en décrivant la structure globale d'un épithélium, les jonctions que ses cellules forment entre elles, et enfin les mécanismes de régulation du tissu.

#### Structure globale

Bien que ses cellules puissent être de formes assez différentes, l'épithélium est principalement défini par sa fonction de barrière : un de ses côtés est en contact avec la lame basale de l'organe délimité, alors que l'autre est en présence de fluide. Cette différence définit intrinsèquement une polarité, dite « apico-basale », du tissu et des cellules qui le composent : la zone apicale est spécialisée selon l'organe impliqué alors que la zone basolatérale (comprenant la partie en contact avec la lame basale, mais également la majeure partie des côtés de la cellule) est le théâtre de processus communs à toutes les cellules épithéliales. Ces deux domaines sont séparés de manière étanche par les jonctions serrées (voir section suivante).

La zone apicale, en contact avec l'environnement de l'organe, est principalement mise en jeu pour détecter, sécréter, absorber et filtrer les substances qu'il contient. Certains épithéliums, afin de favoriser ces transferts, augmentent même leur surface d'échange en étendant des microvillosités. C'est le cas, par exemple, de l'épithélium intestinal dont la surface est déjà très importante du fait de sa géométrie formant des villosités macroscopiques (d'une longueur millimétrique) qui, elles-mêmes, présentent ces microvillosités de longueur micrométrique et de diamètre de l'ordre de 100 nm.

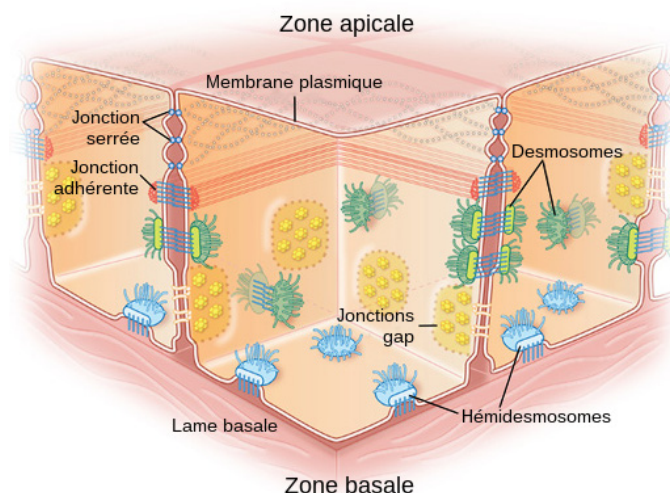


Figure 1.5 – Schéma de la structure épithéliale et de plusieurs jonctions cellule-cellule et cellule-substrat. Adapté de [15].

### Jonctions cellule-cellule

L'intégrité et le fonctionnement en tant qu'ensemble du tissu épithélial sont dus aux jonctions qui existent entre les cellules qui le composent. Elles sont notamment responsables de l'imperméabilité de l'épithélium. Nous allons maintenant présenter les trois principaux types de jonctions existant entre cellules épithéliales (voir figure 1.5).

- Les *jonctions serrées* définissent la frontière entre domaine apical et domaine basal dans les cellules épithéliales des vertébrés. Elles permettent d'assurer l'étanchéité du tissu en scellant l'espace intercellulaire, ce qui contraint les échanges de molécules à ne pouvoir être réalisés qu'au travers des cellules, permettant leur contrôle. Elles sont constituées d'un réseau branché de lignes de soudure entre les membranes de deux cellules voisines (voir figure 1.6a). Ces lignes, qui agissent indépendamment les unes des autres, sont formées de plusieurs protéines dont la claudine et l'occludine, qui vont venir constituer un complexe joignant de manière imperméable la couche externe des deux membranes plasmiques. Ce réseau forme une ceinture faisant le tour de la zone apicale des cellules.
- Les *jonctions d'ancrage* ont pour rôle de permettre l'accrochage des filaments du cytosquelette d'une cellule à l'autre et, par là même, la création de structures supracellulaires pour ces réseaux. À l'instar des adhésions avec le substrat (voir section 1.1.1), il en existe deux types, mais toutes sont assurées par des protéines transmembranaires appelées cadhérines, celles d'une cellule se liant à celles de sa voisine via un mécanisme contrôlé par la concentration en ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$ .

Dans le cas des *jonctions adhérentes*, analogue intercellulaire des complexes d'adhésion décrits précédemment, la partie intracellulaire des cadhérines (principalement de type E) est attachée à des protéines d'ancrage auxquelles viennent se lier les microfilaments d'actine (voir figure 1.6b). Les jonctions adhérentes forment une ceinture autour de la cellule, située juste en dessous de celle des jonctions serrées. Ces adhésions restent cependant très

dynamiques pour permettre aux cellules de reprendre un mouvement individuel lorsque cela est nécessaire (réarrangement, division, etc.).

Les *desmosomes* correspondent eux aux hémidesmosomes, dont ils possèdent la structure, mais en double ! Ils servent de points d'ancrage pour les filaments intermédiaires qui viennent s'accrocher à une plaque cytoplasmique. Deux plaques sont liées l'une à l'autre via des protéines qui font partie de la famille des cadhérines (voir figure 1.6c).

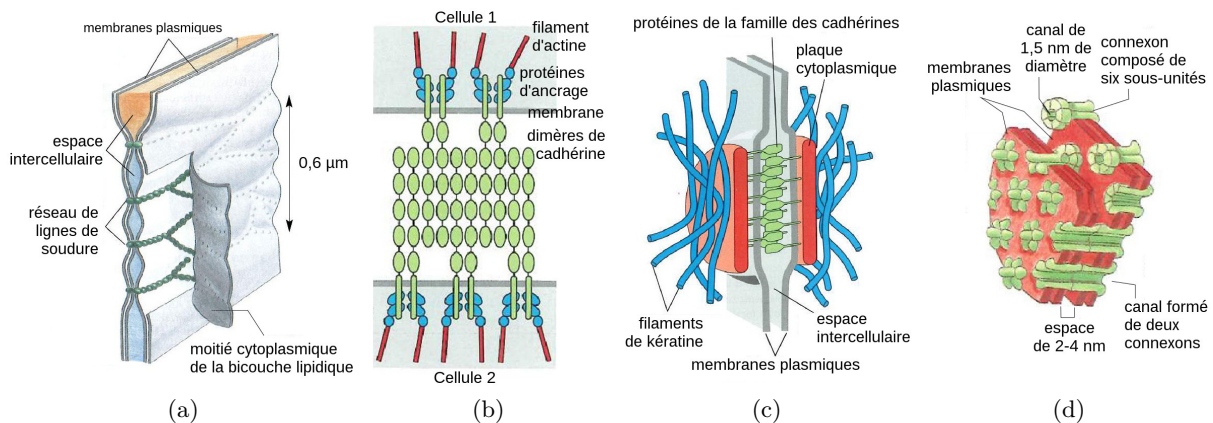


Figure 1.6 – Représentations, adaptées de [1], des différents types de jonctions cellule-cellule. (a) Jonction serrée. (b) Jonction adhérente. (c) Desmosome. (d) Jonction gap.

- Les *jonctions communicantes*, aussi appelées *jonctions gap*, permettent de coupler les cellules électriquement et chimiquement en établissant des liens entre leurs cytoplasmes. Il s'agit de zones où les membranes latérales des deux cellules voisines sont séparées d'une distance d'environ 2 à 4 nm, traversées par une multitude de canaux appelés *connexons*, de diamètre intérieur environ 1,5 nm [16].

### Inhibition par contact

Afin d'accomplir leur rôle de barrière, les tissus épithéliaux ont besoin d'être continus. En conditions de culture cellulaire, on parle de *confluence* pour désigner l'instant où les derniers trous d'une monocouche se ferment et où la totalité de la surface accessible est recouverte de cellules. Le tissu est alors le lieu de deux phénomènes désignés sous le nom d'*inhibition par contact*. Cette appellation recouvre en réalité deux concepts distincts, que nous allons détailler.

L'*inhibition par contact de la motilité*, tout d'abord, est un processus formulé par ABERCROMBIE et HEAYSMAN dans les années 1950 [17,18]. Il se fonde sur le fait que le mouvement d'une cellule sur un substrat change de direction après l'entrée en contact avec une autre cellule. Ce mécanisme est notamment dû au fait que la présence des jonctions adhérentes qui se forment de manière transitoire entre deux cellules inhibe la polymérisation d'actine et donc la création de protrusions dans la zone de contact [19]. Celles-ci se forment donc hors de cette zone, entraînant la migration de la cellule dans une autre direction.

Pour autant, si cette description semble correcte dans le cas de cellules isolées entrant en contact, elle est à nuancer dans le cas d'un épithélium où, les contacts entre cellules étant permanents, tous les mouvements devraient disparaître, ce qui n'est pas observé. On peut toutefois

voir *in vitro* un ralentissement progressif des mouvements cellulaires après la confluence [20], même si ceux-ci subsistent dans le tissu (notamment lors de réarrangements).

Une conséquence de cette inhibition de contact est la polarisation du mouvement des cellules dans la direction d'un éventuel bord libre, situation étudiée dans les expériences de cicatrisation. Des études menées dans l'équipe qui utilisent des blessures modèles créées à partir du retrait de micropochoirs, le tout sans perturbation de l'environnement biochimique, ont permis de montrer que l'existence d'un bord libre suffisait à déclencher une migration polarisée [21]. Par ailleurs, dans un épithélium en migration, les cellules loin de la surface libre sont toujours capables de former des lamellipodes dits cryptiques, car situés en dessous des cellules voisines [22], ce qui montre bien que tout mouvement n'est pas supprimé au-delà de la confluence.

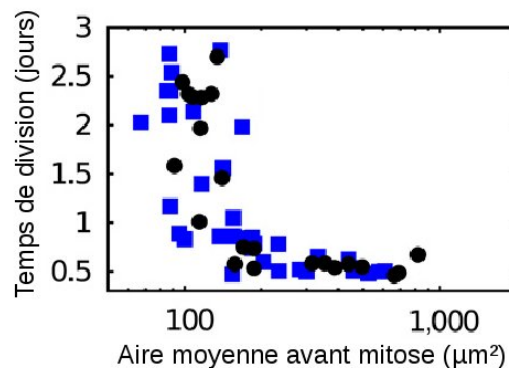


Figure 1.7 – Temps de division de cellules MDCK en fonction de l'aire moyenne occupée par cellule avant mitose. Ce temps est mesuré via l'évolution du nombre de cellules dans la monocouche. En dessous d'une certaine aire (et donc au-delà d'une certaine densité), ce nombre de cellules augmente très lentement. Adapté de [23].

L'autre phénomène, nommé en référence au premier, est l'*inhibition par contact de la prolifération*. De la même manière que précédemment, il s'agit du fait que des cellules en culture arrêtent d'augmenter leur nombre dans la monocouche lorsqu'il n'y a plus de surface disponible (voir figure 1.7). En réalité, les cellules continuent de se diviser après la confluence, en diminuant donc leur taille, jusqu'à une aire moyenne limite occupée par cellule. Contrairement au phénomène précédent, cette inhibition n'est pas due aux contacts entre cellules, mais plutôt à la densité locale de cellules sur le substrat [24]. Elle se traduit en premier lieu à partir d'un certain seuil de densité par une extrusion hors de la monocouche des nouvelles cellules issues des divisions. Plus tard, ce phénomène est suivi par une augmentation drastique du temps de division cellulaire, ce qui vient donc diminuer le taux de production de nouvelles cellules.

Ce mécanisme permet une régulation par rétroaction négative de la densité cellulaire, qui va alors atteindre une valeur stationnaire dans l'épithélium. Il arrive que ce caractère de régulation soit perdu dans les tissus cancéreux, provoquant l'apparition de structures tridimensionnelles en dehors du plan de l'épithélium.

## 1.2 Mouvement collectif

Les cellules de manière générale, et *a fortiori* les cellules épithéliales, interagissent comme on l'a vu avec leurs voisines. Il s'ensuit des phénomènes collectifs de type assez varié. Ainsi, les cellules peuvent se diriger de concert sur le substrat [20] ou échanger en nombre leurs voisines

par intercalation afin de modifier la forme du tissu [25]. Mais elles peuvent également contracter collectivement la zone apicale du tissu qu'elles forment pour changer sa courbure dans l'espace [26], ou de manière oscillante (modes de « respiration ») la totalité d'une population contrainte sur un substrat [27]. Elles peuvent tirer sur des câbles d'acto-myosine supracellulaires [28], communiquer entre elles via des vagues de signaux chimiques [29] ou encore organiser spatialement leurs adhésions sur une échelle plus grande que la cellule unique [30]. Nous nous bornerons dans cette partie à décrire les connaissances relevant de la migration cellulaire collective.

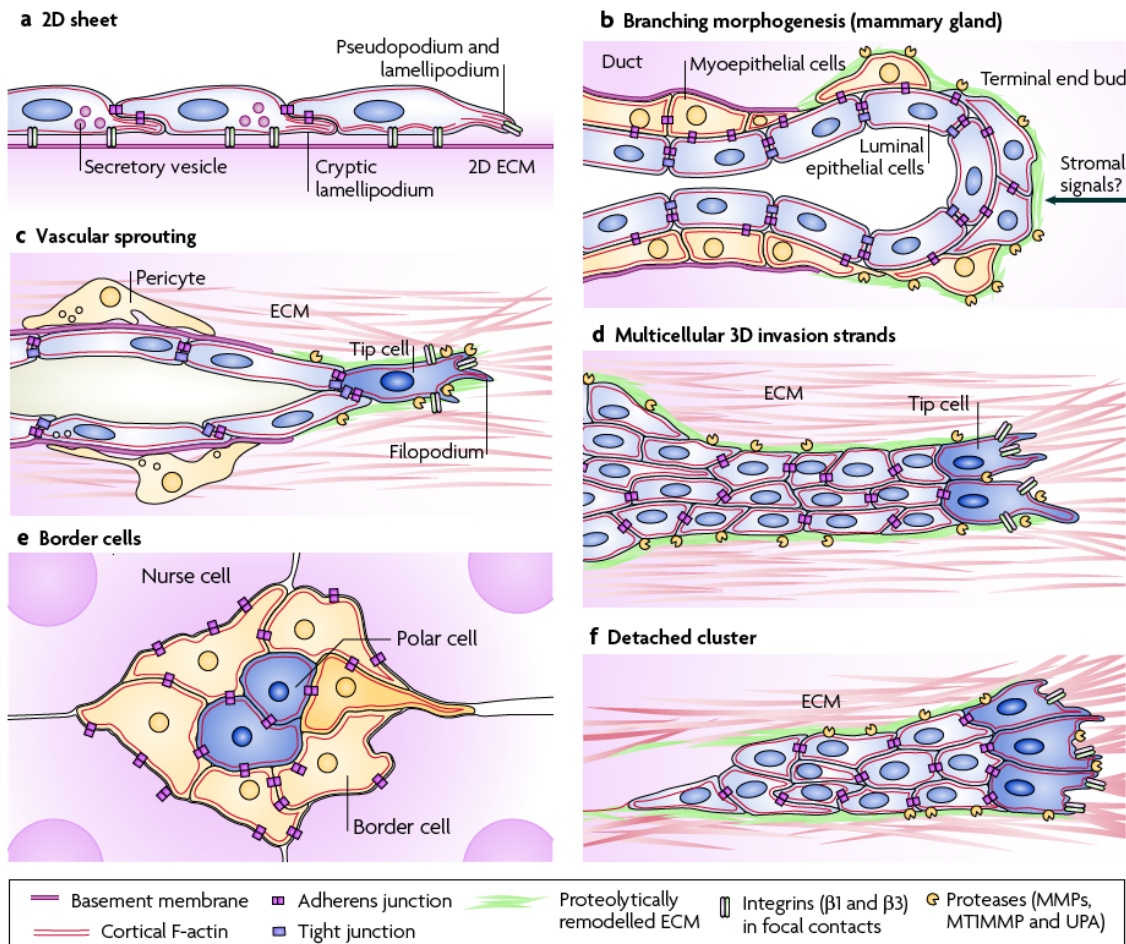


Figure 1.8 – Différents types de migration cellulaire collective. Adapté de [31]. (a) Migration bidimensionnelle d'une monocouche cohésive sur un substrat de matrice extracellulaire. (b) Morphogenèse d'une glande mammaire par embranchement. (c) Croissance d'un nouveau vaisseau sanguin (angiogenèse). (d) Invasion tridimensionnelle d'une digitation de cellules cancéreuses à partir d'une tumeur principale. (e) Migration d'un groupe de cellules dans l'œuf de la drosophile. Les cellules de bord sont bien plus mobiles que les cellules qu'elles renferment. (f) Invasion d'un agrégat de cellules cancéreuses détaché de la tumeur principale.

### 1.2.1 Migration collective *in vivo*

Dans les organismes, la migration cellulaire collective intervient dans de multiples domaines. En fonctionnement normal, elle est notamment impliquée dans le développement des embryons ou encore dans les mécanismes de cicatrisation permettant de conserver l'intégrité des barrières

épithéliales de protection. Mais elle est également mise en jeu dans certains cancers, comme nous allons le voir. Cette migration collective peut prendre de nombreuses formes qui diffèrent parfois fortement dans leur mode de déplacement et dont un certain nombre sont présentées dans [31] et illustrées figure 1.8.

Un exemple très étudié de migration collective se produit pendant le développement de la ligne latérale chez les embryons de poisson-zèbre [32]. Il s'agit d'un système sensoriel qui leur permet de percevoir le mouvement de l'eau environnante (y compris ses vibrations, et donc le son), et donc d'appréhender l'espace dans lequel ils évoluent. La partie postérieure de cette ligne latérale est constituée de 7 ou 8 neuromastes, qui sont des groupes de cellules constituant des organes sensoriels à part entière, disposés selon un schéma bien établi dans l'organisme. Lors du développement de l'embryon, les précurseurs de ces neuromastes sont mis en place par un processus unique. En effet, un primordium originaire de l'encéphale migre selon un chemin pré-établi le long de l'embryon et laisse sur place à intervalles réguliers un groupe de cellules (voir figure 1.9). Chacun de ces groupes de cellules donnera à terme un neuromaste dans l'organisme adulte. Ce processus de dépôt est une combinaison fine de la présence d'une piste chimiotactique de ligands qui donne le tracé de la migration et de gradients de signalisation auto-générés dans le primordium qui induisent le relâchement régulier des précurseurs. Ces mécanismes sont complexes, et bien que ce système spécifique fasse l'objet de nombreuses études, ils constituent toujours actuellement un sujet d'intenses recherches [33–35]. On le voit, le mouvement coordonné de groupes de cellules est ici essentiel pour un développement normal de l'embryon.

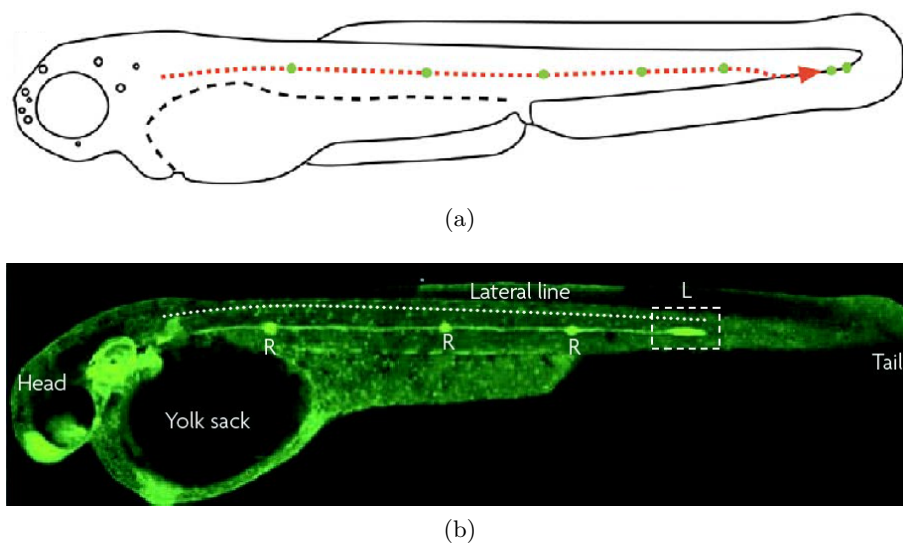


Figure 1.9 – Développement de la ligne latérale postérieure du poisson-zèbre. (a) Schéma montrant le trajet du primordium (en pointillés rouges) et les emplacements des futurs neuromastes (points verts). Adapté de [32]. (b) Embryon de poisson-zèbre dont les membranes cellulaires sont marquées pendant le développement de la ligne latérale. On peut voir le front de migration du primordium (L) ainsi que les rosettes de cellules appelées à devenir des neuromastes (R). Adapté de [31].

D'autres exemples de mouvements cellulaires collectifs à l'œuvre dans l'embryogenèse peuvent se trouver dans la migration de la blastula à la surface du sac vitellin lors de l'épibolie du poisson-zèbre [36], ou encore dans la fermeture dorsale chez la drosophile [37], processus qui a pour but

de clore le trou laissé dans l'épithélium protecteur de l'embryon après qu'il a subi de drastiques changements topologiques (voir figure 1.11a).

Le mouvement collectif de cellules joue également un rôle important dans le processus de cicatrisation après une blessure [38]. Dans la première étape d'inflammation, l'organisme réagit en recrutant des phagocytes (neutrophiles et macrophages) pour « nettoyer » la zone touchée, ainsi que des plaquettes pour la prémunir par coagulation de toute infection extérieure. Cette phase de protection étant achevée, le tissu se reconstruit sous la croûte via la migration collective des cellules épithéliales dans la direction de la blessure. Le tissu conjonctif du derme n'est pas reconstitué à l'identique (absence de poils et de glandes sudoripares, notamment), mais simplement remplacé par une accumulation de collagène qui se traduit par une légère boursouffure rigide de la peau : la cicatrice.

La migration collective est également un phénomène impliqué dans un fonctionnement anormal de l'organisme, à savoir le cancer. On associe souvent le cancer à la perte du caractère cohésif d'un tissu et à une transition vers la migration individuelle de ses cellules. Ce processus, nommé *transition épithélio-mésenchymateuse* (EMT), permet à des cellules cancéreuses initialement épithéliales de se détacher d'une tumeur principale pour circuler via les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et aller créer de nouvelles tumeurs ailleurs dans l'organisme (métastases) [39].

Pour autant, il a été observé [31,40] que certains cancers mettent en jeu une invasion se faisant non par cellules uniques mais par une digitation de cellules cohésives (voir figures 1.8d, 1.10 et 1.11b) voire par un agrégat de cellules complètement détaché de la tumeur primaire [41].

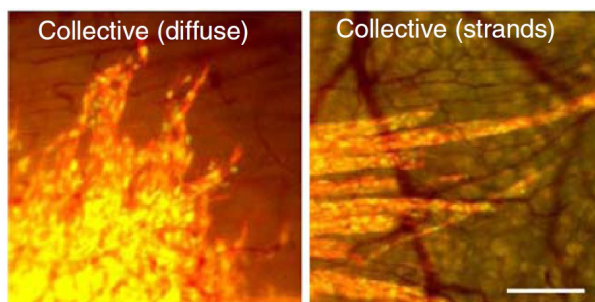


Figure 1.10 – Images en fluorescence de l'invasion de cellules tumorales humaines *in vivo* (en jaune-orange), 6 jours après la xénogreffe d'une tumeur primaire dans le derme profond d'une souris. Les images montrent deux types d'invasion collective à partir de la tumeur : un mode présentant des digitations diffuses et un mode plus ordonné où les cellules forment des structures linéaires. Barre d'échelle : 250  $\mu\text{m}$ . Adapté de [40].

On l'a vu, le mouvement collectif de cellules dans l'organisme peut prendre des formes diverses. Pour autant, il est intéressant de noter que ces phénomènes sont parfois très similaires alors que les fonctions biologiques auxquelles ils répondent semblent très différentes. Ainsi, pour les exemples décrits précédemment, la ré-épithélisation d'une blessure lors de la cicatrisation se fait au moyen d'une migration semblable à celle qui permet la fermeture dorsale dans le développement de la drosophile (voir figure 1.11a). De la même manière, la figure 1.11b illustre le rapprochement qui peut être fait entre l'avance du primordium de la ligne latérale du poisson-zèbre et la digitation permettant l'invasion d'un carcinome du sein.



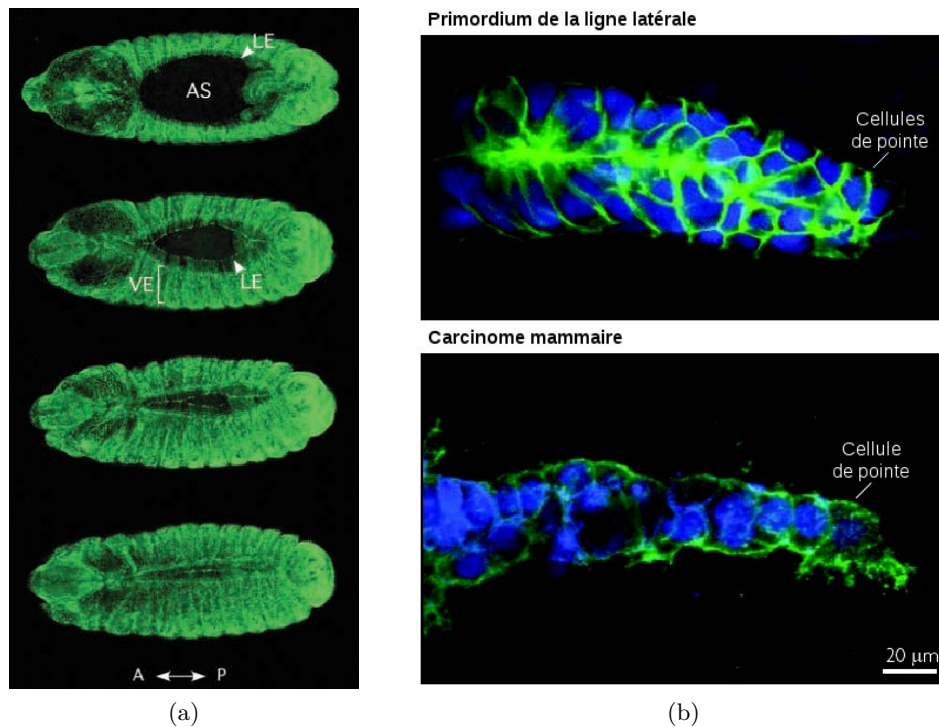


Figure 1.11 – Des phénomènes de migration collective. (a) Fermeture dorsale d'un embryon de drosophile. Le trou a initialement une taille d'environ  $400\ \mu\text{m}$  et cette fermeture se déroule en 3 h. Ce processus ressemble à celui qui permet de reformer l'épithélium lors d'une cicatrisation. Adapté de [42]. (b) Comparaison à même échelle du primordium de la ligne latérale du poisson-zèbre (en haut) et de l'invasion d'un carcinome du sein (en bas). Les noyaux sont marqués en bleu, les jonctions cellulaires (cadhérine E) en vert. Adapté de [31].

### 1.2.2 Expériences *in vitro*

On vient de le voir, les phénomènes de mouvement collectif cellulaire sont très présents dans la vie d'un organisme, dans son développement comme dans sa réparation, ou même dans certaines de ses pathologies. Pour autant, lorsqu'elle se fait directement *in vivo*, leur étude reste compliquée par la complexité des systèmes mis en jeu et la difficulté d'obtenir des statistiques robustes simplement. Par exemple, dans le cas de la migration bidimensionnelle d'un épithélium, le comportement du tissu conjonctif sur lequel il repose peut lui aussi intervenir dans le phénomène [43]. Les interactions potentielles avec le reste de l'organisme sont nombreuses et les conditions de l'expérience difficilement contrôlées.

Pour ces raisons, l'étude des mouvements collectifs repose également sur des expériences *in vitro* mettant en jeu des cellules de lignées immortalisées migrant sur un substrat (en deux dimensions) ou dans une matrice (en trois dimensions) artificiels. Une technique classique d'étude pour le cas bidimensionnel repose sur l'observation du comportement de monocouches de cellules lors de la fermeture de blessures occasionnées dans le tissu. Un des avantages certains de ce genre d'expériences par rapport à celles faites *in vivo* consiste notamment à pouvoir choisir précisément leur instant de début.

Pendant plusieurs décennies, ces expériences ont été menées en grattant une monocouche à confluence à l'aide d'un cône de pipette ou encore d'une lame de rasoir. Cette technique, déjà uti-

lisée dans les années 1960 pour étudier l'inhibition de prolifération par contact [44], s'est raffinée au cours du temps [45,46] pour passer des outils mécaniques aux outils optiques d'ablation au laser [47] qui permet de créer des blessures plus fines. Toutes ces méthodes présentent toutefois des inconvénients. Entre autres, la forme de la blessure n'est que grossièrement contrôlée et elle entraîne souvent la mort de cellules qui vient modifier la forme du bord. Cette mort cellulaire s'accompagne en outre du relâchement du contenu de leur cytoplasme dans le milieu, induisant une possible signalisation inconnue.

Pour pallier ces limitations tout en préservant le concept de l'expérience, de nouvelles techniques ont été développées sur le principe de la croissance d'un tissu dans une contrainte géométrique donnée, qui est ensuite relâchée quasi-instantanément pour permettre la migration sur cette surface nouvellement libre. La première expérience de ce type [48] met en jeu des films fins de poly(diméthylsiloxane) (PDMS), un polymère transparent et biocompatible, déposés sur le substrat. Ces films sont percés de trous de géométrie désirée où la surface est libre, pour ainsi constituer des micropochoirs dans lesquels on fait pousser les cellules. Une fois le tissu à confluence, le pochoir est retiré, faisant disparaître l'inhibition de la migration par contact sur les bords. Le tissu entame alors un mouvement polarisé [49] dans la direction de la surface libre (voir figure 1.12). Il est ainsi possible de constituer des « blessures » modèles présentant plusieurs avantages : une géométrie initiale parfaitement contrôlée, et l'absence de traumatisme ou de destruction des cellules du bord.

L'équipe a perfectionné ces techniques et les utilise depuis plusieurs années pour étudier la migration de monocouches de cellules, principalement de la lignée *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) [20,21,49,50]. Ces pochoirs microfabriqués à l'aide de moules photolithographiés ont même été déclinés en piliers pour réaliser un réseau de blessures circulaires [51]. Ces expériences ont notamment permis d'observer que la seule présence d'un bord libre était suffisante pour déclencher la migration du tissu. L'absence de destruction de cellules du bord n'empêche en outre pas l'apparition de digitations entraînées par des cellules *leaders* [52] pour les types cellulaires qui en présentaient déjà dans les expériences de blessure par grattage.

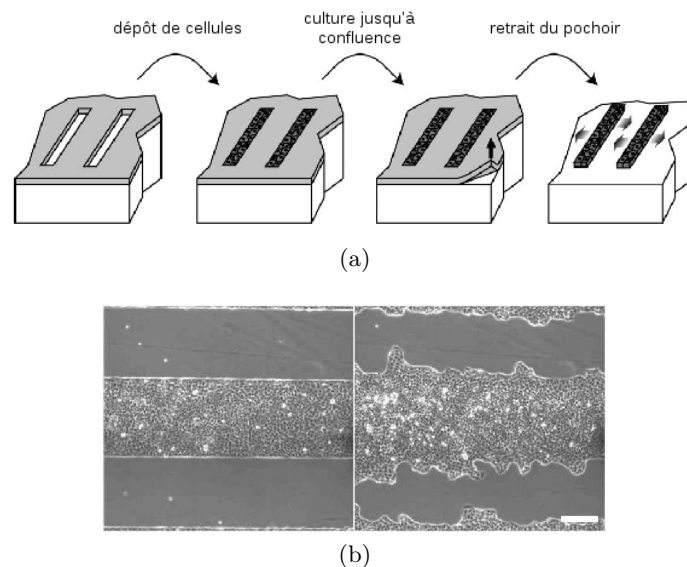


Figure 1.12 – Utilisation de micropochoirs de PDMS, d'après [21]. (a) Principe de la technique. (b) Expérience de blessure modèle sur une monocouche de cellules MDCK. Les deux images sont prises respectivement à  $t = 1,5$  h et  $t = 12$  h. Barre d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ .

Des expériences de migration de ce type ont été employées avec succès pour caractériser le mouvement collectif de monocouches de cellules. En calculant le champ de vitesse à chaque endroit du tissu (à l'aide de PIV, voir section 2.4), PETITJEAN *et al.* ont ainsi pu quantifier cette coopération via l'obtention de longueurs de corrélation de ce champ pour différents types cellulaires [20], comme illustré figure 1.13.

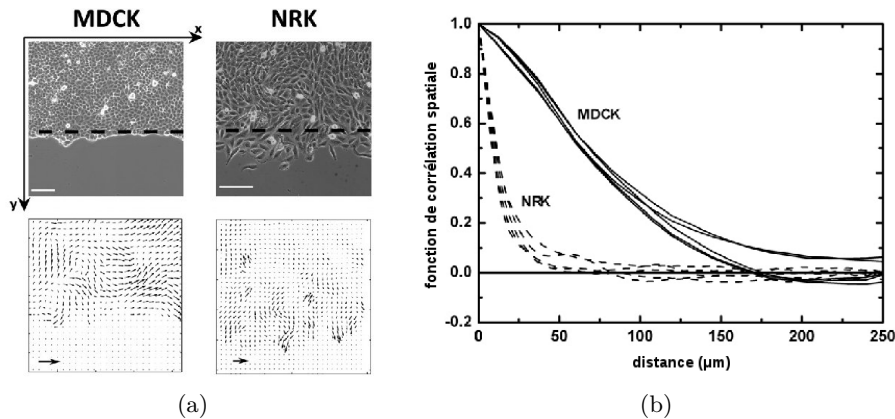


Figure 1.13 – Comparaison du mouvement de cellules MDCK et NRK (*Normal Rat Kidney*), d'après [20]. (a) En haut, les deux types de cellules en migration imagées en contraste de phase. En bas, le champ de vitesse correspondant calculé par PIV. Barres d'échelle : 100  $\mu\text{m}$ , échelles des vitesses : 40  $\mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ . (b) Fonctions d'auto-corrélation spatiale obtenues pour les champs de vitesse de ces deux types de cellules. La corrélation décroît sur des distances bien plus courtes pour les NRK, qui sont des fibroblastes, que pour les MDCK, cellules épithéliales très cohésives.

### 1.2.3 Modélisation théorique

Les populations de cellules ne sont pas les seuls systèmes à montrer des mouvements collectifs spontanés de leurs « particules » (c'est-à-dire sans qu'une particule meneuse soit clairement identifiée). En effet, à bien d'autres échelles, des systèmes biologiques (ou biomimétiques) s'illustrent par un comportement grégaire similaire (voir figures 1.14), qu'il s'agisse d'assemblées de microtubules, de suspensions bactériennes, de populations de cellules, de bancs de poissons, de volées d'oiseaux, de troupeaux de moutons ou encore de foules humaines [53–56].

Encore plus généralement, ces phénomènes sont observés dans tous les matériaux actifs, à savoir des matériaux hors-équilibre dont les particules sont capables d'utiliser une source d'énergie (apportée de l'extérieur ou produite par elles-mêmes) pour la convertir en mouvement [57]. Ces assemblées de particules auto-propulsées incluent de fait les systèmes vivants cités plus hauts, mais existent sous de très nombreuses formes artificielles : monocouches de grains vibrés [58], particules Janus [59], rouleurs de Quincke [60], et cætera.

#### Modèle de Vicsek

D'un point de vue théorique, ces systèmes ont pour beaucoup été décrits ou simulés avec succès à l'aide de différents modèles dont la plupart dérivent du travail fondateur de VICSEK *et al.* [64]. Ce modèle repose sur quelques ingrédients somme toute assez simples, dont voici l'idée

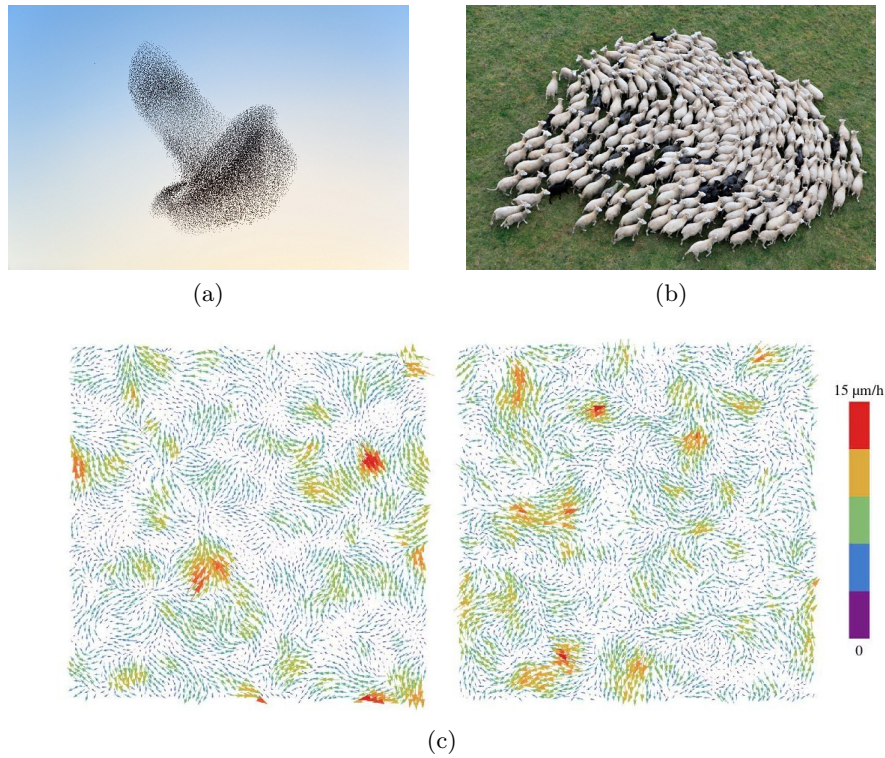


Figure 1.14 – Exemples de mouvements collectifs décrits par un modèle à la VICSEK. (a) Volée d’étourneaux dans le ciel de la réserve naturelle de Shapwick Heath, Somerset, Royaume-Uni. Source : [61]. (b) Troupeau de moutons en Pologne. Source : [62]. (c) Champ de vitesse expérimental dans un tissu de cellules MDCK (à gauche) et champ de vitesse simulé en utilisant un modèle à la VICSEK (à droite). Adapté de [63].

principale : chaque particule du système cherche à aligner son mouvement sur le mouvement moyen de ses voisins.

Détaillons un peu plus ce modèle. On considère une assemblée de particules auto-propulsées possédant des vitesses  $\vec{v}_i$ . En prenant ces vitesses de module  $v$  constant, on peut les réduire à leur orientation  $\theta_i$ . C’est dans la dynamique de cette orientation qu’intervient l’idée du modèle de VICSEK. Ainsi, on a :

$$\theta_i(t + \delta t) = \langle \theta(t) \rangle_r + \Delta\theta$$

Dans l’égalité précédente,  $\langle \theta(t) \rangle_r$  représente la moyenne de l’orientation de la vitesse à l’instant  $t$  de toutes les particules présentes dans un voisinage circulaire de rayon  $r$  autour de la particule  $i$  (y compris elle-même). Le terme  $\Delta\theta$  est lui un terme de bruit sur cette orientation, que le modèle choisit comme un nombre aléatoire tiré avec une probabilité uniforme dans l’intervalle  $[-\eta/2, \eta/2]$ ,  $\eta$  étant ici l’intensité du bruit (c’est-à-dire une température effective).

Ce modèle a notamment pour particularité de présenter une transition entre une phase désorganisée où les particules ont des directions aléatoires, et une phase ordonnée donnant à voir un mouvement complètement collectif des particules (voir figure 1.15a). Elle est quantifiée à l’aide du paramètre d’ordre  $v_a$ , qui est le module normalisé de la vitesse moyenne de cette

assemblée de  $N$  particules :

$$v_a = \frac{\|\langle \vec{v} \rangle_i\|}{v} = \frac{1}{Nv} \left\| \sum_{i=1}^N \vec{v}_i \right\|$$

La mesure de ce paramètre (qui vaut 1 dans le cas polarisé et 0 dans le cas désordonné) permet de faire apparaître des valeurs critiques : le bruit  $\eta_c(\rho)$  (pour une densité  $\rho$  donnée) en dessous duquel le mouvement commence à s'organiser, et la densité  $\rho_c(\eta)$  au-dessus de laquelle la polarisation du système débute (voir figure 1.15b). La transition observée est une transition de phase bien définie dont les exposants critiques ont été déterminés :  $v_a \propto (\eta_c - \eta)^{0.45}$ , et  $v_a \propto (\rho - \rho_c)^{0.35}$ .

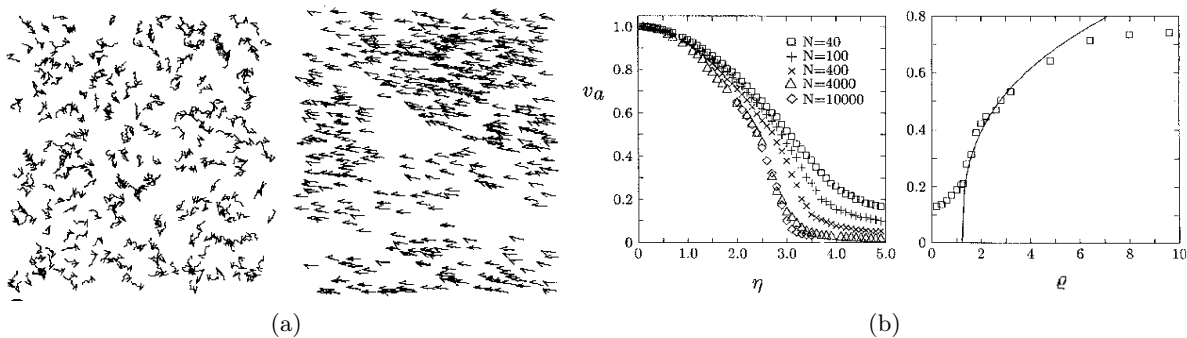


Figure 1.15 – Simulations réalisées à partir du modèle de VICSEK. Figures adaptées de [64]. (a) Différents cas obtenus pour  $N = 300$  particules montrant la phase désordonnée (à gauche) et organisée (à droite). (b) Variation du paramètre d'ordre  $v_a$  en fonction des différents paramètres de contrôle : en fonction de  $\eta$  et  $N$  pour une densité fixée (à gauche), en fonction de  $\rho$  pour une intensité de bruit fixée (à droite).

Ce modèle très simple a connu par la suite des variantes [65] visant à le perfectionner, par exemple en considérant une vitesse non fixée pour les particules, la moyenne se faisant alors directement sur le vecteur vitesse (et non sa seule orientation) [63], ou encore en prenant en compte à la fois la vitesse et l'accélération des particules voisines [66].

L'utilisation de l'orientation moyenne dans le modèle de VICSEK constitue une description phénoménologique du mouvement collectif. Cependant, il est possible de plus théoriser ce dernier en considérant que les particules interagissent et que ces interactions peuvent occasionner cet alignement sans qu'il soit un mécanisme explicite du modèle. C'est ainsi que SZABÓ *et al.* ont établi un modèle [67,68] où cet alignement est implicite : les interactions entre particules viennent modifier leur vitesse (qui est constante en leur absence), mais il n'y a pas d'opération directe de moyennage. Les résultats obtenus sont très similaires au modèle de VICSEK originel, avec notamment des exposants critiques du même ordre.

Un autre exemple de modèle comprenant des interactions de VICSEK implicites est celui issu du travail de BASAN *et al.* [69]. Dans celui-ci, les cellules alternent d'un état non motile où elles n'exercent aucune force, à un état motile où elles exercent une force de migration de direction aléatoire indépendante de celle dans le précédent état motile. Le modèle introduit un couplage entre la force et la vitesse de chaque cellule : si le passage de l'état non motile à l'état motile se fait à un taux temporel constant, le passage inverse se fait à des intervalles de temps plus longs si la force de motilité a une composante positive le long de la direction de la vitesse de la cellule. On a donc un rafraîchissement des forces individuelles qui est moins fréquent si elles contribuent à faire se mouvoir les cellules dans la même direction. Ce couplage entre force et

vitesse occasionne des interactions effectives d'alignement de l'orientation entre cellules voisines qui permet notamment de rendre compte de mouvements collectifs lors de la migration d'un tissu.

Le modèle de VICSEK et ses variations ont été utilisés avec succès pour décrire des populations de cellules en monocouche [63,67,69], comme illustré sur la figure 1.14c. Cependant, des modélisations utilisant des ingrédients radicalement différents existent également pour ce genre de systèmes, nous en présentons quelques uns dans les sections suivantes.

### Modèle de Potts cellulaire

Le modèle de POTTS à deux dimensions est une généralisation du modèle d'ISING au cas où les spins  $\sigma$  peuvent prendre non pas deux mais  $N$  valeurs dégénérées [70]. Le hamiltonien associé est le suivant :

$$\mathcal{H}_{\text{Potts}} = \sum_{\langle i,j \rangle} 1 - \delta_{\sigma(i),\sigma(j)}$$

où les interactions sont calculées entre les couples de spins  $\langle i, j \rangle$  voisins dans le réseau. L'évolution se fait à l'aide d'une méthode de MONTE-CARLO METROPOLIS. Dans leurs travaux [71,72], GRANER et GLAZIER ont étendu ce modèle afin de pouvoir décrire un tissu cellulaire. Ils ont pour cela pris en compte plusieurs ingrédients caractéristiques de ce système pour concevoir le modèle de POTTS cellulaire (CPM).

Une cellule est définie dans ce modèle comme un domaine<sup>4</sup> englobant tous les spins de valeur  $\sigma$ . La taille des cellules ne prenant qu'un intervalle de valeurs bien définies dans la réalité, les auteurs ont ajouté au hamiltonien une contrainte élastique d'aire préférentielle pour chaque type cellulaire. En faisant également dépendre les interactions entre spins du type des cellules impliquées et à l'aide de conditions au bord adaptées, ils ont réussi à décrire avec succès la ségrégation entre deux types cellulaires (voir section 1.3.1).

Ce modèle a lui aussi fait l'objet de variations pour prendre en compte un mouvement polarisé des cellules individuelles [73] ou encore pour étudier l'influence de la motilité des cellules ou les conséquences de la présence de cellules *leaders* [74].

### Modèle vertex

Une autre description commune de ce genre de système est le *vertex model* (littéralement, « modèle à sommets ») dans lequel une monocouche confluente est approchée par un pavage de la surface avec des cellules polygonales (voir figure 1.16). Le modèle décrit uniquement le mouvement des sommets (*vertices*) de ces polygones, les arêtes des cellules se déduisant de la position de ces derniers. Ils sont considérés comme évoluant dans un milieu visqueux appliquant une force de traînée de coefficient  $\mu$ , le tout dans une limite où les effets inertiels sont négligeables. Le mouvement de chaque *vertex*  $i$  est alors obtenu grâce à l'équation suivante, où  $\vec{F}_i$  est la somme des forces s'appliquant sur le *vertex* [75] :

$$\mu \frac{\partial \vec{r}_i}{\partial t} = \vec{F}_i$$

Les différents modèles *vertex* diffèrent principalement par la forme et les ingrédients pris en compte dans la résultante  $\vec{F}_i$ . Il est par exemple possible de formuler la somme des forces  $\vec{F}_i$  de

4. En dessous d'une température critique  $T_c$ , on obtient des domaines de WEISS contigus pour chaque valeur  $\sigma$  de spin, ce qui est compatible avec la description de cellules.

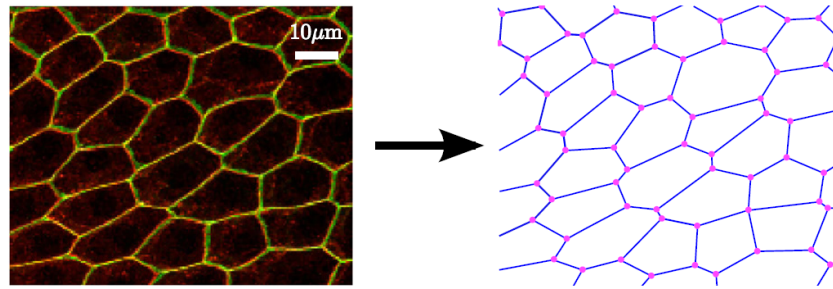


Figure 1.16 – À gauche, projection transverse d'une pile d'images de l'épithélium d'un follicule de drosophile. Les jonctions adhérentes (cadhérine E) sont marquées en rouge, les jonctions septates (neurogliane), équivalent des jonctions serrées chez les invertébrés, sont marquées en vert. À droite, modélisation de type *vertex* où les cellules sont représentées par des polygones dont les arêtes correspondent aux membranes (en bleu), et où les jonctions entre trois cellules ou plus sont les sommets (*vertices*, en magenta) dont on décrit le mouvement. Adapté de [76].

manière explicite comme l'ont fait WELIKY *et al.* [77], ou de manière implicite en la faisant dériver d'un potentiel au niveau de chaque *vertex* comme FARHADIFAR *et al.* [78]. Plusieurs paramètres ont été intégrés dans ces forces par les différents auteurs, notamment une élasticité rendant compte de la capacité limitée de chaque cellule à subir des déformations ou des modifications de volume (implémentée à l'aide d'une aire et/ou d'un périmètre préférés) ou encore les forces d'adhésion ou de tension membranaire souvent prises proportionnelles à la longueur d'arête. Les coefficients correspondants sont pris constants pour un tissu homotypique, ou variés pour rendre compte par exemple d'une adhésion différentielle entre deux types cellulaires.

Ces modèles ont également été perfectionnés afin de pouvoir prendre en compte les réarrangements dans le tissu qui se traduisent par des changements de voisins, pour décrire la fusion de deux populations lors d'une cicatrisation ou encore la délamination de cellules dans le tissu [79]. Ce type de modèle a été appliqué avec succès à la description de nombreux mécanismes collectifs notamment morphogénétiques [77,78,80].

### Descriptions continues

Enfin, d'autres modèles s'affranchissent complètement de la description d'un tissu comme assemblée de cellules, mais se placent à une échelle supérieure pour le traiter de manière continue à l'aide d'équations proches de celles utilisées traditionnellement en mécanique des fluides. Nous présentons ici deux exemples de modèles utilisés pour décrire des épithéliums en cicatrisation.

Par exemple, ARCIERO *et al.* ont modélisé dans [81] un tissu épithélial sous forme d'un fluide bidimensionnel compressible dont la configuration est décrite par la donnée de sa densité cellulaire  $\rho$ . Les équations du mouvement qu'ils ont adoptées sont des variations formelles de celles de NAVIER-STOKES, la densité cellulaire surfacique  $\rho$  jouant le rôle occupé traditionnellement par la masse volumique.

Notamment, le tissu obéit à une équation de continuité traduisant la conservation du nombre de cellules

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \text{div}(\rho \vec{v}) = g(\rho)$$

dans laquelle le terme  $g(\rho)$  est un terme source permettant d'implémenter une croissance ou une entrée en apoptose du tissu en fonction de sa densité. La vitesse dans le tissu est alors obtenue

à l'aide de l'équation de bilan de la quantité de mouvement :

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \rho (\vec{v} \cdot \text{grad}) \vec{v} = -b\vec{v} - \text{grad} p(\rho)$$

où le coefficient  $b$  rend compte d'une friction du tissu avec le substrat, et le terme en pression  $p(\rho)$  est la réduction du tenseur des contraintes en supposant que le fluide est non visqueux. Sous certaines hypothèses (effets inertiels négligeables, choix de la relation constitutive  $p(\rho)$ ), les auteurs ont abouti à une équation de réaction-diffusion de la forme :

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \kappa \Delta \rho + g(\rho)$$

Grâce à ce modèle, les auteurs ont pu décrire avec succès la croissance d'une population cellulaire, et expliquer l'évolution de la forme d'une blessure dans le tissu au cours du temps (voir figure 1.17a).

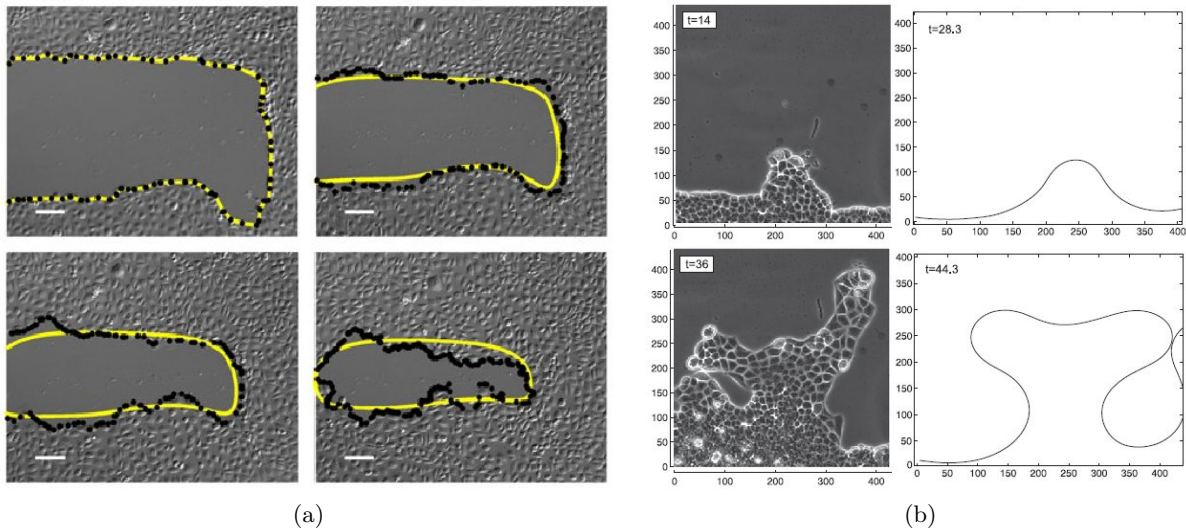


Figure 1.17 – Modèles continus de tissus en migration. (a) Évolution comparative au cours du temps de la bordure d'une blessure dans une monocouche d'entérocytes intestinaux (pointillés noirs) et de la prédiction (ligne jaune) obtenue par un modèle continu dont les paramètres ont été choisis par ajustement de la bordure d'une autre blessure sur le même système. Deux images successives sont séparées de  $\delta t = 1$  h. Barre d'échelle :  $5 \mu\text{m}$ . Adapté de [81]. (b) Comparaison qualitative de la croissance de digitations dans une monocouche de cellules MDCK en migration (à gauche) et un modèle continu où la motilité dépend de la courbure de l'interface (à droite). Longueurs en  $\mu\text{m}$ , temps en h. Adapté de [82].

D'autres auteurs, tels que MARK *et al.* dans leur étude [82], ont adopté une description continue s'intéressant principalement au bord libre de la monocouche. Ils ont pris en compte la tension de ligne de l'interface et y ont ajouté une force due à la motilité des cellules dont la valeur augmente avec la courbure locale de l'interface, ainsi qu'une force de modération qui se comporte comme une force élastique lorsque la densité sort d'un intervalle autorisé. Ils ont ainsi pu rendre compte de la naissance, à partir d'une perturbation de l'interface, d'une ramification d'instabilités dynamiques très similaires aux digitations entraînées par des cellules *leaders* que l'on peut observer lors de la migration de certains tissus épithéliaux (voire figure 1.17b).



Ces deux modèles sont des exemples parmi d'autres de ces approches continues. Il en existe d'autres et on peut notamment citer une description, d'abord conçue pour modéliser les filaments du cytosquelette [83] mais qui a été étendue au cas des tissus cellulaires [84,85] et qui consiste à les modéliser sous la forme de gels actifs. Plus précisément, cette appellation désigne des milieux viscoélastiques qui sont soumis à une contrainte supplémentaire du fait de la division et de l'apoptose des cellules, ainsi qu'à une équation de continuité tenant compte du terme source correspondant à ces deux phénomènes.

### 1.3 Coexistence et compétition

La coexistence de plusieurs types de cellules dans un environnement commun est une évidence biologique : plusieurs organes se côtoient dans le même organisme, et chacun de ces organes est constitué de plusieurs tissus spatialement très proches. L'étude de cette coexistence et de sa dynamique est donc fondamentale pour atteindre une compréhension exhaustive des phénomènes de développement. Cependant, cette coexistence peut également prendre des allures de compétition entre types cellulaires mis en présence l'un de l'autre, ce qui est par exemple le cas lors de l'invasion de tissus sains par des cellules cancéreuses. Dans cette partie, nous détaillerons quelques uns des aspects relevant de cette coexistence : nous aborderons dans un premier temps la ségrégation de deux types cellulaires suffisamment différents, puis nous parlerons du phénomène de compétition cellulaire. Cette seconde partie sera l'occasion d'introduire le concept de pression homéostatique et de s'intéresser à la transformation oncogénique  $Ras^{V12}$ , qui sera au centre des expériences du chapitre 4.

#### 1.3.1 Ségrégation cellulaire

Les embryons, lors de leur développement, voient leurs cellules se différencier et acquérir des fonctions différentes pour créer à terme des organes distincts, et de position prédéterminée. On sait depuis les années 1940 que cette organisation est bien plus essentielle que ce qu'on pourrait croire, et qu'il s'agit en fait d'une *auto*-organisation, « encodée » au niveau cellulaire. En effet, en 1943, Johannes HOLTFRETER a réalisé des biopsies d'embryons de salamandres pour les cultiver *in vitro*. Il a soumis une partie de ces agrégats tridimensionnels en développement à un milieu très basique, dans lequel les cellules se sont dissociées et mises en suspension. En se ramenant à des conditions de pH habituelles, les cellules se sont agrégées de nouveau mais en ayant perdu toute organisation spatiale. La différenciation des cellules a alors repris, et celles-ci se sont déplacées dans les agrégats, si bien qu'à la fin il a obtenu un résultat identique aux agrégats n'ayant pas été dissociés : une séparation radiale nette entre les différents « organes » [86]. Il a postulé l'existence d'une affinité entre certains types de cellules, une sélectivité de l'adhésion cellulaire, concept qu'il a exploré plus longuement avec TOWNES [87] en créant des agrégats de deux ou trois types cellulaires connus, ce qui leur a permis de confirmer les premières observations de HOLTFRETER (voir figure 1.18a) et d'ouvrir la porte à de nombreuses études ultérieures de cette ségrégation cellulaire (*cell sorting*). Ils ont mis en avant une hypothèse d'adhésion spécifique alors très floue, mais qu'ils ont comparée au concept de tension de surface entre liquides.

Malcolm STEINBERG a poursuivi cette *hypothèse d'adhésion différentielle* (DAH), et a prouvé l'existence d'une hiérarchie spatiale entre types cellulaires, certains ayant une forte préférence pour le centre de l'agrégat, et d'autres pour l'extérieur [89]. Cette observation l'a conforté dans l'analogie qu'il tire entre les phénomènes de minimisation d'énergie en jeu dans le concept de tension de surface entre liquides immiscibles, et ceux d'adhésion préférentielle entre cellules d'un

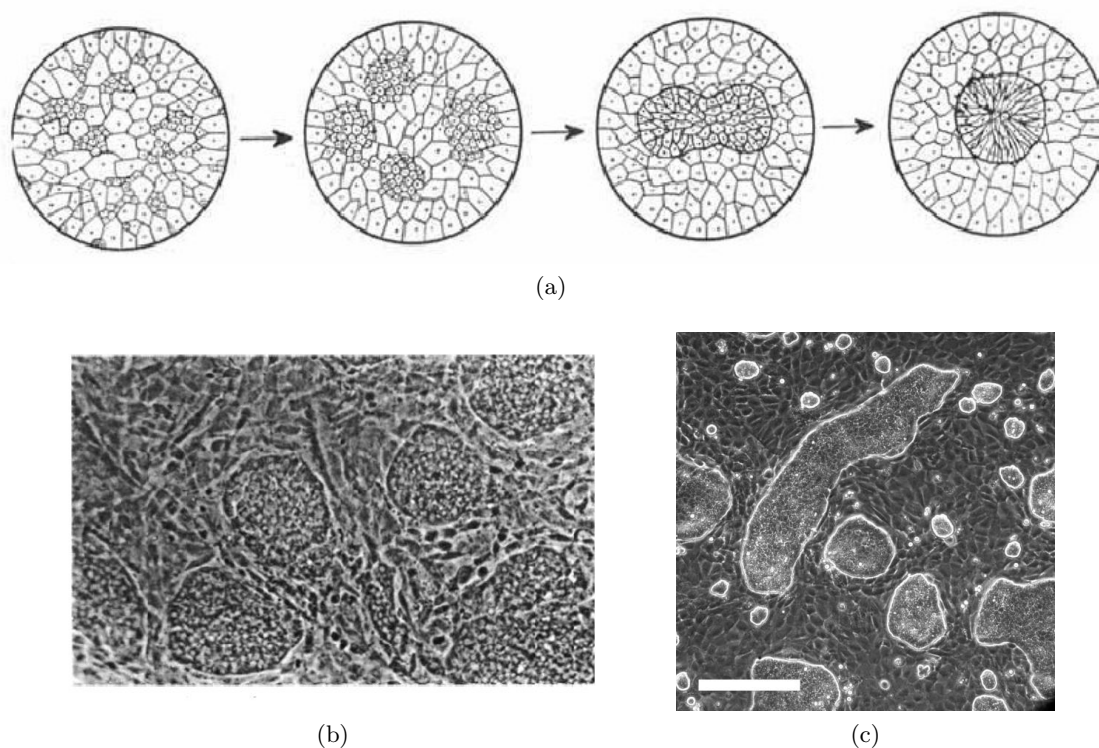


Figure 1.18 – (a) Schémas montrant l'évolution d'un agrégat de cellules embryonnaires de salamandre où sont initialement mélangées de manière homogène des cellules de l'endoderme et des cellules de la plaque neurale. Les cellules neurales se rassemblent en îlots par coalescences successives jusqu'à se fondre en un unique domaine au centre de l'agrégat. Adapté de [87]. (b) Co-culture de cellules de foie (îlots) et de patte (phase continue) d'un embryon de poussin, 48 h après dépôt. Tiré de [88]. (c) Image obtenue au laboratoire d'une co-culture de cellules MDCK et NRK (*Normal Rat Kidney*), 3 jours après dépôt. Les cellules MDCK forment des îlots encerclés de cellules NRK. Barre d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ .

même type. Quelques années plus tard, GARROD et lui-même ont montré que cette ségrégation se produit également dans des cultures mixtes (co-cultures) en monocouches (voir figure 1.18b), et qu'elle continue une fois même que la confluence est atteinte [88]. Cette observation très surprenante a notamment mis à mal l'universalité du concept d'inhibition de la motilité par contact.

La question de l'origine de cette tension de surface a par la suite été explorée. Il a en effet été montré que la différence d'adhésion jouait bien un rôle crucial dans ce phénomène de ségrégation, en particulier via les molécules de jonction de la famille des cadhérines. Plus précisément, c'est le taux d'expression ou le type de celles-ci qui se sont révélés importants, puisqu'une différence dans cette expression suffit à provoquer une ségrégation franche de cellules initialement mélangées [90,91], comme illustré figure 1.19. Des études plus récentes ont mis en évidence le fait que cette différence d'adhésion entre types cellulaires n'était pas toujours un argument suffisant pour expliquer les phénomènes observés, et ont souligné la contribution dans la tension de surface effective entre populations de la contractilité des cellules, et notamment des structures d'acto-myosine qu'elles contiennent [92,93].

Cependant, la complexité du vivant étant rarement réductible à une seule loi, d'autres voies ont été explorées pour justifier cette ségrégation cellulaire. Par exemple, BELMONTE *et al.* [94]

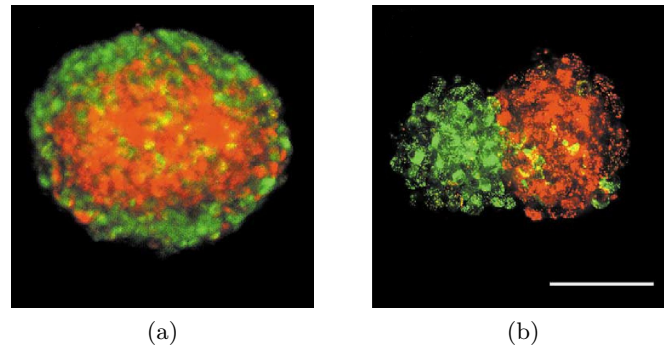


Figure 1.19 – Images, adaptées de [91], montrant les configurations d'équilibre d'agrégats de cellules L composés d'une co-culture de populations exprimant un niveau ou un type de cadhérines différent. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$ . (a) Co-culture de cellules exprimant un niveau différent de cadhérines de type N, après 1 jour en suspension. Les cellules rouges expriment 50 % de cadhérines en plus que les cellules vertes. (a) Co-culture de cellules exprimant un type de cadhérines différent, après 2 jours en culture. Les cellules rouges expriment de la cadhérine de type R alors que les vertes expriment de la cadhérine de type B.

ont étudié par des simulations fondées sur le modèle de VICSEK le rôle du mouvement collectif et montré que celui-ci accélérerait fortement le processus de ségrégation par rapport au cas où seule la tension d'interface agit.

Sans mettre non plus à mal l'hypothèse d'adhésion différentielle mais plutôt pour la compléter, MEHES *et al.* [95] se sont intéressés au rôle de la différence de motilité cellulaire. Celle-ci, par la simple migration de cellules pour lesquelles l'adhésion n'est pas un facteur prépondérant (en l'occurrence, des kératocytes issus d'espèces animales différentes), peut suffire à provoquer la ségrégation des cellules. Ce résultat a par ailleurs également été obtenu *in silico* [96] en simulant des assemblées de particules actives de deux types qui diffèrent par leur motilité (voir figure 1.20).

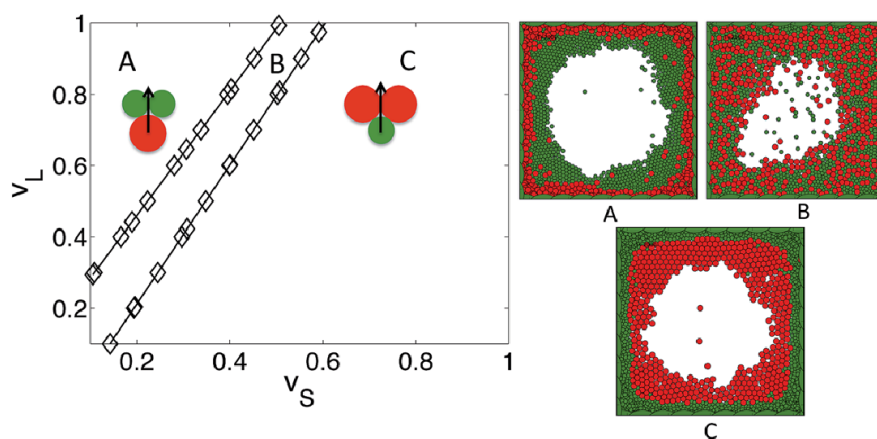


Figure 1.20 – Démixtion de deux populations de particules auto-propulsées, l'une de faible diamètre et de vitesse  $v_S$  (en rouge) et l'autre de diamètre 1,4 fois plus grand et de vitesse  $v_L$  (en vert), en fractions surfaciques égales. En fonction des rapports entre les deux vitesses, trois phases différentes, illustrées à droite, sont observables. Adapté de [96].

Il faut enfin garder à l'esprit que deux types cellulaires, mis en présence l'un de l'autre dans une co-culture, ne subissent pas forcément de ségrégation spontanée, ou à des échelles de temps trop élevées pour être expérimentalement observable. Ce tri cellulaire spontané ne se produit que dans le cas où les cellules sont « assez différentes », ce terme volontairement flou étant justement l'objet des recherches précédemment évoquées (cellules provenant d'animaux d'espèces distinctes, ou de plusieurs organes, ou ayant subi telle mutation, et cætera).

### 1.3.2 Compétition cellulaire

Le phénomène de compétition cellulaire a été décrit en 1975 par Ginés MORATA et Pedro RIPOLL [97] chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*). Leur étude portait sur le développement de clones possédant des cellules porteuses d'une mutation génétique appelée *Minute*, qui sont viables mais se divisent moins rapidement que les cellules de type sauvage (*wild-type*)<sup>5</sup>.

Ils ont en effet observé que les drosophiles porteuses de cette mutation se développent plus lentement que celles du type sauvage, mais arrivent à un état adulte de taille normale sans anomalie majeure dans le développement. Comme l'illustre la figure 1.21a, en provoquant par recombinaison mitotique l'apparition de clones *Minute* ou *wild-type* dans le disque imaginal de l'aile d'une mouche mutante *Minute*, ils ont observé que les clones *Minute* croissaient plus lentement que leur équivalent sauvage. En revanche, en menant l'expérience inverse (clones *Minute* ou non créés dans une drosophile *wild-type*), ils ont observé que les clones mutés *Minute* avaient disparu dans l'organisme adulte pour peu qu'ils aient été créés suffisamment tôt (voir figure 1.21b). Les drosophiles ayant toutes la même taille à la fin, ils ont également conclu au remplacement des cellules mutées par des cellules normales en même quantité.

#### Principe de la compétition cellulaire

La *compétition cellulaire* a été décrite comme cette interaction cellulaire à courte portée qui provoque l'élimination par apoptose de cellules se divisant lentement (les « perdantes ») lorsqu'elles sont en contact avec des cellules se divisant plus rapidement (les « gagnantes »), alors même qu'elles sont viables dans un environnement homotypique<sup>6</sup> [98,99]. Les cellules perdantes sont alors remplacées par des cellules (filles) gagnantes. Ce remplacement est dû à un mécanisme baptisé *prolifération compensatoire*<sup>7</sup> : les cellules mutées, en entrant en apoptose, émettent un signal provoquant la division des cellules voisines. Le phénomène de compétition, qui est désormais avéré pour d'autres mutations génétiques et dans de nombreux systèmes cellulaires est illustré figure 1.22.

La compétition cellulaire peut être vue comme un mécanisme d'optimisation d'une assemblée multicellulaire : les cellules sous-optimales, bien que viables, sont éliminées pour laisser place à des cellules de plus haute valeur sélective (*fitness*). Cette élimination se fait, on l'a vu, grâce à

5. Plus précisément, les cellules mutées étudiées sont exclusivement hétérozygotes pour la mutation *Minute* (*M*). En effet, les cellules porteuses homozygotes (*M/M*) n'y survivent pas car la mutation les empêche de produire des protéines. Les cellules porteuses hétérozygotes (*M/M*<sup>+</sup>) sont viables, mais ont un défaut de croissance vis-à-vis des cellules *wild-type* (*M*<sup>+</sup>/*M*<sup>+</sup>).

6. C'est-à-dire ici uniquement constitué de cellules perdantes.

7. L'usage de cette appellation dans cette thèse suit celui qui est fait dans de nombreuses publications sur le sujet, parfois récentes à l'instar de [99]. Pour autant, MOLLEREAU *et al.* demandent dans [100] l'utilisation d'un vocabulaire distinct pour décrire deux aspects de ce phénomène : *prolifération compensatoire* pour le processus par lequel un tissu auquel il manque des cellules vient compenser cette perte par une prolifération accrue pour recouvrer sa taille d'origine; et *prolifération induite par apoptose* pour le processus cellulaire selon lequel des cellules apoptotiques secrètent des substances favorisant la mitose des cellules voisines.

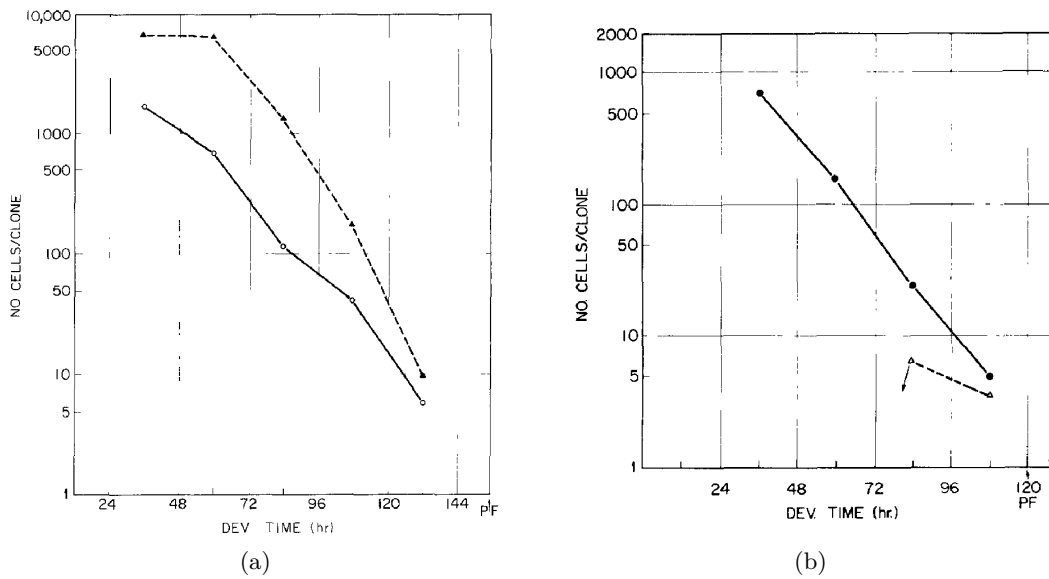


Figure 1.21 – Évolution comparative de clones *wild-type* et *Minute*. Le temps en abscisse est mesuré entre le dépôt initial de l'embryon et l'irradiation déclenchant la recombinaison des clones, qui sont par la suite tous observés en même temps. L'âge des clones va donc dans le sens opposé à cet axe. Figures tirées de [97]. (a) Clones *wild-type* (pointillés) et *Minute* (trait plein) dans un disque imaginal *Minute*. Les clones *wild-type* croissent plus vite que les clones *Minute*, avec des temps de division respectifs de 8,5 h et 12 h. (b) Clones *wild-type* (trait plein) et *Minute* (pointillés) dans un disque imaginal non muté. Les clones mutés *Minute*, lorsqu'ils ont été provoqués tôt dans l'embryon, ont disparu à la fin du développement.

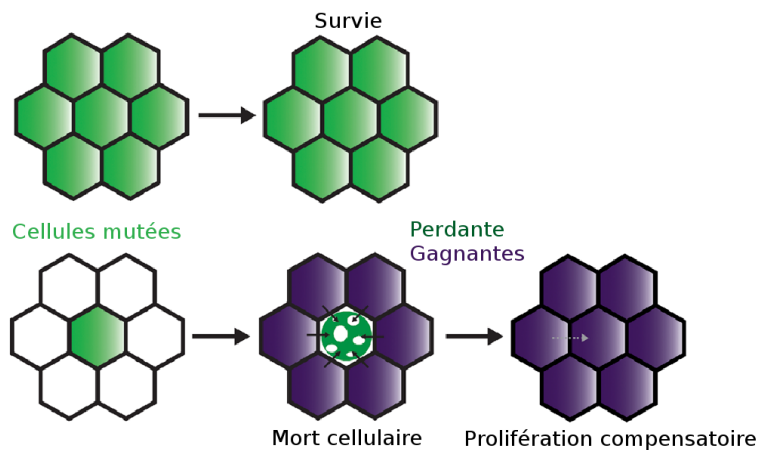


Figure 1.22 – Principe de la compétition cellulaire. Les cellules mutées (en vert) survivent si elles sont entourées de cellules du même génotype. En revanche, si elles sont entourées de cellules non mutées (en blanc), elles sont éliminées et remplacées par la prolifération compensatoire des cellules non mutées. Adapté de [99].

l'entrée en apoptose des cellules perdantes, mais également grâce à la phagocytose de celles-ci – la compétition cellulaire cessant de se produire lorsque les gènes liés à l'internalisation sont inactivés [98]. Il n'a pas été clairement établi si cette internalisation se faisait par les cellules gagnantes ou par des macrophages lors de leur délamination [99].

La compétition cellulaire, si elle a été formulée précisément sous ce nom-là chez la drosophile, a également été observée chez des mammifères, *in vivo* comme en culture cellulaire [101,102]. Avant même les premières études de MORATA et RIPOLL chez *D. melanogaster*, Michael STOKER a observé que des fibroblastes de hamster transformés par un virus tumorigène voient leur croissance *in vitro* inhibée par la présence de fibroblastes non transformés, mais pas par la présence de fibroblastes transformés [103,104]. Ces propriétés ont amené les scientifiques à envisager la compétition cellulaire également comme un dispositif anti-tumeur, et donc un moyen de protection de l'organisme contre le cancer.

Des études plus récentes ont en effet montré que ce mécanisme de compétition cellulaire était observable dans de nombreux cas où la mutation étudiée était impliquée dans la formation de tumeurs, notamment chez l'humain. On peut par exemple citer des mutations des oncogènes *Ras* [101], *Src* [105] ou encore les molécules à effet suppresseur de tumeur Mahjong [106] et p53 [107]. La plupart de ces études ont été menées sur des tissus épithéliaux, ce type de tissus étant à la source de plus de 80 % des cancers humains.

Ainsi, HOGAN *et al.* ont étudié dans [101] la compétition *in vitro* entre des cellules MDCK de type sauvage et de type transformé *Ras*<sup>V12</sup>. Afin d'éviter le phénomène de ségrégation cellulaire décrit dans la section 1.3.1 et d'obtenir des cellules transformées uniques entourées par des cellules normales, ils ont utilisé une lignée transformée dont on peut chimiquement activer la mutation *Ras*<sup>V12</sup> en les mettant en présence de tétracycline. Ils ont observé qu'une fois la mutation *Ras*<sup>V12</sup> activée, les cellules transformées dispersées dans le tissu sain se font expulser apicalement des monocouches (voir figure 1.23a). En revanche, dans le cas d'une population intégralement constituée de cellules mutées, toutes les cellules restent en monocouche (voir figure 1.23b).

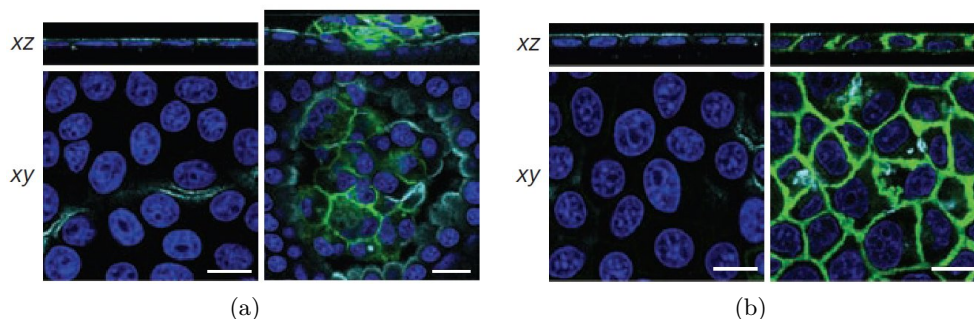


Figure 1.23 – Extrusion apicale de cellules MDCK transformées *Ras*<sup>V12</sup>. Images adaptées de [101]. Barres d'échelle : 20  $\mu\text{m}$ . Les noyaux sont marqués au Hoechst (en bleu), la mutation *Ras*<sup>V12</sup> est couplée à une fluorescence GFP (en vert). (a) Vue en coupe (*xz*) et vue de haut (*xy*) d'une monocouche de cellules MDCK normales contenant des cellules transformées à un rapport 1:100. À gauche, les cellules avant l'activation de la mutation. À droite, après 48 h d'incubation avec de la tétracycline, les cellules transformées se sont fait expulser apicalement. (b) Idem avec une population intégralement constituée de cellules mutées. Même après l'activation, toutes les cellules restent en monocouche.

### Mutation *Ras*<sup>V12</sup>

On peut détailler un peu l'exemple de la mutation oncogénique de *Ras*, qui est celle que nous avons retenue pour le choix des lignées cellulaires employées dans nos expériences de compétition au chapitre 4. Les protéines Ras (abréviation de *Rat sarcoma* pour des raisons historiques)

forment une famille de protéines<sup>8</sup> impliquées dans la transmission de signaux dans les cellules. Elles interviennent dans la régulation de la prolifération, de la différenciation, de l'apoptose, mais aussi dans l'organisation du cytosquelette [108].

Les gènes de la famille *Ras* correspondante sont des proto-oncogènes, c'est-à-dire des gènes normaux dont la mutation ou la surexpression peut générer des cancers. Ainsi, des mutations de trois représentants de cette famille, les gènes *H-RAS*, *K-RAS* et *N-RAS*, se retrouvent dans environ un quart des tumeurs humaines. La plupart de ces mutations impliquent le changement d'un unique acide aminé dans les protéines produites. Chez l'humain, la mutation la plus fréquente se fait au niveau du codon en position 12 qui entraîne chez les protéines *Ras* un remplacement de la glycine qui se trouve à cette position par un autre acide aminé. Ce remplacement a pour conséquence d'activer constamment ces protéines, ce qui perturbe la croissance cellulaire et provoque des cancers [109]. Une mutation couramment étudiée est celle qui implique le remplacement de la glycine en position 12 par une valine, mutation que l'on note *Ras*<sup>G12V</sup>, ou de manière plus concise *Ras*<sup>V12</sup>.

On l'a vu, cette mutation a été étudiée dans le cadre de la compétition cellulaire, et on sait notamment que des cellules transformées *Ras*<sup>V12</sup> dans une monocouche de cellules normales sont extrudées apicalement (voir figure 1.23) ou basalement [101,110].

### Super-compétition

Il faut enfin mentionner la découverte de certaines mutations capables, contrairement au cas classique que l'on vient de décrire, de conférer aux cellules transformées une valeur sélective supérieure à celle des cellules normales, et donc de provoquer la mort de ces dernières.

Par exemple, MORENO *et al.* se sont intéressés dans [111] au cas du gène *dmyc*, homologue chez la drosophile du proto-oncogène *myc* trouvé chez les mammifères. En menant des expériences très comparables dans leur principe à celles de MORATA et RIPOLL, ils ont montré qu'une mutation de ce gène pour donner l'allèle *dmyc*<sup>P0</sup> produisait des clones qui se font extruder basalement de disques imaginaires *wild-type* alors qu'ils sont viables dans des individus mutés, suivant le même mécanisme que celui décrit précédemment.

Ils ont également créé des clones possédant le gène *dmyc* sous sa forme normale, mais en nombre deux fois plus important que dans le type sauvage. De manière surprenante, ils ont observé qu'un clone porteur de *dmyc* surnuméraires grossissait plus que sa contrepartie *wild-type* et qui plus est au détriment de cette dernière (voir figure 1.24). En revanche, lorsque deux clones mutés sont en présence l'un de l'autre, ils ont observé un développement très similaire à celui de clones non mutés. Dans [112], DE LA COVA *et al.* ont montré dans le même système que ce phénomène n'avait lieu qu'à courte portée et forcément au sein d'un même compartiment de développement.

Les cellules mutées se comportent donc comme des cellules *super-compétitrices*, capables d'utiliser le mécanisme de compétition cellulaire à leur avantage pour ainsi détruire les cellules de type sauvage avoisinantes, comme illustré figure 1.25. Leur croissance est également favorisée par la prolifération compensatoire, via la sécrétion de substances activant la division cellulaire par les cellules apoptotiques.

Il a également été montré que les mutations oncogéniques précédemment évoquées avaient le pouvoir de « coopérer » lorsqu'elles se trouvent ensemble dans une cellule pour la rendre super-compétitrice et passer outre le mécanisme anti-cancer que constitue la compétition cellulaire

8. Plus précisément, ces protéines sont des petites (de masse moléculaire faible : environ 21 kDa) GTPases, des enzymes capables d'hydrolyser la guanosine triphosphate (GTP).

classique [98]. Il est difficile de ne pas faire le lien entre ces cellules capables de créer une population à partir d'une cellule unique, et les premiers stades de l'invasion d'un tissu sain par une tumeur.

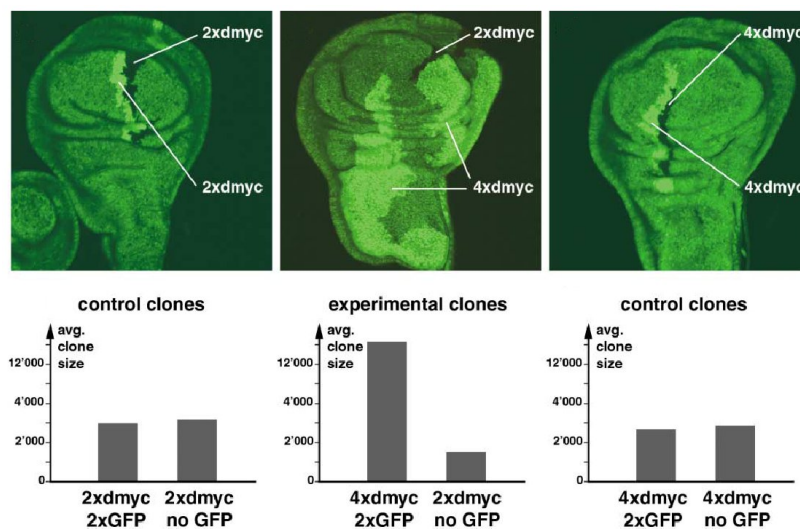


Figure 1.24 – En haut, trois types de tissus mosaïques présentant deux clones l'un marqué par une surexpression de GFP (en vert clair) et l'autre par l'absence de GFP (en noir). En bas, les tailles moyennes constatées pour les clones en question. Les clones sont soit *wild-type* et comportent deux copies du gène *dmyc*, soit mutés pour en comporter quatre. Les cellules avec des copies surnuméraires de *dmyc* se comportent comme des cellules super-compétitrices. Adapté de [111].

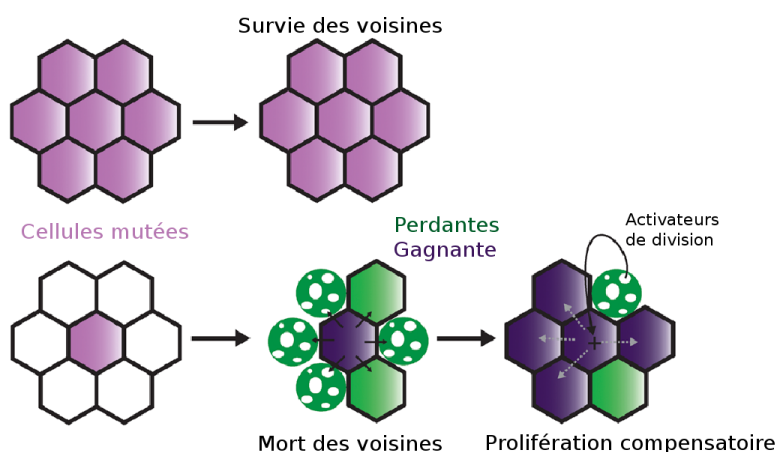


Figure 1.25 – Cas des cellules super-compétitrices. Les cellules mutées (en violet clair) ne tuent pas leur voisines si elles sont entourées de cellules du même génotype. En revanche, si elles sont entourées de cellules non mutées (en blanc), elles éliminent ces voisines pour les remplacer. Ce remplacement est favorisé par la prolifération compensatoire des cellules mutées due au relâchement dans le milieu de signaux activateurs de la division par les cellules non mutées lors de l'apoptose. Adapté de [99].



### 1.3.3 Mécanismes de la compétition

Ces différentes études ont bien montré l'existence du phénomène de compétition cellulaire, c'est-à-dire l'élimination et le remplacement de cellules par leurs voisines d'un type possédant une plus haute valeur sélective. Il a ensuite fallu explorer les raisons et mécanismes de ce phénomène, dont nous donnons un rapide aperçu ici.

#### Communication cellule-cellule

Il a été un temps pensé que la compétition cellulaire était une lutte pour la captation de facteurs de croissance et de survie en quantité totale limitante, mais cette piste s'est révélée insuffisante, la compétition existant également lorsque ces facteurs se trouvent en grande quantité dans le milieu. Il a aussi été postulé une hypothèse légèrement différente : la quantité de ces ressources n'est pas limitante, seule compte la dynamique de transduction de signal en réponse à celles-ci [113,114]. Ce postulat implique quoi qu'il en soit une possibilité de comparer ces niveaux de transduction entre cellules, que l'on peut voir *in fine* comme des niveaux de valeur sélective. Des études se sont donc penchées sur la possibilité de communiquer de cellule à cellule ces niveaux ou tout du moins le caractère gagnant ou perdant d'une cellule.

RHINER *et al.* ont ainsi étudié dans [115] le gène *flower* (*fwe*) chez la drosophile. Ce gène est responsable de la production de la protéine transmembranaire homonyme Flower, présente chez tous les animaux. En raison de l'épissage alternatif de *flower*, cette protéine existe sous trois isoformes qui se distinguent par leur domaine extracellulaire. Les auteurs ont montré qu'une de ces isoformes, qu'ils ont nommée  $Fwe^{ubi}$ , est exprimée partout dans les disques imaginaux de l'œil et de l'aile chez la drosophile. Les deux autres isoformes, baptisées  $Fwe^{Lose-A}$  et  $Fwe^{Lose-B}$ , ne sont pas détectables en l'absence de compétition cellulaire. En revanche, en mettant des cellules *wild-type* en présence de cellules super-compétitrices surexprimant dMyc, ils ont observé que ces deux isoformes étaient spécifiquement détectées dans les cellules *wild-type* qui sont ici perdantes (voir figure 1.26). Les auteurs ont en outre montré dans cette étude qu'une surexpression de  $Fwe^{Lose}$  provoquait l'apoptose mais que celle-ci nécessitait la présence de cellules voisines non transformées ou encore qu'une inhibition de la production de  $Fwe^{ubi}$  déclenchait l'apoptose sans que cela soit lié à un défaut de croissance. Les auteurs ont donc suggéré que le niveau de telle ou telle isoforme de Flower constituait un code entre cellules pour décider de leur destin de gagnante ou perdante, et que ce code pouvait provenir d'une régulation différenciée de l'épissage alternatif de *flower* en fonction de leur valeur sélective. Toutefois, notons que si la molécule Flower semble bien être l'élément de base d'une forme de communication entre cellules, les mécanismes exacts de cette dernière sont toujours inconnus.

#### Pression homéostatique

La comparaison des niveaux de transduction des facteurs de survie semble être une hypothèse solide pour expliquer le phénomène de compétition. Cependant un autre facteur, d'origine mécanique cette fois, pourrait également être important. On a vu que dans les expériences initiales de compétition de MORATA et RIPOLL, les cellules mutées éliminées étaient remplacées par des cellules de type sauvage. L'espace total offert à la population de cellules est donc bien limité.

Il a été postulé que cet espace fini, et l'apparition de contraintes mécaniques qu'il entraîne nécessairement, pouvaient être des facteurs clés pour la compétition cellulaire. Une modélisation de ce mécanisme s'appuie sur l'hypothèse, suggérée par les expériences [116], que l'évolution du nombre de cellules dépend de la pression mécanique exercée sur celles-ci [117] : plus forte est

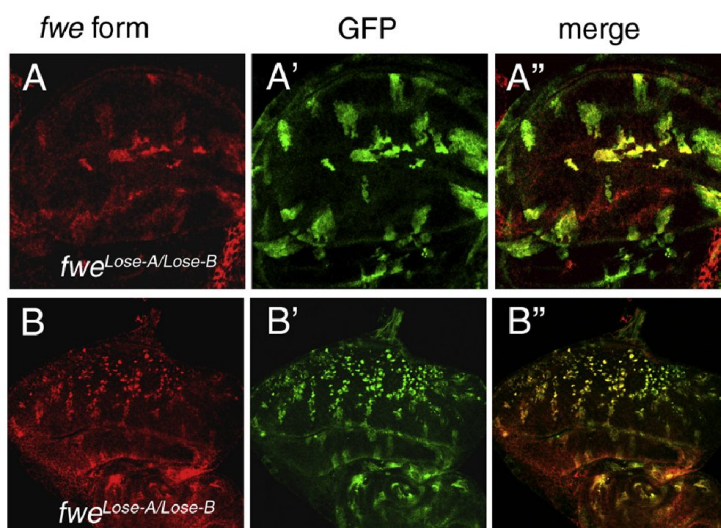


Figure 1.26 – Disques imaginaux de l’aile (en haut) et de l’œil (en bas) de la drosophile. À gauche, la localisation des isoformes  $Fwe^{Lose}$  (hybridation *in situ* en fluorescence, en rouge). Au milieu, la localisation des cellules *wild-type* (GFP, en vert) et super-compétitrices (en noir). À droite, la superposition des deux premières images montre une colocalisation très prononcée. Adapté de [115].

la pression mécanique exercée sur une population de cellules, moins celles-ci se divisent et/ou plus elles meurent, ce qui entraîne un taux de croissance net (différence entre taux de division et taux d’apoptose) de plus en plus petit.

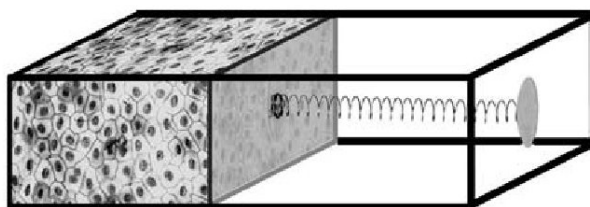


Figure 1.27 – Expérience de pensée permettant d’introduire le concept de pression homéostatique (voir texte). Adapté de [118].

Cette idée a été formalisée théoriquement par BASAN *et al.* [118] à partir de l’expérience de pensée représentée figure 1.27. Une population de cellules est placée dans un compartiment perméable au milieu, aux nutriments et à l’oxygène (mais pas aux cellules), qui leur assure des conditions de culture favorables grâce auxquelles elles peuvent proliférer sans problème. Une des cloisons de ce compartiment est un piston mobile relié à un mur rigide par un ressort. Les cellules se divisant, la population va occuper de plus en plus de place. Le piston va donc se déplacer vers le mur rigide et comprimer le ressort, augmentant ainsi la pression qu’il exerce sur les cellules. Cette augmentation de pression va induire une baisse du taux net de croissance jusqu’à une valeur nulle pour laquelle le taux de division et le taux d’apoptose se compensent. La pression correspondante est baptisée *pression homéostatique*, et doit être vue comme une pression d’équilibre que le tissu essaie d’atteindre. Cette pression est caractéristique d’un tissu donné.

Cette tendance à conserver une pression bien définie a par ailleurs été invoquée pour justifier l'exclusion de cellules vivantes d'une monocouche lorsque la densité surfacique est haute [119,120] et ainsi constituer une des explications à l'inhibition de prolifération par contact (voir section 1.1.2).

En envisageant le cas où, au lieu du ressort, on dispose un autre type cellulaire de l'autre côté du piston, et que leurs pressions homéostatiques diffèrent, il y aura nécessairement un type gagnant (celui dont la pression homéostatique est la plus haute) et un type perdant. Par prolifération, la pression  $P$  dans le système augmente jusqu'à ce que le type perdant arrive à l'équilibre. Le type gagnant continue de se diviser et  $P$  d'augmenter, ce qui provoque l'entrée en apoptose du type perdant, jusqu'à sa disparition totale. À deux dimensions, les cellules perdantes peuvent être plus simplement éliminées par extrusion hors de la monocouche.

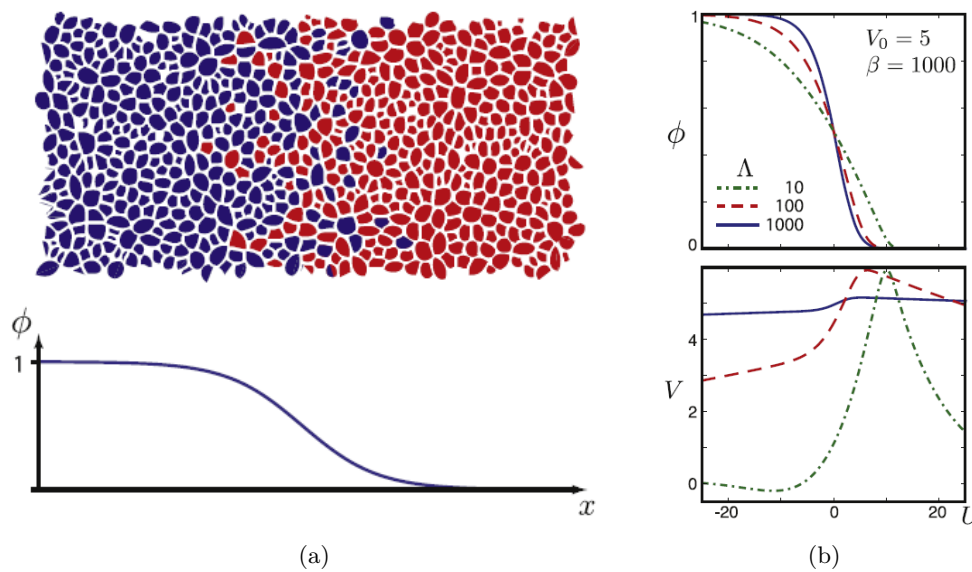


Figure 1.28 – (a) Description de l'interface entre deux tissus miscibles par une fraction surfacique  $\phi$ , en l'occurrence celle des cellules bleues. (b) Exemples de profils théoriques pour la fraction surfacique  $\phi$  et la vitesse  $V$ . Ces profils se déplacent à vitesse  $C$ , et sont donnés en fonction de  $U = X - CT$ , d'origine la position centrale de l'interface. Le type de gauche possède une pression homéostatique plus grande que celui de droite. Adapté de [121].

En suivant cette idée, RANFT *et al.* ont établi dans [121] les équations dynamiques du front entre plusieurs types cellulaires, y compris dans le cas plus complexe où les populations ne sont pas séparées en deux compartiments distincts mais sont libres de se mélanger. Les auteurs ont ainsi décrit le contact entre ces deux tissus par une interface « lisse » (au contraire d'une interface « nette » séparant deux tissus non miscibles). Ils ont traduit mathématiquement cet état de fait par une fraction surfacique  $\phi$  qui évolue continûment dans la direction de migration entre 1 là où un seul type de cellules est présent, et 0 là où les cellules ne sont que de l'autre type (voir figure 1.28a).

Leur système d'équations, qui prend en compte un couplage entre la composition du système et sa mécanique, peut être réduit à trois paramètres : la force d'advection  $V_0$  issue de la différence de pression homéostatique entre les deux tissus ; la longueur d'écran  $\Lambda$  qui dépend notamment de la viscosité du tissu et du rapport entre la pression mécanique et son effet sur le taux net de division ; enfin, la tension d'interface  $\beta$  qui s'oppose au mélange des deux types. Les auteurs font

varier ces différents paramètres pour obtenir une variété de formes de front différentes pour la fraction surfacique  $\phi$  et pour la vitesse  $V$  dans la direction  $x$  de migration. Aux temps longs, ces profils s'établissent tous sous la forme d'ondes progressives qui se déplacent à vitesse constante  $C$  (qui dépend de la valeur  $V_0$ ). Lorsque l'on s'éloigne de l'interface d'une distance suffisamment grande devant la longueur d'écran  $\Lambda$ , la vitesse  $V$  tombe à zéro, les deux tissus étant à l'équilibre homéostatique (voir figure 1.28b).

## 1.4 Transition de *jamming*

Dans cette dernière section, nous introduirons le cadre de réflexion associé à la transition de blocage, souvent désignée par le terme anglais de transition de *jamming*. Celui-ci découle principalement de l'interprétation d'expériences portant sur des milieux inertes (verres ou milieux granulaires) et de la volonté d'unifier les théories utilisées pour les décrire. Ce cadre a guidé certaines des réflexions menées au cours de cette thèse et, de ce fait, son explication est nécessaire à une compréhension exhaustive de celles-ci.

### 1.4.1 Introduction du concept de *jamming*

Deux systèmes, le verre et les milieux granulaires, voient leur mouvement bloqué sous certaines conditions. Issus de domaines de la physique relativement différents, ils ont historiquement été étudiés séparément, avant que des analogies commencent à être tirées et mènent à terme au concept généralisé de *jamming*.

#### États vitreux

À température ambiante, le verre est solide : il montre une réaction élastique au cisaillement, caractérisée par un module du même nom. Pour autant, il présente un agencement de ses molécules de silice bien loin de l'arrangement régulier caractéristique d'un cristal [122]. Au contraire, celui-ci rappelle bien plus un liquide (on parle de *solide amorphe*) sans pour autant conférer au verre les propriétés qui vont avec, c'est-à-dire ne pas avoir de forme propre et couler.

Plus précisément, le verre a une structure ordonnée à courte portée : ses molécules  $\text{SiO}_2$  sont arrangées sous forme d'un réseau connecté de maille bien définie (des tétraèdres  $\text{SiO}_4$ ). Cependant, au lieu d'avoir une orientation identique pour ces mailles dans la totalité du réseau, celle-ci varie très fortement dans l'espace, faisant ainsi disparaître tout ordre à longue portée à la manière d'un liquide.

Solide désordonné ou liquide coulant infiniment lentement, le verre est dans un état à mi-chemin nommé par TAMMANN en référence directe au matériau : l'*état vitreux* [123] (cité par [124]). On appelle de manière plus générale « verres » les matériaux dans cet état, notamment obtenus à partir de liquides moléculaires refroidis suffisamment rapidement pour les faire entrer en surfusion [125–128] ; ou encore de polymères [129], qui voient leur viscosité augmenter très rapidement au fur et à mesure de la diminution de la température. De la même manière, à l'approche de cet état, le temps de relaxation nécessaire au liquide pour atteindre une configuration à l'équilibre augmente progressivement, pour finalement être d'un ordre de grandeur très supérieur à la durée d'observation, faisant des verres des systèmes hors d'équilibre.

Du fait de sa nature, l'état vitreux ne dispose pas d'une transition bien définie et facilement identifiable avec l'état liquide, au contraire de la transition liquide-solide qui introduit de réelles discontinuités dans les paramètres physiques. Cependant, la littérature nous fournit

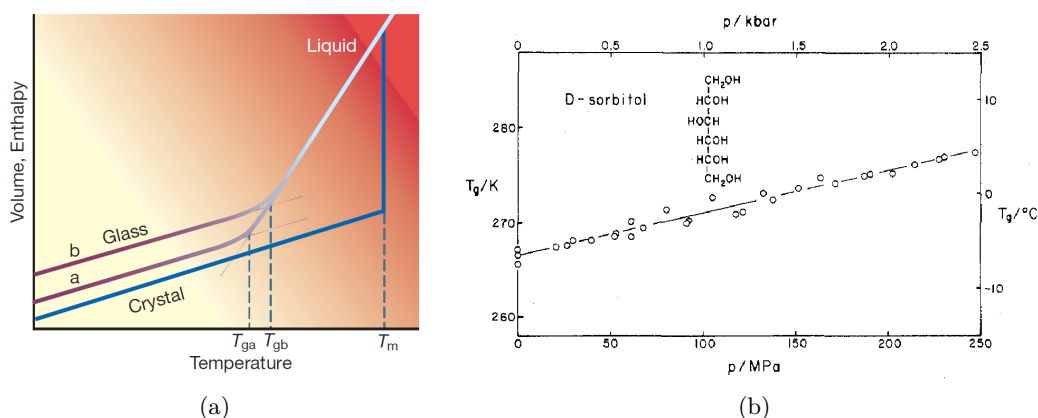


Figure 1.29 – Température de transition vitreuse. (a) Dépendance en température  $T$  du volume spécifique  $v$  ou de l'enthalpie massique  $h$  d'un milieu à pression constante. Classiquement, un liquide refroidi se solidifie lorsque  $T$  descend en dessous de  $T_m$ , son point de fusion, ce qui se traduit par une discontinuité dans l'évolution de  $v$  et  $h$ . Si cette baisse de température est assez rapide, le liquide peut entrer en surfusion et atteindre une transition vitreuse à  $T_g < T_m$ . À  $T_g$ , les grandeurs dérivées varient beaucoup mais de manière continue. Tiré de [128]. (b) Dépendance en pression  $P$  de la température  $T_g$  de transition vitreuse pour le sorbitol, un sucre-alcool. Tiré de [125].

plusieurs définitions empiriques de cette « transition » vitreuse (*glass transition*), qui n'est pas une transition de phase, sous la forme d'une température  $T_g$  à laquelle elle a lieu. Notamment, une définition historique de cette température est uniquement quantitative :  $T_g$  est la température à laquelle est atteinte dans le milieu une valeur de viscosité dynamique arbitraire<sup>9</sup> très importante  $\eta = 10^{12}$  Pa·s [124,128]. Une autre définition, plus qualitative, est donnée par la modification de l'évolution du volume spécifique ou de l'enthalpie massique – grandeurs mesurables par dilatométrie ou calorimétrie différentielle – que l'on observe lors du refroidissement d'un liquide surfondu (voir figure 1.29a), ce qui se traduit encore par un changement très rapide des grandeurs dérivées.

Pour autant, cette température de transition vitreuse n'est en réalité pas univoque. Par exemple, sous pression constante, différents taux de refroidissement d'un liquide surfondu conduiront à des températures  $T_g$  distinctes (plus basse pour un refroidissement plus lent), comme illustré par les deux verres de la figure 1.29a. Cela, malgré l'adoption d'une définition qualitative, ne permet pas de déduire une valeur précise de  $T_g$  [124,128]. La plage sur laquelle s'étalent ces températures restant peu étendue, on peut néanmoins disposer d'une valeur approximée « typique » pour les applications fonctionnelles. Le choix d'un protocole de refroidissement donné a permis d'étudier l'influence d'autres paramètres. On sait notamment, qu'il s'agisse de polymères [129] ou de solides moléculaires [125], que cette température augmente avec la pression  $P$  appliquée sur le milieu, et donc de manière équivalente, avec la masse volumique  $\rho$  (voir par exemple la figure 1.29b).

### Milieus granulaires bloqués

Dans un domaine de la physique *a priori* sans lien direct avec le précédent, des travaux se sont intéressés à l'écoulement et la rhéologie des milieux granulaires (sable, riz, assemblée de

9. Cette définition est notamment toujours celle utilisée comme référence dans le *Gold Book* de l'UICPA [130].

billes, suspensions colloïdales, mousses, etc.) dans différentes configurations [131], par exemple la sortie par l'orifice d'un silo, le cisaillement dans une configuration de COUETTE ou encore la stabilité d'un tas posé sur un plan incliné ou contenu dans un tambour rotatif (voir figure 1.30).

Ceux-ci ont mis en évidence l'existence sous certaines conditions d'un blocage ou, faute de terme français strictement équivalent, « *jamming* », empêchant l'écoulement et s'opposant au cisaillement du milieu, c'est-à-dire en d'autres termes : solidifiant ce dernier [132].

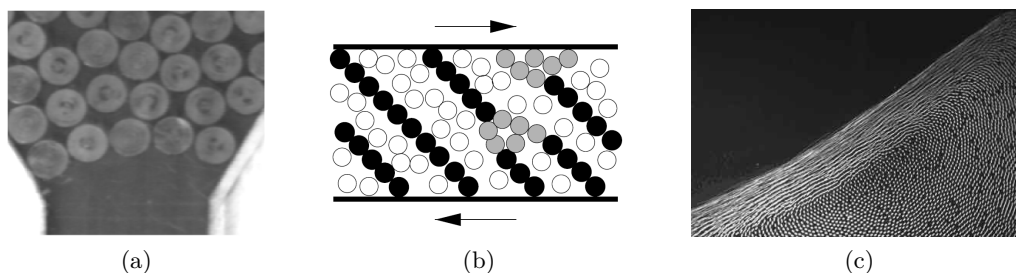


Figure 1.30 – Exemples de systèmes granulaires bloqués. (a) Silo dont l'écoulement est bloqué par une arche de grains. Tiré de [133]. (b) Suspension colloïdale sous cisaillement. En foncé figurent les particules transmettant la force qui s'oppose à l'écoulement (dont, en noir, les chaînes de force dans la direction de contrainte principale). Tiré de [134]. (c) Billes d'acier dans un tambour rotatif montrant un écoulement de surface lors d'une avalanche [135].

La densité de grains ou plutôt, pour se placer dans un cadre plus général, leur fraction volumique  $\phi$  – rapport du volume occupé par les grains sur le volume accessible – est un paramètre important dans ces phénomènes de *jamming*. Lorsque  $\phi$  croît, les grains ont de plus en plus de contacts avec leurs voisins, occasionnant l'apparition de chaînes de forces [134,136] qui entraînent le blocage à partir d'une valeur  $\phi_c$ .

Ces phénomènes de blocage d'un milieu censé « couler » rappellent les états vitreux abordés plus haut, avec une analogie entre la fraction volumique  $\phi$  et la masse volumique  $\rho$ . Cependant, ils sont sans lien avec une quelconque variation de température. En effet, à part dans les suspensions colloïdales où elle ajoute aux particules un mouvement brownien, elle a dans ces expériences un effet parfaitement négligeable, l'agitation thermique se faisant sur des tailles bien plus petites que le diamètre typique d'un grain.

Néanmoins, il est possible de faire disparaître le blocage dans le système, par exemple pour les cas précédemment évoqués : en tapant les côtés du silo ou en le faisant vibrer dans une direction transversale [137], en cisillant dans une autre direction le milieu granulaire en configuration de COUETTE, ou encore en faisant pencher le plan incliné sous le tas de grains ou tourner le tambour [138], et déclencher ainsi des avalanches en surface.

Dans ces différents systèmes granulaires, le blocage apparaît grâce à l'application d'une contrainte. Il s'agit du cisaillement dans la configuration de COUETTE, et de la gravité dans le silo ou le tas de grains, mais on peut aussi penser à la pression atmosphérique dans le cas d'une mousse (dont les grains sont les bulles). La théorie prédit que, pour des particules indéformables, le milieu peut supporter indéfiniment cette contrainte, tant que sa direction reste la même (voir figure 1.31a). En effet, le milieu s'est adapté lui-même afin de pouvoir supporter celle-ci.

En revanche, toute application d'une contrainte *incompatible*, c'est-à-dire le long d'une autre direction, entraîne la disparition du blocage – on parle de système *fragile* [134]. En réalité, les grains sont au minimum légèrement déformables (voire plus dans le cas d'une mousse), ce qui induit une tolérance sur cette direction d'application (voir figure 1.31a). En dehors de cet

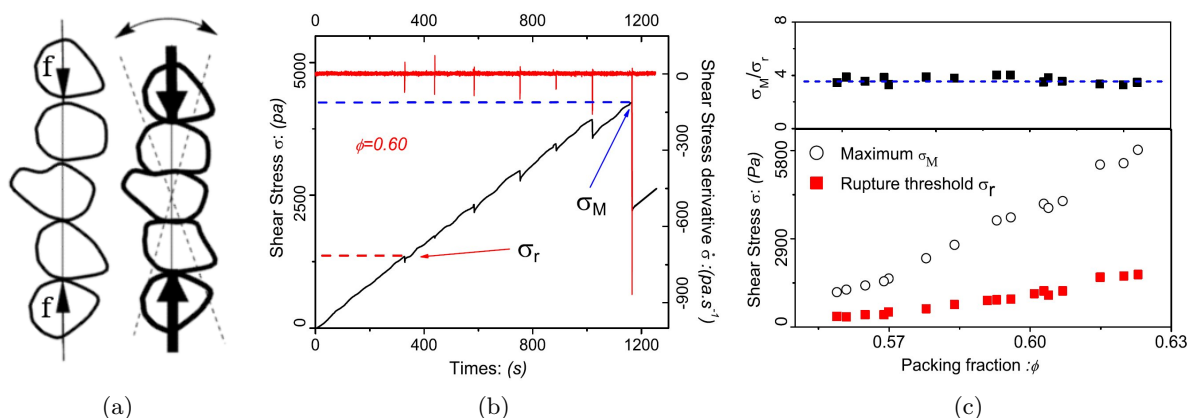


Figure 1.31 – Effet d'une contrainte sur un milieu granulaire. (a) Une chaîne de force de grains indéformables (à gauche) peut supporter de manière statique une compression longitudinale. Une déformabilité finie (à droite) permet de supporter également de faibles contraintes transversales, tant que la direction de la résultante est contenue dans le cône de tolérance. Adapté de [134]. (b) Effet du cisaillement cylindrique d'un milieu de billes de verre. Une rampe de cisaillement  $\sigma$  fait apparaître des réarrangements plastiques brusques et réguliers (phénomène de *stick-slip*) à partir de la « contrainte de première rupture »  $\sigma_r$ , limite d'élasticité du système. La contrainte peut ensuite être augmentée jusqu'à une valeur maximale  $\sigma_M$ . (c) Pour le même système, dépendance en fraction volumique  $\phi$  des contraintes  $\sigma_r$  et  $\sigma_M$ . Adapté de [139].

intervalle de directions compatibles, toute application de contrainte provoque l'effondrement de la structure et la sortie de l'état bloqué. Rien n'empêche toutefois, si cette nouvelle contrainte est maintenue, que le système atteigne après réarrangement un nouvel état bloqué adapté à la direction actuelle de la contrainte. Ces sessions de blocage-déblocage peuvent s'enchaîner dans le cas d'une contrainte variable en suivant une dynamique analogue au phénomène de collé-glissé, ou *stick-slip* (voir figure 1.31b) [139,140].

Il a donc été suggéré qu'un rôle analogue à celui de la température dans les transitions vitreuses pouvait être joué dans les milieux granulaires par une contrainte pertinente incompatible  $\sigma$  [141,142] qui, si elle est suffisamment importante, provoque une déformation irréversible du système (voir figure 1.31c). En cela, la contrainte où cette transition s'effectue constitue donc la limite d'élasticité du milieu. Cette limite dépend de la fraction volumique, comme la température de transition vitreuse dépend de la masse volumique.

### Surface de *jamming*

Il a été observé, dans les expériences et simulations mettant en jeu l'une ou l'autre de ces transitions, que les mouvements dans le système deviennent de plus en plus collectifs. Cela se traduit par une augmentation, voire une divergence, des longueurs de corrélation ou des paramètres d'ordre du champ de vitesse. Ceci a été observé tant pour les matériaux vitreux [143,144] que pour les milieux granulaires [145].

Plutôt que s'arrêter à la simple analogie entre contrainte  $\sigma$  et température  $T$  dans ces deux cas très différents, LIU et NAGEL ont proposé [132,136] d'en faire deux axes de contrôle indépendants d'un phénomène de *jamming* généralisé englobant à la fois les solides vitreux et les granulaires bloqués. Le troisième paramètre pertinent, la fraction volumique  $\phi$  (que l'on peut facilement tirer

de la densité  $\rho$  dans le cas des verres), permet de joindre les deux types de graphes précédemment décrits en un espace des phases tridimensionnel d'axes  $\phi^{-1}$ ,  $T$  et  $\sigma$  (voir figure 1.32).

Ce diagramme suggère alors l'existence d'une surface de *jamming* séparant dans cet espace tridimensionnel les états où le milieu « coule », et ceux où il est bloqué. Ces états bloqués sont proches de l'origine, c'est-à-dire denses, à basse température et sous faible contrainte.

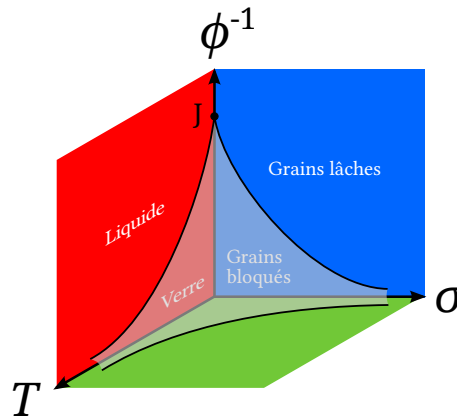


Figure 1.32 – Surface de *jamming* séparant le diagramme de phase  $\phi^{-1}$ - $T$ - $\sigma$  en deux domaines. Les états bloqués se situent du côté de l'origine. La courbe du plan rouge ( $\phi^{-1}, T$ ) correspond à la température de transition vitreuse. Le plan bleu ( $\phi^{-1}, \sigma$ ) rend compte du phénomène de blocage dans les milieux granulaires. Le point J est un point critique traduisant une transition de phase existant pour les cas où  $T = 0$  et  $\sigma = 0$ . Adapté de [132] et [146].

En ce qui concerne les suspensions colloïdales, ce diagramme s'applique déjà de fait, les expériences ayant déjà mis en évidence le fait que le mouvement brownien dû à l'agitation thermique pouvait suffire à rendre l'état bloqué transitoire [147].

Pour autant, dans la plupart des systèmes actifs (voir section 1.2.3), qui sont hors de l'équilibre thermique et dont les particules utilisent une source d'énergie pour convertir cette dernière en mouvement, l'agitation thermique a une influence négligeable. On peut citer par exemple des milieux granulaires secs vibrés macroscopiquement [58], ou encore des assemblées de grains auto-propulsés [68]. Les effets de la température réelle sont ici quasi-nuls face à l'agitation du système due à son activité. Le cadre de réflexion du *jamming* reste cependant utile, en considérant en fait une température effective  $T_{\text{eff}}$ , mesure de cette énergie d'agitation mécanique [148]. Il est également intéressant de noter que les paramètres de contrôle de la transition observée dans le modèle de VICSEK [64] (voir section 1.2.3) trouvent également leur place dans ce cadre (la densité  $\rho$  et l'intensité de bruit  $\eta$  étant ici à rapprocher respectivement de  $\phi$  et  $T$ ).

D'autres phénomènes à relier à la traversée de cette surface ont été mis en évidence, notamment l'apparition de fortes hétérogénéités spatiales (voir figure 1.33). Ces hétérogénéités peuvent être dynamiques avec notamment les particules les plus rapides du système qui se rassemblent en agrégats de plus en plus grands [149,150]. Ces hétérogénéités existent aussi d'un point de vue statique, avec des fluctuations géantes de densité dans le système [68] : la répartition de zones plus et moins denses devient beaucoup plus ségréguée que ce qui est observé dans un système à l'équilibre thermique. Il a également été observé l'apparition d'hétérogénéités temporelles, on a notamment parlé des phénomènes de *stick-slip* [139,140].



De plus, de nombreuses études [68,96,151] ont mis en évidence des effets de confinement local (*caging*) à l'approche de la transition : le mouvement des grains est de plus en plus restreint par la présence de grains voisins. Ce phénomène implique donc de réarranger un nombre de plus en plus grand de grains pour obtenir un mouvement. Les fluctuations d'assez haute énergie pour provoquer un réarrangement collectif devenant de plus en plus rares, cet effet pourrait ainsi être à l'origine du ralentissement et des intermittences observées dans le mouvement.

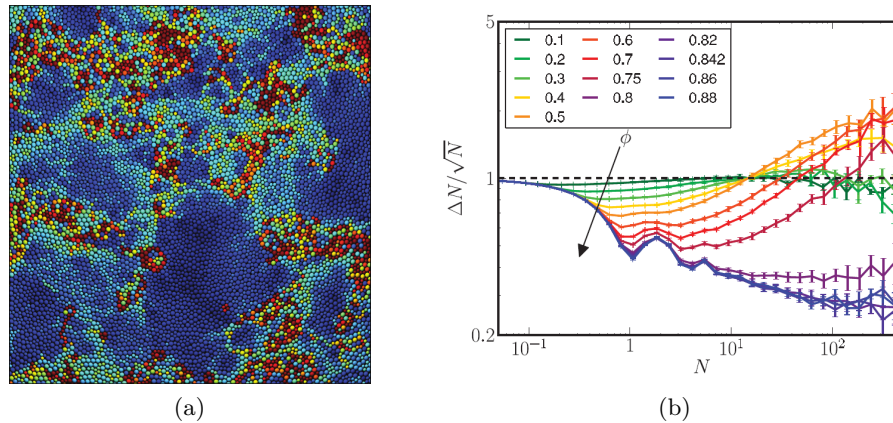


Figure 1.33 – Hétérogénéités à l'approche de la transition. (a) Simulation d'un liquide surfondu montrant l'hétérogénéité des vitesses des particules. En couleurs chaudes figurent les particules les plus rapides, qui se rassemblent sous forme d'agrégats. Tiré de [150]. (b) Un gaz parfait ou un liquide passif à l'équilibre thermique voit l'écart-type  $\Delta N$ , mesure des fluctuations du nombre local de particules, être proportionnel à  $N^{1/2}$  (ligne en pointillés). Au contraire, pour les milieux granulaires actifs, ces fluctuations explosent à l'approche de la transition de *jamming* (lignes rouges). Tiré de [68].

### 1.4.2 Jamming cellulaire

Plus récemment, des études s'intéressant à des populations de cellules évoluant sur un substrat plan ont mis en évidence l'existence de phénomènes usuellement associés à cette transition de *jamming*. Dans la perspective de se placer dans un cadre de réflexion similaire à celui décrit dans la section précédente, elles n'hésitent pas à considérer la densité cellulaire  $\rho_{\text{cell}}$ , concentration surfacique de cellules sur le substrat, comme parfait analogue de la fraction volumique  $\phi$  dans un milieu granulaire (en l'occurrence surfacique pour un système à deux dimensions).

Ainsi, en suivant les mouvements de monocouches de kératocytes de poisson de densités différentes, SZABÓ *et al.* [67] ont permis de mettre en évidence le fait que plus la densité des cellules est importante, plus leurs vitesses sont alignées (voir figure 1.34a). Ils ont quantifié cette observation à l'aide d'un paramètre d'ordre  $V$  des orientations de vitesse, défini de manière analogue à celui du modèle de VICSEK [64] déjà introduit dans la section 1.2.3. Plus précisément, en notant  $N$  le nombre total de particules et  $\vec{v}_i(t)$  la vitesse de la cellule  $i$  à l'instant  $t$  (le paramètre étant moyenné sur le temps d'observation) :

$$V = \left\langle \frac{1}{N} \left\| \sum_{i=1}^N \frac{\vec{v}_i(t)}{\|\vec{v}_i(t)\|} \right\| \right\rangle_t$$

Ce paramètre augmente avec la densité de cellules en présentant une croissance abrupte au niveau d'une valeur de densité relativement bien définie ( $5 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ ), comme illustré figure 1.34b. C'est dans le but de modéliser cette transition vers l'ordre qu'a ensuite été introduit dans cette même étude le modèle implicite lui aussi abordé dans la section 1.2.3 et qui possède une transition de phase.

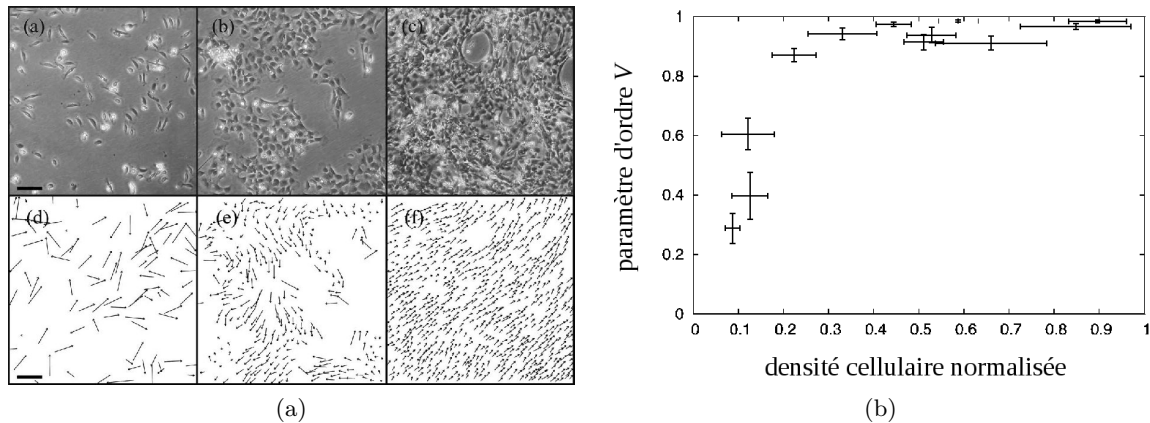


Figure 1.34 – Alignement des vitesses dans une monocouche de kératocytes. Adapté de [67]. (a) Images de monocouches à différentes densités (en haut) et vitesses correspondantes pour les cellules (en bas). Les densités cellulaires valent, de gauche à droite,  $1,8 \times 10^4$ ,  $5,3 \times 10^4$  et  $14,7 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ . Barre d'échelle :  $200 \mu\text{m}$ , échelle des vitesses :  $50 \mu\text{m}/\text{min}$ . (b) Dépendance en densité cellulaire (normalisée par la valeur maximale observée :  $2,5 \times 10^5 \text{ cm}^{-2}$ ) du paramètre d'ordre  $V$  d'alignement des vitesses.

Dans une autre étude, ANGELINI *et al.* [152] se sont intéressés à l'évolution de monocouches de cellules MDCK déposées sur un gel souple de polyacrylamide fonctionnalisé avec du collagène et qui transmet une partie des contraintes exercées par les cellules (voir figure 1.35a). Ils quantifient au fur et à mesure de la densification du tissu la vitesse des mouvements et l'évolution des hétérogénéités dynamiques (voir figure 1.35b).

En calculant le champ de vitesse dans le tissu par la technique de PIV (voir section 2.4), ils ont identifié à chaque pas de temps les 20% de vecteurs possédant la norme la plus importante (voir figure 1.35a). Ils ont ensuite évalué à différents temps une taille caractéristique  $\xi_h$  des hétérogénéités dynamiques sous la forme de l'aire moyenne des agrégats contigus formés par ces vecteurs. Cette taille augmente avec la densité cellulaire, puis sature et décroît à nouveau pour des valeurs au-delà de  $2,8 \times 10^5 \text{ cm}^{-2}$ , comme illustré figure 1.35b. L'augmentation des hétérogénéités dynamiques avec la densité, qui s'accompagne d'un ralentissement du système, rappelle fortement les relaxations d'un fluide en surfusion à l'approche de la transition vitreuse, et semble donc adaptée à une description dans le cadre de réflexion du *jamming*.

Le travail de NNETU *et al.* [153] a lui utilisé des monocouches de cellules MCF10A, MCF-7 ou encore NIH/3T3 mises en vis-à-vis et séparées par une bande de surface libre (expériences du type de celles décrites dans la section 1.2.2). Ils avancent l'argument du *jamming* comme raison à l'établissement d'un front de migration collective dans les populations de cellules cohésives, qui a pour conséquence l'absence de mélange entre deux tissus épithéliaux une fois qu'ils sont au contact. Cet argument est invoqué en raison du gradient de vitesse existant dans le tissu : les cellules près du front migrent rapidement alors que celles au cœur du tissu sont beaucoup plus

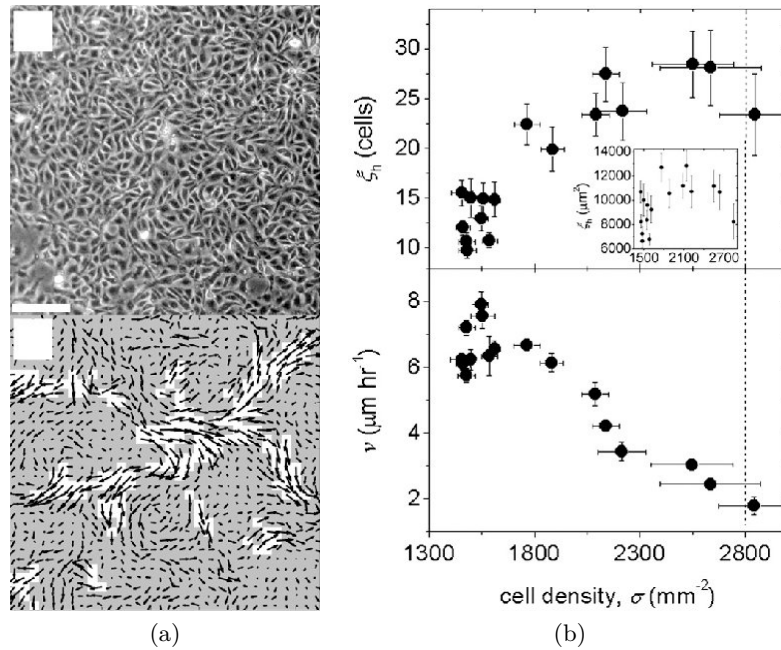


Figure 1.35 – Hétérogénéités dynamiques dans un tissu de cellules MDCK. Adapté de [152]. (a) Image de la monocouche de cellules (en haut) et champ de vitesse correspondant (en bas). Les 20% de vecteurs les plus rapides figurent sur fond blanc. L'aire moyenne  $\xi_h$  des agrégats contigus de ces vecteurs permet de définir une taille caractéristique d'hétérogénéités dynamiques. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$ . (b) Évolution de la surface  $\xi_h$  (en nombre de cellules et en  $\mu\text{m}^2$ ) et la moyenne  $v$  du module de vitesse en fonction de la densité cellulaire.

lentes (voir figure 1.36a). Ce gradient est interprété par les auteurs comme une hétérogénéité spatiale caractéristique des phénomènes de *jamming*.

Ils ont par ailleurs remarqué que lors de la migration même, les vitesses dans le tissu sont de plus en plus ordonnées au cours du temps, ce qui se traduit par une augmentation de leur longueur d'autocorrélation (calculée le long de la direction de migration, pour la composante transverse à celle-ci), fait illustré sur la figure 1.36b. La distribution de vitesses dans le tissu gagne également en hétérogénéité au cours du temps, cette hétérogénéité étant plus importante si le tissu est moins dense (voir les deux monocouches de la figure 1.36a, celle de gauche étant moins dense que celle de droite). Ces observations ont à nouveau été interprétées comme des indices de la présence de phénomènes de *jamming* dans le tissu. Ainsi, la division cellulaire et la migration du front ont été ici vues comme deux phénomènes antagonistes, l'un provoquant un blocage du tissu via l'augmentation de la densité, et le second permettant au contraire de cisailer la monocouche en la débloquent. Les auteurs ont cependant estimé que ces contraintes de cisaillement présentes au niveau du front sont transmises au reste des cellules de proche en proche pour amener à une migration collective et en retour bloquer à nouveau le système.

Le diagramme présenté figure 1.32 avait déjà été adapté au cas particulier de particules attractives [154] ou encore à des systèmes qui vieillissent [155]. Les populations de cellules présentant des phénomènes qui évoquent le *jamming*, une nouvelle version hypothétique a été formulée par SADATI *et al.* [156] pour ces systèmes. Ils ont illustré ce diagramme de *jamming* cellulaire, décrit plus bas, à l'aide du travail expérimental disponible dans [157]. Dans cette étude, TAMBE *et al.* ont mesuré les déformations du substrat par des monocouches en migration, afin

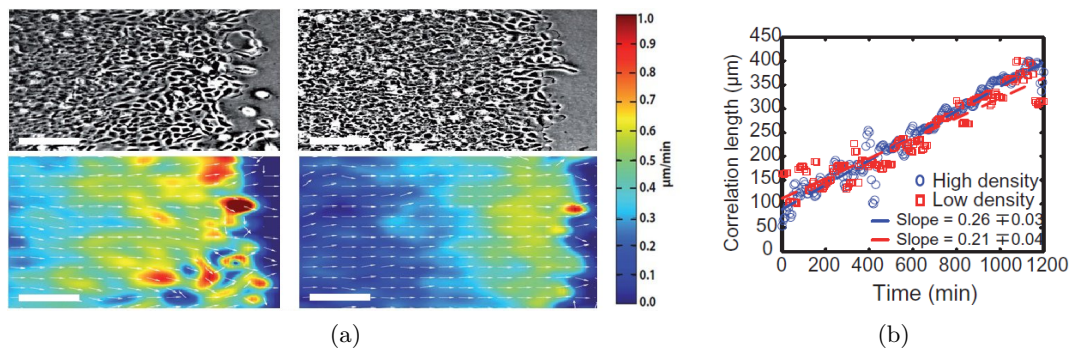


Figure 1.36 – Phénomènes de *jamming* dans des tissus MCF10A en migration. Adapté de [153]. (a) Image en contraste de phase (en haut) et champ de vitesse (en bas) de deux monocouches de MCF10A à deux densités différentes (plus basse à gauche qu'à droite), à l'instant  $t = 955$  min. Le champ de vitesse, initialement désordonné, est maintenant fortement polarisé. On observe un gradient de vitesse entre le front de migration et le cœur du tissu. Barres d'échelle :  $100 \mu\text{m}$ . (b) Évolution de la longueur de corrélation en vitesse au cours de la migration.

de remonter au champ de contrainte dans le tissu. Ils ont observé que celui-ci est très hétérogène alors que le tissu ne montre pas de fluctuations évidentes de structure. Un calcul du champ de vitesse dans la monocouche a montré que les cellules alignent localement leur mouvement sur la direction de contrainte principale maximale (voir figure 1.37a).

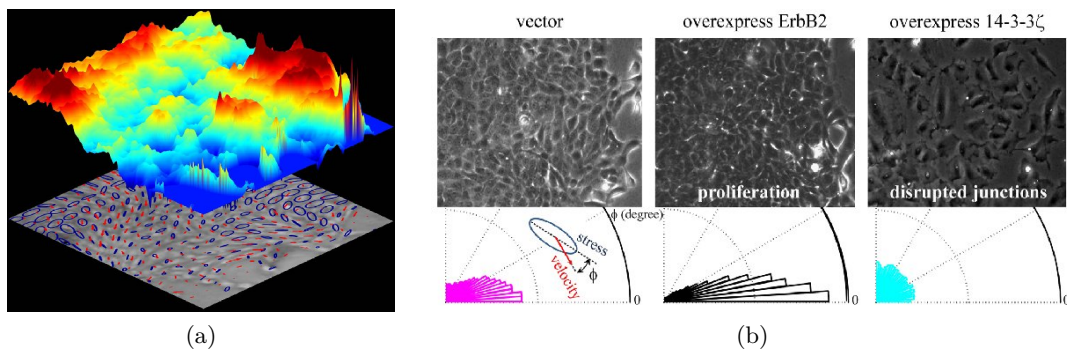


Figure 1.37 – Champ de contraintes et alignement des vitesses. Adapté de [157] et [156]. (a) Monocouche de cellules RPME en migration. Le relief en couleur représente le champ de contrainte normale moyenne de tension. Les flèches rouges sont les vitesses dans le tissu, les ellipses bleues représentent l'anisotropie des tenseurs de contrainte, leurs axes étant les directions principales de ceux-ci. (b) Images en contraste de phase et représentation de la distribution de l'angle entre la vitesse et la direction de contrainte principale maximale dans les différents tissus de MCF10A : *Vector*, *ErbB2* et *14-3-3 $\zeta$* .

Parmi les différents types de cellules étudiées, ils se sont notamment intéressés à trois lignées dérivées de cellules MCF10A, lignées non cancéreuses de cellules mammaires humaines : une lignée contrôle *Vector*, une lignée surexprimant l'oncogène *ErbB2* qui lui confère une prolifération accrue, et enfin une lignée surexprimant l'oncogène *14-3-3 $\zeta$*  qui entraîne un défaut d'expression des protéines de jonctions cellule-cellule. Ils ont observé que ces oncogènes vont respectivement

favoriser et faire disparaître l'alignement des vitesses sur la direction de contrainte principale maximale (voir figure 1.37b).

Dans [156], SADATI *et al.* ont donc proposé un diagramme de *jamming* cellulaire en complétant l'analogie entre densité et fraction volumique à l'aide de deux autres axes : l'inverse de l'adhésion cellule-cellule en guise de contrainte  $\sigma$  et la motilité des cellules comme équivalent à la température d'agitation  $T$  (voir figure 1.38). Ils ont illustré ce diagramme à l'aide des trois lignées de MCF10A utilisées dans [157], en les positionnant en dessous, sur ou au-dessus de la surface de *jamming* d'après les observations expérimentales. Ce positionnement est expliqué plus en détail dans la figure 1.38.

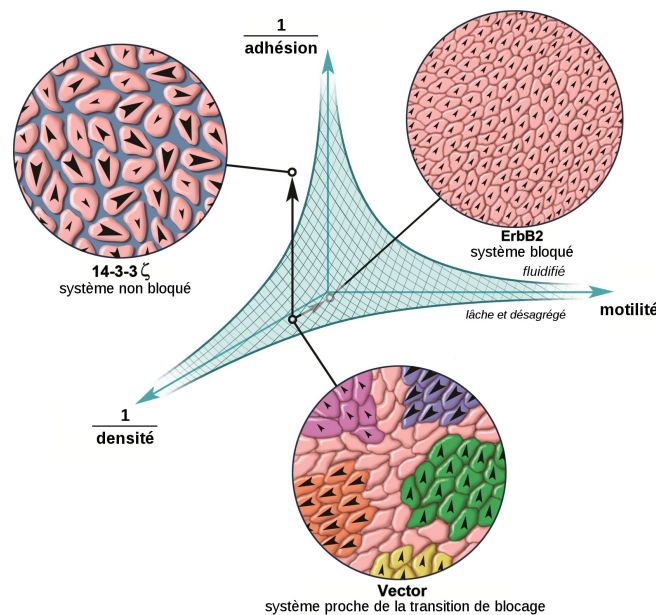
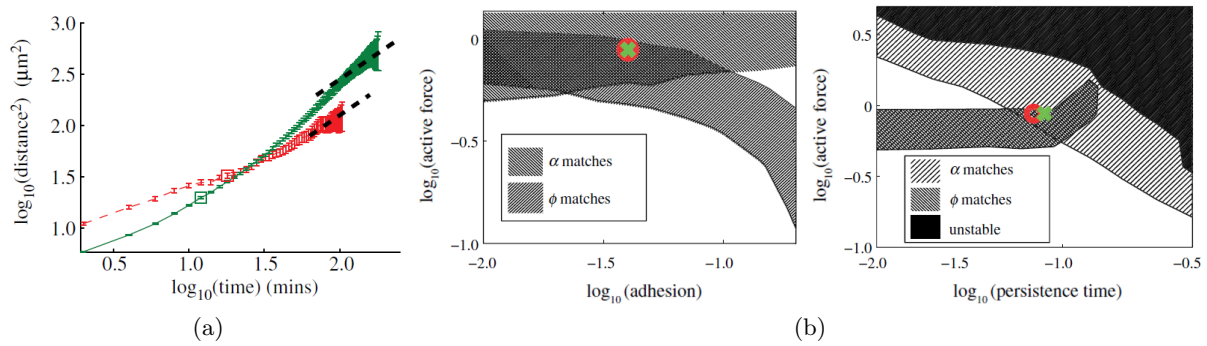


Figure 1.38 – Surface de *jamming* proposée pour les systèmes cellulaires. Les trois dimensions considérées sont l'inverse de la densité cellulaire, l'inverse de l'adhésion cellule-cellule et la motilité, et trois exemples de cas sont positionnés sur le diagramme pour des cellules MCF10A [157]. Les flèches représentent les vitesses et directions de déplacement des cellules. Les cellules *Vector*, lignée contrôle contenant un vecteur vide, sont proches de la transition de *jamming* et comportent des agrégats de cellules se déplaçant collectivement (domaines de couleur). Les cellules surexprimant l'oncogène *ErbB2* ont une prolifération accrue, et sont donc bloquées par leur forte densité. Les cellules surexprimant l'oncogène *14-3-3ζ* sont fluidifiées par l'absence de jonctions avec leurs voisines. Adapté de [156].

Cependant, les auteurs ont suggéré l'existence d'autres axes possibles et potentiellement nécessaires à une description correcte des systèmes : une contrainte externe de cisaillement ou d'étirement du substrat, le volume cellulaire ou encore la raideur de la cellule comme celle du substrat.

En outre, il convient de garder à l'esprit que les analogies utilisées sont loin d'être parfaites. Notamment, l'équivalence entre fraction volumique  $\phi$  et densité cellulaire  $\rho_{\text{cell}}$  ne va pas de soi. On pourrait en effet arguer que la quantité  $\phi$  est directement applicable à des populations de cellules : il s'agit de la fraction de substrat couverte par des cellules, ce qui implique notamment que  $\phi = 1$  pour un tissu à confluence, et ce quelle que soit sa densité. Ce problème d'universalité de ce paramètre  $\phi$  a par ailleurs déjà été soulevé dans le cas de colloïdes mous [158].

Sans se départir du cadre de réflexion relatif au *jamming*, certaines études ont d'ailleurs fait le choix d'explorer d'autres paramètres de contrôle que la densité. Ainsi, dans [159], SCHÖTZ *et al.* ont étudié la dynamique des cellules dans des tissus embryonnaires (tridimensionnels, une fois n'est pas coutume) de poisson-zèbres. En suivant les trajectoires des particules dans le tissu, les auteurs ont pu calculer le déplacement carré moyen (MSD) de celles-ci. Les courbes obtenues pour cette mesure témoignent d'un régime diffusif à longue échelle de temps, mais sous-diffusif aux échelles plus courtes, ce qui correspond respectivement à des lois d'échelle d'exposant égal et inférieur à 1 pour les MSD en fonction du temps (voir figure 1.39a). Ils ont interprété ce fait comme étant dû à un phénomène de confinement local (*caging*) se rapprochant de celui observé lors de la transition de *jamming*. Ces mesures ont permis d'obtenir, outre l'exposant  $\alpha$  de la loi d'échelle évoquée précédemment, une échelle de temps de sortie de cage pour les cellules, qui correspond à la transition entre les deux régimes de mouvement.



**Figure 1.39** – Modélisation de la dynamique des tissus embryonnaires de poisson-zèbre. Figures adaptées de [159]. (a) Mesure du déplacement carré moyen pour des cellules de l'ectoderme (en rouge) et du mésendoderme (en vert). Les lignes pointillées figurent la pente  $\alpha = 1$ , et les points encadrés sont les échelles de temps de sortie de cage pour les deux types de tissus. (b) Diagrammes de phase obtenus en faisant varier les trois paramètres du modèle et montrant les zones où l'exposant  $\alpha$  et la fraction volumique  $\phi$  correspondent aux mesures expérimentales. Les points représentés par un cercle rouge et une croix verte figurent la position du meilleur ajustement (avec correspondance du temps de sortie de cage  $t_c$ ) pour respectivement le tissu ectodermique et mésendodermique. La zone où le système est bloqué se situe en bas à gauche de ces points sur le deuxième diagramme.

Les auteurs ont ensuite conçu un modèle minimal pour simuler ce système par une assemblée de particules dont les équations de mouvement possèdent trois paramètres ajustables : la norme de la force individuelle (de direction aléatoire) qu'elles développent pour se mouvoir, le temps de persistance de cette force et enfin l'adhésion entre cellules. Ils ont ajusté ces trois paramètres (voir figure 1.39b) afin d'obtenir des valeurs compatibles avec les expériences pour trois observables que sont l'exposant  $\alpha$  pour les trajectoires, la fraction volumique  $\phi$  du tissu (inférieure à 1 en raison de la présence de vides entre les cellules) et le temps de sortie de cage  $t_c$ . Les valeurs retenues pour le meilleur ajustement ont ensuite été expérimentalement testées par des expériences de rhéologie consistant en la mesure du temps de relaxation d'agrégats réels et simulés lorsqu'on les écrase entre deux plaques, ce qui a permis de valider ce modèle. Bien que les paramètres ajustés situent le système dans une phase fluide, les auteurs observent la proximité dans leur modèle d'une transition de *jamming* qui pourrait être atteinte pour des réductions de seulement 20% de la norme ou de la persistance des forces motiles cellulaires. Ils en concluent

que le caractère viscoélastique observé dans leurs tissus pourrait être contrôlé par la présence de cette transition proche.

Dans [160], BI *et al.* se sont intéressés au fait que certains tissus cellulaires à prolifération nulle (ou très lente) montraient une dynamique vitreuse, mais aussi au fait que des tissus très similaires (par exemple les tissus de l'ectoderme et du mésendoderme de l'embryon de poisson-zèbre) pouvaient exhiber des temps de relaxation significativement différents à la même densité. Les auteurs ont cherché à clarifier l'importance de la densité en simulant le tissu avec un modèle *vertex* bidimensionnel (voir section 1.2.3). En prenant en compte les contributions de chaque *vertex* d'une cellule  $i$ , ils ont proposé une expression pour l'énergie mécanique de celle-ci, dans le cas où toutes les cellules sont identiques :

$$E_i = \beta(A_i - A_0)^2 + \xi P_i^2 + \gamma P_i$$

où le premier terme rend compte de l'incompressibilité de la cellule et de la résistance de la monocouche aux variations de hauteur sous forme d'une élasticité  $\beta$  et d'une valeur préférée  $A_0$  pour l'aire  $A_i$  de la cellule. Le deuxième terme modélise la contractilité du cortex d'acto-myosine avec une élasticité  $\xi$  et le troisième la tension interfaciale  $\gamma$  réglée par la compétition entre la tension corticale et l'énergie d'adhésion entre cellules. Ces deux derniers termes sont fonction de  $P_i$ , le périmètre de la cellule  $i$ .

En considérant que seule la force dérivée de cette énergie avait une réalité physique, ils ont décalé son origine pour y faire apparaître un périmètre préféré  $P_0 = -\gamma/(2\xi)$  et avoir  $E_i = \beta(A_i - A_0)^2 + \xi(P_i - P_0)^2$ .

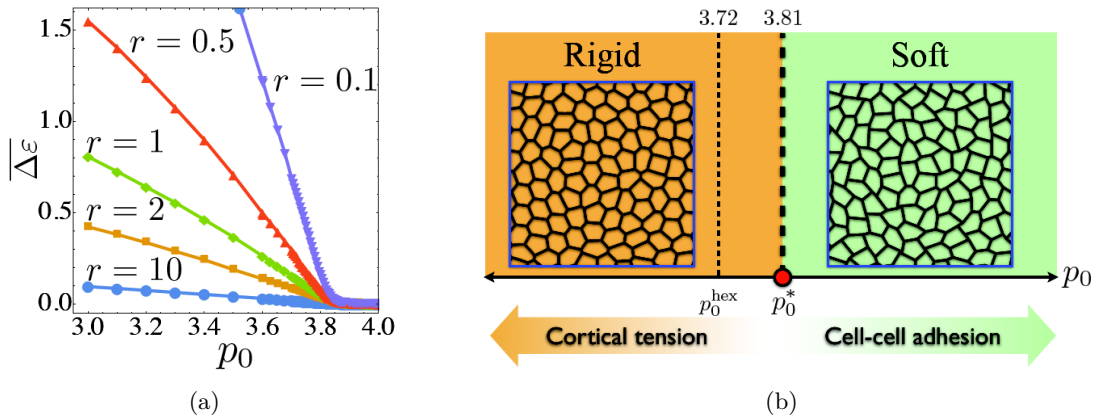


Figure 1.40 – Transition de *jamming* dans le modèle des sommets. Figures adaptées de [160]. (a) Valeur moyenne  $\overline{\Delta\varepsilon}$  de la barrière d'énergie à dépasser pour réaliser un réarrangement élémentaire (transition T1) dans le tissu, pour différentes valeurs de  $r = \beta A_0/\xi$  et  $p_0 = P_0/\sqrt{A_0}$ . Un changement de régime s'opère pour  $p_0 = p_0^* = 3,813$ . (b) Diagramme de phase du système en fonction de  $p_0$ . Pour des valeurs en-dessous de  $p_0^*$ , on a un système rigide bloqué, alors que le système est mou pour des valeurs supérieures à  $p_0^*$ . À titre informatif, le diagramme indique également la valeur  $p_0^{\text{hex}}$  en dessous de laquelle l'état fondamental du tissu est un pavage hexagonal régulier.

Les auteurs ont ensuite calculé à partir de cette énergie la valeur moyenne (adimensionnée)  $\overline{\Delta\varepsilon}$  des barrières d'énergie s'opposant à un échange de voisins dans le tissu, pour plusieurs valeurs du rapport  $r = \beta A_0/\xi$ , qui dépend des deux coefficients d'élasticité, et du facteur de

forme  $p_0 = P_0/\sqrt{A_0}$ , défini comme le nombre sans dimension reliant le périmètre et l'aire préférés (voir figure 1.40a). Ces analyses ont fait apparaître une valeur critique  $p_0^* = 3,813$  de ce paramètre au-dessus de laquelle ces barrières d'énergie disparaissent. Les auteurs ont ensuite mis en évidence l'existence de lois unifiées fonction de  $(p_0 - p_0^*)$  pour cette hauteur de barrière et pour le module de cisaillement  $G_{xy}$  du système. Plus précisément, moyennant le choix d'un ansatz approprié, ces grandeurs peuvent être décrites par deux branches de courbe qui correspondent à un domaine mou et un domaine rigide séparés par  $p_0^*$ . Ces deux quantités  $\overline{\Delta\varepsilon}$  et  $G_{xy}$  suivent des lois d'échelles distinctes en  $(p_0 - p_0^*)$  et  $r$  loin de la transition sur chaque branche, mais sont uniquement fonction de  $r$  lorsqu'on se rapproche de  $p_0^*$ .

Les auteurs ont tiré une analogie entre le point  $J$  de transition du diagramme de *jamming* (voir figure 1.32) et ce point  $p_0^*$  position d'une transition entre un système mou relativement fluide et un système rigide bloqué, comme illustré figure 1.40b. Cependant, à la différence du point  $J$  qui met en jeu une transition contrôlée par la fraction volumique  $\phi$ , celle présentée dans leur étude se fait à densité fixe et est contrôlée par ce facteur de forme préféré  $p_0$  dont la valeur est une conséquence de l'adhésion cellule-cellule (prévue dans le diagramme de la figure 1.38) mais aussi de la tension corticale des cellules.

La transition de *jamming* est donc toujours à manier avec précaution dans le cas de populations cellulaires, ses paramètres de contrôle n'étant pas établis de manière univoque. Pour autant, elle semble être un cadre de pensée prometteur pour la description de ce type de systèmes.





## Chapitre 2

# Matériels et méthodes

### Sommaire

---

<b>2.1</b>	<b>Biologie cellulaire</b>	<b>58</b>
2.1.1	Lignées cellulaires	58
2.1.2	Conditions de culture	59
<b>2.2</b>	<b>Dispositifs expérimentaux</b>	<b>60</b>
2.2.1	Imagerie sur cellules vivantes	60
2.2.2	Imagerie sur cellules fixées	61
<b>2.3</b>	<b>Analyse d'images</b>	<b>63</b>
2.3.1	Techniques de seuillage	63
2.3.2	Filtre à entropie	64
2.3.3	Morphologie mathématique	65
<b>2.4</b>	<b>Vélocimétrie par image de particules (PIV)</b>	<b>67</b>
2.4.1	Principe de la PIV	68
2.4.2	Implémentation de l'algorithme	68
2.4.3	Filtrage des champs de vitesse	70
2.4.4	Application au système de cellules HBEC	71

---

Dans ce chapitre second, le lecteur trouvera une description du matériel employé lors de ce travail de thèse, ainsi que des techniques et méthodes mises en jeu, pour les expériences comme pour l'analyse de données. Nous donnerons tout d'abord le détail des lignées cellulaires auxquelles nous nous sommes intéressés ainsi que leurs conditions de culture. Puis, nous listerons les différents dispositifs expérimentaux utilisés pour obtenir nos données. Enfin, nous développerons les principales méthodes d'analyse des images obtenues, en détaillant particulièrement la technique de vélocimétrie par images de particules qui fera l'objet d'une section à part.

## 2.1 Biologie cellulaire

Cette section détaillera la nature de nos objets d'étude, à savoir les cellules, ainsi que leurs conditions de culture.

### 2.1.1 Lignées cellulaires

Différentes lignées cellulaires ont été utilisées durant ce travail de thèse, pour la plupart issues d'une collaboration avec l'équipe de Jacques CAMONIS, *Analyse des Réseaux de Transduction*, au sein du laboratoire Génétique et Biologie des Cancers (U830 INSERM/Institut Curie). Les constructions fluorescentes GFP et mCherry sont le fruit du travail de Lynda LATRÈCHE.

#### Lignée HBEC

La plupart des expériences sur le gel des mouvements cellulaires décrites dans le chapitre 3 ont été menées sur des cellules épithéliales de la lignée stable HBEC (*Human Bronchial Epithelial Cells*), dérivée de cellules primaires issues de poumons sains. Plus précisément, nous avons utilisé des clones de la lignée HBEC3 immortalisée par le laboratoire de John MINNA [161] au moyen d'une transfection des gènes *Cdk4* et *hTERT*<sup>1</sup>. Ces deux gènes mutés ont été associés à des gènes de résistance à un antibiotique : la généticine (G418) pour *Cdk4* et la puromycine pour *hTERT*. Ces antibiotiques de sélection permettent de ne faire survivre que les cellules comportant les mutations d'intérêt, et donc résistantes aux antibiotiques associés. Ils sont à la fois utiles pour sélectionner les cellules dans lesquelles la transfection a réussi, mais également pour s'assurer du maintien des gènes mutés dans les populations de cellules des générations suivantes.

#### Lignées HEK-HT

Les expériences de compétition pour l'espace décrites dans le chapitre 4 ont elles été conduites sur des lignées de cellules embryonnaires de rein humain HEK (*Human Embryonic Kidney cells*), immortalisées par le laboratoire de Robert A. WEINBERG [162], par transfection des gènes *hTERT* et *large-T*<sup>2</sup>, pour donner la lignée HEK-HT. Ces deux mutations ont été respectivement associées à une résistance à l'hygromycine et à la généticine (G418). Voici les clones utilisés au cours de ce travail :

---

1. Chaque division cellulaire est associée au raccourcissement des télomères, régions non codantes situées au bout de l'ADN des chromosomes. Lorsque les télomères sont trop courts, la cellule entre en sénescence et ne peut plus se diviser. La présence du gène *hTERT* promeut la production de la télomérase, une enzyme permettant de conserver la longueur des télomères et donc de favoriser l'immortalisation des cellules, qui peuvent ainsi se reproduire indéfiniment sans pour autant avoir été directement transformées par un agent oncogène.

2. L'expression de ce gène, à l'origine associée à une infection par le virus simien 40 (SV40), entraîne la production de l'antigène *large T* (TAG). Cette protéine vient notamment inactiver la transcription du gène *p53*, suppresseur de tumeurs, ce qui entraîne une prolifération non régulée des cellules.

- **HEK-HT GFP** : Une variante de la lignée de type sauvage, transduite pour exprimer la protéine fluorescente GFP.
- **HEK-HT Ras<sup>V12</sup> mCherry** : Une lignée transformée portant la mutation *Ras<sup>V12</sup>* (voir section 1.3.2), ou plus précisément *H-RAS<sup>G12V</sup>* [162]. Cette mutation a été associée à une résistance à la puromycine. Cette lignée a également été transduite pour exprimer la protéine fluorescente mCherry.

### Autres lignées

Enfin, d'autres lignées ont été utilisées ponctuellement lors de cette thèse :

- **MDCK** : Les cellules de la lignée *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) immortalisée constituent un prototype des cellules épithéliales (haute cohésion, polarité apico-basale marquée) qui a beaucoup été étudié par l'équipe. Il a notamment servi ici de contrôle pour les expériences d'immunofluorescence.
- **NIH/3T3** : Il s'agit d'une lignée fibroblastique de référence obtenue à partir de cellules de souris (*NIH Swiss Mice*). Cette lignée a été utilisée pour quelques tests dans l'étude du gel des mouvements cellulaires.

### 2.1.2 Conditions de culture

Toutes les lignées ont été maintenues, y compris pendant les expériences, à 37 °C sous une atmosphère contrôlée : 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'humidité relative.

L'entretien des cellules en culture s'est en majeure partie résumée à les « passer ». Cette action consiste, lorsque les cellules occupent la totalité de la surface de culture de la flasque, à les décoller du substrat à l'aide de trypsine<sup>3</sup> et à en prélever un pourcentage mineur pour les déposer dans la nouvelle flasque. Les cellules s'attachent alors à la nouvelle surface de culture, se meuvent et se divisent jusqu'au prochain passage. Les cellules qui n'ont pas été déposées dans la nouvelle flasque peuvent alors être utilisées pour des expériences.

La répétition de ces passages introduit à terme une dérive génétique dans la population de cellules (certains caractères sont peu à peu sélectionnés par ces étapes successives de prélèvement et amplification). Afin de limiter les effets de ce processus, les cellules ont systématiquement cessé d'être utilisées vers une trentaine de passages, et de nouvelles cultures ont été démarrées à partir de la décongélation d'échantillons « jeunes » stockés au préalable dans de l'azote liquide ou dans un congélateur à -80 °C.

Pour la plupart des expériences de microscopie, les cellules ont été déposées sur des plaques à 6 ou 12 puits de culture, à fond de verre (In Vitro Scientific, Sunnyvale, Californie, États-Unis d'Amérique) ou à fond de polystyrène traité pour la culture cellulaire (TPP, Trasadingen, Suisse). Pour les expériences d'immunofluorescence, les cellules ont été déposées sur des lamelles de verre déposées au fond des puits de plaques de culture.

Les conditions de culture spécifiques à chaque lignée, ainsi que le détail des protocoles de culture cellulaire utilisés dans ce travail de thèse sont donnés dans l'annexe B.

---

3. La trypsine est une enzyme digestive servant ici à casser les protéines de jonction et d'adhésion des cellules.

## 2.2 Dispositifs expérimentaux

Le lecteur trouvera ici un descriptif des dispositifs utilisés pour conduire les expériences de ce travail de thèse.

### 2.2.1 Imagerie sur cellules vivantes

#### Vidéomicroscopie

Les films obtenus pour les expériences au long cours (plusieurs jours) l'ont été grâce à deux vidéomicroscopes équipés de caissons (Life Imaging Services, Bâle, Suisse) permettant une régulation de la température à 37 °C et de l'atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'humidité relative au-dessus du milieu.

La microscopie en contraste de phase exploite le fait que la lumière voit sa phase changer à la traversée d'un échantillon : les surfaces les plus verticales apparaissent claires alors que les surfaces dans le plan horizontal restent foncées. La microscopie à épifluorescence utilise, comme son nom l'indique, les propriétés fluorescentes de molécules d'intérêt dans l'échantillon. Un jeu de filtres permet de sélectionner la longueur d'onde d'excitation et de ne récupérer sur la caméra que la gamme de longueur d'ondes de la lumière émise. L'objectif utilisé pour mettre au point l'image fluorescente sur le détecteur est le même que celui qui sert à exciter l'échantillon (la séparation des faisceaux se faisant au moyen d'un miroir dichroïque).

Ces deux microscopes sont en outre motorisés, ce qui permet un contrôle de la position de l'échantillon dans le plan horizontal et de sa mise au point. Ce contrôle est effectué durant les expériences par le logiciel MetaMorph (Molecular Devices, Sunnyvale, Californie, États-Unis d'Amérique).

Pour ces deux microscopes, les durées d'exposition typique pour les expériences présentées ici sont de l'ordre de 50 ms pour le contraste de phase, de 150–200 ms pour l'imagerie de GFP, de 300–400 ms pour l'imagerie de mCherry, et 100–300 ms pour l'imagerie de Hoechst. Pour toutes les longueurs d'onde, le gain fixe est pris égal à 0,5×.

Les images sont prises avec des objectifs de grossissement 10×, qui donnent avec les caméras utilisées des champs de vision dont les côtés ont une taille de l'ordre de 1 mm.

Pour les expériences de compétition, les images nécessitant plusieurs champs de vision sont reconstituées à l'aide d'une macro utilisant le module *Stitching 2D/3D* [163] de Fiji (voir section 2.3 et annexe D.1).

#### Expériences de migration antagoniste

Les expériences de cette thèse concernant des monocouches en compétition (voir chapitre 4) ont nécessité d'avoir des conditions géométriques bien définies et reproductibles à l'état initial. Il a été possible de tirer parti de l'expertise de l'équipe dans des dispositifs adaptés à cette contrainte, dérivés de pochoirs en polydiméthylsiloxane (PDMS), très pratiques car permettant d'obtenir une géométrie sur mesure des tissus. Ils ont notamment été très utilisés pour définir les conditions initiales d'expériences de migration ou de cicatrisation [20,21,49,50].

Dans un esprit similaire, il a été fait le choix de recourir à des chambres de culture cellulaire en silicone commerciales (Ibidi Culture-Insert, Ibidi, Planegg, Allemagne). Ces chambres sont constituées de deux puits séparés par une barrière (voir figure 2.1). Cette dernière est dimensionnée afin de permettre d'ensemencer des populations différentes sans mélange ni soulèvement de la barrière. Ces chambres permettent de disposer, après leur retrait, de deux populations à

confluence en vis-à-vis séparées par une largeur de 400  $\mu\text{m}$  de substrat libre. Il est ensuite possible d'observer la migration des deux tissus sur cette surface et leur évolution après le contact.

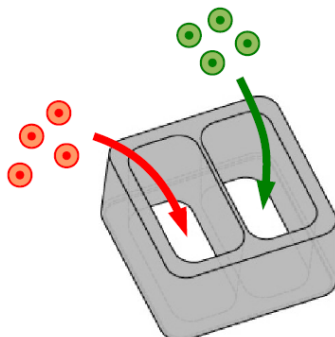


Figure 2.1 – Schéma des chambres utilisées pour les expériences de compétition. Le dispositif total a des dimensions extérieures de 9 mm  $\times$  9 mm, et chaque puits offre 0,22 cm<sup>2</sup> de surface de culture.

## 2.2.2 Imagerie sur cellules fixées

### Immunofluorescence

En plus des expériences de suivi temporel de nos populations, nous avons également mené des expériences de marquages fluorescents de nos populations de cellules HBEC afin de localiser et de contrôler le niveau d'expression de protéines d'intérêt. Ces expériences, à la différence de celles de vidéomicroscopie, sont destructives.

Les échantillons utilisés sont des lames de verre ensemencées de la même manière que les puits de culture utilisés en vidéomicroscopie. Ces échantillons sont ensuite fixés à différents instants choisis à l'aide de paraformaldéhyde. Toutes les réactions biochimiques ayant été arrêtées net, on marque ensuite les protéines telles qu'elles se présentaient au moment de la fixation.

Le détail du protocole utilisé pour ces expériences d'immunofluorescence est disponible dans l'annexe B.5.

Dans cette étude, plusieurs marquages immunofluorescents ou menés à l'aide de l'utilisation de toxines ont été réalisés afin d'étudier l'évolution des jonctions cellule-cellule et des adhésions cellule-substrat dans les monocouches de HBEC (voir section 3.3.3) :

- La E-cadhérine a été marquée directement au moyen d'un anticorps anti-E-cadhérine produit dans le lapin et conjugué au fluorophore Alexa Fluor 488 (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, États-Unis d'Amérique) à dilution 1:800 pendant 1 h.
- La vinculine a été marquée indirectement, en utilisant un anticorps primaire anti-vinculine produit dans la souris (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis d'Amérique) à dilution 1:400 pendant 1 h ; puis un anticorps secondaire immunoglobuline de type G (IgG) anti-souris conjugué au fluorophore Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, États-Unis d'Amérique) à dilution 1:500 pendant 1 h.
- Les filaments d'actine ont été marqués avec de la phalloïdine conjuguée au marqueur Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) à dilution 1:1000, pendant la seconde étape du marquage de la vinculine.

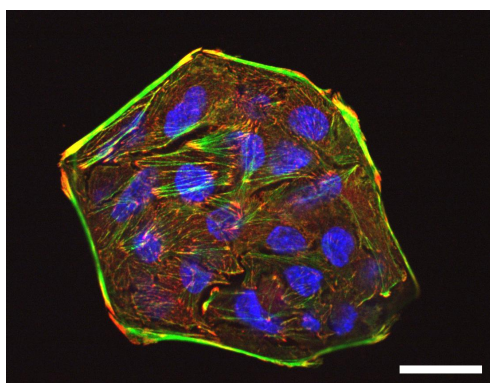


Figure 2.2 – Image de contrôle obtenue sur un îlot de cellules MDCK pour un marquage de la vinculine (en rouge), des filaments d'actine (en vert) et des noyaux (en bleu). Barre d'échelle : 20  $\mu\text{m}$ .

### Marquage des noyaux

Pour obtenir un marquage spécifique des noyaux, on utilise préférentiellement des agents fluorescents d'intercalation dans l'ADN (communément appelés « intercalants »). Ces molécules, comme leur nom l'indique, ont pour spécificité de pouvoir venir s'intercaler entre deux paires de bases dans l'ADN. Étant fluorescentes, elles permettent ensuite de visualiser la localisation du noyau.

Les noyaux des cellules fixées ont été imagés à l'aide de DAPI, molécule pouvant se lier fortement aux bases adénine (A) et thymine (T) de l'ADN, et présente dans le milieu de montage utilisé dans les expériences d'immunofluorescence.

Ponctuellement, ce marquage a également été effectué avant fixation, à l'aide du colorant Hoechst 33342, utilisé dans sa formulation NucBlue Live ReadyProbes Reagent (Molecular Probes). Quelques gouttes de cette solution ajoutées dans le milieu permettent de marquer, après incubation pendant 20 minutes, le noyau de cellules encore vivantes. Cet intercalant, très toxique pour les cellules, permet de les observer pendant quelques heures. Ces noyaux sont imagés à l'aide des microscopes également utilisés pour la vidéomicroscopie.

### Imagerie

Les expériences d'immunofluorescence ont été imagées avec un microscope confocal, pour obtenir des piles de tranches optiques fines et ainsi reconstruire une image tridimensionnelle du signal d'immunofluorescence. Nous avons utilisé un tel microscope droit avec un objectif de grossissement 63 $\times$  à immersion dans l'huile. Ce microscope fait partie de la *Plate-forme Imagerie Cellulaire et Tissulaire* (PICT-IBiSA) de l'Institut Curie.

Un microscope de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF) a été utilisé pour imager des vinculines, protéines localisées sur un plan très proche de la surface. Nous avons utilisé un microscope TIRF inversé muni d'un objectif 100 $\times$  à immersion dans l'huile. Ce microscope est disponible au sein de la plate-forme *Nikon Imaging Center* de l'Institut Curie.

Ces deux microscopes sont également contrôlés en position et en mise au point à l'aide du logiciel MetaMorph.

## 2.3 Analyse d'images

Les images obtenues grâce à ces différentes techniques de microscopie sont très nombreuses. En guise d'exemple, une expérience typique utilisée dans le chapitre 3 de cette étude a une durée de l'ordre de 80 heures, avec un intervalle entre images d'une durée  $\Delta t = 5$  min, ce qui donne un millier d'images par position imagée. En outre, sur chacune de ces images figurent plusieurs milliers de cellules. Il est donc impensable d'analyser manuellement chaque image d'un film, ou de s'intéresser individuellement à chaque cellule d'une image. L'automatisation – ne serait-ce que partielle – de ces traitements se révèle donc indispensable.

Pour ce travail de thèse, l'essentiel des analyses de données ont été conduites à l'aide du logiciel Fiji [164,165], une distribution orientée vers les sciences du vivant du logiciel libre ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, États-Unis d'Amérique) ainsi que du logiciel MATLAB dans sa version 7.12.0 (R2011a, The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, États-Unis d'Amérique).

Certains des codes écrits pour ces analyses sont disponibles à la fin de cette étude, respectivement dans l'annexe C pour les fonctions MATLAB et dans l'annexe D pour les macros ImageJ.

Concernant les différentes quantités calculées et sauf mention contraire explicite, les barres d'erreur présentes sur les figures et les fourchettes données pour les valeurs numériques obtenues sont dans l'intégralité de cette thèse l'écart type estimé de la distribution de valeurs.

### 2.3.1 Techniques de seuillage

Il a souvent fallu lors de cette thèse convertir des images, initialement en niveaux de gris, en cartes binaires n'autorisant que le 0 ou le 1. Cette opération de binarisation, ou seuillage, est plus complexe qu'il n'y paraît, puisqu'elle impose de trouver le seuil adéquat qui séparera de manière pertinente le domaine des objets de celui du fond. En fonction de la nature de l'image de départ, le choix de la méthode utilisée sera crucial dans l'obtention d'une segmentation ayant du sens.

Si des techniques simples existent (prendre comme seuil le niveau de gris moyen de l'image, ou encore le niveau médian), elles sont parfois peu convaincantes. Il arrive qu'un bon seuillage nécessite des méthodes plus élaborées. Fiji propose pour la binarisation le choix de nombreuses techniques pour un calcul systématique du seuil, dont une a donné de bons résultats pour les images en fluorescence des expériences de migration antagoniste du chapitre 4. Il s'agit de la méthode de LI [166,167], qui utilise l'entropie croisée entre l'image d'origine et l'image binarisée pour sélectionner le seuil qui la minimise, seuil qui sera appliqué pour la binarisation de l'image.

Une autre technique fournie par Fiji a été utilisée pour binariser des images de noyaux en fluorescence (voir section 3.1). Ces images pêchant par une illumination non homogène, il a fallu utiliser la fonction de seuillage automatique local du logiciel, un seuil global ne pouvant être satisfaisant pour la totalité de l'image. Celle-ci définit pour chaque pixel un voisinage de taille choisie (dans notre cas de rayon entre 15 et 30 pixels, soit entre 11 et 22  $\mu\text{m}$ ) et calcule sur ce dernier un seuil auquel elle compare le niveau de gris du pixel. Cette fonction a été utilisée avec la méthode MidGrey, qui prend comme valeur de seuil la moyenne du maximum et du minimum de la distribution locale de niveaux de gris. Les images sont ensuite traitées (voir section 2.3.3) afin de séparer les éventuels noyaux trop proches.



### 2.3.2 Filtre à entropie

Nous avons également eu besoin de séparer, sur les images en contraste de phase des expériences de migration antagoniste du chapitre 4, la zone contenant des cellules de la zone où la surface est libre, afin de ne calculer les champs de vitesse qu’aux endroits où cela est pertinent.

On a vu que le moyen le plus simple pour segmenter une image en deux domaines était la définition d’un seuil, très efficace pour les signaux de fluorescence, mais cette technique possède ses limites pour les images prises en contraste de phase. Au mieux, une simple binarisation, même locale, peut sélectionner les bords lumineux des cellules, mais ne saura faire la différence entre le centre ou encore les protrusions plus sombres de la cellule, et l’espace inoccupé (voir figure 2.3).

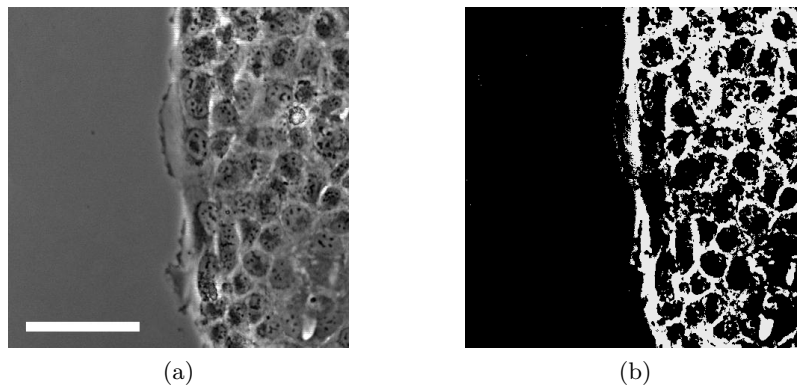


Figure 2.3 – Effet d’un seuillage simple. (a) Image en contraste de phase du bord d’une population de cellules HEK-HT WT. Barre d’échelle : 100  $\mu\text{m}$ . (b) Image binaire obtenue à l’aide d’un seuillage simple respectant le critère de mise à 0 de la zone exempte de cellules.

On souhaite ici séparer deux textures, une qui possède beaucoup de contraste (les cellules) et une très uniforme (la surface libre). La solution nous est donnée par l’utilisation d’un *filtre à entropie*, c’est-à-dire un opérateur  $E$  qui va remplacer la valeur de chaque pixel  $i$  de l’image  $I$  par une entropie locale  $s_i$  : celle de la portion d’image  $v_i$  qui constitue le voisinage du pixel  $i$ . Cette entropie est calculée par analogie avec l’entropie de GIBBS [168] et SHANNON [169], comme suit :

$$s_i = S(v_i) = - \sum_g p_g(v_i) \log_2 p_g(v_i)$$

La portion d’image étant parfaitement connue,  $p_g(v_i)$  n’est ici plus une probabilité mais la fréquence du niveau de gris  $g$  dans le voisinage  $v_i$ .

L’image filtrée sera sombre (basse  $s_i$ ) là où le niveau de gris de l’image initiale est sensiblement uniforme, ou tout du moins varie lentement vis-à-vis des coordonnées spatiales, par exemple au niveau du substrat libre. *A contrario*, l’image filtrée sera claire (haute  $s_i$ ) aux endroits comportant des niveaux de gris contrastés et proches spatialement, par exemple les cellules. Un exemple de ce calcul d’entropie est présenté figure 2.4a.

Cette technique permet de repérer efficacement une différence de texture dans l’image, qu’il s’agisse comme dans notre cas de segmenter deux textures différentes (voir figures 2.4b et 2.4c), ou de mettre en évidence la frontière entre deux surfaces de niveau de gris différent. Le calcul se faisant sur la fréquence des niveaux de gris, il n’est pas affecté par la multiplication ou le

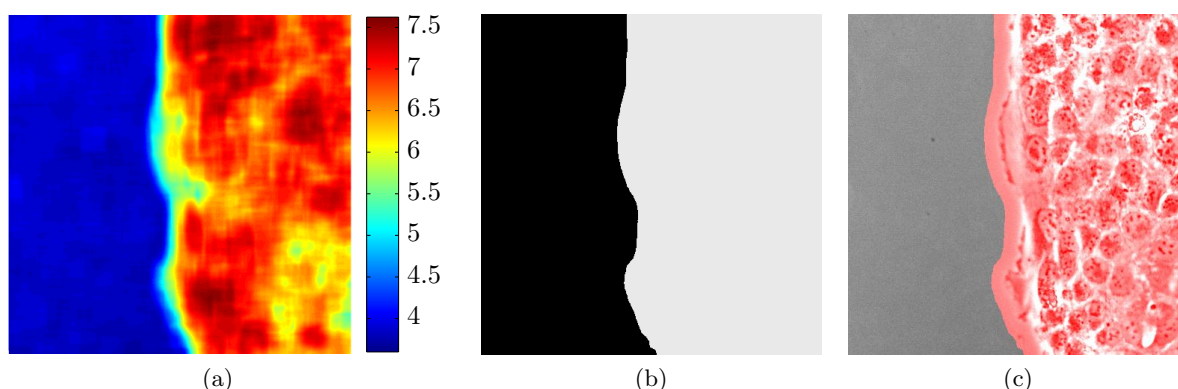


Figure 2.4 – Utilisation du filtre à entropie. (a) Carte d'entropie locale  $E(I)$  obtenue pour l'image  $I$  présentée figure 2.3a en utilisant un voisinage carré de côté  $21\ \mu\text{m}$ . (b) Image binaire obtenue en seuillant cette carte d'entropie avec un seuil égal à 4,1. (c) Superposition de l'image binaire obtenue et de l'image de départ. Le seuil peut si besoin être ajusté ou l'image binaire retravaillée à l'aide d'outils de morphologie mathématique afin d'épouser de plus ou moins près les contours du tissu.

décalage des niveaux de gris eux-mêmes, ce qui le rend relativement indépendant des conditions globales d'illumination.

On a utilisé ce filtre sur nos expériences de migration antagoniste pour éliminer la surface libre de nos calculs de champs de vitesse. Ce masque est calculé grâce à la fonction `entropyfilt` de MATLAB à chaque pas de temps avec un voisinage carré de côté  $21\ \mu\text{m}$  (de l'ordre d'une taille cellulaire) et un seuil à 30% de l'entropie maximale. Il est ensuite élargi d'une taille de voisinage, et « nettoyé » pour remplir les trous plus petits qu'une douzaine de voisinages, souvent des faux négatifs où des cellules très étalées sont repérées comme de la surface libre. Le masque est ensuite vérifié à la main en le comparant à l'image en contraste de phase pour éliminer les éventuels artefacts.

### 2.3.3 Morphologie mathématique

La morphologie mathématique est un ensemble de techniques ayant été développées dans les années 1960 par Jean SERRA et Georges MATHERON [170,171]. Ces outils, très généraux, se révèlent très utiles pour le traitement d'images. Nous n'entrerons pas ici dans le détail des opérations de base mais nous nous restreindrons à celles qui nous ont été utiles ici.

Ces techniques ont été utilisées dans ce travail de thèse afin de segmenter des images de noyaux fluorescents pour des cellules en monocouche (voir section 3.1). Lorsque la densité est élevée, il arrive que certains noyaux proches soient repérés comme un unique objet lors de la binarisation de l'image (voir figure 2.5).

#### Transformée de distance

La *transformée de distance* (*distance transform*), ou *carte des distances*, d'une image binaire est une représentation (voir figure 2.6b) remplaçant chaque pixel des objets de l'image (qui a initialement une valeur 1) par la distance la plus courte qui le sépare d'un pixel de l'arrière-plan (pixel de valeur 0). La valeur des pixels du fond reste inchangée (puisqu'ils sont à une distance nulle d'eux-mêmes).

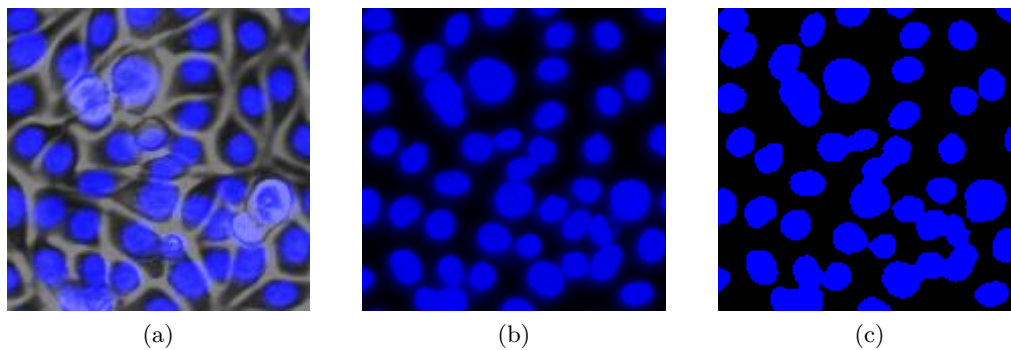


Figure 2.5 – Seuillage imparfait du signal de fluorescence des noyaux. (a) Détail de taille  $111\ \mu\text{m} \times 111\ \mu\text{m}$  d’une monocouche de cellules HBEC, montrant une superposition des signaux en contraste de phase et de fluorescence des noyaux (Hoechst). (b) Uniquement le signal de fluorescence. (c) Résultat du seuillage sur lequel certains noyaux ne sont pas séparés.

Cette transformée dépend bien sûr de la métrique considérée, et donc de la définition utilisée pour la fonction distance. Nous avons exclusivement utilisé ici la distance euclidienne.

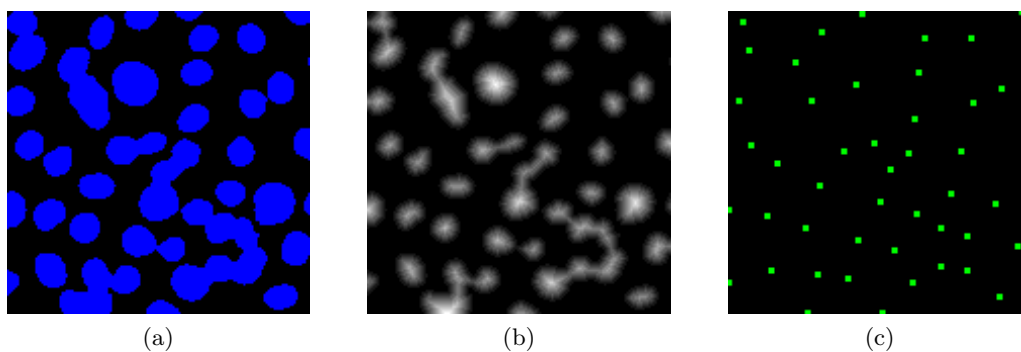


Figure 2.6 – Identification des noyaux par transformée de distance. (a) Image binaire à segmenter (reprise de la figure 2.5c). (b) Transformée de distance de l’image binaire. (c) Position des maxima locaux de la transformée de distance.

Sur nos images, les noyaux sont connectés par un col plus fin que les noyaux eux-mêmes. Après avoir nettoyé l’image binaire obtenue (et enlevé les quelques déchets fluorescents à l’image), on calcule la transformée de distance de celle-ci pour identifier chaque noyau par un point où elle est localement maximale (voir figure 2.6c).

### Segmentation par ligne de partage des eaux

Chaque noyau étant identifié, il reste à séparer ceux qui sont en contact. L’algorithme de segmentation par *ligne de partage des eaux*, ou *watershed* en anglais, permet la détection des lignes de crête du relief constitué par une image en niveau de gris, et ce même si elles ne sont pas toutes à la même hauteur.

L’idée est la suivante : on repère tous les minima locaux de l’image, c’est-à-dire tous les creux du relief (voir figure 2.7a). Chacun de ces points va servir de vanne et déverser de l’eau dans le bassin environnant. Au fur et à mesure de la montée du niveau de l’eau, celui-ci va

atteindre tour à tour les différentes crêtes. Ces endroits, où deux bassins différents se rejoignent (voir figure 2.7b), sont les lignes de partage des eaux – en référence aux lignes géographiques de séparation entre bassins hydrographiques. On continue ensuite à faire monter l'eau, en considérant les lignes de partage comme des barrages entre les bassins qu'elles délimitent, empêchant donc les bassins de se rejoindre. L'algorithme s'arrête lorsque l'altitude maximum du relief est atteinte.

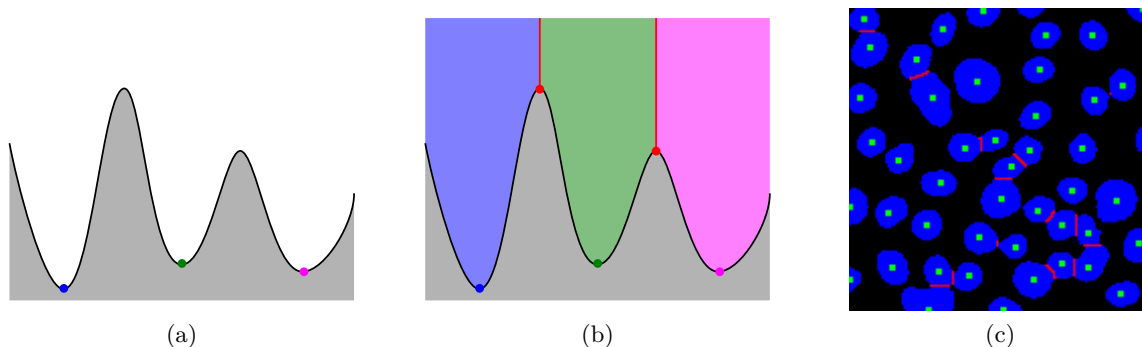


Figure 2.7 – Segmentation par ligne de partage des eaux. (a) Relief où l'on a repéré les minima locaux par des points de couleur. (b) Le remplissage des bassins à partir des minima locaux permet de déterminer les points qui définissent les lignes de partage des eaux (en rouge), où des bassins de couleurs différentes entrent en contact. (c) Segmentation de l'image binaire de la figure 2.5c à l'aide de la transformée de distance et de l'algorithme. En vert figurent les maxima de la transformée, et en rouge les lignes de partage des eaux.

En prenant le relief opposé à la transformée de distance calculée précédemment, on peut appliquer cet algorithme de segmentation. On obtient un bassin par noyau, et une ligne les séparant, au niveau du col. Ce principe, utilisé sur l'image de la figure 2.5c, nous donne le résultat représenté figure 2.7c.

Cet algorithme de segmentation a été employé dans cette thèse à l'aide de la fonction `Process/Binary/Watershed` de Fiji. Nous avons ainsi pu obtenir une segmentation correcte de nos images en fluorescence des noyaux de cellules, et ainsi déterminer leur nombre et leur position pour caractériser la structure de notre système.

## 2.4 Vélométrie par image de particules (PIV)

On l'a dit, les cellules sont très nombreuses sur nos images, et nécessitent d'être marquées si l'on désire suivre aisément leurs trajectoires individuelles dans une population dense. Un bémol s'oppose cependant à cette technique : si l'on souhaite suivre le mouvement de la totalité des cellules à l'écran, il faut logiquement toutes les marquer. Cela implique un certain nombre de problèmes sur la détection (deux cellules voisines vues comme une seule sur l'image en fluorescence), et une plus grande probabilité d'erreur dans l'automatisation du suivi des trajectoires (changement impromptu de cellule dans le suivi). Un suivi manuel de ces trajectoires n'est pas non plus raisonnable, en raison de la quantité de cellules à l'écran.

Il est pourtant possible de connaître la vitesse de nos cellules en tout point de l'image en changeant de cadre de pensée : il faut s'affranchir du point de vue lagrangien (suivi de chaque cellule individuellement) pour adopter le point de vue eulérien et calculer la vitesse de la population en des points fixes de l'image.

Ceci nous est permis par la technique de *vélocimétrie par image de particules* (PIV, pour *Particle Image Velocimetry*). Cette méthode est d'un intérêt tout particulier car elle peut être directement appliquée aux images en contraste de phase – ce qui permet de ne pas avoir à marquer les cellules – sans nécessité de détecter les cellules individuelles, nous affranchissant ainsi de problèmes non triviaux de traitement d'images. Elle a été mise à profit pour analyser les expériences des deux parties de ce travail de thèse, respectivement abordées dans les chapitres 3 et 4.

### 2.4.1 Principe de la PIV

Cette méthode a initialement été développée afin de pouvoir déterminer le champ de vitesse en tout point de l'écoulement hydrodynamique d'un fluide dans lequel on a ajouté des traceurs, c'est-à-dire de petites particules en suspension [172].

Son principe de fonctionnement, résumé figure 2.8, est le suivant :

- On commence par découper le champ visuel imagé par une caméra en une grille de sous-fenêtres, dont les centres vont constituer nos points de mesure du champ de vitesse.
- Pour chaque sous-fenêtre  $i$ , on va comparer deux vues successives, prises respectivement au temps  $t$  et au temps  $t + \delta t$ . Cette comparaison se fait en calculant la corrélation croisée entre ces deux images<sup>4</sup>.
- On repère le pic présent dans ce plan de corrélation<sup>5</sup>. Le vecteur allant de l'origine du plan de corrélation à la position du pic nous donne le déplacement  $\delta \vec{r}_i(t)$  du fluide au niveau de la sous-fenêtre  $i$  entre  $t$  et  $t + \delta t$ . Connaissant le temps  $\delta t$  entre deux images, on en tire sa vitesse  $\vec{v}_i(t) = \delta \vec{r}_i(t) / \delta t$ .
- En répétant ce processus sur toutes les sous-fenêtres et à tous les pas du temps du film, on construit le champ de vitesse complet  $\vec{v}(x, y, t)$  dans l'écoulement imagé.

Il est évident que cette méthode appliquée à l'écoulement d'un fluide homogène nécessite l'ajout de marqueurs en suspension suivant son déplacement. Pour autant, elle peut être directement utilisée sur un film de cellules imagées en contraste de phase [173], ces dernières étant porteuses *per se* de détails visuels dus à la présence d'une multitude de constituants (noyau, membrane et organites) en leur sein (voir figure 2.9).

### 2.4.2 Implémentation de l'algorithme

Depuis le doctorat de Laurence PETITJEAN [174], l'équipe a une bonne expérience de la PIV, qui a été utilisée à l'occasion de multiples études [20,27,49,51,63,175,176].

À l'instar des travaux précédents, cet algorithme a ici été utilisé via le module MatPIV pour MATLAB de Johan K. SVEEN, dans sa version 1.6.1 [177,178]. Les fonctions principales de ce module ont été employées, complétées par quelques fonctions empruntées à Maxime DEFORET ou originales.

Le programme final qui a été appliqué à nos images permet de changer un certain nombre de paramètres cruciaux, notamment :

4. En pratique, on inverse au besoin les niveaux de gris des images corrélées afin d'avoir les marqueurs plus clairs que l'arrière-plan, condition nécessaire pour obtenir un pic marqué.

5. La solution la plus simple consiste à localiser le pixel où la corrélation est maximale. Cependant, il est possible d'être plus précis et de s'affranchir de cas problématiques comme un maximum étalé en essayant d'ajuster une gaussienne sur le pic de corrélation. Le centre de celle-ci, pris comme position exacte du pic, nous est alors donné avec une résolution plus petite que le pixel. C'est cette méthode qui a été appliquée dans cette étude.

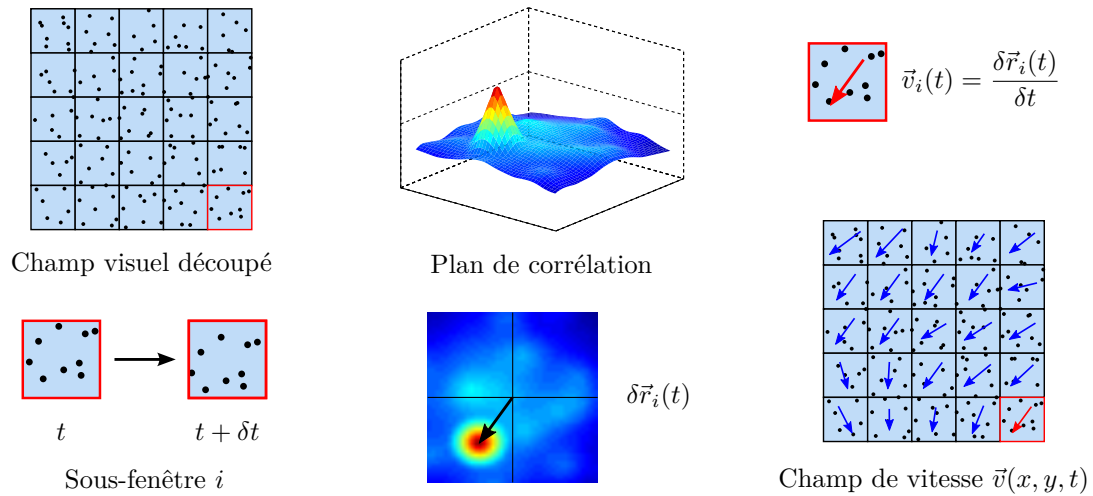


Figure 2.8 – Principe de la PIV : l'image est partagée en sous-fenêtres dont on va calculer la corrélation croisée entre le temps  $t$  et le temps  $t + \delta t$ . La position du pic de corrélation nous donne le déplacement, et donc la vitesse, du fluide au niveau de la sous-fenêtre. Le calcul de ces vecteurs vitesse pour chaque sous-fenêtre à tous les pas de temps permet de reconstituer le champ de vitesse  $\vec{v}(x, y, t)$  sur la totalité du film.

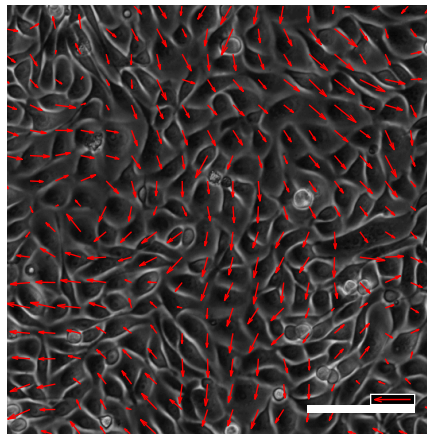


Figure 2.9 – Exemple de champ de vitesse calculé par PIV dans la population de cellules HBEC. Barre d'échelle :  $100 \mu\text{m}$ , échelle des vitesses :  $100 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ .

- la taille de sous-fenêtre en pixels, qui doit ici être une puissance entière de 2, la corrélation croisée étant calculée à l'aide de transformées de FOURIER rapides (FFT) ;
- la superposition entre deux images voisines, permettant d'avoir une grille de mesure plus fine, et donc plus de vecteurs (contenant la même quantité d'information totale, mais utilisée plusieurs fois) ;
- la possibilité de spécifier un masque sur lequel le calcul de vitesse ne se fait pas (par exemple, sur des surfaces ne comportant pas de cellules) ;

— des paramètres de filtrage du champ de vitesse obtenu.

L'adéquation de la fréquence de prise de vue et de la taille de fenêtre avec la vitesse de déplacement des cellules est primordiale ici pour obtenir un champ de vitesse exact. On estime que la taille de fenêtre doit être telle que le déplacement des cellules soit de l'ordre de 30 % de celle-ci entre deux images successives.

Pour les expériences du chapitre 3, des images sont prises à intervalle  $\delta t = 5$  min. Les sous-fenêtres utilisées sont de taille  $47,5 \mu\text{m} \times 47,5 \mu\text{m}$ , avec une superposition de 75 %, c'est-à-dire un vecteur tous les  $11,9 \mu\text{m}$ . Toutes les quantités physiques extraites des champs de vitesse obtenus par PIV ont été lissées en utilisant une moyenne glissante sur une fenêtre de durée 2 h.

Pour les expériences du chapitre 4, l'intervalle entre fenêtres vaut  $\delta t = 15$  min. Les sous-fenêtres utilisées sont de taille  $42,2 \mu\text{m} \times 42,2 \mu\text{m}$ , avec une superposition de 75 %, c'est-à-dire un vecteur tous les  $10,5 \mu\text{m}$ . La moyenne glissante a été faite sur une fenêtre de durée 1 h.

### 2.4.3 Filtrage des champs de vitesse

Plusieurs filtres sont appliqués au champ obtenu par PIV afin d'éliminer tout vecteur aberrant issu d'un calcul non concluant. En effet, dans le cas de sous-fenêtres très mal corrélées<sup>6</sup>, le bruit peut l'emporter sur le signal et la détermination du vecteur déplacement donner un résultat non pertinent et parfois très éloigné de la réalité.

Les filtres appliqués permettent, à partir de certains critères, de supprimer ces vecteurs problématiques puis de les remplacer par des vecteurs interpolés à partir des vecteurs voisins conservés. Le programme utilisé permet de compter la proportion de vecteurs non interpolés sur la totalité, et d'ainsi éviter de reconstruire un champ de vitesse totalement illusoire à partir d'une portion congrue de déplacements réels<sup>7</sup>.

Trois critères de filtrage sont utilisés par MatPIV, avec trois seuils associés. Le premier impose une valeur minimale pour le rapport signal sur bruit. Ce rapport est estimé ici en comparant la valeur moyenne des pixels proches du centre du pic à celle de pixels un peu plus éloignés. Dans le cas de pics de corrélation étalés, comme ici, ce rapport est très bas, mais ce filtre permet néanmoins de supprimer certains vecteurs problématiques. Le deuxième filtre impose un seuil minimal sur la hauteur du pic de corrélation entre les deux sous-fenêtres successives. Enfin, le troisième filtre, qui est global, supprime les vecteurs considérés comme des valeurs anormales (*outliers*) vis-à-vis du reste de la distribution de vitesses. Ces vecteurs sont déterminés en fixant un éloignement maximal des deux composantes du vecteur par rapport aux distributions de celles-ci dans la totalité du champ. Cet éloignement est spécifié sous la forme d'un nombre d'écarts types pour chaque composante. Les valeurs utilisées dans ce travail pour ces trois filtres sont 1,05 pour le seuil de signal sur bruit, 0,3 pour le seuil de hauteur de pic, et 3 écarts types d'éloignement.

6. Ceci peut arriver dans le cas de cellules qui se déforment beaucoup (par exemple lors d'une mitose) ou qu'elles tournent dans la fenêtre, la PIV ne gérant que les mouvements de translation. Une impureté qui se déplace dans le milieu au-dessus des cellules peut également venir fausser les calculs.

7. Bien qu'en toute rigueur, cette proportion ne suffise pas forcément : si une petite partie des vecteurs est supprimée par le filtrage, mais qu'ils sont tous voisins les uns des autres, les vecteurs interpolés au centre n'auront probablement pas de réalité physique. Cette situation est heureusement très rare dans les cas qui nous intéressent ici.

### 2.4.4 Application au système de cellules HBEC

Malgré l'application des filtres précédents, il faut rester prudent en ce qui concerne les résultats obtenus. En effet, l'algorithme de PIV peut être trompeur dans la mesure où il fournit toujours un résultat, mais ne donne des contrôles que très relatifs sur sa validité. Quelle que soit la proportion de vecteurs vitesse considérés corrects après l'application des filtres, une seule vérification permet de s'assurer que les calculs sont exempts d'erreur : il s'agit de la comparaison systématique des champs de vitesse obtenus au déplacement effectif des cellules sur les images du film.

Pratiquement, nos analyses impliquent le suivi de la vitesse quadratique  $v_{\text{rms}}$  dans le tissu et de la longueur d'auto-corrélation en vitesse  $\xi_{vv}$ , mesure du caractère collectif du mouvement. Les cellules HBEC, comme on le verra dans le chapitre suivant, sont très peu cohésives, se meuvent et se déforment très rapidement en comparaison d'autres types cellulaires épithéliaux. Une fréquence de prise de vue mal choisie peut donc conduire à des résultats drastiquement faux si l'on n'est pas précautionneux, comme l'illustre la figure 2.10. En revanche, nous avons pu tester la validité de nos résultats en conduisant nos expériences avec une fréquence de prise de vue encore plus importante qui, si elle peut être impropre à l'analyse de mouvements lents, nous a permis de confirmer que l'allure en cloche obtenue pour nos caractéristiques corrélation-vitesse n'était pas un artefact de calcul (à ce titre, comparer les résultats obtenus pour des périodes de prise de vue  $\delta t = 2$  min et  $\delta t = 4$  min illustrés figure 3.13)

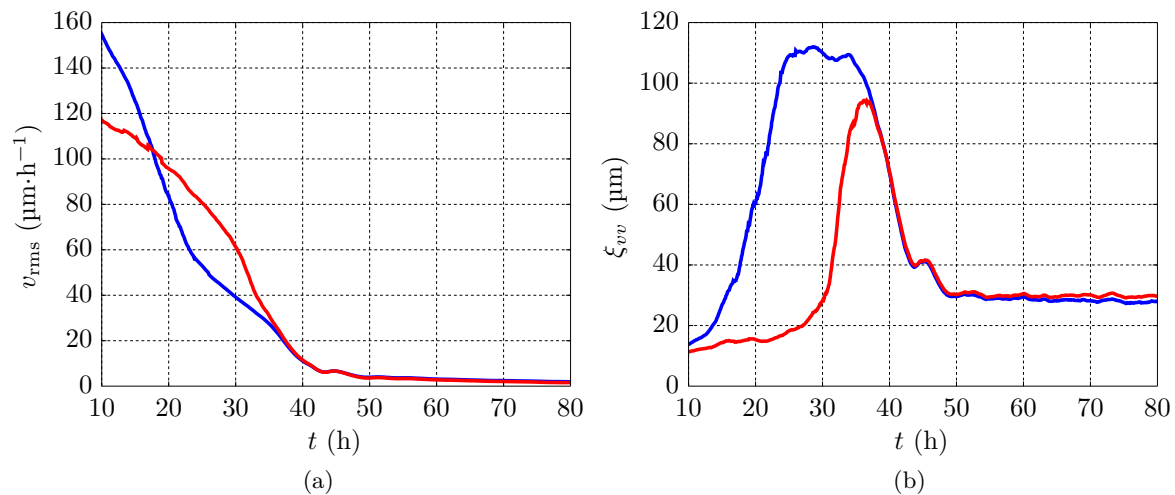


Figure 2.10 – Quantités  $v_{\text{rms}}$  et  $\xi_{vv}$  calculées avec une prise de vue  $\delta t = 5$  min (en bleu) et en simulant une période d'échantillonnage double  $\delta t = 10$  min (en rouge) en corrélant non pas chaque image avec l'image suivante, mais avec celle qui suit cette dernière.

De plus, les cellules HBEC, qui sont très rapides au début de nos films, vont décrire une large gamme de vitesses sur la totalité de l'expérience. Une taille de fenêtre et une fréquence de prise de vue données ne peuvent donc convenir que pour une portion de celle-ci. En effet, on observe lorsque les déplacements sont trop rapides une déformation de la distribution de vitesse dans le champ et l'apparition de pics de fréquence suspects autour de la demi-taille de fenêtre (voir figure 2.11a). Cet artefact est dû à la manière de fonctionner de l'algorithme : la corrélation entre sous-fenêtres successives est calculée jusqu'à un décalage d'une moitié de sous-fenêtre dans les deux directions. Or le bord du plan de corrélation est obtenu avec moins de pixels que son



centre et est donc plus sujet aux fluctuations. Ce fait implique que dans l'absence d'un pic de corrélation bien défini, les fluctuations du bord sont repérées comme tel, ce qui entraîne une sur-représentation factice des déplacements en question lorsque ces vecteurs ne sont pas supprimés par les filtres de l'algorithme.

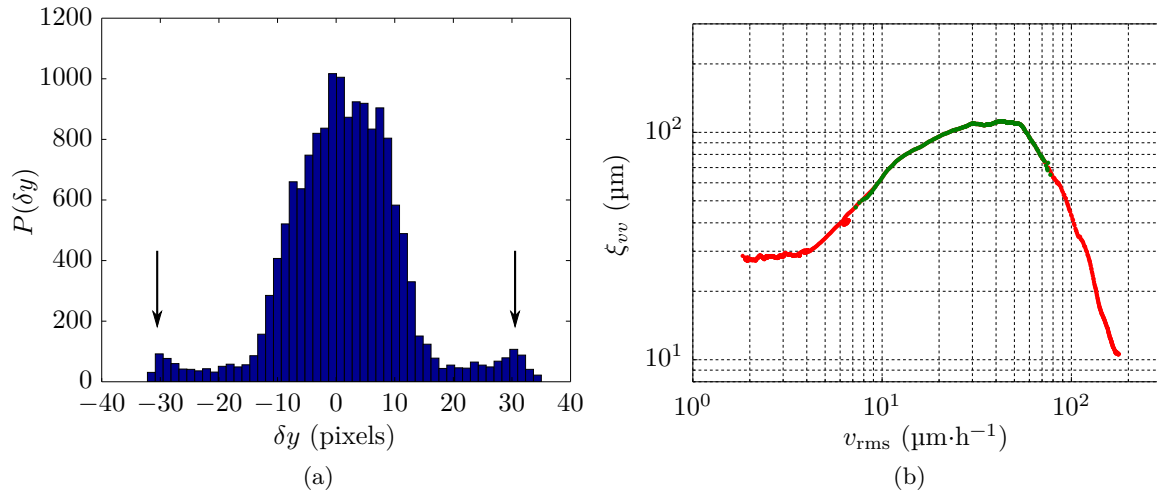


Figure 2.11 – Critère supplémentaire pour les expériences sur les monocouches HBEC. (a) Exemple de distribution d'une composante du champ de déplacement (en nombre d'occurrences), montrant les pics anormaux de fréquence (flèches) autour de 32 pixels, la demi-taille de la sous-fenêtre de corrélation. (b) Application du critère supplémentaire permettant de sélectionner les pas de temps où les champs de vitesse sont corrects (en vert) et d'éliminer ceux où ils sont suspects (en rouge).

L'emploi de programmes de PIV plus élaborés, adaptant par exemple la taille de la sous-fenêtre au cours du temps ou utilisant des fenêtres de taille différente pour les deux images successives corrélées, aurait été possible. Cependant, nous faisons plutôt le choix, pour des raisons de simplicité et de robustesse, de traiter la totalité de notre film avec les mêmes paramètres et de restreindre ensuite notre ensemble de pas de temps à ceux qui sont correctement analysés.

Afin d'éviter les artefacts détaillés plus haut, nous appliquons donc à nos champs un critère supplémentaire. Après le passage des trois filtres précédemment décrits, nous supprimons tous les vecteurs correspondant à un déplacement supérieur à 90 % d'une demi-taille de fenêtre. Cependant, puisque l'observation de notre système sur une très large gamme de vitesse pousse l'algorithme dans ses limites, certains de ces vecteurs proches du bord du plan de corrélation sont calculés légitimement. Nous faisons donc le choix de nous restreindre pour nos analyses aux pas de temps tels que la vitesse quadratique  $v_{\text{rms}}$  et la longueur de corrélation  $\xi_{vv}$  mesurées avec et sans les filtres supplémentaires présentent un écart relatif inférieur à 10 %. Cette tolérance correspond à l'ordre de grandeur du bruit mesuré sur ces quantités avant la moyenne glissante temporelle, et nous assure que les déplacements proches du bord du plan de corrélation n'ont pas une importance majeure dans nos calculs. Nous décidons également de ne pas nous intéresser aux pas de temps où l'on calcule une longueur de corrélation plus petite que la taille de sous-fenêtre.

Ces critères sélectionnent les pas de temps sur lesquels nous menons nos analyses, et excluent de fait ceux où nos calculs sont suspects (voir figure 2.11b).

## Chapitre 3

# Mouvements cellulaires collectifs dans une monocouche

### Sommaire

---

<b>3.1</b>	<b>Structure spatiale</b>	<b>74</b>
<b>3.2</b>	<b>Ralentissement du mouvement et évolution des corrélations</b>	<b>76</b>
3.2.1	Ralentissement du système	76
3.2.2	Longueur de corrélation spatiale	78
3.2.3	Densité cellulaire	79
<b>3.3</b>	<b>Analyse en termes d'agrégats effectifs</b>	<b>81</b>
3.3.1	Modèle analytique	82
3.3.2	Caractéristiques corrélation-vitesse	84
3.3.3	Maturation des jonctions cellulaires	87
3.3.4	Modèle aux liens glissants	89
<b>3.4</b>	<b>Différentes routes vers le ralentissement</b>	<b>91</b>
3.4.1	Système simulé	91
3.4.2	Caractéristiques corrélation-vitesse	92
3.4.3	Friction avec le substrat non constante	92
<b>3.5</b>	<b>Hétérogénéités dynamiques</b>	<b>95</b>
3.5.1	Longueur d'hétérogénéité dynamique	95
3.5.2	Paramètre d'alignement	97
<b>3.6</b>	<b>Trajectoires virtuelles</b>	<b>98</b>
<b>3.7</b>	<b>Différents types cellulaires</b>	<b>100</b>

---

Le lecteur trouvera dans ce chapitre tiers le compte-rendu d'un projet qui s'intéresse à l'évolution au cours du temps du mouvement collectif sur un substrat dans des populations de cellules HBEC, et aux paramètres pertinents utiles à sa description. Nous nous pencherons en premier lieu sur une étude des positions de cellules. Puis, nous nous intéresserons au ralentissement du système et à l'évolution des corrélations en vitesse. Nous étudierons ensuite des observations expérimentales suggérant un vieillissement du système, cohérentes avec un modèle théorique de ce dernier. Nous donnerons ensuite un aperçu de simulations permettant l'obtention de caractéristiques similaires au cas expérimental. Nous concluons ce chapitre par une comparaison avec d'autres types cellulaires.

### 3.1 Structure spatiale

Nous nous intéressons en premier lieu à une observation de la structure spatiale de notre système, une monocouche de cellules HBEC WT, dans plusieurs configurations. En ce but, on ensemence plusieurs puits de plaques de culture avec des populations de cellules de densités différentes. À l'instant  $t = 27$  h (mesuré depuis le dépôt des cellules), on marque les noyaux des cellules avec le colorant Hoechst (voir section 2.2.2) pour remonter après traitement du signal obtenu (détaillé sections 2.3.1 et 2.3.3) à la position de leurs barycentres. Nous espérons ainsi pouvoir rapprocher la structure trouvée de celle de systèmes plus classiques mieux connus que le nôtre.

On peut ainsi remonter au nombre de cellules, et donc à la densité moyenne  $\rho_{\text{cell}}$  dans les champs de vision. Pour chaque densité, on compte le nombre de cellules  $N$  dans des sous-fenêtres d'interrogation de taille croissante. On s'intéresse ensuite au rapport entre l'écart type  $\Delta N$  et le nombre de cellules moyen  $\langle N \rangle$ , en fonction de  $\langle N \rangle$  pour ces différentes tailles. Pour un système passif, l'application du théorème central limite impose une loi d'échelle  $\Delta N \propto \langle N \rangle^{1/2}$  pour  $N$  suffisamment grand. On a cependant vu dans la section 1.4.1 que les systèmes actifs montraient la présence de fluctuations « géantes » qui violent cette relation pour les grandes valeurs de  $\langle N \rangle$ .

C'est le cas dans notre système, comme l'illustre la figure 3.1. Ces fluctuations géantes de densité ont en outre été observées précédemment dans d'autres systèmes cellulaires [176,179]. On mesure  $\Delta N \propto \langle N \rangle^\alpha$  avec  $\alpha = 0,79 \pm 0,01$  pour le domaine  $\langle N \rangle > 10-100$ . Le régime précédant ces fluctuations géantes montre un système plus ordonné à l'échelle de la dizaine de cellules qu'un tirage aléatoire de positions (le minimum observable sur la figure pour  $\langle N \rangle$  petit). On peut supposer qu'il est dû à une structuration locale de notre système pour des raisons de compacité.

Cette structure peut également être explorée via le calcul du facteur de structure radial  $S(q)$  de notre système, ce dernier étant au préalable réduit aux positions  $\{\vec{r}_j\}$  des barycentres des  $N_c$  noyaux :

$$S(\vec{q}) = \frac{1}{N_c} \left| \sum_{j=1}^{N_c} e^{-i\vec{q} \cdot \vec{r}_j} \right|^2 \quad \text{puis} \quad S(q) = \langle S(\vec{q}) \rangle_{\theta_q}$$

On trace ce facteur de structure  $S(q)$  pour chaque densité  $\rho_{\text{cell}}$  pour obtenir la figure 3.2. On observe pour les grandes valeurs de  $q$  (c'est-à-dire les petites tailles) des oscillations, très similaires à celles observées pour un liquide, qui traduisent bien la structuration locale. En revanche, à petit nombre d'onde, là où le facteur de structure tomberait à 0 pour un liquide passif, on obtient en fait un pic qui monte bien plus haut que les oscillations. Celui-ci est un témoignage des effets collectifs de l'activité qui se retrouvent aux grandes tailles, ce qui correspond aux fluctuations géantes aux grands  $\langle N \rangle$  illustrées figure 3.1.

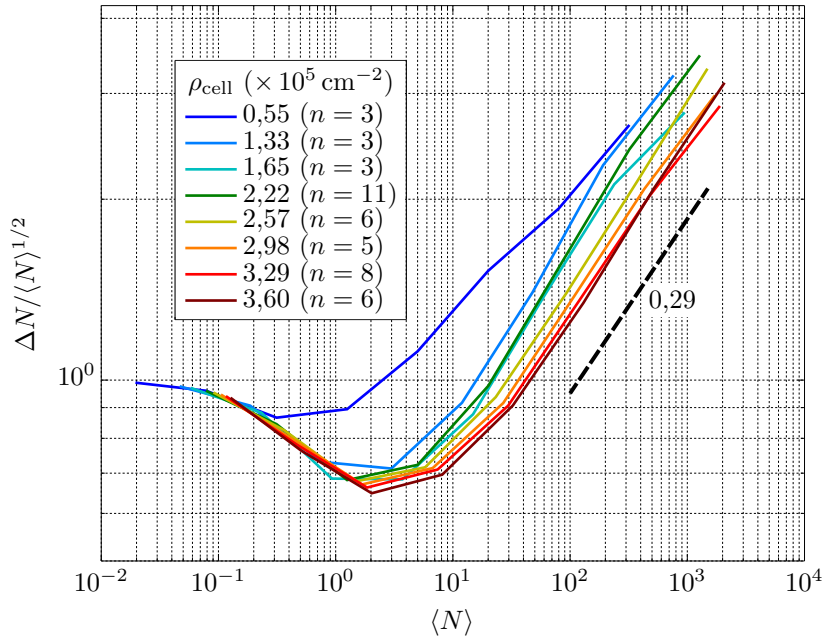


Figure 3.1 – Fluctuations de densité dans les monocouches de cellules HBEC.  $\langle N \rangle$  et  $\Delta N$  sont respectivement la moyenne et l'écart-type du nombre de cellules  $N$  présentes dans une sous-fenêtre de taille donnée. Pour chaque courbe,  $n$  est le nombre de champs de vision utilisés pour obtenir celle-ci.

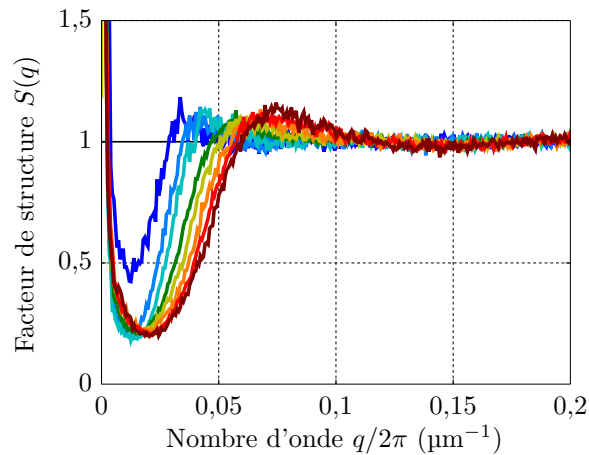


Figure 3.2 – Facteur de structure de la population pour différentes densités. Le code couleur est le même que celui de la figure 3.1.

En résumé, l'organisation des populations de cellules HBEC, à des densités différentes, exhibe donc une structuration aux petites tailles, et des fluctuations de densité à grande échelle bien plus importantes que celles existantes dans des systèmes passifs. Celles-ci sont la trace de l'existence de phénomènes collectifs dans la population, qui sont l'objet des études décrites dans le reste du présent chapitre.

## 3.2 Ralentissement du mouvement et évolution des corrélations

Nous nous proposons de considérer ici des cellules de la lignée HBEC WT déposées au fond des puits d'une plaque de culture en plastique (environ 640 000 cellules par puits). Après rinçage et enlèvement des cellules non accrochées, on suit au cours du temps l'évolution de la population ainsi constituée. Ce suivi se fait au vidéomicroscope en contraste de phase pendant plusieurs jours, au rythme d'une image tous les  $\delta t = 5$  min.

Un exemple typique de film obtenu grâce à ce dispositif est illustré par les images à différents pas de temps de la figure 3.3. La vidéo correspondante est également disponible en ligne dans l'annexe A.1.

### 3.2.1 Ralentissement du système

La première observation frappante est le peu de cohésion qui semble exister initialement entre les cellules HBEC, pourtant épithéliales. À basse densité, elles semblent se déplacer avec peu d'interactions, à la manière d'un « gaz » de cellules<sup>1</sup>. La confluence est ici difficile à caractériser, on n'observe pas la traditionnelle dichotomie entre des zones recouvertes par le tissu et des trous de surface libre. L'ensemble de la population est très dynamique et les espaces vides ne sont pendant longtemps que transitoires.

On peut également voir qu'avec le temps, les cellules se densifient et ralentissent (voir film en annexe A.1). Le mouvement semble s'organiser peu à peu sous forme de courants coordonnés sur plusieurs cellules, de directions très multiples. Puis, le tissu entre dans une autre phase où les mouvements deviennent très lents et très locaux, consistant principalement en des réarrangements.

On analyse ces vidéos par PIV (voir section 2.4) pour obtenir à chaque instant  $t$  les champs de vitesse  $\vec{v}$  correspondant à ces films. Les images étant prises loin du bord des puits et le dépôt des cellules ayant été fait de manière homogène, ces systèmes n'ont pas de direction privilégiée et ont une vitesse moyenne nulle en théorie. Après vérification, celle-ci est la plupart du temps négligeable devant les vitesses des cellules, et dans tous les cas semble attribuable à une dérive horizontale de la platine plutôt qu'à un mouvement d'ensemble réel des cellules. Cette vitesse moyenne a donc été systématiquement soustraite des champs obtenus par PIV.

Les paramètres choisis pour la PIV sont ceux qui permettent de décrire la plus grande partie du film. Nous avons vérifié que dans cette gamme, les champs de vitesse sont corrects (voir la section 2.4.4).

Le ralentissement observé sur les films est alors quantifiable en calculant la moyenne quadratique (*root mean square*) de la vitesse dans le champ, que par la suite on appellera plus simplement « vitesse quadratique » et qu'on notera  $v_{\text{rms}}$ . Celle-ci est définie comme suit à partir des  $N_{\text{vect}}$  vecteurs vitesse  $\vec{v}_i$  du champ :

$$v_{\text{rms}}(t) = \sqrt{\langle \vec{v}(\vec{r}, t)^2 \rangle_{\vec{r}}} = \left[ \frac{1}{N_{\text{vect}}} \sum_{i=1}^{N_{\text{vect}}} v_i(t)^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

La figure 3.4 présente l'évolution de cette vitesse quadratique en fonction du temps. On observe que cette vitesse décroît bien de manière monotone sur l'intervalle de temps analysé, d'environ  $80 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$  à moins de  $10 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ . Notre système ralentit et se dirige donc spontanément

1. À titre de comparaison, dans la même situation, les cellules épithéliales MDCK forment des îlots bien définis, qui vont croître et coalescer au cours du temps.

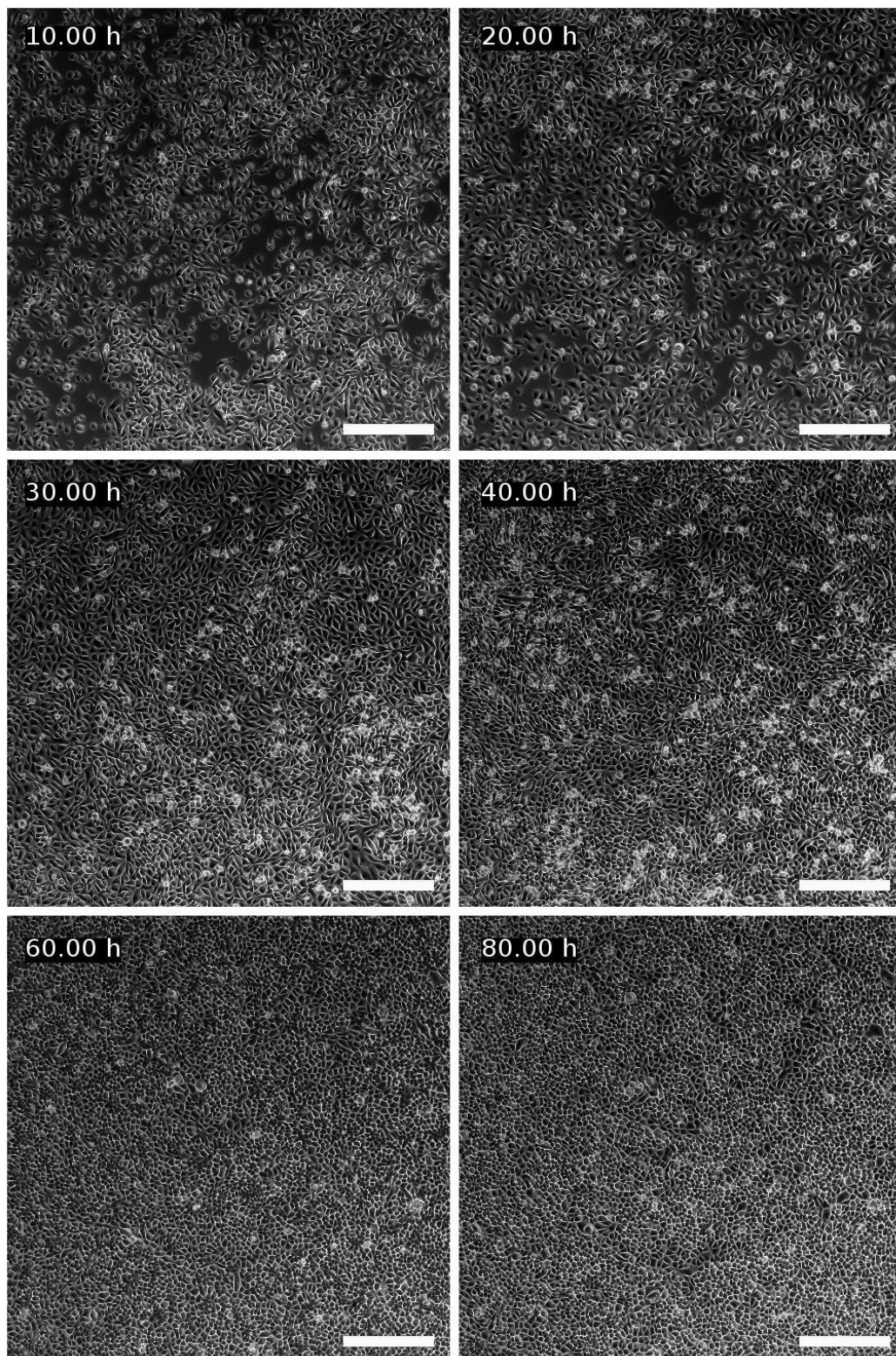


Figure 3.3 – Images en contraste de phase de l'évolution d'une population de cellules HBEC au cours du temps. Barre d'échelle : 300 µm. La vidéo correspondant à cette expérience est disponible annexe A.1.

vers un état de moindre activité qui aboutira plus tard à une phase où les mouvements des cellules sont confinés localement autour de leurs positions finales – un état bloqué à quelques réarrangements près qui rappellent les intermittences évoquées à la fin de la section 1.4.1.

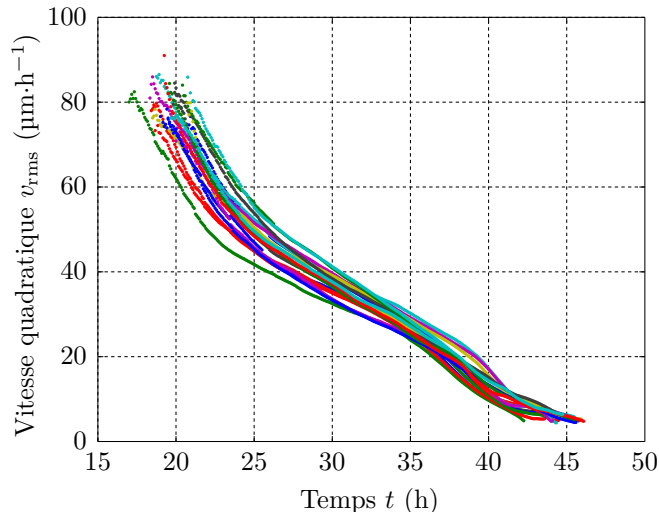


Figure 3.4 – Évolution de la vitesse quadratique  $\xi_{vv}$  dans la monocouche en fonction du temps  $t$ , mesuré depuis le dépôt des cellules sur le substrat pour 18 champs de vision (avec le même nombre initial de cellules par puits). Chaque couleur représente un champ de vision.

### 3.2.2 Longueur de corrélation spatiale

Afin de quantifier le caractère collectif de ces mouvements cellulaires ralentis, nous calculons ensuite à chaque instant  $t$  la carte d'autocorrélation spatiale  $C_{vv}(\delta\vec{r}, t)$  pour ces champs de vitesse, normalisée par la valeur du pic central :

$$C_{vv}(\delta\vec{r}, t) = \frac{\langle \vec{v}(\vec{r}, t) \cdot \vec{v}(\vec{r} + \delta\vec{r}, t) \rangle_{\vec{r}}}{\langle \vec{v}(\vec{r}, t)^2 \rangle_{\vec{r}}}$$

À partir de cette carte de corrélation, et notre système étant isotrope, on calcule la fonction de corrélation radiale  $C_{vv}(\delta r, t)$  moyennée sur toutes les directions (voir annexe C.1). On ajuste cette fonction par une exponentielle décroissante qui nous permet d'ainsi introduire la longueur de corrélation  $\xi_{vv}(t)$  (voir figure 3.5).

Cette longueur de corrélation fournit une mesure quantitative de la collectivité du mouvement. De manière surprenante, l'évolution de  $\xi_{vv}$  dans le temps n'est pas monotone, comme illustré figure 3.6. Petite au début de l'analyse (de l'ordre de  $60 \mu\text{m}$ , soit 2 ou 3 tailles cellulaires), elle augmente ensuite pour atteindre des valeurs importantes entre  $100$  et  $150 \mu\text{m}$  (environ 7 tailles cellulaires). Cette longueur décroît ensuite jusqu'à la limite basse que nous permet notre analyse.

On obtient donc pour notre longueur de corrélation une allure en cloche au cours du temps qui pourrait être une signature potentielle de la traversée par le système d'une transition de *jammimg*. Notamment, l'augmentation de cette longueur de corrélation, qui constitue une mesure de l'hétérogénéité spatiale du système, rappelle la croissance d'autres grandeurs analogues à

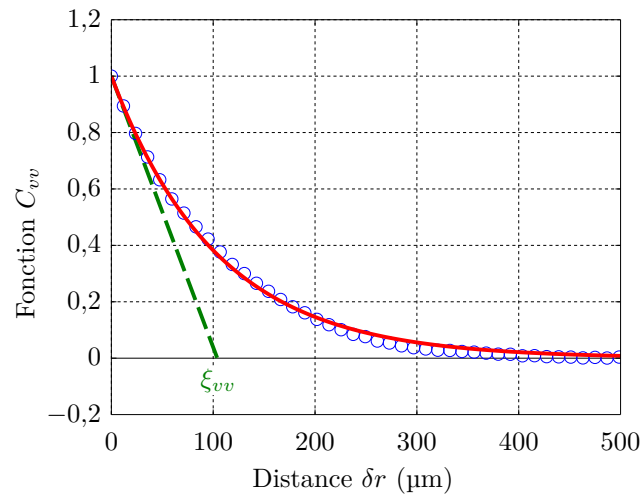


Figure 3.5 – Fonction  $C_{vv}(\delta r)$  de corrélation radiale pour un champ de vitesse. Les cercles bleus sont les données expérimentales, et la courbe en rouge l’ajustement par une exponentielle décroissante de longueur caractéristique  $\xi_{vv}$ .

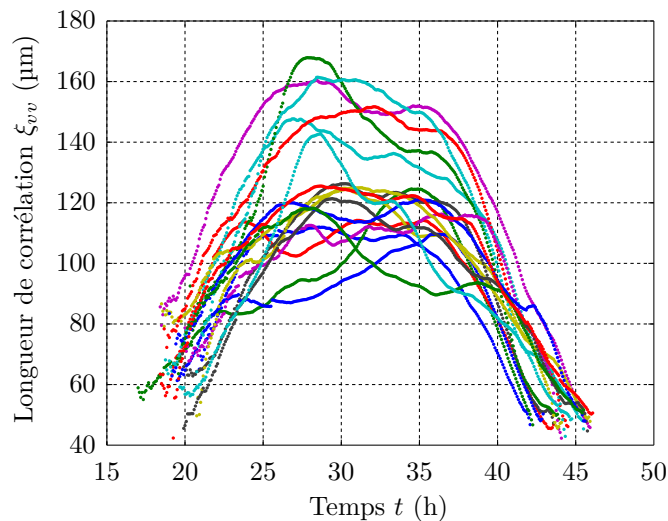


Figure 3.6 – Évolution de la longueur  $\xi_{vv}$  de corrélation en vitesse en fonction du temps  $t$ , mesuré depuis le dépôt des cellules sur le substrat, pour les 18 champs de vision. Chaque couleur représente un champ de vision.

l’approche d’une telle transition, dans les systèmes inertes (voir section 1.4.1) comme cellulaires (voir section 1.4.2).

### 3.2.3 Densité cellulaire

Nous avons tout d’abord tenté de relier l’évolution de la longueur de corrélation  $\xi_{vv}$  au changement de la densité cellulaire  $\rho_{\text{cell}}$  dans le tissu. En effet, elle augmente visiblement au cours du temps et d’autres études (voir section 1.4.2) suggèrent que la densité surfacique est le paramètre contrôlant la montée de la longueur de corrélation, à la manière de la traditionnelle fraction volumique  $\phi$  de la transition de *jamm*ing.



On effectue un comptage manuel des cellules figurant sur une sélection de champs de vision aux temps  $t = 21$  h,  $t = 31$  h et  $t = 40$  h après dépôt (voir figure 3.7). Ces mesures montrent une augmentation de la densité  $\rho_{\text{cell}}$  d'un facteur 2 environ (de  $1,6 \times 10^5 \text{ cm}^{-2}$  à  $3,1 \times 10^5 \text{ cm}^{-2}$ ) entre les deux pas de temps les plus éloignés. Elles permettent de montrer qu'aux instants  $t_0$  où les comptages sont faits, la longueur de corrélation  $\xi_{vv}(t_0)$  est très peu corrélée à la densité cellulaire  $\rho_{\text{cell}}(t_0)$  (voir figure 3.7).

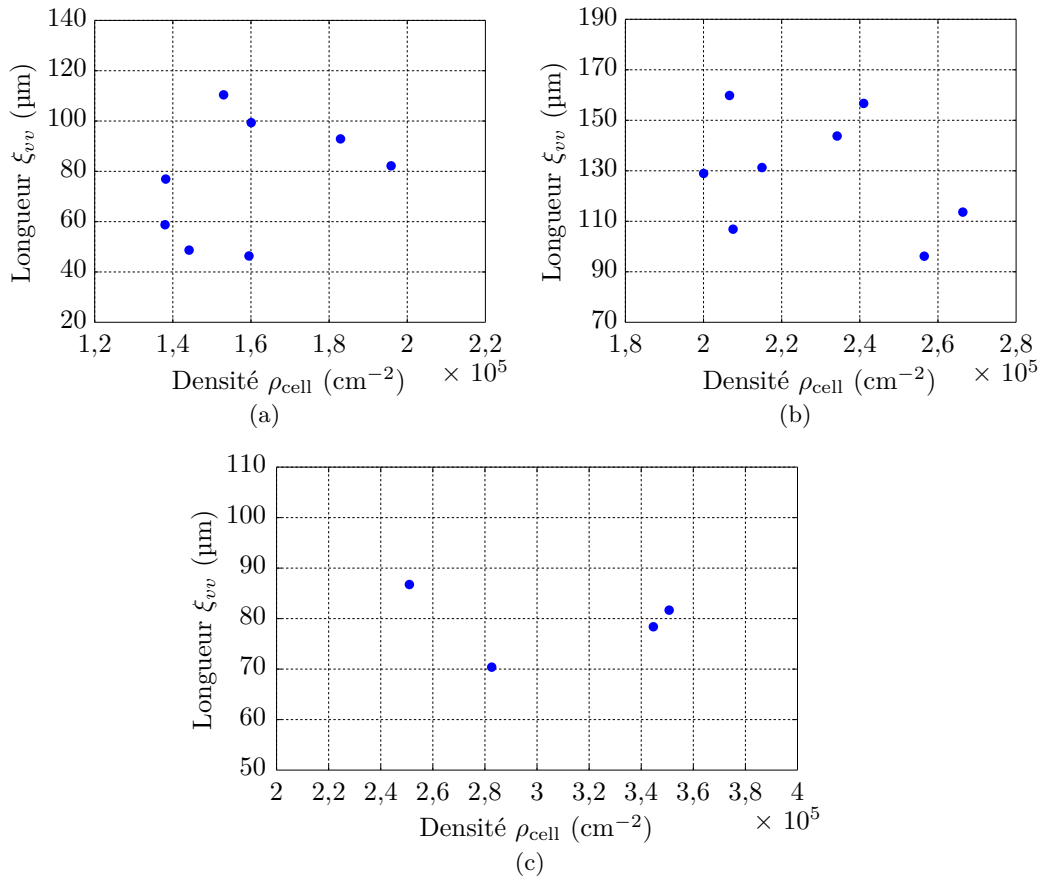


Figure 3.7 – Longueur de corrélation  $\xi_{vv}$  et densité cellulaire  $\rho_{\text{cell}}$  (comptée manuellement) pour 8 champs de vision arbitrairement choisis parmi les puitsensemencés avec 640 000 cellules. (a) Mesures faites à  $t = 21$  h. Le coefficient de corrélation de PEARSON vaut  $r = 0,34$ . (b) Mesures faites à  $t = 30$  h. On calcule  $r = -0,33$ . (c) Mesures faites à  $t = 40$  h. Ces différentes mesures montrent que les deux quantités sont donc non corrélées.

Ces mesures permettent d'étudier la relation entre vitesse et densité. Pour des cellules épithéliales MDCK confinées, des expériences [180] et un modèle théorique [181] ont donné une loi d'échelle  $v \propto \rho_{\text{cell}}^\alpha$  avec  $\alpha$  valant entre  $-0,5$  et  $-0,7$ . Nos mesures montrent, comme vu plus haut, une augmentation de la densité d'un facteur 2 entre  $t = 21$  h et  $t = 40$  h, alors que les vitesses diminuent d'un facteur compris entre 5 et 8 pour la vitesse. Ces valeurs invalident sans ambiguïté l'exposant trouvé pour les MDCK, qui n'est donc pas applicable à notre système très peu cohésif.

La densité cellulaire de la population reste cependant difficile à obtenir de manière dynamique à partir des images en contraste de phase. En effet, le calcul de cette quantité implique de

compter entre 3000 et 8000 cellules pour chaque champ de vision considéré. Le problème se pose donc de tester l'hypothèse de la densité cellulaire comme paramètre de contrôle principal, sans pouvoir accéder à sa valeur à chaque instant. Nous avons donc raisonné ainsi : si la densité  $\rho_{\text{cell}}$  est effectivement le paramètre pertinent, des expériences effectuées avec un nombre initial de cellules différent doivent être décrites avec des courbes  $\xi_{vv}(t)$  identiques mais décalées dans le temps.

Nous avons donc mené des expériences en variant le nombre de cellules mises initialement dans le puits. La figure 3.8 présente la longueur de corrélation  $\xi_{vv}$  mesurée au cours du temps pour ces différentes quantités de cellules : environ 640 000 (en bleu, 18 champs de vision précédemment étudiés), environ 960 000 (en vert, 13 champs de vision) et environ 1 280 000 (en rouge, 12 champs de vision) cellules par puits.

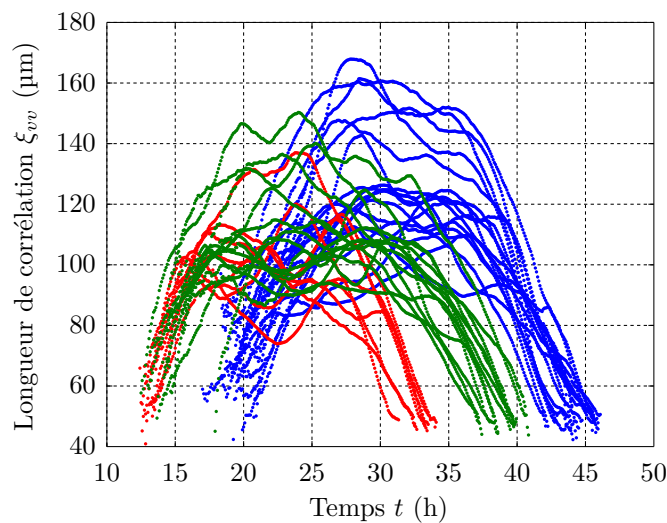


Figure 3.8 – Longueur de corrélation  $\xi_{vv}$  en fonction du temps  $t$  pour différentes quantités initiales de cellules. Chaque couleur représente une quantité différente.

La figure 3.9 présente l'évolution de  $\xi_{vv}(t)$ , moyennée sur chaque famille d'expériences (définie par un nombre initial de cellules égal dans le puits). En alignant les montées de ces caractéristiques par simple décalage temporel, on peut voir que les trois courbes ne coïncident pas. Si le taux de croissance est initialement très semblable pour les trois familles, on voit ensuite apparaître des différences sensibles entre celles-ci. Les puits les moins peuplés initialement montrent une phase de croissance plus longue et atteignent un plateau plus haut en moyenne pour  $\xi_{vv}$ . La densité seule ne peut donc pas expliquer ces différences notables entre ces trois caractéristiques.

Toutes ces observations montrent que la densité n'est pas suffisante à expliquer l'évolution de la longueur de corrélation. Puisqu'un décalage temporel ne peut réconcilier les différentes familles de courbes, il faut envisager que le temps a en lui-même de l'importance : le système vieillit.

### 3.3 Analyse en termes d'agrégats effectifs

Afin d'expliquer cette évolution inattendue pour la longueur de corrélation  $\xi_{vv}$ , nous avons collaboré avec Nir GOV de l'Institut Weizmann (Israël) pour concevoir un modèle rendant compte de nos observations expérimentales.

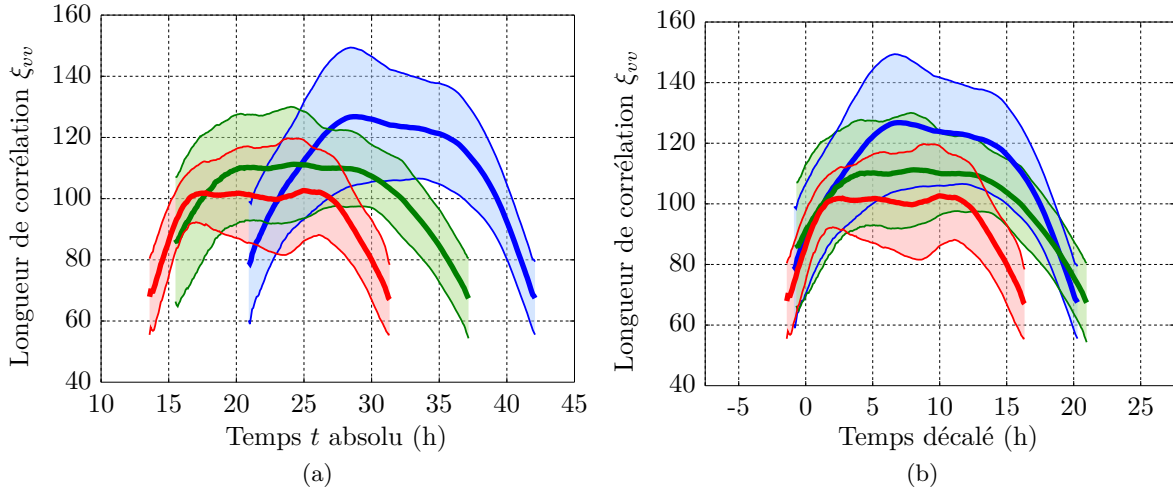


Figure 3.9 – Évolution de  $\xi_{vv}$  en fonction du temps. (a) Valeur moyenne et écart type de  $\xi_{vv}$  pour chaque famille de courbes. Le temps  $t$  est mesuré depuis le dépôt des cellules sur le substrat. (b) Les mêmes courbes, mais décalées dans le temps pour avoir une montée synchrone.

### 3.3.1 Modèle analytique

On modélise la monocouche de cellules en introduisant des agrégats fictifs de rayon  $\xi_{vv}$  (voir figure 3.10). On suppose ces agrégats parfaitement corrélés en vitesse, à savoir que toutes les cellules qui le constituent possèdent la même vitesse (en norme et en orientation) et donc que l'agrégat se déplace comme un objet indéformable. Mathématiquement, cette approximation revient à remplacer la décroissance exponentielle de la corrélation vitesse-vitesse par une fonction échelon valant 1 jusqu'à  $\xi_{vv}$  et 0 au-delà.

Les forces motiles  $\vec{f}$  des cellules individuelles sont considérées comme de direction aléatoire et de norme  $f_0$ . Elles sont actives pendant des salves de durée  $\tau_{\text{bruit}}$  (temps de persistance de la force) et séparées d'une durée moyenne  $\tau$ , soit un taux d'activité  $p_{\text{on}} = \tau_{\text{bruit}}/(\tau + \tau_{\text{bruit}})$ . On note  $\lambda$  la friction effective de l'agrégat avec son environnement.

En utilisant le raisonnement développé par BEN-ISAAC *et al.* [182] et par MALET-ENGRA *et al.* [183], on résout ensuite l'équation de LANGEVIN pour le centre de masse d'un agrégat en se plaçant dans la limite  $\lambda\tau_{\text{bruit}} \gg 1$ , où l'inertie peut être négligée ( $\frac{d\vec{v}}{dt} \approx 0$ ), ce qui nous donne :

$$\vec{v} = \frac{1}{\lambda} \sum \vec{f} \quad \text{et donc} \quad \langle v^2 \rangle = \frac{1}{\lambda^2} \left\langle \left( \sum \vec{f} \right)^2 \right\rangle$$

On considère les deux cas extrêmes où les forces individuelles cellulaires  $\vec{f}$  dans l'agrégat ne sont absolument pas corrélées, ou au contraire le sont parfaitement. Sans entrer dans le détail du calcul, nous livrons ici quelques éléments de compréhension des résultats exacts détaillés plus bas.

En considérant que les forces motiles  $\vec{f}$  sont activées en continu ( $p_{\text{on}} = 1$ ), on a dans le cas où les forces ne sont pas corrélées  $\langle \vec{f}_i \cdot \vec{f}_j \rangle = f_0^2 \delta_{ij}$ , c'est-à-dire  $f_0^2$  si  $i = j$  et 0 s'il s'agit de deux cellules différentes. Si on note  $N_c$  le nombre de cellules dans l'agrégat, on a donc  $\langle v^2 \rangle \propto N_c f_0^2$ . Au contraire, si les forces sont parfaitement corrélées, on a  $\langle \vec{f}_i \cdot \vec{f}_j \rangle = f_0^2$  pour tous les couples  $(i, j)$ , et donc  $\langle v^2 \rangle \propto N_c^2 f_0^2$ .

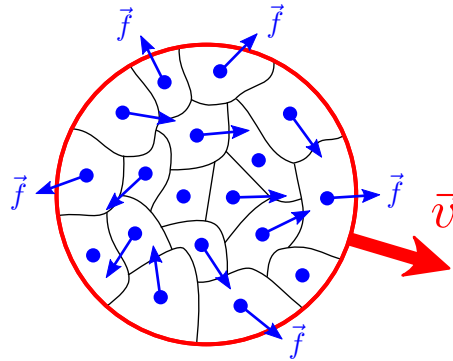


Figure 3.10 – Agrégat utilisé dans le modèle. Les vitesses de toutes les cellules sont parfaitement corrélées et sont donc toutes égales à  $\vec{v}$ . Les forces motiles  $\vec{f}$  des cellules individuelles ont des directions aléatoires, que l'on peut considérer corrélées ou non.

Le calcul exact implique le fait que les forces ne sont pas actives tout le temps, et qui plus est non synchronisées. Ceci se traduit *in fine* par un facteur numérique  $p_{\text{on}}/2$ . En prenant en compte le fait que  $N_c$  est proportionnel à son aire et donc à  $\xi_{vv}^2$ , on obtient pour  $\langle v^2 \rangle$  :

$$\langle v^2 \rangle_{\text{non corr.}} = \frac{p_{\text{on}} N_c f_0^2}{2\lambda^2} \propto \frac{\xi_{vv}^2}{\lambda^2} \quad \text{et} \quad \langle v^2 \rangle_{\text{corr.}} = \frac{p_{\text{on}} (N_c f_0)^2}{2\lambda^2} \propto \frac{\xi_{vv}^4}{\lambda^2}$$

Si la friction de l'agrégat est dominée par les interactions entre les cellules et le substrat, le coefficient  $\lambda$  sera surfacique, soit  $\lambda \propto \xi_{vv}^2$ . Alors :

$$\langle v^2 \rangle_{\text{non corr.}} \propto \frac{1}{\xi_{vv}^2} \quad \text{et} \quad \langle v^2 \rangle_{\text{corr.}} \propto \xi_{vv}^0$$

On s'attend donc à une dépendance  $v_{\text{rms}} \propto \xi_{vv}^\alpha$  avec des valeurs de  $\alpha$  autour de  $-1$  pour des cellules dominées par la friction cellule-substrat dont les forces ne sont pas corrélées, voire supérieures (entre  $-1$  et  $0$ ) si elles le sont partiellement.

		Forces motiles			
		Non corrélées		Parfaitement corrélées	
$\langle v^2 \rangle$		$\frac{\xi_{vv}^2}{\lambda^2}$		$\frac{\xi_{vv}^4}{\lambda^2}$	
		Origine de la friction			
		Cellule-substrat	Cellule-cellule	Cellule-substrat	Cellule-cellule
$\lambda$		$\xi_{vv}^2$	$\xi_{vv}$	$\xi_{vv}^2$	$\xi_{vv}$
$\langle v^2 \rangle$		$\xi_{vv}^{-2}$	$\xi_{vv}^0$	$\xi_{vv}^0$	$\xi_{vv}^2$
$v_{\text{rms}}$		$\xi_{vv}^{-1}$	$\xi_{vv}^0$	$\xi_{vv}^0$	$\xi_{vv}$

Tableau 3.1 – Lois d'échelle  $v_{\text{rms}} \propto \xi_{vv}^\alpha$  obtenues pour les différents régimes de corrélation du bruit et de friction considérés.

Dans le cas où la friction a plutôt pour origine les interactions cellule-cellule, celle-ci a majoritairement lieu au périmètre de l'agrégat, ce qui implique un coefficient  $\lambda$  linéaire :  $\lambda \propto \xi_{vv}$ .

De manière analogue, on peut déterminer que  $v_{\text{rms}}$  est indépendante de  $\xi_{vv}$  dans le cas non corrélé, et que  $v_{\text{rms}} \propto \xi_{vv}$  dans le cas parfaitement corrélé. Il est plausible, dans une situation où les interactions cellule-cellule sont fortes, que les forces individuelles de traction soient très corrélées, ce qui suggère plutôt la dernière relation.

On résume ces différentes lois d'échelle dans le tableau 3.1.

### 3.3.2 Caractéristiques corrélation-vitesse

Motivés par les conclusions de cette analyse, nous avons décidé d'explorer à nouveau les résultats expérimentaux, en décrivant cette fois l'évolution de la longueur de corrélation  $\xi_{vv}$  en fonction de la vitesse quadratique  $v_{\text{rms}}$  (dont les variations au cours du temps sont illustrées figure 3.11). Notons que cette description peut toujours être inscrite dans le cadre de réflexion du *jamm*ing, mais en s'intéressant cette fois à l'approche de la surface le long de l'axe de l'activité des cellules, analogue d'une température d'agitation effective  $T_{\text{eff}}$ .

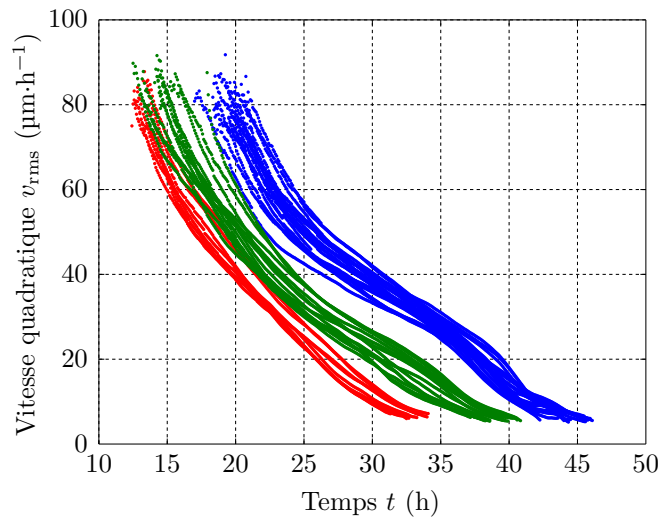


Figure 3.11 – Vitesse quadratique  $v_{\text{rms}}$  en fonction du temps  $t$  pour les différentes quantités initiales de cellules. Le code couleur est le même que dans la figure 3.8.

Comme on peut le voir sur la figure 3.12, lorsque l'on adopte ce mode de représentation, les caractéristiques des 39 champs de vision, quel que soit le nombre initial de cellules dans les puits, viennent se fondre en une unique courbe en cloche. La vitesse quadratique  $v_{\text{rms}}$  constitue bien donc le paramètre de contrôle principal de l'évolution de la longueur de corrélation  $\xi_{vv}$ .

Nous avons vérifié que l'existence d'un maximum de longueur de corrélation pour ces caractéristiques, atteint vers une vitesse quadratique de  $40\text{--}50 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ , n'est pas un artefact d'analyse des champs de vitesse en conduisant les contrôles suivants. Tout d'abord, en termes de limites de l'algorithme de PIV, on peut se demander quelles sont les conséquences sur la longueur  $\xi_{vv}$  d'un régime de vitesse quadratique se rapprochant de  $v_{\text{pix}} = 1 \text{ pixel/image}$ . Cette vitesse, ramenée à des quantités physiques, vaut  $v_{\text{pix}} = 8,9 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ , ce qui est très inférieur au domaine de vitesse du changement de pente. Par ailleurs, en conduisant une expérience similaire avec une période d'échantillonnage plus courte  $\delta t = 2 \text{ min}$ , on est à même de voir que la position de ce domaine se situe autour des mêmes valeurs de vitesse, prouvant la robustesse de cette observation (voir figure 3.13).

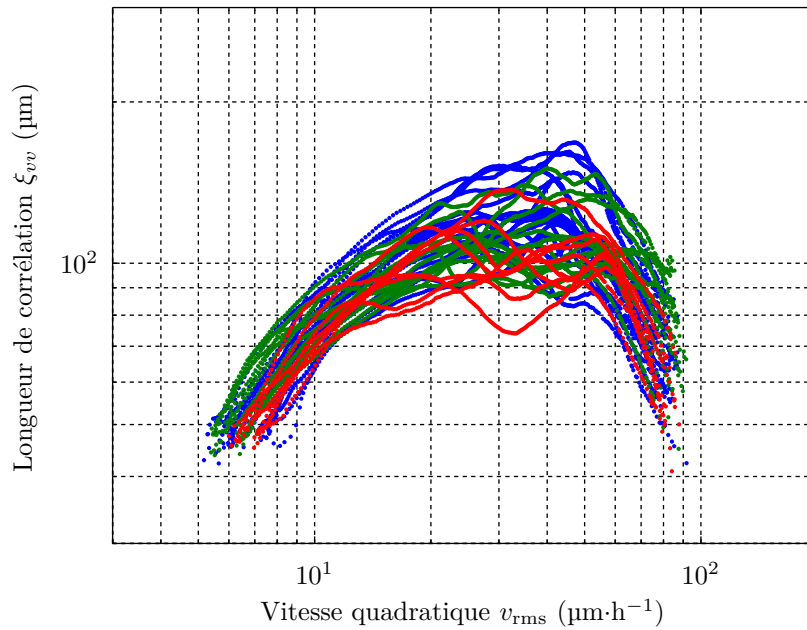


Figure 3.12 – Caractéristiques corrélation-vitesse, en échelle logarithmique, pour les 39 champs de vision de la première plaque. Le code couleur est le même que précédemment (voir section 3.2.1).

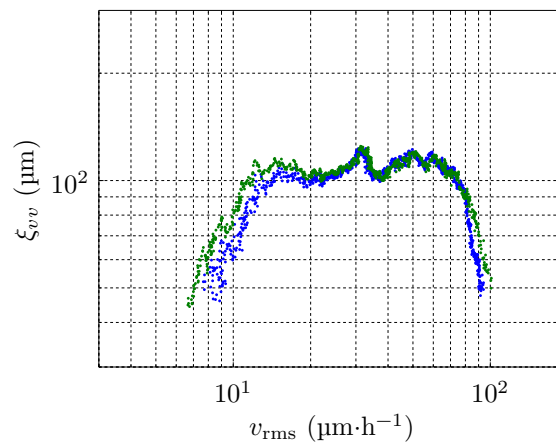


Figure 3.13 – Caractéristique corrélation-vitesse (sans moyenne glissante) d'un champ de vision pour une expérience menée avec un écart  $\delta t = 2$  min entre deux images successives. Les points en bleu sont obtenus en utilisant l'algorithme de PIV sur des images séparées de  $\delta t$ , ceux en vert en l'utilisant sur des images séparées de  $2\delta t = 4$  min.

On en conclut donc que notre système présente des caractéristiques corrélation-vitesse bien définies qui se superposent toutes en une courbe maîtresse d'allure en cloche, indépendamment du nombre initial de cellules déposées dans le puits. Ces observations sont bien reproductibles, comme en attestent les caractéristiques très similaires obtenues pour les 39 champs de vision d'une seconde plaque, tracées dans la figure 3.14a. L'utilisation d'une plaque à fond de verre

se solde par des caractéristiques (voir figure 3.14b) proches de celles obtenues pour un substrat plastique.

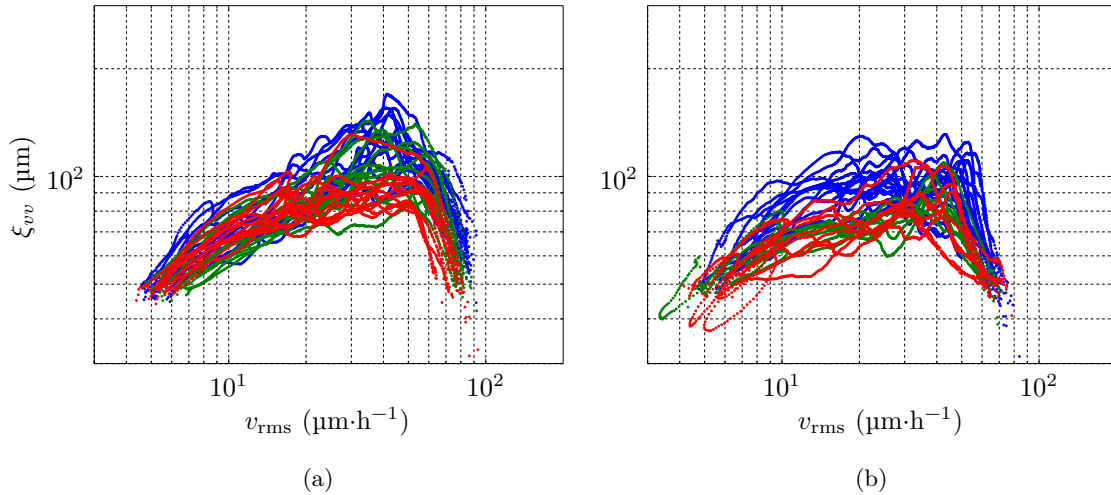


Figure 3.14 – Caractéristiques corrélation-vitesse pour d’autres plaques de culture. Le code couleur est identique à celui utilisé pour la première plaque. (a) Caractéristiques pour une deuxième plaque à fond de plastique. 39 champs de vision : 15 en bleu, 12 en vert et 12 en rouge. (b) Caractéristiques pour une plaque à fond de verre. 32 champs de vision : 16 en bleu, 8 en vert et 8 en rouge.

La figure 3.15 montre pour un champ de vision le parcours dans le temps de l’espace des phases  $v_{rms}$ – $\xi_{vv}$ . La phase de montée en corrélation aux grandes vitesses semble suggérer un exposant compris entre  $-2$  et  $-1$ , soit des lois d’échelles respectives  $v_{rms} \propto \xi_{vv}^{-1/2}$  et  $v_{rms} \propto \xi_{vv}^{-1}$ . Ces observations sont compatibles avec les prédictions théoriques qui donnaient un exposant valant  $-1$  pour des cellules dominées par la friction cellule-substrat dont les forces ne sont pas corrélées, et supérieur pour des forces partiellement corrélées. Cependant, une mesure précise de ces pentes est illusoire en raison du trop petit intervalle parcouru par la vitesse  $v_{rms}$  (bien en dessous d’une décade). Dans le régime de basse vitesse, correspondant aux temps longs, la pente de la caractéristique devient positive : la longueur de corrélation  $\xi_{vv}$  décroît avec le ralentissement du système.

Ces caractéristiques montrent que les changements dans la longueur de corrélation  $\xi_{vv}$  des mouvements de notre système sont bien contrôlés par la vitesse quadratique  $v_{rms}$ . L’évolution dudit système peut s’interpréter comme un passage progressif à un état vitreux lors de la diminution de sa température effective.

La combinaison de ces données expérimentales et du modèle décrit dans la section 3.3.1 suggère que la population est initialement (aux hautes vitesses) dans un régime où les forces de traction exercées par des cellules voisines sont peu corrélées, et où la friction est dominée par les interactions avec le substrat. Plus tard, pour des vitesses plus basses, la monocouche change de comportement, ce qui pourrait s’interpréter par l’entrée dans un régime où les interactions cellule-cellule ont pris de l’importance, au point de dominer la friction et de faire apparaître une corrélation dans les forces motiles. Qualitativement, ce changement de régime correspond à une transition progressive de la courbe bleue à la courbe violette sur la figure 3.16 au fur et à mesure

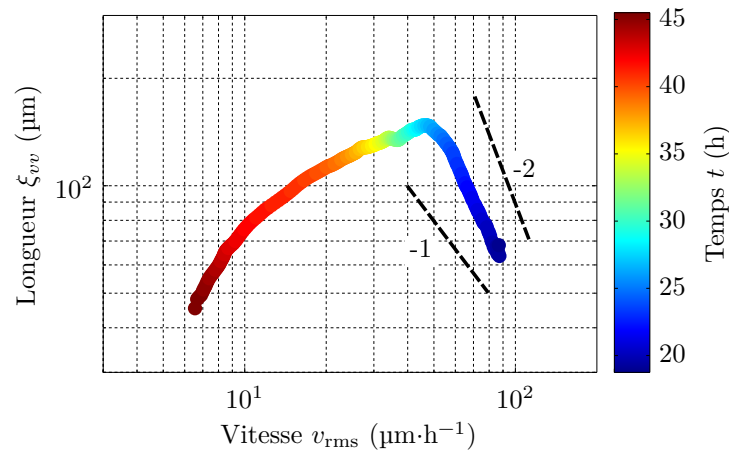


Figure 3.15 – Exemple d'évolution de la monocouche de cellules dans l'espace des phases  $v_{\text{rms}}-\xi_{vv}$  en fonction du temps  $t$  pour un champ de vision.

de la diminution de  $v_{\text{rms}}$ , pour donner la courbe rouge dont l'allure en cloche est à rapprocher de celle obtenue pour les caractéristiques expérimentales.

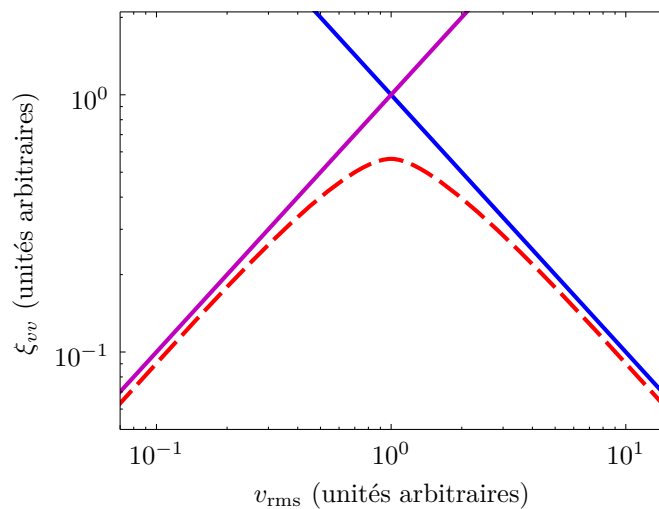


Figure 3.16 – Illustration de la relation obtenue entre  $\xi_{vv}$  et  $v_{\text{rms}}$  à l'aide du modèle dans le cas d'une friction dominée par les adhésions cellule-substrat et des forces de traction non corrélées (en bleu), et dans le cas d'une friction dominée par les jonctions cellule-cellule et des forces motiles parfaitement corrélées. Les courbes obtenues expérimentalement pourraient témoigner d'un passage progressif de la première situation à la seconde lors du ralentissement des mouvements (courbe rouge en pointillés).

### 3.3.3 Maturation des jonctions cellulaires

Le modèle aux agrégats fictifs suggérant une augmentation des interactions cellule-cellule, nous avons voulu vérifier cette hypothèse en nous intéressant aux changements dans les jonctions correspondantes via l'expression de la cadhérine de type E. Ces mesures ont été effectuées par



immunofluorescence (voir section 2.2.2) sur des cellules HBEC déposées sur des lamelles de verre à densité comparable aux puits les moins denses de nos expériences. La comparaison s'est faite entre des échantillons ensemencés simultanément, mais fixés pour certains à  $t = 1$  jour ( $21 \text{ h} < t < 23 \text{ h}$ ) et pour les autres à  $t = 3$  jours ( $68 \text{ h} < t < 73 \text{ h}$ ).

La figure 3.17a montre une augmentation du signal de fluorescence dû aux cadhérines au niveau des frontières cellulaires entre  $t = 1$  jour et  $t = 3$  jours. Nous avons quantifié ces changements en calculant pour chaque expérience un contraste entre l'intensité de fluorescence au niveau des jonctions et celle à l'intérieur du cytoplasme (voir figure 3.17b).

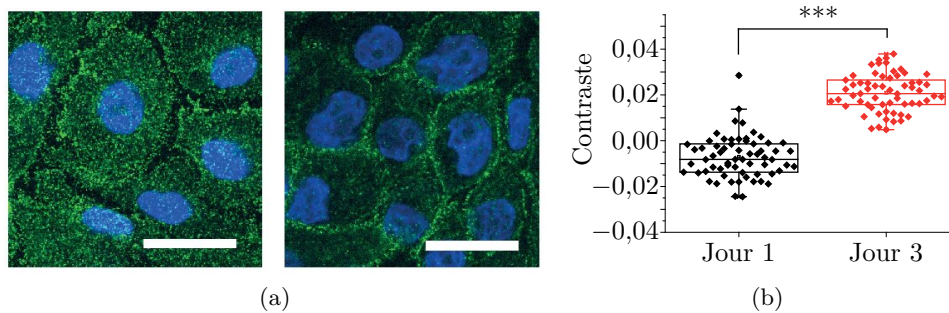


Figure 3.17 – Maturation des jonctions cellule-cellule. (a) Images en fluorescence d'échantillons marqués à  $t = 1$  jour (à gauche) et 3 jours (à droite). La cadhérine E est en vert et les noyaux en bleu. Barres d'échelle :  $20 \mu\text{m}$ . (b) Évolution du contraste en intensité et de la position de ses quartiles entre les deux instants pour une expérience.

Pour cela, on repère manuellement entre 30 et 40 jonctions par champ de vision, et on réduit ces jonctions à des profils transverses d'intensité, de  $8 \mu\text{m}$  de long et centrés sur la jonction, à l'aide d'une macro Fiji disponible dans l'annexe D.3. Puis, sous MATLAB, on en tire les niveaux moyens de fluorescence  $I_{\text{jonc}}$  au niveau de la jonction (entre  $-0,5 \mu\text{m}$  et  $0,5 \mu\text{m}$  autour du centre du profil), et  $I_{\text{cyto}}$  à l'intérieur du cytoplasme (sur les deux intervalles situés entre  $3,5$  et  $4 \mu\text{m}$  de la jonction). On calcule ensuite le contraste entre ces niveaux moyens :

$$\text{Contraste} = \frac{I_{\text{jonc}} - I_{\text{cyto}}}{I_{\text{jonc}} + I_{\text{cyto}}}$$

On conduit ces analyses sur quatre expériences d'immunofluorescence, issues de deux processus d'ensemencement et de fixation différents, et en utilisant deux champs de vision par expérience. On observe de manière systématique une augmentation significative de contraste au sein d'une même expérience entre les échantillons à  $t = 1$  jour et ceux à  $t = 3$  jours. Ces observations plaident pour une augmentation des interactions cellule-cellule au cours du temps, comme suggéré par le modèle. Elles sont par ailleurs en accord avec le comportement similaire mesuré dans des îlots de cellules MDCK par ROLLI *et al.* [184].

De manière similaire, nous nous sommes intéressés à l'évolution des jonctions cellule-substrat via l'immunomarquage de la vinculine. On observe, comme illustré figures 3.18 et 3.19 que la distribution de vinculine s'homogénéise avec le temps. En fait, on voit une disparition des structures d'adhésion bien définies (complexes d'adhésion ou adhésions focales) présentes à l'extrémité des fibres de tension. Il est difficile de statuer sur l'impact que cette transformation a sur le mouvement des cellules. En effet, selon leur degré de maturation, les structures d'adhésion peuvent être partie prenante dans la migration cellulaire ou au contraire des freins à celle-ci (voir section

1.1.1). De plus, ces structures peuvent évoluer de manière très dynamique, et une photographie à un instant donné est insuffisante pour pouvoir en déduire une conclusion claire sur le mouvement.

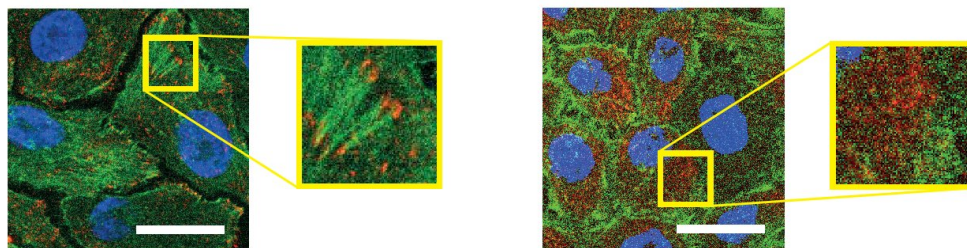


Figure 3.18 – Images en fluorescence d'échantillons marqués à  $t = 1$  jour (à gauche) et 3 jours (à droite). L'actine filamenteuse est en vert, la vinculine en rouge et les noyaux en bleu. Les niveaux initiaux de fluorescence ne sont pas respectés, et sont ajustés pour obtenir un contraste optimal. Le signal de fluorescence de la vinculine à 3 jours est en réalité à hauteur du bruit d'arrière-plan du signal à 1 jour. Barres d'échelle :  $20 \mu\text{m}$ .

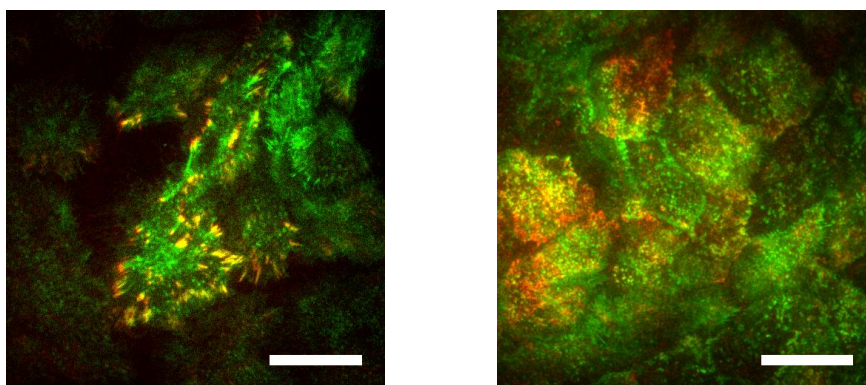


Figure 3.19 – Images en TIRF d'échantillons marqués à  $t = 1$  jour (à gauche) et 3 jours (à droite). L'actine filamenteuse est en vert, la vinculine en rouge. Ici également, les niveaux de fluorescence ne sont pas respectés et on a à nouveau un signal de fluorescence de la vinculine à 3 jours à hauteur du bruit d'arrière-plan du signal à 1 jour. Barres d'échelle :  $20 \mu\text{m}$ .

Ces observations, ajoutées à celles qui précèdent, nous permettent cependant de conclure que le système vieillit sans que l'augmentation de la densité soit le paramètre de contrôle principal. Ce vieillissement passe par une maturation avec le temps des jonctions cellule-cellule et des adhésions cellule-substrat. Il constitue une explication possible au ralentissement du système qui contrôle l'apparition des phénomènes observés précédemment, possiblement dus à la traversée d'une transition de *jamming* lors de cette baisse de température effective.

### 3.3.4 Modèle aux liens glissants

Sur la base de nos observations, nous pouvons alors complexifier le modèle développé dans la section 3.3.1 afin de prendre en compte la maturation des contacts des cellules avec leurs voisines ou avec le substrat, en reliant celle-ci à la baisse de vitesse dans la monocouche. Pour cela, on modélise les liaisons moléculaires entre cellules ou entre les cellules et le substrat.

L'idée est la suivante : on considère que la friction sur les cellules est due à des liaisons moléculaires qui s'attachent et se détachent dynamiquement, et qui sont sensibles aux forces de cisaillement. Les molécules de liaison forment des « liens glissants » (*slip bonds*, voir par exemple [185,186]) qui ont tendance à se détacher lors de l'application d'une contrainte de cisaillement due à la vitesse relative des cellules entre elles ou par rapport au substrat. Pendant que ces molécules sont attachées, elles sont étirées par ce cisaillement et on suppose qu'elles se comportent comme de simples ressorts élastiques.

Le modèle traduit mathématiquement ces principes en considérant des ressorts de raideur  $k$ , s'attachant avec une constante de vitesse  $k_{\text{on}}$  indépendante de l'étirement  $x$ , et se détachant avec une constante de vitesse  $k_{\text{off}}$  qui augmente avec ce dernier :

$$k_{\text{off}} = k_{\text{off},0} \exp\left(-\frac{\Delta E - k\langle x^2 \rangle}{k_{\text{B}}T}\right) = k_{\text{off},0} \exp\left(-\frac{\Delta E - k\langle v^2 \rangle/k_{\text{off}}^2}{k_{\text{B}}T}\right)$$

où  $\Delta E$  est l'énergie d'adhésion d'une liaison,  $k_{\text{off},0}$  est la valeur de  $k_{\text{off}}$  en l'absence de contrainte et  $\langle x^2 \rangle = \langle v^2 \rangle/k_{\text{off}}^2$  puisque le temps d'attache moyen d'une liaison est  $k_{\text{off}}^{-1}$ .

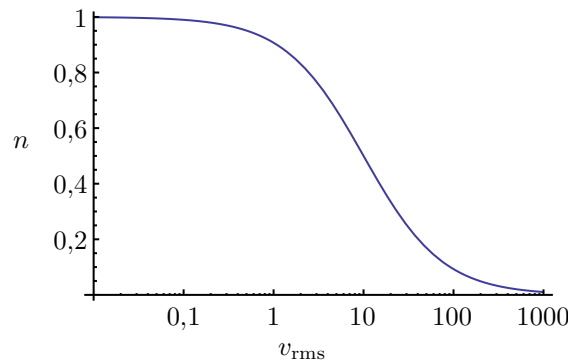


Figure 3.20 – Exemple de dépendance avec la vitesse  $v_{\text{rms}}$  du nombre  $n$  de liaisons formées, obtenue pour les valeurs numériques  $\Delta E = 50$ ,  $k = 1$ ,  $k_{\text{on}} = 1$  et  $k_{\text{off},0} = 1$ .

La force de rappel développée s'oppose au mouvement, ce que l'on traduit par un terme de friction effective  $\lambda$ . Cette friction est bien sûr fonction du nombre  $n(v_{\text{rms}})$  de liaisons formées, et augmente donc fortement lorsque la vitesse est réduite et que plus de molécules restent attachées. La dépendance de  $n$  avec  $v_{\text{rms}}$  est non linéaire, comme l'illustre la figure 3.20.

Le modèle explore deux voies différentes, l'une où le coefficient de friction cellule-substrat est fixe alors que le coefficient cellule-cellule dépend de  $n$  et donc de  $v_{\text{rms}}$  ; l'autre où la friction cellule-cellule est négligée, et la friction cellule-substrat dépend de  $n(v_{\text{rms}})$ . La figure 3.21 illustre les résultats de ces deux hypothèses. Le détail du modèle et des calculs effectués est disponible dans l'article en annexe E (dans la partie *Supplementary Information*).

Le précédent modèle suggérait des lois d'échelles pour deux régimes différents sans pouvoir fournir de transition entre les deux. Au contraire, celui que nous venons de présenter donne des caractéristiques corrélation-vitesse non monotones compatibles avec nos résultats expérimentaux, et permet ainsi de mieux cerner le rôle de la maturation des jonctions et adhésions dans le ralentissement observé.

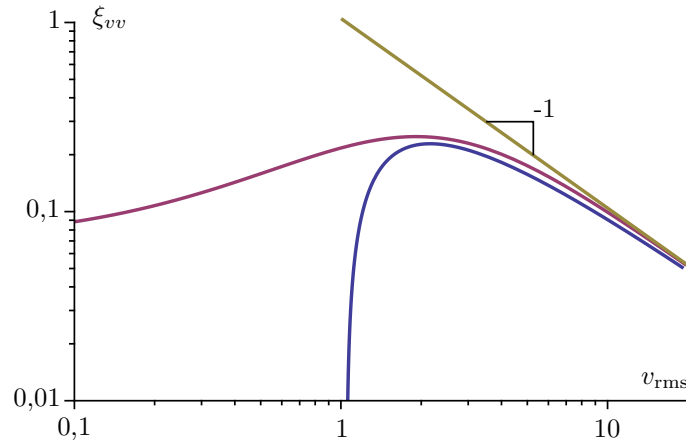


Figure 3.21 – Caractéristiques corrélation-vitesse obtenues pour le modèle aux liens glissants. La ligne kaki rappelle la relation  $\xi_{vv} \propto 1/v_{\text{rms}}$  obtenue dans la section 3.3.1 pour des forces de traction non corrélées et une friction surfacique constante dans le temps. Les deux autres courbes sont obtenues pour des forces de traction non corrélées, et une friction cellule-cellule (courbe bleue) ou cellule-substrat (courbe violette) qui dépend de la vitesse. À basse vitesse, les molécules de liaison restent attachées plus longtemps et exercent une friction croissante. Dans le premier cas, la longueur  $\xi_{vv}$  s'annule en dessous d'une vitesse  $v_{\text{rms}}$  limite. Dans le second cas,  $\xi_{vv}$  reste non nulle mais passe par un maximum marqué.

## 3.4 Différentes routes vers le ralentissement

Les considérations théoriques et les observations expérimentales précédentes permettent de relier l'évolution de la longueur de corrélation  $\xi_{vv}$  à celle de la vitesse quadratique  $v_{\text{rms}}$ , tout en suggérant des mécanismes pouvant potentiellement expliquer le ralentissement des mouvements dans la monocouche. Afin d'explorer plus avant ces hypothèses, nous avons collaboré avec Édouard HANNEZO et Jean-François JOANNY du laboratoire, ainsi que Jens ELGETI du Centre de recherche de Jülich (Allemagne) pour conduire des simulations de dynamique de particules dissipative (DPD) sur un système équivalent.

### 3.4.1 Système simulé

En s'inspirant du travail de BASAN *et al.* [69], on simule nos cellules par des sphères molles adhésives qui évoluent sur une surface plane. Chaque cellule exerce constamment une force motile de norme  $f_0$  dont la direction reste fixe pendant un temps de persistance moyen  $\tau$ , avant d'en choisir une nouvelle aléatoirement (avec une probabilité uniforme). Chaque cellule  $i$  interagit avec ses voisines via une force conservative  $\vec{F}_k$  dérivant d'un potentiel  $U = \sum U_j$  de raideur  $k$ , répulsif à courte portée et attractif à plus longue portée, de rayon d'équilibre  $r_n$  :

$$U_j(\vec{r}_{ij}) = k \left( \frac{r_n^2}{2r_{ij}^2} - \frac{r_n}{r_{ij}} \right)$$

Le mouvement des cellules est dissipé de deux manières différentes, dont les formulations sont inspirées de celles présentes dans le travail d'ESPAÑOL *et al.* [187]. Un facteur  $\lambda_{\text{cell}}$  rend compte des interactions cellule-cellule en venant amortir la composante radiale de la vitesse relative des paires de particules en contact. La force de cette interaction est modulée par un

pois  $w$  fonction de la distance  $r_{ij}$  entre les deux particules :

$$\vec{F}_{\lambda j} = -\lambda_{\text{cell}} w(r_{ij}) \left[ \vec{u}_{ij} \cdot (\vec{v}_j - \vec{v}_i) \right] \vec{u}_{ij}$$

où  $\vec{u}_{ij}$  est le vecteur unitaire dirigé de  $i$  vers  $j$ .

Un facteur  $\lambda$  décrit, lui, la friction entre cellules et substrat en opposant à chaque vecteur vitesse  $\vec{v}_i$  une force  $\vec{F}_\lambda$  :

$$\vec{F}_\lambda = -\lambda \vec{v}_i$$

Il est important de noter que ce modèle ne possède pas de mécanisme de couplage entre la direction des forces motiles des cellules et les interactions avec l'extérieur. À la différence de celui décrit dans BASAN *et al.* [69], il n'existe pas ici d'interactions explicites d'alignement à la VICSEK.

Ces éléments constituent le système simulé dont on va mesurer la longueur de corrélation  $\xi_{vv}$ , que l'on va suivre pendant qu'on fait ralentir le système.

### 3.4.2 Caractéristiques corrélation-vitesse

Le fait de travailler sur un système simulé permet d'explorer de manière indépendante plusieurs processus menant à la diminution de vitesse dans la monocouche : une augmentation au cours du temps de l'interaction entre cellules (et donc de  $k$ ), une diminution de la force de traction  $f_0$ , une augmentation de l'un ou l'autre des termes de friction ( $\lambda_{\text{cell}}$  et  $\lambda$ ), et cætera. Les résultats des simulations conduites pour ces différentes « routes » vers le ralentissement sont résumés figure 3.22, où il est possible d'observer des lois d'échelles différentes pour chaque cas.

Des contacts d'adhésion cellule-cellule de plus en plus forts se traduisent dans ce système simulé comme une augmentation de la profondeur  $k$  du potentiel  $U$  d'interaction. Le ralentissement de la monocouche via cette route se fait alors avec une loi d'échelle  $v_{\text{rms}} \propto \xi_{vv}^\alpha$  où  $\alpha \approx -1$  (voir figure 3.22a), ce qui s'accorde aux observations expérimentales. Une décroissance des forces de traction ou une augmentation de la friction effective entre cellules se traduit par une décroissance plus douce de la vitesse avec un exposant  $\alpha > -1$  (voir figures 3.22b et 3.22c). Une augmentation de la friction avec le substrat inverse la corrélation entre la longueur  $\xi_{vv}$  et la vitesse  $v_{\text{rms}}$  ( $\alpha > 0$ , voir figure 3.22d). Enfin, une augmentation de la densité provoque un ralentissement dont la loi d'échelle est très dépendante de la forme et de la profondeur du potentiel  $U$ , mais en général en dehors des exposants obtenus dans les expériences (voir figure 3.22e).

Notons que la loi d'échelle avec  $\alpha = -1$  obtenue pour l'augmentation de la profondeur  $k$  du potentiel d'interaction (figure 3.22a) est satisfaite de manière continue du début à la fin de la simulation, c'est-à-dire d'une phase fluide obtenue pour de faibles valeurs de  $k$  à une phase solide amorphe (avec effets de confinement local) obtenue pour les grands  $k$ . Cette loi donne une dépendance monotone de  $\xi_{vv}$  avec  $v_{\text{rms}}$  alors même que le système traverse une transition de *jamming*. La forme en cloche des caractéristiques corrélation-vitesse étudiées section 3.3.2 ne peut donc être expliquée sur la seule base de la maturation des adhésions cellule-cellule, mais nécessite un ingrédient supplémentaire. Au vu de nos observations, la friction avec le substrat pourrait jouer ce rôle.

### 3.4.3 Friction avec le substrat non constante

Afin de modéliser l'évolution de cette friction, il est possible de s'inspirer des résultats du modèle aux liens glissants développé section 3.3.4, et en particulier du cas où le système est

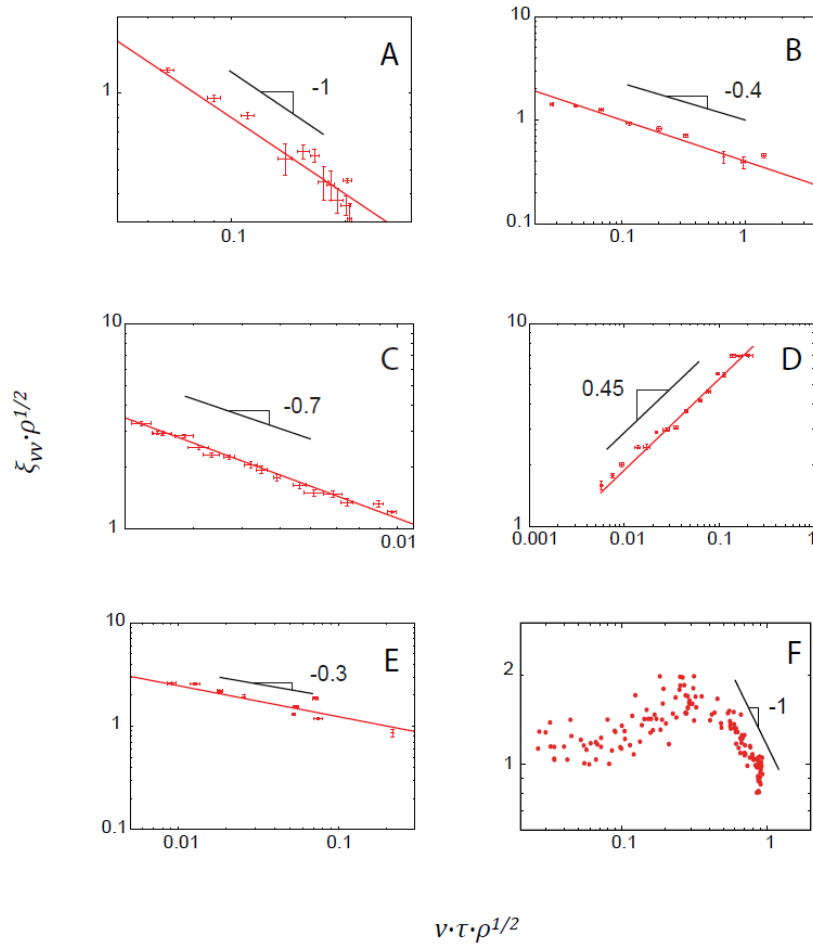


Figure 3.22 – Résultats des simulations. Ces caractéristiques corrélation-vitesse, à l'exception de la dernière, sont obtenues en faisant varier un unique paramètre. Elles sont ensuite ajustées par une loi de puissance  $v_{\text{rms}} \propto \xi_{vv}^\alpha$ . Les deux grandeurs  $\xi_{vv}$  et  $v_{\text{rms}}$  sont adimensionnées à l'aide de la distance caractéristique  $\rho^{-1/2}$  entre cellules et du temps  $\tau$  de persistance des forces motiles. Les valeurs de référence pour les paramètres gardés fixes sont les suivantes :  $k = 5$ ,  $f_0 = 1$ ,  $\lambda = 10$ ,  $\lambda_{\text{cell}} = 10$ . (a) Augmentation de l'adhésion cellule-cellule  $k$  de 0,1 à 30. (b) Diminution de la norme  $f_0$  des forces de traction de 10 à 2. (c) Augmentation de la friction cellule-cellule  $\lambda_{\text{cell}}$  de 1 à 100. (d) Augmentation de la friction cellule-substrat  $\lambda$  de 1 à 100. (e) Exemple d'une augmentation de la densité cellulaire  $\rho$  (distance  $\rho^{-1/2}$  diminuée de 1 à 0,2). (f) Augmentation de l'adhésion cellule-cellule  $k$ , avec une dépendance en  $v_{\text{rms}}$  de la friction cellule-substrat  $\lambda$ .

ralenti par une augmentation de l'adhésion entre cellules tout en ayant une friction cellule-substrat fonction de la vitesse (courbe violette de la figure 3.21). On se place à nouveau dans le cas où  $k$  augmente, en se munissant donc en outre d'un coefficient  $\lambda$  dépendant de la vitesse, et ce d'une manière non linéaire. La réalisation de cette dépendance, qui rend  $\lambda$  plus important pour les vecteurs vitesse  $\vec{v}$  de plus petite norme, est faite comme suit :

$$\lambda(v) = \lambda_0 + \lambda_1 e^{-v/v_0}$$

Cette dépendance est principalement ressentie pour les basses vitesses : le coefficient  $\lambda$  vaut ainsi  $\lambda_0$  pour de grandes vitesses, mais va augmenter de manière de plus en plus prononcée au fur et à mesure du ralentissement, jusqu'à une valeur théorique de  $\lambda_0 + \lambda_1$  à vitesse exactement nulle.

Le résultat de ces simulations, illustré figure 3.22f, est très similaire aux caractéristiques obtenues expérimentalement ainsi qu'à celles données par le modèle aux liens glissants. On retrouve bien l'allure en cloche de nos caractéristiques, ainsi que l'exposant  $\alpha$  voisin de  $-1$  observé dans le premier régime de nos expériences. Ce résultat est très robuste, particulièrement dans ce régime de grande vitesse, et est obtenu pour diverses valeurs des coefficients de friction  $\lambda_{\text{cell}}$  et  $\lambda_0$  (voir figure 3.23).

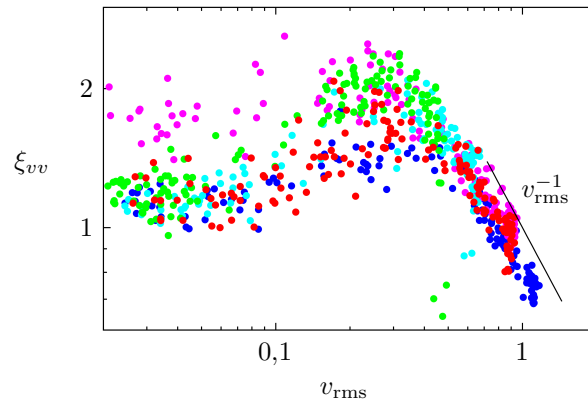


Figure 3.23 – Caractéristiques corrélation-vitesse obtenues dans le cas d'une friction avec le substrat non constante. Les couleurs correspondent à différentes valeurs des coefficients  $\lambda_{\text{cell}}$  et  $\lambda_0$  : valeurs de référence pour la courbe rouge,  $\lambda_0$  valant 0,53 fois la valeur de référence pour la courbe magenta,  $\lambda_{\text{cell}}$  valant respectivement 0,5 ; 2,5 et 5 fois la valeur de référence pour les courbes bleu foncé, cyan et verte. On retrouve quoi qu'il en soit le large pic en  $\xi_{vv}$  et la loi d'échelle aux grandes vitesses  $\xi_{vv} \propto 1/v_{\text{rms}}$ .

En conclusion, au regard des observations expérimentales et des résultats de ces considérations théoriques, il semble que l'on puisse rapprocher la forme en cloche de nos caractéristiques corrélation-vitesse réelles comme simulées d'un passage au travers d'une transition de *jamming* vers un état vitreux, due au « refroidissement » du système, c'est-à-dire une baisse de la vitesse quadratique. Ces simulations contribuent en outre à relier ce ralentissement au changement de nature de la friction effective ressentie par les cellules au cours du temps. Elles sont cohérentes avec la maturation des jonctions cellule-cellule et des adhésions cellule-substrat qui a été montrée expérimentalement.

## 3.5 Hétérogénéités dynamiques

On l'a dit, la traversée de la surface de *jamming* est associée à l'apparition d'importantes hétérogénéités dynamiques, y compris dans les systèmes cellulaires (voir sections 1.4.1 et 1.4.2). Après la longueur de corrélation, nous nous intéresserons ici à une autre quantification de celles-ci à l'aide d'agrégats rapides. Une partie des codes utilisés en ce but sont disponibles dans l'annexe C.2.

### 3.5.1 Longueur d'hétérogénéité dynamique

On identifie des « agrégats rapides », à la manière d'ANGELINI *et al.* [152], en considérant les ensembles contigus (avec une connexité 8) des 20 % de vecteurs du champ de vitesse possédant la norme la plus importante, comme illustré sur la figure 3.24.

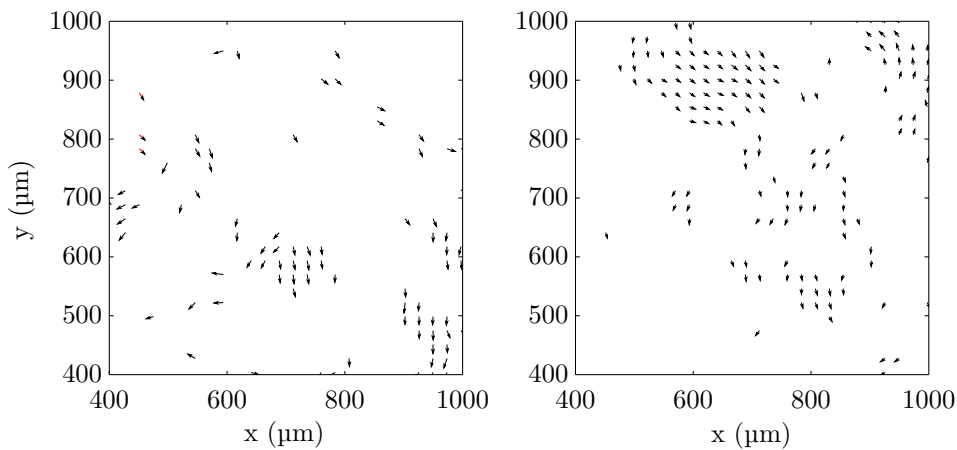


Figure 3.24 – Détail d'un champ de vitesse, à deux instants différents, où l'on ne représente que les 20 % de vecteurs vitesse les plus rapides. Le champ de vision pris en exemple se situe dans un puits avec initialement 640 000 cellules. À gauche :  $t = 25$  h. À droite,  $t = 32$  h. Pour plus de clarté, on n'a ici tracé qu'un vecteur vitesse sur quatre, d'où un maillage deux fois plus large que celui effectivement utilisé pour le calcul.

On peut alors définir, pour chaque champ de vitesse et donc à chaque instant, la longueur d'hétérogénéité dynamique  $\xi_{\text{het}}$  comme le diamètre équivalent de l'aire moyenne de ces agrégats rapides :

$$\xi_{\text{het}}(t) = \sqrt{\frac{4}{\pi} \langle A_C(t) \rangle_C}$$

Cette longueur  $\xi_{\text{het}}$  possède une évolution comparable à la longueur de corrélation  $\xi_{vv}$  précédemment calculée. En effet, comme illustré figure 3.25,  $\xi_{\text{het}}$  commence elle aussi par croître et s'infléchit plus tard pour diminuer au cours du temps. Les différentes familles de courbes peuvent à nouveau être superposées en utilisant la vitesse quadratique  $v_{\text{rms}}$  comme paramètre de contrôle.

Pour autant, cette nouvelle longueur  $\xi_{\text{het}}$  n'obéit pas à la loi d'échelle suivie par la longueur de corrélation  $\xi_{vv}$ . Alors que  $\xi_{vv}$  varie d'un facteur pouvant aller jusqu'à 3–4 dans nos analyses, la longueur d'hétérogénéité  $\xi_{\text{het}}$  ne varie que d'un facteur 1,5. Par ailleurs, si l'on considère ces



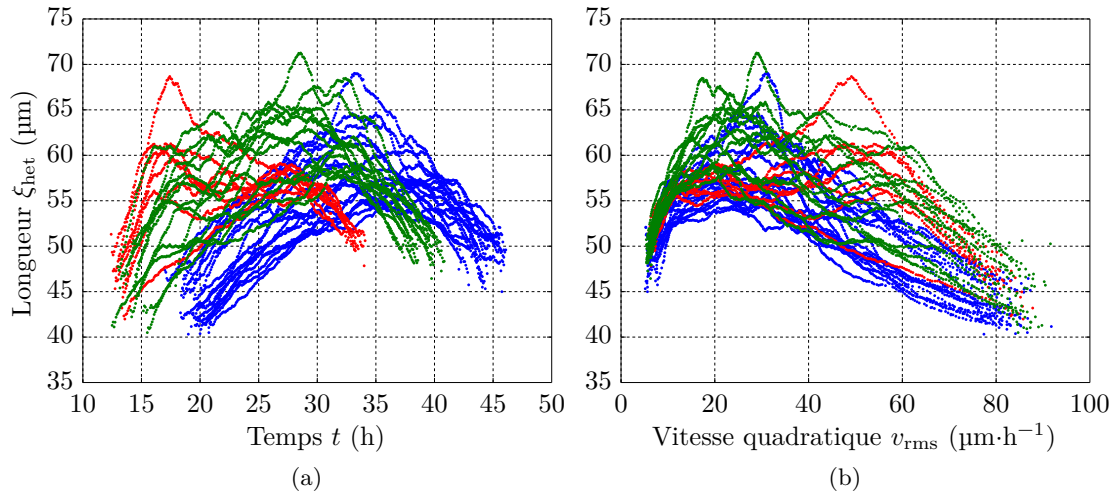


Figure 3.25 – Évolution de la longueur d’hétérogénéité  $\xi_{\text{het}}$ . Le code couleur est identique à celui utilisé précédemment. (a) Évolution de  $\xi_{\text{het}}$  en fonction du temps  $t$ , mesuré depuis le dépôt des cellules. (b) Évolution de  $\xi_{\text{het}}$  en fonction de la vitesse quadratique  $v_{\text{rms}}$ .

deux longueurs pour toutes les familles de courbes, sur un intervalle de valeurs de  $\xi_{vv}$  comprises entre 50 et 100  $\mu\text{m}$  – ce qui correspond grossièrement aux phases de montée et de descente – on obtient une dépendance affine (voir figure 3.26b). Cette dernière traduit la dynamique similaire, mais compressée, de  $\xi_{\text{het}}$  en comparaison de celle de  $\xi_{vv}$ . Cette dépendance est en accord qualitatif avec celle qui est obtenue dans les simulations et illustrée figure 3.26c, où la longueur de corrélation varie bien plus que la longueur d’hétérogénéité.

Cette montée de la longueur d’hétérogénéité  $\xi_{\text{het}}$ , que l’on trouve à la fois dans notre système expérimental et dans nos simulations, est elle aussi une signature du déplacement du système vers un état bloqué, au travers d’une transition de *jamming*.

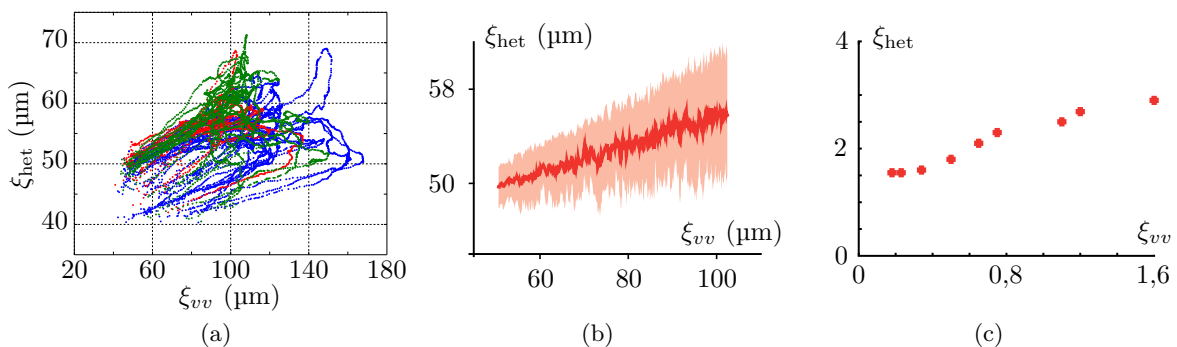


Figure 3.26 – Relation entre  $\xi_{\text{het}}$  et  $\xi_{vv}$ . (a) Dans notre système cellulaire. (b) Moyenne et écart type pour toutes les courbes. (c) Dans le système simulé avec augmentation de  $k$  mais  $\lambda$  constant.

### 3.5.2 Paramètre d'alignement

Les agrégats rapides sont définis à l'aide de la norme des vecteurs vitesse uniquement. Pour autant, il est possible de s'intéresser à l'orientation du mouvement dans ces ensembles. La mesure d'un paramètre d'alignement nous renseigne sur le fait que les hétérogénéités dynamiques trouvées en terme de module de la vitesse existent également au niveau de l'orientation du mouvement.

On commence par définir pour chaque agrégat  $C$  un paramètre d'ordre  $S_C$  pour l'orientation des  $N_C$  vecteurs qu'il contient. En s'inspirant des travaux de SZABÓ *et al.* [67], on choisit la norme de la moyenne des vecteurs unitaires ayant la même direction que les vecteurs vitesse  $\vec{v}_i$ . Si l'on note  $\theta_i$  l'angle fait pour ces vecteurs avec l'horizontale, on a :

$$S_C = \left\| \left\langle \frac{\vec{v}_i}{v_i} \right\rangle_{i \in C} \right\| = \left\| \frac{1}{N_C} \sum_{i \in C} \frac{\vec{v}_i}{v_i} \right\| = \sqrt{\langle \cos \theta_i \rangle^2 + \langle \sin \theta_i \rangle^2}$$

Ce paramètre  $S_C$  vaut 1 si tous les vecteurs de  $C$  sont exactement alignés dans la même direction, et tombe à 0 dans le cas de directions aléatoires (pour suffisamment de vecteurs). On prend ensuite la moyenne des paramètres de tous les agrégats  $C$  du champ pour en déduire un paramètre d'alignement global  $S_{\text{align}}$  pour le champ de vitesse. Des agrégats ne comprenant qu'un seul vecteur sont mécaniquement parfaitement alignés ( $S_C = 1$ ) alors qu'il est plus « difficile » d'avoir un grand agrégat avec une orientation cohérente. On choisit donc de plus donner d'importance aux grands agrégats dans le calcul de  $S_{\text{align}}$  en pondérant notre moyenne par le nombre de vecteurs  $N_C$  de l'agrégat (ou son aire  $A_C$ , ce qui est équivalent).

$$S_{\text{align}} = \frac{\sum N_C S_C}{\sum N_C}$$

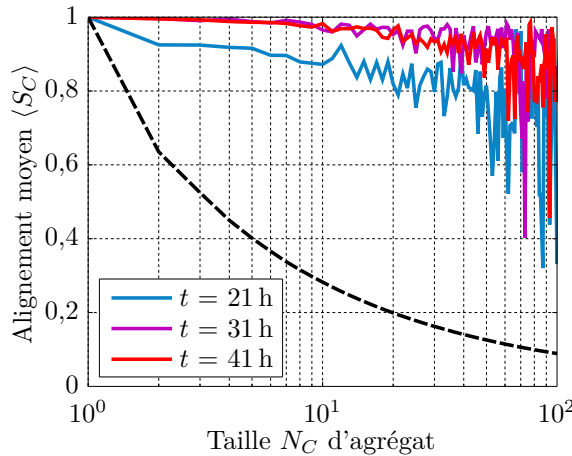


Figure 3.27 – Paramètre d'ordre moyen  $\langle S_C \rangle$  en fonction de la taille  $N_C$  de l'agrégat. La ligne pointillée représente le calcul effectué pour des agrégats simulés dont tous les vecteurs ont une direction aléatoire. Les lignes continues sont obtenues pour les agrégats expérimentaux des 18 champs de vision tirés des puits à 640 000 cellules, pour trois instants différents.

Pour la raison précédemment évoquée, des agrégats dont les vecteurs ont chacun une direction totalement aléatoire mais qui sont de petite taille ne verront pas leur paramètre  $S_C$  tomber à 0. Pour un agrégat de 100 vecteurs, des simulations nous donnent en moyenne  $\langle S_C \rangle \approx 0,1$ .

Pour autant, la mesure de ce paramètre pour quelques points expérimentaux, y compris parmi ceux censés être les moins alignés, nous confirme que les agrégats rapides sont toujours bien plus alignés que les agrégats aléatoires (voir figure 3.27). L'effet de petite taille est donc bien négligeable dans notre mesure.

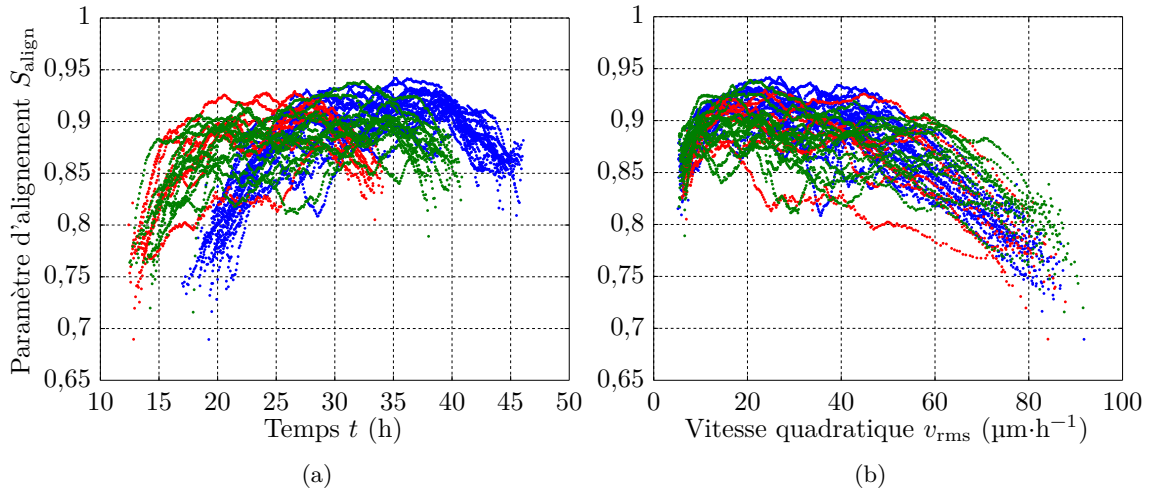


Figure 3.28 – Paramètre d'alignement  $S_{\text{align}}$ . (a) Évolution de  $S_{\text{align}}$  en fonction du temps  $t$ , mesuré depuis le dépôt des cellules. (b) Évolution de  $S_{\text{align}}$  en fonction de la vitesse quadratique  $v_{\text{rms}}$ .

On voit que la montée de  $S_{\text{align}}$  est synchronisée avec celle de  $\xi_{vv}$  (voir figure 3.28a) et contrôlée par la vitesse quadratique  $v_{\text{rms}}$  (voir figure 3.28b).  $S_{\text{align}}$  décrit un plateau bien marqué lorsque sa croissance s'achève, et ne redescend quasiment pas par la suite. La mesure de ce paramètre permet d'affirmer que les agrégats rapides, sélectionnés pour cette dernière propriété et dont la taille croît, sont également de plus en plus alignés. Les hétérogénéités dynamiques dans le système se retrouvent donc aussi au niveau de l'orientation.

### 3.6 Trajectoires virtuelles

La PIV est une technique très utile, mais elle ne permet pas le suivi de cellules individuelles. Or, l'obtention de trajectoires de particules permet d'obtenir d'autres renseignements sur le système concernant les interactions entre cellules ou la persistance du mouvement de celles-ci. Notamment, le calcul du déplacement carré moyen (MSD) de ses particules  $p$ , défini plus bas, permet de nous renseigner sur le caractère diffusif ou non du système. En effet, l'ajustement de cette grandeur en fonction de l'écart de temps  $\delta t$  par une loi de puissance nous permet d'obtenir un exposant  $\alpha$  caractéristique du régime de mouvement des particules :

$$MSD(\delta t) = \left\langle \left[ \vec{r}_p(t + \delta t) - \vec{r}_p(t) \right]^2 \right\rangle_{p,t} \stackrel{\text{aj.}}{=} K \delta t^\alpha$$

Ainsi, une valeur  $\alpha = 2$  correspond à un comportement balistique, c'est-à-dire des parcours en ligne droite n'interagissant pas sur la durée de mesure, alors qu'une valeur  $\alpha = 1$  est la signature d'un mouvement diffusif, obtenu entre autres pour un mouvement dont la direction change aléatoirement au cours du temps.

À défaut de pouvoir réellement suivre les déplacements de nos cellules individuellement, on peut utiliser les champs de vitesse obtenus par PIV pour simuler les trajectoires de particules virtuelles, en incrémentant pas à pas leur position. Le code utilisé pour ce calcul est disponible dans l'annexe C.3. On obtient des trajectoires simulées (voir figure 3.29) pour plusieurs centaines de particules virtuelles.

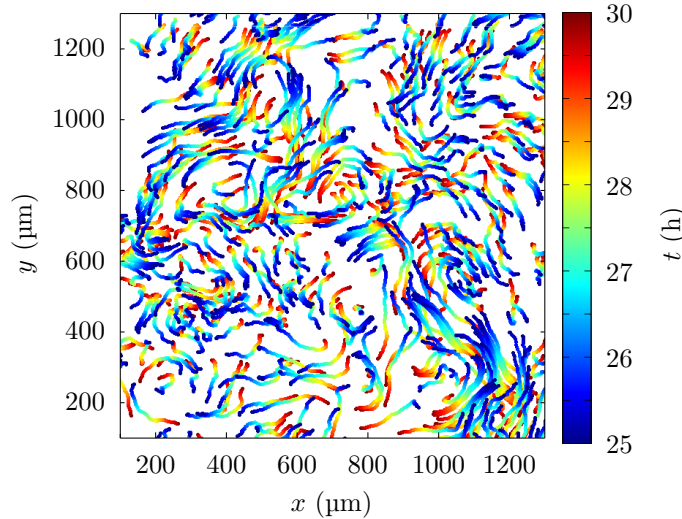


Figure 3.29 – Exemples de trajectoires obtenues entre  $t = 25$  h et  $t = 30$  h pour des particules virtuelles se mouvant dans le champ de vitesse obtenu par PIV sur un champ de vision.

Cependant, le bruit des champs de vitesse se cumulant à chaque pas de temps, nous nous limitons à des échantillons de durée 5 h pour nos calculs de MSD, dont quelques résultats sont illustrés figure 3.30a.

Pour chaque échantillon, centré sur l'instant  $t$ , on récupère ensuite par ajustement l'exposant  $\alpha(t)$  de la loi de puissance. Les résultats de ces calculs, pour les différents nombres initiaux de cellules dans le puits, sont illustrés figure 3.30b.

De manière surprenante, on observe un exposant  $\alpha$  bien supérieur à 1 sur toute la durée de l'expérience, ce qui implique que les trajectoires restent surdiffusives. L'exposant  $\alpha$  est même très proche de 2, signifiant que le mouvement dans le système est quasi-balistique sur la totalité des champs analysés. Cette observation inattendue suggère que les phénomènes faisant varier les cellules de direction ont une influence minimale sur un temps de parcours de 5 h.

Un mouvement balistique est habituellement le signe d'une absence d'interaction entre particules, comme par exemple dans un gaz sur le temps de libre parcours moyen. Pour autant, nous avons vu que nos cellules montrent bien des mouvements collectifs dans nos expériences, donc l'hypothèse de cellules qui ne se « voient » pas n'est pas réaliste ici. On peut en revanche spéculer que ces mouvements collectifs renforcent les trajectoires individuelles de nos cellules sous forme de courants multicellulaires, qui ne se retrouvent pas facilement déviés sur ces durées. Cet exposant commence à décroître à la fin de nos analyses, et tendra probablement vers un mouvement plus diffusif caractéristique des phénomènes de confinement local (*caging*).

Notre système est donc plus complexe qu'il n'y paraît et, afin de le caractériser plus complètement, nécessiterait une étude plus poussée des trajectoires réelles des cellules dans la population, qui permettrait notamment un suivi sur des temps plus longs.

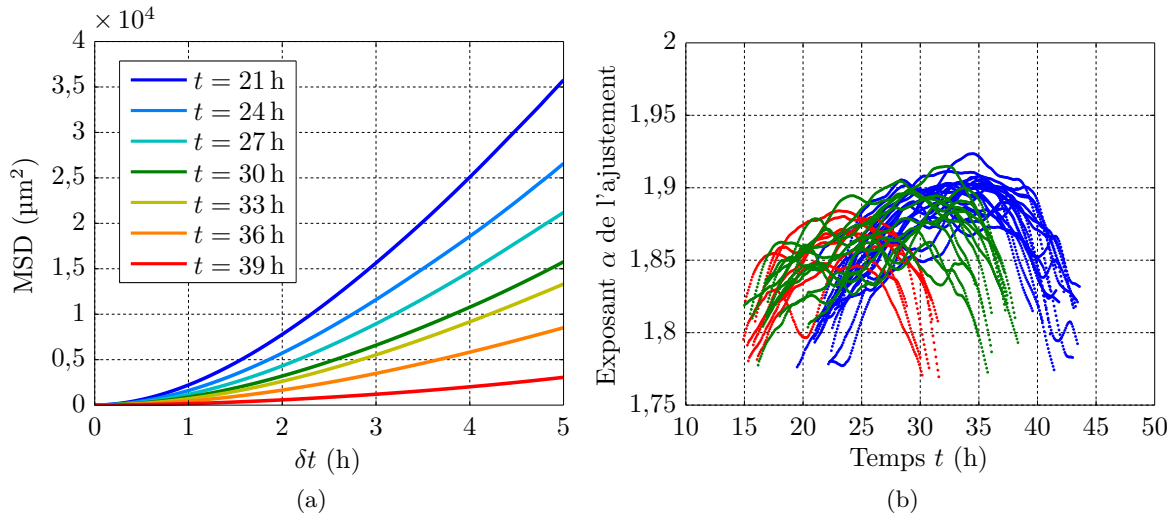


Figure 3.30 – Déplacements carrés moyens. (a) Exemples de courbes  $MSD(\delta t)$  à différents instants pour les trajectoires simulées sur un champ de vision. (b) Exposant  $\alpha$  obtenu lors de l'ajustement  $MSD(\delta t) = K\delta t^\alpha$ .

### 3.7 Différents types cellulaires

Les cellules HBEC utilisées ici sont très peu cohésives, se déplacent individuellement à la manière de kératinocytes au début de l'expérience, puis de manière plus corrélée plus tard. On peut légitimement se demander si les mêmes analyses que celles décrites dans ce chapitre, menées sur des tissus très cohésifs ou à l'inverse sur des fibroblastes, donneraient des résultats compatibles avec nos conclusions.

Ainsi, en analysant les champs de vitesse de populations MDCK très denses après la confluence de l'ensemble du champ de vision et avant que les délaminations soient trop nombreuses et empêchent le calcul des champs de vitesse, on obtient les caractéristiques illustrées sur la figure 3.31. On observe uniquement une phase où la longueur de corrélation comme la vitesse quadratique décroissent de manière monotone, qualitativement comparable au second régime observé pour les cellules HBEC. Ces résultats, interprétés à la lumière du modèle présenté section 3.3.1, suggèrent que l'on se situe dans une phase où la friction effective ressentie par les cellules est dominée par les interactions cellule-cellule, ce qui est cohérent avec un type cellulaire très cohésif tel que les MDCK.

À l'opposé, si l'on s'intéresse plutôt à des cellules NIH/3T3, c'est-à-dire des fibroblastes qui témoignent de peu d'interactions entre cellules, on obtient les caractéristiques illustrées sur la figure 3.32. On observe une montée analogue à celle obtenue dans le cas des cellules HBEC. Cette montée est suivie par un plateau où  $\xi_{vv}$  devient indépendante de  $v_{\text{rms}}$ , ce que l'on peut interpréter à l'aide du modèle comme une situation où la friction reste dominée par les adhésions cellule-substrat, les cellules étant fibroblastiques, mais où les forces motiles deviennent corrélées en raison de la proximité des cellules. Les plateaux et les pentes obtenues pour ces caractéristiques sont différents selon les champs de vision, ce qui donne des caractéristiques moins unifiées que dans le cas des cellules HBEC. Cependant, le type cellulaire NIH/3T3 est connu pour développer un ordre nématique en se densifiant [176], ce qui rend ce système plus complexe et le fait peut-être sortir du cadre de notre modèle analytique. Les coefficients obtenus pour les différentes

pentent restent toutefois compatibles avec un exposant proche de  $-1$  comme pour les cellules HBEC.

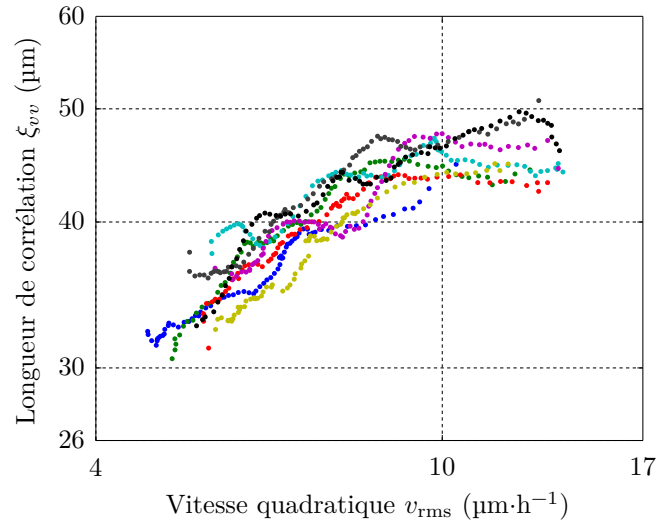


Figure 3.31 – Caractéristiques corrélation-vitesse pour des monocouches de MDCK surconfluentes. 8 champs de vision imagés avec  $\delta t = 15$  min, une couleur par champ.

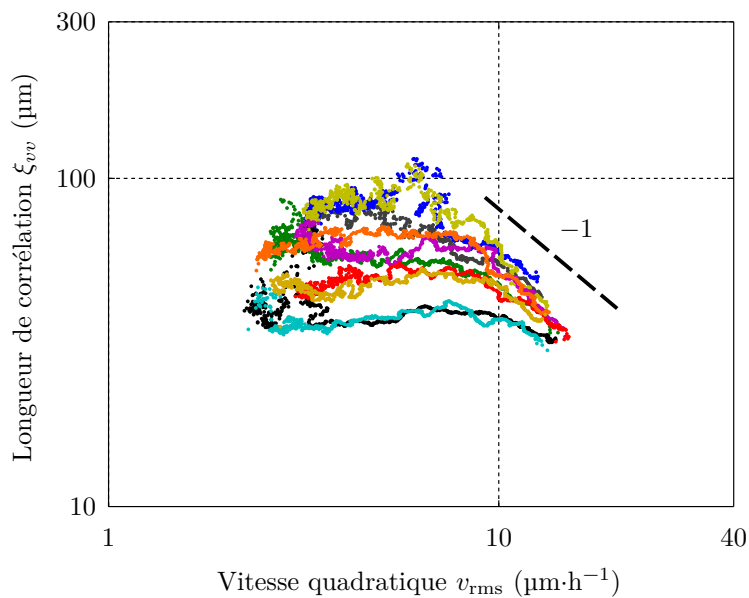


Figure 3.32 – Caractéristiques corrélation-vitesse pour des monocouches de NIH/3T3. 10 champs de vision imagés avec  $\delta t = 5$  min, une couleur par champ.

Ces deux lignées ne sont que quelques exemples de systèmes cellulaires que l'on peut étudier à l'aide de ce cadre de réflexion. Il serait intéressant de passer en revue une multitude de types cellulaires différents pour en tirer des allures communes et interpréter celles-ci à l'aide de notre modèle.

## Conclusion

Au terme de cette étude, nous avons montré qu'un ralentissement se produit dans nos populations de cellules. Simultanément, on observe que la longueur de corrélation du mouvement augmente, puis diminue à nouveau. D'autres indices rappellent les phénomènes vus dans les systèmes soumis à une transition de *jamming*, comme la présence d'hétérogénéités dynamiques et statiques dans le système.

On établit que le système ne subit pas une transition de phase classique entre liquide et solide. Il se change en système amorphe via une transition de *jamming* contrôlée non pas par la densité cellulaire dans le tissu mais par la vitesse quadratique  $v_{\text{rms}}$ , analogue d'une température effective et mesure de l'activité du système. Ce contrôle se traduit par une relation très reproductible entre longueur de corrélation et vitesse.

Notre méthodologie complète, combinaison d'études expérimentales, d'analyses théoriques et de simulations, nous permet de mettre en évidence que le ralentissement du système est dû à la maturation des contacts entre les cellules et leur environnement, qui provoque un changement de nature de la friction effective qu'elles ressentent.

L'utilisation d'autres lignées de cellules permettent d'obtenir des caractéristiques corrélation-vitesse différentes, mais compatibles avec le modèle analytique. Il faudrait désormais mener ces calculs sur une variété encore plus grande de types cellulaires afin d'éventuellement pouvoir les classer en grandes familles. De manière plus générale, ces analyses pourraient même être appliquées à d'autres dispositifs actifs bidimensionnels pour en évaluer la versatilité et tenter de rapprocher certaines monocouches cellulaires de systèmes classiques mieux connus.

Par ailleurs, puisque l'évolution de la longueur de corrélation est due à un vieillissement du système qui influence la friction que ressentent les cellules, jouer sur cette dernière pourrait permettre de comprendre plus en détail le rôle joué par les jonctions et adhésions. Par exemple, il serait possible de refaire ces expériences sur des substrats dont la surface est différemment traitée en faisant par exemple varier la concentration de matrice extracellulaire pour observer les modifications de comportement.

Afin de mieux appréhender les éléments du modèle, il serait également possible de mener des mesures de force sur le système ou encore d'envisager des substrats de différentes rigidités. Enfin, il serait intéressant de vérifier si les conclusions tirées dans cette étude peuvent se transférer, et si oui avec quelles adaptations, au cas tridimensionnel.

## Chapitre 4

# Compétition pour l'espace entre types normal et transformé

### Sommaire

---

<b>4.1</b>	<b>Étude préliminaire</b> . . . . .	<b>104</b>
4.1.1	Caractérisation des types individuels . . . . .	104
4.1.2	Populations en co-culture . . . . .	104
4.1.3	Expériences de migration antagoniste . . . . .	106
<b>4.2</b>	<b>Position et largeur des fronts</b> . . . . .	<b>107</b>
4.2.1	Profils de front . . . . .	107
4.2.2	Quantification . . . . .	109
4.2.3	Dynamique des fronts . . . . .	111
<b>4.3</b>	<b>Étude du champ de vitesse</b> . . . . .	<b>113</b>

---



Dans ce chapitre quart, le lecteur trouvera le compte-rendu d'un travail plus prospectif qui a été mené durant cette thèse. Il s'agit du développement de techniques d'analyse pour l'étude systématique d'une situation de mise en compétition entre cellules normales et transformées. Nous avons utilisé pour ce travail des lignées de HEK-HT normales et transformées  $Ras^{V12}$ , respectivement fluorescentes GFP et mCherry (voir section 2.1.1) sur des substrats de verre nu.

On donnera une étude succincte des deux types en co-culture, suivie d'une présentation des expériences de migration antagoniste utilisées ici, et enfin une description détaillée des techniques ayant été développées pour les analyser et des résultats obtenus.

Les expériences décrites ici ont pour partie été menées avec l'aide d'Isabelle BONNET et de Sarah MOITRIER, chercheuses dans l'équipe.

## 4.1 Étude préliminaire

### 4.1.1 Caractérisation des types individuels

Sophie BAGUR, stagiaire dans l'équipe, a effectué des mesures d'absorbance effectuées sur des suspensions obtenues à partir de monocouches de cellules à divers pas de temps. Elles lui ont permis, en ajustant ses résultats par une fonction exponentielle, de quantifier les temps de division de chaque type. Elle a ainsi déterminé que ces derniers valaient respectivement environ 20 h pour le type normal et 17 h pour le type transformé  $Ras^{V12}$ .

Des expériences de migration nous ont également permis d'imager en contraste de phase les deux types en jeu. En se plaçant à distance du bord en migration, nous avons analysé par PIV l'intérieur (*bulk*) des deux tissus et calculé leur longueur de corrélation à la manière de PETITJEAN *et al.* [20]. On trouve des longueurs de corrélation  $\xi_{vv}$  de l'ordre de 15 à 30  $\mu\text{m}$  pour les deux types, soit 1 à 2 rayons cellulaires, ce qui témoigne d'un mouvement peu collectif des cellules loin du bord en migration.

### 4.1.2 Populations en co-culture

Au contraire d'autres systèmes, la cohabitation entre cellules HEK-HT normales et transformées ne semble pas donner lieu à une ségrégation d'envergure (*cell sorting*), y compris plusieurs jours après avoir étéensemencées de manière homogène (voir figure 4.1).

Pour confirmer cette observation de manière quantitative, on réalise des co-cultures de cellules HEK-HT à partir d'un mélange homogène à volume égal de suspension cellulaire pour les deux types. On suit en contraste de phase et en fluorescence l'évolution du système pendant plusieurs jours. Après un filtre passe-haut corrigeant un éclairage inhomogène, on seuille pour chaque type cellulaire les images de fluorescence avec la méthode de LI. On obtient des cartes binaires où la valeur 1 est donnée aux pixels où des cellules du type sont présentes, les autres pixels valant 0. On réduit la taille de nos cartes binaires tout en s'affranchissant des petits défauts via une approche à gros grains (*coarse graining*). On divise nos images en sous-fenêtres de taille  $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$  (soit environ la taille d'une cellule), et on attribue à chacune la valeur 0 ou 1 la plus présente. On obtient ainsi une nouvelle carte binaire  $\varphi(\vec{r})$  où chaque pixel correspond en taille à une cellule.

On calcule ensuite la longueur d'autocorrélation spatiale pour  $\varphi - \langle \varphi \rangle_{\vec{r}}$ , la soustraction de la valeur moyenne permettant d'obtenir une corrélation nulle à longue distance (voir figure 4.2). On obtient environ 30  $\mu\text{m}$  pour le tissu normal et environ 20  $\mu\text{m}$  pour le tissu transformé 4 jours après dépôt. Ces tailles sont à comparer à celles obtenues lorsque la co-culture est très peu

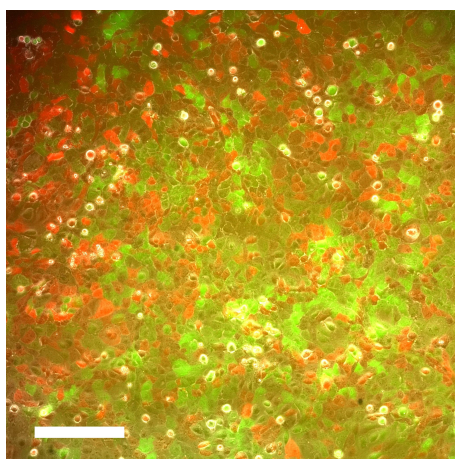


Figure 4.1 – Image d’une co-culture de cellules HEK-HT normales (en vert) et transformées  $Ras^{V12}$  (en rouge),  $t = 72,2$  h après le dépôt des cellules en mélange homogène. On n’observe pas de phénomène de ségrégation macroscopique. Barre d’échelle :  $300 \mu\text{m}$ .

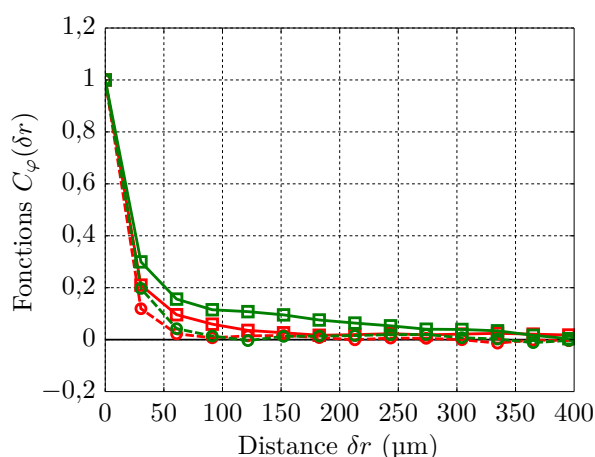


Figure 4.2 – Fonctions  $C_\varphi(\delta r)$  d’autocorrélation radiale obtenues pour  $\varphi - \langle \varphi \rangle_{\vec{r}}$  aux instants  $t = 12,2$  h (cercles et pointillés) et  $t = 92,2$  h (carrés et traits pleins) après ensemencement de la co-culture à basse densité. Les fonctions obtenues pour le tissu normal sont en vert, celles obtenues pour le tissu transformé  $Ras^{V12}$  en rouge. On observe que les longueurs de corrélation correspondantes augmentent de manière très limitée.

dense et les cellules individuelles : environ  $20 \mu\text{m}$  pour le tissu normal et  $15 \mu\text{m}$  pour le tissu transformé. Ces tailles de domaines homogènes pour chaque lignée cellulaire après plusieurs jours sont toujours de l’ordre du rayon cellulaire (les cellules du type normal étant légèrement plus étalées que celles du type transformé) et correspondent en conséquence à des agrégats de quelques cellules au plus, sans doute imputables à la division. On a donc deux populations qui restent bien mélangées, à la manière de deux liquides miscibles.

RANFT *et al.*, dans [121], ont cependant montré que cette situation n’excluait pas une compétition lorsque les deux types cellulaires sont mis face à face. On reproduit donc une géométrie dans laquelle les deux types de cellules sont initialement séparés pour être ensuite mis en contact.

### 4.1.3 Expériences de migration antagoniste

On étudie la compétition pour l'espace entre les deux types cellulaires en utilisant des chambres à deux compartiments séparés par une barrière en silicone de 400  $\mu\text{m}$  de large (voir figure 2.1). On cultive les cellules à confluence dans les chambres avant de retirer ces dernières du substrat. Les deux populations de cellules peuvent alors migrer sur la surface ainsi libérée, à la manière d'une expérience de cicatrisation de blessure modèle (voir section 1.2.2).

On s'intéresse ici à la migration antagoniste des deux populations sur la surface libre qui les sépare. Comme l'illustrent la figure 4.3 et la vidéo en annexe A.2, on observe qu'une fois la séparation enlevée, les deux tissus entament leur migration l'une vers l'autre jusqu'à entrer en contact. Cette migration se fait de manière plus individuelle pour les cellules transformées  $Ras^{V12}$  que pour les cellules normales, qui semblent plus cohésives et dont le front est visuellement moins rugueux. Certaines cellules transformées se détachent même temporairement de la monocouche pendant ce mouvement.

Les deux populations entrent alors en contact pour établir une interface autour de laquelle elles se mélangent de manière limitée. Cependant, le mouvement du système ne s'arrête pas là mais entre dans un nouveau régime : on observe ensuite que les cellules transformées continuent leur avancée alors que les cellules normales reculent.

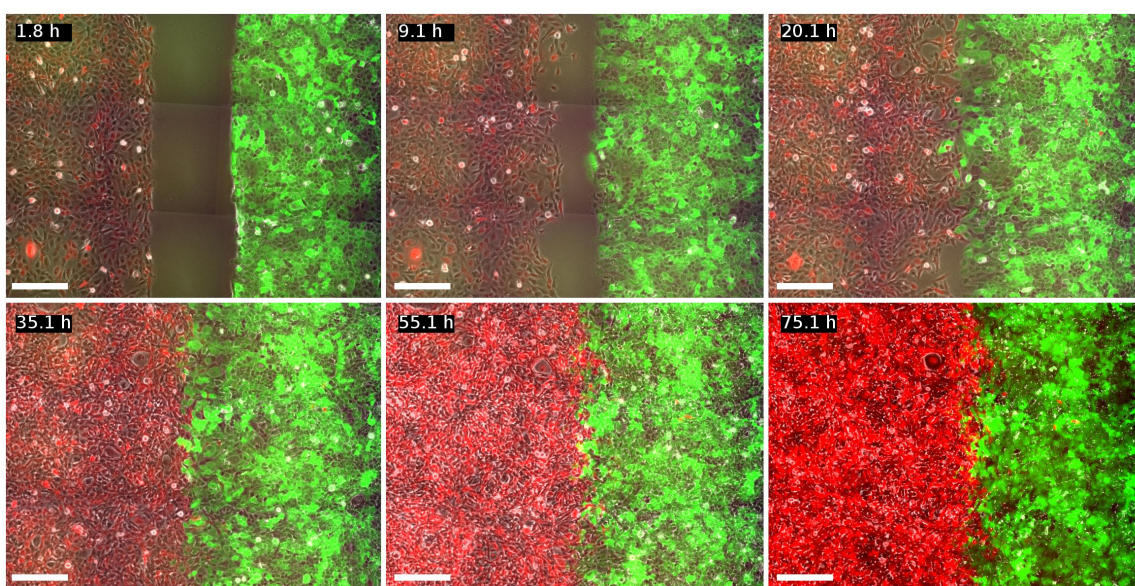


Figure 4.3 – Détail d'une expérience de migration antagoniste. Les cellules normales sont en vert, les cellules transformées  $Ras^{V12}$  en rouge. Le temps  $t$  est mesuré depuis le retrait de la chambre. Barre d'échelle : 300  $\mu\text{m}$ . La vidéo correspondant à cette expérience est disponible annexe A.2.

En imageant les deux populations au microscope confocal, on peut voir que les deux monocouches sont d'une épaisseur comparable au niveau de l'interface après le contact (voir figure 4.4).

On arrête les expériences vers  $t = 75$  h. En effet, aux temps plus longs, le tissu de cellules HEK-HT  $Ras^{V12}$  a tendance à former des structures tridimensionnelles qui dépeuplent le substrat, ce qui nous fait sortir du cadre d'étude (voir figure 4.5). Ce comportement est également observé pour ce type cellulaire en culture lorsque la densité devient trop importante.

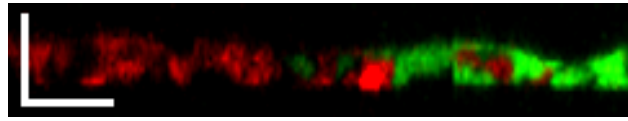


Figure 4.4 – Coupe confocale d'un des systèmes au niveau de l'interface à  $t = 51,6$  h. Barres d'échelle :  $25 \mu\text{m}$ .

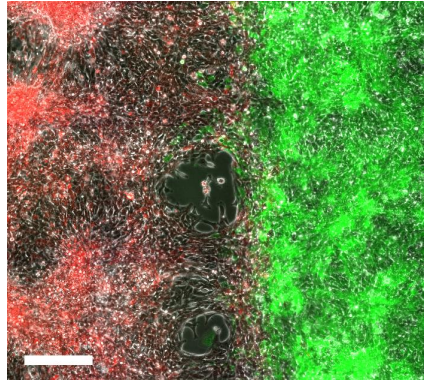


Figure 4.5 – Image prise à  $t = 104$  h où l'on voit apparaître des trous et des structures tridimensionnelles dans le tissu transformé  $Ras^{V12}$ . En conséquence, nos expériences sont arrêtées vers  $t = 75$  h. Barre d'échelle :  $300 \mu\text{m}$ .

## 4.2 Position et largeur des fronts

On cherche maintenant à établir une méthode objective d'analyse de ces expériences de migration antagoniste, qui permette de quantifier les observations précédentes pour les deux phases de nos expériences, avant et après contact.

### 4.2.1 Profils de front

Si les fronts des populations ne restent pas parfaitement rectilignes lors de leur avancée, rien ne distingue pour autant *a priori* les conditions dans lesquelles les cellules évoluent. Pour une barrière suffisamment longue, on peut donc considérer notre système comme invariant dans la direction transverse à celle de la migration. Dès lors, il est tentant de décrire notre système de manière unidimensionnelle.

On peut pour cela s'inspirer de la description faite par RANFT *et al.* [121] sous la forme d'une fraction surfacique  $\phi$  (voir section 1.3.3). Expérimentalement parlant, il est cependant difficile de définir avec exactitude cette fraction surfacique du fait de l'absence d'un procédé de segmentation du tissu véritablement efficace. Pour autant, on peut garder en tête cette approche pour obtenir des profils de front exploitables pour nos populations de cellules.

Ainsi, on fait le choix de partir des images en fluorescence pour établir un profil unidimensionnel dans la direction  $x$  de migration. On leur applique un filtre passe-haut afin de corriger un éclairage inhomogène du champ de vision (voir figures 4.6a et 4.6b). On effectue ensuite une projection le long de la direction transverse  $y$  en sommant les valeurs de pixels sur la totalité de chaque colonne, soit sur une longueur allant typiquement de 1 à 3 mm pour récupérer un profil dans la direction  $x$ . Notons que la rugosité de la ligne contribue au profil obtenu. Pour des raisons pratiques, on fait précéder l'étape de projection d'un seuillage automatique par la méthode de LI (voir figure 4.6c) qui, bien qu'elle gomme en partie la réalité physique du système, rend

la suite de l'analyse plus robuste (notamment la phase d'ajustement, voir section 4.2.2) sans pour autant changer nos résultats de manière significative. La figure 4.7 illustre les différents profils obtenus avant le filtrage passe-haut (en bleu), après celui-ci (en violet), ainsi qu'après la binarisation (en rouge).

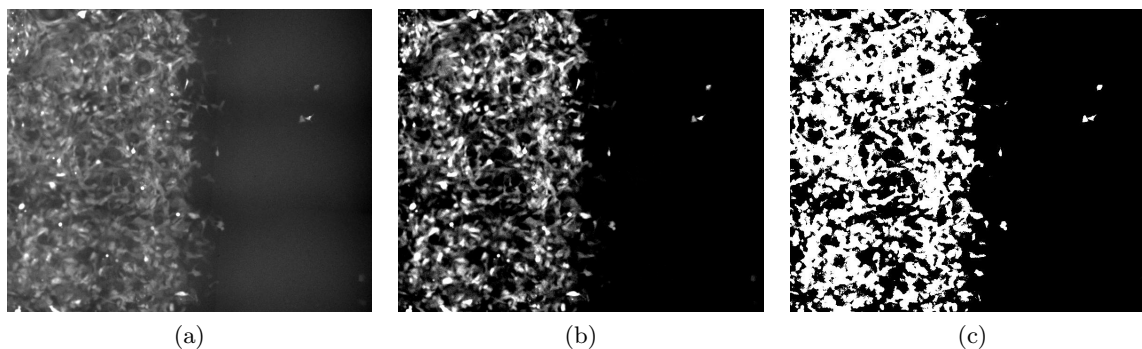


Figure 4.6 – Traitement des images de fluorescence. (a) Exemple d'image en fluorescence mCherry obtenue pour une population  $Ras^{V12}$ . (b) La même image après un filtrage passe-haut. (c) Résultat du seuillage de l'image précédente par la méthode de LI.

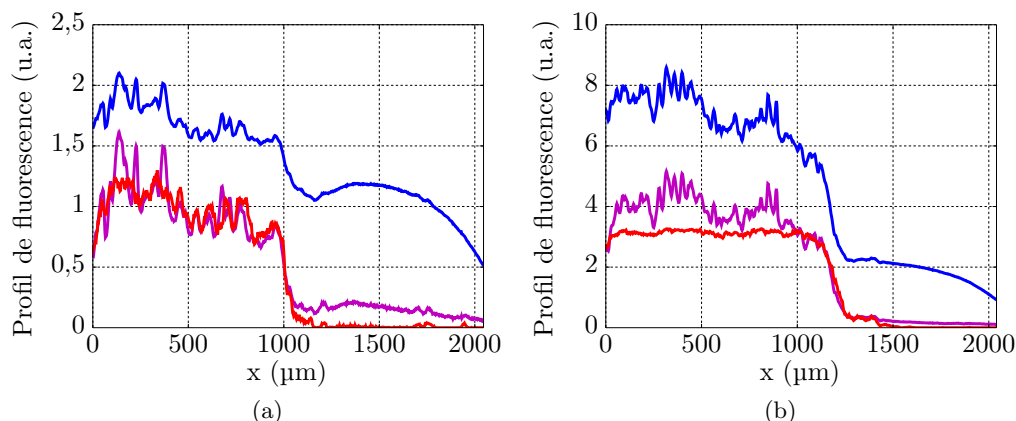


Figure 4.7 – Comparaison des profils de fluorescence obtenus avec le signal non traité (en bleu), après filtrage passe-haut (en violet) et seuillage par la méthode de LI (en rouge). Les unités sont arbitraires. Le profil du signal non traité a été déplacé vers l'origine selon l'axe des ordonnées par commodité de la représentation : en pratique, son niveau bas est 5 fois plus important. (a) Tissu transformé  $Ras^{V12}$  pour une expérience à  $t = 23,6$  h. (b) Tissu transformé  $Ras^{V12}$  pour une autre expérience à  $t = 72,1$  h.

En effectuant ce traitement à chaque pas de temps  $t$ , on peut obtenir un kymographe pour chaque signal de fluorescence, qui nous renseigne sur l'évolution moyenne de la population correspondante. On peut ensuite combiner ces kymographes pour confronter le mouvement des deux monocouches.

Sur la figure 4.8, les observations formulées plus tôt se retrouvent de manière évidente : on voit l'apparition d'une zone de superposition qui correspond au mélange des deux tissus au niveau de leur interface. La population normale, après avoir migré en direction de la surface libre,

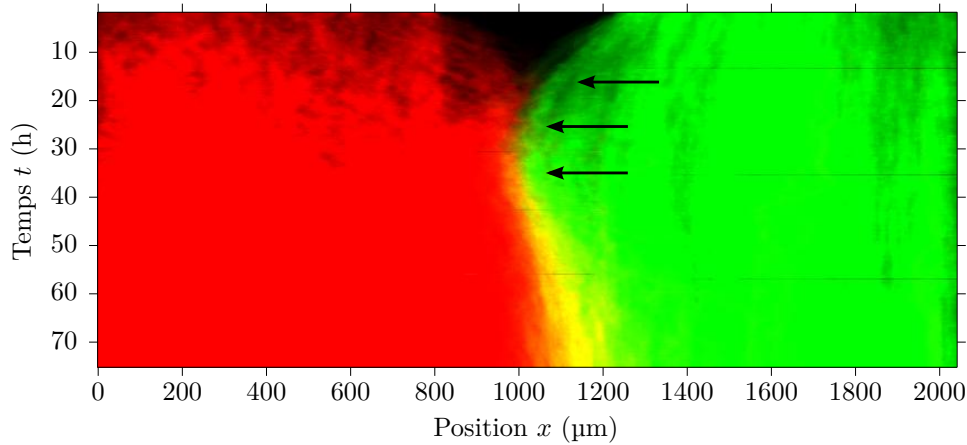


Figure 4.8 – Exemple de kymographe obtenu pour les deux signaux de fluorescence seuillés puis moyennés sur la direction transverse  $y$ . En vert, le signal GFP des cellules normales. En rouge, le signal mCherry des cellules transformées  $Ras^{V12}$ . Les trois flèches successives désignent approximativement les instants, dans l'ordre, de premier contact entre les monocouches, de fusion de celles-ci et enfin de début de recul de la population normale.

fait demi-tour après contact avec la population transformée, ce qui traduit bien le phénomène de recul observé précédemment.

#### 4.2.2 Quantification

Pour quantifier nos observations, on mesure séparément chaque profil de front. En raison d'une inhomogénéité intrinsèque des niveaux d'expression de fluorescence dans la population, le seuillage ne garde pas la totalité des cellules dans l'image binaire. On pallie ce manquement en divisant le profil par son maximum, qui est ainsi ramené à une valeur 1 signifiant la présence de cellules partout dans la zone concernée.

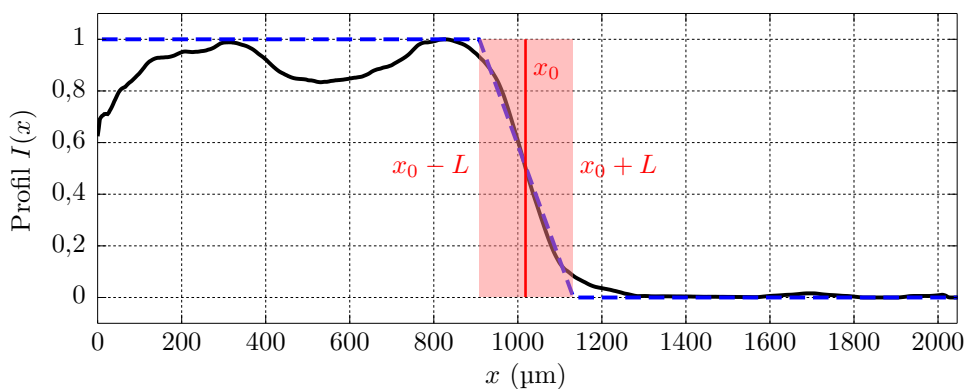


Figure 4.9 – Le profil  $I(x)$  obtenu à partir des images de fluorescence (en noir) est ajusté par une fonction à décroissance linéaire (en pointillés bleus) pour obtenir la position centrale  $x_0$  et la largeur  $2L$  du front.

Pour chaque pas de temps, ce profil  $I(x)$  est ensuite ajusté par une fonction à deux paramètres permettant de définir à la fois une position centrale  $x_0$  (telle que  $I(x_0) = \frac{1}{2}$ ) et une largeur  $2L$

pour le front. On utilise une fonction très simple, valant 1 avant  $x_0 - L$ , 0 après  $x_0 + L$ , et progressant linéairement entre les deux.

Afin de faciliter l'ajustement des profils et éviter une surestimation de la largeur  $2L$ , on les lisse au préalable par moyenne glissante. La taille de fenêtre choisie pour ce lissage a une influence loin d'être négligeable sur le calcul de la largeur du front. On en teste plusieurs pour choisir le meilleur compromis, soit pour notre système une taille de  $132\ \mu\text{m}$ .

Les kymographes précédemment obtenus peuvent donc être quantifiés au moyen de ces deux quantités que sont la position  $x_0$  et la largeur  $2L$  du front et traduire numériquement les observations qualitatives précédemment formulées. Les figures 4.10 (pour une expérience représentative) et 4.11 (où l'on a fait la moyenne de nos résultats) illustrent le résultat de ces mesures au cours du temps dans notre système expérimental.

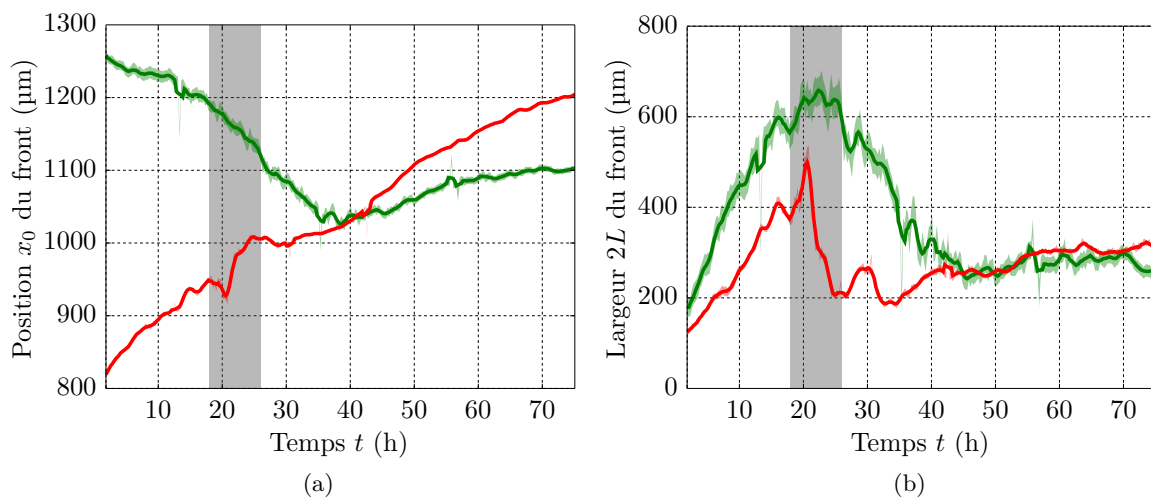


Figure 4.10 – Évolution dans le temps des deux fronts de population pour l'expérience de la figure 4.8 : en vert, les cellules normales ; en rouge, les cellules transformées  $Ras^{V12}$ . Les courbes représentent les valeurs ajustées moyennées avec une fenêtre glissante de durée 1 h. Les aplats de couleur correspondent aux intervalles de confiance à 95 % obtenus lors de l'ajustement (non lissés). L'intervalle de temps grisé correspond approximativement à la mise en contact macroscopique des deux monocouches cellulaires. (a) Position centrale  $x_0$  des fronts en fonction du temps  $t$ , mesuré depuis le retrait de la chambre. (b) Largeur  $2L$  des fronts.

Juste après le retrait de la barrière, les cellules du bord commencent à avancer vers la surface libre, comme l'indiquent l'augmentation de  $x_0$  pour le tissu transformé  $Ras^{V12}$  et sa diminution pour le tissu normal, ce qui entraîne également un élargissement du front (voir figure 4.11). Cette augmentation de  $2L$  continue pendant la migration des deux fronts antagonistes (qui se traduit par le rapprochement de leur position centrale  $x_0$ ).

Par la suite, alors qu'elles sont en migration, les deux populations entrent en contact (zones grisées sur la figure 4.10) et les fronts se raidissent ( $2L$  diminue). On observe alors que si le front de cellules  $Ras^{V12}$  continue à avancer, le front de cellules normales fait lui demi-tour (après  $t = 35$  h sur la figure). On a donc un  $x_0$  croissant pour les deux tissus, tandis que les largeurs de front se stabilisent.

Il est important de remarquer que, les profils analysés n'étant pas de réelles fractions surfaciques et étant obtenus de manière indépendante pour chaque canal de fluorescence, la position

centrale  $x_0$  des deux fronts ne coïncide pas forcément et ce même après que les tissus sont entrés en contact. Leurs valeurs restent toutefois relativement proches.

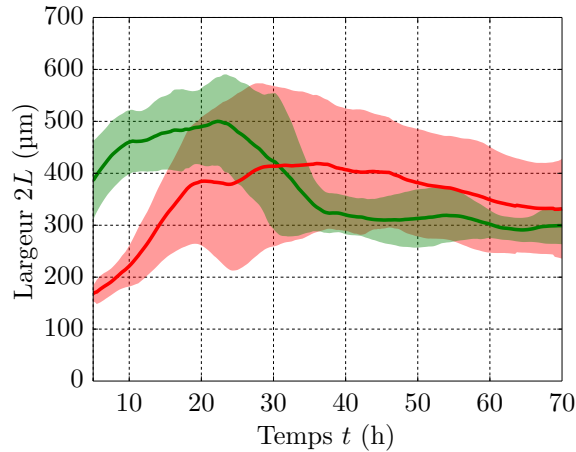


Figure 4.11 – Moyenne et écart type de la largeur  $2L$  du front en fonction du temps  $t$ , pour les deux populations normale (en vert) et transformée  $Ras^{V12}$  (en rouge).

### 4.2.3 Dynamique des fronts

L'obtention de la position centrale  $x_0$  des deux fronts à chaque pas de temps permet de suivre leur dynamique via, notamment, le calcul de la vitesse de front  $v_0$  au cours du temps, obtenue à partir d'une approximation à 5 points de la dérivée de  $x_0$ .

À partir de ces vitesses de front  $v_0$ , on peut obtenir des vitesses moyennes avant contact (mesurées pour  $5\text{ h} < t < 25\text{ h}$ ) et après contact (mesurées pour  $50\text{ h} < t < 70\text{ h}$ ). La figure 4.12 illustre ces mesures pour 7 expériences de migration antagoniste, dont les populations ont des densités cellulaires initiales volontairement prises très différentes (un facteur 2 ou 3 d'étendue pour chaque type).

En stage dans l'équipe, Leticia VALENCIA BLANCO a quantifié cette densité cellulaire  $\rho_{\text{cell}}$  (avec une erreur relative de 10 %) à l'état initial pour chaque population. On montre que les vitesses de migration de front avant contact sont peu corrélées à la densité cellulaire initiale de la population concernée (voir figure 4.13). On obtient en effet, en prenant les valeurs absolues de ces vitesses, des coefficients de corrélation respectifs de  $-0,47$  et de  $-0,18$  pour les populations normale et transformée  $Ras^{V12}$ .

On s'autorise donc à calculer la moyenne de ces différentes vitesses au cours du temps, qui est illustrée figure 4.14 pour les deux populations.

Si l'on s'intéresse à nouveau aux intervalles de temps sur lesquels on calcule nos vitesses avant et après contact, on peut conclure que les fronts de populations migrent initialement l'un vers l'autre avec des vitesses  $v_0$  comparables (à savoir  $-8,1 \pm 2,4\ \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$  pour le tissu normal et  $7,8 \pm 2,1\ \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$  pour le tissu transformé). Pour comparaison, deux types normaux mis en vis-à-vis donnent sur une expérience, après le même type d'analyse, des vitesses initiales valant en valeur absolue  $6,5 \pm 2,4\ \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$  (moyenne des écarts types obtenus sur chaque vitesse de front), ce qui est compatible avec les vitesses trouvées en migration antagoniste.

Après contact, les fronts des populations normale et transformée migrent dans le même sens, avec une vitesse finale plus rapide pour le tissu  $Ras^{V12}$  ( $4,5 \pm 1,3\ \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ ) que pour le tissu normal ( $1,4 \pm 0,8\ \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ ). On note qu'à la fin de nos expériences, les fronts normal et



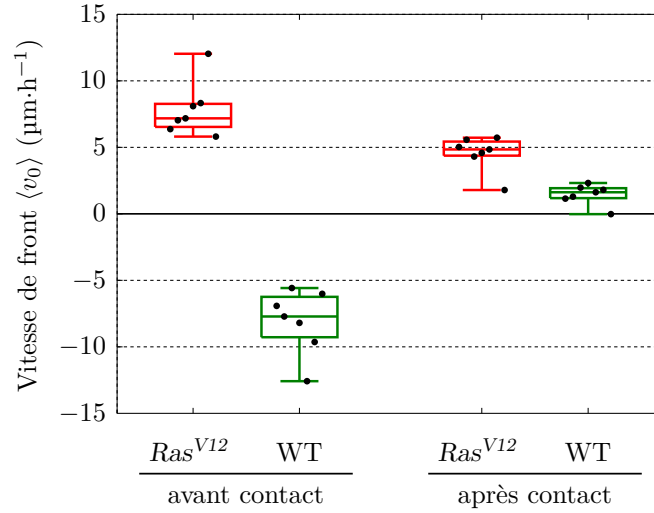


Figure 4.12 – Vitesse moyenne  $\langle v_0 \rangle$  de front mesurée avant et après contact pour le tissu normal (en vert) et le tissu transformé  $Ras^{V12}$  (en rouge).

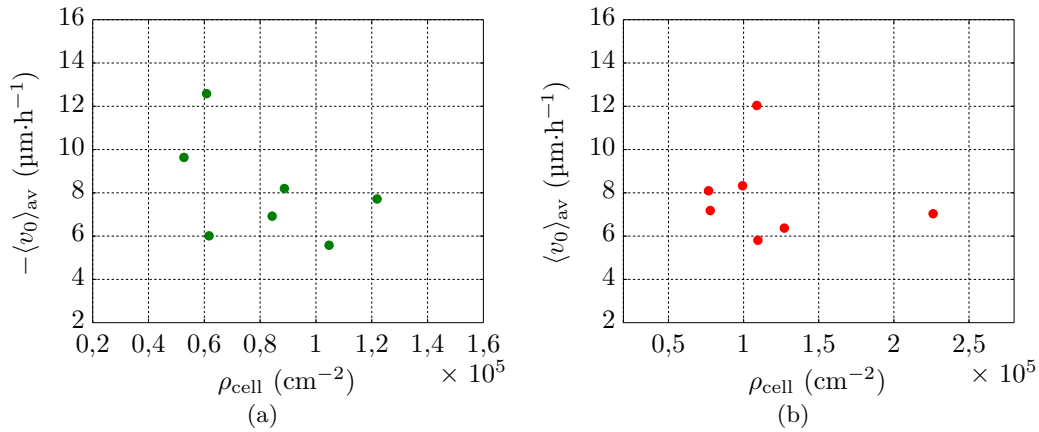


Figure 4.13 – Dépendance de la vitesse  $\langle v_0 \rangle_{av}$  du front avant contact (en valeur absolue) avec la densité initiale  $\rho_{cell}$ . (a) Populations de cellules normales. Le coefficient de corrélation de PEARSON vaut  $r = -0,47$ . (b) Populations de cellules transformées  $Ras^{V12}$ . Le coefficient de corrélation vaut  $r = -0,18$ .

transformé  $Ras^{V12}$  ne possèdent pas la même vitesse  $v_0$ , même si l'on semble s'en rapprocher (voir figure 4.14). Il est envisageable que cette différence soit une conséquence de l'histoire du système, qui tendrait à s'évanouir si ce dernier pouvait explorer des temps plus longs et éventuellement atteindre un régime permanent. Malheureusement, on l'a dit, au-delà de la durée de nos expériences, le tissu transformé cesse d'être une monocouche, ce qui nous empêche d'aller vérifier cette hypothèse.

Une autre information pertinente dans l'étude de ce système est le pouvoir de pénétration d'un tissu dans l'autre, c'est-à-dire l'étendue du mélange entre les deux populations. Nous choisissons d'évaluer celle-ci en faisant la moyenne sur l'intervalle de temps  $50\text{ h} < t < 70\text{ h}$  de la largeur de front  $2L$ . Ne pouvant affirmer que cette largeur est une mesure plus juste de pénétration si elle est prise sur le tissu normal ou sur le tissu transformé  $Ras^{V12}$ , nous mesurons

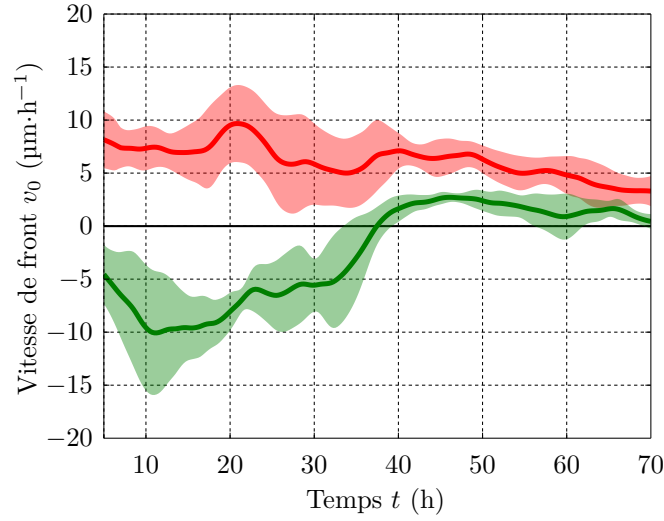


Figure 4.14 – Moyenne et écart type de la vitesse de front  $v_0$  pour les deux populations, normale (en vert) et transformée (en rouge). La vitesse du front de la population normale devient positive lorsque cette dernière amorce son recul.

les deux. On obtient  $2L = 305 \pm 34 \mu\text{m}$  pour le tissu normal et  $2L = 351 \pm 95 \mu\text{m}$  pour le tissu *Ras*<sup>V12</sup>. On évalue ainsi cette longueur de pénétration comme étant de l'ordre de  $300 \mu\text{m}$ .

Dans l'étude [121] de RANFT *et al.*, l'avancée de l'interface est due à une différence de pression homéostatique entre les deux tissus, et se fait en direction de la population de pression homéostatique minimale. Il existe cependant une différence majeure entre leurs calculs et nos expériences : l'écart de pression homéostatique est due à une disparité entre tissus dans les taux de division et d'apoptose, alors que nos expériences semblent plutôt être dans un régime où la migration cellulaire intervient de manière prépondérante. En effet, si nos films montrent un nombre conséquent de divisions cellulaires dans nos tissus, particulièrement dans les zones situées loin de l'interface, et que la densité augmente pour les deux types, on n'observe pas de manière évidente d'extrusions dans les monocouches, y compris au niveau de l'interface. Les phénomènes à l'œuvre semblent donc bien liés à la migration cellulaire, plus qu'à un éventuel déséquilibre entre divisions et extrusions dans le tissu.

### 4.3 Étude du champ de vitesse

Dans [121], RANFT *et al.* soulignent l'importance des profils de vitesse pour caractériser ce système. Nous avons analysé les films en contraste de phase à l'aide de la technique de PIV (voir section 2.8) pour accéder à la totalité du champ de vitesse dans les tissus imagés.

On s'intéresse à deux grandeurs homogènes à une vitesse, mais nous renseignant sur des caractéristiques différentes de la migration,  $\langle v_x \rangle$  et  $v_{\text{rms}}$ , définies comme suit pour notre système :

$$\langle v_x \rangle(x, t) = \left\langle \vec{v}(x, y, t) \cdot \vec{u}_x \right\rangle_y \quad \text{et} \quad v_{\text{rms}}(x, t) = \sqrt{\left\langle \vec{v}(x, y, t)^2 \right\rangle_y}$$

Ces deux mesures présentent deux informations différentes :  $v_{\text{rms}}$  représente les vitesses individuelles des cellules dans le tissu sans considération de leur direction et peut être vue comme une activité. *A contrario*, la grandeur  $\langle v_x \rangle$  ne s'intéresse qu'à la composante de la vitesse dans

la direction de migration, soit à quel point cette activité se traduit par une avancée effective du tissu vers le substrat libre (ou l'autre population). C'est une vitesse que l'on peut qualifier de « productive ».

Dans ces calculs de moyenne, on fait le choix de considérer comme ayant une vitesse nulle les endroits où le substrat n'est pas recouvert de cellules (et où en toute rigueur  $\vec{v}$  n'est pas définie). Ce parti pris permet de mieux rendre compte du comportement d'ensemble des populations, plutôt que de considérer que quelques cellules en avance sur le reste du tissu sont complètement représentatives de ce dernier.

La figure 4.15 présente les kymographes typiques obtenus pour  $\langle v_x \rangle$  et  $v_{\text{rms}}$  pour une expérience. On observe sans surprise que les tissus migrent chacun vers la surface libre au début de l'expérience, avec une vitesse plus importante près des bords du tissu. Plus tard dans l'expérience, la vitesse  $\langle v_x \rangle$  algébriquement négative du tissu normal s'évanouit, et devient positive, marque du déplacement de l'ensemble du système vers la droite.

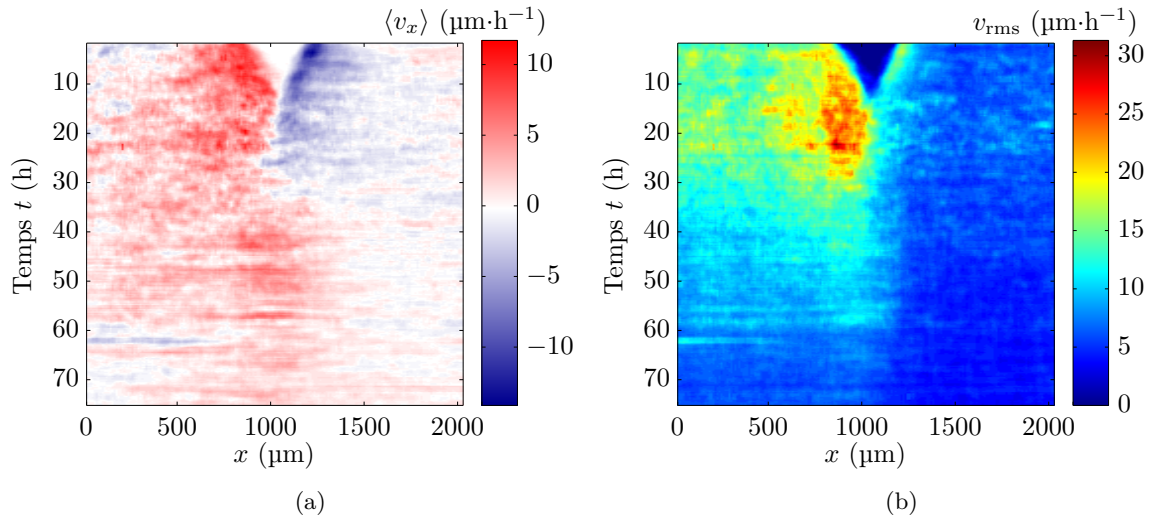


Figure 4.15 – Kymographes de vitesse pour une expérience, moyennés sur une fenêtre glissante de longueur 1 h. La population transformée  $Ras^{V12}$  est à gauche, le population normale à droite. (a) Moyenne  $\langle v_x \rangle$  de la composante de la vitesse dans la direction de migration. Les valeurs positives indiquent un déplacement vers  $x$  croissant. (b) Vitesse quadratique, équivalent de l'activité du tissu.

Pour le tissu normal, la valeur absolue de  $\langle v_x \rangle$  et  $v_{\text{rms}}$  sont presque égales au bord dans les débuts de l'expérience. La quasi-totalité de la vitesse au bord du tissu normal est donc employée à faire migrer celui-ci vers la surface libre. Le tissu transformé  $Ras^{V12}$ , quant à lui, est le lieu d'une plus grande vitesse quadratique  $v_{\text{rms}}$ , pour l'ensemble des cellules mais en particulier près du bord. Pour autant, cette grande activité donne au tissu  $Ras^{V12}$  une vitesse  $\langle v_x \rangle$  comparable en valeur absolue à celle du tissu normal.

Cette différence d'efficacité s'explique lorsque l'on regarde le champ de vitesse plus en détail. En effet, si on se place près du bord des populations en migration, on observe (voir figure 4.16) que les lignes du champ  $\vec{v}$  sont bien plus dirigées en direction de la surface libre pour les cellules normales. Au contraire, les lignes du champ de vitesse du tissu transformé  $Ras^{V12}$  sont beaucoup plus tourmentées et mettent même en évidence des vortex, y compris près du substrat non occupé. Ces cellules transformées migrent sur la surface libre de manière bien moins persistante (et donc moins « productive ») que les cellules normales.

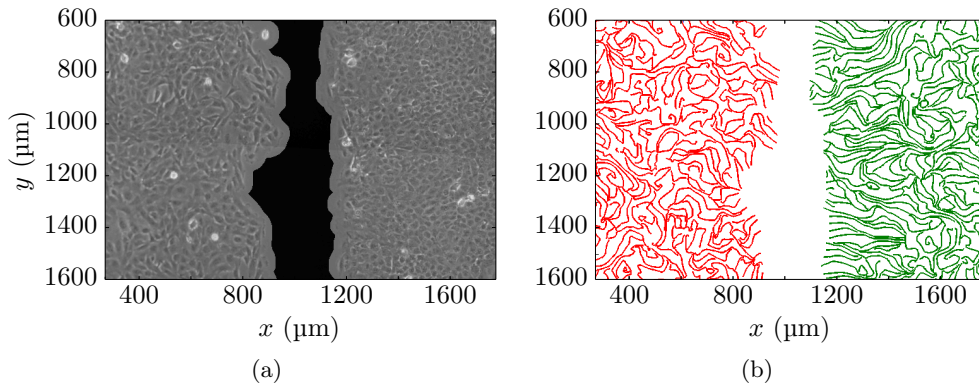


Figure 4.16 – Alignement de la vitesse près du bord des populations (a) Détail d’une image en contraste de phase à  $t = 6,6$  h. La zone masquée n’est pas traitée pour le calcul de la vitesse. (b) Lignes du champ de vitesse, colorées en vert pour les cellules normales et en rouge pour les cellules transformées. On observe que ces dernières ont un mouvement moins dirigé que les cellules normales près du bord.

On peut quantifier ces observations en s’intéressant à un paramètre d’ordre rendant compte de la polarisation des vitesses dans le tissu en migration [20]. Ce paramètre d’ordre  $S_{\text{pol}}$  est défini comme suit :

$$S_{\text{pol}}(x, t) = \left\langle \cos \theta(x, y, t) \right\rangle_y \quad \text{avec} \quad \theta(x, y, t) = \left( \vec{u}_x, \vec{v}(x, y, t) \right)$$

où la moyenne est cette fois calculée uniquement aux endroits où des cellules sont présentes. Ce paramètre vaut 1 lorsque tous les vecteurs vitesse sont dirigés dans la direction  $x$  et orientés vers les valeurs croissantes, et vaut  $-1$  dans le sens opposé.

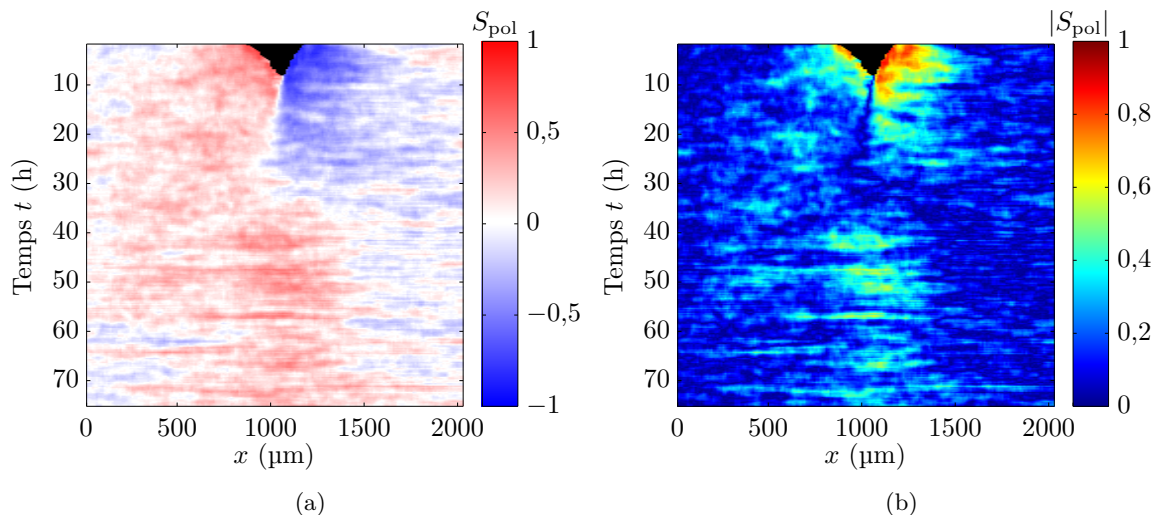


Figure 4.17 – Kymographe du paramètre d’ordre  $S_{\text{pol}}$  pour la même expérience que celle représentée sur la figure 4.15, moyenné sur une fenêtre glissante de longueur 1 h. La zone en noir correspond à un paramètre  $S_{\text{pol}}$  non défini. (a) Paramètre de polarisation  $S_{\text{pol}}$ . (b) Valeur absolue  $|S_{\text{pol}}|$  du paramètre de polarisation.

La figure 4.17 montre que le mouvement est polarisé au bord des monocouches. On observe que cette polarisation est plus prononcée et s'étend bien plus loin dans le tissu normal que dans le tissu transformé (voir figure 4.18). À l'intérieur du tissu, le paramètre  $S_{\text{pol}}$  tombe proche de 0, les mouvements y sont donc peu polarisés.

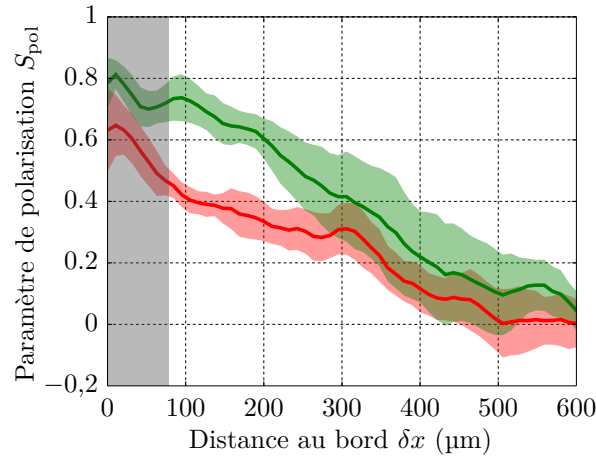


Figure 4.18 – Exemples pour une expérience du profil moyen obtenu pour le paramètre de polarisation  $S_{\text{pol}}$  en fonction de la distance  $\delta x$  au bord de la monocouche. La moyenne est réalisée entre les instants  $t = 2$  h et  $t = 7$  h. Le profil en vert est obtenu pour les cellules normales, celui en rouge pour les cellules transformées  $Ras^{VI2}$ . Le signe du paramètre  $S_{\text{pol}}$  est choisi pour être positif dans le sens d'avancée du type considéré. Le paramètre  $S_{\text{pol}}$  étant calculé à partir du point le plus avancé de la monocouche, il ne prend en compte que quelques cellules près du bord. La zone grisée sur le diagramme est donc sujette à caution.

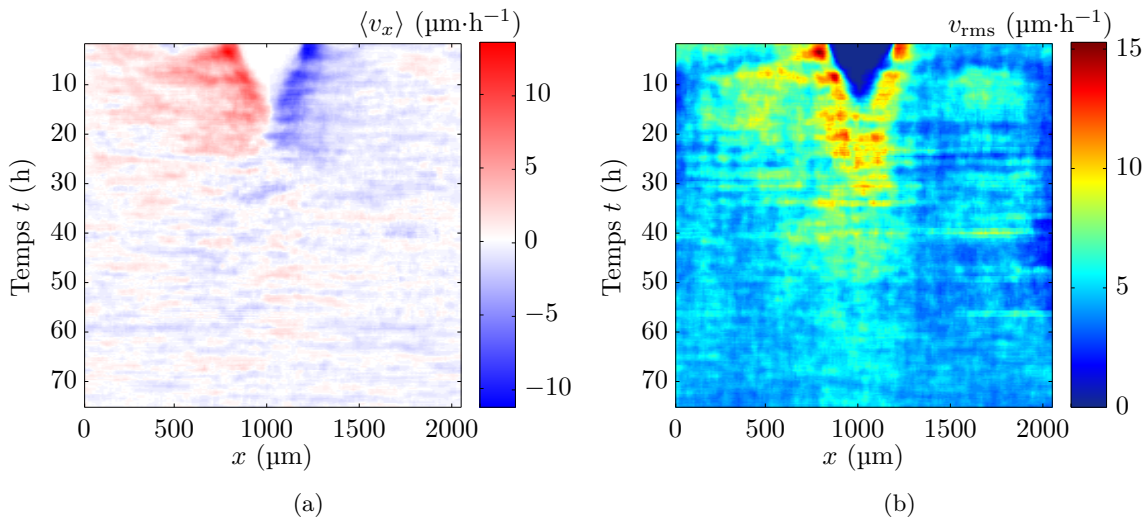


Figure 4.19 – Kymographes de vitesse, moyennés sur une fenêtre glissante de longueur 1 h, obtenus pour deux populations normales se faisant face. (a) Moyenne  $\langle v_x \rangle$  de la composante de la vitesse dans la direction de migration. (b) Vitesse quadratique  $v_{\text{rms}}$ .

En comparaison, la même expérience menée pour deux populations normales se faisant face donne des kymographes de vitesse très symétriques (voir figure 4.19). Après le contact, les deux

populations voient leur vitesse très fortement diminuer sans qu'il y ait de sens de migration global.

Il est tentant à ce stade de comparer nos résultats expérimentaux aux prédictions théoriques de RANFT *et al.* formulées dans [121] et déjà abordées dans la section 1.3.3. Juste après le contact, les profils expérimentaux obtenus pour  $v_x$  donnent des vitesses positives avant l'interface et négatives après, c'est-à-dire des flux qui convergent vers ladite interface (voir le profil vert de la figure 4.20). Parmi les profils obtenus grâce au modèle, les seuls qui présentent une inversion du signe pour la vitesse de migration ont une allure rigoureusement opposée à celle que nous obtenons (voir figure 4.21a). Dans ces simulations dont le moteur est uniquement la pression homéostatique (sans prendre en compte la migration cellulaire) et dans ce cas où la tension interfaciale est importante, les divisions se font majoritairement dans la zone proximale de l'interface alors qu'un peu plus loin les tissus sont en apoptose (le reste des populations étant à leur pression homéostatique respective). Il s'en déduit des flux qui divergent de l'interface, le contraire de ce qui est observé expérimentalement. La composante de migration cellulaire nécessiterait très probablement d'être prise en compte dans un modèle plus élaboré pour mieux décrire nos expériences. De plus, les calculs théoriques traduisent un état stationnaire alors qu'il est clair dans notre cas que les profils de vitesse continuent à évoluer : nous assistons vraisemblablement ici à leur établissement.

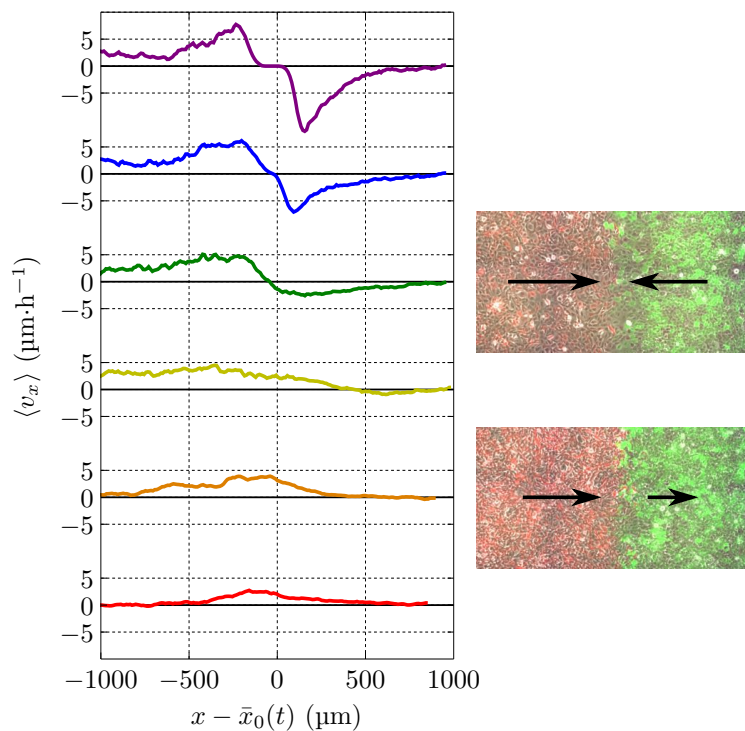


Figure 4.20 – Profils de vitesse  $\langle v_x \rangle$  dans la direction de migration pour une expérience à différents instants  $t$ , comptés depuis le retrait de la chambre. Avant le contact :  $t = 5,3\text{ h}$  (violet) et  $10,3\text{ h}$  (bleu). Puis :  $t = 25,3\text{ h}$  (vert),  $35,3\text{ h}$  (jaune),  $55,3\text{ h}$  (orange) et  $70,3\text{ h}$  (rouge). L'origine de la coordonnée  $x$  est prise en  $\bar{x}_0(t)$ , moyenne des valeurs de  $x_0$  trouvées pour les deux tissus au temps  $t$ . Les profils sont moyennés sur une fenêtre temporelle de 5 h. Sur les schémas à droite figure une représentation simplifiée des flux au voisinage de l'interface.

Les profils obtenus à des temps plus tardifs montrent une vitesse  $v_x$  positive dans la totalité du système, même si celle-ci reste plus élevée du côté transformé  $Ras^{V12}$  que du côté normal (voir figure 4.20). Si l'on se réfère à nouveau aux profils théoriques calculés par RANFT *et al.*, on peut rapprocher nos profils expérimentaux à ceux obtenus dans leur système simulé lorsque la tension d'interface est nulle (voir figure 4.21b). Bien que nos profils de vitesse ne soient pas symétriques, il semble que l'on s'en rapproche à la fin de l'expérience. Notre système tend donc peut-être vers les régimes permanents décrits par le modèle, sans toutefois pouvoir les atteindre à cause de la transition de la population  $Ras^{V12}$  vers des structures tridimensionnelles sous l'effet de la pression dans le tissu.

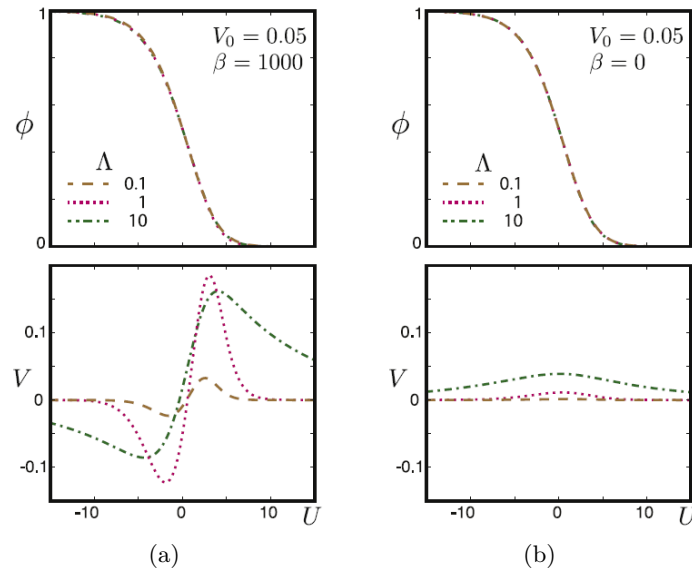


Figure 4.21 – Profils théoriques obtenus dans [121] par RANFT *et al.* (voir section 1.3.3). (a) Pour une grande tension d'interface  $\beta$  et une force motrice  $V_0$  faible. (b) Pour une tension d'interface  $\beta$  nulle et une force motrice  $V_0$  faible. L'allure de ces profils est similaire pour une valeur importante de  $V_0$ .

En définitive, le modèle développé par RANFT *et al.* ne peut en l'état décrire nos observations expérimentales. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cet état de fait et éventuellement permettre d'y remédier.

Tout d'abord, on l'a dit, on n'observe pas de zone de forte extrusion dans le système. Il semble donc que la différence de pression homéostatique ne soit pas le premier paramètre de contrôle de l'évolution de notre système. En outre, du fait notamment de notre géométrie initiale, nos monocouches sont le siège d'importants mouvements de migration, qui mériteraient d'être explorés plus avant, par exemple via l'utilisation d'inhibiteurs. Or, ces phénomènes de migration cellulaire sont complètement absents du modèle théorique. Enfin, nos observations aux temps longs sont limitées par le fait que la population transformée arrête de se comporter comme une monocouche. Les profils issus du modèle sont décrits une fois qu'un état stationnaire a été atteint, ce qui n'est peut-être pas encore le cas dans notre système expérimental.

Plusieurs approches permettraient de rapprocher le cadre théorique et la situation expérimentale. Il serait ainsi possible de modifier le modèle pour lui ajouter un terme rendant compte de la migration cellulaire. Ce terme supplémentaire pourrait en outre permettre d'obtenir une modélisation pour le régime transitoire à l'œuvre avant l'établissement des profils stationnaires

et ainsi mieux décrire nos expériences. À l'inverse, il serait également possible de mener le même type d'expériences sur d'autres lignées cellulaires, choisies pour être moins sensibles aux effets de la pression mécanique. Elles nous autoriseraient ainsi à explorer des temps plus longs et espérer atteindre un régime permanent sans que les populations cessent de se comporter comme des monocouches.

## Conclusion

Au terme de ce chapitre, nous avons analysé la dynamique de deux populations de HEK-HT normale et transformée  $Ras^{V12}$  pendant leur migration antagoniste sur une bande de substrat libre. Nous avons conçu une technique d'analyse des images de fluorescence permettant de remonter à une position et une largeur pour le front de migration de chaque population. Nous avons mis en évidence que les deux types cellulaires avaient des vitesses de migration avant contact très similaires, indépendantes de la densité cellulaire. Après être entrées en contact, les deux populations établissent une interface qui se déplace dans le sens d'avancée du type transformé. La vitesse du type transformé reste supérieure à celle du type normal après contact, une différence probablement due à la migration qui précède le contact. Les deux types cellulaires se mélangent en outre sur une longueur de pénétration qui se stabilise autour de  $300\ \mu\text{m}$  à la fin de nos expériences.

L'étude par PIV du champ de vitesse dans l'ensemble des deux tissus met en évidence une activité bien supérieure de la population transformée, mais une persistance et une polarisation moindres qui se traduisent par une efficacité de migration réduite au point d'être comparable à celle du tissu normal. Les profils de vitesse obtenus montrent des flux convergents autour de l'interface juste après le contact, puis plus tard une vitesse positive pour l'ensemble du système, qui se déplace dans le sens d'avancée de la population transformée  $Ras^{V12}$ . Le modèle théorique développé par RANFT *et al.* dans [121] est insuffisant pour expliquer nos observations dans lesquelles l'évolution du système semble plus liée à la migration cellulaire qu'à la différence éventuelle de pression homéostatique. Qui plus est, notre système expérimental n'a pas le temps d'atteindre un régime permanent tel que ceux décrits théoriquement.

L'étude encore préliminaire présentée dans cette thèse appelle de multiples développements. Nous souhaiterions en particulier mesurer les forces déployées par les cellules, notamment au niveau de l'interface, pour éclairer nos premières observations. Nous espérons ainsi pouvoir conclure par exemple sur le fait que le tissu normal est ou non poussé après le contact par le tissu transformé  $Ras^{V12}$ , pourtant peu efficace dans la migration du fait de sa polarisation moindre et des vortex dans son champ de vitesse.

Il serait intéressant de complexifier le modèle théorique pour rendre compte des phénomènes de migration observés ou encore d'y inclure l'augmentation de la densité cellulaire pour les deux types en fonction du temps – traduction d'un effet tridimensionnel puisque les cellules deviennent plus hautes lors de ce processus. Nous aimerions également mener ces expériences sur des cellules moins sensibles aux effets de pression dans le tissu. Suivant la même idée de réconciliation de l'expérience et de la théorie, nous pourrions chercher à concevoir un système où les deux types cellulaires sont déjà au contact à l'instant initial. La construction de lignées permettant l'activation d'une mutation par des méthodes optogénétiques pourrait constituer un moyen utilisable à cette fin.





# Conclusion

Nous nous sommes intéressés dans cette thèse à deux situations expérimentales mettant en jeu des mouvements collectifs dans des monocouches cellulaires.

Nous avons tout d'abord étudié des populations de cellules de la lignée HBEC, qui sont épithéliales mais peu cohésives. Nous avons pu mettre en évidence dans nos expériences que ces cellules ralentissent au cours du temps, pendant que la longueur de corrélation du mouvement a une évolution non monotone, croissante puis décroissante. Nous avons relié cette évolution à une transformation en système amorphe via une transition de *jamming* contrôlée par la vitesse dans le tissu, mesure de l'activité du système. Ce contrôle se traduit par des caractéristiques corrélation-vitesse très reproductibles. En combinant nos expériences à des analyses théoriques et des simulations, nous avons montré que le ralentissement de la population était dû à la maturation des contacts des jonctions cellule-cellule et des adhésions cellule-substrat.

Nous avons ensuite étudié la dynamique de deux populations de HEK-HT normale et transformée  $Ras^{V12}$ , munies de marqueurs fluorescents distincts, pendant leur migration antagoniste sur une bande de substrat libre qui les sépare initialement. À partir des images de fluorescence, nous avons déterminé une position et une largeur pour le front de migration de chaque population, et ainsi montré qu'au début de l'expérience, les deux types ont des vitesses de migration proches. Après contact, les deux monocouches établissent une interface qui se déplace dans le sens d'avancée de la population transformée  $Ras^{V12}$ , tout en se mélangeant l'une à l'autre sur une longueur de pénétration que nous avons quantifiée. Une analyse du champ de vitesse par PIV montre que la population transformée  $Ras^{V12}$  a une activité supérieure à celle de la population normale, mais qui se traduit par une vitesse de migration comparable à cause d'une polarisation bien moindre. Après contact des deux populations, nous observons qu'en réalité les deux monocouches migrent dans leur ensemble avec l'interface. La comparaison de nos résultats avec un modèle théorique décrivant une situation proche a montré que ce dernier ne pouvait dans l'état décrire nos observations. Nous avons ainsi proposé des modifications du modèle ou de nos expériences afin de pouvoir concilier ces deux approches.

Pour ces deux projets, des développements peuvent être envisagés en menant par exemple le même type d'expériences sur d'autres types cellulaires soigneusement choisis. La mesure des forces exercées par les cellules sur le substrat comme l'utilisation d'inhibiteurs ou d'autres surfaces pour nos monocouches pourraient également constituer des pistes intéressantes à explorer pour compléter notre compréhension de ces deux situations expérimentales.



# Annexes

Le lecteur trouvera ici les diverses annexes dont il a été fait mention tout au long de cette thèse, recueillies ici plutôt que dans le corps du texte afin d'en alléger la lecture.

Il s'agit principalement (annexes B, C et D) de données techniques concernant mon travail de thèse, à savoir des protocoles de culture cellulaire employés ici, des macros ImageJ ou encore quelques uns des codes MATLAB utilisés dans nos analyses.

L'annexe A donne les liens vers deux exemples typiques de films obtenus pour les expériences de cette thèse.

L'annexe E liste les articles auxquels j'ai eu l'heur de participer et, en particulier, comporte en son intégralité le manuscrit de l'article (y compris les informations supplémentaires) écrit à partir du travail détaillé dans le chapitre 3.



# Annexe A

## Vidéos

Le lecteur trouvera dans cette annexe des liens vers des vidéos, hébergées sur la plate-forme de diffusion YouTube, d'expériences réalisées durant cette thèse et correspondant à des figures du texte.

### A.1 Évolution d'une population de cellules HBEC

Cette vidéo correspond à la figure 3.3, section 3.2.

[https://youtu.be/A0kCGoc\\_gqo](https://youtu.be/A0kCGoc_gqo)

### A.2 Migration antagoniste de cellules HEK-HT

Cette vidéo correspond à la figure 4.3, section 4.1.3.

<https://youtu.be/MWbovq5gFCM>



## Annexe B

# Protocoles de biologie cellulaire

Cette annexe présente les protocoles de biologie cellulaire utilisés dans ce travail de thèse pour diverses opérations de routine de culture cellulaire, ainsi que pour les marquages de cellules fixées.

Les cellules ont été cultivées dans des flasques T25 et T75 (de surface de culture respective 25 cm<sup>2</sup> et 75 cm<sup>2</sup>) à fond de polystyrène traité pour la culture cellulaire de chez TPP (Trasadingen, Suisse), avec respectivement 7 mL et 21 mL de milieu adapté au type cellulaire.

Toutes les étapes de centrifugation mentionnées plus bas ont été effectuées durant 3 minutes, à une vitesse de 1000 tr/min soit une accélération d'environ 200 *g* sur la centrifugeuse utilisée.

### B.1 Conditions de culture

Cette section liste les conditions de culture pour les différentes lignées de cellules utilisées lors de cette thèse.

#### Lignée HBEC

Les cellules de la lignée HBEC ont été cultivées dans du milieu sans sérum pour kératinocytes (Keratinocyte-SFM; Gibco), complété d'1 % en volume d'un cocktail pénicilline-streptomycine (10 000 unités·mL<sup>-1</sup> de pénicilline et 10 mg·mL<sup>-1</sup> de streptomycine; Gibco), de L-glutamine à 2 mM (Gibco), de solution tampon HEPES à 20 mM (Gibco), de généticine à 30 µg·mL<sup>-1</sup> (G418 sulfate; Gibco), de dihydrochlorure de puromycine à 250 ng·mL<sup>-1</sup> (Gibco), de facteur de croissance épidermal recombinant humain préqualifié 1-53 à 5 ng·mL<sup>-1</sup> (EGF 1-53; Gibco) et enfin d'extrait de pituitaire bovine à 50 µg·mL<sup>-1</sup> (BPE; Gibco).

Le milieu ne comportant pas de sérum, il a été nécessaire d'inhiber l'effet de la trypsine utilisée pour décoller les cellules à l'aide d'un volume égal d'un inhibiteur spécifique (Defined trypsin inhibitor; Gibco) suivi de la centrifugation des cellules enfin décollées et de la resuspension du culot dans du milieu sans trypsine ni inhibiteur avant dépôt final dans la nouvelle flasque.

#### Lignées HEK-HT et autres lignées

Les cellules de la lignée HEK-HT GFP ont été cultivées dans du milieu de EAGLE modifié par DULBECCO (*Dulbecco's modified Eagle's medium* ou plus simplement DMEM; Gibco) à haut niveau de D-glucose (25,0 mmol·L<sup>-1</sup>) et comportant une forme stabilisée de L-glutamine à



4,0 mmol·L<sup>-1</sup> (L-alanyl-L-glutamine, commercialisée par Gibco sous le nom GlutaMAX). Ce milieu est complété par 10 % en volume de sérum de veau foetal (FBS ; Gibco), d'1 % en volume d'un cocktail pénicilline-streptomycine (10 000 unités·mL<sup>-1</sup> de pénicilline et 10 mg·mL<sup>-1</sup> de streptomycine ; Gibco), de généticine à 400 µg·mL<sup>-1</sup> (G418 sulfate ; Gibco) et enfin d'hygromycine B à 100 µg·mL<sup>-1</sup> (Gibco).

Lors des passages, la trypsine est inhibée par l'ajout de milieu (contenant du sérum) en large excès et ne requiert pas d'inhibiteur spécifique.

Les cellules des lignées transformées *Ras*<sup>V12</sup> ont été cultivées dans un milieu similaire, mais comportant en plus du dihydrochlorure de puromycine à 500 ng·mL<sup>-1</sup> (Gibco).

Les cellules des lignées MDCK et NIH/3T3 ont été cultivées dans le même milieu que celui utilisé pour les lignées HEK-HT, à l'exception des antibiotiques de sélection (généticine, puromycine, hygromycine).

## B.2 Passage

Le protocole suivant est celui qui a été utilisé pour passer des flasques T25. Il s'adapte aisément à des flasques T75 en triplant tous les volumes.

- Aspirer le milieu de culture et rincer la flasque avec 5 mL de tampon phosphate salin (PBS, une solution isotonique au milieu intracellulaire).
- Ajouter 500 µL de trypsine-EDTA (Gibco, Carlsbad, Californie, États-Unis d'Amérique) ou un produit de remplacement équivalent, le TrypLE Express (Gibco).
- Mettre la flasque à l'incubateur (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % d'humidité relative) afin que la température active le processus, jusqu'à détachement des cellules (entre 5 et 15 minutes, en fonction du type cellulaire).
- Ajouter du milieu dans la flasque pour achever de détacher les cellules, et homogénéiser la suspension.
- Si besoin est, ajouter de l'inhibiteur de trypsine, transférer les cellules dans un tube pour les centrifuger, puis resuspendre le culot dans du milieu (sans trypsine ni inhibiteur).
- Transférer le pourcentage désiré de la suspension de cellule dans une nouvelle flasque contenant du milieu (de telle sorte à obtenir environ 7 mL de volume final).
- Mettre la nouvelle boîte à l'incubateur.
- Utiliser le reste de la suspension pour une expérience, le cas échéant.

## B.3 Congélation

Pour des cellules cultivées en flasque T25, la congélation a toujours été précédée d'une étape d'amplification où les cellules sont passées (trois fois plus nombreuses) dans une T75, afin d'en obtenir un nombre plus conséquent à stocker.

- Aspirer le milieu de culture et rincer la T75 avec 15 mL de PBS.
- Détacher les cellules à l'aide de 1,5 mL de trypsine ou équivalent.
- Préparer 10 cryotubes en prenant soin de reporter les informations de la flasque.
- Ajouter du milieu dans la flasque pour achever de détacher les cellules, et homogénéiser la suspension.
- Transférer la suspension de cellules dans un tube et le passer à la centrifugeuse.
- Aspirer le surnageant et le remplacer par un volume de 9 mL de milieu.
- Resuspendre les cellules dans le milieu.
- Ajouter 1 mL de sulfoxyde de diméthyle (DMSO) et homogénéiser le mélange.
- Transférer 1 mL de la solution dans chaque cryotube.
- Disposer les cryotubes dans un conteneur de congélation (Mr. Frosty Freezing Container, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis d'Amérique).
- Transférer le conteneur dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  et l'y laisser une nuit. Le conteneur contient dans son fond, séparé des cryotubes, de l'isopropanol, qui permet un refroidissement des tubes à un rythme régulier de  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .
- Récupérer les cryotubes et les mettre à l'azote liquide pour stockage.

Pour les cellules les plus sensibles au DMSO, baisser la part de DMSO dans le milieu de congélation de 10 à 5% en volume. Ce solvant est utilisé ici en tant qu'agent cryoprotecteur afin de réduire la formation de cristaux de glace qui peuvent endommager les cellules lors de la congélation. Il est toxique pour les cellules à température ambiante.

## B.4 Décongélation

- Décongeler le cryotube de cellules en le mettant au bain-marie à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant quelques minutes.
- Transvaser le contenu du cryotube dans un tube et le passer à la centrifugeuse.
- Aspirer le milieu de congélation (toxique car contenant du DMSO).
- Resuspendre le culot de cellules dans 7 mL de milieu.
- Transvaser la suspension dans une flasque T25 en reportant les informations du tube.
- Mettre à l'incubateur.
- Vérifier l'état de confluence des cellules le lendemain. Les passer si nécessaire ou, à défaut, changer leur milieu pour évacuer les cellules n'ayant pas survécu au processus et les éventuelles traces de DMSO.
- Attendre au moins un ou deux passages pour utiliser les cellules dans une expérience.

## B.5 Immunofluorescence

Pour toutes les expériences d'immunofluorescence, les cellules sont déposées sur des lamelles de verre de diamètre 18 mm et d'épaisseur n°1 (soit entre 0,13 mm et 0,16 mm).

Elles sont fixées<sup>1</sup> au moment désiré avec du paraformaldéhyde (PFA) à  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Euromedex, Souffelweyersheim, France) pendant 10 min. Elles sont rincées et conservées dans du PBS à  $4^\circ\text{C}$  jusqu'au marquage.

Les différentes étapes de la procédure de marquage suivante sont conduites en déposant à chaque fois une goutte de  $30 \mu\text{L}$  sur un film de paraffine (Parafilm M, Bemis North America, Neenah, Wisconsin, États-Unis d'Amérique) pour chaque lamelle, que l'on vient recouvrir de la lamelle en question (cellules vers le bas). Sauf mention contraire, ces étapes sont faites à température ambiante.

Les étapes de rinçages sont faites en trempant les lamelles dans trois bains de PBS successifs, toujours dans le même ordre, et sont suivies d'un retrait de l'excès de PBS restant sur la lamelle par capillarité.

- Éteindre la fluorescence résiduelle avec de la glycine à  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (Euromedex) pendant 2 min puis rincer.
- Perméabiliser<sup>2</sup> les cellules avec une solution à 1 % de Triton X-100 (Euromedex) pendant 15 min afin que les anticorps puissent pénétrer le cytoplasme, puis rincer.
- Saturer<sup>3</sup> les cellules avec une solution de PBS complétée par 10 % en volume de FBS pendant 60 min. Ne pas rincer.
- Dans le cas d'un immunomarquage indirect, faire tremper les lamelles dans l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation<sup>4</sup> pendant 1 h en atmosphère saturée en eau (pour empêcher l'évaporation de la solution d'anticorps). Rincer au PBS.
- Suivre la même procédure pour l'anticorps secondaire (immunomarquage indirect) ou pour l'anticorps conjugué (immunomarquage direct). Bien s'assurer d'effectuer ce trempage à l'abri de la lumière pour les anticorps porteurs de fluorophores, afin de les préserver du photoblanchiment. Ajouter si désiré à la solution, avant le trempage, des toxines d'action spécifique conjuguées à des fluorophores. Rincer au PBS.
- Monter les lamelles traitées sur des lames de microscopie en verre, afin de solidifier et protéger ces échantillons, à l'aide du milieu de montage ProLong Gold antifade reagent avec ou sans DAPI (Molecular Probes, Eugene, Oregon, États-Unis d'Amérique).
- Faire durcir l'échantillon monté à  $37^\circ\text{C}$  en atmosphère sèche pendant une nuit.
- Conserver les échantillons à  $4^\circ\text{C}$  à l'abri de la lumière en attendant de les imager.

---

1. Cette étape consiste à arrêter net toutes les réactions biochimiques dans les cellules, tout en renforçant leur structure. Elle permet de prévenir toute décomposition de l'échantillon tout en gardant son organisation spatiale intacte. Cette réaction s'accompagne de la création de produits légèrement fluorescents. Il faut donc éteindre (on parle de *quenching*) cette fluorescence résiduelle avant de marquer les échantillons.

2. La perméabilisation des membranes permet aux anticorps de pénétrer le cytoplasme.

3. L'étape de saturation a pour but de faire occuper par l'albumine présente dans le sérum tous les sites d'accrochage possibles des anticorps, et d'ainsi augmenter la barrière de potentiel à franchir pour ces derniers. Les anticorps ne s'accrochent alors plus qu'aux sites pour lesquels ils ont une affinité très forte, suffisante pour chasser l'albumine présente.

4. Les anticorps sont dilués dans la solution de saturation afin de s'assurer que l'albumine continue d'occuper les sites non préférentiels et ainsi éviter tout marquage non spécifique.

# Annexe C

## Fonctions MATLAB

Cette annexe présente quelques uns des codes MATLAB utilisés pour les analyses de ce travail de thèse.

### C.1 Calcul et ajustement de la fonction radiale d'autocorrélation en vitesse

La fonction `piv_xcorr_rad` permet de calculer la longueur d'autocorrélation spatiale en vitesse  $\xi_{vv}$  à partir d'un champ de vitesse bidimensionnel obtenu par PIV.

```
function CorrDist = piv_xcorr_rad(PIVfile)

% piv_xcorr_rad - Spatial autocorrelation length from radial function
%
% CorrDist = piv_xcorr_rad(PIVfile)
%
% PIVfile is the structure file obtained by PIV analysis
% CorrDist is a structure of the same length as PIVfile containing for
% each time frame the correlation length from a fit with an
% exponential function. The structure also provides the results of
% fitting the correlation function with a power law.

%% Initialization

CorrDist = struct([]);
tmax = size(PIVfile,2);
x = [];
tmin = 0;
while size(x,1) == 0
    tmin = tmin+1;
    x = PIVfile(tmin).x;
end
mesh = x(1,2)-x(1,1);
[xmax,ymax] = size(x);
Norm = xcorr2(ones(size(x))); % Normalization for unbiased correlation
rmax = min(xmax,ymax);
r = (0:rmax-1)'*mesh;

%% Computation of the correlation lengths

parfor t = tmin:tmax
```

```

u = PIVfile(t).fu;
v = PIVfile(t).fv;

du = u-nanmean(u(:))*ones(size(u));
dv = v-nanmean(v(:))*ones(size(v));
du(isnan(du)) = 0;
dv(isnan(dv)) = 0;

CorrU = xcorr2(du)./Norm;
CorrV = xcorr2(dv)./Norm;

% Computing the radial function

[XX,YY] = meshgrid(-xmax+1:xmax-1,-ymax+1:ymax-1);
[~,Rho] = cart2pol(XX,YY);

Cu = NaN(rmax,1);
Cv = NaN(rmax,1);
for i = 1:rmax
    Cu(i) = mean(CorrU(round(Rho)+1 == i));
    Cv(i) = mean(CorrV(round(Rho)+1 == i));
end

Cavg = (Cu+Cv)/(Cu(1)+Cv(1));

% Fit

fitexp = fitype( @(d,x) exp(-x/d) );
dest = mesh/(1-Cavg(2));
[fexp,gof] = fit(r,Cavg,fitexp,...
    'StartPoint',dest,...
    'Lower',0,...
    'Upper',Inf);
fcoeff = coeffvalues(fexp);
fitv = confint(fexp);

fitpow = fitype( @(a,eta,x) a*x.^eta );
exc = excludedata(r,Cavg,'domain',[1e-5 400]);
[fpow,gofp] = fit(r,Cavg,fitpow,...
    'StartPoint',[1,-1],...
    'Lower',[0.9,-Inf],...
    'Upper',[1.1,0],...
    'Exclude',exc);
pcoeff = coeffvalues(fpow);
pitv = confint(fpow);

% Graphical display

plot(r,Cavg,'+');
hold on
plot(fexp);
hold off
title(strcat('Frame#',num2str(t),'_Dist_=_',...
    num2str(fcoeff(1)*0.742),'_mum_R_=_',num2str(gof.rsquare)));
pause(0.1)

%% Output

```

```

CorrDist(t).Dist = fcoeff(1);
CorrDist(t).DistInt = fitv(:,1);
CorrDist(t).Rsq = gof.rsquare;
CorrDist(t).PowPeak = pcoeff(1);
CorrDist(t).PowPeakInt = pitv(:,1);
CorrDist(t).Eta = pcoeff(2);
CorrDist(t).EtaInt = pitv(:,2);
CorrDist(t).PowRsq = gofp.rsquare;

CorrDist(t).AdjRsq = gof.adjrsquare;
CorrDist(t).RMSE = gof.rmse;
CorrDist(t).DFE = gof.dfe;

CorrDist(t).PowAdjRsq = gofp.adjrsquare;
CorrDist(t).PowRMSE = gofp.rmse;
CorrDist(t).PowDFE = gofp.dfe;

end
end

```

## C.2 Hétérogénéités dynamiques

La fonction `dyn_het` permet d'étudier les hétérogénéités dynamiques dans le champ de vitesse obtenu par PIV sous la forme d'agrégats rapides. Elle appelle les sous-fonctions `dyn_vel` en charge de la détermination des agrégats et de l'étude de leur propriétés pour un unique champ de vitesse, ainsi que la sous-fonction `align_par` qui permet le calcul du paramètre d'alignement dans ces agrégats.

```

function Output = dyn_het(PIVfile, FastThres)

% dyn_het - Dynamical heterogeneities
%
% Output = dyn_het(PIVfile, FastThres)
%
% PIVfile is the structure file obtained by PIV analysis
% FastThres is the percentage (between 0 and 1) of velocity vectors
% to be considered fast, and thus belonging to clusters.

if nargin < 2
    FastThres = 0.2;
end

tmax = size(PIVfile,2);
Output = struct([]);

x = [];
tmin = 0;
while size(x,1) == 0
    tmin = tmin+1;
    x = PIVfile(tmin).x;
end
Mesh = x(1,2)-x(1,1);
NVect = length(x(:));
NFast = round(NVect*FastThres);

```

```

for t = tmin:tmax

    % Computing the fast domains for the velocity field (V)

    fu = PIVfile(t).fu;
    fv = PIVfile(t).fv;
    [Props,Vrms] = dyn_vel(fu,fv,NFast);

    % Computing the fast domains for the velocity fluctuation field (D)

    du = fu-nanmean(fu(:))*ones(size(fu));
    dv = fv-nanmean(fv(:))*ones(size(fv));
    [DProps,DVrms] = dyn_vel(du,dv,NFast);

    % Writing V props

    Output(t).Areas = [Props.Area]*Mesh^2;
    Output(t).MeanArea = mean([Props.Area])*Mesh^2;
    Output(t).EqDiam = sqrt(4*Output(t).MeanArea/pi);
    Output(t).MeanDiam = mean([Props.EquivDiameter])*Mesh;

    Output(t).GeoMeanArea = geomean([Props.Area])*Mesh^2;
    Output(t).GeoEqDiam = sqrt(4*Output(t).GeoMeanArea/pi);

    % Writing D props

    Output(t).DAreas = [DProps.Area]*Mesh^2;
    Output(t).DMeanArea = mean([DProps.Area])*Mesh^2;
    Output(t).DEqDiam = sqrt(4*Output(t).DMeanArea/pi); % Using this!
    Output(t).DMeanDiam = mean([DProps.EquivDiameter])*Mesh;

    Output(t).GeoDMeanArea = geomean([DProps.Area])*Mesh^2;
    Output(t).GeoDEqDiam = sqrt(4*Output(t).GeoDMeanArea/pi);

    % Alignment parameter (using D)

    Align = zeros(2,size(DProps,1));
    Lists = struct([]);
    Lists(size(DProps,1)).Area = 0;
    [Lists.Area] = DProps.Area;
    [Lists.Pixels] = DProps.PixelIdxList;
    for z = 1:size(DProps,1)
        Lists(z).OrdPar = align_par(...
            du(Lists(z).Pixels),...
            dv(Lists(z).Pixels));
    end
    Align(1,:) = [Lists.Area];
    Align(2,:) = [Lists.OrdPar];

    Output(t).AlignPar = wmean(Align(2,:),Align(1,:));

    % Velocities

    Output(t).Vrms = Vrms;
    Output(t).DVrms = DVrms;

end

```

```

end

% dyn_vel

function [MapProps, Vrms] = dyn_vel(u,v,N)

    Vel = sqrt(u.^2+v.^2);
    VSort = sort(Vel(:), 'descend');
    VFast = VSort(N);
    FastMap = (Vel >= VFast);
    ConnComps = bwconncomp(FastMap,8);
    MapProps = regionprops(ConnComps, 'Area', 'EquivDiameter', ...
                           'PixelIdxList');

    Vrms = Vel.*FastMap;
    Vrms(Vrms == 0) = NaN;
    Vrms = nanmean(Vrms(:));

end

% align_par

function S = align_par(u,v)

u = u(:);
v = v(:);
th = angle(u+1i*v);

S = sqrt(mean(cos(th))^2+mean(sin(th))^2);

end

```

### C.3 Trajectoires de particules virtuelles dans un champ de vitesse

La fonction `piv2tracks` permet de simuler des trajectoires pour une grille de particules virtuelles que l'on fait évoluer dans un champ de vitesse bidimensionnel obtenu par PIV. `Tracks` et `NDTracks` sont les trajectoires obtenues, respectivement sans et avec correction de la dérive, sous le format  $(x, y, t, p)$ .

```

function [Tracks, NDTracks] = piv2tracks(PIVfile, StartStop, Scale, Offset)

% piv2tracks - Trajectories of virtual particles from PIV velocity fields
%
% [Tracks, NDTracks] = piv2tracks(PIVfile, StartStop, Scale, Offset)
%
% PIVfile is the structure file obtained by PIV analysis
% StartStop is a two-element vector of the first and the last time points
% Scale is the initial distance between particles in mesh size units
% Offset is a two-element vector adding a displacement in x and/or y
%   of the initial position of the particles, in mesh size units
%
% Tracks and NDTracks are the obtained trajectories, respectively without
%   and with a correction for the drift.

if nargin < 4
    Offset = [0 0];
    if nargin < 3
        Scale = 1;
    end
end

```



```

        if nargin < 2
            StartStop = [1,size(PIVfile,2)];
        end
    end
end

%% Initialization

Start = StartStop(1);
Stop = StartStop(2);

x = PIVfile(1).x;
y = PIVfile(1).y;
Mesh = x(1,2)-x(1,1);

xmin = x(1,1);
ymin = y(1,1);
xmax = x(1,end);
ymax = y(end,1);

%% Initial positions of the particles

xstart = (xmin+round(Offset(1)*Mesh)...
          :Mesh*Scale...
          :xmax+round(Offset(1)*Mesh));
ystart = (ymin+round(Offset(2)*Mesh)...
          :Mesh*Scale...
          :ymax+round(Offset(2)*Mesh));
[X0,Y0] = meshgrid(xstart,ystart);

X0(X0 < xmin | X0 > xmax) = NaN;
Y0(Y0 < ymin | Y0 > ymax) = NaN;

Xt = NaN(length(X0(:)),size(PIVfile,2));
Yt = NaN(length(X0(:)),size(PIVfile,2));

Xt(:,Start) = X0(:);
Yt(:,Start) = Y0(:);

% No drift

Xnd = NaN(length(X0(:)),size(PIVfile,2));
Ynd = NaN(length(X0(:)),size(PIVfile,2));

Xnd(:,Start) = X0(:);
Ynd(:,Start) = Y0(:);

%% Simulation of the trajectories

for t = Start+1:Stop

    Xr = Xt(:,t-1);
    Xr(isnan(Xr)) = 1;
    Yr = Yt(:,t-1);
    Yr(isnan(Yr)) = 1;

    Ut = interp2(x,y,PIVfile(t-1).fu,Xr,Yr,'linear');
    Vt = interp2(x,y,PIVfile(t-1).fv,Xr,Yr,'linear');

```

```

Xt(:,t) = Xt(:,t-1)+Ut;
Yt(:,t) = Yt(:,t-1)+Vt;

Xt((Xt(:,t) < xmin | Xt(:,t) > xmax),t) = NaN;
Yt((Yt(:,t) < ymin | Yt(:,t) > ymax),t) = NaN;

% No drift

Xnd(:,t) = Xnd(:,t-1)+Ut-nanmean(PIVfile(t-1).fu(:));
Ynd(:,t) = Ynd(:,t-1)+Vt-nanmean(PIVfile(t-1).fv(:));

Xnd((Xnd(:,t) < xmin | Xnd(:,t) > xmax),t) = NaN;
Ynd((Ynd(:,t) < ymin | Ynd(:,t) > ymax),t) = NaN;

end

%% Output

AllTracks = NaN(length(Xt(:)),4);
[N,T] = meshgrid(1:size(Xt,1),1:size(Xt,2));

N = N';
T = T';

AllTracks(:,1) = Xt(:);
AllTracks(:,2) = Yt(:);
AllTracks(:,3) = T(:);
AllTracks(:,4) = N(:);

Tracks = AllTracks(...
    (~isnan(AllTracks(:,1)) & ~isnan(AllTracks(:,2))),:);

AllNDTracks(:,1) = Xnd(:);
AllNDTracks(:,2) = Ynd(:);
AllNDTracks(:,3) = T(:);
AllNDTracks(:,4) = N(:);

NDTracks = AllNDTracks(...
    (~isnan(AllNDTracks(:,1)) & ~isnan(AllNDTracks(:,2))),:);

end

```

## C.4 Ajustement des profils de fluorescence

La fonction `ibidi_lin` permet d'analyser les profils de front obtenus dans les expériences de migration antagoniste pour déterminer à chaque pas de temps du kymographe une position et une largeur pour les fronts des deux populations.

```

function Output = ibidi_lin(M,Time,X,draw)

% ibidi_lin - Profiles fitting
%
% Output = ibidi_lin(M,Time,X,draw)
%
% M is the kymograph obtained from the fluorescence signal

```

```

% Time is a vector containing the physical value of each time point
% X is a vector containing the physical values for the x-axis
% draw is a flag which triggers a graphical display of the profiles and
% the fitted functions at each time point if its value is 'draw'.

draw_prof = false;
smooth_par = 51;

if nargin == 4
    if strcmp(draw,'draw')
        draw_prof = true;
    end
end
if nargin < 3
    X = (1:size(M,2));
    if nargin < 2
        Time = 1:size(M,1);
    end
end

MidProf = round(size(M,2)/2);
M = double(M);
Output = struct([]);
Output(1).X = X;
X = X';
Xmin = min(X);
Xmax = max(X);
Prof1 = M(1,:)' ;
Lmin = 0;
Lmax = Inf;
Lstart = mean(abs(X))/10;

% Definition of the fit functions
fitlin_ud = fittype( @(L,x0,x) ...
    (x<(x0-L))+(-1/(2*L))*(x-x0)+1/2) .* (x>=(x0-L) & x<=(x0+L))...
);

fitlin_du = fittype( @(L,x0,x) ...
    (x>(x0+L))+1/(2*L)*(x-x0)+1/2) .* (x>=(x0-L) & x<=(x0+L))...
);

% Choice of the adapted fit function
if mean(Prof1(1:MidProf)) > mean(Prof1(MidProf:end))
    fitlin = fitlin_ud;
else
    fitlin = fitlin_du;
end

% Computation
tmax = size(M,1);
for t = 1:tmax

    Profile = M(t,:)' ;
    Profile = smooth(Profile,smooth_par)/max(smooth(Profile,smooth_par));

```

```
[flin,gof] = fit(X,Profile,fitlin,...
    'StartPoint',[Lstart,mean(X)],...
    'Lower',[Lmin,Xmin],...
    'Upper',[Lmax,Xmax]);
fcoeff = coeffvalues(flin);
fitv = confint(flin);

% Graphical display

if draw_prof
    plot(X,Profile,'+');
    hold on
    plot(flin);
    hold off
    xlab = strcat('Frame_#',num2str(t,'%d'),'/',num2str(tmax,'%d'));
    xlabel(xlab);
    pause(0.1)
end;

% Output

Output(t).Time = Time(t);
Output(t).L = fcoeff(1);
Output(t).LInt = fitv(:,1);
Output(t).x0 = fcoeff(2);
Output(t).x0Int = fitv(:,2);
Output(t).Gof = gof;
Output(t).Rsq = gof.rsquare;
Output(t).Fit = flin;

end

end
```



# Annexe D

## Macros ImageJ

Cette annexe présente quelques unes des macros ImageJ utilisées pour automatiser les traitements d'images de ce travail de thèse.

### D.1 Assemblage d'images

La macro `IbidiProfiler_InfStitching` permet de reconstituer les films à partir de plusieurs champs de vision et de les redimensionner pour éviter d'avoir des fichiers trop volumineux pour être manipulés. Après une rotation permettant d'aligner les bords initiaux des populations avec la verticale, les films sont prêts à être transformés en kymographes.

```
//  
// IbidiProfiler_InfStitching macro  
//  
  
// Select an image from the experiment  
path = File.openDialog("Select an image file");  
dir = File.getParent(path);  
name = File.getName(path);  
  
// Parameters for stitching  
firstfov = getNumber("First FOV index", 1)  
lastfov = getNumber("Last FOV index", firstfov+1);  
scale = getNumber("Scale (%)", 25);  
nbchan = getNumber("Number of channels", 1);  
stpath = File.openDialog("Select the stitching parameters text file");  
stpar = File.openAsString(stpath);  
stparlines = split(stpar, "\n");  
outputdir = getDirectory("Select Output Directory");  
  
// Select the wanted output stacks  
filter = newArray(nbchan);  
stackname = newArray(nbchan);  
  
for (c=0; c<=nbchan-1; c++) {  
  
    filter[c] = getString("Channel #"+(c+1)+" filter", "");  
    stackname[c] = getString("Stack name", "");  
  
}
```

```
// Scale and stitch the images to make stacks
for (c=0; c<=nbchan-1; c++) {

    run("Image Sequence...", "open="+path+" starting=1 increment=1 scale="+
        scale+" file="+filter[c]+"_s"+firstfov+"_ sort");
    rename("Stitched");
    for (s=firstfov+1; s<=lastfov; s++) {

        run("Image Sequence...", "open="+path+" starting=1 increment=1
            scale="+scale+" file="+filter[c]+"_s"+s+"_ sort");
        rename("Part");
        stitch = stparlines[s-firstfov-1];
        stxy = split(stitch, " xy=", "");
        dx = stxy[0];
        dy = stxy[1];
        run("3D Stitching", "first_stack=Stitched use_channel_for_first
            =[Red, Green and Blue] second_stack=Part
            use_channel_for_second=[Red, Green and Blue] peaks=5
            create_fused_image fusion_method=[Max. Intensity] fusion=1
            .50 fused_image_name=Out number_of_other_channels=1 x="+dx+"
            y="+dy+" z=0");
        close("Stitched");
        close("Part");
        selectWindow("Out");
        rename("Stitched");
    }

    saveAs("Tiff", outputdir+stackname[c]+"_sc"+scale+".tif");
    close();
}
}
```

## D.2 Calcul de kymographes

La macro `IbidiProfiler_InfProfiler` permet d'obtenir des kymographes à partir des films en fluorescence des deux types cellulaires dans les expériences de migration antagoniste. Après un filtrage passe-haut servant à corriger un éclairage inhomogène, les images sont seuillées à l'aide de la méthode de LI et projetées sur la direction de migration à chaque pas de temps.

```
//
// IbidiProfiler_InfProfiler macro
//

nbstacks = getNumber("Number of stacks", 1);
outputdir = getDirectory("Select Output Directory");
roll = getNumber("Rolling ball radius", 100);

path = newArray(nbstacks);
name = newArray(nbstacks);

// Select the stacks
for (s=0; s<=nbstacks-1; s++) {

    path[s] = File.openDialog("Select the stack #"+(s+1));
    namestr = File.getName(path[s]);
    namestr = split(namestr, ".");
}
```

```

        name[s] = namestr[0];
    }

    for (s=0; s<=nbstacks-1; s++) {

        open(path[s]);
        rename("Stack");
        getDimensions(dummy, height, dummy, tmax, dummy);
        run("Subtract Background...", "rolling="+roll+" stack");

        // Threshold
        run("Duplicate...", "title=Li duplicate range=1-"+tmax);
        setAutoThreshold("Li dark");
        run("Convert to Mask", "method=Li background=Dark");
        run("Invert LUT");

        // Project and make a kymograph
        run("Reslice [/]...", "output=1.000 start=Top avoid");
        run("Z Project...", "start=1 stop="+height+" projection=[Sum Slices]");
        saveAs("Tiff", outputdir+File.separator+name[s]+"_Li.tif");
        close();
        selectWindow("Li");
        close();
        selectWindow("Reslice of Li");
        close();

        selectWindow("Stack");
        close();
    }
}

```

## D.3 Quantification des cadhérines

La macro EcadQuantif permet de tracer une ligne au niveau d'une membrane cellule-cellule, en ayant au préalable choisi la hauteur où l'expression des cadhérines semble la mieux résolue pour cette membrane. Elle découpe un voisinage rectangulaire centré autour de cette ligne dans l'image. La macro en récupère ensuite le profil d'intensité, moyenné dans la direction de la membrane, le long de la direction perpendiculaire à celle-ci. Ce profil est obtenu sur une longueur de 80 pixels, soit environ 8  $\mu\text{m}$ . La macro permet de mener ce processus successivement sur une multitude de membranes (typiquement entre 30 et 40).

```

//
// EcadQuantif macro
//

// Open the z-stack
path = File.openDialog("Select a file");
dir = File.getParent(path);
name = File.getName(path);

// Create a subdirectory to save the profiles
open(path);
name = split(name, ".");
outputdir = getDirectory("Select output directory");

```



```

subdir = getString("Name of the subdirectory",name[0]);
File.makeDirectory(outputdir+subdir+File.separator);
quit = false;
n = 1;

rename(subdir);
setTool("line");

while (!quit) {

    // Wait for the selection of the junction as a line on the correct slice
    run("Line Width...", "line=85");
    waitForUser("Cell-cell junction","Please select the correct slice and
        draw a line over the cell-cell junction #"+n+".\n(Or press the
        Escape key to end the macro.)");

    // Create a rectangular selection around the line, rotate it and save it
    s = getSliceNumber();
    getSelectionCoordinates(x,y);
    angle = -atan((y[1]-y[0])/(x[1]-x[0]))*180/PI;
    length = sqrt(pow(x[1]-x[0],2)+pow(y[1]-y[0],2))-2;
    run("Line to Area");
    run("Duplicate...", " ");
    juncname = "n"+n+"_s"+s+"_x"+round(x[0])+"_y"+round(y[0])+"_x"+round(x
        [1])+"_y"+round(y[1]);
    run("Clear Outside");
    run("Select None");
    run("Rotate... ", "angle="+angle-90+" grid=1 interpolation=Bilinear
        enlarge");
    run("Canvas Size...", "width=81 height="+length+" position=Center zero")
        ;
    saveAs("Tiff", outputdir+subdir+File.separator+juncname+".tif");
    rename(juncname);

    // Get the intensity profile from the selection
    run("Reslice [/]...", "output=1.000 start=Top avoid");
    rename("Reslice");
    run("Z Project...", "projection=[Average Intensity]");
    close("Reslice");
    rename("Zproject");
    run("Line Width...", "line=1");
    makeLine(0,0.5,81,0.5);
    run("Clear Results");
    profile = getProfile();
    for (i=0; i<profile.length; i++)
        setResult("Value", i, profile[i]);
    updateResults;
    saveAs("results", outputdir+subdir+File.separator+"n"+n+".txt");
    close("Zproject");
    selectWindow(juncname);
    close(juncname);

    // Draw an overlaid line on the z-stack as a reminder
    selectWindow(subdir);
    run("Select None");
    run("Line Width...", "line=2");
    Overlay.drawLine(x[0], y[0], x[1], y[1]);
    setColor("yellow");
}

```

```
    Overlay.show;  
    n++;  
}
```



# Annexe E

## Articles

D'autres travaux auxquels j'ai participé au sein de l'équipe ou dans le cadre de collaborations se sont soldés par deux articles publiés :

- **Perfect nematic order in confined monolayers of spindle-shaped cells**, issu du travail de Guillaume DUCLOS *et al.*
- **How cells flow in the spreading of cellular aggregates**, issu du travail de Grégory BEAUNE *et al.*

Bien que non joints à cette thèse, ils sont respectivement disponibles aux références [176] et [188].

L'article joint ci-après porte sur les résultats de cette thèse concernant la maturation de monocouches de cellules HBEC (voir chapitre 3). Il est actuellement en révision.

### **Physics of active jamming: collective cellular motion in a monolayer**

Simon GARCIA, Édouard HANNEZO, Jens ELGETI, Jean-François JOANNY,  
Pascal SILBERZAN & Nir S. GOV

# Physics of active jamming: collective cellular motion in a monolayer

Simon Garcia<sup>1,2</sup>, Edouard Hannezo<sup>1,3</sup>, Jens Elgeti<sup>4</sup>, Jean-François Joanny<sup>1</sup>, Pascal Silberzan<sup>1,2\*</sup> and Nir S. Gov<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire PhysicoChimie Curie. Institut Curie - Centre de Recherche - Paris Sciences et Lettres. Centre National de la Recherche Scientifique. Université Pierre et Marie Curie - Sorbonne Universités. 75248 Paris, France.

<sup>2</sup> Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer

<sup>3</sup> Cavendish Laboratory, University of Cambridge. CB3 0HE Cambridge, United Kingdom

<sup>4</sup> Theoretical Soft Matter and Biophysics, Institute of Complex Systems and Institute for Advanced Simulation, Forschungszentrum Jülich, D-52425 Jülich, Germany

<sup>5</sup> Department of Chemical Physics, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel.

\* To whom correspondence should be sent: Pascal Silberzan, E-mail: [pascal.silberzan@curie.fr](mailto:pascal.silberzan@curie.fr); Nir Gov, E-mail: [nir.gov@weizmann.ac.il](mailto:nir.gov@weizmann.ac.il)

## Keywords

Collective cell migration, Jamming, Glass transition, Dynamic inhomogeneity, Cell-cell adhesion

## **Abstract**

Although collective cell motion plays an important role for example during wound healing, embryogenesis or cancer progression, the fundamental rules governing this motion are still not well understood in particular at high cell density. We study here the motion of epithelial cells within a monolayer, over long times. We observe that as the cell layer ages it slows down monotonously, while the velocity correlation length first increases as the cells slow down, but eventually decreases at the slowest motions. By comparing experiments, analytic model and detailed particle-based simulations, we shed light on this biological amorphous solidification process, demonstrating that the observed dynamics can be explained as a consequence of the combined maturation and strengthening of cell-cell and cell-substrate adhesion. Surprisingly, the increase of cell surface density due to proliferation is only secondary in this process. We find very general relations between the mean cell velocity and velocity correlation lengths, which apply for aggregates of self-propelled particles, as well as motile cells, and could possibly be used to discriminate between various parameter changes in vivo, from non-invasive microscopy data.

Significance statement: Collective cell motion is very important in many biological processes such as wound healing, embryogenesis or cancer progression. Nevertheless, it is not clear which parameters control the transition from freely moving single cells to collective jammed motion. In this article, we uncover complex dynamics as a cell monolayer ages, where cell motion is shown to gradually slow down with time, while the distance over which cell displacements

are correlated first increases drastically and then decreases. This change of behavior is not controlled by cell density, but rather by a maturation of the cell-cell and cell-substrate contacts. By comparing experiments, analytic model and detailed particle-based simulations, we shed light on this biological amorphous solidification process.

## Introduction

Collective motion of cells is crucial in many biological phenomena, including embryonic development (1), wound healing (2, 3), tissue repair (1, 4) and cancer (1, 4). Therefore, understanding the physics underlying how individually migrating cells combine their motion to collectively migrate is presently a matter of intense study. In this context, several studies have recently shown by numerical simulations that local alignment rules can result in the emergence of strongly correlated cellular motions in a confluent monolayer (5–9).

As time goes, these cell movements in the monolayer slow down. This classic observation is usually associated with the so-called “density-mediated contact inhibition of locomotion” (10, 11). To go further in the analysis of this phenomenon, several observations (6, 12, 13) and simulations (7, 14, 15) give an interesting new angle by emphasizing the analogy between a cell monolayer and a bidimensional “jammed” colloidal system, where the individual motions of the particles are confined in “cages” of the size of the particles, and where the whole system behaves as a solid (16–19). In particular, the increase in the characteristic length-scales describing the velocity field as well as the presence of “giant” density fluctuations (20, 21) appear to validate this analogy. As a consequence, several theoretical descriptions have been proposed to describe cell assemblies within the conceptual framework used to describe jamming in active systems (6, 12, 13, 22–24).

Cellular density (the equivalent of the packing fraction in colloidal systems) is often assumed to be the principal control parameter in these systems (6, 12, 25–



27). However, since cellular densities vary between cell types and growing conditions, other parameters such as i/ cell-cell adhesion energy, ii/ magnitude of cellular forces and persistence time for these forces (28), or iii/ the preferred cellular perimeter (15) have also been considered. Indeed, any of these parameters could a priori contribute to the jamming transition, and a criterion to discriminate between each contribution is lacking until now.

In the present study, we investigate the motion of a proliferating, motile, population of immortalized Human Bronchial Epithelial Cells (HBEC) (29) . Even though cellular density increases during the time course of our experiments, we find that it is not the main control parameter to describe the collective motion of these cells. Rather, we observe that the decrease in cell motility is due to an aging of the cellular system that we attribute to the maturation of cell-cell and cell-substrate junctions. This aging can be formalized in a simple model and in numerical simulations that both describe well our experimental observations.

## Results

### Cellular slowing down and evolution of the velocity correlations

We have experimentally studied the dynamics of immortalized HBEC cells in a monolayer and its evolution over time. For these weakly cohesive cells, confluence could not be accurately defined since, at low density, the cells were very dynamic, the population being best described as a cellular gas with low interactions between particles. This state was followed by a situation where the cells remained very motile but with no more voids between them because of the larger cell density (“fluid phase”). Of notice, by analyzing the density fluctuations in the layer, we found the characteristic signature of non-equilibrium dynamics, namely giant number fluctuations (30) (Fig. S1).

By mapping the displacement field within the monolayer over time (3) (Movie S1, Fig. 1A), we first measured the overall cell speed, or root-mean-square velocity  $v_{\text{rms}}$ , in the layer and observed that it decreased monotonously (Fig. 1B) with time until being too small to be measured. We then computed the velocity-velocity spatial correlation function  $C_{vv}(r)$  for each time, from which we extracted a correlation length  $\xi_{vv}(t)$  (Fig. 1C). This correlation length was small (of order 2-3 cells sizes) at the beginning of the experiment (Fig. 1D), and then increased to a value corresponding to  $\sim 7$  cell sizes over the course of several hours. Eventually at longer times  $\xi_{vv}$  decreased again to the single cell size.

Inspired by previous work (6, 12, 26), we first tried to correlate this progressive slowing down of the cells with their surface density  $\rho$ . Indeed, because of proliferation,  $\rho$  did increase over time. However, the previously observed and calculated relation  $v_{\text{rms}} \sim 1/\sqrt{\rho}$  (25, 27) was clearly not consistent with the slow-

down of the cells that we observed at long times, suggesting that it was not dominated by the increase in density. Furthermore, we noticed that in the present case the velocity decreased by a factor of 10 and the density increased only by a factor of 2 (from  $1.3 \cdot 10^5$  to  $2.5 \cdot 10^5$  cells  $\text{cm}^{-2}$ ) in the time-course of our experiments (Fig. 1B) (compared with factors of 2 and 3 respectively in (27)). Finally, since it was practically not possible to dynamically access the cell density from the phase contrast images in dense monolayers, we reasoned that if density was the major control parameter, it is expected that different experiments performed with different initial seeding density would be described by the same  $\xi_{vv}(t)$  curve with a shift in times. This is however not what was observed (Figure 2A). Furthermore, at a given time and for the same number of cells seeded on the substrate,  $\xi_{vv}(t)$  and  $\rho$  were found to be basically uncorrelated (Pearson coefficient =  $0.0 \pm 0.3$ ) (Fig. 2B). Altogether, these observations point to an aging of the monolayer distinct from a simple increase in density.

### **Analysis in terms of effective clusters**

Motivated by these unexpected observations we first analyzed the cellular layer in terms of fictitious clusters, which are defined to have the radius of the velocity-velocity correlation length  $\xi_{vv}$ . Each such cluster is assumed to move as a solid object, so that all the cells inside it have the same velocity, and are therefore perfectly correlated in their motion. This amounts to replacing the exponential decay in the velocity correlations by a step function at radius  $\xi_{vv}$ .

We characterize the random active (motile) forces induced by the individual cells as having a typical force  $f_0$  and a mean burst length  $\tau_{noise}$  (persistence time of the

cellular traction force). We then solve the Langevin equation for the center-of-mass motion of a cluster (31) to access the average cluster speed,  $v_{rms}$ , in the limit of vanishing inertial effects  $\lambda\tau_{noise} \gg 1$ , where  $\lambda$  is the effective friction coefficient of the cluster. We consider the two extreme cases of no correlation or perfect correlation between the individual traction forces of the cells inside the cluster. We therefore get:

$$\langle v^2 \rangle_{nocor} = \frac{Nf_0^2}{2\lambda^2}, \quad \langle v^2 \rangle_{cor} = \frac{N^2f_0^2}{2\lambda^2} \quad (1)$$

where  $N$  is the number of cells in the clusters ( $N \propto \xi_{vv}^2$ ).

If the friction is dominated by the cell-substrate interactions, we have:  $\lambda \propto \xi_{vv}^2$  and we get from Eq.(1) that (Supp. Notes, Fig. S2)

$$\langle v^2 \rangle_{nocor} \propto \frac{1}{\xi_{vv}^2} \Rightarrow \sqrt{\langle v^2 \rangle_{nocor}} = v_{rms} \propto \frac{1}{\xi_{vv}}, \quad \langle v^2 \rangle_{cor} \propto \xi_{vv}^0 \quad (2)$$

Our model yields other scaling relations in different cases. Consider for instance that the cells are non-adhesive, so a connected cluster arises only when enough cells in the cluster are (transiently) pointing their individual traction forces into the cluster, thereby forming a cluster by “jamming” each other (such clusters are found for repulsive active particles (7, 32)). Since such clusters form when the particles have their motile forces directed against each other, they necessarily represent a form of anti-correlation between the individual traction forces. We can analyze a simple extreme case where we consider a cluster with all the particles pointing their traction forces at the cluster center (Supp notes, Fig. S3). In such a case almost all the forces cancel, and the velocity of the cluster is dominated by the unbalanced forces of few cells, which is of order 1 in the limit of perfect cancellation (it is of order  $\sqrt{N}$  otherwise). In this limiting case we get (for friction that is dominated by the cell-substrate interactions)

$$\langle v^2 \rangle_{repulse} = \frac{f_0^2}{2\lambda^2} \Rightarrow \sqrt{\langle v^2 \rangle_{repulse}} = v_{rms} \propto \frac{1}{\xi_{vv}^2} \quad (3)$$

We therefore expect in general the exponents to be between -1 and -2 for cells dominated by substrate friction.

Another interesting limit is the situation where effective friction is dominated by cell-cell interactions rather than cell-substrate interactions. Then, most of the dissipation takes place at the perimeter of the clusters and therefore,  $\lambda \propto \xi_{vv}$ . Using this relation in Eq. 1 we get (Supp. Notes, Fig. S2)

$$\langle v^2 \rangle_{nocor} \propto \xi_{vv}^0, \quad \langle v^2 \rangle_{cor} \propto \xi_{vv}^2 \Rightarrow \sqrt{\langle v^2 \rangle_{cor}} = v_{rms} \propto \xi_{vv} \quad (4)$$

In any case, the r.m.s. velocity  $v_{rms}$  increases with the correlation length  $\xi_{vv}$ . It is highly plausible that when cell-cell interactions (effective friction) are strong, the cellular traction forces become highly correlated. In that case our model predicts (according to Eq. 4) that  $v_{rms}$  is proportional to  $\xi_{vv}$ .

Motivated by this cluster analysis we plotted the velocity correlation length as a function of the r.m.s. velocity of the cells (Fig. 2C,D). All experiments (including different seeding densities) collapsed onto a characteristic universal bell-shape curve (Figure 2B) for different experiments, suggesting that  $v_{rms}$  is indeed the correct control parameter. For large velocities we find that the power-law relations (Eqs. 2,3) which predict exponents in the range -1 to -2, seems to fit the data reasonably well (Fig. 2D), which would indicate that in this regime the effective friction is dominated by cell-surface interactions (as in (31)).

In contrast, at low velocities the slope became positive with the correlation length decreasing with further slowing down (bell shape curve in Fig. 2C,D). The presence

of such a second regime was highly surprising. Altogether these data and analysis suggest that the layer is initially (high speed regime) fluid-like with low coherence in the motile forces that neighboring cells exert, and dominated by constant cell-surface effective friction. At later times (small speeds) the behavior changes, which may indicate that cell-cell (and cell-substrate, see below) interactions could dominate the internal friction and also give rise to correlated traction forces. Please, note that the density evolution is only secondary in this interpretation, in contrast with other systems (27).

What could then be the mechanism driving this change in behavior of the cellular layer? Our simple clusters model hints at increased cell-cell interactions, so we sought to verify this prediction by looking for changes in the cell-cell cadherin-based junctions. As shown in Fig. 3A,B we find that as the cell layer ages, the contrast between the cadherin concentration at the cell-cell junctions and its cytoplasmic concentration significantly increased between Day1 and Day3 and 60hrs. This is in agreement with a similar behavior found previously in small cellular islands (33), where increased cell-cell adhesion with culture age decreased cell expansion velocity. We also find that cell-substrate adhesion, labeled by vinculin which is a member of the focal-adhesion (FA) complex (34, 35), became more homogeneously spread over the entire cell-substrate surface with time (Fig. 3C). As a matter of fact, the well-defined FAs initially present, disappeared progressively between Day1 and Day3. From these observations we can therefore conclude that, as time goes, the system ages by maturation of cell-cell cadherin-mediated contacts and cell-substrate adhesions.

We now go beyond the simple theoretical analysis described above, and consider a more detailed model for cell-cell and cell-substrate effective friction. We model the effective friction as arising from transient molecular adhesions that undergo binding-

unbinding dynamics, and that are affected by the shear forces. The molecular linkers are of the “slip-bond” type, so that applied shear forces due to relative velocity between the cells, or between the cell and substrate, tend to detach them (Supp Notes, Fig. S4). During the times that these linkers are attached, and stretched by the relative velocity, they exert a restoring force as they are assumed to behave as simple Hookean springs. This restoring force acts to resist the motion, and therefore gives rise to an effective friction term. The strength of the friction coefficient due to these linkers depends on the number of attached linker (adhesion) molecules, and therefore increases sharply when the velocity is reduced and their detachment rate decreases. Details of the calculations are given in the SI. The result is shown in Fig.4 for uncorrelated motile cellular forces, and smoothly connects between the  $v_{rms} \propto 1/\xi_{vv}$  behavior at large velocities and a turn-over at lower velocities. There is good qualitative agreement between this theoretical result (Fig. 4, Supp notes S5, S6) and the experimental observations (Fig. 2C). This suggests that the experimentally observed turn-over in the  $v_{rms}$  vs  $\xi_{vv}$  relation arises due to a continuous increase in the importance of cell-cell and cell-substrate frictions, through molecular adhesions, as the cellular layer slows down.

### **Theoretical model of interacting active particles: different routes to slowing down**

The theoretical treatment presented so far in terms of effective clusters relates the mean cellular velocities ( $v_{rms}$ ) to the velocity correlations length ( $\xi_{vv}$ ) (Eqs.1-4,supp Eqs. S1-S17), and it suggests a possible underlying mechanism leading to cellular slowing down in the first place.

In order to validate these predictions theoretically, we resorted to particle-based simulations of self-propelled (active) interacting particles (based on (9)). In this simulation we treat each particle as having a constant internal propulsive force, with a polarization vector that is diffusing freely in all directions. Each particle has the same properties, it is coupled to its neighbors through a short-range, repulsive medium-range attractive potential and experiences an additional velocity-dependent frictional force (both with the substrate and with neighboring cells). The details of the model and the fitting to the experimental data are given in the Materials and Methods section. Note that this model was used without any coupling between the internal polarization of the cells and their external interactions, so that there are no effective orientational interactions of the Vicsek-type (5, 6, 8) in this system.

From the experiments (Fig. 3) and analysis (Figs. 2C, Fig. 4) described above, we have evidence that both cell-cell and cell-substrate adhesion evolve as the cell layer ages. However, there could in principle be several other changes in the cellular behavior which contribute to the effect of slowing down. The advantage of using simulations is that we can explore independently the different “routes” to slowing down, and compare to the experiments. In addition to the effect of increase in the attractive interaction between the cells (described by the potential scaling factor  $k$ ), we also consider the following effects: (i) decrease in the propulsion force  $f_0$  produced by each particle, (ii) increase in the friction of the cells with the substrate  $\lambda_0$ , and (iii) increase in the cell-cell effective friction  $\lambda_{cell}$ . It is not a-priori clear if all or any of these routes would give the experimentally observed relation between the velocity and correlation length. The case of increasing particle density is discussed in the SI, but does not seem to pertain to the experiments we present here (Fig. 2B).



In Fig.5 we summarize the results of the simulations. Interestingly, we find that each of these routes give rise to distinguishably different scaling behavior. Stronger cell-cell adhesive contacts should manifest in our model as stronger cell-cell potential ( $k$ ). We find that when this parameter of the model increases in magnitude, the slowing down follows a scaling  $1/\xi^\alpha$ , with  $\alpha \cong 1$  (Fig. 5A). This is in agreement with the observed scaling in the experiments (Fig. 2D, fast regime). The route of decrease in the traction forces or increase in cell-cell effective friction produces a much shallower scaling  $\alpha < 1$  (Figs.5B,C), while increasing cell-substrate friction gives a completely opposite correlation ( $\alpha < 0$ , Fig. 5D). The effects of increasing the density are shown in Fig. 5E), where we find that there is indeed a slowing down, however it is strongly dependent on the form of the interaction potential between the cells, and its slope is generally not in the observed range.

Specifically, for increasing cell-cell attractive potential ( $k$ ) we find that the same  $1/\xi^\alpha$  scaling relation is satisfied continuously from the fluid phase (low  $k$ ) all the way to the solid phase (high  $k$ ) (Fig. 5A). The turn-over in the observed  $v_{rms} - \xi_{vv}$  relation (Fig. 2C,D) is therefore not directly due to the effective solidification of the cell layer. Following the analytic results of Fig.4, we simulate a system whereby we increase the cell-cell adhesion strength, while the cell-substrate friction increases in a non-linear manner for slow velocities (large  $k$ ). This is done following the indications from the analytic model (Fig. 4) and due to the observation (Fig. 3B) that show evolving cell-substrate adhesion (and effective friction) as the layer slows down. The result of such simulations is shown in Fig. 5F, which resemble very closely the observations (Fig. 2C) and the analytic calculation (Fig. 4 purple line). This behavior was found to be a robust feature of the simulations, independent of the particular choice of parameters (Suppl notes Fig. S7).

To conclude, we find from the above comparison between the experiments and the theory that the observed  $v_{rms}$  vs  $\xi_{vv}$  relation (Fig. 2C,D) is not likely to arise from a liquid-solid transition, but is very likely due to an increase in the effective cell-cell and cell-substrate frictions. The increase in the effective friction is due to the maturation of the cell-cell and cell-substrate adhesions with time (Fig. 3). Note that since we are simulating a dense system, and keeping the density fixed, our results are not arising from the specific form of the effective inter-particle potential. This is especially important since the usage of an effective potential that acts between the center of mass of each cell (particle), is a coarse-grained simplification of the complex cell-cell interactions that occur in reality.

### **Dynamical heterogeneities**

The solidification process of disordered, glassy, systems is often characterized by large dynamic heterogeneities (12, 23, 36–38). One way that the dynamic heterogeneities are quantified is by analyzing the mean size of clusters of the fastest 20% of particles in the system (39) ( $\xi_{het}$ ), which we plot as a function of  $v_{rms}$  (Fig. 6A). We find that  $\xi_{het}$  does **not** scale with the velocities in the same way as  $\xi_{vv}$  (Fig. 2C,D). While  $\xi_{vv}$  changes by a factor of  $\sim 3$  over the course of the layer aging, the heterogeneity length-scale  $\xi_{het}$  changes by a factor of  $\sim 1.5$  only. Comparing to the simulations, this qualitative agreement is a further indication that the cellular layer does not go through any sharp fluid-solid phase transition as it slows down (Fig. 6A,C). The inhomogeneous nature of the distribution of fast particles is shown in Fig. 6B,D from the experiments and simulations at the limits of cell-cell adhesion strength, respectively.

## Conclusion

- We show that cellular monolayers slow down over time, a process that is driven by aging (or maturation) of cell-cell contacts. Using physical models we are able to learn about the biological processes in this living system.
- The slowdown of the cellular layer does **not** go through a genuine phase transition, but is a dynamic change in the dominant internal forces that control the motion. We find an analogy between  $v_{rms}$  and temperature, with the system turning into an amorphous as it slows down, but without crossing a clear phase-transition line. The changing nature of the effective friction, as the system “cools”, is shown to drive the apparent phase change.
- We demonstrate that using experiments, simple analytic models and detailed particle-based simulations we can dissect the underlying mechanisms even in a complex system such as collective cell motion.
- The cells used in this study do not have very long-range correlations, unlike MDCK for example, and it seems that the correlations that do exist arise from the dynamics without any strong alignment interactions. Therefore our analysis would need to be adapted to cells showing larger scale correlations.

We have investigated here the phenomenon of the “solidification” of a continuous (confluent) cellular layer. By solidification we mean that the cellular layer begins as having large cellular velocities with cells diffusing within the layer as in a fluid. Over the course of hours, the cells slow down and become solid-like. We present a theoretical analysis of this system, in terms of clusters of cells moving in a correlated manner within the layer, which allows us to obtain analytic relations between the

r.m.s velocity and the velocity-correlation length. This analytic description provides insights about the dynamics within the cellular layer. We then complement the analytic analysis with a simulation study.

Overall, our study demonstrates that cellular layers behave as active, granular two-dimensional matter. Within such a layer we find that velocity correlations arise due to the inherent persistence of the traction forces of the individual cells, even in the absence of explicit orientational interactions (such as of the Vicsek form (6, 7, 9)). Comparing the simulation calculations and the statistical data from the experiments, we are able to determine that the dominant mechanism responsible for the cellular slowing down is driven by an increase of cell-cell adhesion. Orientational interactions that align the traction forces of neighboring cells do exist, but do not seem to have a strong effect in the present system. Other cellular systems may be more strongly dominated by such interactions (8). In fact, orientational ordering, similar to the changes in cell-substrate friction, produces a positive correlation between the cellular velocities and the velocity correlation length. Thus we demonstrate that our framework allows to conclusively discriminate between different types and classes of mechanisms that affect the collective dynamics *in vitro*. Therefore, it could in principle be directly applied to data acquired in *in vivo* situations, allowing to deduce the evolution of biological parameters, from simple and non-invasive 4D microscopy.

Beyond cellular behavior, our work is relevant to the general study of active out of equilibrium systems. We obtain new scaling relations between the velocity and the correlation length that dense active matter obeys, as they change from a highly fluid to an amorphous (glass-like) solid.

## Materials and Methods

**Cell culture and seeding.** We conducted experiments using Human Bronchial Epithelial Cells (HBEC), immortalized (HBEC3) by transfection with hTERT and Cdk4 genes (29, 40). HBEC cells (kind gift from Pr J. Minna lab, Dallas) were grown in Keratinocyte serum-free medium (Keratinocyte-SFM; Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 1% (vol/vol) penicillin-streptomycin solution (10,000 units/mL penicillin + 10 mg/mL streptomycin; Gibco), 2 mM L-glutamin (Gibco), 20 mM HEPES buffer solution (Gibco), 30 µg/mL G418 sulfate (Gibco), 250 ng/mL puromycin dihydrochloride (Gibco), 5 ng/mL prequalified human recombinant epidermal growth factor 1-53 (EGF 1-53; Gibco) and 50 µg/mL bovine pituitary extract (BPE; Gibco). Cells were maintained at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> partial pressure and 95% relative humidity atmosphere.

For videomicroscopy experiments, cells were seeded on glass-bottom (In Vitro Scientific, Sunnyvale, CA, USA) or polystyrene-bottom (TPP, Trasadingen, Switzerland) 12-well tissue culture plates. Between around 640,000 and around 1,280,000 cells were seeded per well. For immunocytochemistry experiments, cells were seeded on glass coverslips (around 400,000 cells per coverslip) put at the bottom of multiwell plates. For all experiments, the origin of time is always taken as the moment when the cells are seeded on the substrate. Cells were fixed at day 1 (21h < t < 23h) and day 3 (68h < t < 73h).

**Microscopy.** Time-lapse multifield experiments were performed in phase contrast on an automated IX71 inverted microscope (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan) equipped with the same temperature, humidity and CO<sub>2</sub> regulations as in culture (Life Imaging

Services, Basel, Switzerland). Images were acquired with a 10× objective and a CCD-camera (Retiga-4000R, Qimaging, Surrey, BC, Canada), for a typical field of view (FOV) of 1.5 mm × 1.5 mm. This microscope was also used in fluorescence to image Hoechst-labeled cells. Immunostained cells were observed under an upright Axio Imager.Z2 spinning-disk confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Both setups were controlled using MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

**Immunocytochemistry and fluorescence staining.** Cells were fixed with 4% (wt/vol) paraformaldehyde (Euromedex, Souffelweyersheim, France) for 10 min, quenched with 100 mM glycine (Euromedex) for 2 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Euromedex) for 15 min, then saturated in PBS supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum for 60 min. All those steps were performed at room temperature.

E-cadherin labeling was performed with a rabbit anti-E-cadherin antibody conjugated to Alexa Fluor 488 dye (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) at 1:800 for 1 h. Vinculin labeling was performed with a primary mouse anti-vinculin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 1:400 for 1 h, then with both a secondary goat anti-mouse IgG antibody conjugated to Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) at 1:500 and phalloidin conjugated to Alexa Fluor 488 dye (Molecular Probes) at 1:1000 for 1 h.

Eventually, the cells were mounted on glass slides using ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes), let overnight at 37°C under a dry atmosphere then imaged.

For density fluctuations measurements, living cells seeded in a glass-bottom 12-well plate (In Vitro Scientific) at different concentrations were incubated 26 h later with Hoechst 33342 (NucBlue Live ReadyProbes Reagent; Molecular Probes) during 1 h, then imaged.

**Velocity fields.** Most of the image processing was performed using MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA). Particle image velocimetry (PIV) analysis (41) was conducted using a custom algorithm based on the MatPIV software package for MATLAB (3, 42). Correlated subwindows were of size  $47.5 \mu\text{m} \times 47.5 \mu\text{m}$  (64x64 pixels) with a 75% overlap and typical time between two successive pictures was 5 min. We checked that the analysis was robust with respect to these parameters. Further analysis of the velocity fields was performed using functions from both MATLAB and the Image Processing Toolbox.

For all purposes, the mean velocity was subtracted from calculated velocity fields in order to avoid any drift-related bias. All the extracted physical quantities were time-averaged with a 2-hour-long sliding window.

**Fast clusters and heterogeneity length.** The fast clusters are determined at each time point by identifying the 20% of vectors with greatest modulus in our velocity field then considering as clusters all the contiguous regions (8-connectivity) (43). Heterogeneity length  $\xi_{\text{het}}$  is then calculated at each time point as the equivalent diameter of the average area of the fast clusters:  $\xi_{\text{het}}(t) = \langle \frac{4}{\pi} A_{\text{clust}}(t) \rangle^{1/2}$

**Density measurements.** Cellular density  $\rho_{\text{cell}}$  in the time-lapse experiments was determined by manual pointing-and-clicking. The positions of the Hoechst-labeled cells were obtained through thresholding fluorescence images of the nuclei, computing the distance map of the binary image, and performing a watershed

algorithm. The segmented nuclei were then reduced to their ultimate points. All those operations were performed using Fiji (44), a distribution of open-source ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) (45) focused on biological-image analysis.

For each image used in the measurement of cell density fluctuations, we first measured the total number of cells  $N_{\text{FOV}}$  in the FOV. For a given  $N_{\text{FOV}}$ , we then measured the number of cells  $N$  in interrogation windows of increasing size and monitored the deviation  $\Delta N$  to the average cell number  $\langle N \rangle$  as a function of  $\langle N \rangle$  for these different sizes (20).

**E-cadherin contrast calculation.** On the E-cadherin immunofluorescence images, an average intensity was measured at the cell-cell junction ( $i_{jct}$ ) and in the cytoplasm ( $i_{cyt}$ ) using ImageJ. These values were averaged over 30 to 40 cells ( $I_{jct} = \langle i_{jct} \rangle$  and  $I_{cyt} = \langle i_{cyt} \rangle$ ). We then defined and computed a contrast  $C = \frac{I_{jct} - I_{cyt}}{I_{jct} + I_{cyt}}$ .

### **Simulation model:**

Inspired by recent particle based models for motile cells (9)(46), each motile cell is modeled as a soft sticky sphere, with a constant motility force of strength  $f_0$ . All cells are constrained to evolve on a 2D surface. The direction of this motility force stays fixed for a mean persistence time  $\tau$  with a new random orientation chosen afterwards. Each cell interacts with its neighbors through a soft short-range repulsion, medium range attraction potential  $F$ , with a potential stiffness  $k$  and equilibrium distance  $r_n$ . Therefore, the potential reads:

$$F = k \left( \frac{r_n^2}{2r^2} - \frac{r_n}{r} \right)$$



Dissipation happens in two ways: (a) the radial component of the relative velocity between particles is dampened by a factor  $\lambda_{\text{cell}}$  as in previous dissipative particle dynamics (DPD) (47), and (b) a background friction  $\lambda$  dampens all velocities through a friction force  $F_f = \lambda \cdot v$ . A marginal amount of thermal noise is added, to avoid metastable states. See Refs (9, 48) for details of the simulation technique.

To emulate the velocity dependent cell-substrate adhesion, we render  $\lambda$  velocity-dependent:

$$\lambda(v) = \lambda_0 + \lambda_1 \exp\left(-\frac{v}{v_0}\right)$$

i.e. the background friction increases exponentially with a characteristic velocity  $v_0$ , to a maximum of  $\lambda_0 + \lambda_1$  at zero velocity.

Simulations are started from a preequilibrated distribution of  $N=1000$  cells in a  $20 \times 20$  simulation box with periodic boundary conditions. The simulation is then iterated for 1400 time units using standard methods for DPD (9, 49) to reach a steady state. Subsequently, over the next 100 time units velocities and their correlations are computed from the cell positions and displacements. While data is scattered significantly, the amount of scatter is very similar to the experimental one.

### **Measurement of the correlation lengths**

In order to extract the correlation length, we waited until the simulation reached a steady state, and measured the velocity-velocity correlation function as a function of distance  $r$  between two particles. In order to smooth high frequency noise arising from the simulation scheme, and match our analysis to the measured data, we computed velocity fields from the displacements of each particle, between a time  $T=2$ , equal to the typical persistence time for the particle polarity. We used different values of this

averaging time, to verify the results were qualitatively unchanged. In all instances we studied, the velocity-velocity correlation function was well fitted by a single exponential, from which we could extract the correlation length  $\xi_{vv}$ .

To make the characteristic cluster size of the fastest 20% cells, we used the same velocity field as calculated for the velocity-velocity correlation function, kept only the 20% fastest cells and defined that (among these 20% fastest cells) two neighboring cells were belonging to the same cluster if their distance  $r$  was less than 1.25 time the average cell-cell distance. We then calculated the mean size of these clusters, and plotted the clusters of Fig. 6D in the liquid phase ( $k=1$ ) and glassy phase ( $k=20$ ).

### **Units and parameters used in the simulation**

The simulations presented are inherently unit-less. We thus present our simulation results without units. Here we provide some explanations for the choice of parameter values in the simulations in order to match the experimental data, and how the simulation units should be converted to real physical units. The characteristic cell-cell distance in the simulation is 0.6, which means that one simulation length units corresponds to roughly 40  $\mu\text{m}$ . In Fig.5, the correlation length is therefore rescaled by this characteristic cell size. The characteristic persistence time for the cell polarity in the simulations is  $T=2.5$ , compared to typical values of  $\sim 30$  min for the epithelial cells (50), meaning that one simulation time unit is equal to roughly 10 min. We therefore rescaled the velocities in Fig.5 by cell length divided by  $T$ , which gives a characteristic velocity of 240  $\mu\text{m}/\text{h}$ . We chose the migration force  $f_0=1$ , and the cell-substrate friction parameter  $\lambda_0=10$  in our simulations, so that the velocity for isolated cells was 0.1 in the simulation units, which is 24  $\mu\text{m}/\text{h}$ , and matches well with the mean velocity observed in the experiments.

We also notice that our correlation length in the simulation goes from 0.5 to roughly 3-4 cell size, again in the same range as the experimental data, where the correlation length increases three-fold..

### **Values used in the simulation**

We started by increasing the values of the cell-cell coupling  $k$ , from 0.1 to 30, to obtain the results of Fig. 5A. the values of the other parameters are  $f_0=1$ ,  $\lambda_0 =10$  and  $\lambda_{\text{cell}} =10$ . We then fixed  $k=5$  to explore the rest of the phase diagram, varying the migration force  $f_0$  (Fig. 5B), the cell-cell effective friction  $\lambda_{\text{cell}}$  (Fig. 5C) and the cell-substrate friction  $\lambda_0$  (Fig. 5D). For each of these curves, we neglected the variation of cell-substrate friction with velocity, and also tried different values of  $k$ , to make sure that the shapes of the curves we were getting were universal. We also performed simulation for different shapes of the cell-cell interaction potential, and verified that the -1 power law when varying cell-cell coupling  $k$  was unchanged.

For the density variation (Fig. 5E), we varied the number of particles in the simulation box, going from a characteristic cell-cell distance of 0.2 to 1 in simulation length unit. In that case obviously, the shape of the interaction potential did play a major role.

## **Acknowledgments**

We thank Isabelle Bonnet, Axel Buguin, Jacques Camonis, Fanny Cayrac, Sylvie Coscoy, Guillaume Duclos, Philippe Marcq, Maria Carla Parrini and the members of the “biology-inspired physics at mesoscales” group for discussion and advice. We acknowledge the Cell and Tissue Imaging Platform (member of France-Bioimaging) of the Genetics and Developmental Biology Department (UMR3215/U934) of Institut Curie and in particular Olivier Renaud and Olivier Leroy. The laboratoire PhysicoChimie Curie is part of the Labex CelTisPhyBio. EH acknowledges the Bettencourt-Schueller Foundation's Young Researcher Prize and Trinity College's Junior Researcher Fellowship for their support. NGS and PS thank the Kavli Institute for Theoretical Physics (KITP) at Santa Barbara for its hospitality during the Workshop on Active Matter. This research was supported in part by the National Science Foundation under Grant No. NSF PHY1125915 for the workshop program at KITP. NSG would like to acknowledge the Institut Curie's Mayent-Rothschild Visiting Professor fund and Labex CelTisPhyBio for their support during the stay at the Institut Curie. N.S.G is the incumbent of the Lee and William Abramowitz Professorial Chair of Biophysics, and would like to thank also the ISF grant 580/12 for support.

1. Friedl P, Gilmour D (2009) Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(7):445–57.
2. Nnetu KD, Knorr M, Strehle D, Zink M, Käs J a. (2012) Directed persistent motion maintains sheet integrity during multi-cellular spreading and migration. *Soft Matter* 8:2913–2921.
3. Petitjean L, et al. (2010) Velocity fields in a collectively migrating epithelium. *Biophys J* 98(9):1790–800.
4. Ilina O, Friedl P (2009) Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J Cell Sci* 122(Pt 18):3203–8.
5. Vicsek T, Czirók A, Ben-Jacob E, Cohen I, Shochet O (1995) Novel type of phase transition in a system of self-driven particles. *Phys Rev Lett* 75(6):1226.
6. Szabó B, et al. (2006) Phase transition in the collective migration of tissue cells: Experiment and model. *Phys Rev E* 74(6):1–5.
7. Henkes S, Fily Y, Marchetti MC (2011) Active jamming: Self-propelled soft particles at high density. *Phys Rev E* 84(4):84–87.
8. Sepúlveda N, et al. (2013) Collective cell motion in an epithelial sheet can be quantitatively described by a stochastic interacting particle model. *PLoS Comput Biol* 9(3):e1002944.
9. Basan M, Elgeti J, Hannezo E, Rappel W-J, Levine H (2013) Alignment of cellular motility forces with tissue flow as a mechanism for efficient wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(7):2452–9.
10. Abercrombie M, Heaysman JEM (1953) Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. *Exp Cell Res* 5(1):111–131.
11. Stoker MGP, Rubin H (1967) Density dependent inhibition of cell growth in culture. *Nature* 215:171.
12. Angelini TE, et al. (2011) Glass-like dynamics of collective cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(12):4714–9.
13. Nnetu KD, Knorr M, Käs J a., Zink M (2012) The impact of jamming on boundaries of collectively moving weak-interacting cells. *New J Phys* 14(11):115012.
14. Yang X, Manning ML, Marchetti MC (2014) Aggregation and segregation of confined active particles. *Soft Matter* 10(34):6477–6484.
15. Bi D, Lopez JH, Schwarz JM, Manning ML (2014) A density-independent glass transition in biological tissues. *arxiv* (1):5.

16. Berthier L, et al. (2005) Direct experimental evidence of a growing length scale accompanying the glass transition. *Science* 310:1797–1800.
17. Cates M, Wittmer J, Bouchaud J-P, Claudin P (1998) Jamming, Force Chains, and Fragile Matter. *Phys Rev Lett* 81(9):1841–1844.
18. Liu AJ, Nagel SR (1998) Jamming is not just cool any more. *Nature* 396(November):21–22.
19. Silbert LE, Ertas D, Grest GS, Halsey TC, Levine D (2002) Analogies between granular jamming and the liquid-glass transition. *Phys Rev E - Stat Nonlinear, Soft Matter Phys* 65:3–6.
20. Duclos G, Garcia S, Yevick HG, Silberzan P (2014) Perfect nematic order in confined monolayers of spindle-shaped cells. *Soft Matter* 10:2346–2353.
21. Zehnder SM, Suaris M, Bellaire MM, Angelini TE (2015) Cell Volume Fluctuations in MDCK Monolayers. *Biophys J* 108(2):247–250.
22. Sadati M, Taheri Qazvini N, Krishnan R, Park CY, Fredberg JJ (2013) Collective migration and cell jamming. *Differentiation* 86(3):121–125.
23. Sadati M, Nourhani A, Fredberg JJ, Taheri Qazvini N (2014) Glass-like dynamics in the cell and in cellular collectives. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 6(April):137–149.
24. Fredberg JJ (2014) Power Steering, Power Brakes, and Jamming: Evolution of Collective Cell-Cell Interactions. *Physiology* 29(4):218–219.
25. Li B, Sun SX (2014) Coherent Motions in Confluent Cell Monolayer Sheets. *Biophys J* 107(7):1532–1541.
26. Marel A-K, et al. (2014) Flow and Diffusion in Channel-Guided Cell Migration. *Biophys J* 107(5):1054–1064.
27. Doxzen K, et al. (2013) Guidance of collective cell migration by substrate geometry. *Integr Biol (Camb)* 5(8):1026–35.
28. Schötz E-M, Lanio M, Talbot J a, Manning ML (2013) Glassy dynamics in three-dimensional embryonic tissues. *J R Soc Interface* 10:20130726.
29. Ramirez RD, et al. (2004) Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. *Cancer Res* 64(24):9027–34.
30. Marchetti MC, et al. (2013) Hydrodynamics of soft active matter. *Rev Mod Phys* 85(3):1143–1189.
31. Malet-Engra G, et al. (2014) Collective Cell Motility Promotes Chemotactic Prowess and Resistance to Chemorepulsion. *Curr Biol* Not yet pu:242–250.

32. Redner GS, Hagan MF, Baskaran A (2013) Structure and dynamics of a phase-separating active colloidal fluid. *Phys Rev Lett* 110(5):1–5.
33. Rolli CG, et al. (2012) Switchable adhesive substrates: revealing geometry dependence in collective cell behavior. *Biomaterials* 33(8):2409–18.
34. Humphries JD, et al. (2007) Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol* 179(5):1043–1057.
35. Carisey A, et al. (2013) Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner. *Curr Biol* 23(4):271–281.
36. Berthier L, Biroli G, Bouchaud J-P, Cipelletti L, Saarloos W van (2011) *Dynamical Heterogeneities in Glasses, Colloids, and Granular Media*.
37. Steinberg MS, Garrod DR (1975) Observations on the sorting-out of embryonic cells in monolayer culture. *J Cell Sci* 18(3):385–403.
38. Garrahan JP (2011) Dynamic heterogeneity comes to life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(12):4701–4702.
39. Angelini TE, Hannezo E, Trepat X, Fredberg JJ, Weitz D a. (2010) Cell Migration Driven by Cooperative Substrate Deformation Patterns. *Phys Rev Lett* 104(16):1–4.
40. Sato M, et al. (2013) Human lung epithelial cells progressed to malignancy through specific oncogenic manipulations. *Mol Cancer Res* 11(6):638–50.
41. Raffel M, Willert CE, Kompenhans J (1998) *Particle Image Velocimetry. A practical guide*. (Springer Verlag, Berlin).
42. Deforet M, et al. (2012) Automated velocity mapping of migrating cell populations (AVeMap). *Nat Methods* 9(11):1081–1083.
43. Tambe DT, et al. (2011) Collective cell guidance by cooperative intercellular forces. *Nat Mater* 10(6):469–75.
44. Schindelin J, et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7):676–682.
45. Rasband, W.S. ImageJ v1.46b (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 1997-2012) ImageJ v1.46b (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, 1997-2012).
46. Anna-Kristina Marel, Nils Podewitz, Zorn M, Rädler JO, Elgeti J (2014) Alignment of cell division axes in directed epithelial cell migration. *New J Phys* 16(11):115005.
47. Espanol P, Warren P (1995) Statistical mechanics of dissipative particle dynamics. *Europhys Lett* 30(4):191.

48. Basan M, Prost J, Joanny JF, Elgeti J (2011) Dissipative particle dynamics simulations for biological tissues: rheology and competition. *Phys Biol* 8(2):026014.
49. Nikunen P, Karttunen M, Vattulainen I (2003) How would you integrate the equations of motion in dissipative particle dynamics simulations? *Comput Phys Commun* 153(3):407–423.
50. Szabó A, et al. (2010) Collective cell motion in endothelial monolayers. *Phys Biol* 7(4):046007.



## Figure Legends

**Figure 1: Dynamics of the HBEC tissue.** – A. Example of a velocity field obtained through PIV superimposed to the corresponding phase contrast image of the monolayer. B Evolution of rms velocity  $v_{rms}$  in the tissue with time. Blue, green and red curves correspond to different initial number of cells seeded in the well, respectively around 640,000, 960,000 and 1,280,000 cells. C - Velocity-velocity radial correlation function  $C_{vv}(r)$ . Fitting a decreasing exponential function gives the correlation length  $\xi_{vv}$ . – D. Evolution of  $\xi_{vv}$  with time after seeding for 39 FOV. (color code is the same as in B-).

**Figure 2: Velocity controls the correlation.** – A. Comparison of the  $\xi_{vv}(t)$  evolution curves for different seeding densities. The times have been shifted to superimpose the early evolutions. B- No significant correlation between  $\xi_{vv}$  and cell density  $\rho_{cell}$  was found for given time points. Here, 8 FOV were picked among the wells seeded with 640,000 cells at  $t = 21$  h. Pearson's correlation coefficient is  $r = 0.34$ . C- The different  $\xi_{vv}(v_{rms})$  curves (same data as Figure 1D) nicely superimpose and describe a single master curve. D- Evolution of the monolayer in the  $v_{rms}$ - $\xi_{vv}$  space for a representative FOV.

**Figure 3: Aging of the system through evolution of junction proteins with time.**– A. Tissue stained for cell-cell junctions. Cadherin concentration is observed to increase at the cell-cell contacts as the cell layer ages. – B. Quantification of the contrast in cadherin signal between the junction and the cytoplasm. - C As the layer ages vinculin distribution is observed to evolve from small complexes at the ends of actin filaments to a more homogeneous and uniform distribution over the whole cell-substrate contact area. Scale bars: 20  $\mu$ m

**Figure 4: Calculated  $v_{RMS}$ - $\xi_{vv}$  relation using the cluster analysis.** Brown line -  $v_{RMS} \propto 1/\xi_{vv}$  relation for uncorrelated noise and constant friction (Eq.2), blue and purple lines – for uncorrelated noise and velocity dependent cell-cell and cell-substrate friction respectively (Eqs.S13,S17, Figs.S5,S6). At low velocities the cell-cell or cell-substrate adhesion molecules are able to exert an increasing effective friction due to their increasing life-time. For cell-cell adhesion we find that there is a minimal velocity at which the correlation length  $\xi_{vv}$  vanishes (Eq.S14). For cell-substrate friction the  $\xi_{vv}$  does not vanish at any velocity, but there is a pronounced minimum (Fig.S6).

**Figure 5: Simulations of cellular dynamics.** Simulated  $v_{rms}$ - $\xi_{vv}$  relation while changing only one parameter in the model (symbols), while keeping the others fixed to the values specified in Materials and Methods: (A) increasing cell-cell adhesion ( $k$ ), resulting in a power-law (solid line)  $v_{rms} \propto 1/\xi_{vv}^\alpha$ , with  $\alpha = 1 \pm 0.03$ . (B) decreasing cell propulsive force ( $f_0$ ), resulting in  $\alpha = 0.37 \pm 0.02$ . (C) increasing cell-cell effective friction, resulting in  $\alpha = 0.66 \pm 0.04$ . (D) increasing cell-substrate friction, resulting in  $\alpha = -0.45 \pm 0.03$ . (E) increasing the cell density, resulting in  $\alpha = -0.32 \pm 0.04$  (but strongly depends on the interaction strength). (F) increasing cell-cell adhesion, while increasing non-linearly the cell-substrate friction at low velocities, for  $\lambda_0 = 1$ . All graphs are plotted in rescaled units (see Materials and Methods).

**Figure 6: Dynamics of fast clusters.** – A. Evolution of the experimentally measured heterogeneity length  $\xi_{het}$  with  $v_{rms}$  (same color coding as in Fig.1). Inset:  $\xi_{het}$  vs.  $\xi_{vv}$ . B. Inhomogeneous nature of the spatial distribution of the fast cells (red arrows) at different times in the experiments – C. Same as panel (A) from the simulated data. Note that, since no increasing friction was implemented in this simulation, the curve

decreases monotonously. In both the simulations and experiments,  $\xi_{het}$  varies much less than  $\xi_{vv}$  for the same velocity range — D. Same as B from simulations for a fluid-like ( $k=1$ , right panel), and solid-like ( $k=20$ , left panel) cell layer. Note that in both the simulations and experiments (panel B), the fast cells are more dispersed in the high velocity regime and form more compact clusters and streams in the low  $v_{rms}$  regime.

**Movie S1: Evolution of a layer of HBEC cells with time.** Scale bar: 300  $\mu\text{m}$ .

**Movie S2: Visualization of particle based simulations for active jamming with velocity dependent friction.** Particles are color-coded according to their initial radial position, to visualize the dispersion over time. Blue line represents the simulation box. The system shown here is in the very liquid regime where cell-cell coupling is relatively weak.

**Movie S3: Visualization of particle based simulations for active jamming with velocity dependent friction.** Particles are color-coded according to their initial radial position, to visualize the dispersion over time. Blue line represents the simulation box. The system shown here is near the peak of the  $\xi_{vv}$  vs  $v_{RMS}$  curve (Fig.5F).

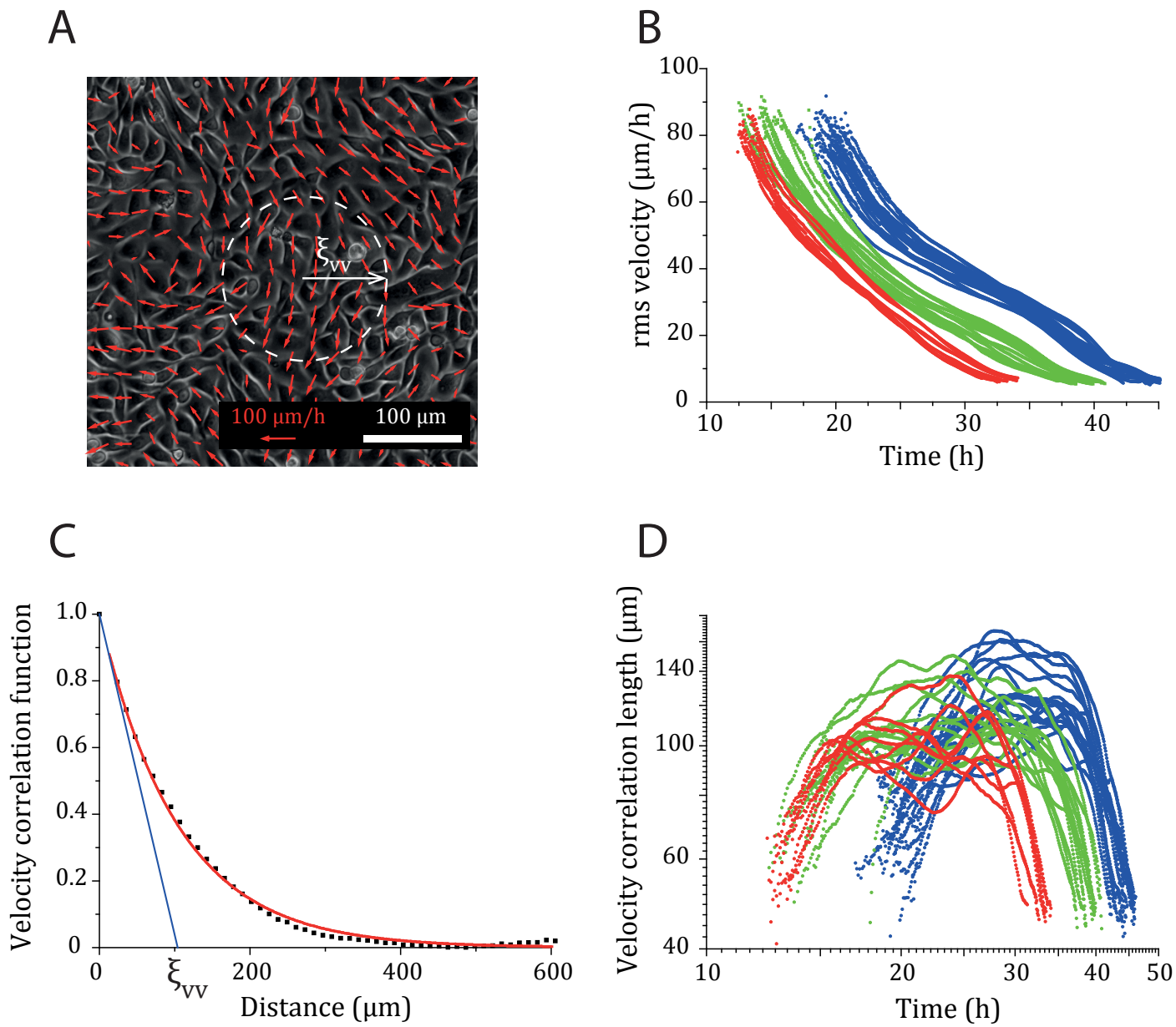


Figure 1

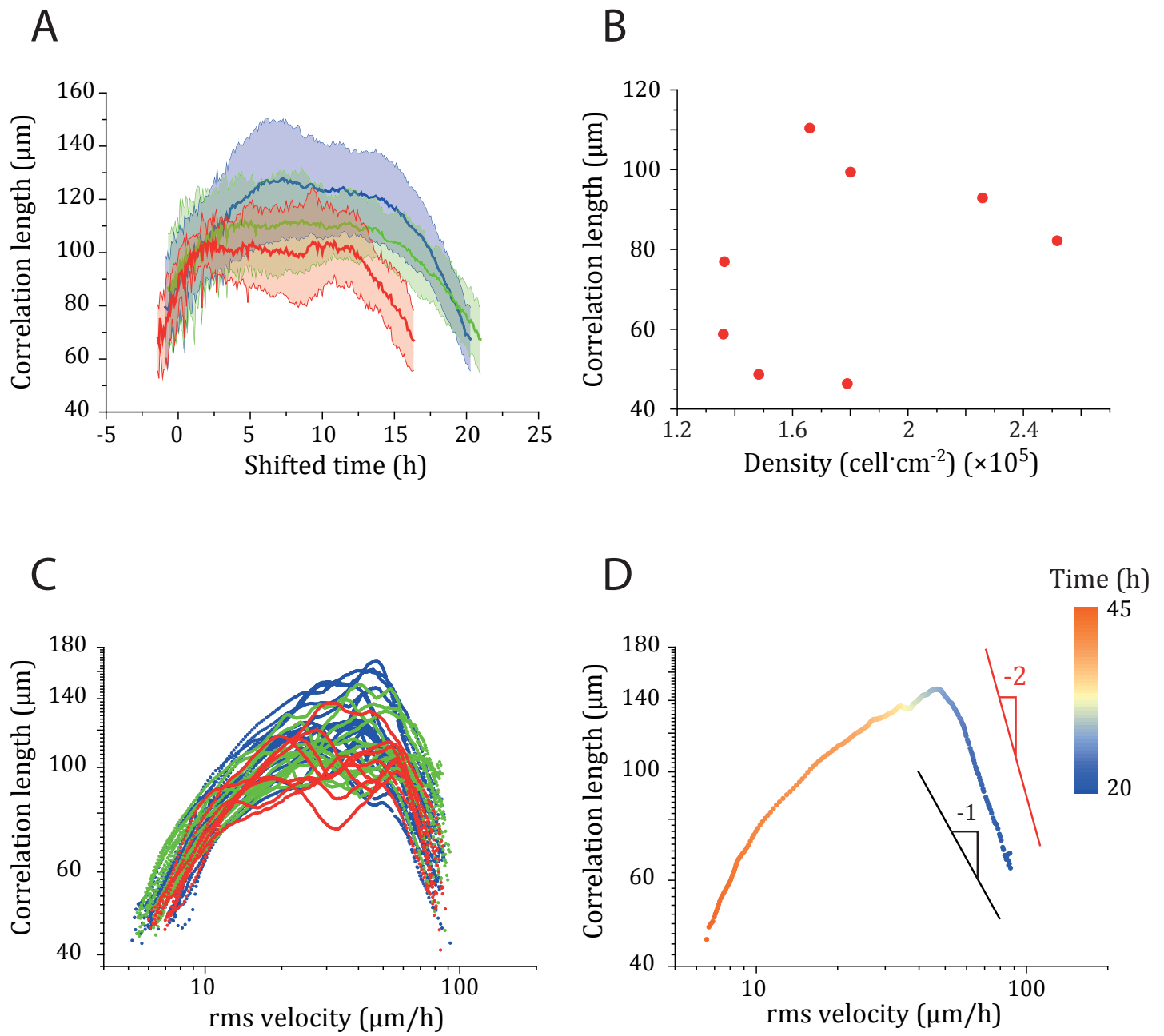
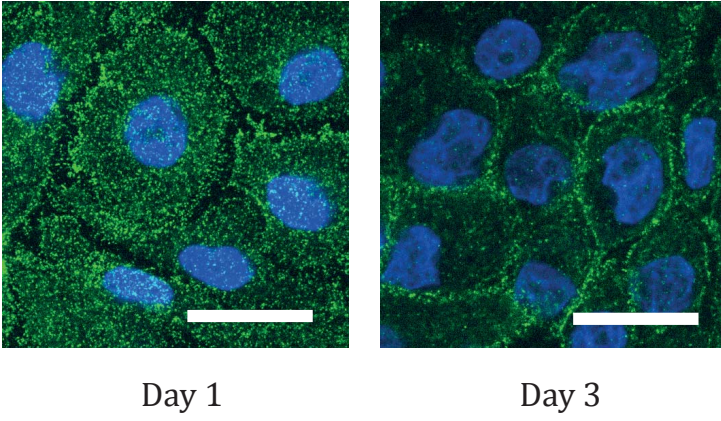
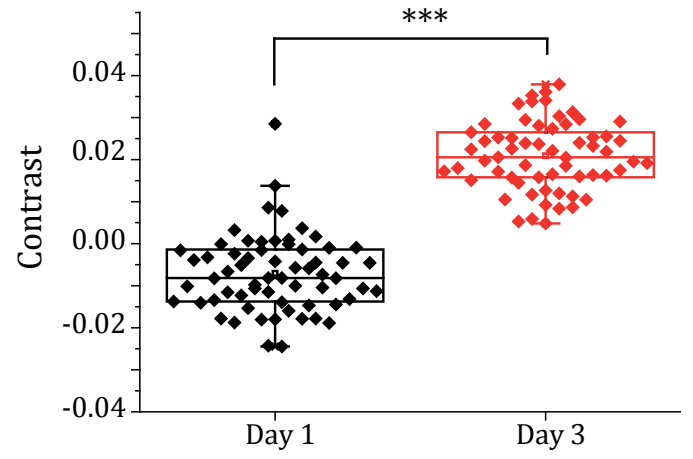


Figure 2

A cadherins - nucleus



B



C vinculin - actin - nucleus

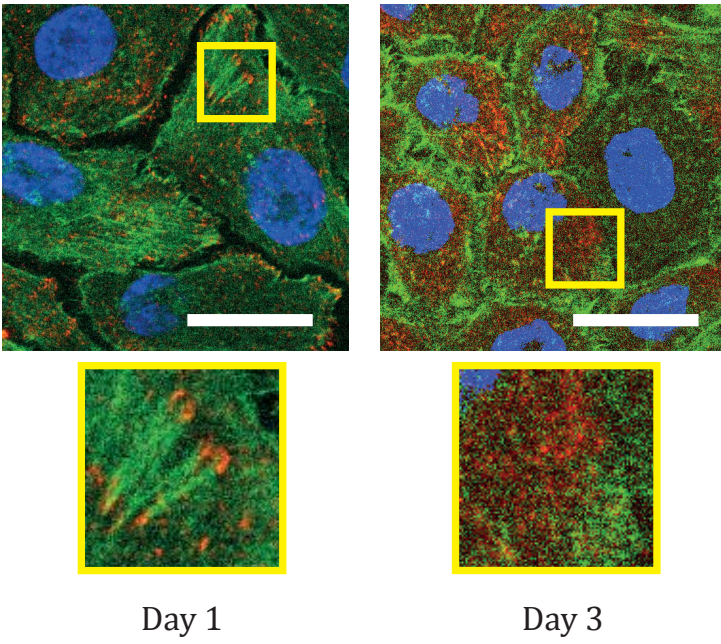


Figure 3

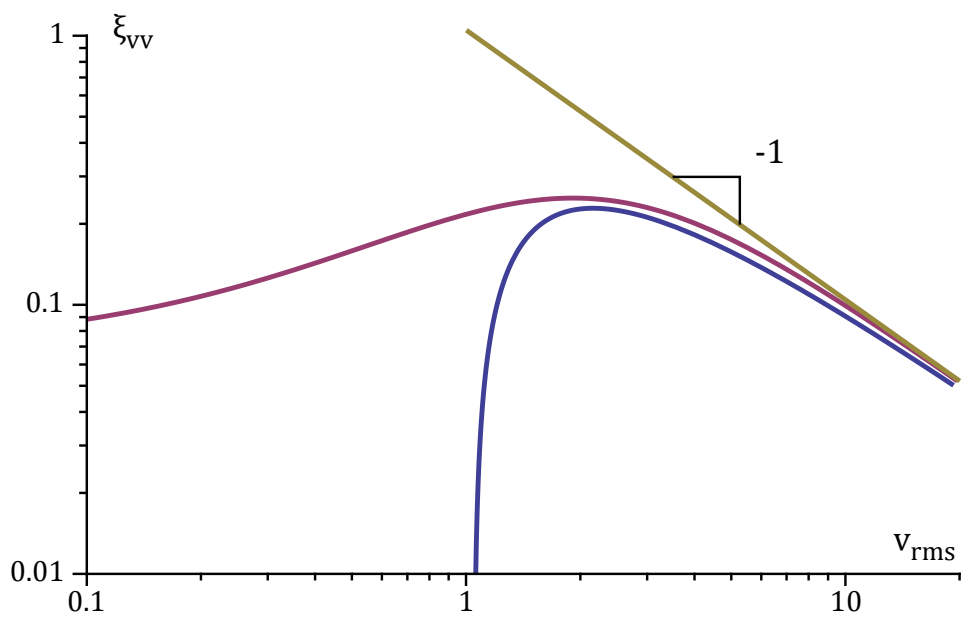


Figure 4

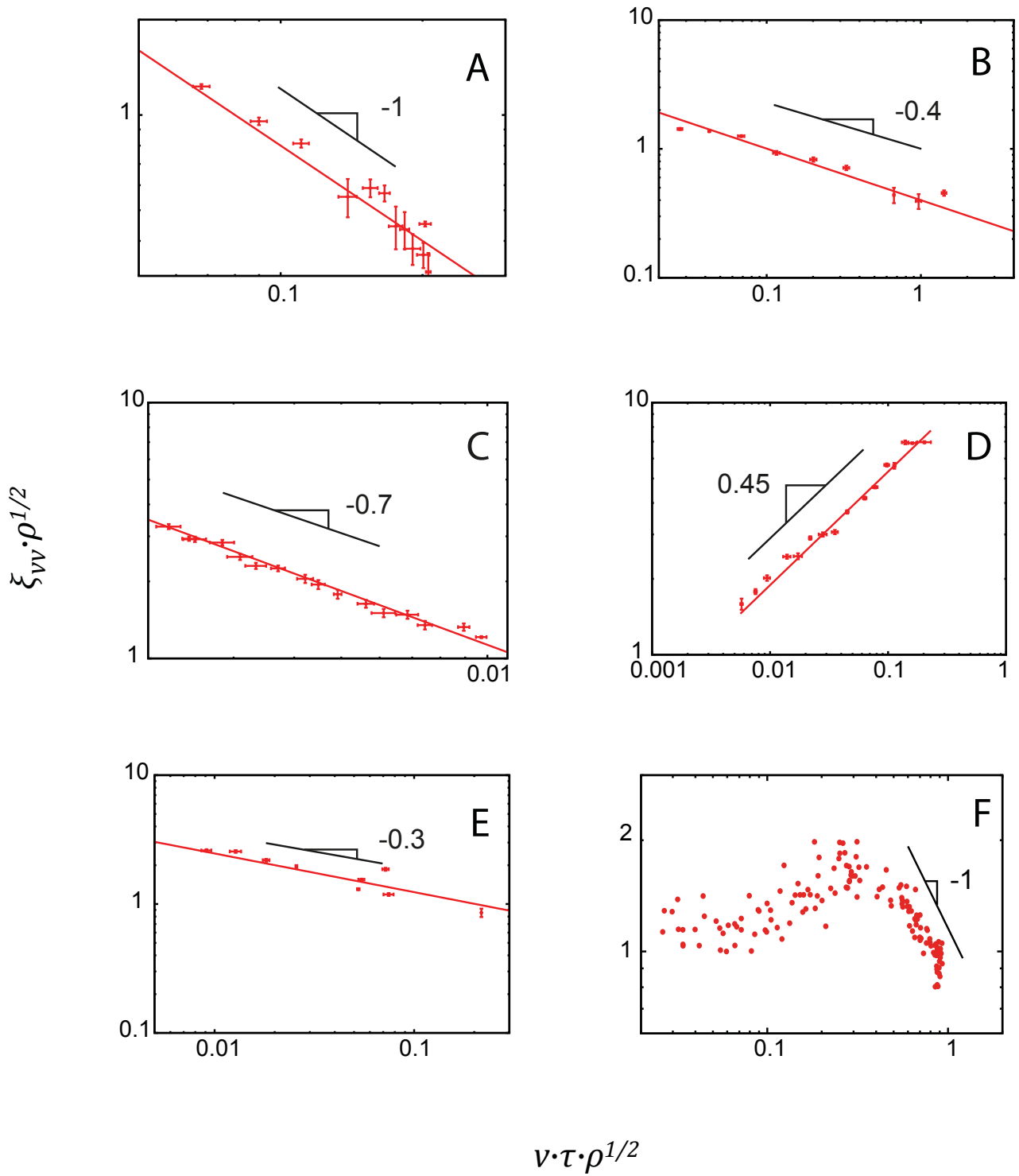


Figure 5



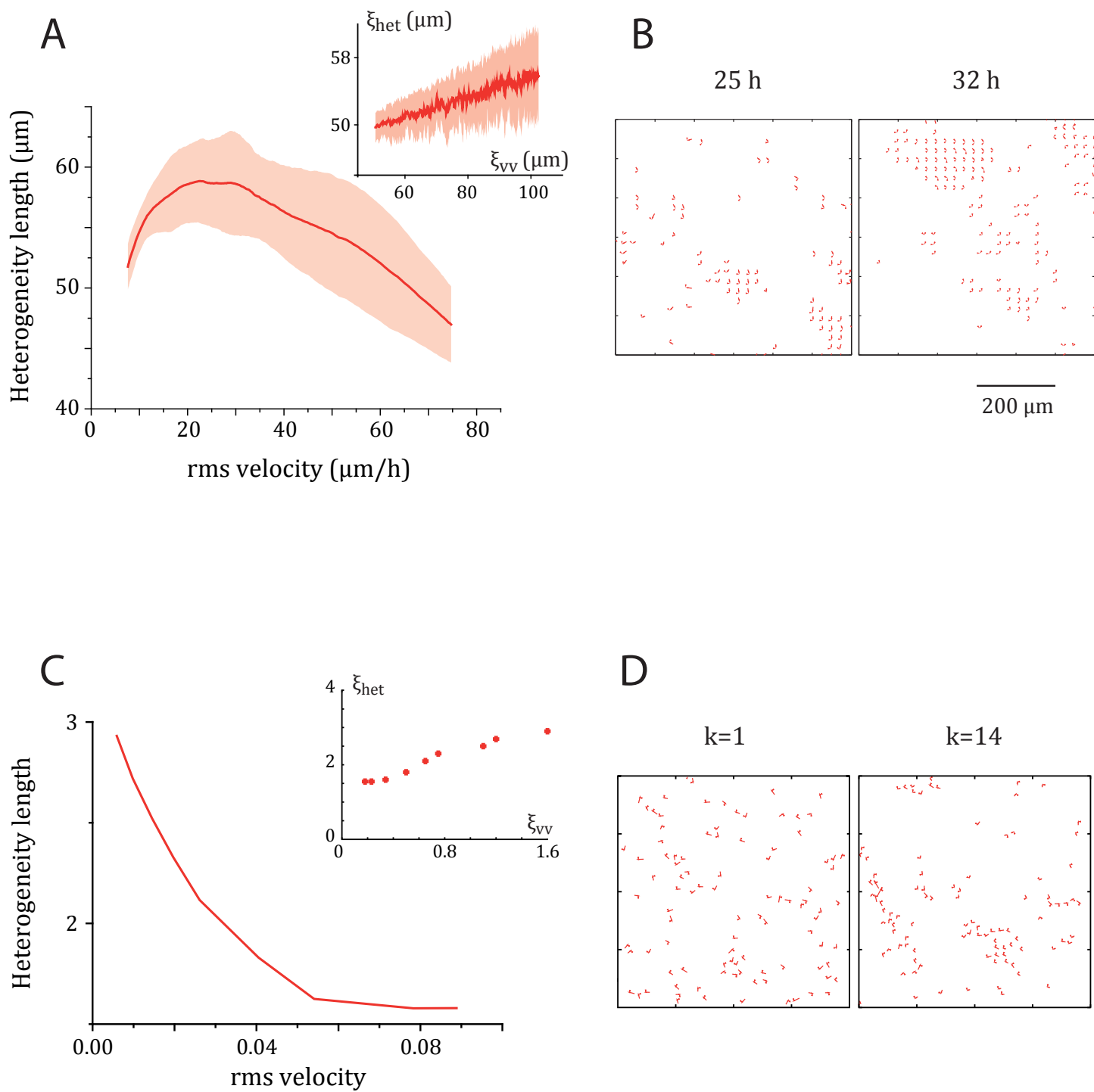


Figure 6

# Supplementary Information: Physics of active jamming: collective cellular motion in a monolayer

Simon Garcia<sup>1,2</sup>, Edouard Hannezo<sup>1,3</sup>, Jens Elgeti<sup>4</sup>, Jean-Francois Joanny<sup>1</sup>, Pascal Silberzan<sup>1,2</sup> and Nir S. Gov<sup>5</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoire PhysicoChimie Curie. Institut Curie - Centre de Recherche - Paris Sciences et Lettres. Centre National de la Recherche Scientifique. Universit Pierre et Marie Curie - Sorbonne Universits. 75248 Paris, France*

<sup>2</sup> *Equipe labellise Ligue Contre le Cancer*

<sup>3</sup> *Cavendish Laboratory, University of Cambridge. CB3 0HE Cambridge, United Kingdom*

<sup>4</sup> *Forschungszentrum Juelich GmbH, 52425 Juelich, Germany*

<sup>5</sup> *Department of Chemical Physics, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel*

PACS numbers:

## GIANT DENSITY FLUCTUATIONS

The experimental observations of giant density fluctuations are shown in Fig.S1.

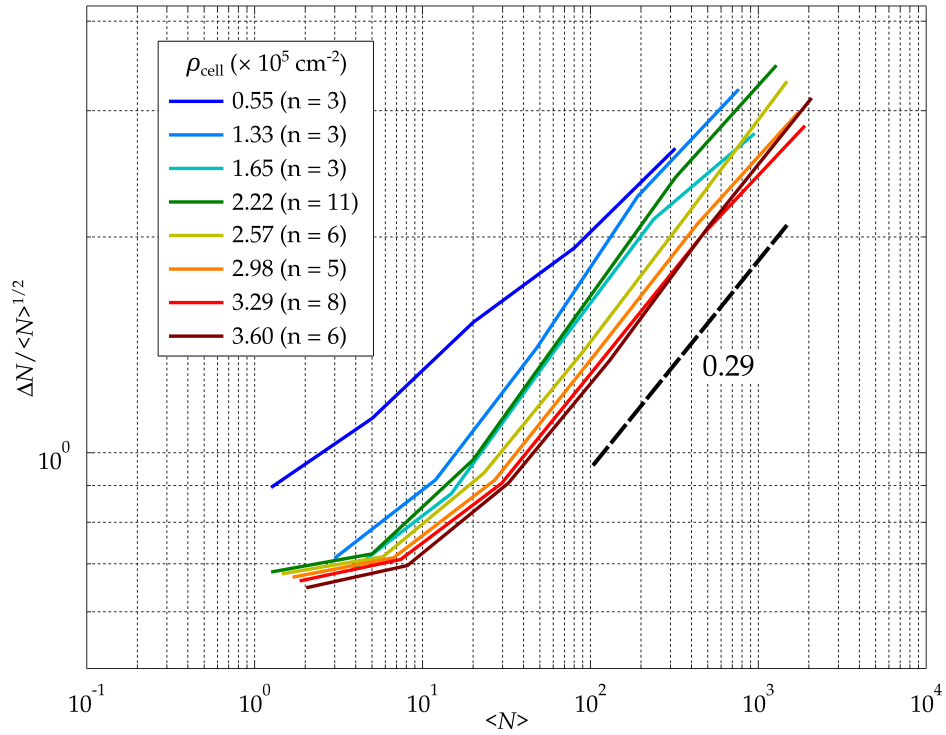


FIG. S1: Giant density fluctuations. For each image used in the measurement of cell density fluctuations, we first measured the total number of cells  $N_{FOV}$  in the FOV. For a given  $N_{FOV}$ , we then measured the number of cells  $N$  in interrogation windows of increasing size and monitored the deviation  $\Delta N$  compared to the average cell number  $\langle N \rangle$ , as a function of  $\langle N \rangle$  for these different sizes [1].

## CLUSTER ANALYSIS WITH CONSTANT FRICTION

Consider a circular cluster of radius  $\xi_{vv}$  which is the velocity-velocity correlation length. This is of course an approximation, since over this length-scale the velocity correlations decay, while here we assume that they are perfect (solid-body) over this length-scale, and then drop to zero beyond.

We will characterize the random active forces induced by the individual cells as having a typical force  $f_0$ , a mean burst length  $\tau_{noise}$  (persistence time of the cellular traction force) and mean waiting time between bursts  $\tau$ . We then solve the Langevin equation for the center-of-mass motion of a cluster [2], in the limit of vanishing inertial effects  $\lambda\tau_{noise} \gg 1$ . We therefore get

$$\langle v^2 \rangle_{nocor} = \frac{p_{on} N_c f_0^2}{2\lambda^2} \quad (S1)$$

$$\langle v^2 \rangle_{cor} = \frac{p_{on} (N_c f_0)^2}{2\lambda^2} \quad (S2)$$

where  $p_{on} = \tau_{noise}/(\tau + \tau_{noise})$  is the probability for the random cellular force to be turned on, and we give the case of uncorrelated (Eq.S1) and perfectly correlated (Eq.S2) noise. The number of cells in the cluster  $N_c \propto \xi_{vv}^2$ .

Let us start with the uncorrelated noise case. To find the velocity fluctuations we need to determine the friction coefficient  $\lambda$ . If the friction occurs over the entire cell-substrate contact area, then we expect  $\lambda = \lambda_0 N_c \propto \xi_{vv}^2$ , so that we now get

$$\begin{aligned} \langle v^2 \rangle_{nocor} &= \frac{p_{on} N_c f_0^2}{2(\lambda_0 N_c)^2} \propto \frac{1}{\xi_{vv}^2} \\ \sqrt{\langle v^2 \rangle} &= v_{RMS} \propto \frac{1}{\xi_{vv}} \end{aligned} \quad (S3)$$

This seems to fit the observations during the stage of fluid-like behavior, prior to the transition to a solid-like phase. In the fluid phase we expect to find:  $\sqrt{\langle v^2 \rangle} = v_{RMS} \propto 1/\xi_{vv}$ , as is observed. This agreement indicates that while cell-cell contacts are strong, so that cell clusters move together, their internal traction forces are not well correlated.

However, what if the dominant friction arises from the cell-cell friction? in this case the solid-like cluster of cells will feel a friction that has the following functional form:  $\lambda = \alpha \xi_{vv}$ . In this case we find that  $v_{RMS}$  becomes independent of the size of the cluster. More generally, we may write:  $\lambda = \alpha \xi_{vv} + \beta \xi_{vv}^2$ .

When cells become perfectly correlated with respect to their traction forces, Eq.(S2) becomes relevant. We now find that for surface-dominated friction  $v_{RMS}$  becomes independent of the size of the cluster (which is represented by the correlation length). For perimeter-dominated friction we now find  $v_{RMS} \propto \xi_{vv}$ .

$$\langle v^2 \rangle_{nocor} = \frac{p_{on} N_c^2 f_0^2}{2(\lambda_0 N_c)^2} \propto \xi_{vv}^0 \quad (S4)$$

$$\langle v^2 \rangle_{cor} = \frac{p_{on} N_c^2 f_0^2}{2(\lambda_0 N_c)^2} \propto \xi_{vv}^2 \quad \sqrt{\langle v^2 \rangle} = v_{RMS} \propto \xi_{vv} \quad (S5)$$

In Fig.S2 we plot the  $v_{RMS}$ - $\xi_{vv}$  relations for the two extreme behaviors from the simple analysis of clusters. The transition in this picture would involve the system changing from the blue to the red curve, presumably due to the cells changing their behavior as cell-cell contacts become increasingly strong so that cell-cell friction dominates and cellular forces become correlated. This is in qualitative agreement with the observations, so this interpretation is possible for the sharp transition observed.

Note that we assumed here that the cells are adhesive in the sense that they can form a correlated cluster even if individual cells move in opposite directions. If the cells are purely repulsive, then clusters form only when cells move actively towards each other (Fig.S3). Since only of the order of one cell now contributes an unbalanced force, in such situations we get the following relation between the velocity of the c.o.m. of such a cluster and its size

$$\begin{aligned} \langle v^2 \rangle_{nocor} &= \frac{p_{on} f_0^2}{2(\lambda_0 N_c)^2} \propto \frac{1}{\xi_{vv}^4} \\ \sqrt{\langle v^2 \rangle} &= v_{RMS} \propto \frac{1}{\xi_{vv}^2} \end{aligned} \quad (S6)$$

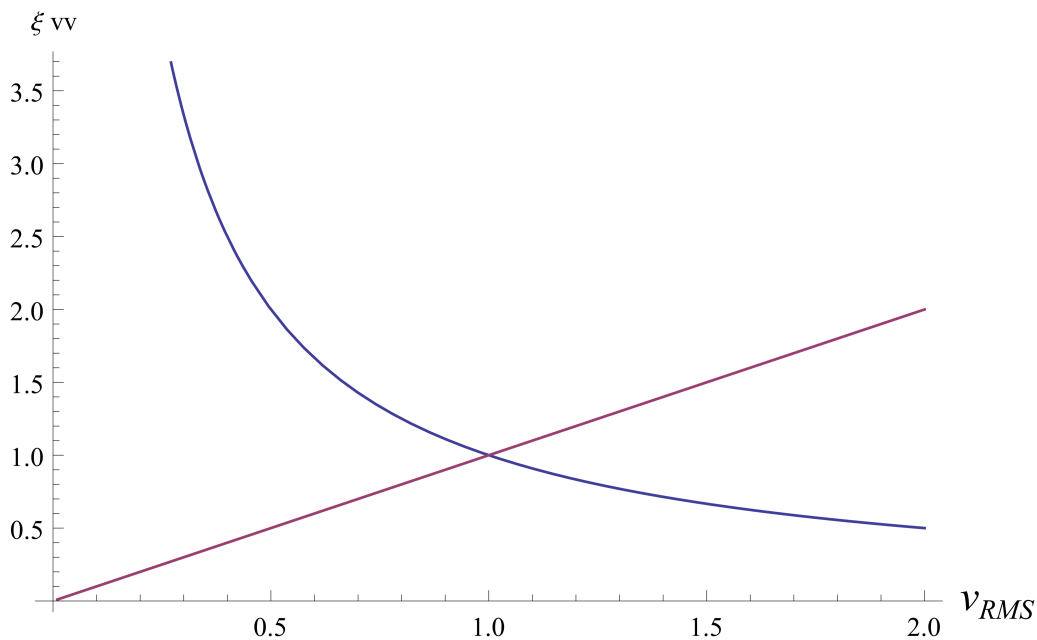


FIG. S2: Illustration of the relation between  $v_{RMS}$  ( $y$ -axis) and  $\xi_{vv}$  ( $x$ -axis), using the cluster analysis, for the case of uniform substrate friction and uncorrelated noise (Eq.S3, blue line), and for perimeter (cell-cell) friction and correlated noise (Eq.S5, red line).

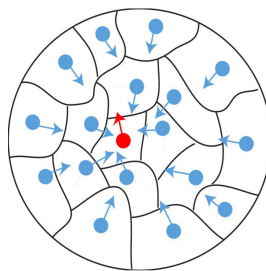


FIG. S3: Illustration of a cluster forming when cells are purely repulsive, and form only when they move towards each other. There is strong cancellation of the traction forces in this case, with the resultant force (red arrow) of order  $O(1)$ .

### VELOCITY-DEPENDENT CELL-CELL ADHESION MODEL

We may attempt to relate the increase in the strength of cell-cell adhesion to the decrease in the velocities of the cell, due to an overall "slip-bond" behavior of the binding molecules. The picture is as follows: Let us consider a cell-cell linker, of stiffness  $k$ . It makes some on-off adhesion between the cells, with  $k_{on}$  independent of the stretch and  $k_{off}$  that is reduced when it is stretched so that the adhesion breaks up more when stretched. Let us propose the simplest form

$$k_{off} = k_{off,0} e^{-(\Delta E - k(v^2)/k_{off}^2)/k_B T} \quad (S7)$$

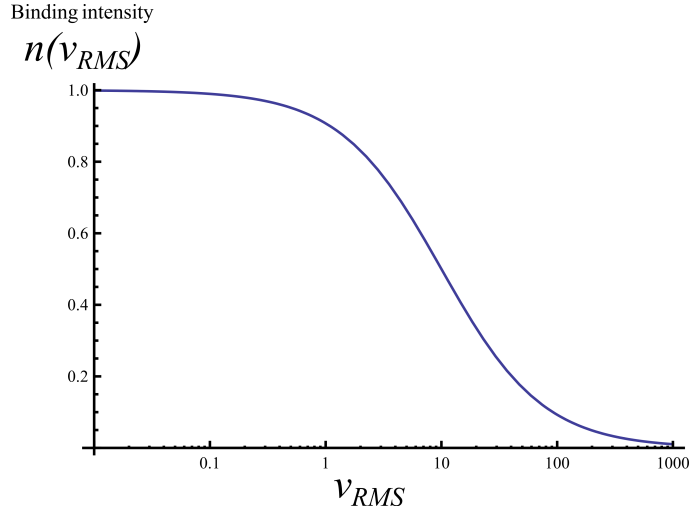


FIG. S4: Illustration of the dependence of the density of attached linkers  $n(v_{RMS})$  on the r.m.s. relative cell-cell velocity  $v_{RMS}$ , using Eqs.(S8,S9). This indicates that the attached linkers increase in density for lower velocities. Parameters used for this illustration:  $\Delta E = 50$ ,  $k_{on} = 1$ ,  $k = 1$ ,  $k_{off,0} = 1$ .

where  $k_{off,0}$  is the off-rate when unstretched,  $\Delta E$  is the energy of linker adhesion. The time-scale of the stretch is over the average time that the linker is attached, i.e.  $k_{off}^{-1}$ , so that each spring is on average stretched by an amount  $\langle x^2 \rangle = \langle v^2 \rangle / k_{off}^2$ .

We solve Eq.S7 for  $k_{off}$

$$k_{off} = \frac{\sqrt{2k\langle v^2 \rangle}}{\sqrt{W[2e^{2\Delta E}k\langle v^2 \rangle / k_{off,0}^2]}} \quad (S8)$$

where  $W[]$  is the Product-Log or Lambert-W function.

The average density of attached linkers is therefore given by

$$n(v) = n_0 \frac{k_{on}}{k_{on} + k_{off}} \quad (S9)$$

and is plotted in Fig.S4.

From this density of attached linkers we can extract the effective friction coefficient that acts between the cells: The force due to the stretched linkers (per unit area of cell-cell contact) is

$$F_{cell-cell} = n(v)k \frac{v_{RMS}}{k_{off}} \quad (S10)$$

From this expression we therefore directly get the contribution to the friction coefficient of the cluster due to the cell-cell contacts. We can write the friction coefficient of the cluster  $\lambda$  as

$$\lambda = \xi_{vv}(\lambda_0 \xi_{vv} + n(v)k/k_{off}) \quad (S11)$$

The solution for the r.m.s. velocity  $v_{RMS}$  as a function of the correlation length is therefore given by (for uncorrelated noise, Eq.(S1)) the following equation

$$\langle v^2 \rangle = \frac{\tilde{\xi}_{vv}^2 v_0^2}{\left( \tilde{\xi}_{vv}(\tilde{\xi}_{vv} + \beta n(v_{RMS})k/k_{off}(v_{RMS})) \right)^2} \quad (S12)$$

where  $v_0 = f_0/\lambda_0$ ,  $\beta$  relates the friction along the perimeter to dimensionless units (so  $\beta$  has units of  $x^2/t$ ), and the correlation length is in units of cell length (dimensionless)  $\tilde{\xi}_{vv} = \xi_{vv}/l_{cell}$ . An analytic solution can be found for  $\xi_{vv}$

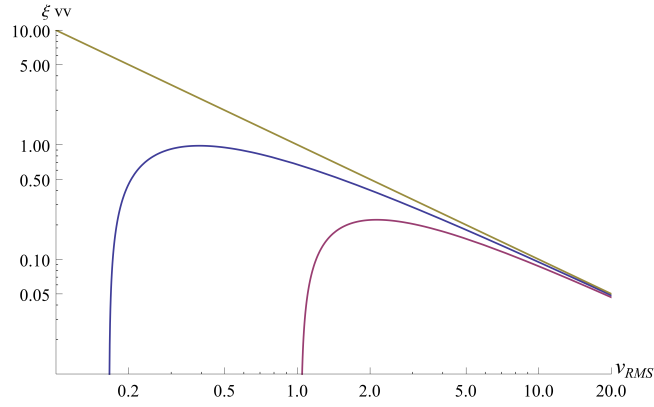


FIG. S5: Illustration of the dependence of the velocity correlation length  $\xi_{vv}$  on the r.m.s. velocity, when the cell-substrate friction is constant, while the cell-cell friction increases at low relative velocities, according to Eq.(S13). Parameters used for this illustration:  $k_{on} = 0.01, k = 1, k_{off,0} = 0.1, k = 1, v_0 = 1$ . Yellow line- no cell-cell friction ( $\beta = 0, v_{RMS} \propto 1/\xi_{vv}$ , Eq.S3), blue and purple lines- using  $\beta = 5$  and  $\Delta E = 2, 10$  respectively.

$$\xi_{vv}^{cell-cell} = \frac{\left( v_0 \sqrt{\langle v^2 \rangle} \left( k_{on} \sqrt{W \left[ \frac{e^{2\Delta E} k v^2}{k_{off,0}^2} \right]} + \sqrt{k} v_{RMS} \right)^4 - \beta \sqrt{k} k_{on}^2 v_{RMS} W \left[ \frac{e^{2\Delta E} k \langle v^2 \rangle}{k_{off,0}^2} \right]^{3/2} - \beta k k_{on} v^2 W \left[ \frac{e^{2\Delta E} k \langle v^2 \rangle}{k_{off,0}^2} \right] \right)}{\langle v^2 \rangle \left( k_{on} \sqrt{W \left[ \frac{e^{2\Delta E} k \langle v^2 \rangle}{k_{off,0}^2} \right]} + \sqrt{k} v_{RMS} \right)^2} \quad (S13)$$

In Fig.S5 we plot an example of the relation of Eq.(S13), showing that there is a change in behavior for small velocities, due to the dominance of cell-cell adhesion in this regime ( $n(v)/k_{off}(v)$  becomes large).

We find that the correlation length vanishes for a finite value of the velocity, which we can estimate to be (Fig.S5)

$$v_{min} \simeq \frac{\beta k_{on} \log \left( \frac{e^{2\Delta E} k}{k_{off,0}^2} \right)}{v_0} \quad (S14)$$

### VELOCITY-DEPENDENT CELL-SUBSTRATE ADHESION MODEL

Similar to the treatment given above for velocity-dependent cell-cell friction, we can describe the case of cell-substrate friction that is velocity dependent. In this case we ignore for simplicity the contribution of cell-cell friction and write (similar to Eq.S11)

$$\lambda = \xi_{vv}^2 (\lambda_0 + n(v)k/k_{off}) \quad (S15)$$

The velocity-correlation equation then becomes

$$\langle v^2 \rangle = \frac{\tilde{\xi}_{vv}^2 v_0^2}{\left( \tilde{\xi}_{vv}^2 (1 + \beta n(v_{RMS})k/k_{off}(v_{RMS})) \right)^2} \quad (S16)$$

An analytic solution can be found for  $\xi_{vv}$

$$\xi_{vv}^{cell-sub} = v_0 \frac{k_{on} \sqrt{W \left[ \frac{e^{2\Delta E} k \langle v^2 \rangle}{k_{off,0}^2} \right]} + \sqrt{k} v_{RMS}}{\beta \sqrt{k} k_{on} W \left[ \frac{e^{2\Delta E} k \langle v^2 \rangle}{k_{off,0}^2} \right] + k_{on} v_{RMS} \sqrt{W \left[ \frac{e^{2\Delta E} k \langle v^2 \rangle}{k_{off,0}^2} \right]} + \sqrt{k} \langle v^2 \rangle} \quad (S17)$$

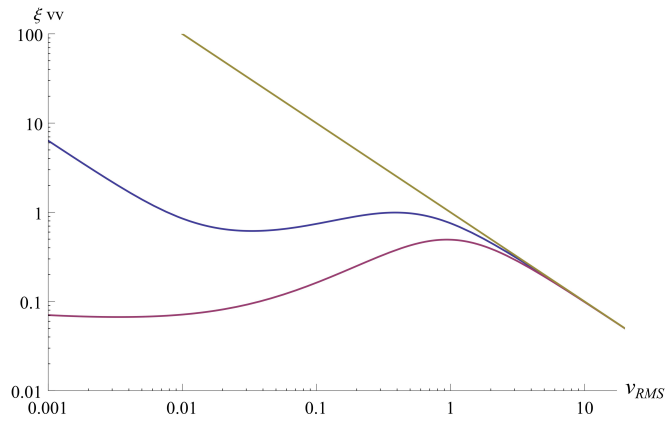


FIG. S6: Illustration of the dependence of the velocity correlation length  $\xi_{vv}$  on the r.m.s. velocity, when the cell-substrate friction increases at low relative velocities, according to Eq.(S17). Parameters used for this illustration:  $k_{on} = 0.01, k = 1, k_{off,0} = 0.1, k = 1, v_0 = 1$ . Yellow line- no cell-cell friction ( $\beta = 0, v_{RMS} \propto 1/\xi_{vv}$ , Eq.S3), blue and purple lines- using  $\beta = 5$  and  $\Delta E = 2, 10$  respectively.

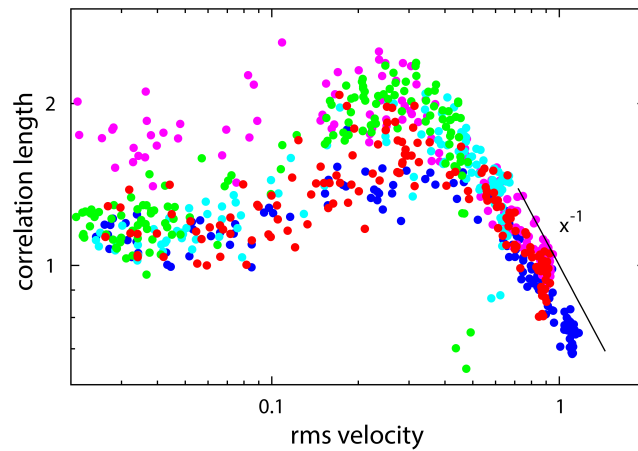


FIG. S7: Sensitivity analysis of simulation results. Velocity correlation length as a function of the rms velocity for different model parameters.  $\lambda_{cell}$  is the cell-cell effective friction coefficient, and  $\lambda$  is the background friction with the substrate. We refer to the reference values used in the main text with the 0 superscript. The different parameters are  $\lambda_{cell} = \lambda_{cell}^0, \lambda = \lambda^0$  (red),  $\lambda_{cell} = \lambda_{cell}^0/2, \lambda = \lambda^0$  (blue),  $\lambda_{cell} = \lambda_{cell}^0, \lambda = 0.53\lambda^0$  (pink),  $\lambda_{cell} = 2.5\lambda_{cell}^0, \lambda = \lambda^0$  (cyan),  $\lambda_{cell} = 5\lambda_{cell}^0, \lambda = \lambda^0$  (green). The presence of a broad peak is a robust feature regarding the parameters of the model as is the slope (-1) in the high velocity regime.

In Fig.S6 we plot an example of the relation of Eq.(S17), showing that as for the case of cell-cell velocity dependent friction (Fig.S5), there is a change in behavior for small velocities. Unlike the case of cell-cell friction (Fig.S5), the correlation length does not vanish at a finite velocity.

## SIMULATIONS USING NON-LINEAR INCREASE IN CELL-SUBSTRATE FRICTION

Simulations demonstrating the robust features of the velocity correlation length as a function of the rms velocity, are shown in Fig.S7.

[1] Duclos G, Garcia S, Yevick HG, Silberzan P, *em Soft Matter* **10** (2014) 23462353.

[2] E. Ben-Isaac *et. al.*, *Phys. Rev. Lett.* **106** (2011) 238103.

# Bibliographie

- [1] B. ALBERTS, A. JOHNSON, J. LEWIS *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>e</sup> éd., New York : Garland Science, 2002. 1616 pages.
- [2] B. ALBERTS, D. BRAY, K. HOPKIN *et al.*, *Essential Cell Biology*. 2<sup>e</sup> éd., New York : Garland Science, 2003. 740 pages.
- [3] A. OTT, M. MAGNASCO, A. SIMON *et al.*, Measurement of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy, *Physical Review E*, **48** : 1993. DOI : [10.1103/PhysRevE.48.R1642](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.48.R1642)
- [4] A. DIMITROV, M. QUESNOIT, S. MOUTEL *et al.*, Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science*, **322** : 1353–1356, 2008. DOI : [10.1126/science.1165401](https://doi.org/10.1126/science.1165401)
- [5] Page « Cell adhesion », site web du Cell Migration Lab, University of Reading, [www.reading.ac.uk/cellmigration/adhesion.htm](http://www.reading.ac.uk/cellmigration/adhesion.htm)
- [6] Y. WANG, E. L. BOTVINICK, Y. ZHAO *et al.*, Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature*, **434** : 1040–1045, 2005. DOI : [10.1038/nature03469](https://doi.org/10.1038/nature03469)
- [7] P. K. MATTILA *et al.*, Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **9** : 446–454, 2008. DOI : [10.1038/nrm2406](https://doi.org/10.1038/nrm2406)
- [8] T. D. POLLARD *et al.*, Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments, *Cell*, **112** : 453–465, 2003. DOI : [10.1016/S0092-8674\(03\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00120-X)
- [9] T. M. SVITKINA, E. A. BULANOVA, O. Y. CHAGA *et al.*, Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network, *Journal of Cell Biology*, **160** : 409–421, 2003. DOI : [10.1083/jcb.200210174](https://doi.org/10.1083/jcb.200210174)
- [10] R. ANANTHAKRISHNAN *et al.*, The forces behind cell movement, 2007, DOI : [10.7150/ijbs.3.303](https://doi.org/10.7150/ijbs.3.303)
- [11] J. BLAY *et al.*, Epidermal growth factor promotes the chemotactic migration of cultured rat intestinal epithelial cells. *Journal of cellular physiology*, **124** : 107–112, 1985. DOI : [10.1002/jcp.1041240117](https://doi.org/10.1002/jcp.1041240117)
- [12] J. T. SMITH, J. T. ELKIN *et al.*, Directed cell migration on fibronectin gradients: Effect of gradient slope, *Experimental Cell Research*, **312** : 2424–2432, 2006. DOI : [10.1016/j.yexcr.2006.04.005](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.04.005)



- [13] C. M. LO, H. B. WANG, M. DEMBO et Y. L. WANG, Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical Journal*, **79** : 144–152, 2000.  
DOI : [10.1016/S0006-3495\(00\)76279-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76279-5)
- [14] A. SAEZ, M. GHIBAUDO, A. BUGUIN, P. SILBERZAN et B. LADOUX, Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104** : 8281–8286, 2007.  
DOI : [10.1073/pnas.0702259104](https://doi.org/10.1073/pnas.0702259104)
- [15] Site web *Scitable*, plate-forme d'apprentissage en ligne de *Nature Education*.  
[www.nature.com/scitable](http://www.nature.com/scitable)
- [16] N. M. KUMAR et N. B. GILULA, The gap junction communication channel, 1996,  
DOI : [10.1016/S0092-8674\(00\)81282-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81282-9)
- [17] M. ABERCROMBIE et J. E. M. HEAYSMAN, Observations on the social behaviour of cells in tissue culture, *Experimental Cell Research*, **6** : 293–306, 1954.  
DOI : [10.1016/0014-4827\(54\)90176-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(54)90176-7)
- [18] M. ABERCROMBIE, Contact inhibition and malignancy. *Nature*, **281** : 259–262, 1979.  
DOI : [10.1038/281259a0](https://doi.org/10.1038/281259a0)
- [19] F. DREES, S. POKUTTA, S. YAMADA, W. J. NELSON et W. I. WEIS,  $\alpha$ -catenin is a molecular switch that binds E-cadherin- $\beta$ -catenin and regulates actin-filament assembly, *Cell*, **123** : 903–915, 2005.  
DOI : [10.1016/j.cell.2005.09.021](https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.021)
- [20] L. PETITJEAN, M. REFFAY, E. GRASLAND-MONGRAIN *et al.*, Velocity fields in a collectively migrating epithelium, *Biophysical Journal*, **98** : 1790–1800, 2010.  
DOI : [10.1016/j.bpj.2010.01.030](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.01.030)
- [21] M. POUJADE, E. GRASLAND-MONGRAIN, A. HERTZOG *et al.*, Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104** : 15988–15993, 2007.  
DOI : [10.1073/pnas.0705062104](https://doi.org/10.1073/pnas.0705062104)
- [22] R. FAROOQUI et G. FENTEANY, Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement. *Journal of cell science*, **118** : 51–63, 2005.  
DOI : [10.1242/jcs.01577](https://doi.org/10.1242/jcs.01577)
- [23] A. PULIAFITO, L. HUFNAGEL, P. NEVEU *et al.*, Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109** : 739–744, 2012.  
DOI : [10.1073/pnas.1007809109](https://doi.org/10.1073/pnas.1007809109)
- [24] M. G. P. STOKER et H. RUBIN, Density Dependent Inhibition of Cell Growth in Culture, *Nature*, **215** : 171–172, 1967.  
DOI : [10.1038/215171a0](https://doi.org/10.1038/215171a0)
- [25] L. C. BUTLER, G. B. BLANCHARD, A. J. KABLA *et al.*, Cell shape changes indicate a role for extrinsic tensile forces in *Drosophila* germ-band extension. *Nature cell biology*, **11** : 859–864, 2009.  
DOI : [10.1038/ncb1894](https://doi.org/10.1038/ncb1894)

- [26] H. ODA et S. TSUKITA, Real-time imaging of cell-cell adherens junctions reveals that *Drosophila* mesoderm invagination begins with two phases of apical constriction of cells. *Journal of cell science*, **114**: 493–501, 2001.
- [27] M. DEFORET, V. HAKIM, H. G. YEVICK, G. DUCLOS et P. SILBERZAN, Emergence of collective modes and tri-dimensional structures from epithelial confinement. *Nature communications*, **5**: 3747, 2014.  
DOI : [10.1038/ncomms4747](https://doi.org/10.1038/ncomms4747)
- [28] J. D. FRANKE, R. A. MONTAGUE et D. P. KIEHART, Nonmuscle myosin II generates forces that transmit tension and drive contraction in multiple tissues during dorsal closure, *Current Biology*, **15**: 2208–2221, 2005.  
DOI : [10.1016/j.cub.2005.11.064](https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.064)
- [29] A. C. CHARLES, C. C. G. NAUS, D. ZHU *et al.*, Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells, *Journal of Cell Biology*, **118**: 195–201, 1992.  
DOI : [10.1083/jcb.118.1.195](https://doi.org/10.1083/jcb.118.1.195)
- [30] A. F. MERTZ, Y. CHE, S. BANERJEE *et al.*, Cadherin-based intercellular adhesions organize epithelial cell-matrix traction forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**: 842–7, 2013.  
DOI : [10.1073/pnas.1217279110](https://doi.org/10.1073/pnas.1217279110)
- [31] P. FRIEDL et D. GILMOUR, Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **10**: 445–457, 2009.  
DOI : [10.1038/nrm2720](https://doi.org/10.1038/nrm2720)
- [32] A. GHYSEN et C. DAMBLY-CHAUDIÈRE, Development of the zebrafish lateral line, *Current Opinion in Neurobiology*, **14**: 67–73, 2004.  
DOI : [10.1016/j.conb.2004.01.012](https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.01.012)
- [33] E. Y. MA et D. W. RAIBLE, Signaling Pathways Regulating Zebrafish Lateral Line Development, *Current Biology*, **19**: R381–R386, 2009.  
DOI : [10.1016/j.cub.2009.03.057](https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.057)
- [34] V. E. GALLARDO, J. LIANG, M. BEHRA *et al.*, Molecular dissection of the migrating posterior lateral line primordium during early development in zebrafish, *BMC Developmental Biology*, **10**: 120, 2010.  
DOI : [10.1186/1471-213X-10-120](https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-120)
- [35] H. F. MCGRAW, C. M. DRERUP, M. D. CULBERTSON *et al.*, Lef1 is required for progenitor cell identity in the zebrafish lateral line primordium, *Development*, **138**: 3921–3930, 2011.  
DOI : [10.1242/dev.062554](https://doi.org/10.1242/dev.062554)
- [36] S. E. LEPAGE et A. E. E. BRUCE, Zebrafish epiboly: Mechanics and mechanisms, *International Journal of Developmental Biology*, **54**: 1213–1228, 2010.  
DOI : [10.1387/ijdb.093028s1](https://doi.org/10.1387/ijdb.093028s1)
- [37] A. JACINTO, W. WOOD, S. WOOLNER *et al.*, Dynamic analysis of actin cable function during *Drosophila* dorsal closure, *Current Biology*, **12**: 1245–1250, 2002.  
DOI : [10.1016/S0960-9822\(02\)00955-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00955-7)
- [38] G. C. GURTNER, S. WERNER, Y. BARRANDON et M. T. LONGAKER, Wound repair and regeneration. *Nature*, **453**: 314–321, 2008.  
DOI : [10.1038/nature07039](https://doi.org/10.1038/nature07039)

- [39] R. KALLURI et R. A. WEINBERG, The basics of epithelial-mesenchymal transition, *Journal of Clinical Investigation*, **119** : 1420–1428, 2009.  
DOI : [10.1172/JCI39104.1420](https://doi.org/10.1172/JCI39104.1420)
- [40] S. ALEXANDER, G. E. KOEHL, M. HIRSCHBERG, E. K. GEISSLER et P. FRIEDL, Dynamic imaging of cancer growth and invasion: a modified skin-fold chamber model. *Histochemistry and Cell Biology*, **130** : 1147–54, 2008.  
DOI : [10.1007/s00418-008-0529-1](https://doi.org/10.1007/s00418-008-0529-1)
- [41] K. NABESHIMA, T. INOUE, Y. SHIMAO, H. KATAOKA et M. KOONO, Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets. *Histology and histopathology*, **14** : 1183–1197, 1999.
- [42] P. MARTIN et S. M. PARKHURST, Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development*, **131** : 3021–3034, 2004.  
DOI : [10.1242/dev.01253](https://doi.org/10.1242/dev.01253)
- [43] E. MUSSIG, T. STEINBERG, S. SCHULZ *et al.*, Connective-Tissue Fibroblasts Established on Micropillar Interfaces are Pivotal for Epithelial-Tissue Morphogenesis, *Advanced Functional Materials*, **18** : 2919–2929, 2008.  
DOI : [10.1002/adfm.200800381](https://doi.org/10.1002/adfm.200800381)
- [44] G. J. TODARO, G. K. LAZAR et H. GREEN, The initiation of cell division in a contact-inhibited mammalian cell line. *Journal of cellular physiology*, **66** : 325–333, 1965.  
DOI : [10.1002/jcp.1030660310](https://doi.org/10.1002/jcp.1030660310)
- [45] P. ROSEN et D. S. MISFELDT, Cell density determines epithelial migration in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **77** : 4760–3, 1980.
- [46] H. THIELECKE, IMPIDJATI et G. R. FUHR, Biopsy on living cells by ultra slow instrument movement, *Journal of Physics: Condensed Matter*, **18** : S627–S637, 2006.  
DOI : [10.1088/0953-8984/18/18/S09](https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/18/S09)
- [47] M. TAMADA, T. D. PEREZ, W. J. NELSON et M. P. SHEETZ, Two distinct modes of myosin assembly and dynamics during epithelial wound closure, *Journal of Cell Biology*, **176** : 27–33, 2007.  
DOI : [10.1083/jcb.200609116](https://doi.org/10.1083/jcb.200609116)
- [48] A. FOLCH, B. H. JO, O. HURTADO, D. J. BEEBE et M. TONER, Microfabricated elastomeric stencils for micropatterning cell cultures. *Journal of biomedical materials research*, **52** : 346–53, 2000.
- [49] M. REFFAY, L. PETITJEAN, S. COSCOY *et al.*, Orientation and polarity in collectively migrating cell structures: Statics and dynamics, *Biophysical Journal*, **100** : 2566–2575, 2011.  
DOI : [10.1016/j.bpj.2011.04.047](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.04.047)
- [50] M. REFFAY, M. C. PARRINI, O. COCHET-ESPARTIN *et al.*, Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells. *Nature Cell Biology*, **16** : 217–223, 2014.  
DOI : [10.1038/ncb2917](https://doi.org/10.1038/ncb2917)
- [51] O. COCHET-ESPARTIN, J. RANFT, P. SILBERZAN et P. MARCQ, Border forces and friction control epithelial closure dynamics, *Biophysical Journal*, **106** : 65–73, 2014.  
DOI : [10.1016/j.bpj.2013.11.015](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.015)

- [52] T. OMELCHENKO, J. M. VASILIEV, I. M. GELFAND, H. H. FEDER et E. M. BONDER, Rho-dependent formation of epithelial "leader" cells during wound healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**: 10788–10793, 2003.  
DOI : [10.1073/pnas.1834401100](https://doi.org/10.1073/pnas.1834401100)
- [53] T. SANCHEZ, D. T. N. CHEN, S. J. DECAMP, M. HEYMANN et Z. DOGIC, Spontaneous motion in hierarchically assembled active matter. *Nature*, **491**: 431–4, 2012.  
DOI : [10.1038/nature11591](https://doi.org/10.1038/nature11591)
- [54] A. SOKOLOV et I. S. ARANSON, Physical properties of collective motion in suspensions of bacteria, *Physical Review Letters*, **109**: 248109, 2012.  
DOI : [10.1103/PhysRevLett.109.248109](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.109.248109)
- [55] P. MICHELENA, J. GAUTRAIS, J.-F. GÉRARD, R. BON et J.-L. DENEUBOURG, Social cohesion in groups of sheep: Effect of activity level, sex composition and group size, *Applied Animal Behaviour Science*, **112**: 81–93, 2008.  
DOI : [10.1016/j.applanim.2007.06.020](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.06.020)
- [56] J. L. SILVERBERG, M. BIERBAUM, J. P. SETHNA et I. COHEN, Collective motion of humans in mosh and circle pits at heavy metal concerts, *Physical Review Letters*, **110**: 228701, 2013.  
DOI : [10.1103/PhysRevLett.110.228701](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.110.228701)
- [57] M. C. MARCHETTI, J.-F. JOANNY, S. RAMASWAMY *et al.*, Hydrodynamics of soft active matter, *Reviews of Modern Physics*, **85**: 1143–1189, 2013.  
DOI : [10.1103/RevModPhys.85.1143](https://doi.org/10.1103/RevModPhys.85.1143)
- [58] J. DESEIGNE, O. DAUCHOT et H. CHATÉ, Collective motion of vibrated polar disks, *Physical Review Letters*, **105**: 098001, 2010.  
DOI : [10.1103/PhysRevLett.105.098001](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.105.098001)
- [59] J. R. HOWSE, R. A. L. JONES, A. J. RYAN *et al.*, Self-Motile Colloidal Particles: From Directed Propulsion to Random Walk, *Physical Review Letters*, **99**: 048102, 2007.  
DOI : [10.1103/PhysRevLett.99.048102](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.99.048102)
- [60] A. BRICARD, J.-B. CAUSSIN, N. DESREUMAUX, O. DAUCHOT et D. BARTOLO, Emergence of macroscopic directed motion in populations of motile colloids. *Nature*, **503**: 95–8, 2013.  
DOI : [10.1038/nature12673](https://doi.org/10.1038/nature12673)
- [61] Photographie de Robert WOLSTENHOLME, publiée dans le *Daily Mail* du 14 mai 2012, [www.dailymail.co.uk](http://www.dailymail.co.uk)
- [62] Photographie de Dariusz PACIOREK, utilisée entre autres dans un article d'Ed YONG publié dans *Wired* le 19 mars 2013, [www.wired.com/2013/03/powers-of-swarms/](http://www.wired.com/2013/03/powers-of-swarms/)
- [63] N. SEPÚLVEDA, L. PETITJEAN, O. COCHET *et al.*, Collective Cell Motion in an Epithelial Sheet Can Be Quantitatively Described by a Stochastic Interacting Particle Model, *PLoS Computational Biology*, **9**: 2013.  
DOI : [10.1371/journal.pcbi.1002944](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002944)
- [64] T. VICSEK, A. CZIRÓK, E. BEN-JACOB, I. COHEN et O. SHOCHET, Novel Type of Phase Transition in a System of Self-Driven Particles, *Physical Review Letters*, **75**: 1226–1229, 1995.  
DOI : [10.1103/PhysRevLett.75.1226](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.75.1226)

- [65] T. VICSEK et A. ZAFEIRIS, Collective motion, 2012,  
DOI : [10.1016/j.physrep.2012.03.004](https://doi.org/10.1016/j.physrep.2012.03.004), arXiv : [1010.5017](https://arxiv.org/abs/1010.5017)
- [66] P. SZABÓ, M. NAGY et T. VICSEK, Transitions in a self-propelled-particles model with coupling of accelerations, *Physical Review E*, **79** : 1–6, 2009.  
DOI : [10.1103/PhysRevE.79.021908](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.79.021908)
- [67] B. SZABÓ, G. SZÖLLÖSI, B. GÖNCI *et al.*, Phase transition in the collective migration of tissue cells: Experiment and model, *Physical Review E*, **74** : 1–5, 2006.  
DOI : [10.1103/PhysRevE.74.061908](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.74.061908)
- [68] S. HENKES, Y. FILY et M. C. MARCHETTI, Active jamming: Self-propelled soft particles at high density, *Physical Review E*, **84** : 040301, 2011.  
DOI : [10.1103/PhysRevE.84.040301](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.84.040301)
- [69] M. BASAN, J. ELGETI, E. HANNEZO, W.-J. RAPPEL et H. LEVINE, Alignment of cellular motility forces with tissue flow as a mechanism for efficient wound healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110** : 2452–9, 2013.  
DOI : [10.1073/pnas.1219937110](https://doi.org/10.1073/pnas.1219937110)
- [70] F. Y. WU, The Potts model, *Reviews of Modern Physics*, **54** : 235–268, 1982.  
DOI : [10.1103/RevModPhys.54.235](https://doi.org/10.1103/RevModPhys.54.235)
- [71] F. GRANER et J. A. GLAZIER, Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended Potts model, *Physical Review Letters*, **69** : 2013–2016, 1992.  
DOI : [10.1103/PhysRevLett.69.2013](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.69.2013)
- [72] J. A. GLAZIER et F. GRANER, Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells, *Physical Review E*, **47** : 2128–2154, 1993.  
DOI : [10.1103/PhysRevE.47.2128](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.47.2128)
- [73] A. SZABÓ, R. UNNEP, E. MÉHES *et al.*, Collective cell motion in endothelial monolayers. *Physical biology*, **7** : 046007, 2010.  
DOI : [10.1088/1478-3975/7/4/046007](https://doi.org/10.1088/1478-3975/7/4/046007)
- [74] A. J. KABLA, Collective Cell Migration: Leadership, Invasion and Segregation, *Journal of the Royal Society, Interface*, 2012.  
DOI : [10.1098/rsif.2012.0448](https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0448)
- [75] A. G. FLETCHER, M. OSTERFIELD, R. E. BAKER et S. Y. SHVARTSMAN, Vertex models of epithelial morphogenesis, *Biophysical Journal*, **106** : 2291–2304, 2014.  
DOI : [10.1016/j.bpj.2013.11.4498](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.4498)
- [76] X. DU, M. OSTERFIELD et S. Y. SHVARTSMAN, Computational analysis of three-dimensional epithelial morphogenesis using vertex models, *Physical Biology*, **11** : 066007, 2014.  
DOI : [10.1088/1478-3975/11/6/066007](https://doi.org/10.1088/1478-3975/11/6/066007)
- [77] M. WELIKY et G. OSTER, The mechanical basis of cell rearrangement. I. Epithelial morphogenesis during *Fundulus* epiboly. *Development*, **109** : 373–386, 1990.
- [78] R. FARHADIFAR, J.-C. RÖPER, B. AIGOUY, S. EATON et F. JÜLICHER, The Influence of Cell Mechanics, Cell-Cell Interactions, and Proliferation on Epithelial Packing, *Current Biology*, **17** : 2095–2104, 2007.  
DOI : [10.1016/j.cub.2007.11.049](https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.11.049)

- [79] T. NAGAI et H. HONDA, Computer simulation of wound closure in epithelial tissues: Cell–basal-lamina adhesion, *Physical Review E*, **80**: 061903, 2009.  
DOI : [10.1103/PhysRevE.80.061903](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.80.061903)
- [80] K. K. CHIOU, L. HUFNAGEL et B. I. SHRAIMAN, Mechanical Stress Inference for Two Dimensional Cell Arrays, *PLoS Computational Biology*, **8**: e1002512, 2012.  
DOI : [10.1371/journal.pcbi.1002512](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002512)
- [81] J. C. ARCIERO, Q. MI, M. F. BRANCA, D. J. HACKAM et D. SWIGON, Continuum model of collective cell migration in wound healing and colony expansion. *Biophysical Journal*, **100**: 535–43, 2011.  
DOI : [10.1016/j.bpj.2010.11.083](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.11.083)
- [82] S. MARK, R. SHLOMOVITZ, N. S. GOV *et al.*, Physical model of the dynamic instability in an expanding cell culture. *Biophysical Journal*, **98**: 361–70, 2010.  
DOI : [10.1016/j.bpj.2009.10.022](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.10.022)
- [83] J. PROST, F. JÜLICHER et J.-F. JOANNY, Active gel physics, *Nature Physics*, **11**: 111–117, 2015.  
DOI : [10.1038/nphys3224](https://doi.org/10.1038/nphys3224)
- [84] J. RANFT, M. BASAN, J. ELGETI *et al.*, Fluidization of tissues by cell division and apoptosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**: 20863–20868, 2010.  
DOI : [10.1073/pnas.1011086107](https://doi.org/10.1073/pnas.1011086107)
- [85] M. DELARUE, J.-F. JOANNY, F. JÜLICHER et J. PROST, Stress distributions and cell flows in a growing cell aggregate, *Interface Focus*, **4**: 20140033–20140033, 2014.  
DOI : [10.1098/rsfs.2014.0033](https://doi.org/10.1098/rsfs.2014.0033)
- [86] M. S. STEINBERG et S. F. GILBERT, Townes and Holtfreter (1955): directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells, *Journal of Experimental Zoology. Part A, Comparative experimental biology*, **301**: 701–6, 2004.  
DOI : [10.1002/jez.a.114](https://doi.org/10.1002/jez.a.114)
- [87] P. L. TOWNES et J. HOLTFRETER, Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells, *Journal of Experimental Zoology*, **128**: 53–120, 1955.  
DOI : [10.1002/jez.1401280105](https://doi.org/10.1002/jez.1401280105)
- [88] D. R. GARROD et M. S. STEINBERG, Tissue-specific Sorting-out in Two Dimensions in Relation to Contact Inhibition of Cell Movement, *Nature*, **244**: 568–569, 1973.  
DOI : [10.1038/244568a0](https://doi.org/10.1038/244568a0)
- [89] M. S. STEINBERG, Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells. *Journal of Experimental Zoology*, **173**: 395–433, 1970.  
DOI : [10.1002/jez.1401730406](https://doi.org/10.1002/jez.1401730406)
- [90] M. S. STEINBERG et M. TAKEICHI, Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**: 206–209, 1994.  
DOI : [10.1073/pnas.91.1.206](https://doi.org/10.1073/pnas.91.1.206)

- [91] D. DUGUAY, R. A. FOTY et M. S. STEINBERG, Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: Qualitative and quantitative determinants, *Developmental Biology*, **253**: 309–323, 2003.  
DOI : [10.1016/S0012-1606\(02\)00016-7](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00016-7)
- [92] G. W. BRODLAND et H. H. CHEN, The mechanics of cell sorting and envelopment, *Journal of Biomechanics*, **33**: 845–851, 2000.  
DOI : [10.1016/S0021-9290\(00\)00011-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(00)00011-7)
- [93] K. P. LANDSBERG, R. FARHADIFAR, J. RANFT *et al.*, Increased Cell Bond Tension Governs Cell Sorting at the Drosophila Anteroposterior Compartment Boundary, *Current Biology*, **19**: 1950–1955, 2009.  
DOI : [10.1016/j.cub.2009.10.021](https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.10.021)
- [94] J. BELMONTE, G. THOMAS, L. BRUNET, R. de ALMEIDA et H. CHATÉ, Self-Propelled Particle Model for Cell-Sorting Phenomena, *Physical Review Letters*, **100**: 248702, 2008.  
DOI : [10.1103/PhysRevLett.100.248702](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.100.248702)
- [95] E. MÉHES, E. MONES, V. NÉMETH et T. VICSEK, Collective Motion of Cells Mediates Segregation and Pattern Formation in Co-Cultures. *PloS one*, **7**: e31711, 2012.  
DOI : [10.1371/journal.pone.0031711](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031711)
- [96] X. YANG, M. L. MANNING et M. C. MARCHETTI, Aggregation and segregation of confined active particles. *Soft matter*, **10**: 6477–6484, 2014.  
DOI : [10.1039/c4sm00927d](https://doi.org/10.1039/c4sm00927d)
- [97] G. MORATA et P. RIPOLL, Minutes: mutants of drosophila autonomously affecting cell division rate. *Developmental biology*, **42**: 211–221, 1975.  
DOI : [10.1016/0012-1606\(75\)90330-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90330-9)
- [98] E. MORENO, Is cell competition relevant to cancer?, *Nature reviews. Cancer*, **8**: 141–7, 2008.  
DOI : [10.1038/nrc2252](https://doi.org/10.1038/nrc2252)
- [99] R. LEVAYER et E. MORENO, Mechanisms of cell competition: themes and variations. *The Journal of cell biology*, **200**: 689–98, 2013.  
DOI : [10.1083/jcb.201301051](https://doi.org/10.1083/jcb.201301051)
- [100] B. MOLLEREAU, A. PEREZ-GARIJO, A. BERGMANN *et al.*, Compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation: a need for clarification, *Cell Death & Differentiation*, **20**: 181, 2013.  
DOI : [10.1038/cdd.2012.82](https://doi.org/10.1038/cdd.2012.82)
- [101] C. HOGAN, S. DUPRÉ-CROCHET, M. NORMAN *et al.*, Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells. *Nature cell biology*, **11**: 460–7, 2009.  
DOI : [10.1038/ncb1853](https://doi.org/10.1038/ncb1853)
- [102] S. de BECO, M. ZIOSI et L. A. JOHNSTON, New frontiers in cell competition, *Developmental Dynamics*, **241**: 831–841, 2012.  
DOI : [10.1002/dvdy.23783](https://doi.org/10.1002/dvdy.23783)
- [103] M. G. P. STOKER, Regulation of growth and orientation in hamster cells transformed by polyoma virus, 1964,  
DOI : [10.1016/0042-6822\(64\)90099-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(64)90099-6)
- [104] M. G. P. STOKER, M. SHEARER et C. O'NEILL, Growth inhibition of polyoma-transformed cells by contact with static normal fibroblasts. *Journal of cell science*, **1**: 297–310, 1966.

- [105] M. KAJITA, C. HOGAN, A. R. HARRIS *et al.*, Interaction with surrounding normal epithelial cells influences signalling pathways and behaviour of Src-transformed cells. *Journal of cell science*, **123**: 171–180, 2010.  
DOI : [10.1242/jcs.057976](https://doi.org/10.1242/jcs.057976)
- [106] Y. TAMORI, C. U. BIALUCHA, A. G. TIAN *et al.*, Involvement of Lgl and mahjong/VprBP in cell competition, *PLoS Biology*, **8**: 2010.  
DOI : [10.1371/journal.pbio.1000422](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000422)
- [107] T. BONDAR et R. MEDZHITOV, p53-Mediated Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Competition, *Cell Stem Cell*, **6**: 309–322, 2010.  
DOI : [10.1016/j.stem.2010.03.002](https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.002)
- [108] V. AYLLÓN et A. REBOLLO, Ras-induced cellular events (review). *Molecular membrane biology*, **17**: 65–73, 2000.
- [109] M. BARBACID, Ras Genes, *Annual Review of Biochemistry*, **56**: 779–827, 1987.  
DOI : [10.1146/annurev.biochem.56.1.779](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.56.1.779)
- [110] J. S. LIU, J. T. FARLOW, A. K. PAULSON, M. A. LABARGE et Z. J. GARTNER, Programmed cell-to-cell variability in Ras activity triggers emergent behaviors during mammary epithelial morphogenesis. *Cell Reports*, **2**: 1461–1470, 2012.  
DOI : [10.1016/j.celrep.2012.08.037](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.037)
- [111] E. MORENO et K. BASLER, dMyc transforms cells into super-competitors, *Cell*, **117**: 117–129, 2004.  
DOI : [10.1016/S0092-8674\(04\)00262-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00262-4)
- [112] C. de la COVA, M. ABRIL, P. BELLOSTA, P. GALLANT et L. A. JOHNSTON, Drosophila myc regulates organ size by inducing cell competition, *Cell*, **117**: 107–116, 2004.  
DOI : [10.1016/S0092-8674\(04\)00214-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00214-4)
- [113] E. MORENO, K. BASLER et G. MORATA, Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in Drosophila wing development. *Nature*, **416**: 755–759, 2002.  
DOI : [10.1038/416755a](https://doi.org/10.1038/416755a)
- [114] B. DÍAZ et E. MORENO, The competitive nature of cells, *Experimental Cell Research*, **306**: 317–322, 2005.  
DOI : [10.1016/j.yexcr.2005.03.017](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.03.017)
- [115] C. RHINER, J. M. LÓPEZ-GAY, D. SOLDINI *et al.*, Flower forms an extracellular code that reveals the fitness of a cell to its neighbors in Drosophila, *Developmental Cell*, **18**: 985–998, 2010.  
DOI : [10.1016/j.devcel.2010.05.010](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.010)
- [116] G. HELMLINGER, P. A. NETTI, H. C. LICHTENBELD, R. J. MELDER et R. K. JAIN, Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nature biotechnology*, **15**: 778–783, 1997.  
DOI : [10.1038/nbt0897-778](https://doi.org/10.1038/nbt0897-778)
- [117] B. I. SHRAIMAN, Mechanical feedback as a possible regulator of tissue growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 3318–3323, 2005.  
DOI : [10.1073/pnas.0404782102](https://doi.org/10.1073/pnas.0404782102)



- [118] M. BASAN, T. RISLER, J.-F. JOANNY, X. SASTRE-GARAU et J. PROST, Homeostatic competition drives tumor growth and metastasis nucleation. *HFSP journal*, **3**: 265–72, 2009.  
DOI : [10.2976/1.3086732](https://doi.org/10.2976/1.3086732)
- [119] E. MARINARI, A. MEHONIC, S. CURRAN *et al.*, Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit tissue overcrowding. *Nature*, **484**: 542–5, 2012.  
DOI : [10.1038/nature10984](https://doi.org/10.1038/nature10984)
- [120] G. T. EISENHOFER, P. D. LOFTUS, M. YOSHIGI *et al.*, Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia, *Nature*, **484**: 546–549, 2012.  
DOI : [10.1038/nature10999](https://doi.org/10.1038/nature10999)
- [121] J. RANFT, M. ALIEE, J. PROST, F. JÜLICHER et J.-F. JOANNY, Mechanically driven interface propagation in biological tissues, *New Journal of Physics*, **16**: 035002, 2014.  
DOI : [10.1088/1367-2630/16/3/035002](https://doi.org/10.1088/1367-2630/16/3/035002)
- [122] W. H. ZACHARIASEN, The atomic arrangement in glass, *Journal of the American Chemical Society*, **54**: 3841–3851, 1932.  
DOI : [10.1021/ja01349a006](https://doi.org/10.1021/ja01349a006)
- [123] G. TAMMANN, *Der Glaszustand*. Leipzig : L. Voss, 1933. 123 pages.
- [124] J. ZARZYCKI, *Les verres et l'état vitreux*. Paris : Masson, 1982. 391 pages.
- [125] T. ATAKE et C. A. ANGELL, Pressure dependence of the glass transition temperature in molecular liquids and plastic crystals, *The Journal of Physical Chemistry*, **83**: 3218–3223, 1979.  
DOI : [10.1021/j100488a007](https://doi.org/10.1021/j100488a007)
- [126] U. BENGTZELIUS, W. GOTZE et A. SJOLANDER, Dynamics of supercooled liquids and the glass transition, *Journal of Physics C: Solid State Physics*, **17**: 5915–5934, 1984.  
DOI : [10.1088/0022-3719/17/33/005](https://doi.org/10.1088/0022-3719/17/33/005)
- [127] M. D. EDIGER, C. A. ANGELL et S. R. NAGEL, Supercooled Liquids and Glasses, *The Journal of Physical Chemistry*, **100**: 13200–13212, 1996.  
DOI : [10.1021/jp953538d](https://doi.org/10.1021/jp953538d)
- [128] P. G. DEBENEDETTI et F. H. STILLINGER, Supercooled liquids and the glass transition, *Nature*, **410**: 259–67, 2001.  
DOI : [10.1038/35065704](https://doi.org/10.1038/35065704)
- [129] E. JONES PARRY et D. TABOR, Effect of hydrostatic pressure and temperature on the mechanical loss properties of polymers: 3. PET, PVAC and vinyl chloride/vinyl acetate copolymers, *Polymer*, **14**: 628–631, 1973.  
DOI : [10.1016/0032-3861\(73\)90037-2](https://doi.org/10.1016/0032-3861(73)90037-2)
- [130] Définition de la température de transition vitreuse, *Compendium of Chemical Terminology (Gold Book)* en ligne de l'UICPA (Union internationale de chimie pure et appliquée, IUPAC en anglais), <http://goldbook.iupac.org/G02641.html>,  
DOI : [10.1351/goldbook.G02641](https://doi.org/10.1351/goldbook.G02641)
- [131] GDR MiDi, On dense granular flows. *The European physical journal. E*, **14**: 341–365, 2004.  
DOI : [10.1140/epje/i2003-10153-0](https://doi.org/10.1140/epje/i2003-10153-0)

- [132] A. J. LIU et S. R. NAGEL, Jamming is not just cool any more, *Nature*, **396** : 21–22, 1998.  
DOI : [10.1038/23819](https://doi.org/10.1038/23819)
- [133] K. TO, P. Y. LAI et H. K. PAK, Jamming of granular flow in a two-dimensional hopper, *Physical Review Letters*, **86** : 71–74, 2001.  
DOI : [10.1103/PhysRevLett.86.71](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.86.71)
- [134] M. CATES, J. WITTMER, J.-P. BOUCHAUD et P. CLAUDIN, Jamming, Force Chains, and Fragile Matter, *Physical Review Letters*, **81** : 1841–1844, 1998.  
DOI : [10.1103/PhysRevLett.81.1841](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.81.1841)
- [135] Photographie par Hubert RAGUET du tambour rotatif présent au SPEC (IRAMIS, CEA, Saclay), dispositif utilisé notamment dans l'article [138].
- [136] A. J. LIU et S. R. NAGEL, *Jamming and Rheology: Constrained Dynamics on Microscopic and Macroscopic Scales*. Londres : Taylor & Francis, 2001. 551 pages.
- [137] A. JANDA, D. MAZA, A. GARCIMARTIN *et al.*, Unjamming a granular hopper by vibration, *Europhysics Letters*, **87** : 24002, 2009.  
DOI : [10.1209/0295-5075/87/24002](https://doi.org/10.1209/0295-5075/87/24002)
- [138] S. DEBOEUF, E. M. BERTIN, E. LAJEUNESSE et O. DAUCHOT, Jamming transition of a granular pile below the angle of repose, *European Physical Journal B*, **36** : 105–113, 2003.  
DOI : [10.1140/epjb/e2003-00322-1](https://doi.org/10.1140/epjb/e2003-00322-1)
- [139] V. B. NGUYEN, T. DARNIGE, A. BRUAND et E. CLÉMENT, Creep and fluidity of a real granular packing near jamming, *Physical Review Letters*, **107** : 138303, 2011.  
DOI : [10.1103/PhysRevLett.107.138303](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.107.138303)
- [140] I. ALBERT, P. TEGZES, B. KAHNG *et al.*, Jamming and Fluctuations in Granular Drag, *Physical Review Letters*, **84** : 5122–5125, 2000.  
DOI : [10.1103/PhysRevLett.84.5122](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.84.5122)
- [141] L. E. SILBERT, D. ERTAŞ, G. S. GREST, T. C. HALSEY et D. LEVINE, Analogies between granular jamming and the liquid-glass transition, *Physical Review E*, **65** : 3–6, 2002.  
DOI : [10.1103/PhysRevE.65.051307](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.65.051307)
- [142] L. BERTHIER, G. BIROLI, J.-P. BOUCHAUD, L. CIPELLETTI et W. van SAARLOOS, *Dynamical Heterogeneities in Glasses, Colloids, and Granular Media*. 2011. 466 pages.  
DOI : [10.1093/acprof:oso/9780199691470.001.0001](https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199691470.001.0001), arXiv : [1009.4765v2](https://arxiv.org/abs/1009.4765v2)
- [143] E. W. FISCHER, E. DONTH et W. STEFFEN, Temperature dependence of characteristic length for glass transition, *Physical Review Letters*, **68** : 2344–2346, 1992.  
DOI : [10.1103/PhysRevLett.68.2344](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.68.2344)
- [144] L. BERTHIER, G. BIROLI, J.-P. BOUCHAUD *et al.*, Direct experimental evidence of a growing length scale accompanying the glass transition. *Science*, **310** : 1797–1800, 2005.  
DOI : [10.1126/science.1120714](https://doi.org/10.1126/science.1120714)
- [145] O. POULIQUEN, Velocity correlations in dense granular flows, *Physical Review Letters*, **93** : 248001, 2004.  
DOI : [10.1103/PhysRevLett.93.248001](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.93.248001)
- [146] C. S. O'HERN, L. E. SILBERT et S. R. NAGEL, Jamming at zero temperature and zero applied stress: The epitome of disorder, *Physical Review E*, **68** : 011306, 2003.  
DOI : [10.1103/PhysRevE.68.011306](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.68.011306)

- [147] H. M. LAUN, Normal stresses in extremely shear thickening polymer dispersions, *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, **54**: 87–108, 1994.  
DOI : [10.1016/0377-0257\(94\)80016-2](https://doi.org/10.1016/0377-0257(94)80016-2)
- [148] C. SONG, P. WANG et H. A. MAKSE, Experimental measurement of an effective temperature for jammed granular materials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 2299–2304, 2005.  
DOI : [10.1073/pnas.0409911102](https://doi.org/10.1073/pnas.0409911102)
- [149] E. R. WEEKS, Three-Dimensional Direct Imaging of Structural Relaxation Near the Colloidal Glass Transition, *Science*, **287**: 627–631, 2000.  
DOI : [10.1126/science.287.5453.627](https://doi.org/10.1126/science.287.5453.627)
- [150] L. O. HEDGES, image de couverture, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**: iii, 2009.
- [151] P. SCHALL, D. A. WEITZ et F. SPAEPEN, Structural rearrangements that govern flow in colloidal glasses. *Science*, **318**: 1895–1899, 2007.  
DOI : [10.1126/science.1149308](https://doi.org/10.1126/science.1149308)
- [152] T. E. ANGELINI, E. HANNEZO, X. TREPAT *et al.*, Glass-like dynamics of collective cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**: 4714–4719, 2011.  
DOI : [10.1073/pnas.1010059108](https://doi.org/10.1073/pnas.1010059108)
- [153] K. D. NNETU, M. KNORR, J. A. KÄS et M. ZINK, The impact of jamming on boundaries of collectively moving weak-interacting cells, *New Journal of Physics*, **14**: 115012, 2012.  
DOI : [10.1088/1367-2630/14/11/115012](https://doi.org/10.1088/1367-2630/14/11/115012)
- [154] V. TRAPPE, V. PRASAD, L. CIPELLETTI, P. N. SEGRE et D. A. WEITZ, Jamming phase diagram for attractive particles, *Nature*, **411**: 772–5, 2001.  
DOI : [10.1038/35081021](https://doi.org/10.1038/35081021)
- [155] K. LU, E. E. BRODSKY et H. P. KAVEHPOUR, A thermodynamic unification of jamming, *Nature Physics*, **4**: 404–407, 2008.  
DOI : [10.1038/nphys934](https://doi.org/10.1038/nphys934)
- [156] M. SADATI, N. TAHERI QAZVINI, R. KRISHNAN, C. Y. PARK et J. J. FREDBERG, Collective migration and cell jamming. *Differentiation*, **86**: 121–5, 2013.  
DOI : [10.1016/j.diff.2013.02.005](https://doi.org/10.1016/j.diff.2013.02.005)
- [157] D. T. TAMBE, C. C. HARDIN, T. E. ANGELINI *et al.*, Collective cell guidance by cooperative intercellular forces. *Nature materials*, **10**: 469–475, 2011.  
DOI : [10.1038/nmat3025](https://doi.org/10.1038/nmat3025)
- [158] J. MATTSSON, H. M. WYSS, A. FERNANDEZ-NIEVES *et al.*, Soft colloids make strong glasses. *Nature*, **462**: 83–6, 2009.  
DOI : [10.1038/nature08457](https://doi.org/10.1038/nature08457)
- [159] E.-M. SCHÖTZ, M. LANIO, J. A. TALBOT et M. L. MANNING, Glassy dynamics in three-dimensional embryonic tissues. *Journal of the Royal Society, Interface*, **10**: 20130726, 2013.  
DOI : [10.1098/rsif.2013.0726](https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0726)
- [160] D. BI, J. H. LOPEZ, J. M. SCHWARZ et M. L. MANNING, A density-independent rigidity transition in biological tissues, 2015, arXiv : [1409.0593v4](https://arxiv.org/abs/1409.0593v4)

- [161] R. D. RAMIREZ, S. SHERIDAN, L. GIRARD *et al.*, Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins, *Cancer research*, **64**: 9027–9034, 2004.  
DOI : [10.1158/0008-5472.CAN-04-3703](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3703)
- [162] W. C. HAHN, C. M. COUNTER, A. S. LUNDBERG *et al.*, Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, **400**: 464–8, 1999.  
DOI : [10.1038/22780](https://doi.org/10.1038/22780)
- [163] S. PREIBISCH, S. SAALFELD *et P.* TOMANCAK, Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions, *Bioinformatics*, **25**: 1463–1465, 2009.  
DOI : [10.1093/bioinformatics/btp184](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp184)
- [164] J. SCHINDELIN, I. ARGANDA-CARRERAS, E. FRISE *et al.*, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, **9**: 676–82, 2012.  
DOI : [10.1038/nmeth.2019](https://doi.org/10.1038/nmeth.2019)
- [165] Site web du logiciel d'analyse d'images Fiji (Fiji Is Just ImageJ). [www.fiji.sc/Fiji](http://www.fiji.sc/Fiji)
- [166] C. LI *et C.* LEE, Minimum cross entropy thresholding, *Pattern Recognition*, **26**: 617–625, 1993.  
DOI : [10.1016/0031-3203\(93\)90115-D](https://doi.org/10.1016/0031-3203(93)90115-D)
- [167] C. LI *et P.* TAM, An iterative algorithm for minimum cross entropy thresholding, *Pattern Recognition*, **19**: 771–776, 1998.  
DOI : [10.1016/S0167-8655\(98\)00057-9](https://doi.org/10.1016/S0167-8655(98)00057-9)
- [168] E. T. JAYNES, Gibbs vs Boltzmann Entropies, *American Journal of Physics*, **33**: 391–398, 1965.  
DOI : [10.1119/1.1971557](https://doi.org/10.1119/1.1971557)
- [169] C. SHANNON, A mathematical theory of communication, *The Bell System Technical Journal*, **27**: 379–423, 1948.  
DOI : [10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x](https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x)
- [170] J. SERRA, L'analyse des textures par la géométrie aléatoire, *Comptes-rendus du Comité Scientifique de l'IRSID*, 1965.
- [171] G. MATHERON *et J.* SERRA, The birth of mathematical morphology, in : *Proceedings of the Vith International Symposium on Mathematical Morphology*, sous la dir. de H. TALBOT *et R.* BEARE, pp. 1–16. CSIRO Publishing, 2002.
- [172] M. RAFFEL, C. E. WILLERT *et J.* KOMPENHANS, *Particle Image Velocimetry: A practical guide*. Berlin, Heidelberg, New York : Springer, 1998. 253 pages.
- [173] W. SUPATTO, D. DÉBARRE, B. MOULIA *et al.*, In vivo modulation of morphogenetic movements in Drosophila embryos with femtosecond laser pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 1047–1052, 2005.  
DOI : [10.1073/pnas.0405316102](https://doi.org/10.1073/pnas.0405316102)
- [174] L. PETITJEAN, *Réponse active d'un épithélium à une stimulation mécanique*. Thèse de doctorat, UPMC – Université Pierre et Marie Curie, 2011.
- [175] M. DEFORET, M. C. PARRINI, L. PETITJEAN *et al.*, Automated velocity mapping of migrating cell populations (AVeMap), *Nature Methods*, **9**: 1081–3, 2012.  
DOI : [10.1038/nmeth.2209](https://doi.org/10.1038/nmeth.2209)

- [176] G. DUCLOS, S. GARCIA, H. G. YEVICK et P. SILBERZAN, Perfect nematic order in confined monolayers of spindle-shaped cells. *Soft matter*, **10**: 2346–53, 2014.  
DOI : [10.1039/c3sm52323c](https://doi.org/10.1039/c3sm52323c)
- [177] Page web du module MatPIV de Johan Kristian SVEEN. [folk.uio.no/jks/matpiv/index2.html](http://folk.uio.no/jks/matpiv/index2.html)
- [178] J. K. SVEEN, *An introduction to MatPIV v. 1.6.1*. Department of Mathematics, University of Oslo, 2004.
- [179] S. M. ZEHNDER, M. SUARIS, M. M. BELLAIRE et T. E. ANGELINI, Cell Volume Fluctuations in MDCK Monolayers, *Biophysical Journal*, **108**: 247–250, 2015.  
DOI : [10.1016/j.bpj.2014.11.1856](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.11.1856)
- [180] K. DOXZEN, S. R. K. VEDULA, M. C. LEONG *et al.*, Guidance of collective cell migration by substrate geometry. *Integrative biology*, **5**: 1026–35, 2013.  
DOI : [10.1039/c3ib40054a](https://doi.org/10.1039/c3ib40054a)
- [181] B. LI et S. X. SUN, Coherent Motions in Confluent Cell Monolayer Sheets, *Biophysical Journal*, **107**: 1532–1541, 2014.  
DOI : [10.1016/j.bpj.2014.08.006](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.08.006)
- [182] E. BEN-ISAAC, Y. PARK, G. POPESCU *et al.*, Effective temperature of red-blood-cell membrane fluctuations, *Physical Review Letters*, **106**: 238103, 2011.  
DOI : [10.1103/PhysRevLett.106.238103](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.106.238103)
- [183] G. MALET-ENGRA, W. YU, A. OLDANI *et al.*, Collective Cell Motility Promotes Chemotactic Prowess and Resistance to Chemorepulsion, *Current Biology*, **25**: 242–250, 2015.  
DOI : [10.1016/j.cub.2014.11.030](https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.030)
- [184] C. G. ROLLI, H. NAKAYAMA, K. YAMAGUCHI *et al.*, Switchable adhesive substrates: Revealing geometry dependence in collective cell behavior, *Biomaterials*, **33**: 2409–2418, 2012.  
DOI : [10.1016/j.biomaterials.2011.12.012](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.012)
- [185] R. ALON, D. A. HAMMER et T. A. SPRINGER, Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature*, **374**: 539–542, 1995.  
DOI : [10.1038/374539a0](https://doi.org/10.1038/374539a0)
- [186] M. J. SMITH, E. L. BERG et M. B. LAWRENCE, A direct comparison of selectin-mediated transient, adhesive events using high temporal resolution. *Biophysical Journal*, **77**: 3371–3383, 1999.  
DOI : [10.1016/S0006-3495\(99\)77169-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77169-9)
- [187] P. ESPAÑOL et P. WARREN, Statistical Mechanics of Dissipative Particle Dynamics, *Europhysics Letters*, **30**: 191–196, 1995.  
DOI : [10.1209/0295-5075/30/4/001](https://doi.org/10.1209/0295-5075/30/4/001)
- [188] G. BEAUNE, T. V. STIRBAT, N. KHALIFAT *et al.*, How cells flow in the spreading of cellular aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**: 8055–60, 2014.  
DOI : [10.1073/pnas.1323788111](https://doi.org/10.1073/pnas.1323788111)



## Maturation et mise en compétition de monocouches cellulaires

Les mouvements cellulaires collectifs jouent un rôle fondamental dans de nombreux phénomènes biologiques (développement, régénération, cancer, etc.). Pour autant, les mécanismes régissant ces mouvements sont toujours mal connus. Nous nous proposons dans cette thèse d'étudier deux situations expérimentales mettant en jeu ces mouvements dans des monocouches cellulaires.

Nous nous intéressons en premier lieu à des cellules HBEC, épithéliales mais peu cohésives. On calcule par PIV (vélocimétrie par images de particules) le champ de vitesse dans des populations de cellules déposées de manière homogène sur le substrat. On observe un ralentissement des mouvements et une progression non monotone de leur corrélation spatiale en fonction du temps. La combinaison de nos expériences, d'un modèle analytique et de simulations nous permet de conclure que cette évolution est la signature d'une transition de *jamming* contrôlée par la vitesse et que le ralentissement est dû à une maturation des jonctions cellule-cellule et des adhésions cellules-substrat.

Nous étudions ensuite la compétition pour l'espace entre deux lignées HEK-HT, l'une normale et l'autre transformée par une mutation oncogénique  $Ras^{V12}$ . On fait migrer les deux populations, fluorescentes, en vis-à-vis sur une bande de substrat libre qui les sépare. On dépose face à face les deux populations, porteuses d'un fluorophore différent, séparées par une bande de substrat libre pour les faire migrer l'une vers l'autre. On combine l'analyse des images de fluorescence aux techniques de PIV pour étudier la dynamique des deux fronts de population. Après contact et malgré un certain mélange des deux types, les monocouches forment une interface relativement bien définie qui se déplace dans le sens d'avancée du type transformé.

**Mots-clefs :** mouvement collectif ; monocouches cellulaires ; migration ; *jamming* ; compétition ; PIV.

## Maturation and competition in cellular monolayers

Collective cellular motion plays a fundamental role in several biological phenomena: development, regeneration, cancer, etc. However, the mechanisms behind this motion are still poorly understood. In this thesis, we study two experimental situations involving collective motion in cellular monolayers.

We first look at HBEC cells, which are epithelial but weakly cohesive. Using particle image velocimetry (PIV), we monitor the velocity field in populations of cells homogeneously seeded on the substrate. We observe a slowdown in the cellular motion as its spatial correlation non-monotonically changes with time. Combining our experiments with an analytical model and simulations allows us to conclude that the system undergoes a jamming transition with speed as the main control parameter. We also show that the observed slowdown is a consequence of the maturation of cell-cell junctions and cell-substrate adhesions.

We then study the competition for space between two HEK-HT cell lines, one being normal and the other being transformed by an oncogenic  $Ras^{V12}$  mutation. The two fluorescently-labeled populations are set to migrate antagonistically towards an in-between stripe of free substrate. Through analysis of the fluorescence images and PIV methods, we study the dynamics of both population fronts. After contact, even though the two types mix to a certain extent, we observe a relatively well-defined interface, which moves towards the normal population.

**Keywords:** collective motion; cellular monolayers; migration; jamming; competition; PIV.