



HAL
open science

Modèle de réseaux de contrôle de la prolifération cellulaire : application à la simulation de l'homéostasie d'un tissu épithélial stratifié en 2D

Didier Morel

► **To cite this version:**

Didier Morel. Modèle de réseaux de contrôle de la prolifération cellulaire : application à la simulation de l'homéostasie d'un tissu épithélial stratifié en 2D. Autre [q-bio.OT]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2001. Français. NNT: . tel-00004693

HAL Id: tel-00004693

<https://theses.hal.science/tel-00004693>

Submitted on 16 Feb 2004

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.

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE I
SCIENCES & GEOGRAPHIE**

THESE
Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
(arrêté ministériel du 30 mars 1992)

Discipline : Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

DIDIER MOREL
Le 19 décembre 2001

**Modèle de réseaux de contrôle de la prolifération
cellulaire : application à la simulation de l'homéostasie
d'un tissu épithélial stratifié en 2D.**

Travaux de recherche dirigés par
M. Gérard Brugal, professeur de l'Université Joseph Fourier

Composition du Jury :

Pr. Danielle Dhouailly	Présidente
Pr. Zvia Agur	Rapporteur
Dr. Hidde de Jong	Rapporteur
Dr. Raphaël Marcelpoil	Examineur
Pr. Gérard Brugal	Examineur

Thèse préparée au sein de l'Equipe de Reconnaissance des Formes et de Microscopie Quantitative, Laboratoire des Techniques de l'Imagerie, de la Modélisation et de la Cognition. Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble I

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE I
SCIENCES & GEOGRAPHIE**

THESE
Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
(arrêté ministériel du 30 mars 1992)

Discipline : Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

DIDIER MOREL
Le 19 décembre 2001

**Modèle de réseaux de contrôle de la prolifération
cellulaire : application à la simulation de l'homéostasie
d'un tissu épithélial stratifié en 2D.**

Travaux de recherche dirigés par
M. Gérard Brugal, professeur de l'Université Joseph Fourier

Composition du Jury :

Pr. Danielle Dhouailly	Présidente
Pr. Zvia Agur	Rapporteur
Dr. Hidde de Jong	Rapporteur
Dr. Raphaël Marcelpoil	Examineur
Pr. Gérard Brugal	Examineur

Thèse préparée au sein de l'Equipe de Reconnaissance des Formes et de Microscopie Quantitative, Laboratoire des Techniques de l'Imagerie, de la Modélisation et de la Cognition. Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble I

A la mémoire d'Isabelle Bonsignore,

Alice was beginning to get very tired of sitting by her sister on the bank, and of having nothing to do: once or twice she had peeped into the book her sister was reading, but it had no pictures or conversations in it, 'and what is the use of a book,' thought Alice, 'without pictures or conversations?'

***Lewis Carroll
Alice in wonderland***

Merci au Pr. Gérard Brugal, d'avoir accepté de diriger cette thèse, pour ses qualités d'enseignant et pour les quatre phases et demi du cycle cellulaire.

Merci à M^{me} le Professeur Danielle Dhouailly d'avoir accepté de présider ce jury.

Merci à M^{me} le Professeur Zvia Agur d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, de se déplacer en France pour assister à la soutenance malgré les contraintes liées à une situation géopolitique difficile.

Merci à Hidde de Jong d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Merci à Raphaël Marcelpoil, pour tout.

Merci M^{mes} Pinte et Jaymon ainsi que M Guy Ageron et Alain Duc, respectivement Professeurs de Biologie, Instituteur et Professeur de Français pour la curiosité et l'envie d'apprendre, et qui me jouent parfois des tours...

Merci à mes parents, mon frère et toute la famille.

Merci à la musique et aux musiciens, sans qui point de salut, Dominique Ané, Miles Davis, Nick Drake, Erik Satie, ... et j'en oublie certains c'est sûr.

Merci à Bichon, Claire, Jean-Marie, Stéphane, Aurélie, Nathalie, Jean-Pierre, Stéfan et Aude, Greg et Yann. Ces jeunes pousses de tulipe presque toutes devenues de belles plantes.

Merci à Lolo, Vincent, William et Raphaël, pour la course à pied, les 24 heures de Sillery, le VTT, l'escalade, la randonnée, etc, etc ... de l'effort pour nos petits corps par le sport.

Merci aux filles d'à côté : Françoise, Marie-Paule, Michèle, Nicole, Paulette et Véro pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Merci à Bernard, Bruno, Christèle, Etienne, Fabien, Franck, Françoise, Gérard, Gilbert, Jean-Dominique, Jean-François, Magali, Marie-Paule, Martial, Michèle, Nicole, Pascal, Patrick, Paul, Paulette, Véronique, Vincent, Xavier, Yves, ... tous les membres de la smala RFMQ passée, présente et à venir.

Merci à toute l'équipe de Tripath Imaging, Bruno, Cedrick, Franck, Jean-François, Raphaël et Thomas.

Merci au laboratoire TIMC et plus particulièrement à Pierre Baconnier, Philippe Tracqui, Jacques Demongeot, Myriam Vial, Corinne Frison et Corinne Meunier.

Merci au Comité de l'Isère de La Ligue Contre Le Cancer, à l'Association pour la Recherche sur le Cancer, à l'Université Joseph Fourier et à Tripath Imaging pour leur soutien financier sans lequel cette thèse n'aurait pu avoir lieu.

Merci à Domino.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	8
ETAT DE L'ART.....	10
PARTIE 1 : PROBLEMATIQUE BIOLOGIQUE.....	10
I. Introduction : définition de l'homéostasie.....	10
II. Généralités sur les épithélia.....	10
1. Introduction.....	10
2. Classification des épithélia.....	11
III. Structure et fonction des épithélia stratifiés.....	11
1. Introduction.....	11
2. Epithélium stratifié squameux kératinisé : l'épiderme.....	12
3. Epithélium stratifié squameux : la cornée.....	23
4. Conclusion.....	24
IV. Régulation moléculaire de la prolifération et de la différenciation.....	25
1. Généralité sur le « Cycle » cellulaire.....	25
2. Bases de la régulation moléculaire du cycle cellulaire.....	29
3. Spécificité de la transition G ₁ /S.....	37
4. Spécificité de la transition G ₁ /G ₀ /Différenciation.....	42
5. Spécificité de la transition G ₂ /M.....	45
6. Réseaux de contrôle moléculaires du cycle cellulaire.....	48
7. Conclusion.....	63
V. Régulation de l'homéostasie d'un épithélium stratifié.....	64
1. Introduction.....	64
2. Théorie des cellules souches.....	64
3. Organisation cinétique de la couche basale des épithélia stratifiés.....	69
4. Contrôles moléculaires de l'homéostasie <i>in vivo</i>	76
PARTIE 2 : MODELISATION DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE.....	81
I. Introduction : modélisation de la prolifération, une discipline contemporaine.....	81
II. Modèles de prolifération cellulaire.....	82
1. Introduction.....	82
2. Macro-modèles.....	82
3. Micro-modèles.....	87
5. Conclusion sur les modèles de prolifération cellulaire.....	95
III. Modèles et représentation de cellules et de tissus en 2 et 3 dimensions.....	96
1. Modèles non-déformables.....	96
2. Modèles déformables.....	99
3. Modèles continus.....	105
4. Conclusion.....	106
IV. Conclusion générale sur les modèles.....	106
METHODES.....	107
INTRODUCTION.....	107
PARTIE 1 : MODELE DES RESEAUX DE CONTROLE DE LA PROLIFERATION ET DE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE.....	107
I. Modèle de réseau de contrôle de la prolifération.....	107
1. Introduction.....	107
2. Construction d'un réseau de contrôle de la phase G1 par assemblage de sous-réseaux.....	108
3. Conclusion : réseau entier.....	111
II. Modèle stœchiométrique et cinétique.....	112
1. Généralité sur l'équation de Michaelis et Menten.....	112
2. Loi d'Action de Masse.....	112
3. Application de la LAM aux réactions de contrôle de la prolifération cellulaire.....	113
4. Implémentation.....	116
6. Nomenclature et formalisation.....	119
PARTIE 2 : REPRESENTATION D'UN TISSU EN 2D.....	121
I. Graphe de Voronoï.....	121
1. Définition.....	121
2. Applicabilité à un tissu épithélial.....	121
II. Intégration du modèle de prolifération et du graphe de Voronoï.....	123
1. Généralités.....	123

2. Implémentation du modèle.....	123
3. Déroulement des simulations : gestion du temps et émulation du parallélisme.....	126
III. <i>Modélisation des échanges biochimiques entre les cellules ou entre la cellule et la membrane basale</i>	128
1. Echanges à court terme	128
2. Signalisation à distance et gradients.....	129
IV. <i>Modélisation des relations physiques entre les cellules</i>	129
1. Mobilité cellulaire, lien avec les échanges biochimiques.....	129
2. Calcul de l'adhérence cellulaire	130
2. Calcul de la répulsion cellulaire.....	131
V. <i>Cadre des simulations et gestion des effets de bord</i>	131
1. Cadre des simulations	131
2. Bords absorbants	132
3. Bords réfléchissants	132
4. Cas particulier de la membrane basale.....	132
VI. <i>Interface</i>	132
RESULTATS.....	135
PARTIE 1 : MODELE DE RESEAU DE CONTROLE	135
I. <i>Etude des comportements dynamiques du réseau</i>	135
1. Forme simple (cellule isolée).....	135
3. Forme complexe incluant les effets de l'environnement (cellule socialisée).....	144
4. Conclusion et critiques.....	152
II. <i>Identification de comportements cinétiques différents biologiquement significatifs</i>	152
1. Introduction.....	152
2. Modèle de cellules souches : cellule à prolifération lente	152
3. Modèle de cellules en transit : cellule à prolifération rapide	153
4. Modèle de cellules engagées dans la différenciation : cellule ne proliférant plus	154
5. Conclusion	154
PARTIE 2 : APPLICATION DU MODELE DE RESEAU DE CONTROLE DE LA PROLIFERATION A L'HOMEOSTASIE D'UN EPITHELIUM STRATIFIE.....	155
I. <i>Simulations déterministes</i>	155
1. Cas d'une population cellulaire épithéliale de la couche basale d'un épithélium stratifié en coupe frontale	155
2. Cas d'une population cellulaire épithéliale stratifiée en coupe transversale.....	158
II. <i>Simulations semi-déterministes</i>	159
1. Cas d'une population cellulaire épithéliale de la couche basale d'un épithélium stratifié en coupe frontale	160
2. Cas d'une population cellulaire épithéliale stratifiée en coupe transversale.....	169
3. Conclusion	171
III. <i>Simulations de l'homéostasie</i>	171
1. Définition de populations cellulaires de référence	172
2. Cellules souches réparties de façon homogène	172
3. Cellules souches en groupes.....	178
4. Conclusion	180
DISCUSSION	182
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	185
REFERENCES.....	187
RESUME	197

INTRODUCTION

La biologie est certainement la discipline scientifique qui a connu le plus de bouleversements au cours des cinquante dernières années. De l'observation du comportement physiologique - échelle macroscopique - à l'observation du comportement moléculaire - échelle microscopique, la description du vivant a atteint un degré de complexité inédit la rendant de plus en plus difficile à appréhender.

Le développement rapide de techniques expérimentales efficaces, peu coûteuses et reproductibles a fourni les outils indispensables à l'identification d'acteurs moléculaires et macromoléculaires impliqués dans la régulation de la vie, de l'ADN aux complexes protéiques membranaires macromoléculaires en passant par les gènes et les protéines. Outre l'apport indéniable de ces techniques, on peut aussi regretter le fossé qu'elles ont contribué à creuser entre, d'une part, une biologie soucieuse de fournir une représentation cohérente et globale du vivant et, d'autre part, une biologie moléculaire malheureusement réduite à sa seule part descriptive, voir encyclopédiste, réduisant le vivant à une somme d'éléments difficile à lier les uns aux autres.

L'étude de la dynamique des processus impliqués dans les régulations de la croissance et de l'homéostasie de tissus est un exemple très significatif des problèmes rencontrés par la biologie actuelle. La compréhension de ces processus est fortement dépendante de l'intégration de tous les facteurs présents : architecture, niveau tissulaire, niveau cellulaire, messages moléculaires entre les cellules, régulations intracellulaires, etc... Cette intégration est difficile et relève malheureusement d'un schéma assez archétypal. D'un côté, les facteurs moléculaires de régulation de la croissance sont connus en détails chez les cellules en culture *in vitro* mais difficile à extrapoler d'un type cellulaire à un autre, d'une expérience à l'autre. D'un autre côté, ces connaissances sont intégrées avec beaucoup de difficultés dans le cadre du tissu. Cette difficulté est d'autant plus grande que l'étude systématique de la topologie de l'expression de protéines dans un tissu et de leur dynamique est extrêmement longue, coûteuse, fastidieuse et, bien qu'elle se révélerait nécessaire, peu susceptible d'apporter gloire et reconnaissance au chercheur qui aurait assez d'énergie à consacrer à la tâche. Ainsi, les connaissances de la prolifération dans les épithélia se résument principalement à l'observation de caractères cinétiques peu ou prou reliés à des marqueurs moléculaires génériques dont la signification reste difficile à établir.

La modélisation pourrait être un excellent outil d'intégration de cette complexité. Grâce à la puissance croissante de calcul des ordinateurs, il s'avère dorénavant envisageable de simuler des comportements biologiques en intégrant les différents niveaux de complexité qui les caractérise : complexité des interactions moléculaires de la régulation de la prolifération cellulaire, complexité des relations cellules / cellules et complexité des relations structure / fonction dans un tissu.

Ici, nous souhaitons proposer une approche originale de la modélisation de l'homéostasie des épithélia stratifiés qui se fonde sur un modèle des contrôles moléculaires de la prolifération. Le développement d'un tel modèle ne

pouvait pas se concevoir sans une revue bibliographique approfondie permettant de rassembler les connaissances actuelles des mécanismes de la régulation de l'homéostasie d'un épithélium stratifié tant aux niveaux moléculaire et cellulaire que tissulaire. Ce mémoire débute donc par une importante partie bibliographique dont le but est la définition du cadre biologique de notre travail et la mise en évidence de sa complexité. Afin de permettre au lecteur de juger de la pertinence de notre approche, il nous a semblé essentiel de compléter cet état de l'art par une revue des approches antérieures dans le domaine de la modélisation. Suite à la description des méthodes que nous avons employées pour développer et conjuguer un modèle des contrôles moléculaires de la prolifération et une représentation des cellules en deux dimensions, la présentation de nos résultats montre qu'il est possible d'intégrer cette complexité multi-échelle même si une approche complète et rigoureuse nous a semblé difficile à mettre en œuvre.

ETAT DE L'ART

Partie 1 : Problématique Biologique

I. Introduction : définition de l'homéostasie

La notion d'homéostasie a été introduite par Cannon en 1932 comme étant l'état d'un système capable de maintenir ses variables essentielles dans des limites acceptables pour sa structure face à des perturbations imprévues, e.g. régulations physiologiques d'un organisme lors de changements de température ou cicatrisation après blessure (**Cannon 1932**).

Plus généralement, l'homéostasie est considérée comme l'ensemble des mécanismes permettant à un système biologique de conserver sa structure et sa fonction.

Dans le cas d'un épithélium stratifié, cas qui nous intéresse particulièrement ici, l'homéostasie est donc l'ensemble des mécanismes permettant au tissu de conserver une structure stratifiée lui permettant d'assurer efficacement sa fonction de protection tout en contrebalançant l'usure du tissu sur sa face exposée par le remplacement des cellules en nombre et en qualité.

II. Généralités sur les épithélia

1. Introduction

Le terme « épithélium » possède des racines grecques : *thelio* (grossir) et *epi* (autour). Cette étymologie caractérise assez précisément un épithélium qui est avant tout un tissu d'interface entre l'organisme et son environnement. Tous les épithélia sont formés de cellules contiguës, disposées sur une membrane basale (MB) qui est une structure extracellulaire composée de nombreuses protéines fibreuses incluant des lamines et du collagène de type IV, par exemple (**Wright et al. 84**).

Suivant leur localisation, les épithélia possèdent des fonctions différentes dont la protection, la sécrétion ou l'absorption de substances diverses dans et/ou depuis un lumen (une cavité) ou les vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que la reconnaissance sensorielle et la reconnaissance d'antigènes.

L'exposition d'une face de l'épithélium au lumen ou à l'extérieur ainsi que l'attachement de l'autre face à la MB donne à chaque cellule une polarité spécifique à trois faces :

- Une face apicale : la partie supérieure des cellules en contact avec un lumen ou avec l'extérieur ;
- Une face basale : la partie la plus proche de la MB ;
- Une face latérale : la partie en contact avec d'autres cellules de la même couche ou des cellules des couches environnantes.

Un composant essentiel du cytosquelette des épithélia est le filament intermédiaire (FI) de kératine. Cette caractéristique différencie les cellules épithéliales des autres types cellulaires. Par exemple, la vimentine est le FI des tissus conjonctifs et la desmine est le FI des cellules musculaires (**Wright et al. 84**).

Les épithélia sont des tissus non vascularisés. Aucun vaisseau sanguin ne les traverse comme c'est le cas dans les tissus conjonctifs et musculaires.

2. Classification des épithélia

La classification des épithélia dépend de trois paramètres :

- La forme ;
- Le nombre de couches dans l'épithélium ;
- La spécialisation de la surface (**Wright *et al.* 84**).

Les épithélia peuvent être simples (une couche unique de cellules disposées sur la MB), pseudo-stratifiés (les cellules s'empilent mais chaque cellule reste en contact avec la MB) ou stratifiés (les cellules s'empilent et une seule couche de cellule reste en contact avec la MB) (**Davies *et al.* 97**). Comme le montre la **Fig. 1** ces différents types d'épithélia possèdent des sous-catégories.

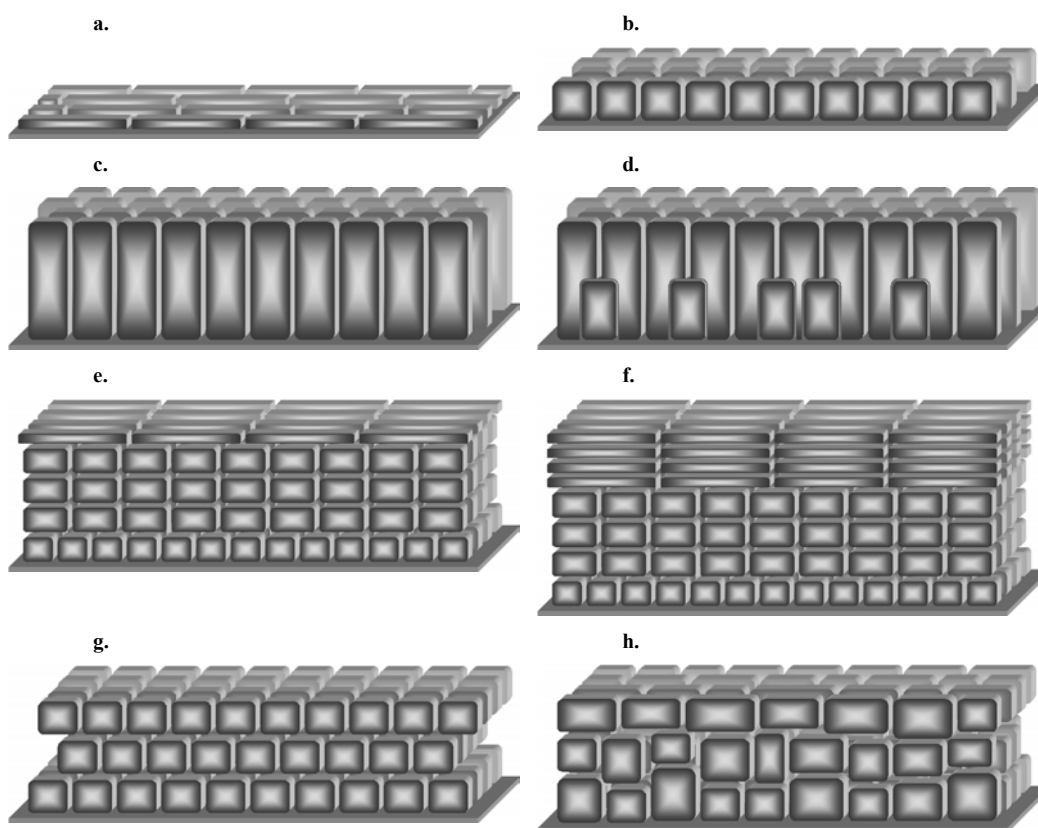


Fig. 1. Structure des différents types d'épithélia stratifiés : Simples : a. Squameux (alvéoles pulmonaires, glomérules rénaux, ...), b. Cuboïdes (système tubulaire rénal, acini thyroïdiens, ...), c. Colonnaire (vili du petit intestin, épithélium cilié des trompes de Fallope) ; d. De transition (conduit urinaire, foie, urètre, ...) ; Pseudo-stratifiés : e. Colonnaux (trachée, bronches larges, pharynx, canal endocervical, ...) ; Stratifiés : f. Squameux (cornée, bouche, œsophage, vagin), g. Squameux kératinisés (épiderme), h. Cuboïdes et colonnaires (respectivement : conduits des glandes sudoripares et pharynx ou larynx).

III. Structure et fonction des épithélia stratifiés

1. Introduction

Dans ce mémoire, nous nous intéresserons particulièrement aux épithélia squameux kératinisés de l'épiderme (**Fig. 2a**) et aux épithélia stratifiés squameux de la cornée (**Fig. 2b**).

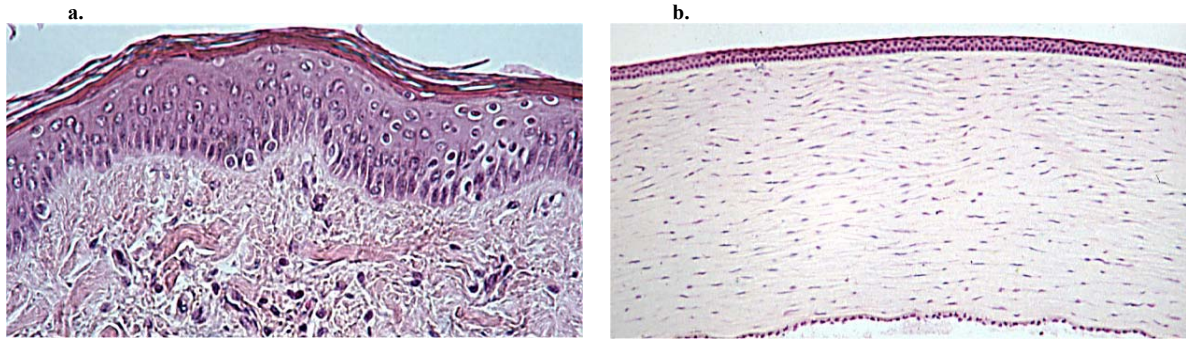


Fig. 2. Coupes histologiques d'épithélia stratifiés : a. Epiderme et b. Cornée. L'échelle n'est pas la même pour les deux images.

Ces tissus sont formés majoritairement de kératinocytes disposés en couches superposées en nombre variable, une membrane basale (MB) les séparent du tissu sous-jacent, seule la couche basale est au contact de la MB. Bien que tous les épithélia expriment des kératines seuls les épithélia dits squameux kératinisés présentent des couches cornées d'épaisseur variable (**Fig. 3**). Cette particularité est particulièrement marquée là où le tissu fait face à des contraintes importantes (paume, plante des pieds ...).

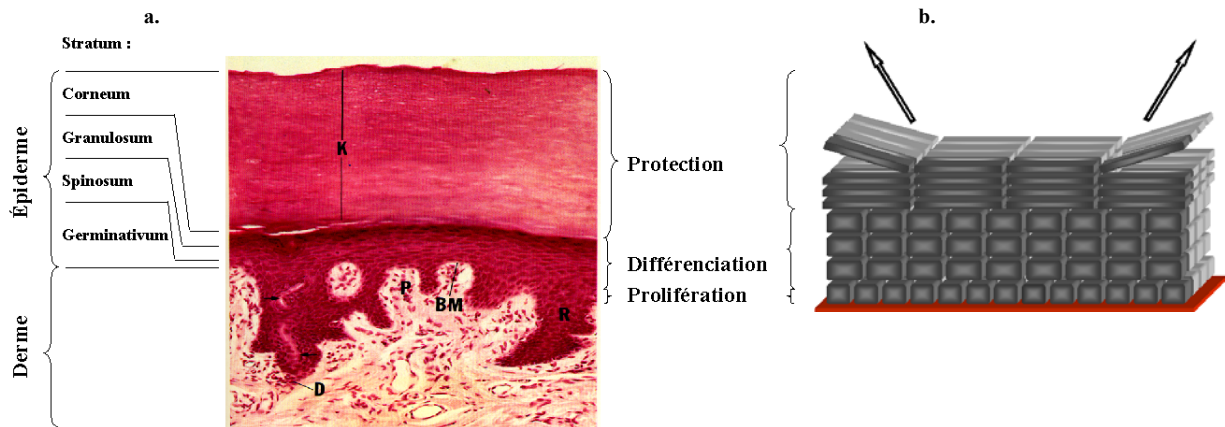


Fig. 3. Caractéristiques principales d'un épithélium stratifié. a. Photographie (d'après Gartner *et al.* 92) et b. Vue schématique (d'après Jones 97)¹. BM : membrane basale, D : canal sudoripare, K : couches de cornéocytes, P : papille dermique et R : crête épidermique.

2. Epithélium stratifié squameux kératinisé : l'épiderme

a. Lignées cellulaires

Différents lignages cellulaires sont présents dans les épithélia :

- **Kératinocytes** : ils constituent la plus grande partie du pool de cellules épithéliales, soit environ 99% des cellules. Ce sont les cellules typiques des épithélia, ils prolifèrent puis se différencient en adoptant un comportement caractéristique de leur épithélium. Les kératinocytes dérivent de l'ectoderme embryonnaire (**Wright *et al.* 84**).
- **Mélanocytes pigmentés** (dendritiques, pas d'attachement desmosomaux², mélanosomes) : ils constituent une population qui se renouvelle lentement sous stimulus ad hoc. Dans la peau, par exemple, les mélanocytes pigmentés matures produisent de la mélanine après exposition aux rayons UV. Cette

¹ Au fil du document, nous utiliserons cette représentation schématique de ce type de tissu comme support didactique.

² Complexes protéiques membranaires permettant aux cellules d'adhérer les unes aux autres, voir ci-après.

mélanine est transférée aux kératinocytes voisins par l'intermédiaire d'organelles appelées mélanosomes (Goding *et al.* 97), à l'origine de variations de la pigmentation épidermique.

- Cellules de Langerhans (noyaux indentés, cytoplasme clair, pas de contact desmosomaux) : Leur fonction n'est pas très bien définie. Elles pourraient avoir un rôle dans le contrôle de la kératinisation et dans le contrôle et le maintien de la production de cellules dans l'épiderme. Elles sont dérivées de macrophages ou d'autres cellules mésenchymateuses. Elles sont présentes à 17-20% dans la couche basale, le reste dans les couches supra-basales. Elles seraient originaires de la moelle osseuse et peuvent proliférer *in situ* (Wright *et al.* 84).

- Cellules de Merkel (associées aux disques tactiles adjacents aux poils, noyaux irréguliers, important granules cytoplasmiques) : Elles sont associées à des terminaisons neurales et contiennent des catécholamines. Elles pourraient être des récepteurs sensoriels, des transducteurs ou des mécanorécepteurs. Elles pourraient provenir de kératinocytes (Wright *et al.* 84).

b. Origine embryonnaire de l'épiderme

Les cellules des épithélia peuvent dériver de n'importe laquelle des 3 couches embryonnaires germinatives : endoderme, mésoderme et ectoderme mais les kératinocytes proviennent de l'ectoderme. La structure du tissu épidermique est loin d'être constante au cours de sa formation et huit étapes sont distinguées dans ce processus (Fig. 4).

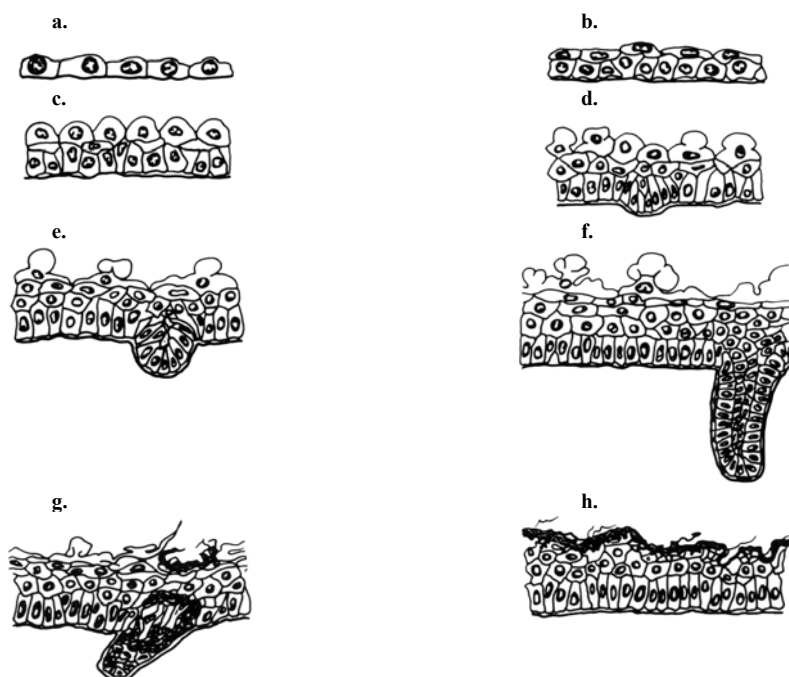


Fig. 4. Etapes de développement de l'épiderme humain (tirés de Wright *et al.* 84). a. <36 jours : épithélium indifférencié, b. 35 à 55 jours : développement d'une surface plate, c. 55 à 75 jours : formation d'une surface élevée, d. 65 à 95 jours : formation de bulbes, e. 96 à 110 jours : formation de bulbes simples, f. 95 à 120 jours : formation de bulbes plus complexes, g. 110 à 160 jours : régression du périoderme, h. à partir du 160^{ème} jour : cornéification.

Deux aspects intéressants de la croissance embryonnaire des épithélia résident dans la localisation des cellules capables de se diviser et dans la direction de l'axe mitotique au cours du processus ontogénique. Dans les premières étapes de la formation du tissu, la prolifération cellulaire est retrouvée dans toutes les couches de cellules. Cependant les axes mitotiques ne sont pas orientés de la même façon. Les cellules de la couche basale se divisent verticalement alors que celles des couches suprabasales se divisent majoritairement horizontalement.

Plus le tissu prend forme et plus les cellules en cours de division cellulaire sont les cellules basales. Au stade postnatal, les cellules basales sont les seules à se diviser et l'axe de leur division est horizontal.

Ceci est très cohérent puisque, dans un tissu adulte, le mécanisme de renouvellement du tissu prend le pas sur celui de la croissance. Lors de la croissance embryonnaire, la couche basale serait donc responsable de la stratification alors que les couches suprabasales seraient responsables de la croissance latérale du tissu (**Wright et al. 84**).

c. Morphologie : illustration de la relation structure/fonction

Un aperçu de la structure du tissu épithélial stratifié (**Fig. 5. a, b**) souligne la relation entre structure et fonction dans ce tissu. Certains aspects de la morphologie des épithélia varient suivant la fonction du tissu. Par exemple, l'épaisseur de la couche cornée des épithélia inter folliculaires dans les endroits où la fonction de protection du tissu est primordiale (la paume des mains, la plante des pieds). Une organisation plus ou moins marquée des couches suprabasales en colonnes parallèles (**Mackenzie 75**) est présente dans des tissus dont la fonction nécessite une surface extrêmement lisse (oreille). La présence de follicule pileux permet quant à elle au tissu d'assurer des fonctions sensorielles et thermorégulatrices différentes. Dans ce dernier cas l'allure générale du tissu est très différente (**Fig. 5. c**).

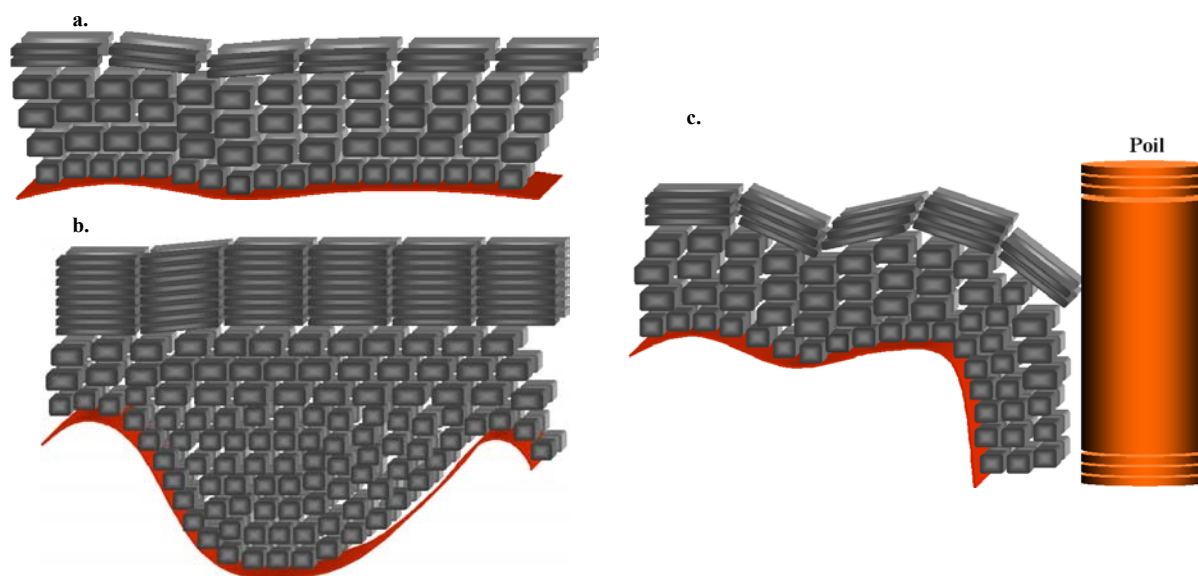


Fig. 5. Structure de l'épiderme. a. Inter folliculaire fin (oreille, dos), b. interfolliculaire épais (paume de la main) et c. folliculaire.

C'est l'ensemble des mécanismes moléculaires assurant l'adhérence des cellules entre elles, des cellules avec la matrice extracellulaire (MEC) et des cellules avec la membrane basale (MB) de l'épiderme qui donne au tissu la cohésion de sa structure stratifiée et donc sa fonction de protection.

i. Membrane basale

Composant principal de la jonction épiderme-derme (JED) qui comprend aussi, au-dessus de la MB, les membranes cellulaires de la face basale des kératinocytes contenant les hémidesmosomes dans lesquels s'insèrent les cytotkératines. La MB contient deux feuillets distincts en microscopie électronique : un feuillet appelé la *lamina lucida* (claire aux électrons) et la *lamina densa* (dense aux électrons) (**Timpl 89** et **Sarret 95**). Ces deux feuillets sont respectivement composés d'un réseau de laminines et d'un réseau de collagène IV. Ces

deux réseaux sont indépendants mais connectés par des protéines de nidogène, entre autres, qui stabilisent l'ensemble de la structure (**Timpl 96**).

Certains considèrent la *lamina sub-basale* contenant les fibrilles d'ancrages comme un 4^{ème} élément de la JED (**Burgeson et al. 97**) alors que d'autres l'incluent dans la *lamina densa* (**Sarret 95**).

- Lamina lucida

La *lamina lucida* (LL) est épaisse de 30 à 40 nm (**Sarret 95**) et produite par les cellules épithéliales (**Alberts et al. 94**). La LL est une structure dynamique majoritairement composée de laminines 1 et 5 dont le rôle serait d'assurer une interface « sur-mesure » avec les cellules épithéliales (**Timpl 96**).

La laminine 1 est synthétisée dans la peau par les kératinocytes et les fibroblastes dermiques. Elle est capable de se lier aux intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 6\beta 1$ (**Staquet et al. 90** et **Lee et al. 92**). Elle possède aussi des sites de liaison pour la fibronectine, le collagène IV et d'autres molécules de laminines (**Schittny et al. 90**). La laminine peut ainsi former un réseau moléculaire indépendant des réseaux de collagène IV. Des liaisons peuvent cependant exister entre ces différents types de réseaux (**Sarret 95**). La laminine 5 possède des sites de liaison à l'intégrine $\alpha 3\beta 1$, propriété qui permet la migration kératinocytaire (**Nguyen et al. 00**). Seul les kératinocytes synthétisent et sécrètent cette glycoprotéine (**Sarret 95**). De plus, il existe 11 isoformes connus de la laminine qui seraient présente en différentes proportions dans la membrane basale.

- Lamina densa

La *lamina densa* (LD) est une couche réticulée plus fibreuse épaisse de 50 à 80 nm produite par les fibroblastes et les kératinocytes de l'épithélium (**Alberts et al. 94** et **Sarret 95**). La LD est majoritairement composée de collagène IV (**Sarret 95** et **Timpl 96**).

Le collagène IV est la charpente de la LD et est synthétisé par les kératinocytes et les fibroblastes dermiques. Il est formé de protomères (500 kD et 400 nm de long) de 3 chaînes polypeptidiques α : $[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV)$. Les chaînes α sont composées de 3 domaines : une extrémité N-terminale (région 7S), un domaine central en hélice et un domaine C-terminal globulaire (domaine NC1). Des tétramères sont formés de quatre protomères assemblés par leur extrémité 7S. Ces tétramères s'associent par leur domaine NC1 pour former un réseau macromoléculaire stabilisé par des ponts disulfures et des ponts lysyls. C'est ce réseau qui donne son opacité à la LD en microscopie électronique (**Sarret 95**).

Le collagène IV intervient dans l'attachement et la migration cellulaires liant les laminines, et d'autres composants des LL et LD.

- Autres composants

La MB est composée de nombreuses autres molécules qui contribuent à la formation des réseaux macromoléculaires. Parmi celles-ci citons :

- L'entactine nidogène, présente à la fois dans la LL et la LD, dont le rôle principal est de servir de liaison entre le collagène IV et la laminine ;
- Le collagène VII, composant principal des fibrilles d'ancrages, des agencements macromoléculaires impliqués dans la cohésion entre la MB et le tissu conjonctif sous-jacent (**Aumailley et al. 93**) dont l'expression est augmentée par l'action du facteur de différenciation TGF β (**Konig et al. 92**) ;
- Les protéoglycanes, dont la plus connue est l'héparane-sulfate protéoglycane (perlécane), présents dans la LD mais aussi à la surface de certaines cellules impliquées dans la filtration des ions, servent de réservoir aux facteurs de croissance et sont aussi impliqués dans l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire ;

- La thrombospondine synthétisée par les kératinocytes en culture et qui peut se lier à l'intégrine $\alpha v \beta 3$. Elle pourrait être impliquée dans le contrôle de l'adhésion, l'étalement cellulaire et la chimiotaxie ;
- Les fibronectines, bien qu'elles ne soient pas du tout spécifiques de la MB (présentes sous forme soluble dans les fluides biologiques, e. g. plasma), sont fabriquées par les kératinocytes et déposées dans la matrice extracellulaire, notamment la MB. Ces glycoprotéines peuvent interagir avec des protéines présentes dans la MB comme le collagène et avec des intégrines cellulaires ($\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$ et $\alpha v \beta 5$) et participer de l'adhésion, la migration cellulaire et l'organisation tridimensionnelle de la MB ;

- Conclusion

La MB est une matrice extracellulaire hautement spécialisée à la structure très dynamique dont les composants participent aux interactions avec les cellules épithéliales supra-basales et contrôlent les échanges entre le tissu fibroblastique sous-jacent et l'épithélium (**Fig. 6**).

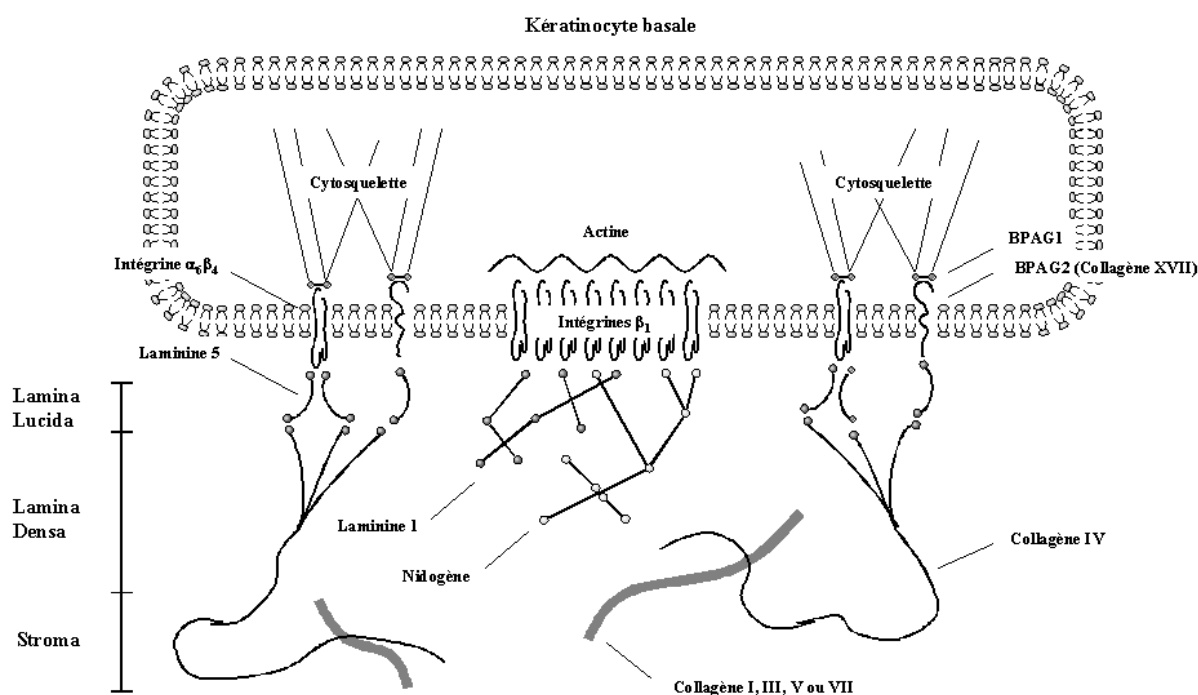


Fig. 6. Structure de la MB (modifié d'après Burgeson *et al.* 97 et Aumailley *et al.* 93).

La synthèse d'une grande partie des protéines de la MB par les kératinocytes illustre leur capacité à modifier cette structure afin de l'adapter à leurs besoins. Modifier la MB peut permettre aux kératinocytes de communiquer entre eux en la marquant localement, d'améliorer ses propriétés d'adhérence ou de la rendre plus ou moins perméable aux signaux provenant du tissu conjonctif sous-jacent. Par ailleurs, une incapacité à organiser une MB normale est observée dans certaines pathologies des épithélia, stratifiés ou non (**Boudreau *et al.* 98, Murgia *et al.* 98**).

ii. Matrice extracellulaire

Dans les épithélia, la matrice extracellulaire (MEC) au sens propre, c'est à dire l'ensemble des molécules situées entre les cellules, est une structure difficile à étudier *in vivo* et la plus grande circonspection est de mise vis à vis des modèles de MEC artificielle *in vitro*. On sait cependant qu'elle existe sous la forme d'un fin réseau parcellaire situé entre les cellules du tissu et que ce sont les kératinocytes eux-mêmes qui produisent cette matrice (**Streuli 99**). Il est probable que la MEC possède de nombreuses molécules communes avec la MB mais

que la variation de sa composition dans le temps permet aux cellules de gérer dynamiquement cette interface extrêmement sensible avec leur cellules voisines (**Boudreau et al. 98**).

iii. Couche basale (*stratum basale* ou *germinativum*)

Depuis 1969, il est acquis que c'est principalement dans la couche basale que les kératinocytes se divisent puis commencent le processus de différenciation qu'ils poursuivront dans les couches supérieures pour finalement être éliminés du tissu par desquamation (**Olson et al. 69**). C'est la couche où réside la plus grande variété des comportements cellulaires : contrôle de la prolifération, de la différenciation, mobilité latérale, migration de la couche basale vers les couches suprabasales et de nombreuses molécules et complexes moléculaires sont impliqués (**Potten et al. 88**). Comme nous le verrons par la suite, c'est la complexité de ces mécanismes cellulaires qui rend difficile la compréhension de l'homéostasie.

iv. Couche spinale (*stratum spinosum* ou couche Malpighienne)

Après avoir quitté la couche basale, les cellules passent dans la couche spinale. La maturation des cellules différenciées est identifiable dans cette couche lorsque les cellules se mettent à fabriquer des kératines K1 et K10 en grande quantité et cessent d'exprimer les kératines K5 et K14 et les intégrines (**Tennenbaum et al. 96**).

Dans certains épidermes, la division cellulaire est encore présente dans les couches supra-basales à un taux faible.

v. Couche granuleuse (*stratum granulosum*)

La couche granuleuse est la zone transitionnelle entre les kératinocytes viables des couches inférieures et les kératinocytes anucléés des couches supérieures. Les cellules granulaires contiennent des granules basophiles de kératohyaline (des organelles qui ont subis une destruction enzymatique partielle). C'est à ce niveau que débute l'apoptose au cours de laquelle les noyaux sont réabsorbés et perdus. C'est une forme particulière d'apoptose qui se poursuivra alors que les cellules migrent toujours vers les couches supérieures en se remplissant de filaments de kératines (**Claudy 95**).

vi. Couche cornée (*stratum corneum*)

Les kératinocytes en phase terminale de différenciation sont appelés cornéocytes. Ils constituent la *stratum corneum*. Cette couche cornée, est divisée en deux couches :

- Stratum compactum : couche adhérentes ;
- Stratum disjunctum : couche desquamante superficielle dont l'épaisseur varie de 20 couches dans la peau de l'avant bras interne jusqu'à 1000 couches dans la plante du pied (**Wright et al. 84**).

La cornéification est un processus contrôlé qui inclut 3 étapes simultanées (**Claudy 95**) :

- L'apoptose kératinocytaire : fragmentation de l'ADN, lyse des organelles intracytoplasmiques (lysosomes, mitochondries, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique ...) ;
- Synthèse de l'enveloppe cornée ;
- Scellage lipidique (liaison des acides gras et des céramides) ;
- Action des transglutaminases.
- Remplissage du cytoplasme par des complexes kératine-fillagrine.

La compartimentalisation hydrophobe (membranes de protéo-céramide) et hydrophile (complexes kératine-fillagrine intra-cellulaire) des kératinocytes de la *stratum corneum* est particulièrement importante pour assurer la fonction de protection.

Après kératinisation complète et migration vers l'extérieur, les cellules sont éliminées de la surface de l'épithélium par desquamation. Ce processus résulte de deux mécanismes simultanés :

- Déstructuration des membranes lipido-protéiques cornéocytaires par des lipases et des sphingomyélinases ;
- Dégradation enzymatique des cornéodesmosomes par l'action progressive de plusieurs protéases (**Claudy 95**).

d. Organisation des empilements épidermiques supra-basaux

L'avènement de nouvelles techniques expérimentales (fixation, déshydratation, microscopie) appliquées à l'étude de la structure des épidermes a permis, dès la fin des années 60, la découverte d'empilement ordonné en colonnes des cellules des couches granuleuses et cornées dans certains épidermes (**Mackenzie 69**).

La régularité des empilements varie selon les tissus en fonction de la localisation, de l'espèce et de l'âge (**Mackenzie et al. 81, Wright et al. 84**). L'empilement des cellules en colonnes est plus facilement distingué dans la couche cornée des épithélia de primates ou de rongeurs dans les régions de l'abdomen, du scalpe, du thorax ou du bras (**Fig. 7a**).

Par contre, ces colonnes n'ont jamais été observées dans les épithélia palmaires et plantaires. D'autres épithélia possèdent une organisation en colonnes très ordonnées comme les parties fines de la peau de rongeur, e.g. la peau de l'oreille du hamster (**Fig. 7b**).

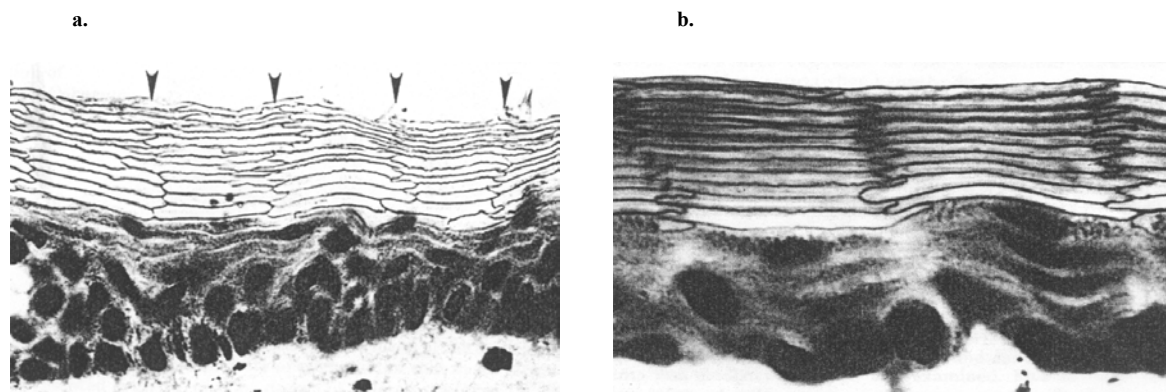


Fig. 7. Exemples d'organisation de l'empilement des cellules en colonnes : a. dans l'épiderme d'abdomen humain et b. dans l'épiderme de l'intérieur de l'oreille de hamster (tirés de Mackenzie et al. 81). Les colonnes sont beaucoup plus difficiles à discerner dans le cas de l'épiderme humain.

Les épithélia des muqueuses ne présentent aucune organisation en colonne, c'est le cas dans les muqueuses orales ou vaginales. Cette caractéristique morphologique serait liée à la fonction de l'épiderme considéré et aux contraintes, notamment environnementales (pression, frottements), associées à celle-ci.

Il semblerait qu'il existe un lien entre l'organisation de la prolifération cellulaire dans la couche basale et l'organisation de l'ultrastructure des empilements dans les couches suprabasales.

e. Cohésion du tissu

La cohésion d'un tissu épithélial est primordiale puisque sa fonction de protection est entièrement dépendante de sa résistance (pression, tension, abrasion), de sa tolérance à la déshydratation ou aux variations de température et de sa souplesse.

Même si de très nombreuses protéines sont impliquées dans l'adhérence cellulaire, trois complexes multiprotéiques contrôlant l'adhérence des cellules entre elles et des cellules à la MB sont principalement

responsables de la cohésion des épithélia. Il s'agit, respectivement, des adhésions focales, situées à la périphérie des cellules de la couche basale formant un anneau proche de la base des cellules, des desmosomes, présents sur la surface de tous les kératinocytes et des hémidesmosomes, trouvés uniquement sur la face basale des kératinocytes de la couche basale (**Alberts et al. 94, Borradori et al. 96, Garrod et al. 96, Jensen et al. 99 et Simon et al. 95**). Les composants extracellulaires principaux des adhésions focales sont les intégrines possédant une sous-unité $\beta 1$; ceux des desmosomes sont la desmocolline et la desmoglérine, qui sont des protéines de la famille des cadhérines (**Haftik 95**) et ceux des hémidesmosomes sont les intégrines $\alpha 6\beta 4$ (**Borradori et al. 96**).

i. Adhésion focales

Les intégrines sont des molécules membranaires hétérodimères consistant en 2 sous-unités α (16 connues) et β (8 connues), chacune étant une glycoprotéine transmembranaire (**Giancotti 97 et Hynes 87**). Ces molécules servent d'ancres permettant aux cellules de s'arrimer à un substrat mais, étant associées à d'autres protéines sous-membranaires, elles servent aussi de relais dynamique entre le substrat et le cytosquelette de la cellule.

On classe généralement les intégrines par sous-groupes correspondants à leur sous-unité β . Les kératinocytes expriment plusieurs types d'intégrines dont les intégrines $\alpha 2\beta 1$, un récepteur du collagène, les intégrines $\alpha 3\beta 1$, un récepteur de la laminine et les intégrines $\alpha 6\beta 4$, un composant des hémidesmosomes (**Adams et al. 91 et Borradori et al. 96**). Ces protéines donnent à la cellule la capacité de réguler « à volonté » son adhérence au substrat en alternant entre un mode d'**affinité** au substrat et un mode d'**avidité** au substrat, mode résultant de l'agrégation des intégrines. La transition entre ces deux états est régulée à la fois par des mécanismes biochimiques à l'intérieur de la cellule et par le ligand extracellulaire (type, disponibilité, localisation, etc.). Les intégrines $\beta 1$ possèdent la capacité de former des adhésions focales, aussi appelées foyers d'adhésion, dès lors qu'un ligand est disponible à l'extérieur de la cellule (**Fig. 8**).

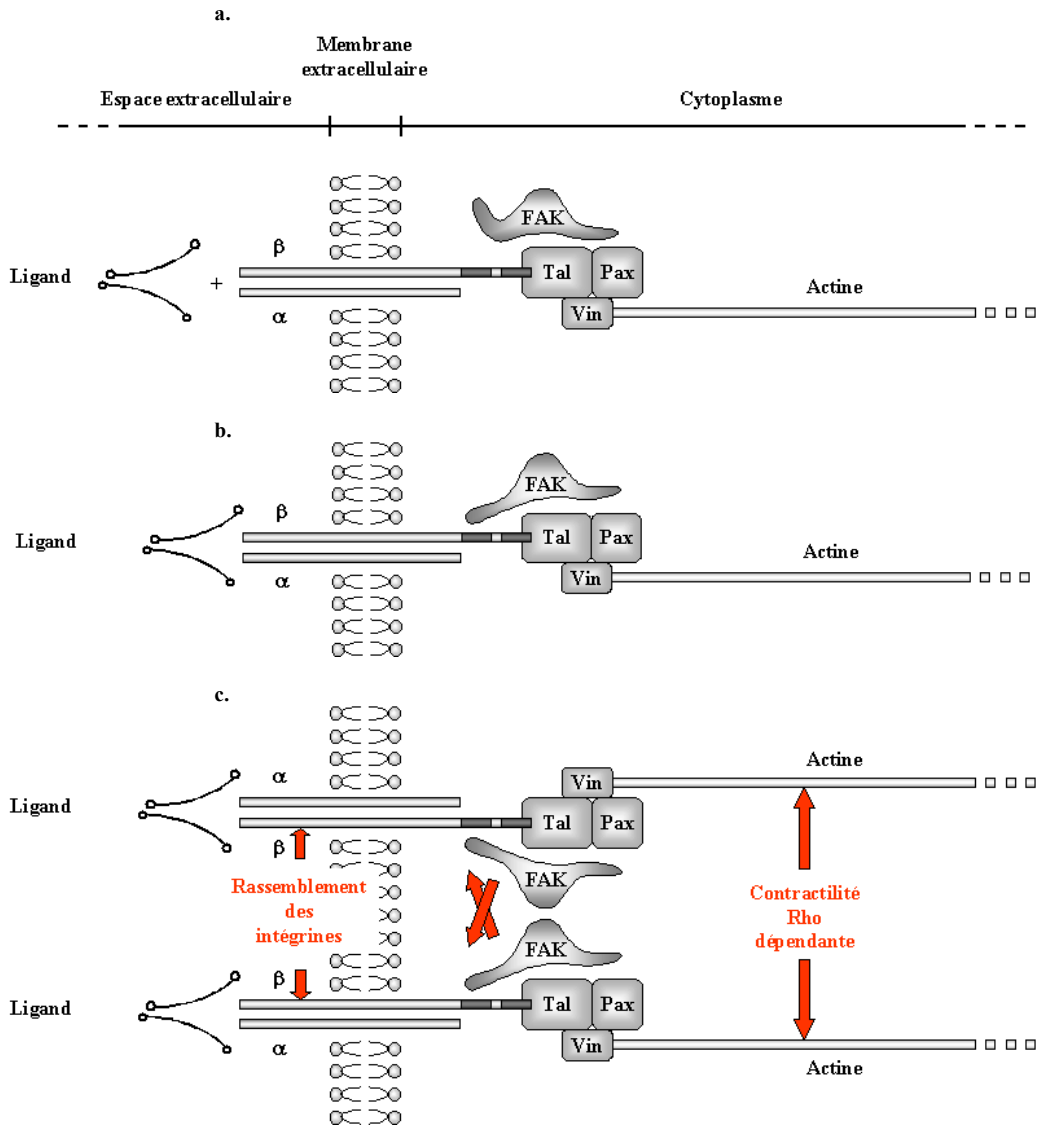


Fig. 8. Assemblage d'une adhésion focale (d'après Denhardt 99 et Giancotti 97) : a. Consécutivement à la liaison extracellulaire des intégrines à leur ligand (laminine 5 ou collagène IV), la partie cytoplasmique de la sous-unité $\beta 1$ recrute des protéines d' α -actinine et de taline (Tal), vinculine (Vin) et paxilline (Pax) et, par leur intermédiaire, lie un filament d'actine du cytosquelette (Giancotti 97). Le recrutement d'une FAK (Focal adhesion kinase) est réalisé par l'intermédiaire de la paxilline et de la taline ; b. Suite à un changement de conformation de la FAK lui permettant d'interagir avec la sous-unité $\beta 1$ les complexes molécules d'intégrines voisines forment des amas entraînant la formation de volumineux faisceaux de molécules d'actine parfois appelés « fibres de stress » qui semblent bourgeonner à partir des adhésions focales (c). La FAK possède ainsi une fonction mécanique dans le contrôle de l'adhésivité et de la contractilité de la cellule et une fonction biochimique de messenger dans les réseaux de transfert d'information intracellulaire (Giancotti 97).

Des études récentes ont montré qu'un défaut en intégrines de type $\beta 1$ induit des formations d'ampoules entre le derme et l'épiderme, des problèmes de pilosité accompagnés de défauts très importants dans l'assemblage et l'organisation de la MB (Huhtala *et al.* 95, Raghavan *et al.* 00) indiquant le rôle essentiel des intégrines $\beta 1$ dans le contrôle de la formation de la MEC et de la MB par les kératinocytes.

Dans les épithélia stratifiés comme la peau, les intégrines sont uniquement exprimées par les cellules de la couche basale (Jensen *et al.* 99). Sans avoir de certitude sur la causalité de cette relation, le début de la différenciation des kératinocytes correspond à la perte de l'expression des intégrines par les kératinocytes de la couche basale (Adams *et al.* 90). De plus, l'expression des intégrines de type $\beta 1$ par les cellules de la couche basale suit des patrons précis qui semblent corrélés à des patrons de la prolifération (Jones *et al.* 93).

ii. Desmosomes

Les kératinocytes de toutes les couches de l'épithélium sont attachés les uns aux autres par des desmosomes. Les desmosomes possèdent une structure différente de celle des hémidesmosomes car le composant principal n'est pas de la famille des intégrines (pas exprimées par les cellules supra-basales) mais de celle des cadhérines. Les cadhérines possèdent cinq domaines extra-cellulaires dont la structure est stabilisée par des ions Ca^{2+} . Les intégrines d'une même cellule sont associées les unes aux autres par des interactions *cis* et l'adhésion de cellule à cellule est due aux interactions *trans* entre cadhérines de cellules voisines (**Steinberg et al. 99**) au sein des structures macromoléculaires des desmosomes (**Fig. 9**). Des filaments de kératine se fixent sur la face intracellulaire des desmosomes permettant ainsi au réseau du cytosquelette des kératinocytes de prendre ancrage sur la surface des cellules à l'endroit même où celles-ci adhèrent à leur voisines. Cette structure donne à la fois des propriétés de souplesse, de résistance à la tension et à la compression qui donnent au tissu sa cohésion. Cette propriété, à laquelle participe aussi les hémidesmosomes, a été appelée la tensegrité (**Ingber 93**).

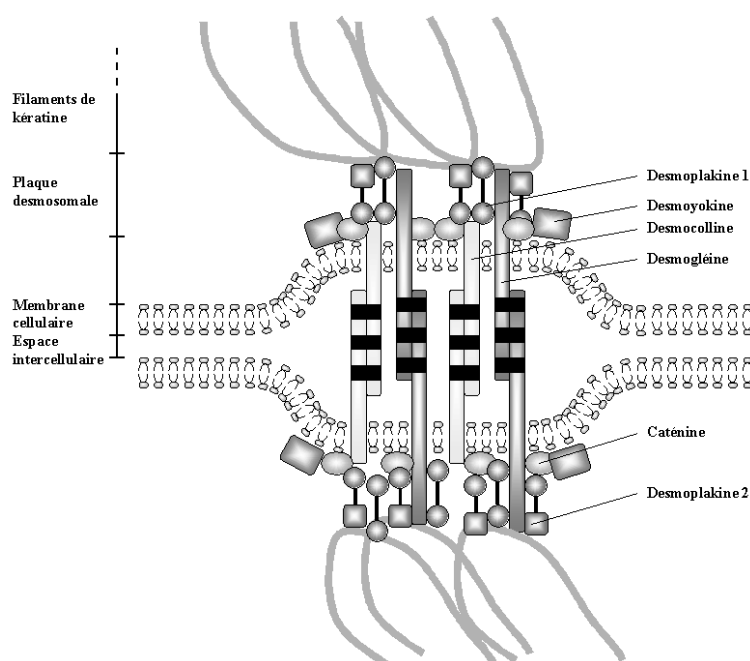


Fig. 9. Structure d'un desmosome (d'après Haftek 95).

La composition, répartition à la surface et le nombre des desmosomes changent suivant la position des cellules dans le tissu, i.e. le degré de différenciation atteint par les kératinocytes, alors que les cellules se différencient en cornéocytes au fil de leur migration vers la surface du tissu (**Garrod et al. 96, Haftek 95 et Simon et al. 95**). La desmogléine 2 (HDGC) et les desmocollines 3a et 3b sont confinées à la couche basale, la desmogléine 1 et les desmocollines 1a et 1b sont présentes seulement dans les couches suprabasales et la desmogléine 3 est exprimée uniquement dans la partie inférieure de l'épiderme suprabasale (**Fig. 10**).

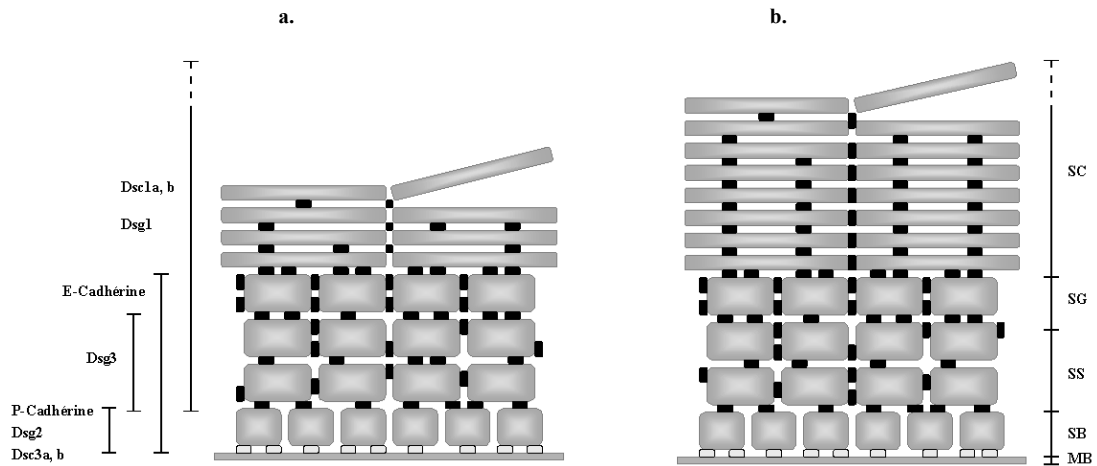


Fig. 10. Variation de la composition, de la répartition et du nombre des desmosomes suivant la position des kératinocytes ou des cornéocytes dans le tissu et de son épaisseur (d'après Haftek 95 p11 et Simon *et al.* 95). a. Epiderme non palmo-plantaire, b. Epiderme palmo-plantaire. Avec : SC-Stratum Corneum ; SG-Stratum Granulosum ; SS-Stratum Spinosum ; SB-Stratum Germinativum ; MB-Membrane Basale ; Dsc-Desmocolline ; Dsg-Desmogléine ; ■ - Desmosomes et □ - Hémidesmosomes.

iii. Hémidesmosomes

Les hémidesmosomes sont de petits complexes multiprotéiques de 0,1 à 0,5 μm de diamètre (Fig. 11). Ils régulent l'adhérence des kératinocytes à la MB et relient des éléments du cytosquelette des cellules à la matrice extracellulaire (Borradori *et al.* 96, Burgeson *et al.* 97 et Mainiero *et al.* 95). Les intégrines $\alpha_6\beta_4$ en sont les composants transmembranaires indispensables permettant l'adhérence des cellules à la MB.

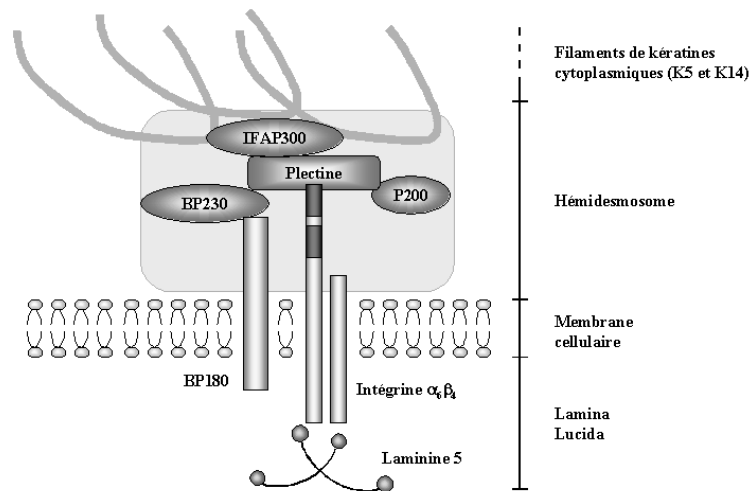


Fig. 11. Structure d'un hémidesmosome (d'après Borradori *et al.* 96 et Mainiero *et al.* 95).

Une déficience d'un ou plusieurs des composants des hémidesmosomes, notamment les intégrines $\alpha_6\beta_4$, entraîne des problèmes graves de cohésion entre le derme et l'épiderme comme l'épidermolyse bulleuse pyloric artesia (PA-JEB), une pathologie caractérisée par un décollement de l'épiderme (Borradori *et al.* 96 et Murgia *et al.* 98).

f. Cinétiques de renouvellement tissulaires

Les données cinétiques concernant le renouvellement des épithélia stratifiés sont remarquablement pauvres par comparaison aux données structurales. Le modèle expérimental le plus étudié reste la souris. Deux ouvrages datant du milieu des années 1980 (**Potten *et al.* 83** et **Wright *et al.* 84**) rassemblent presque l'essentiel des données disponibles (**Tab. 1**).

Tab. 1. Temps de renouvellement dans la couche basale des épithélia squameux de souris (d'après Wright *et al.* 84 p279). p est la proportion de mitoses dans la couche basale dont l'axe est dans le plan de la couche basale. Le ratio des divisions est le nombre de division

Epiderme	Temps de renouvellement (h)	p
Oreille	73	0.94
Ventral	105	0.89
Dorsal	109	0.95
Plantaire	59	0.73
Queue	120	0.65

Le comportement des cellules basales semble lié à l'épaisseur du tissu. Dans les épidermes très épais (plantaire), l'axe des mitoses se trouve moins dans le plan de la couche basale que dans les épidermes fins (oreille). Par contre, il n'y a pas de différence concernant le temps de renouvellement puisque à la fois l'épiderme le plus épais (plantaire) et le plus fin (oreille) se renouvellent le plus rapidement. Il n'est pas possible de tirer des conclusions de ce types de données. La partie intitulée « **Régulation de l'homéostasie d'un épithélium stratifié** » présente des informations plus précises montrant que les cinétiques de prolifération des cellules de la couche basale sont très hétérogènes et impliquent des réseaux de contrôle moléculaires complexes détaillés dans la partie intitulée « **Régulation moléculaire de la prolifération et de la différenciation cellulaire** ».

3. Epithélium stratifié squameux : la cornée

a. Introduction

L'épithélium cornéen est, avec l'épithélium conjonctival, un des deux épithélia malpighiens non kératinisés recouvrant la surface oculaire (**Hoang-Xuan *et al.* 98**). Il protège l'œil mais sa finesse et sa surface parfaitement lisse assure une transparence. Si l'épiderme est le modèle d'épithélium stratifié le plus étudié, la cornée arrive certainement en seconde position. Des travaux récents (**Lehrer *et al.* 98**) ont montré son intérêt dans l'étude de l'homéostasie tissulaire et c'est un modèle de plus en plus étudié en médecine pour son potentiel en matière de greffe (**Hoang-Xuan *et al.* 98**). Le cas de la cornée est considéré ici comme un contre exemple à l'épiderme qui reste notre modèle de travail.

b. Relations structure – fonction

Deux caractéristiques différencient principalement la cornée de l'épiderme. Tout d'abord il s'agit d'un épithélium stratifié très peu kératinisé et fin, de 10 cellules d'épaisseur dans la zone limbique à cinq cellules tout dans la zone centrale de la cornée (**Fig. 12a**). La distribution des cellules proliférantes est asymétrique (**Lauweryns *et al.* 93, Lehrer *et al.* 98**). En effet, il a été montré, comme pour l'épiderme, que seules les cellules basales prolifèrent mais que la plupart des divisions cellulaires sont observées dans la zone de transition entre le limbe et la cornée périphérique (**Fig. 12b**). Les cellules migrent alors vers le centre de la cornée et peuvent se détacher en cours de route pour se différencier et migrer vers la surface du tissu. Dans le cas de blessures de la cornée, une augmentation de la prolifération est aussi observée dans le limbe mais pas dans les autres régions du

tissu (Sandvig *et al.* 93, 94). Cette particularité a fait l'objet de nombreux travaux sur la cinétique de la prolifération des cellules de la cornée (Cotsarelis *et al.* 89, Lauweryns *et al.* 93, Lehrer *et al.* 98) mais il y'a beaucoup moins de données sur la maintenance de la cohésion que dans le cas de l'épiderme.

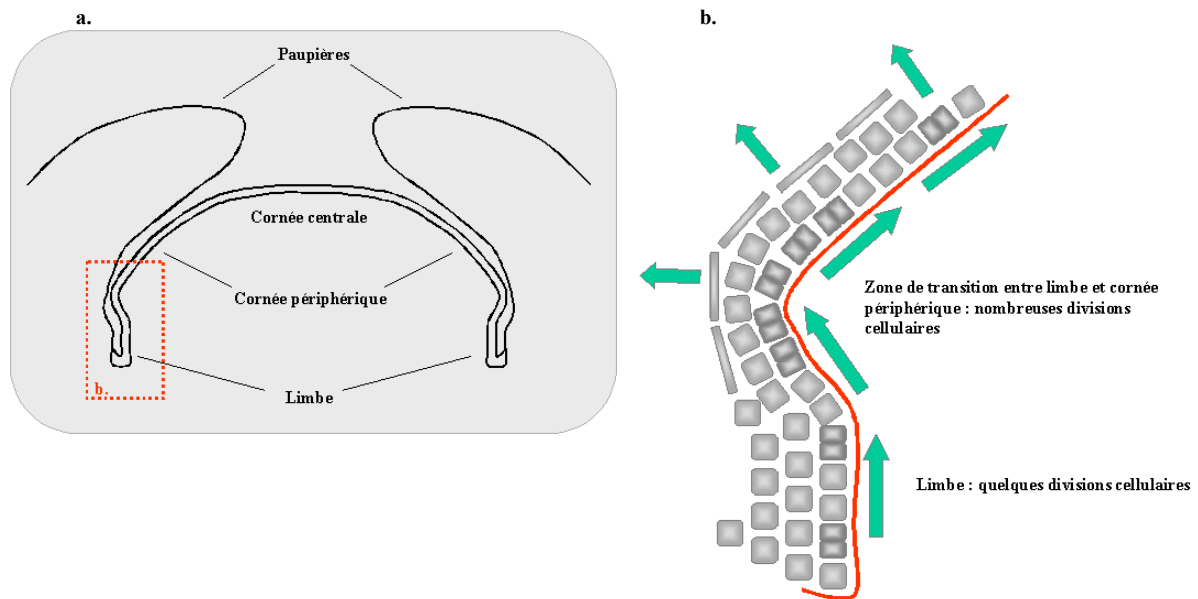


Fig. 12. a. Structure de la cornée et b. Double orientation de la prolifération dans la cornée (flèches vertes).

4. Conclusion

Connaître la structure des épithélia stratifiés, comme l'épiderme et la cornée, et les mécanismes qui assurent la cohésion physique de ces tissus ne suffit pas à comprendre comment est assuré le renouvellement de ces tissus. Les mécanismes moléculaires du contrôle de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes de la couche basale sont les acteurs principaux de l'homéostasie du tissu. Un rappel des connaissances actuelles sur la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaires est donc proposé dans le chapitre suivant.

IV. Régulation moléculaire de la prolifération et de la différenciation

1. Généralité sur le « Cycle » cellulaire

a. Rappel historique

Les premières observations de la division cellulaire datent d'un siècle et demi. Virchow proposa son célèbre postulat « *omni cellula e cellula* » (toute cellule naît de la fission d'une cellule préexistante) en 1826 précédant de peu la description des phases de la division cellulaire par mitose publiée de Shneider en 1875. Ce n'est qu'un siècle plus tard, entre 1950 et 1960, que l'étude de la division cellulaire sortit de sa léthargie³.

Le concept de « cycle » cellulaire découle des travaux de Howard et Pelc qui utilisèrent le ³²P pour marquer des racines de germes de *Vicia faba* et l'autoradiographie comme technique de révélation de l'incorporation de l'isotope (**Howard et al. 51**). Ils découvrirent que l'ADN était synthétisé durant une période limitée de la vie de la cellule, que l'intervalle entre la phase de synthèse de l'ADN était une phase de durée plutôt longue et que l'intervalle entre la phase de synthèse de l'ADN et la mitose était plutôt une phase courte. Ils démontrèrent ainsi que les processus de division de la cellule et de duplication des chromosomes étaient dissociés. Les bases du découpage actuel de la vie de la cellule en 4 phases furent ainsi posées : une phase G₁ (g pour gap) entre la naissance de la cellule par division de sa cellule mère et la phase de synthèse de l'ADN, la phase S (s pour synthèse), une phase G₂ entre la phase de synthèse et la phase de mitose puis la phase de mitose elle-même (**Howard et al. 51, 53**).

L'utilisation de la thymidine tritiée (³H-Tdr) permit d'étudier l'ADN cellulaire avec plus de précision puisque, contrairement au ³²P, il peut être localisé précisément dans la cellule, voir dans des compartiments cellulaires et c'est un précurseur spécifique de l'ADN (**Hughes et al. 58**).

C'est en 1962 que Cohen purifia, à partir de glandes salivaires de souris, un polypeptide entraînant l'éruption des incisives et l'ouverture prématurée des paupières chez la souris nouveau-née (**Cohen 62**). C'est ainsi que le premier facteur de croissance fut découvert et appelé Epidermal Growth Factor (EGF).

Ces principales découvertes servirent de bases aux recherches des années 1960. En utilisant les mêmes outils, la cinétique cellulaire fut abordée sous un angle descriptif. Les données obtenues concernaient la durée du « cycle » cellulaire, la durée des différentes phases, la quantification de la fraction en croissance dans des tissus normaux ou pathologiques. Les travaux de Lieberman *et al.* (**Lieberman et al. 63**), suggérant l'existence d'une série de réactions biochimiques contrôlant le cycle cellulaire, firent des émules et depuis le début des années 1970 les recherches se sont orientées vers la compréhension du contrôle moléculaire du cycle cellulaire.

Hartwell (**Hartwell 71**) montra que la progression du cycle cellulaire est régulée par l'expression de certains gènes. Cochran et collaborateurs (**Cochran et al. 83**) furent les premiers à identifier les produits de gènes dont l'expression était régulée par des facteurs de croissance.

Depuis le début des années 1980 et les progrès de la biologie moléculaire, les interactions biochimiques entre un nombre de plus en plus grand de molécules ont été détaillées. On connaît maintenant plus de 500 gènes dont l'expression est régulée par les facteurs de croissance (**Hofbauer et al. 91**) et, en exagérant à peine, nous pourrions avancer que chaque jour voit apparaître un nouveau gène impliqué dans la régulation du déroulement du cycle cellulaire. Il est très difficile d'associer une fonction à chacune des protéines découvertes actuellement et de la replacer dans son contexte et de nouveaux outils comme les puces à ADN permettent déjà de prévoir une augmentation encore plus importante des données disponibles. Certains mécanismes centraux du contrôle du

cycle cellulaire n'ont été élucidés que très récemment, comme le rôle de la protéine du rétinoblastome dans le contrôle de l'expression génique (**Chellappan *et al.* 91**) ou les principes moléculaires de la régulation des Cyclines Dependent Kinases (**Morgan 95**). C'est une partie de ces mécanismes moléculaires que nous allons détailler maintenant pour montrer la complexité de ce système et ainsi mettre en relief l'intérêt des approches fondées sur la modélisation.

b. Notion de « cycle cellulaire »

La fonction de base du cycle cellulaire est d'obtenir deux cellules par la division d'une seule. Durant le développement embryonnaire, la division cellulaire permet avant tout d'accroître le nombre de cellules et donc la masse de l'embryon puis d'obtenir des cellules qui se différencie pour finalement assurer une fonction particulière, spécifique de leur tissu d'appartenance. Dans l'organisme adulte, le rôle principal de la division cellulaire est de permettre le remplacement des cellules mortes (renouvellement) ou perdues par accident (régénération, cicatrisation) pour assurer un nombre de cellules fonctionnelles constant.

Regrouper l'ensemble de ces comportements sous le terme générique de « cycle » cellulaire est forcément réducteur. D'ailleurs, lorsque l'on entend pour la première fois parler de cycle cellulaire ne s'imagine-t-on pas un joli cercle bien rond tournant *ad vitam æternam* sur lui-même (**Fig. 13a**) ?

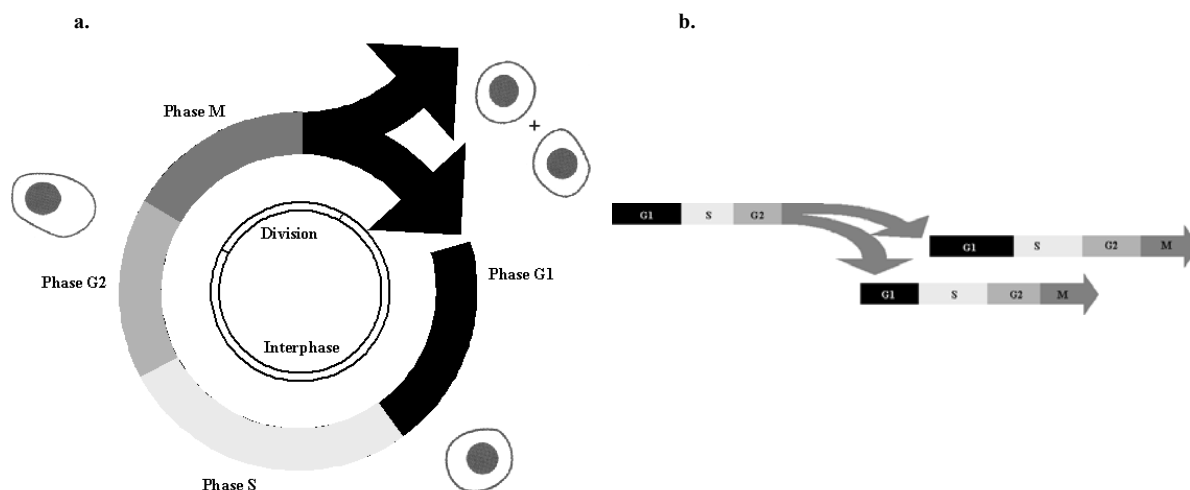


Fig. 13. Deux représentations du cycle cellulaire. a. Représentation circulaire conventionnelle b. Représentation propositionnelle en segments.

Cette représentation physique va fatalement de pair avec une conception réductrice de la réalité. Souvenons-nous que le terme « cycle cellulaire » (**Smith *et al.* 73, 82**), a été introduit pour résumer l'idée qu'une partie des mécanismes survenant lors de la vie d'une cellule, d'une division à l'autre se retrouve de façon périodique à chaque nouvelle génération (**Swann 57**). Cette partie inclus au moins la réplication des chromosomes et la division de la cellule (**Smith 82**) mais pour le reste, principalement à cause de l'état parcellaire de nos connaissances, c'est un raccourci malheureux, que de concevoir chaque génération cellulaire comme étant identique à la précédente.

Le bien fondé de cette discussion est évident lorsque l'on essaie de replacer la cellule dans son contexte tissulaire. Comme nous le verrons par la suite la durée du « cycle » cellulaire est très variable et dépend de la position de la cellule et de son environnement dans le tissu mais aussi de son histoire et de l'asymétrie éventuelle de certaines divisions).

³ Citation de Baserga dans **Stein *et al.* 99**

Dans divers tissus, la prolifération cellulaire est compartimentée (e. g. couche basale dans le cas des épithélia stratifiés) et certaines cellules semblent se diviser très lentement alors que d'autres se divisent rapidement et que d'autres encore cessent de se diviser pour se différencier (**Till et al. 61**, **Wright et al. 84**). Les découvertes concernant les télomères et les télomérases, enzymes chargées de les préserver, ont montré que la répétition des divisions cellulaires n'étaient pas sans effet sur les lignées cellulaires (**Blasko et al. 99** et **Brun et al. 97**). Ces résultats fournissent des arguments moléculaires à des théories plus anciennes sur le vieillissement des cellules comme la célèbre limite de Hayflick (**Hayflick 65**).

Citons comme autre exemple, les travaux de Holtzer et collaborateurs (**Holtzer et al. 84**) qui essayèrent de distinguer les divisions ayant pour but l'atteinte d'un nombre de cellules suffisant, en quelque sorte une masse tissulaire critique, et qualifiées de prolifératives, alors que les divisions au cours desquelles les cellules prennent une orientation particulière afin d'assurer une fonction particulière (même si cette fonction n'est assurée qu'après un nombre variable d'autres divisions prolifératives) sont qualifiées de quantiques.

Il devient donc de plus en plus évident que, même si les cellules possèdent toutes le même génotype pour une espèce donnée, les mécanismes de régulation de l'expression des gènes sont susceptibles de changer d'une division à l'autre, provoquant une dérive phénotypique.

Ainsi, à une représentation circulaire, on préférera une représentation en « segment » (**Fig. 13b**) où chaque segment est potentiellement différent des autres. Malgré tout, pour respecter une convention séculaire, nous utiliserons la notion de « cycle » cellulaire, sans guillemets, pour désigner la vie d'une cellule entre deux divisions successives en gardant ces considérations critiques à l'esprit.

c. Les 4 ½ phases du cycle cellulaire

Même si des modèles descriptifs différents ont été proposés (modèle à 12 phases de **Darzynkiewicz et al. 80** et modèle à 2 phases de **Smith 82**), le modèle commun du cycle cellulaire est celui d'un cycle en quatre phases (**Howard et al. 51**) :

- G_1 : pour gap 1 (jonction 1). La phase G_1 , de durée variable, est définie comme la première phase traversée par la cellule après la division cellulaire. Par définition *stricto sensu* elle succède à la division cellulaire et précède la phase S. La phase G_1 est une phase au cours de laquelle la cellule choisit de proliférer, d'attendre ou de se différencier. Deux facteurs jouent un rôle prépondérant sur le comportement de la cellule lors de cette phase : la croissance et l'environnement cellulaire. La croissance cellulaire est l'ensemble des mécanismes permettant à la cellule nouveau née de gagner « sa taille et son poids normal ». L'environnement de la cellule est primordial car c'est lui qui induira ou non, par la balance entre facteurs de croissance et facteurs de différenciation, la cellule à se diviser. La cellule n'est sensible à son environnement que jusqu'à un moment précis situé vers la fin de la phase G_1 . La perte de sensibilité aux facteurs environnementaux ainsi que l'irréversibilité de « l'induction » de la cellule dans la phase de synthèse de l'ADN définit le point de restriction (**Pardee, 74 et 86**). Un événement similaire existe chez la levure, c'est le point Start (**Woolard et al. 95**). L'identification des mécanismes moléculaires correspondant au point R est un sujet d'actualité.
- S : pour phase de synthèse. La phase S est la phase de synthèse de l'ADN. Sa durée, peu variable, est principalement dépendante de la quantité d'ADN à répliquer et du nombre de sites de répllication actifs en parallèle. Ainsi observe-t-on une durée de phase S plus longue dans le cas de cellules polyploïdes (possédant du matériel chromosomique en excès).
- G_2 : pour gap 2. Il s'agit d'une phase de sécurité au cours de laquelle la cellule a le temps de réparer d'éventuelles erreurs commises lors de la répllication de son ADN.

- M : pour mitose. C'est la phase durant laquelle la cellule réalise sa division en deux cellules filles. Elle regroupe la condensation de la chromatine en chromosomes (prophase), l'alignement des chromosomes sur les fuseaux mitotiques (prométaphase et métaphase) puis la migration des chromatides le long des microtubules (anaphase et télophase) précédant la division de la cellule (cytodièrese). Cette succession de quatre phases est caractéristique de tous les eucaryotes (**Fig. 14**).

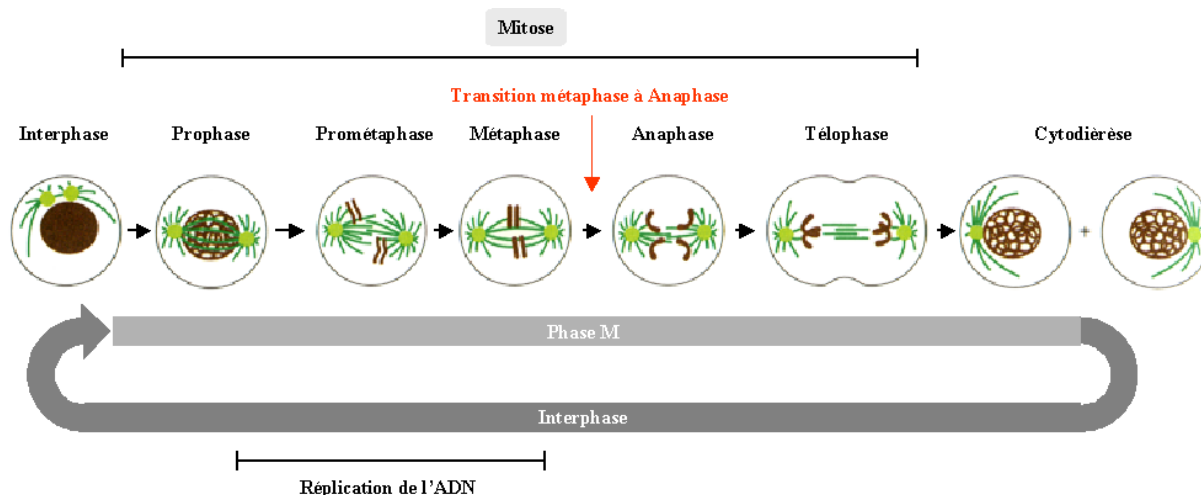


Fig. 14. Evénements de la mitose (modifié d'après Alberts *et al.* 94).

On désigne généralement par G_0 , la phase de quiescence survenant dans certaines conditions lors de la phase G_1 . La phase G_0 est observée *in vitro* lorsque les facteurs de croissance sont supprimés du milieu de culture mais son existence est toujours contestée, certains préférant parler de « cellules arrêtées après suppression de sérum avec un contenu en ADN de phase G_1 » (**Cooper 88**).

Plus rarement, une phase G_0 est observée en G_2 . Il s'agit de cas particuliers lorsque la phase G_2 est plus longue chez certains types cellulaires du système immunitaire comme les lymphocytes. Notons qu'il n'existe pas de marqueur précis de la phase G_0 même si la statine a été proposé à cet effet (**Porter-Jordan et al. 94**). En l'absence de marqueur il est difficile de replacer cette phase G_0 qui est principalement observée *in vitro* lors du retrait de facteurs de croissances du milieu de culture et a ainsi pu recevoir une grossière caractérisation moléculaire.

d. Cinétique du cycle cellulaire

Les durées du cycle cellulaire varient d'un type cellulaire à l'autre et d'une espèce à l'autre (**Tab. 2**) et dépendent aussi des conditions de mesure. Les cellules en cultures cyclent en général beaucoup plus vite que les cellules *in vivo*.

Tab. 2. Durées des phases du cycle cellulaire *in vitro* et *in vivo* de quelques types cellulaires différents (d'après Baserga 85 p18 et Wright *et al.* 84 p433). La phase M est généralement considérée comme possédant une durée fixe de 1 à 3 heures suivant les espèces.

Type cellulaire	Durée du cycle cellulaire (h)	Durée des phases du cycle cellulaire (h)		
		G ₁	S	G ₂ /M
<i>In vitro</i>				
Fibroblastes humains	18	6.5	7.5	4.0
HeLa S3	21	8.0	9.5	3.5
3T3	19	8.0	7.0	4.0
<i>In vivo</i>				
Homme				
Epithélium de Colon	25	9	14	2
Epithélium rectal	48	33	10	5
Epithélium stomacal	24	9	12	3
Cellules de la moelle osseuse	18	2	12	4
Carcinome des cellules basales	67	36	19	12
Carcinome épidermoïde	24	9	11	4
Souris				
Epithélium de Colon	19	9	8	2
Cellules des alvéoles pulmonaires	71	45	22	4

Nous verrons plus loin que les cinétiques de prolifération sont aussi très variables dans un même tissu pour une même espèce et qu'il peut être trompeur de faire des moyennes (écart type trop important). Toutefois il est généralement admis que les phases S, G₂ et M possèdent des durées fixes dans les cellules normales. Seule la durée de la phase G₁ est très variable (e.g. 6.5 h dans les fibroblastes humains *in vitro* et 33 h dans l'épithélium rectal humain *in vivo*, **Tab. 2**). Dans le cas de cellules cancéreuses, les cinétiques sont beaucoup plus variables et peuvent être proches de la normale (carcinome épidermoïde humain, Tab. n) ou très différentes (Carcinome des cellules basales avec une phase G₂/M très longue, **Tab. 2**).

2. Bases de la régulation moléculaire du cycle cellulaire

a. Introduction

La machine de contrôle du cycle cellulaire eucaryote est composée de complexes de protéines qui sont activés dans un ordre précis et qui déclenchent l'initialisation d'événements spécifiques, comme la réplication de l'ADN, la destruction de l'enveloppe nucléaire, la formation des fuseaux achromatiques et la ségrégation chromosomique (**Graña *et al.* 95**).

On trouve des boucles de contrôle en rétroaction positive et négative reliant des récepteurs de signaux de prolifération et des protéines impliquées dans l'adhérence (intégrines, cadhérines), la transmission en cascades de signaux basés sur l'action de kinases et de phosphatases cytoplasmiques, des protéines de la famille des protéines poches (*pocket proteins* : pRb, p107 et p130), des cyclines (D, E, A et B), des kinases dépendantes de cyclines (CDKs), des protéines inhibitrices de CDK (CKIs), des facteurs de transcription (e. g. famille des E2Fs), des facteurs de régulation de la traduction et finalement les gènes eux-mêmes (**Graña *et al.* 95** et **Sherr *et al.* 99**). Cette machinerie protéique est sujette à un contrôle précis qui assure que chaque événement est correctement rempli dans une séquence ordonnée (**Lavia *et al.* 99**).

Les complexes formés des protéines poches et des facteurs de transcription de la famille E2F sont responsables du contrôle direct de l'expression des gènes régulateurs ou structuraux nécessaires à la prolifération et/ou la différenciation et leur activité est régulée par les complexes cycline-kinase. Chaque complexe protéique est composé d'une protéine régulatrice (la cycline) et d'une protéine catalytique (CDK ou Cyclin dependent kinase). C'est principalement la formation, l'activation et la destruction de la cycline qui régule l'activité de ces complexes. Les cyclines sont spécifiques aux étapes du cycle cellulaire et requises pour la progression au travers de la phase S et de la mitose. Les complexes Cycline-CDK possèdent des inhibiteurs spécifiques dont l'action se situe avant ou après l'association des deux molécules. La description du fonctionnement de ces complexes a permis de mettre d'éclaircir la situation et de proposer une représentation des mécanismes anciennement connus par défaut comme les « points de contrôle » (*checkpoints*).

b. Acteurs moléculaires et régulation de leur activité

i. Cyclin dependent kinases (CDK)

Chez la levure, une seule CDK (*cdc2*) est responsable de l'initialisation de plusieurs phases et c'est son association avec des protéines différentes qui lui confère des fonctions différentes. Chez les eucaryotes supérieurs, il existe de nombreuses CDK qui sont impliquées dans le contrôle de processus cellulaires divers comme le passage du point de restriction, la réplication de l'ADN, la mitose, la migration des chromosomes, etc. Chaque CDK est capable de s'associer à une ou plusieurs cycline(s) pour former des complexes actifs lors de différentes phases du cycle cellulaire (**Fig. 15**).

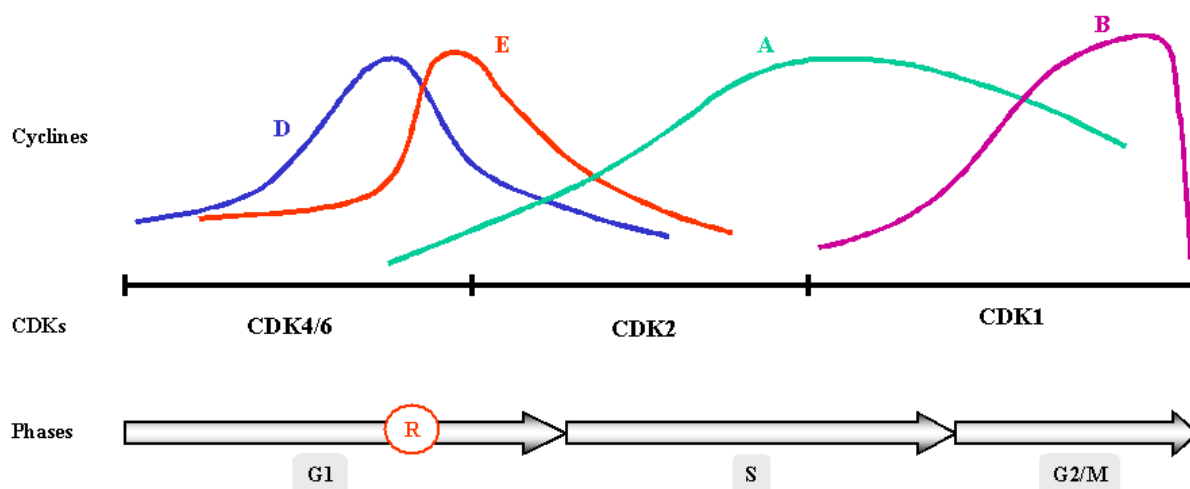


Fig. 15. Implication de différents complexes cycline-CDK lors de contrôles d'événements du cycle cellulaire (d'après Roberts 99).

Huit CDKs sont connues chez l'homme (de CDK1 à CDK8) mais seulement les CDKs 1, 2, 4 et 6 semblent jouer un rôle majeur dans le contrôle du cycle cellulaire (**Tab. n**). En moyenne les CDKs sont formées d'un corps catalytique de 300 acides aminés complètement inactif sous sa forme monomérique et hypophosphorylée (**Morgan 95**). On sait maintenant que c'est l'activité séquentielle des CDK, contrôlée positivement par leur association avec des cycline différentes, et négativement par leur association avec des inhibiteurs spécifiques nommés les CKI (*cyclin kinase inhibitor*), qui ordonne les événements requis pour la réplication de l'ADN et la mitose. Les complexes cycline D-CDK4/6 et cycline E-CDK2 sont présents de la phase G₁ à la phase S où ils contrôlent directement l'activité des facteurs de transcription nécessaires à la réplication de l'ADN en les libérant

de l'emprise des protéines poches, le complexe cycline A-CDK2 est impliqué dans le contrôle de la phase S et le complexe cycline B-CDK1 est impliqué dans le contrôle de la mitose (**Tab. 3**).

Tab. 3. Propriétés et fonctions des CDK et cyclines connues (d'après Puri *et al.* 99).

Protéine	Phase du cycle cellulaire	Fonction de la protéine	Régulation de l'activité
Cycline A	Progression de S jusqu'à M	Active CDK1 et CDK2	Transcriptionnelle et dégradation par la voie ubiquitine
Cycline B1	Progression vers M	Active CDK1	Transcriptionnelle et ubiquitine
Cycline B2	Progression vers M	?	Ubiquitine
Cycline C	G ₁ ?	Active CDK8	?
Cycline D1, D2 et D3	G ₁	Active CDK4 et CDK6	Transcriptionnelle et protéolyse
Cycline E	Transition G ₁ / S	Active CDK2	Transcriptionnelle et protéolyse
Cycline F	G ₂ ou transition G ₂ / M	Impliquée dans des processus d'ubiquitination	Transcriptionnelle
Cycline G	Ubiquitaire ?	Réparation de l'ADN ?	?
Cycline H	Ubiquitaire	Active CDK7	?
CDK1 (cdc2)	Progression vers M	Phosphoryle histone H1, lamines, etc.	Activée par cyclines A et B
CDK2	Progression G ₁ post point R / S et S	Association et phosphorylation de l'appareil de réplication de l'ADN Phosphoryle pRb	Activée par cyclines A et E
CDK3	G ₁ ou G ₁ post R / S	?	?
CDK4	G ₁	Phosphoryle pRb	Activée par cyclines D1, D2 et D3
CDK5	G ₀ ?	Phosphoryle tau et des protéines des neurofilaments	Activée par p35
CDK6	G ₁ (presque identique à CDK4)	Phosphoryle pRb	Activée par cyclines D1, D2 et D3
CDK7	Ubiquitaire	Active les autres CDK et phosphoryle la CTD de la RNA polymérase II	Activée par présence du substrat ?
CDK8	G ₁	Phosphoryle la CTD de la RNA polymérase II	Activée par cycline C

Lors de la phase G₁, il semblerait que l'hyperphosphorylation complète de pRb entraînant la libération de E2F survient après l'action séquentielle des complexes cycline D-CDK4/6 et cycline E-CDK2 (**Lundberg *et al.* 98**). Plus spécifiquement, la fonction du complexe cycline D-CDK4 semble être la destruction de l'association de pRb avec une histone désacétylase annulant ainsi la répression des gènes cycline A et CDK1 par le complexe pRb-E2F (**Magnaghi-Jaulin *et al.* 98, Zhang *et al.* 00**). Cette vision de l'interaction des complexes protéines poches-E2F et complexes kinases cycline dépendants est très récente.

Ce sont des études réalisées sur la CDK2 qui ont permis de comprendre les mécanismes de base de l'activation des CDK (**Morgan 96**). La CDK sous forme monomérique et hypophosphorylée est maintenue dans un état inactif par deux contraintes structurales : l'accès du site de liaison au substrat est bloqué par une boucle appelée la boucle T et l'orientation des sites de liaison à l'ATP est telle que les phosphates de la molécule d'ATP utilisée lors de la phosphorylation du substrat sont très mal positionnés pour un transfert efficace. L'activation de la CDK nécessite donc plusieurs étapes (**Fig. 16**). Tout d'abord le changement structural principal est réalisé lors de l'association de la kinase à une cycline (**Fig. 16a**). Cette association entraîne un retrait partiel de la boucle T qui permet aux ATP d'adopter une position intermédiaire. Le site actif est complètement libéré après la

phosphorylation de la CDK en Thr 160 (161 chez la CDK1, 172 chez la CDK4) par un complexe généralement nommé CAK (*CDK activating kinase*) (**Fig. 16b**). Ce complexe est formé lui aussi d'une cycline (H) et d'une CDK (7) (**Fisher et al. 95**). Même si une même CAK peut phosphoryler plusieurs complexes cycline-CDK *in vitro*, il existerait un complexe CAK pour chaque complexe cycline-CDK (**Morgan 95**). L'activation du complexe cycline-CDK par le complexe CAK peut être inhibé par la présence d'une CKI de type Cip/Kip (**Fig. 16c**).

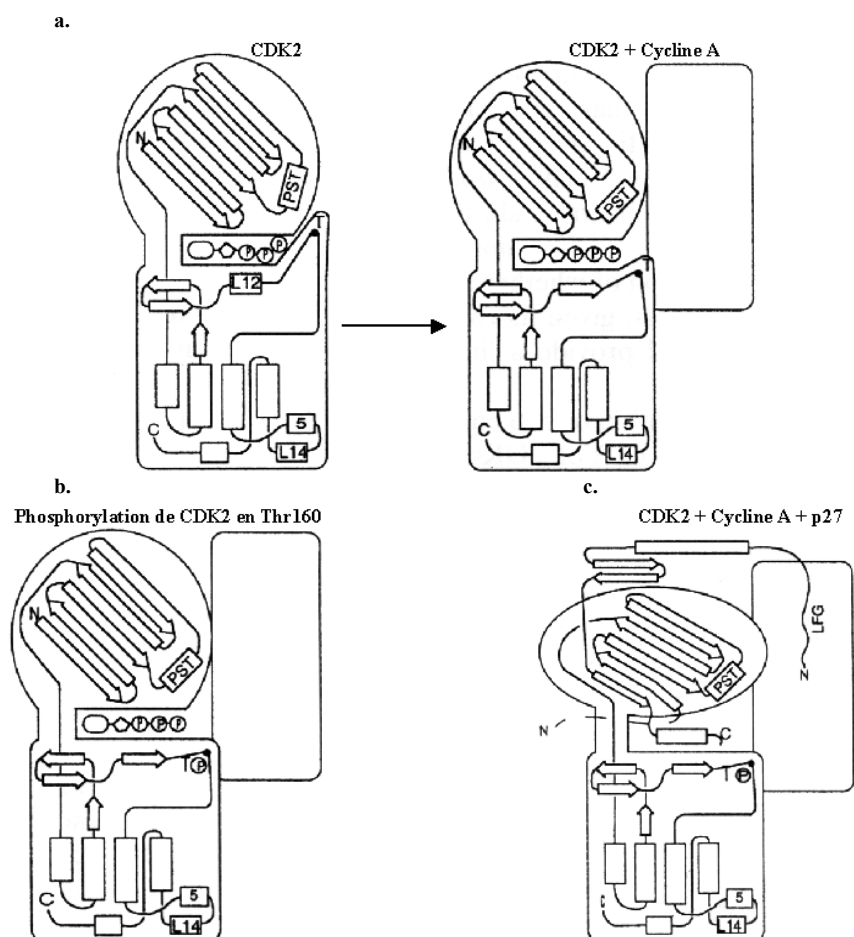


Fig. 16. Activation et inhibition d'une CDK par : a. Association avec une cycline, b. Action d'une kinase et c. association avec p27^{Cip1} (tirés de Puri 99).

De plus, dans certains cas, l'activité kinase des complexes cycline-CDK pourrait être régulée par l'action de phosphatases de type CDC25 (**Davezac et al. 00, Endicott et al. 99 et Sexl et al. 99**). Cette phosphatase déphosphorylerait la CDK à la fois en Thr 14 et Tyr 15. Le gène de la protéine CDC25A est activé en phase G₁ suite à une stimulation mitogénique (**Jinno et al. 94**). CDC25A est un facteur de régulation positif de la prolifération capable de diminuer la durée de la phase G₁ en agissant directement sur CDK2 (**Sexl et al. 99**). Mais les données sont contradictoires quant au mode d'action de cette phosphatase. Elle pourrait agir directement (**Davezac et al. 00**) ou indirectement (**Sexl et al. 99**) sur le complexe CDK2.

ii. Cyclines

Contrairement aux CDK, dont les niveaux restent pratiquement constants durant les phases du cycle cellulaire, les cyclines sont synthétisées et dégradées spécifiquement (**Cavalla et al. 97 et Puri et al. 99**).

La cycline D, ligand de la CDK4/6, est présente dans des cellules normales durant la phase G₁ (**Darzynkiewicz et al. 96**) et sa surexpression accélère la phase G₁ (**Lukas et al., 96**). L'expression et la dégradation de la cycline D

sont régulées par des cascades de signalisation convergentes initialisées par des récepteurs membranaires incluant des récepteurs tyrosine kinase, des cytokines, des protéines G (Stein *et al.* 99) et des protéines impliquées dans l'adhérence comme les intégrines et les cadhérines (Aktas *et al.* 99, Lukas *et al.* 96). La cycline E s'associe à la CDK2 et est exprimée durant la phase G₁, précédant la cycline A dont l'expression coïncide avec l'entrée dans la phase S (Darzynkiewicz *et al.* 96).

Même si les connaissances actuelles semblent indiquer que l'implication directe des CDK dans le contrôle de la phase G₁ se limite aux trois complexes cycline D-CDK4/6, cycline E-CDK2 et cycline A-CDK2 les découvertes récentes sur la complémentarité de l'action de ces complexes, notamment lors de l'hyperphosphorylation de pRb-E2F, laissent entrevoir un degré de complexité plus grand et l'implication de protéines supplémentaires.

Les deux complexes cycline D-CDK4/6 et cycline E-CDK2 ne possèdent pas la même fonction. Le complexe cycline D-CDK4 contrôle la destruction de l'association de pRb avec une histone désacétylase annulant ainsi la répression des gènes cycline A et CDK1 par le complexe pRb-E2F (Zhang *et al.* 00). Le complexe cycline E-CDK2 montre une spécificité beaucoup moins grande et possède plusieurs substrats. Il est capable de phosphoryler, outre pRb, l'histone H1, la protéine p27 inhibitrice de CDK et aurait probablement d'autres substrats (Sherr *et al.* 99). Un autre rôle a récemment été attribué au complexe cycline E-CDK2. Ce complexe contrôlerait la formation des complexes de transcription en permettant le chargement de la polymérase α par la phosphorylation de la protéine Cdc45 (Bartek *et al.* 01).

Le contrôle de l'activité des cyclines implique leur protéolyse par des complexes des voies à ubiquitine. Ceci a d'abord été démontré pour la cycline B dont la dégradation est nécessaire pour permettre à la cellule de sortir de la mitose (Glotzer *et al.* 91). La dégradation des cyclines B et A requiert la présence d'une boîte de destruction dans leur partie amino-terminale (Glotzer *et al.* 91). Les mécanismes de contrôle de la dégradation de la cycline D sont mal connus. Cependant, on sait que la phosphorylation de la cycline D par la glycogène synthétase kinase-3 β (GSK-3 β) entraîne son exportation du noyau vers le cytoplasme où elle est dégradée par des systèmes à ubiquitines (Diehl *et al.* 98). Ce système permet de réduire la demi-vie de la cycline D à 10 mn, ce qui permet une régulation très rapide de son activité. La dégradation de la cycline E est catalysée par le complexe SCF. C'est l'autophosphorylation préalable de la cycline E catalysée au sein du complexe cyclin E-CDK2 lui-même qui permet sa protéolyse ubiquitine-dépendante lorsqu'elle se retrouve sous forme libre (Clurman *et al.* 96).

iii. CKI

Il existe deux familles de CKI : les Cip/Kip (*CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein*) et les Ink4 (*Inhibitor of CDK4*). La famille Ink4 comprend actuellement quatre membres (p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} et p19^{INK4D}) qui inhibent l'association des cyclines aux CDK en s'associant aux CDK avec une plus grande affinité que les cyclines (Hall *et al.* 95). La famille Cip/Kip comprend trois membres (p21^{Cip1/Waf1/Sdi1/CAP20}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}) qui forment de complexes ternaires avec les complexes cycline-CDK par liaison à leur composant cycline (Hall *et al.* 95) ou sont capables de s'associer avec les cyclines seules sans pour autant inhiber la formation des complexes cycline-CDK (Martinez *et al.* 99). Les propriétés de ces protéines sont résumées dans le Tab. 4.

Tab. 4. Propriétés des CKI connues (d'après Puri *et al.* 99 et Roussel 99).

Protéine	Emplacement du gène	Phase du cycle cellulaire concernée	Fonction de la protéine	Régulation de l'activité
<i>Ink4</i>				
p15 ^{INK4B}	9p21	G ₁	Inhibe CDK4 et CDK6	Transcription TGFβ dépendante
p16 ^{INK4A}	9p21	G ₁	Inhibe CDK4/6	Transcription E2F dépendante
p18 ^{INK4C}	1p32	G ₁	Inhibe CDK4/6	Transcriptionnelle ?
p19 ^{INK4D}	19p13	G ₁	Inhibe CDK4/6	Transcriptionnelle ?
<i>Cip/Kip</i>				
p21 ^{cip1/wAF1}	6p21	G ₁ et S	Inhibe CDK2, CDK4/6 (?) et PCNA	Transcriptionnelle (e.g. expression p53, TGFβ et/ou MyoD dépendante)
p27 ^{kip1}	11p12-13	G ₁	Inhibe CDK2 et CDK4/6	Localisation et ubiquitination
p57 ^{kip2}	11p15.5	G ₁	Inhibe CDK2 et CDK4/6	Transcriptionnelle

- Ink4

La surexpression de p16 entraîne un arrêt de la prolifération cellulaire (**Lukas *et al.* 95**). Des tests de liaison *in vitro*, ont montré sans équivoque que p15 et p16 sont des compétiteurs de la cycline D dans les complexes cycline D-CDK4 et prendraient sa place pour former des complexes p15-CDK4/6 ou p16-CDK4/6 (**Hall *et al.* 95**). La cycline D libre serait alors rapidement dégradée par les protéasomes ubiquitine-dépendants (**Roussel 99**). La présence de sites de liaison E2F dans la région promotrice du gène de p16 semble signifier que l'expression de p16 est E2F dépendante alors que l'expression de p15 est TGFβ dépendante (**Hannon *et al.* 94**). Il n'existe aucune évidence expérimentale du recyclage des CDK4/6 après leur liaison avec les Ink4. Ces inhibiteurs pourraient donc servir de corbeille pour CDK4/6 en mettant ces Cdk hors-jeu pour le restant du cycle cellulaire (**Sherr *et al.* 99**).

p15 serait l'effecteur de la régulation de l'activité de la cycline D-CDK4/6 par TGFβ alors que p16 interviendrait plus tard pour inhiber l'activité du complexe cycline D-CDK4/6 et entraîner la destruction de la cycline D lors de la transition G₁/S. Un autre niveau de régulation impliquerait une régulation croisée avec les inhibiteurs Cip/Kip.

- Cip/Kip

p21, la première des CKI à avoir été identifiée, possède de nombreuses fonctions. C'est un des effecteurs de p53 impliqué dans l'arrêt p53 dépendant induit par un dommage de l'ADN survenant lors de G₁ (**El-Deiry *et al.* 93**). p21, comme p27, agirait en se liant à la cycline des complexes cycline-CDK (cycline D-CDK4/6 et cycline E-CDK2 (**Hall *et al.* 95**), mais leur effet inhibiteur est plus important sur le complexe cycline E-CDK2 (**Sherr *et al.* 99**)) et *en empêchant l'activation* de la sous-unité CDK par phosphorylation (**Kato *et al.* 94**). En plus de ce rôle d'inhibiteur indirect sur l'activité des facteurs de transcription E2F par l'intermédiaire des complexes cycline-CDK, p21 pourrait aussi agir directement sur ce facteur de transcription en se liant à lui, ceci a été observé *in vitro* et reste à confirmer *in vivo* (**Delavaine *et al.* 99**).

La régulation de p21 est plutôt transcriptionnelle, le promoteur de p21 contenant notamment 2 sites de liaison à p53 (**Boulaire 00, Vidal *et al.* 00**). Cette expression serait aussi induite par des facteurs de différenciation dont la nature dépend du type cellulaire considéré, TGFβ pour les kératinocytes, MyoD pour les cellules myoblastiques ou NGF (*nerve growth factor*) pour les cellules de lignées adrénocorticales (**Boulaire 00**) ou encore lors de l'induction de la différenciation Ca²⁺ dépendante chez les kératinocytes (**Martinez *et al.* 99**). p21 pourrait donc

jouer un rôle central lors de l'induction de la différenciation (**Boulaire 00** et **Martinez *et al.* 99**). D'autres systèmes expérimentaux ont montré que l'expression de p21 est activée par E2F alors qu'elle est réprimée par HBP1 (**Gartel *et al.* 98**). Bien que la fonction d'une boucle de contrôle négatif impliquant E2F et p21 ne soit pas évidente une telle boucle de rétrocontrôle existe aussi entre p16 et E2F.

p27 a tout d'abord été identifié comme un inhibiteur de prolifération dans des cellules subissant une inhibition de contact ou traitées au TGF β (**Polyak *et al.* 94**). *In vitro*, la quantité de p27 exprimée dans les cellules en prolifération contribue à la longueur de G₁. Plus la quantité de p27 est importante, plus la phase G₁ est longue (**Coats *et al.* 96**). L'absence de p27 rend les cellules insensibles aux facteurs anti-mitogènes en fin de phase G₁ (**Coats *et al.* 96**). Les interactions de p27 et du complexe cycline E-CDK2 sont de deux types : (1) association forte et inhibition de cycline E-CDK2 (**Sheaff *et al.* 97**) ; (2) phosphorylation de p27 sur le résidu T187 entraînant sa dégradation plus tard en phase G₁ par les voies ubiquitine dépendantes (**Sheaff *et al.* 97** et **Xu *et al.* 99**). Il semble que ce soit le mode de régulation principal de l'activité de p27 (**Pagano *et al.* 95**). Mais cette régulation, visiblement très complexe, impliquerait aussi à la fois un contrôle transcriptionnel, un contrôle traductionnel et un contrôle lié à la localisation de la protéine (**Vidal *et al.* 00**)⁴.

e. Aspects complémentaires

i. Localisation spatio-temporelle des molécules de contrôle du cycle cellulaire

La localisation des complexes cycline-CDK au cours du cycle cellulaire (**Fig. 17**) est un élément supplémentaire du contrôle de leur activité. Les mécanismes moléculaires engagés dans ce contrôle sont encore très mal connus (**Yang *et al.* 99**).

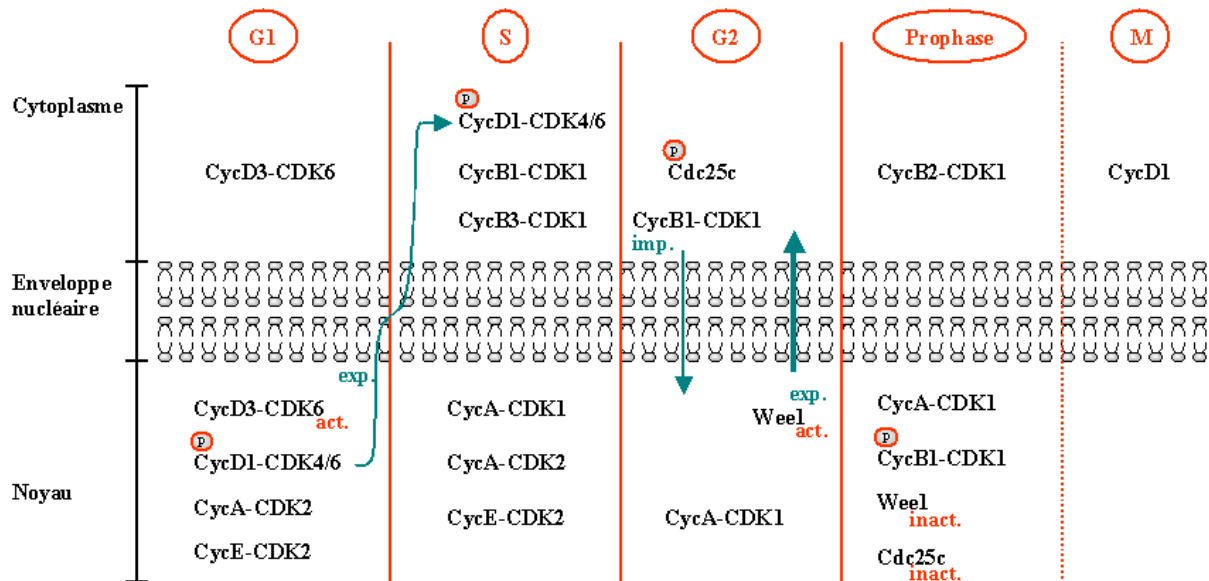


Fig. 17. Localisation spatio-temporelle des cyclines (d'après Darzynkiewicz 80, 96, Sherr *et al.* 99 et Yang *et al.* 99).

⁴ Notons que des études récentes ont montré que p21 et p27 sont essentielles à l'association de la cycline D et de la CDK4/6 car stabilise la structure (**Cheng *et al.* 99**). Mais ces résultats n'ont pas été reproduits avec d'autres systèmes biologiques (ici des fibroblastes d'embryon de souris de type MEF) et sont encore discutés (**Sherr *et al.* 99**). S'ils sont confirmés ils suggéreraient que cycline D-CDK4/6 agit comme un réservoir de cette protéine sans que son activité soit modifiée alors que p27 successivement, inhibe cycline E-CDK2 puis est phosphorylée par ce complexe.

ii. Ubiquitination

On trouve de nombreuses cibles des voies ubiquitines dépendantes parmi les protéines régulatrices de la prolifération cellulaire. Depuis 1991, il est connu que la cycline B1 (acteur principal du contrôle de la transition G₂-M) est dégradée par une voie ubiquitine dépendante (**Glotzer et al. 91**). De même, p53, les facteurs de transcription c-jun et c-fos, c-myc, les β-caténines et p27^{KIP1} font partie des dégradés par le protéasome 26S (**Kornitzer et al. 00**).

La dégradation spécifique des protéines via ce système implique deux étapes successives (**Fig. 18**). Premièrement, les protéines cibles sont conjuguées à un polypeptide nommé ubiquitine. Ensuite, les protéines conjuguées à l'ubiquitine sont reconnues par une protéase multicatalytique, le protéasome 26S. La machine enzymatique responsable de l'ubiquitination des protéines nécessite au moins deux entités catalytiques différentes, E1 (*ubiquitin activating enzyme*) et E2 (*ubiquitin carrier protein*). L'ubiquitine est initialement conjuguée à E1 par une liaison thioester entre son groupe carboxyle C-terminal et une chaîne cystéine dans le site actif de l'enzyme. La formation de ce lien nécessite une molécule d'ATP. Une réaction de transestérification passe alors l'ubiquitine activée vers un résidu cystéine du site actif de E2 qui peut alors transférer l'ubiquitine sur la protéine cible (**Kornitzer et al. 00**). Ce modèle de base est suffisant *in vitro* mais une troisième enzyme, nommée E3, est nécessaire à la catalyse de la poly-ubiquitination *in vivo*. C'est elle qui donne sa spécificité d'action au système. Une quatrième enzyme, nommée E4, a été identifiée chez la levure (**Koegl et al. 99**) qui ne semble nécessaire qu'à l'élongation de chaînes d'ubiquitine dans certains cas précis, suggérant que le fonctionnement des voies protéolytique ubiquitine dépendantes ne soit pas encore complètement compris.

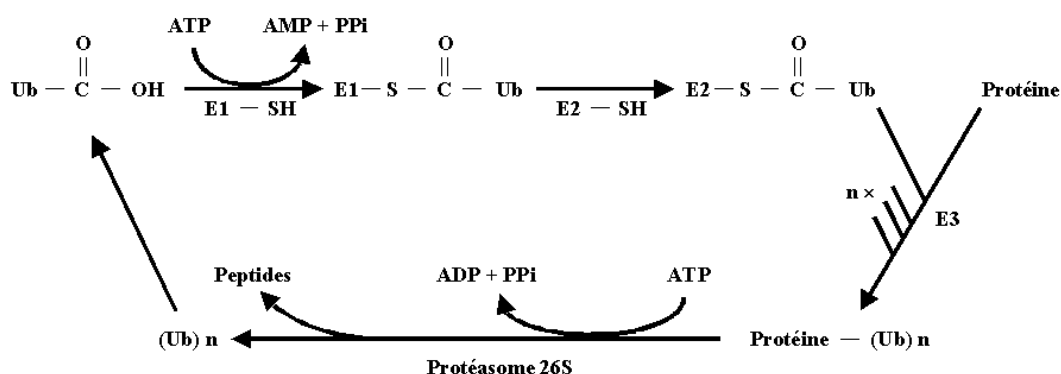


Fig. 18. Réactions enzymatiques principales de la protéolyse protéine spécifique ubiquitine dépendante (d'après Hershko 97, Kornitzer et al. 00 et Zachariae et al. 99).

E3 regroupe sous le même nom une famille de complexes enzymatiques dont 4 membres sont actuellement connus (**Kornitzer et al. 00**) : APC (*anaphase promoting complex* aussi appelé cyclosome), E3α/E3β, protéines à domaines HECT et SCF (*Skp1-Cdc53/cullin-F-box protein*). L'ubiquitination par SCF nécessite la phosphorylation du substrat, l'activité de APC est modulée par la phosphorylation du substrat et la présence de protéines ancillaires permettant la liaison au substrat, l'activité de HECT dépend aussi de protéines ancillaires et E3α/E3β est activée constitutivement à l'encontre de ces substrats spécifiques. Cependant, seuls les complexes SCF et APC sont connus comme étant impliqués dans la dégradation de protéines de régulation du cycle cellulaire chez les mammifères.

SCF contrôle la dégradation de protéines lorsque celles-ci ont été phosphorylées sur des sites spécifiques :

- La cycline E est phosphorylée par autophosphorylation en Thr380 (**Clurman et al. 96**) ;
- La cycline D1 est phosphorylée en Thr286 (**Diehl et al. 97**) ;

- La protéine p27KIP1, inhibiteur de cycline E-CDK2, est phosphorylée en Thr187 par ce même complexe (Carrano *et al.* 99 et Montagnoli *et al.* 99) ;
- Les autres substrats de SCF comprennent la β -caténine (Tyers *et al.* 00), E2F (Marti *et al.* 99), p53, c-jun et c-fos, c-myc (Kornitzer *et al.* 00) et la cycline A (Yam *et al.* 99).

APC intervient dans le contrôle de la fin du cycle cellulaire et participe à la dégradation des cyclines B à la fin de la phase M (King 95). La spécificité de APC montre deux niveaux de régulation :

- Les protéines associées à APC lui permettent de lier spécifiquement ses substrats. C'est la liaison de Hct1/Cdh1 qui permet à APC de dégrader la cycline B. L'activité de Hct1/Cdh1 est elle-même inhibée par phosphorylation suivant l'action de la kinase Cdc28 et la phosphatase Cdc14 (Jaspersen *et al.* 99).
- La phosphorylation activatrice de APC par le complexe Cycline B-CDK1 (Shteinberg *et al.* 99).

Ainsi, par l'intermédiaire des systèmes à ubiquitine, la cellule peut inhiber les protéolyses spécifiques et bloquer le cycle cellulaire. Les causes de ces arrêts sont les dommages de l'ADN, la réplication incomplète de l'ADN ou des problèmes d'attache des chromosomes aux fuseaux achromatiques. L'importance de l'implication des systèmes ubiquitine dépendants dans les mécanismes de contrôle de la prolifération cellulaire suggère qu'ils puissent être liés à des pathologies cellulaires.

iii. Autres facteurs de régulation du cycle cellulaire

De nombreux facteurs, autres que ceux cités ci-dessus semblent impliqués dans la régulation des comportements de type prolifération / différenciation : la quantité d'ARN ribosomiaux, le nombre de ribosomes, l'acétylation des histones, la désacétylation des histones, la phosphorylation et la déphosphorylation des histones, l'AMP cyclique et le GMP, les protéases, les tailles cellulaires et nucléaires, les ADN polymérase, les protéines chromosomiques non-histones, le pH intracellulaire, les flux de Na⁺, l'ATP, le calcium, la calmoduline, le magnésium, l'ornithine décarboxylase, les glycoprotéines membranaires, les glycolipides membranaires, ... (Baserga 99).

3. Spécificité de la transition G₁/S

a. Introduction

Dans un tissu, les cellules reçoivent des signaux multiples auxquels elles sont sensibles jusqu'au point de restriction (Pardee 74). Certains sont mitogéniques, d'autres anti-mitogéniques. Ces signaux consistent en des facteurs extracellulaires (facteurs de croissance ou hormones) et d'interactions physiques avec les cellules du voisinage et les supports comme la MEC ou la membrane basale. Le point de restriction est le point où l'équilibre entre ces signaux est rompu définitivement et induit une réponse binaire de la part de la cellule :

- Elle est engagée irréversiblement dans le cycle cellulaire et se prépare à entrer en phase S.
- Elle entre en état de quiescence et attend des informations supplémentaires pour retrouver la voie du cycle cellulaire ou celui de la différenciation (Vidal *et al.* 00).

Comprendre les mécanismes moléculaires aboutissant au point de restriction c'est comprendre le fonctionnement de l'intégration en temps réel de ces signaux négatifs et positifs permettant à la cellule d'ajuster l'expression de ces gènes en fonction de son environnement.

Chronologiquement, la cycline D semble être un des effecteurs de l'environnement de la cellule médiés par les complexes protéines poches-E2F. Comme nous le verrons dans la partie consacrée aux voies de signalisation cellulaires, l'expression et la dégradation de nombreuses protéines, dont la cycline D, sont régulées par des cascades de signalisation convergentes initialisées par des récepteurs membranaires incluant des récepteurs tyrosine kinase, des cytokines, des protéines G (Stein *et al.* 99) et des protéines impliquées dans l'adhérence comme les intégrines et les cadhérines (Aktas *et al.* 99, Lukas *et al.* 96).

b. Protéines poches et E2F : des régulateurs spécifiques de l'expression génique

i. Généralités

La protéine du rétinoblastome (pRb ou p105) est considérée comme LA protéine clé de la régulation de la prolifération jusqu'au point de restriction. pRb est un membre de la famille des protéines poches. Cette famille de protéine comprend aussi deux autres membres : p107 et p130 (Fig. 19. a.). Les protéines poches, lorsqu'elles sont hypophosphorylées, séquestrent les facteurs de transcription E2F. La libération de E2F suit l'hyperphosphorylation de la protéine poche, qui est alors dite inactivée.

Les facteurs de transcription E2F libres sont en fait des hétérodimères contenant une sous-unité codée par la famille de gènes E2F et une sous-unité codée par la famille des gènes DP. Actuellement, six membres de la famille E2F et deux gènes de la famille DP sont connus chez les mammifères (Fig. 19. b.).

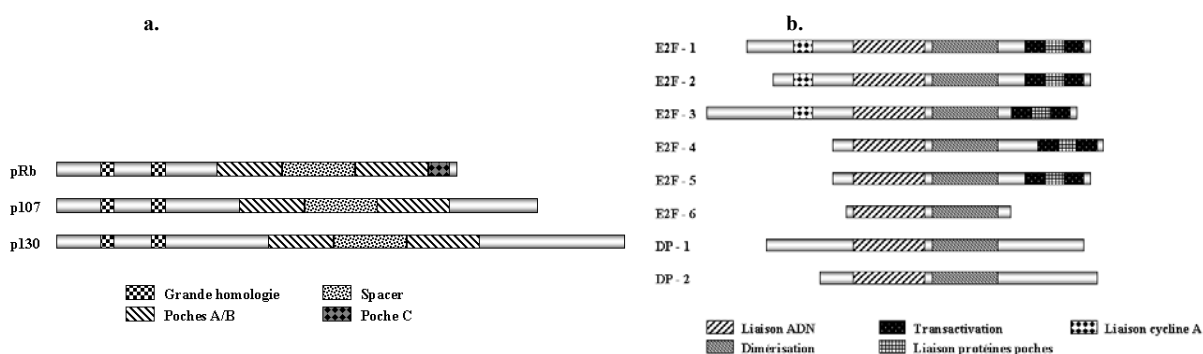


Fig. 19. Organisation : a. des trois gènes de la famille des protéines poches (d'après Kaelin 99 et Puri *et al.* 99 pour pRb et Mulligan *et al.* 98 pour p107 et p130) et b. des six gènes de la famille E2F et des deux gènes de la famille DP (d'après Dyson 98 et Lavia *et al.* 99).

ii. Spécificité complexes protéines poches-E2F vs. cycle cellulaire

Il ne semble pas exister de spécificité de l'interaction entre les sous-unités E2F et DP ni entre DP et pRb. Par contre, il existe une forte spécificité dans l'association des protéines E2F avec les protéines poches : E2F-1, E2F-2 et E2F-3 se lient presque exclusivement à pRb, E2F-4 à p107, p130 et pRb dans certains types cellulaires et E2F-5 seulement à p130 (Dyson 98). La formation et l'activité de ces complexes ne sont pas simultanées, même si certains sont présent en même temps dans la cellule, ce qui semble indiquer que leurs fonctions ne seraient que partiellement redondante (Tab. 5 et Fig. 20).

Tab. 5. Propriétés des complexes protéines poches-E2F suivant les phases du cycle cellulaire (d'après Bernards 97).

Composant de E2F	Protéine poche associée	Active lors de la phase	Complexe lors de	Induction de la phase S	Localisation nucléaire
E2F-1	pRb	Transition G ₁ / S	G ₁ (avec pRb)	+++	Oui
E2F-2	pRb	Transition G ₁ / S	G ₁ (avec pRb)	+++	Oui
E2F-3	pRb	Transition G ₁ / S	G ₁ (avec pRb)	+++	Oui
E2F-4	pRb, p107, p130	Transition G ₁ / S	G ₁ (avec pRb), G ₀ (avec p130), S (avec p107)	+	Non
E2F-5	p130	Transition G ₁ / S	G ₀ (avec p130)	-	Non
DP-1	pRb, p107, p130	G ₁ et début de S	Constitutive	+	Non
DP-2 / DP-3	pRb, p107, p130	?	Constitutive	+	Oui

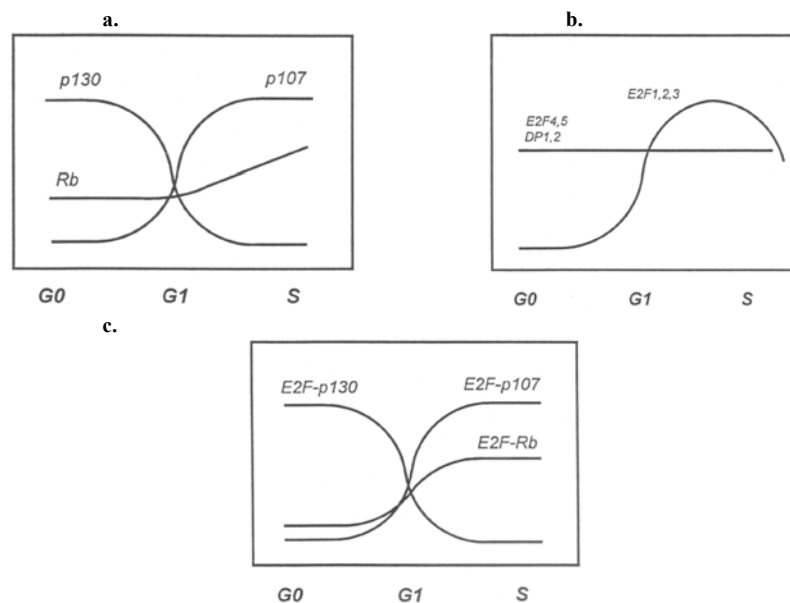


Fig. 20. Variation des quantités de protéines poches et des facteurs de transcription après stimulation à passer de G₀ à G₁ puis S : a. Famille des protéines poches, b. Famille E2F et c. Complexes protéines poches-E2F (tirés de Mayol *et al.* 98 et Nevins 98).

iii. Action des facteurs de transcription E2F et des complexes protéine poche/E2F

L'association des protéines poches avec E2F inhibe la transcription E2F dépendante car le domaine très conservé situé dans la région C-terminale des protéines E2F et régulant leur association avec les protéines poches est inclus dans le domaine de transactivation des protéines E2F. Cependant, le complexe formé par les protéines poches et E2F possède potentiellement une fonction duale (Fig. 21). Le complexe pRb-E2F peut à la fois réprimer activement l'expression de certains gènes et empêcher le facteur E2F de promouvoir l'expression d'autres ou des mêmes gènes (Dyson 98).

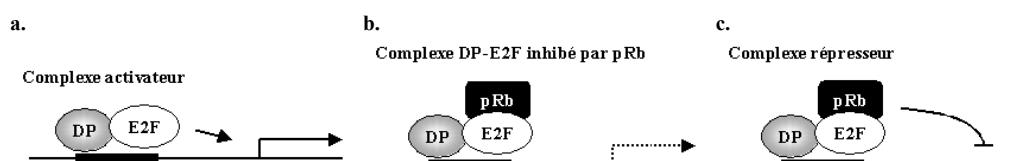


Fig. 21. Action du complexe protéine poche/E2F lorsque : a. E2F est activateur, b. le complexe protéine poche-E2F est inhibiteur passif et c. le complexe protéine poche-E2F est répresseur actif de la transcription (d'après Alberts *et al.* 94, Dyson 98 et Macleod 99).

De très nombreuses régions promotrices de gènes contiennent des sites de liaison E2F. Il s'agit notamment de protéines régulatrices comme B-myb, les cyclines E et A, les CDK 1 et 2, p19^{ARF} ou structurales comme l'ADN polymérase α , thymidine kinase, etc. ... et les gènes des protéines E2F eux-mêmes (**Lavia et al. 99**). D'autre part, E2F active l'expression de la dihydrofolate réductase (DHFR) mais le complexe pRb-E2F réprime activement la transcription des protéines B-myb, E2F-1, E2F-2, CDK1 (**Tab. 6**).

Tab. 6. Caractéristiques des gènes dont la transcription est contrôlée par des promoteurs possédant un ou plusieurs sites E2F (d'après Lavia et al. 99).

Gène	Caractéristiques du site E2F	Régulation par E2F/DP ou protéines poches
Gènes de contrôle		
c-myc	2 sites pRb/E2F, activité transcriptionnelle en l'absence de pRb/E2F	Répression par pRb/E2F
Cycline E	Sites multiples à E2F, dont 1 site à p107 et p130	Très forte induction par E2F
B-myb	1 site E2F	Induction par E2F et répression par p107 et p130
p107	2 sites E2F	Site d'activation par E2F et site de répression par pRb et p107
pRb	1 site pRb/E2F	Autorépression par pRb/E2F
E2F-1	2 sites E2F	Répression par p107/E2F et p130/E2F, activation par E2F
E2F-2	Multiplés sites E2F	Idem E2F
Cycline A	1 site p107(p130)/E2F, activité transcriptionnelle en l'absence de p107 et p130	Induction par E2F et répression par p107 et p130/E2F
CDK1 (p34 ^{cdc2})	1 site E2F non-consensus	Idem cycline A
RabBP1	2 sites E2F	Répression par le site proximal en G ₀ et activation par le site distal en G ₁ /S
Gènes structuraux		
DNA pol. α	2 sites E2F consensus	Induction par E2F
HsORC1	2 sites E2F à orientation inversée	Répression en G ₀ et activation en G ₁ /S
DHFR	Multiplés sites E2F	Répression par p107 et p130 en début de G ₁ et induction par E2F à G ₁ /S
PCNA	1 site E2F	Induction par E2F
RRM2	?	Induction par E2F et répression par p107 et p130
Srp20	2 sites E2F	Induction par E2F
Histone H2A	1 site E2F	Induction par E2F et répression par pRb et p107

L'expression de la cycline E est contrôlée par les complexes protéines poches-E2F et donc indirectement par le complexe cycline D-CDK4/6 (**Resnitzky 97**). Cependant, l'ARNm de la cycline E est présent même en l'absence de E2F, E2F n'entraînerait donc une augmentation de la présence de cycline E qu'à partir d'un seuil « bruit de fond » (**Vidal et al. 00**).

Des expériences de *footprinting in vivo* (**Dyson 98**) ont montrées que les sites de liaison à E2F des promoteurs des gènes B-myb, CDK1 et cycline A sont occupés pendant les phases G₀ et G₁ par des complexes protéines poches-E2F et libérés lors du passage de la phase G₁ à la phase S. Ceci souligne l'importance de la répression active exercée par les complexes protéines poches-E2F et de leur possible corrélation à l'évolution du cycle cellulaire.

L'hétérodimère E2F/DP est lié et phosphorylé plus tard dans le cycle cellulaire par le complexe kinase cycline A-CDK2 (**Krek *et al.* 94**) lors de la phase S. Cette phosphorylation entraîne une incapacité à lier à l'ADN et sa dégradation par la voie ubiquitine (**Dyson 98 et Lavia *et al.* 99**).

iv. Conclusion

Il y'a une certaine symétrie dans l'organisation de la phase G₁ qui est centrée autour des régulateurs négatifs pRb et Cip/Kip. L'effet inhibiteur de ces protéines est levé sous l'impulsion de facteurs mitogènes par la cycline D. En réponse à une stimulation continue des facteurs mitogènes, la cycline D s'accumule et remplit deux fonctions : les kinases cycline D dépendantes phosphorylent pRb, contribuant à son inactivation et les complexes cycline D-CDK agissent de façon stœchiométrique pour lier et séquestrer les protéines Cip/Kip. L'activation des complexes CDK2 durant la phase G₁ requiert l'inactivation des protéines Cip/Kip et de pRb et est donc dépendante de l'activation préalable de la voie cycline D (**Fig. 22**).

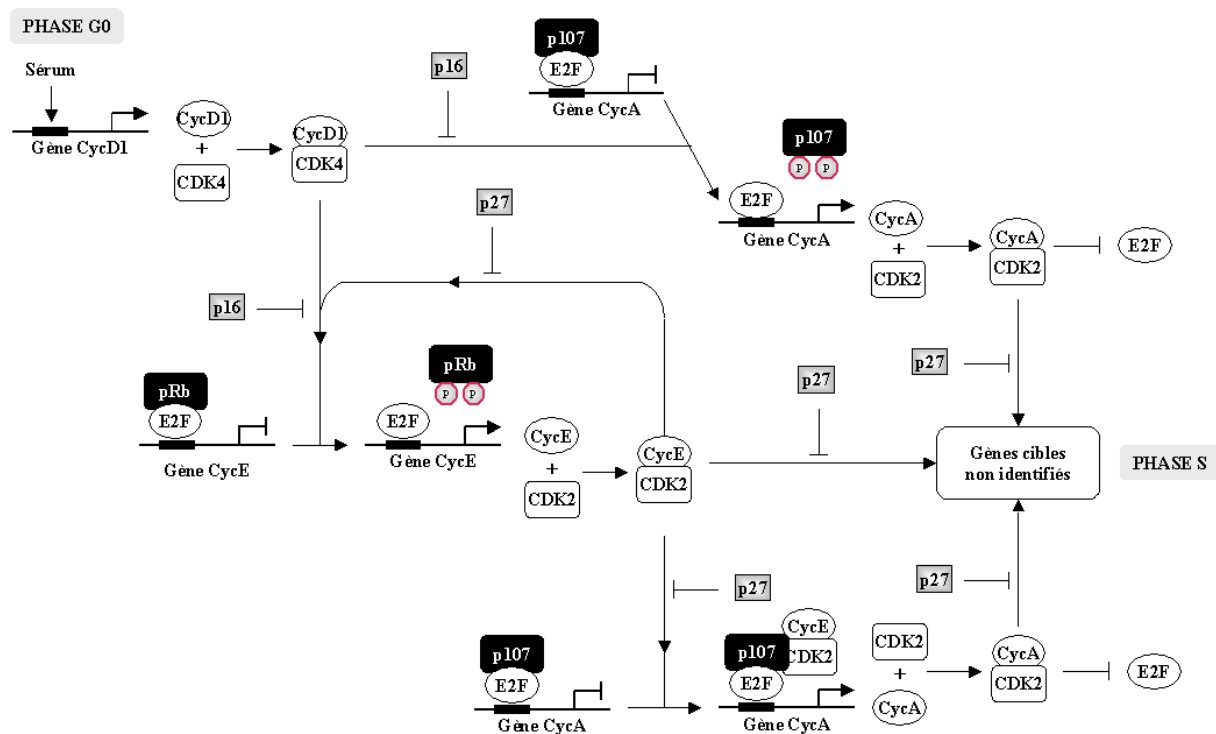


Fig. 22. Schéma de synthèse des voies de régulation impliquant les CDK lors du passage G₀/G₁/S (d'après Lavia *et al.* 99).

L'irréversibilité de ce système proviendrait de la double boucle de contrôle associant le complexe cycline E-CDK2 et la protéine p27. Lorsque des signaux mitogènes et anti-mitogènes perturbent l'équilibre existant entre les cycline-CDK et les CKI le complexe cycline E-CDK2 peut voir son activité augmenter et entraîner une augmentation de la quantité de cycline E et corrélativement une diminution de la quantité de p27 en le phosphorylant pour permettre sa protéolyse (**Vidal *et al.* 00**).

Les boucles de contrôle négatif impliquant p16, p21 et E2F pourraient aussi jouer un rôle complémentaire dans l'irréversibilité du passage du point de restriction à moins que ce ne soit dans le contrôle de l'équilibre précédant ce même point de restriction.

Le système est probablement remis à son état de départ lorsque la cycline E est phosphorylée pour être protéolysée en cours de phase S et plus tard lorsque la cycline A est dégradée en phase G₂ (**King *et al.* 96**).

Si ces schémas permettent de se faire une idée des contrôles de la prolifération en G₁ ils ne permettent pas de comprendre complètement les mécanismes inducteurs de la différenciation. En effet, Harvat et collaborateurs ont

récemment montré que l'arrêt en phase G₁ contrôlé par la voie pRb est nécessaire mais pas suffisant à l'induction de la différenciation de cellules épithéliales. Cet arrêt est caractérisé par une accumulation des formes hypophosphorylées de pRb et p130 conduisant à une diminution de la quantité de pRb et une augmentation de la quantité de p130 conduisant à une régulation négative de l'expression des gènes régulés par E2F. Ces événements coïncident avec une inhibition des complexes cycline-CDK par les CKI p21, p27 et p16 (**Harvat et al. 98**).

4. Spécificité de la transition G₁/G₀/Différenciation

a. Introduction

La prolifération et la quiescence ont été amplement documentés, il en est autrement de la différenciation. La prolifération et la différenciation sont des processus exclusifs et, *in vitro*, il est beaucoup plus difficile d'obtenir une population différenciée pérenne qu'une population indifférenciée en croissance.

Le modèle de la différenciation musculaire a servi de modèle de référence dans la tentative d'établissement d'un paradigme de la différenciation : l'induction de la différenciation d'un myoblaste mononucléé par sa fusion avec un myotube polynucléé complètement différencié (**Cardoso et al. 99, Maione et al. 97 et Yaffe et al. 77**). La plupart des données sur la différenciation proviennent de ce modèle, ce qui pose des problèmes car la différenciation est un processus par nature spécifique. L'inhibition des mécanismes de contrôle de la prolifération entraîne un arrêt en G₁ et vraisemblablement la mise en route d'une voie de contrôle d'expression de gènes spécifiques au type cellulaire entraînant ou concomitant à un retrait irréversible du cycle cellulaire. L'utilisation de culture de cellules épithéliales (ré-ensemencement de dermes dont l'épiderme a été supprimé) a apporté quelques éléments de compréhension supplémentaires.

b. Le paradigme de l'induction de la différenciation musculaire

Des facteurs de transcription liés à la différenciation musculaire ont été identifiés. Il s'agit des protéines des familles MyoD et MEF2 (*myocyte-enhancer factor 2*). La famille MyoD comprend actuellement 4 membres : MyoD, Myf5, myogénine et MRF4. Ce sont des protéines bHLH (*basic helix-loop-helix*) qui se lient à des séquences de l'ADN nommées boîtes E (*E box*). La famille MEF2 contient aussi 4 membres : MEF2A-D qui possèdent sont tous codés par le même gène par épissage alternatif. Le schéma admis pour l'instant est le suivant :

- L'expression de MyoD et Myf5 est présente à un faible niveau tôt lors du développement, cette régulation semble être assimilable à une détermination myogénique de cellules proliférantes survenant lors du développement. La différenciation ultérieure à l'arrêt de la prolifération nécessite un stimulus supplémentaire (**Zhang et al. 99**) ;
 - L'augmentation de l'expression de MyoD et Myf5 entraîne l'activation de cascades de régulation (mal définies pour l'instant) résultant en l'expression MEF2 ;
 - L'expression de MEF2 entraîne l'expression de la myogénine ;
 - La myogénine entraîne l'expression de protéines structurales et stimule aussi l'expression de MEF2, créant une boucle de régulation positive entraînant une augmentation importante de la quantité de MEF2 et de la myogénine puis plus tard de MRF4 ;
 - Des facteurs de transcription des deux familles (MyoD, MEF2) contrôlent alors l'expression d'une batterie de gènes muscle spécifiques.

L'interaction de MyoD et d'autres protéines bHLH avec pRb est nécessaire tout au long du processus de différenciation (**Gu et al. 93 et Thornburn et al. 93**). Une redondance partielle est observée entre pRb, p107 et

p130 lors du processus de différenciation puisque ces protéines peuvent suppléer l'absence de pRb. Les souris pRb^{-/-} meurent *in utero* mais des niveaux de p107 très supérieurs à la moyenne sont observés *in vitro* dans les cellules pRb^{-/-}. Ces mêmes cellules, même en cours de différenciation sont sensibles aux facteurs de croissance et reprennent un comportement prolifératif suite à un stimulus (**Schneider et al. 94**). Il est donc essentiel au processus de la différenciation de conserver pRb sous une forme hypophosphorylée. Ceci semble être réalisé par MyoD qui est capable d'induire la synthèse de p21 d'une façon p53 indépendante (**Parker et al. 95**) en collaborant avec un cofacteur de transcription nommée p300 (**Maione et al. 97** et **Missero et al. 95**). Des souris ne possédant pas de p21 fonctionnel ne montrent pas de défaut de développement suggérant une possibilité de redondance avec les autres CKI : p27 et p57 (**Deng et al. 96**). Ce mécanisme permet à la cellule de conserver ses protéines poches (pRb, p107 et p130) dans un état hypophosphorylé par l'inhibition des complexes cycline-CDK de la phase G₁ (**Cardoso et al. 93**, **Rao et al. 94** et **Guo et al. 95**). De plus, l'expression de pRb est co-activée par MyoD (**Martelli et al. 94**).

L'expression de MyoD est inhibée par les complexes cycline D-CDK4/6, mais les cellules MyoD^{-/-} sont capables de poursuivre une voie de différenciation tout à fait normale (**Parker et al. 95**). Ceci suggère l'existence de redondance avec les autres protéines bHLH de la même famille. L'interaction entre les protéines bHLH, poches et les complexes CDK permet à la cellule d'atteindre l'irréversibilité de la différenciation. Les détails de ce processus ne sont pas encore connus mais il est consolidé par le contrôle de la destruction de toutes les cyclines (**Tab. 7**) et une compartimentalisation précise des membres de la famille E2F entre cytoplasme – E2F1, E2F3 et E2F5 - et noyau – E2F2 et E2F4 (**Montgomery Gill et al. 00**).

Tab. 7. Régulation des protéines du cycle cellulaire durant la différenciation musculaire (d'après Walsh et al. 97).

Protéine	Régulation	Protéine	Régulation
Cycline A	---	E2F	Stable
Cycline D1	---	pRb	Stable
Cycline D2	----	p107	-
Cycline D3	+++	p130	+++
Cycline E	Stable	p16	Stable
CDK1	---	p18	+++
CDK2	---	p19	---
CDK4	Stable	p21	+++
CDK6	Stable		

Ces variations conduisent à une très forte augmentation de la quantité de pRb hypophosphorylé et donc à la suppression de l'activité des facteurs de transcription E2F (**Fig. 23**). Parallèlement, les facteurs de transcription spécifiques de la différenciation peuvent entrer en jeu à une plus grande échelle.

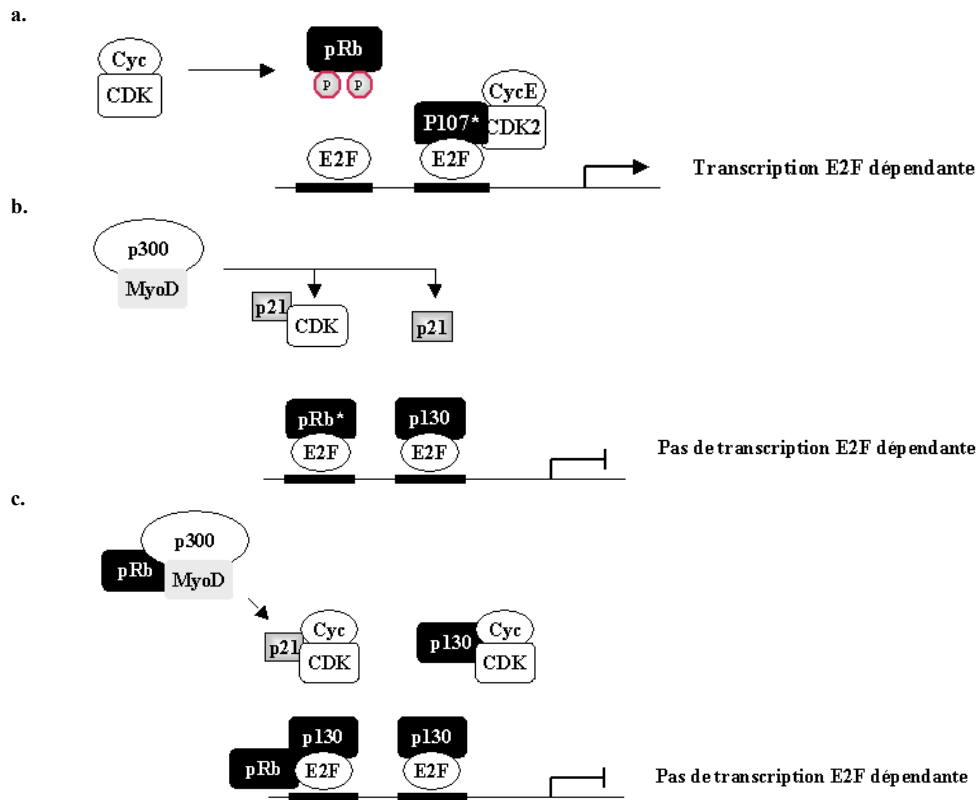


Fig. 23. Paradigme de l'induction de la différenciation musculaire. a. Prolifération (* aussi p130), b. Différenciation (* aussi pRb ou p130) et c. Cellule différenciée (d'après Puri *et al.* 99 et Zhang *et al.* 99).

Le chaînon manquant du paradigme musculaire est le facteur déclenchant l'expression de MyoD. Ces toutes premières étapes de la différenciation, reliant l'activation des récepteurs inducteurs de la différenciation, l'induction de l'expression des CKI et l'expression de MyoD, ne sont pas connues. Les protéines de la famille MyoD ne semblent pas posséder la même fonction centrale dans la différenciation des tissus autres que les tissus musculaires. Ceci semble logique puisque MyoD contrôle l'expression de protéines spécifiques des cellules musculaires. Il est probable qu'une (ou un jeu de) protéine(s) dont la fonction est équivalente à celle de MyoD peut être trouvée pour les différents types cellulaires connus.

c. Différenciation kératinocytaire

Différents stimuli, dont TGF β et le Ca²⁺, permettent d'induire des réactions similaires à la différenciation chez des kératinocytes *in vitro* (ensemencement de dermes desépidérisés). Une étude récente basée sur l'application de Ca²⁺ sur des dermes réensemencés a permis de préciser le niveau d'implication de l'appareil de contrôle du cycle cellulaire dans les événements moléculaires du début de la différenciation (Martinez *et al.* 99). Les 3 cyclines D sont inhibées lors de la différenciation. Leur ARNm disparaît lors des 6 premières heures de la stimulation Ca²⁺. Les protéines elles-mêmes disparaissent dans les 20 h suivant la stimulation. Les quantités de CDK4/6 et CDK2 sous forme libre ou complexée avec une cycline diminuent dans une proportion similaire dans le même intervalle. L'activité kinase des complexes cycline-CDK2 diminue constamment entre 4 et 8 h suivant le stimulus (Martinez *et al.* 99).

L'expression des CKI p21 et p57 augmente fortement dans les premières heures (de 6 à 24h) suivant le stimulus Ca²⁺ alors que l'expression de p27 diminue sensiblement durant la même période (Martinez *et al.* 99 et Missero *et al.* 95). L'association de p21, p27 et p57 avec les complexes Cycline D-CDK4 et cycline E-CDK2 augmente fortement entre 4 et 8 h puis diminuent ensuite, certainement parce que les quantités de chacune de Cycline D-

CDK4 et cycline E-CDK2 tend alors à diminuer. p21 n'est pas essentielle au déroulement de la différenciation mais son absence entraîne des anomalies (Missero *et al.* 96). Notons au passage que p21 ne semble être utile qu'à l'induction de la différenciation puis est dégradé par une voie ubiquitine dépendante plus tard au cours de la différenciation. Une surexpression directe de p21, plus tard dans le processus de différenciation, inhibe celui-ci (Di Cunto *et al.* 98) suggérant que p21 puisse être lié au contrôle de l'expression des gènes spécifiques de stades tardifs de la différenciation kératinocytaire.

La quantité de pRb sous formes hypo- et hyperphosphorylé diminue durant les 6 premières heures suivant le stimulus, la forme hypophosphorylée restant la forme prédominante. Les autres protéines poches restent présentes au-delà des premières 24 heures après stimulation (Martinez *et al.* 99). Elles pourraient contrôler, directement ou indirectement, l'expression de protéines spécifiques de la différenciation kératinocytaire et apparaîtraient donc fonctionnellement équivalentes des protéines MyoD ou MEF dans les cellules musculaires.

d. Conclusion

Le schéma émergent de ces données (Fig. 24) est très complémentaire de celui du contrôle de la transition G₁/S lors du passage du point de restriction (Fig. 22). Le Ca²⁺ entraîne l'expression de p21 qui inhibe les complexes cycline D-CDK4 et cycline E-CDK2. Cette inhibition entraîne une présence majoritaire de pRb sous sa forme hypophosphorylée et donc empêche la synthèse de la cycline D. Parmi celles-ci on distinguera les protéines structurales, comme les kératines K1 et K10 peu susceptibles de jouer un rôle direct dans le contrôle de la différenciation, des protéines de contrôle qui restent jusqu'ici le chaînon manquant de la différenciation kératinocytaire.

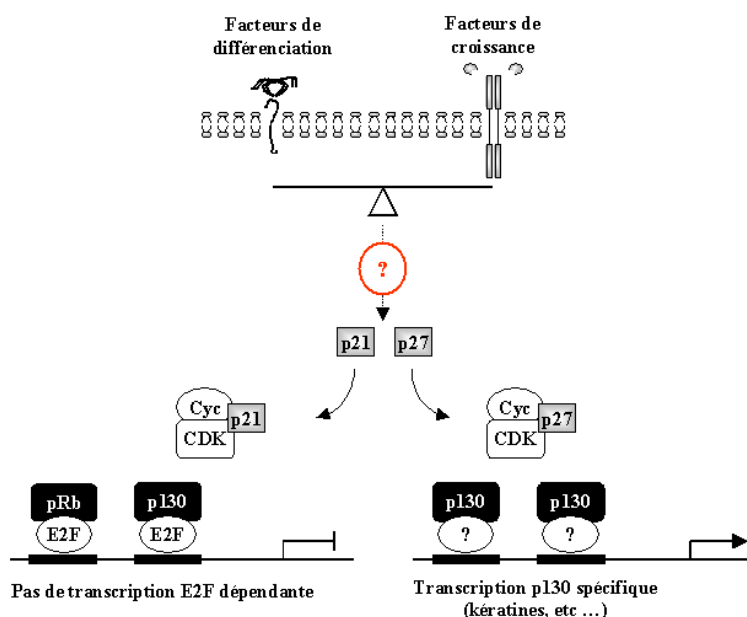


Fig. 24. Rôle des molécules de contrôle du cycle cellulaire lors de l'initialisation de la différenciation (d'après Martinez *et al.* 99).

5. Spécificité de la transition G₂/M

a. Introduction

La place accordée à la description des mécanismes de contrôle de la transition S/G₂/M paraîtra un peu courte comparée à celle concédée à la description des contrôles de la transition G₁/S. Il y'a plusieurs raisons à cela. Dans la partie concernant G₁/S, c'est la complexité des mécanismes impliqués et la fragilité de nos

connaissances que nous voulons mettre en relief. Or, les connaissances disponibles sur la partie S/G₂/M sont beaucoup plus claires que celles concernant la transition G₁/S.

Une fois passé le point de restriction, la cellule n'est plus sensible à la plupart des facteurs environnementaux mais le système de régulation par activations successives de complexes cycline-CDK reste le mécanisme de base. Il permet à la cellule de contrôler les processus de la réplication de l'ADN et ceux de la compaction de la chromatine en chromosomes, leur migration et leur ségrégation dans les deux cellules filles. Il est aussi lié aux contrôles et à la réparation d'erreurs éventuelles commises lors de la réplication.

b. Phase S

Les complexes cyclines A-CDK2 et cycline B-CDK1 (aussi appelé le MPF – *meiosis promoting factor*) contrôlent la progression au travers de la partie du cycle cellulaire indépendante des facteurs extracellulaires (**Tab. 3**).

La synthèse de la cycline A débute vers la point de restriction et l'activation du complexe cycline A-CDK2 est réalisée lors de la fin de la phase G₁ et atteint son maximum au début de la phase S (**Darzynkiewicz 86**). L'activité de cycline A-CDK2 est essentielle au bon déroulement de la phase S. La quantité maximum de cycline A-CDK2 correspond au début de la réplication de l'ADN (**Pines 99**). Il a été montré *in vitro* que le complexe cycline A-CDK2 contrôle l'activité des enzymes ADN polymérase après l'association des complexes de réplication, lors de l'initialisation de la réplication de l'ADN, probablement en phosphorylant des éléments du complexe de l'ADN polymérase dont le PCNA (**Fotedar et al. 96**). Reste à savoir si, en plus de son rôle de régulateur par phosphorylation, le complexe cycline A-CDK2 possède un rôle structural dans la réplication de l'ADN.

c. Phases G₂/M

La synthèse de cycline B commence dès le début de la phase S (**Darzynkiewicz et al. 86**). L'implication de la cycline B dans la transition G₂/M suit trois phases principales :

- La cycline B se lie à la CDK1 pour former le MPF et initier la prophase ;
- MPF active un système protéolytique ubiquitine dépendant entraînant à la fois la destruction de la cycline B et l'initialisation de l'anaphase ;
- Le processus de destruction de la cycline B est interrompu et la cellule se divise.

Le complexe cycline B-CDK1 s'assemble au fur et à mesure de la synthèse de la cycline B dans le cytoplasme mais n'est actif qu'après sa translocation dans le noyau durant la prophase de la phase M.

Tout au long des phases S et G₂, le complexe cycline B-CDK1 est conservé dans le cytoplasme sous une forme inactive par la phosphorylation de CDK1 sur les résidus Thr14 et Tyr15 catalysée par la protéine kinase Wee1 (phosphorylation de Thr14) et Myt1 (phosphorylation à la fois de Thr14 et Tyr15).

L'activation de MPF en fin de phase G₂ ou en début de prophase résulte de l'inhibition de Wee1 et Myt1 et de la stimulation du complexe par la phosphatase Cdc25C (**Fig. 25**). L'activation de la Cdc25C est réalisée par un jeu de kinases et par le complexe cycline B-CDK1 lui-même. Une autre boucle de contrôle, négative celle-là, existe puisque CDK1 est capable de phosphoryler et inactiver Wee1.

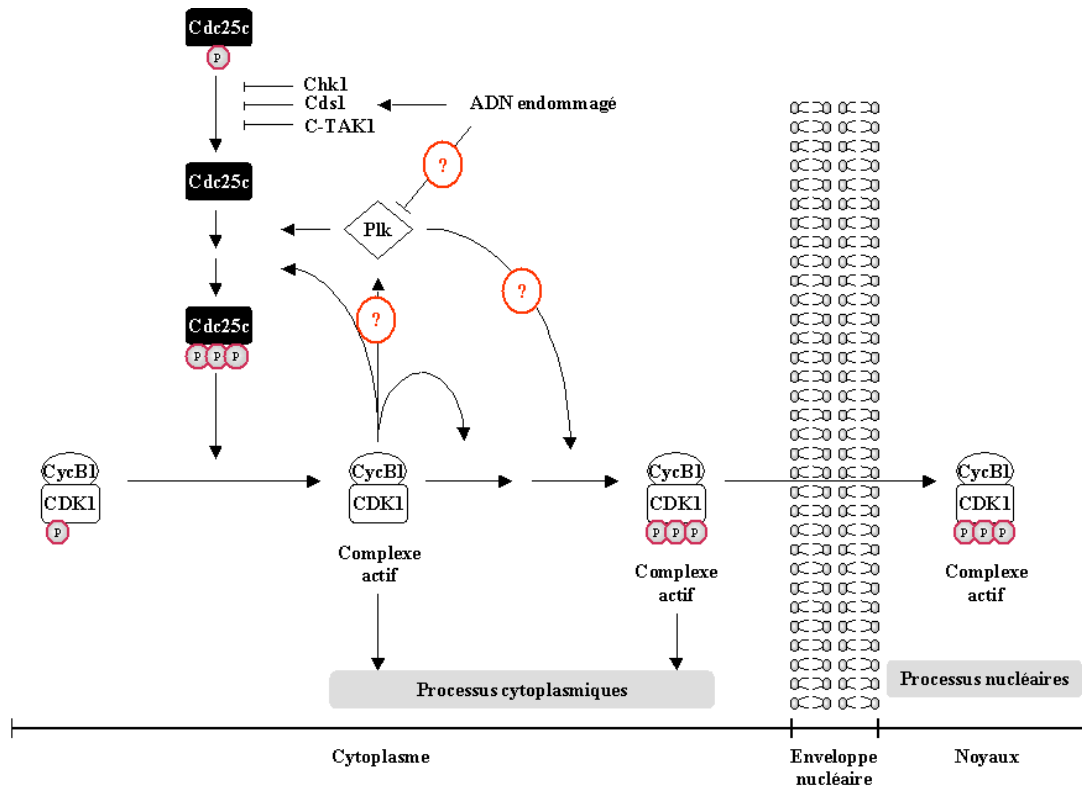


Fig. 25. Régulation de l'activité de MPF lors de la transition G2/M (modifié d'après Takizawa *et al.* 00).

La dégradation de la cycline B est nécessaire à la terminaison de la phase M. Cette dégradation est contrôlée par le complexe APC (Fig. 41) qui contrôle aussi la dégradation anaphase spécifique d'autres protéines et permet la séparation des chromatides sœurs et la re-formation des pre-RC (*prereplicative complexes*) en préparation du cycle cellulaire suivant en détruisant les cyclines associées aux CDK1 (Zachariae *et al.* 00).

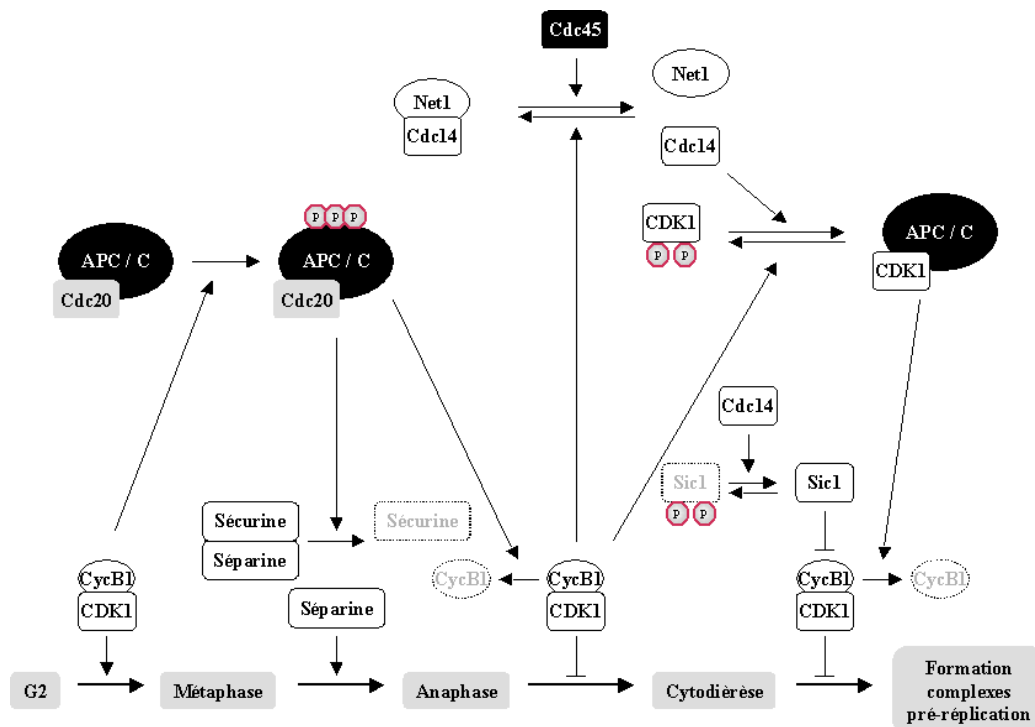


Fig. 26. Détails des interactions entre la cycline B et le complexe APC de la phase S jusqu'à la phase M (modifié d'après Zachariae *et al.* 00).

d. Conclusion

Même s'il reste quelques zones de doute, les contrôles moléculaires de la transition S/G₂/M sont mieux compris que ceux des transitions G₁/S ou de l'initialisation de la différenciation. Elles n'en sont pas pour autant simple et comportent de nombreuses boucles de régulations positives (e.g. cycline B-Cdk1/Cdc25c) ou négatives (e.g. relation cycline B-Cdk1/APC).

6. Réseaux de contrôle moléculaires du cycle cellulaire

a. Introduction

La vision des contrôles du cycle cellulaire que nous avons présenté est très simplifiée. L'appréhension dans leur ensemble des données disponibles actuellement permet de comprendre que cette vision n'est pas fausse mais incomplète. Par exemple, nous avons introduit la cycline D comme un nœud de convergence de plusieurs signaux d'origine extra-cellulaires positifs et négatifs, i.e. mitogéniques ou anti-mitogéniques. Mais la cycline D n'est pas la cible directe de ces signaux, ou plutôt de tous ces signaux, et de nombreux gènes sont exprimés avant elle : les gènes de réponse précoce (*immediate early genes*). Ces premières étapes sont mal connues ou sujettes à de nombreuses polémiques. En effet, il n'y a pas si longtemps notre connaissance du contrôle de la prolifération cellulaire se limitait à une chaîne d'événements débutant avec l'interaction de récepteurs de croissance et leurs récepteurs spécifiques à la membrane des cellules. Loin de former des voies de signalisation parallèles et parfois redondantes, ces contrôles forment un ensemble de régulations liées les unes aux autres en de nombreux points. La notion de réseau de contrôle de la prolifération développée dorénavant découle directement de ce point de vue et implique à la fois des mécanismes intra et intercellulaires. Ces mécanismes moléculaires de régulation peuvent alors être considérés comme des nœuds connectés par des réactions biochimiques. Les connaissances des contrôles moléculaires de la prolifération cellulaire sont maintenant si nombreuses, détaillées et complexes qu'il faut des cartes pour retrouver son chemin dans ce labyrinthe (**Kohn, 99**). La question de la représentation et de l'organisation de ces connaissances est d'autant plus cruciale que de nouvelles techniques d'études de l'expression des gènes sur une très grande échelle, notamment les puces à ADN (*microarrays*), laissent envisager une augmentation considérable des quantités de données disponibles dans le domaine.

Même si une énumération exhaustive de tous les nœuds et connections du réseau de contrôle de la prolifération semble impossible, les paragraphes suivant s'efforceront d'en donner un aperçu et de souligner ainsi la complexité du réseau et la nécessité de disposer d'outils permettant une meilleure appréhension de celle-ci.

b. De l'environnement vers la cellule

Dans un tissu, les cellules sont sans cesse soumises aux signaux exogènes qu'elles reçoivent. Plusieurs familles de molécules trans-membranaires sensibilisent la cellule à son environnement : récepteurs tyrosine kinase, récepteur sérine kinase, cytokines membranaires, protéines G, intégrines, cadhérines et certainement d'autres encore (**Fig. 27**). Certaines ne semblent posséder qu'un rôle de régulation de la prolifération alors que d'autres présentent un éventail d'activités différentes : régulation de la mobilité et de l'adhérence cellulaire, reconnaissance de substrats, modification de l'environnement, etc.

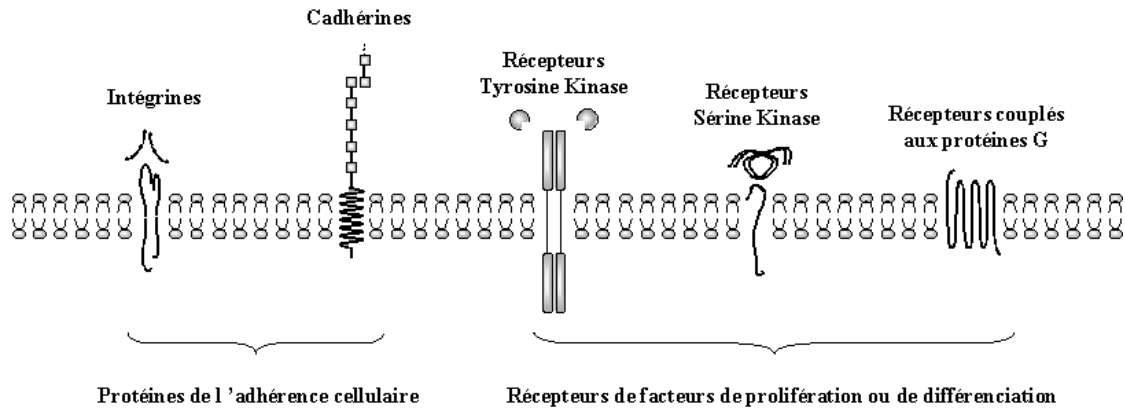


Fig. 27. Molécules membranaires impliquées dans le contrôle du passage G1/S.

i. Récepteurs trans-membranaires

- Récepteurs tyrosine kinase

Les récepteurs tyrosine kinase (TKR) forment un grand groupe de protéines transmembranaires. On distingue en général les familles de récepteurs à PDGF, EGF, NGF, FGF, CSF, insuline (IGF) et *stem cell factor*. Ces familles contiennent elles-mêmes un nombre variable de membres. La famille EGFR contient quatre membres HER1 (c-erbB1, EGFR), HER2 (c-erbB2), HER3 (c-erbB3) et HER4 (c-erbB4). Parmi ces protéines, les EGFR et les IGF sont deux cas particuliers puisque les récepteurs sont internalisés après activation (**Leof 00**). Cette différence de sous localisation cellulaire ne semble pas affecter les mécanismes de bases de l'activité des EGFR (**Haugh et al. 99**).

A l'exception des IGF, récepteurs tyrosine kinases dimériques de l'insuline, ces protéines sont des monomères transmembranaires qui s'assemblent généralement en homo- ou hétérodimères lorsqu'elles lient un ligand grâce à leur partie N-terminale extracellulaire. Cette dimérisation entraîne des changements conformationnels des protéines, une autophosphorylation (*trans*), la liaison à haute affinité et l'activation de protéines SH2 ou PTB cytoplasmiques ou associées à la face interne de la membrane plasmique et finalement leur dégradation dans des lysosomes (**Denhardt 99**, **Pawson et al. 95** et **Pustzai et al. 93**).

Des sites très spécifiques des TKR sont dédiés à la liaison et l'activation de protéines dites adaptatrices contenant des domaines SH2 ou PTB. Ces sites sont très bien connus dans le cas du récepteurs à PDGF (**Fig. 28**). Src (mais aussi Fyn et Yes) peuvent se lier à la fois en Y579 ou Y581 alors que Shc peut lier Y579 (site de préférence), Y740, Y751 ou Y771 (**Denhardt 99**). On le voit ces protéines ne peuvent pas se lier toutes en même temps aux sites disponibles et peuvent entrer en compétition pour l'accès aux sites les plus attractifs. L'affinité des protéines adaptatrices avec le site est très dépendante de sa composition en acides aminés. Les données concernant les autres récepteurs de type TKR manque de précision et même si l'activation de EGFR entraîne une activité 3 fois plus importantes de Src (**Abram et al. 00**), les sites d'interaction des deux protéines ne sont pas connus et il est possible que dans ce cas les interactions soient indirectes. Elles pourraient impliquer un autre récepteur comme HER2.

Les TKR interviennent dans la signalisation de voies impliquant Ras (par l'association de SOS avec Grb2 ou Grb2/Shc), Src, PI3-K et PLC γ . Expérimentalement, il semble très difficile de juger de l'indépendance des voies entre elles. Cependant les récepteurs PDGFR, EGFR et CSF-1 semblent activer deux voies différentes : une voie Ras dépendante résolue par l'augmentation de l'activité des facteurs de transcription Fos/Jun et une voie Src dépendante résolue par l'augmentation de l'expression de Myc (**Barone et al. 95** et **Gotoh et al. 97**).

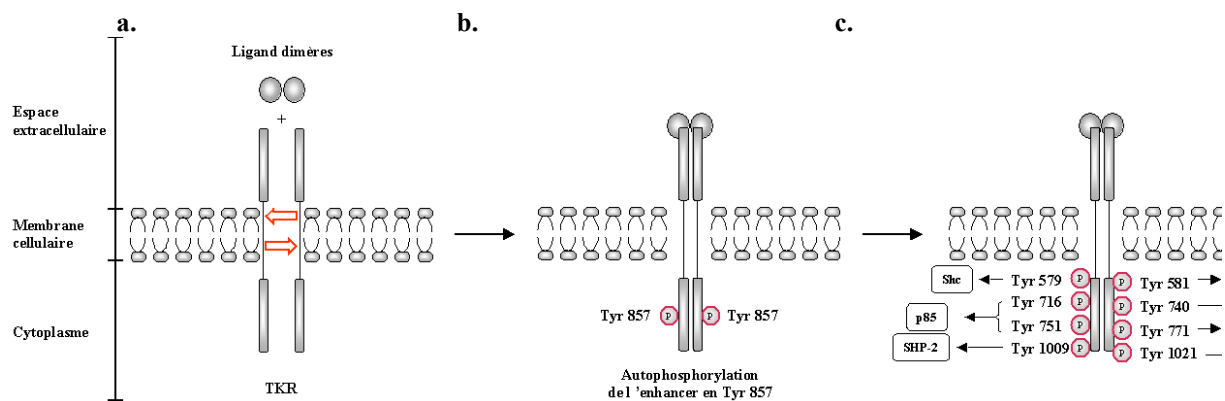


Fig. 28. Mécanisme d'action des TKR (exemple de PDGF ou EGFR) : a. Dimérisation du récepteur après liaison du ligand, b. Autophosphorylation de la partie cytoplasmique du dimère et c. Autres sites d'autophosphorylation et leur ligands (modifié d'après Denhardt 99).

Les techniques de puces à ADN ont permis d'étudier les gènes dont l'expression est contrôlée par les signalisations TKR dépendantes sur une grande échelle (**Fambrough *et al.* 99**). Un même type de TKR semble capable d'activer l'expression de groupes de gènes de réponse précoce distincts (*clusters*).

- Récepteurs sérine kinases (SKR)

La super famille de récepteurs SKR contient deux groupes de protéines partageant des similarités structurales mais possédant des fonctions légèrement différentes (**Zimmerman *et al.* 00**). Les SKR de type I sont les ALK (*activin-like kinases*) (**Zimmerman *et al.* 00**). Les SKR de types II comprennent les récepteurs TGF β (*transforming growth factor β*), les BMP (*bone morphogenic proteins*) ou les GDF (*growth and differentiation factor*) entre autres (**Christian *et al.* 99**). Ce sont des molécules impliquées dans la signalisation de cellule à cellule, bien que des différences dans le rayon d'action des ligands de ces récepteurs aient récemment été rapportées (**Christian 00**). Les récepteurs SKR jouent un rôle important dans divers contrôles allant de la régulation de la prolifération et de la différenciation dans les organismes adultes à la détermination cellulaire ou encore la formation de patrons et l'organogenèse. Parmi cette gamme de fonctions assez large, les récepteurs TGF β se révèlent ici très intéressants en tant que médiateurs de la différenciation ou plus exactement comme régulateur négatif de la prolifération chez les kératinocytes. Il faut pourtant insister sur le fait que cette action inhibitrice de la prolifération et activatrice de la différenciation est dépendante du type cellulaire observé, si TGF β inhibe la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes il inhibe la différenciation des cellules musculaires (**Massague *et al.* 86**).

Le mécanisme de transmission de l'information par les récepteurs SKR est très conservé parmi toutes ces protéines : un ligand de la famille TGF β se lie tout d'abord à un groupe homo-oligomérique de récepteurs SKR de type II (dans le cas de BMP ce récepteur est indifféremment de type I ou II). La liaison de ce ligand stimule alors le recrutement de récepteurs SKR de type I pour former un complexe hétérodimérique à la surface de la cellule (**Fig. 29**). A la suite de la formation de ce complexe les récepteurs de type II trans-phosphorylent les récepteurs de type I (**Christian 00**). Les récepteurs de type I peuvent alors transmettre ce signal activateur en phosphorylant directement des protéines Smad de classe I (appelées aussi R-Smad). Ces protéines Smad de classe I forment ensuite des complexes hétérodimériques en se liant aux protéines Smad de classe II (appelées aussi Co-Smad), les complexes sont alors transloqués jusqu'au noyau où ils peuvent jouer comme activateurs de la transcription soit directement soit par le biais d'interactions avec d'autres facteurs de transcription (**Padgett *et al.* 98** et **Zimmerman *et al.* 00**).

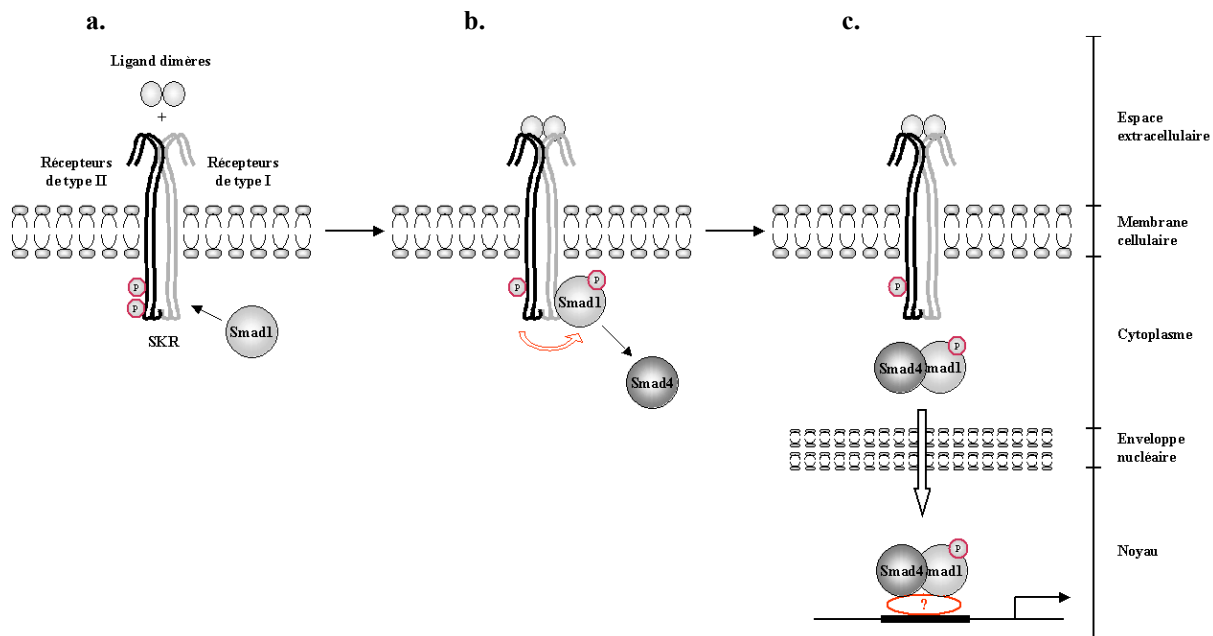


Fig. 29. Mécanisme d'action des SKR : exemple des récepteurs TGF β (d'après Christian *et al.* 99 et Zimmerman *et al.* 00).

Il existe une grande spécificité des interactions entre SKR et Smad (**Tab. 8**). Le nombre de ligand connus, beaucoup plus important que celui de récepteurs, suggère que tous les récepteurs de cette famille ne soient pas encore découverts.

Tab. 8. Médiateurs moléculaires des voies de signalisations SKR dépendantes (d'après Zimmerman *et al.* 00).

Ligand	SKR de type II	SKR de type I	R-Smad	Co-Smad
TGF β	T β RII	ALK5	Smad2 Smad3	Smad4
Activin	ActRII ActRIIB	ALK4	Smad2 Smad3	Smad4
BMP 2/4	BMPRII ActRII	ALK3 ALK6	Smad1 Smad5 Smad8	Smad4

Les protéines Smad sont des facteurs de contrôle de la transcription lorsqu'elles sont associées au domaine de liaison à l'ADN de protéines hétérologues. La protéine Smad4 étant commune à toutes les voies de signalisation SKR dépendante c'est la protéine R-Smad qui donne sa spécificité au signal.

La localisation membranaire des protéines Smad semble être assurée par des protéines spécifiques. La protéine SARA joue ce rôle de modulateur positif de l'activation TGF β dépendante en liant la protéine Smad 2 non phosphorylée. La phosphorylation de Smad2 par les récepteurs TGF β entraîne la dissociation du complexe Smad2-SARA et la formation du complexe Smad2-Smad4. Le rôle de la protéine SARA serait donc de conserver les protéines Smad2 à proximité des récepteurs de TGF β . Si la spécificité de SARA envers Smad 2 est avérée cette protéine pourrait appartenir à une famille de protéines adaptatrices encore inconnue à ce jour et dont le rôle s'apparenterait à celui des protéines adaptatrices des voies TKR (Zimmerman *et al.* 00).

Deux systèmes principaux sont impliqués dans le contrôle négatif des voies SKR dépendantes. Tout d'abord elles pourraient s'autoréguler par l'intermédiaire de boucles de rétrocontrôle négatif. Il a en effet été montré que l'expression de protéines antagonistes des Smad (Smad6 et Smad7) est activée de façon SKR dépendante

(**Christian et al. 99**). Ces protéines empêchent la formation des complexes Smad actifs en se liant au complexe récepteur SKR et en empêchant la phosphorylation des protéines de types R-Smad. De plus la destruction des protéines Smad serait régulée par des systèmes à ubiquitine. Une protéine spécifique nommée Smurf-1 (*Smad ubiquitination regulatory factor 1*) présentant une grande homologie avec l'ubiquitine ligase E3 a d'ailleurs été identifié chez la drosophile (**Zimmerman et al. 00**).

La régulation de l'expression de gènes spécifiques par les complexes Smad après leur transport à l'intérieur du noyau peut être positive ou négative. Dans les deux cas, cette régulation fait intervenir des protéines spécifiques. La liaison des complexes Smad avec des protéines FAST, des protéines de la famille AP-1 (comprenant entre autres c-Jun et c-Fos), des facteurs de transcription TFE-3 ou encore des récepteurs nucléaires de la vitamine D (**Zimmerman et al. 00**) est nécessaire à la régulation positive de la transcription de nombreux gènes. TGF β régule positivement l'expression de p15, p16, p21 et p27 par la trans-activation du facteur de transcription elk et/ou de facteurs de transcription de la famille SP-1 (**Hu et al. 99** et **Reynisdottir et al. 95, 97**). Les complexes Smad pourraient aussi déréguler l'expression de certains gènes en interagissant avec des inhibiteurs de transcription, par exemple avec Hoxc-8, inhibiteur de l'expression de l'ostéopontine, une protéine impliquée dans la morphogenèse des os (**Zimmerman et al. 00**).

TGF β régule négativement CDC25A au niveau de la transcription (**Iavarone et al. 97**) il est aussi indirectement impliqué, au travers d'une voie pRb dépendante, dans la suppression de l'expression des protéines c-myc (**Dagnino et al. 93**), cycline A, cycline E (**Nagahara et al. 99**), CDK2 et CDK4 (**Inohara et al. 95**). Les mécanismes de ce contrôle restent à découvrir.

Au premier abord, les voies de signalisation SKR semblent assez linéaires. Malheureusement, la réalité est beaucoup plus complexes et des interactions avec d'autres systèmes de contrôle existent aux niveaux cytoplasmique et nucléaire. Les voies TKR dépendantes semblent pouvoir contrôler les voies SKR dépendantes positivement et négativement. Par exemple, les voies EGF et HGF peuvent induire la phosphorylation de Smad1, inhibant de fait son accumulation nucléaire en favorisant sa rétention cytoplasmique. Cette phosphorylation est catalysée par la famille de MAP kinases Erk (**Kretzschmar et al. 97**). Mais d'autres auteurs ont montré que les mêmes voies EGF et HGF peuvent phosphoryler Smad2 et activer ainsi l'expression de gènes Smad2 dépendants.

De plus une nouvelle voie SKR dépendante a été identifiée très récemment (**Petritsch et al. 00**) qui induirait l'arrêt en phase G₁ du cycle cellulaire. La liaison de TGF β à son récepteur induit son association avec la protéine phosphatase 2A (PP2A). Ensuite 3 sous-unité de PP2A s'associent avec p70^{SKK} entraînant sa déphosphorylation et son inactivation. TGF β pourrait donc contrôler la progression du cycle cellulaire de façon transcriptionnelle et traductionnelle.

On le voit, il reste beaucoup à faire pour décrire complètement les voies de signalisation SKR dépendantes qui semblent, à l'instar des voies TKR dépendantes, ressembler de plus en plus à un réseau. Ici aussi, l'application de techniques de microarrays permettrait d'obtenir des informations plus complètes et systématiques sur les conséquences de l'activation de SKR sur l'expression d'une grande quantité de gènes.

- Récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR pour *G protein coupled receptor*) forment une grande super-famille de récepteurs membranaires cellulaires. Ce sont des protéines formées d'un polypeptide simple, contenant sept hélices transmembranaires, couplé à une protéine hétérotrimérique G $_{\alpha\beta\gamma}$.

Parmi les récepteurs de cette famille ayant été étudiés, on trouve les récepteurs muscariniques M1, les récepteurs adrénérgiques α_1 , les récepteurs muscariniques acétylcholine M2 (m_2 AChR) et les récepteurs adrénérgiques α_{2A} (**Denhardt 99**).

$G_{\alpha\beta\gamma}$ consiste en un hétérodimère stable $G_{\beta\gamma}$ et une sous-unité G_α liant les nucléotides guanines (GDP/GTP). La liaison d'un ligand au récepteur associé à une protéine G_α entraîne des changements conformationnels résultant dans le remplacement du GDP de la sous-unité G_α par un GTP. Les sous-unités G_α et $G_{\beta\gamma}$ se dissocient et deviennent des molécules actives liées à la membrane. Ces sous-unités interviennent comme inhibiteurs ou activateurs de la prolifération en utilisant des messagers secondaires de type AMPc, DAG et phosphates inositols qui semblent posséder une activité en amont des cascades de phosphorylation cytoplasmiques telles que décrites plus loin.

Rôle de la sous-unité G_α

Vingt sous-unités G_α différentes ont été identifiées qui permettent la classification des protéines $G_{\alpha\beta\gamma}$ en quatre familles : α_s et α_{olf} , α_i et α_o , α_q et α_{12-13} . Les sous-unités α_s et α_{olf} , activent les adénylates cyclases et les canaux Ca^{2+} , les sous-unités α_i et α_o , inhibent les adénylates cyclases et contrôlent les canaux K^+ et Ca^{2+} et activent les GMPc phosphodiesterases, les sous-unités α_q activent la phospholipase C β et les sous-unités α_{12-13} stimulent les échanges $Na^+ H^+$.

La fonction GTPase de la sous-unité α des protéines G lui confère un mode d'action et de régulation proche de celui des petites GTPases membranaires de la famille p21^{GTPase}. Ainsi des protéines RGS (*regulator of G protein signaling*) régulent la signalisation GPCR dépendante en accélérant l'hydrolyse du GTP associé à la sous-unité α . L'hétérotrimère $G_{\alpha\beta\gamma}$ peut alors se reconstituer.

Rôle de la sous-unité $G_{\beta\gamma}$

Six sous-unités β et douze sous-unités γ ont été identifiées. Quand elles se sont dissociées de la sous-unité α , elles peuvent interagir avec la partie C-terminale des domaines PH de certaines protéines et stimulent leur activité, notamment Rho. Cette sous-unité reste attachée à la membrane plasmique par la sous-unité γ . Ceci permet à cette protéine d'attirer vers la membrane les protéines qu'elle peut lier et activer, suite à leur association induisant un changement conformationnel.

Les sous-unités $G_{\beta\gamma}$ interviennent dans l'activation de plusieurs protéines différentes. L'activation de cascades cytoplasmiques par $G_{\beta\gamma}$ débouchant sur ERK nécessite l'activité de Ras mais pas celle de PKC. Le sous-groupe de MAPK JNK/SAPK peut-être activé, de façon Raf indépendante, par des GPCR par l'intermédiaire de $G_{\beta\gamma}$. $G_{\beta\gamma}$ recrute PI3-K vers la membrane plasmique. Celle-ci peut ainsi stimuler Src qui lui-même va phosphoryler Shc qui active Ras par une interaction avec Grb2/SOS. Il s'agit d'un mécanisme en apparence similaire à celui de l'activation de Ras par les récepteurs tyrosine kinase (**Denhardt 99**). Cependant, chaque sous-unité $\beta\gamma$ semble interagir avec des protéines de type Src spécifiques, par exemple $G_{q\alpha\beta\gamma}$ avec Csk et Lyn alors que $G_{i\alpha\beta\gamma}$ interagit avec Btk.

Dans certaines lignées cellulaires incapables d'exprimer G_{α_o} , plusieurs protéines deviennent exprimées constitutivement : la phosphatidylcholine phospholipase C, la DAG et la phosphorylcholine. De plus, même en l'absence de facteurs mitogènes, une présence élevée de $G_{\beta\gamma}$ libre active constitutivement à la fois les voies Ras/ERK et le complexe cycline D-CDK4/6 (**Denhardt 99**). Ces données soulignent la spécificité de l'implication des sous-unités $G_{\beta\gamma}$ à la fois dans la régulation de l'activité des cascades cytoplasmiques au niveau transcriptionnel ainsi que son influence sur l'activité des complexes cycline D-CDK4/6.

On a montré qu'elles activent des facteurs de transcription par l'intermédiaire des voies Ras/Raf (**Dhanasekaran et al. 98**).

Des évidences expérimentales récentes montrent la transactivation de TKR tels que le récepteur EGFR, PDGFR et les récepteurs à IGF dans la signalisation GPCR dépendante (Abram *et al.* 00). Deux mécanismes semblent possibles. Les GPCR pourraient activer les kinases Src qui s'associeraient alors avec les TKR et les activeraient. Ou alors les GPCR pourraient utiliser les TKR pour recruter et activer Src. Dans tous les cas, les TKR semblent indispensables à l'activation Src dépendante des cascades MAPK cytoplasmiques (Fig. 30).

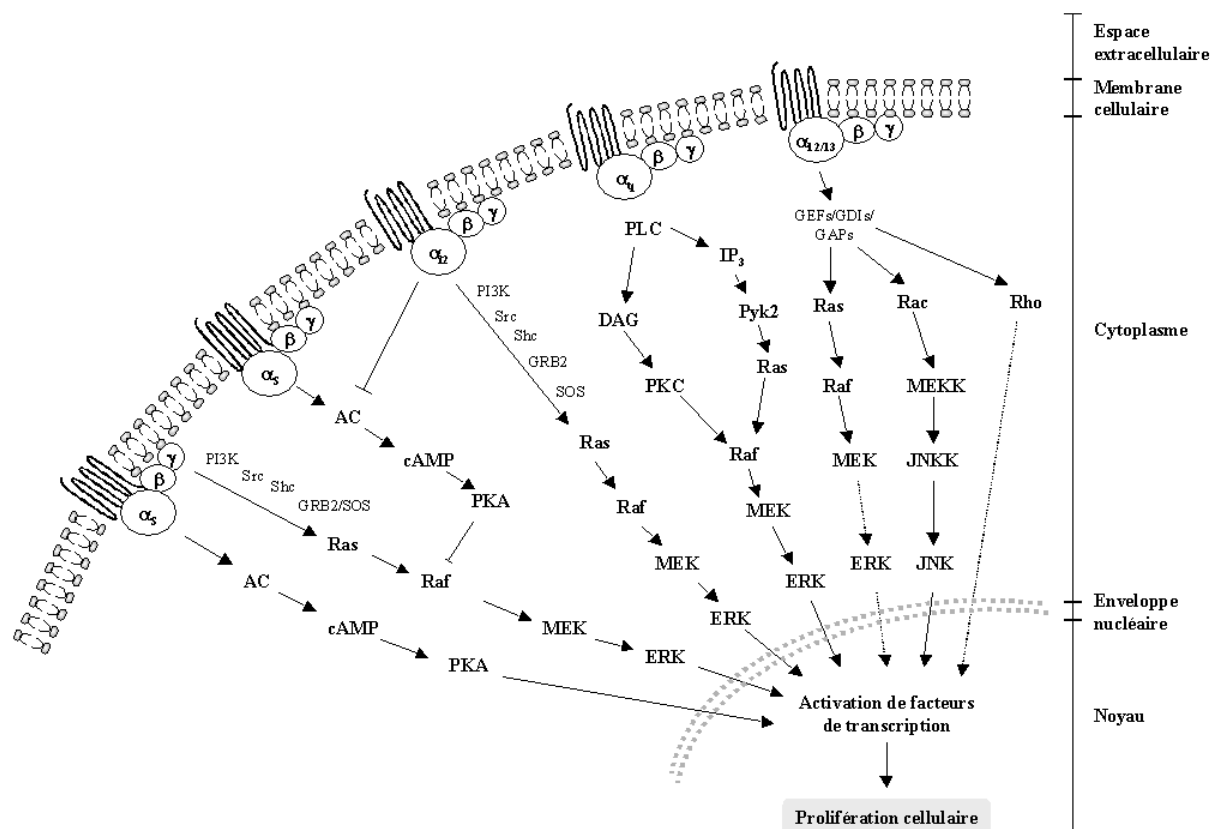


Fig. 30. Action des protéines G et de leurs récepteurs associés dans le contrôle de la prolifération cellulaire (modifié d'après Denhardt 99).

ii. Rôle des molécules d'adhérences

L'incapacité des cellules normales non-adhérentes à entrer dans le cycle cellulaire démontre sans équivoque l'implication de l'adhérence cellulaire dans le contrôle de la prolifération. Cette implication intervient tout au long du cycle cellulaire. Si l'adhérence est essentielle à la cellule pour induire la cellule dans la prolifération, elle est aussi essentielle à l'accomplissement du cycle cellulaire et au contrôle de la localisation des cellules filles après la division. Il n'est donc pas étonnant de voir à quel point les contrôles de l'adhérence et de la prolifération cellulaire sont liés et combien chacun des appareils moléculaires de ces contrôles emprunte à l'autre. En effet, le caractère non proliférant des cellules en suspension est principalement corrélé à l'augmentation de l'expression des CKI p21 et p27 (environ 4 fois plus) et à la baisse de la phosphorylation de CDK2 sur la Thr-160 (Fang *et al.* 96). De plus, les cellules en prolifération et capables d'adhérence cellulaire régulent positivement l'expression et la traduction de l'ARNm de la cycline D1, de la cycline E et de la cycline A, l'activité du complexe par l'inhibition de p27^{KIP1} et p21^{Cip1} en début de phase G₁ (Zhu *et al.* 96). La perte de l'adhérence résulte dans l'augmentation de la quantité de mRNA de p27 chez les cellules normales (Denhardt 99).

En tant que principales protéines responsables de l'adhérence cellulaire, les intégrines (interactions cellule-MEC) et les cadhérines (interactions cellule-cellule) sont de bonnes candidates médiatrices de la prolifération

par des interactions directes et/ou collaboratrices d'autres voies de signalisation comme celles liées aux facteurs de croissance et aux récepteurs couplés aux protéines G (GPCR).

- Intégrines

Nous l'avons vu dans le cas des kératinocytes, les intégrines assurent l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire et, le cas échéant, à la membrane basale. La structure transmembranaire des intégrines leur permet d'être des transducteurs de signaux de la surface de la cellule vers son cytoplasme (**Giancotti 97** et **Wang et al. 93**) à la façon des récepteurs aux facteurs de croissance dont elles partagent une partie des voies de signalisation cytoplasmiques. Les nombreux ligands que peuvent lier spécifiquement les quelques 22 intégrines connues suggèrent une grande variété dans la signalisation intégrine dépendante (**Bernard et al. 00**). La signalisation intégrine dépendante peut-être directe lorsque la liaison au ligand et l'agrégation d'intégrines en adhésions focales est le seul stimulus extracellulaire. Dans de telles conditions les intégrines peuvent activer des protéines tyrosine kinases cytoplasmiques (e. g. la FAK – *focal adhesion kinase*) et des protéines Ser/Thr kinases (du type des protéines des cascades MAPK), induire les transports ioniques membranaires (Ca^{2+} , Na^+/H^+) et des enzymes de type ILK (*integrin linked kinase*) ou PI3-K (**Howe et al. 98**). Elle peut aussi être indirecte et moduler la signalisation de récepteurs de facteurs de croissance et de récepteurs associés aux protéines G par le biais d'interactions dites collaboratives (**Howe et al. 98** et **Huang et al. 98**).

Ces deux types de régulations impliquent des protéines communes, notamment des GTPases. Si les intégrines sont en amont de différentes voies parallèles régulées par des membres de la famille de GTPases Rho et Ras (**Clark et al. 98**), la capacité des intégrines à s'agréger est elle-même contrôlée par ces mêmes GTPases (**Howe et al. 98**). Cette propriété donnant certainement à la cellule la possibilité de passer du mode affinité au mode avidité de façon cycle cellulaire dépendante.

Intégrines et cascades MAPK

La partie C-terminale interne des intégrines interagit avec de nombreuses protéines : des protéines kinases (FAK, Src) et des protéines structurales (paxilline, α -actinine, taline et vinculine). Les FAK et les protéines Src sont recrutées et activées par les intégrines. L'autophosphorylation activatrice de FAK (Tyr-397) associée à la sous-unité $\beta 1$ des intégrines est réalisée lors de l'agrégation des hétérodimères d'intégrines induite par la liaison à leur substrat. La FAK peut alors lier et activer Src. L'activation d'autres protéines telles que la paxilline, la tensine et la protéine p130^{CAS}⁵ (*Crk-associated substrate*) implique FAK et/ou Src. Ces protéines peuvent alors interagir avec d'autres protéines, comme la PI3-K, Shc ou Grb2/SOS, en formant des complexes capables d'initier une signalisation cytoplasmique ou d'interagir avec des TKR (**Denhardt 99**).

A son tour p130^{CAS} active p70^{S6K}, une protéine Ser/Thr kinase qui fait partie de l'appareillage ribosomique traductionnel de la cellule. C'est un exemple de voie de contrôle de la traduction protéique.

L'activation de PI3-K par FAK ou Src entraîne l'augmentation des niveaux de PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃ et pourrait ainsi activer Raf directement de façon Ras indépendante (**Denhardt 99**). Cette voie débouche sur l'activation de la cascade MAPK/ERK. Parallèlement, une voie Ras dépendante (**Fig. 31**) impliquant les intégrines existe via Shc et Grb2/SOS. Cette voie pourrait être un point de convergence de signaux intégrines et de signaux TKR dépendants (**Dedhar 00**).

⁵ La famille des protéines Cas contient trois membres (p130^{CAS}, HEF1/Cas-L et Efs/Sin) qui pourraient être impliquée dans de nombreux mécanismes de contrôle aux côtés des intégrines –prolifération, apoptose, différenciation – mais beaucoup reste à faire pour éclaircir les choses (**O'Neill et al. 00**).

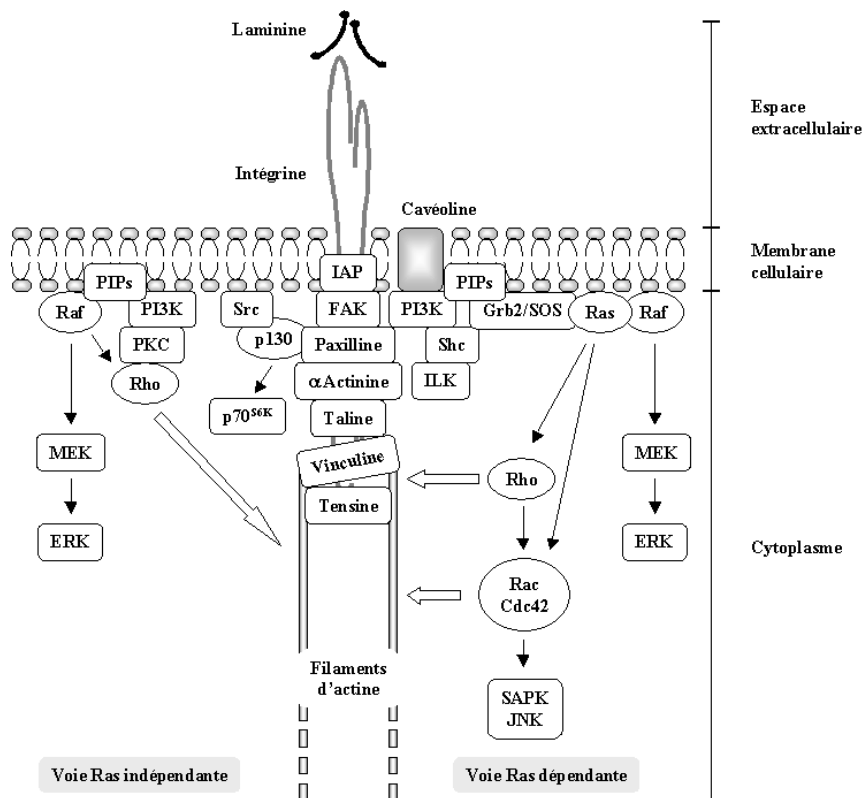


Fig. 31. Action des intégrines $\beta 1$ dans la signalisation des voies MAPK cytoplasmiques au sein des adhésions focales (d'après Alberts *et al.* 94, Aplin *et al.* 99, Dedhar 00, Denhardt 99, Giancotti *et al.* 97 et Howe *et al.* 98).

Dans un tissu, les intégrines de la plupart des cellules sont engagées dans des liaisons avec la MEC. La régulation des cascades MAPK ne doit donc pas être drastique et globale permettant à la cellule de « passer du tout au rien » mais plutôt permettre un contrôle très fin et local de l'adhérence et de la contractilité cellulaire, régulant ainsi la mobilité cellulaire.

Intégrines et TKR

Le deuxième type de contrôle intégrine dépendante est la modulation des voies de signalisation TKR dépendantes. Cette modulation peut intervenir au niveau des récepteurs eux-mêmes, au niveau des effecteurs cytoplasmiques de ces récepteurs (principalement les cascades MAPK) et aussi au niveau de l'expression des gènes codant pour ces récepteurs.

La signalisation intégrine dépendante seule ne permet pas aux cellules de se diviser (Howe *et al.* 98). Cependant, il a été démontré que EGF ne pouvait activer ERK chez les fibroblastes que si les intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ étaient activées et agrégées (Denhardt 99). Dans ce cas l'agrégation des intégrines contrôle l'agrégation et l'état d'activation des TKR, ce qui nécessite un contrôle situé en amont de Ras jusqu'à présent non identifié (Howe *et al.* 98). Dans certains cas les intégrines pourraient lier les TKR et les activer même en l'absence de facteurs de croissances et de ligands pour les intégrines (Howe *et al.* 98), ceci reste surprenant.

La protéine Ser/Thr kinases ILK est aussi impliquée dans la signalisation au niveau des adhésions focales (Fig. 32). Il s'agit d'une kinase activée par association avec les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ (Dedhar 00) mais aussi par les TKR, par l'intermédiaire des protéines Pinch et de PI3-K. Elle inhibe directement par phosphorylation GSK-3, une kinase qui phosphoryle la β -caténine, un cofacteur de transcription, entraînant sa dégradation par ubiquitination (Aplin *et al.* 99 et Dedhar 00). Le promoteur du gène de la cycline D1 contient un site de liaison LEF-1 permettant la transcription β -caténine dépendante de la cycline D1 (Shtutman *et al.* 99). L'activité transcriptionnelle de la β -caténine est inhibée par les cadhérines (voir partie suivante). GSK-3 régule aussi

l'expression et la dégradation de la cycline D1 et son inhibition entraîne la stabilisation et l'accumulation de la cycline D nucléaire (**Dedhar 00**).

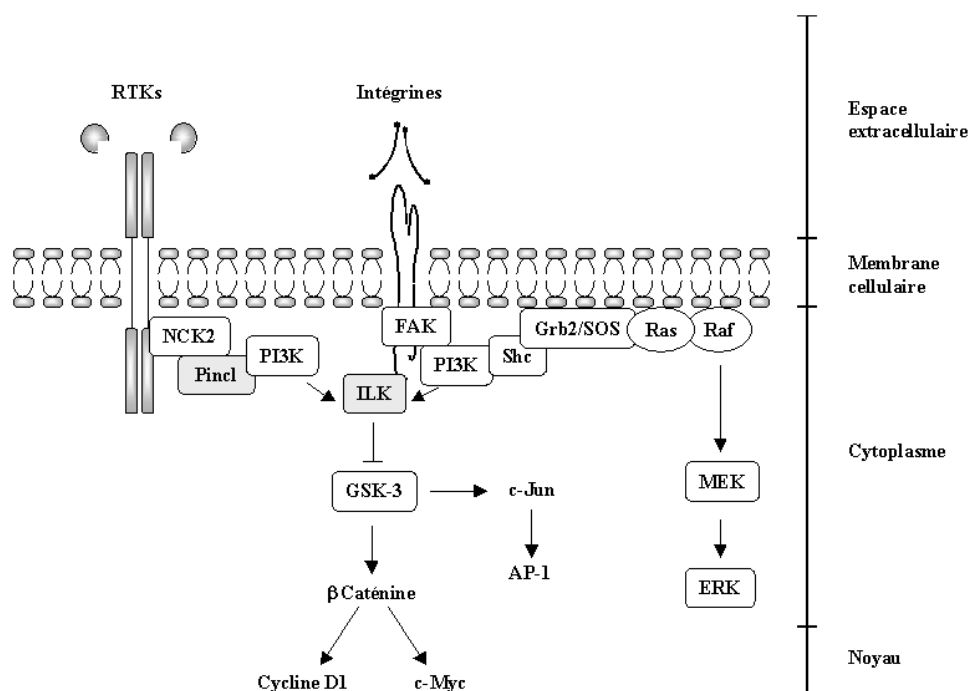


Fig. 32. Voies ILK, intégrines et TKR dépendantes au sein des adhésions focales (d'après Dedhar 00).

Cas particulier des intégrines $\alpha 6 \beta 4$

Le cas des intégrines $\alpha 6 \beta 4$ est un peu particulier. En effet, ce sont les protéines responsables de l'adhérence des hémidesmosomes des kératinocytes basaux. L'activation des intégrines $\alpha 6 \beta 4$ par les laminines entraîne la phosphorylation de la sous-unité $\beta 4$ sur un résidu Tyr (par FAK ou Src) et le recrutement de Shc et Grb2 par le complexe $\alpha 6 \beta 4$ (**Mainiero et al. 95**). Ces recrutements permettent l'activation de Ras puis des voies MAP kinases résultant dans l'activation de Erk et Jnk (**Mainiero et al. 97**). De plus, l'activation de Erk nécessite Shc, Ras et Rho alors que l'activation de Jnk nécessite Ras, PI-3K et Rac (**Mainiero et al. 97**). Cette étude a permis de montrer que l'adhésion contrôlée par les intégrines $\alpha 6 \beta 4$ est nécessaire à la plupart des cellules pour proliférer *in vitro*.

Cadhérines

Les cadhérines sont connues comme étant des inhibiteurs de la prolifération. Ce sont les acteurs protéiques membranaires principaux de l'inhibition de contact. Des interactions homophiliques Ca^{2+} dépendantes entre les molécules de cadhérines de cellules voisines entraînent la liaison des fibres d'actine du cytosquelette à la cadhérines via des complexes protéiques contenant la β -caténine, l' α -caténine et la vinculine (**Aplin et al. 99**). La quantité de cadhérine exprimée et l'efficacité de leurs interactions avec les cadhérines des cellules voisines régule la quantité de β -caténine libre. Plus les liaisons sont fortes moins il y'a de β -caténine libre (**Fig. 33**). Ainsi, l'efficacité de l'adhésion cellule à cellule est régulée par la quantité de β -caténine libre : plus la quantité de β -caténine disponible est importante plus le potentiel d'adhérence de la cellule avec d'autres cellules est grand. Or, dans le noyau, la β -caténine est un cofacteur de transcription qui lie LEF-1 et augmente ainsi la transcription des gènes possédant un élément LEF-1 dans leur promoteur. Parmi ces gènes on retrouve ceux de la cycline D1, de Myc, de Jun et de la cadhérine E (**Aplin et al. 99** et **Kikuchi et al. 00**).

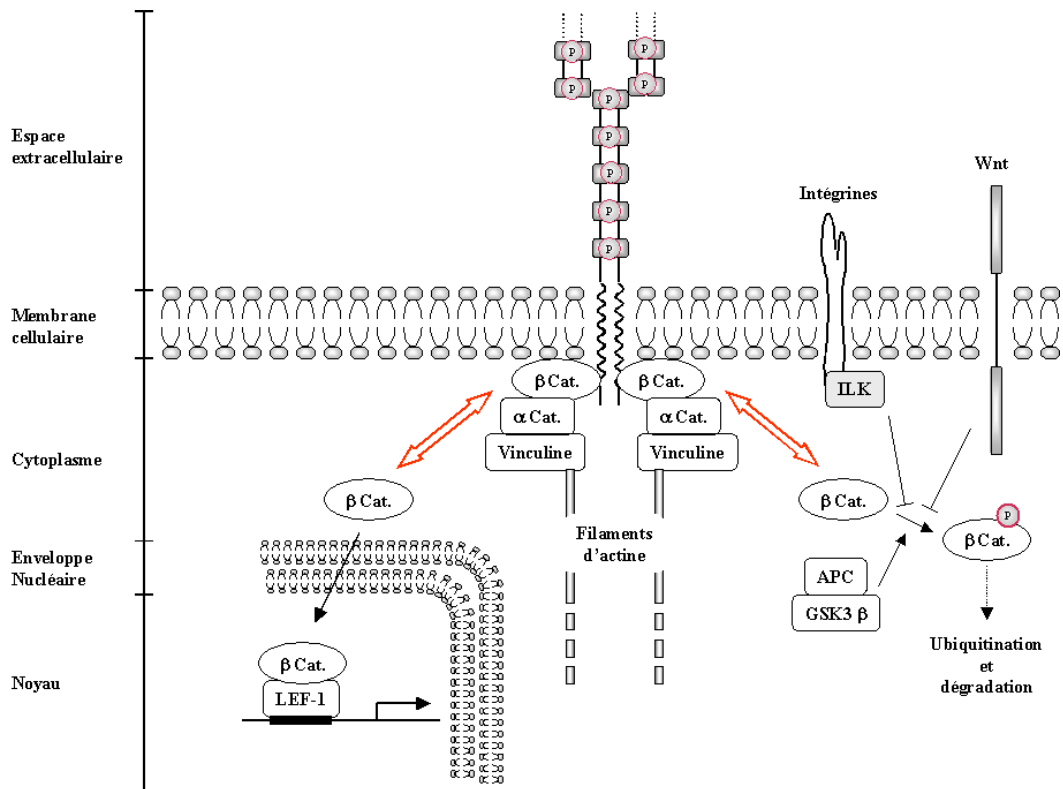


Fig. 33. Action des cadhérines dans le contrôle de la prolifération (d'après Alberts *et al.* 99 et Aplin *et al.* 99).

A la manière des intégrines vis à vis des TKR, cette voie de régulation pourrait être impliquée dans la modulation de la signalisation Wnt dépendante (Aplin *et al.* 99 et Kikuchi *et al.* 00). Wnt est un morphogène extracellulaire possédant un récepteur membranaire spécifique nommé Frizzled dont l'activation résulte en la phosphorylation de la kinase GSK-3 dont l'activité principale est la phosphorylation et l'ubiquitination de la β -caténine libre à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Kikuchi *et al.* 00). Son rôle d'inhibiteur de la β -caténine est donc proche de celui de ILK.

De plus, il a été montré que Cdc42 et Rac1, des GTPases membranaires, régulent l'adhésion cellule à cellule cadhérine dépendante en régulant l'activité d'une kinase nommée (pour l'instant) IQGAP1 (Fig. 34). Lorsque Cdc42 et Rac1 sont associées à une GDP (forme inactive), elles ne peuvent pas interagir avec IQGAP1 la laissant libre de se lier à la β -caténine. La β -caténine se dissocie alors de l' α -caténine qui maintient l'actine associée au complexe membranaire. Ce changement de configuration confère une adhérence très faible au complexe. Lorsque Cdc42 et Rac1 sont associées à une GTP (forme active), elles empêchent IQGAP1 d'interagir avec la β -caténine. Le complexe possède alors son adhérence la plus forte (Kaibuchi *et al.* 99).

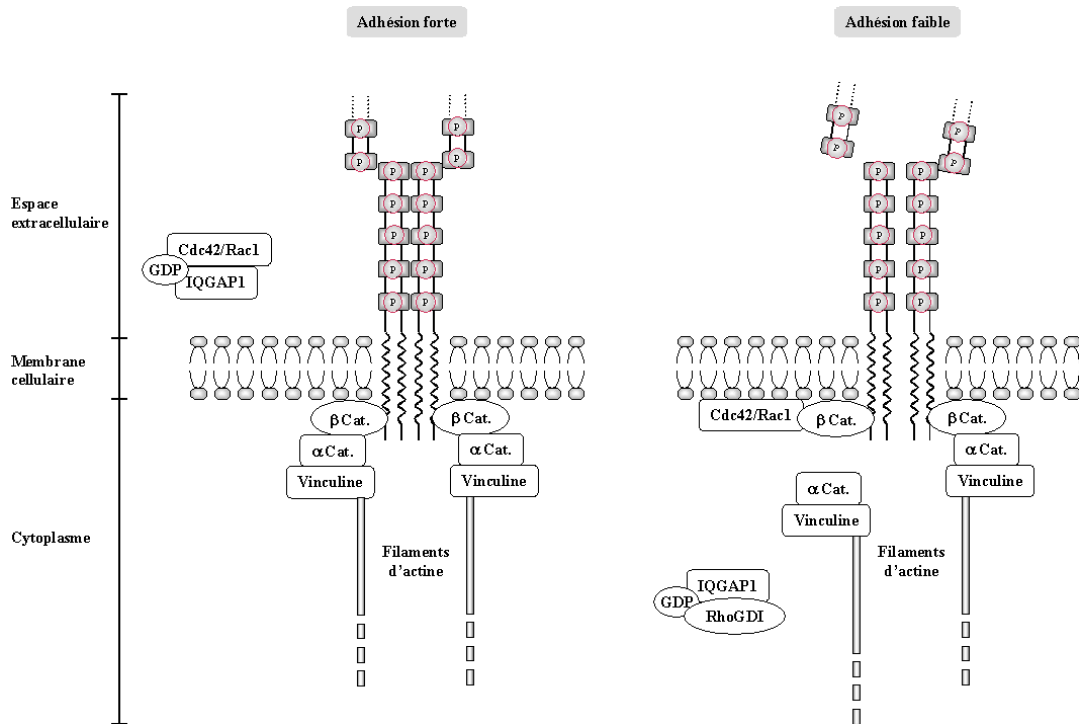


Fig. 34. Rôle des protéines Cdc42/Rac1 et IQGAP1 dans la régulation de l'adhérence cellule à cellule cadhérine dépendante (d'après Kaibuchi *et al.* 99).

L'activation de Rac est d'ailleurs suffisante pour supprimer l'adhérence cellule à cellule cadhérine dépendante (Braga *et al.* 00). Ce dernier mécanisme implique des protéines de la même famille que celles retrouvées dans les signalisations TKR et intégrines dépendantes permettant d'envisager des interactions possibles avec ces différentes voies. Même si celles-ci ne sont pas encore comprises, des travaux très récents (Pece *et al.* 00) ont montré que les cadhérines E sont capables de réguler les signaux TKR dépendants.

De plus, le rôle de p27^{KIP1} dans la suppression de la prolifération cadhérines E ou N dépendante a été démontré (Levenberg *et al.* 99 et St. Croix *et al.* 98). p16^{INK4} est aussi impliquée dans le contrôle de l'inhibition de contact (Wieser *et al.* 99). Nous l'avons vu, ces protéines sont des inhibiteurs de la phosphorylation de pRb et donc de la prolifération. Il n'est donc pas étonnant de les retrouver impliquées dans ce processus. Contrairement aux mécanismes liant les cadhérines à la régulation de l'expression de la cycline D1, les mécanismes moléculaires concernés ne sont pas encore connus.

b. De la membrane au noyau : les voies d'intégration de signaux

La notion de réseau prend toute sa signification quand elle est appliquée à la signalisation cytoplasmique. La quantité de protéines est impressionnante et de nouvelles protéines ou de nouveaux isoformes de protéines connues sont identifiées presque tous les jours... sans compter les protéines identiques portant des noms différents.

Deux types de systèmes de signalisation principaux sont connus dans la transmission de signaux mitogènes :

- Ceux basés sur les protéines de la super famille des protéines Ras/p21^{GTPase} dont les échanges se font par des protéines activatrices de GTPase ;
- Ceux basés sur les protéines de la famille des protéines kinases MAPK (ERK, JNK/SAPK, p38/RK), MAPKK (MEK, SEK, MKK) et MAPKKK (Raf, MEKK, MTK, MLK).

Le premier système, les protéines de la famille Ras, joue le rôle de pivot entre les protéines trans-membranaires que nous venons de voir (récepteurs aux facteurs de croissances, intégrines, ...) et le second système, un jeu

impressionnant protéines kinases cytoplasmiques, relaie et amplifie les messages transmis de l'extérieur de la cellule par les protéines transmembranaires vers le noyau ou le cytoplasme pour contrôler l'expression de gènes et la structure du cytosquelette.

i. Protéines p21^{GTPase}/Ras ⁶

Les protéines de la « super » famille p21^{GTPase} sont des protéines associées à la face interne des membranes cytoplasmiques cellulaires (**Alberts et al. 94**). Certaines possèdent une localisation spécifique dans des microdomaines riches en cholestérol et contenant de la cavéoline appelés cavéoles (**Shields et al. 00**). On trouve encore de nombreuses publications ne faisant référence qu'à « Ras » (**Aktas et al. 97, Axelrod et al. 93, Chin et al. 99, Frame et al. 00, Gotoh et al. 97, Kerkhoff et al. 98, Shields et al. 00**) mais cette famille est vaste (**Reuther et al. 00**). Elle comprend 5 sous-familles : Ras, Rho, Rac, Ral et Cdc42 (**Denhardt 99**). La sous-famille Ras elle-même, par exemple, comprend actuellement 16 membres partageant de 100 à 45% d'homologie (dans le domaine allant du résidu 20 au résidu 48) avec la protéine H-Ras, considérée comme la référence (**Reuther et al. 00**).

Les protéines p21^{GTPases} sont activées quand une molécule de GDP associée est remplacée par une molécule de GTP lors d'un échange catalysé par une protéine de type GEF (*guanine nucleotide exchange factor*). Ces protéines GEF sont généralement trouvées en complexe avec une protéine adaptatrice contenant un site SH2 lui permettant de relier l'action de la GEF à des récepteurs tyrosine kinase membranaires ou à des intégrines (**Denhardt 99 et Frame et al. 00**). L'inactivation des protéines p21^{GTPases} est réalisée par l'intermédiaire d'une protéine paradoxalement nommée GAP (GTPase activating protein) qui peuvent aussi empêcher l'interaction des p21^{GTPase} avec les GEF une fois activée (**Denhardt 99**).

Par exemple, H-Ras est souvent trouvée associée avec la GEF SOS, elle-même complexée avec Grb2, une protéine SH2. Ce complexe pourrait être associé à la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire d'une autre protéine SH2 nommée Shc après sa phosphorylation. Les protéines adaptatrices comme Shc et Grb2 ne possèdent pas d'activités enzymatiques intrinsèques mais elles servent de lien entre deux autres protéines différentes.

Le changement de conformation de la protéine p21^{GTPase} résultant de la substitution du GDP par un GTP lui permet d'interagir avec différentes protéines parmi lesquelles : les autres p21^{GTPase} et les protéines du deuxième système introduit ci-dessus comme Raf, PI3-K, Ral-BP, PKC ζ , Ras^{GAP} et plusieurs MEKK. Ces dernières sont des protéines qui sont elles-mêmes les membres de sous-familles comprenant plusieurs isoformes possédant des caractéristiques similaires (**Denhardt 99**). Cette complexité, très rebutante au premier abord, doit être relativisée en sachant que toutes ces protéines sont loin d'être exprimées par toutes les cellules et que le pool de protéines varie souvent suivant les types cellulaires.

ii. Cascades MAPKKK-MAPKK-MAPK

A présent, trois types de cascades différentes ont été documentés chez les mammifères :

- Raf→MEK→ERK ;
- MEKK→MEK→JNK ;
- MLK→RKK→p38.

Ces cascades contiennent au moins trois protéines kinases fonctionnant en série, chaque série est appelée un module et prend le nom de la dernière protéine kinase soit ERK, JNK et p38 (**English et al. 99**). Une étude théorique a permis de montrer que si le premier niveau de la cascade, activation de MEK par Raf, sert à l'amplification du signal initial le second niveau, activation de ERK par MEK, permet de filtrer le bruit

d'activations artefactuelles initiales et d'obtenir une réponse calibrée à une intensité précise de signal en entrée (**Ferrell 97**).

- Cascades ERK

La première kinase est une protéine de la famille Raf, dont l'isoforme la plus étudiée est Raf-1. L'activation de Raf-1 nécessite Ras qui l'attire sur la surface interne de la membrane plasmique et provoque des changements conformationnels (**Denhardt 99**). Raf est phosphorylée sur plusieurs résidus par de nombreuses protéines différentes parmi lesquelles PKA, PKC, Src. Les différents patrons de phosphorylation entraînent des états d'activité variables. L'identification de l'ensemble des configurations possibles nécessite encore un lourd travail passant par l'utilisation de protéines mutantes non-fonctionnelles (**Blanchard 00**). Les phosphorylations de résidus Ser/Ser par PKA sont inhibitrices (**English et al. 99**) alors que celles effectuées sur des résidus Ser/Thr par PKC sont activatrices (**Denhardt 99**).

Une fois activée, Raf peut elle-même lier et activer MEK en phosphorylant deux résidus Ser/Thr. Cette protéine peut à son tour effectuer une double phosphorylation de résidus Tyr/Thr de ERK1 ou 2, ses deux seuls substrats identifiés (**Denhardt 99**). L'activation de ces protéines kinases nécessite cette double phosphorylation qui augmente leur activité de 1000 fois (**English et al. 99**).

- Cascades JNK

Contrairement à Raf, les protéines MEKK possèdent des localisations cellulaires très variables. La présence de MEKK1 a été observée dans le noyau et dans des vésicules post-Golgi alors que MEKK2 et 4 ont été trouvées dans des vésicules de Golgi distinctes. Elles activent de préférences des molécules MEK et peuvent donc résulter, suivant la protéine MEKK impliquée, en l'activation de ERK ou de JNK. MEKK1 est la protéine principalement impliquée dans l'activation EGFR dépendante de ERK. MEKK1 et 4 activent JNK en réponse à des signaux initialisés par Rac et Cdc42. Aucune des MEKK de cette voie ne semble impliquée dans l'activation de p38.

- Cascades p38

L'activation de p38 est réalisée par MTK1 qui agit par l'intermédiaire de MKK3, MKK6 ou SEK1 en réponse à des chocs environnementaux (choc osmotique, UV, inhibition de synthèse de protéine).

Protéines kinase C

Les protéines kinases C (PKC) sont des protéines cytoplasmiques localisées sur la face interne de la membrane plasmique lors de leur activation. Il existe environ 11 isoformes de la PKC distribués dans 3 groupes : conventionnel – activé par Ca^{2+} , le diacylglycérol (DAG) et la phosphatidylsérine - (α , β_1 , β_2 et γ), nouveau – activation Ca^{2+} indépendante - (δ , ϵ , η , θ et μ) et atypique – activation Ca^{2+} et DAG indépendante - (λ et ζ).

Les PKC sont impliquées dans les doubles phosphorylations, sur des résidus Ser/Thr, des protéines kinases impliquées dans les cascades cytoplasmiques de régulation de la prolifération cellulaire, entre autres. La plupart des PKC peuvent en effet activer la voie Raf→MEK→ERK, suggérant pour ces voies la possibilité d'une activation Ras dépendante. Bien entendu, ceci reste à définir avec précision puisque les PKC sont aussi des substrats des protéines p21^{GTPases}.

Il nous faut mentionner que dans certaines conditions les PKC possèdent une action antiproliférative, par l'action du domaine PH (*pleckstrin homology*) de certaines protéines de signalisation (**Denhardt 99**). Suivant le type cellulaire, PKC possède un effet de promotion de la prolifération et de la différenciation (**Mitev et al. 99**).

PI3-K

⁶ Attention : la famille de protéines p21^{GTPase} n'a aucun rapport avec l'inhibiteur de CDK p21^{Cip1}.

A l'instar des protéines kinases, il y'a trois classes de PI3-K. Elles phosphorylent le résidu 3-hydroxyl de phosphatidylinositol membranaire après leur stimulation par un récepteur tyrosine kinase, Ras ou des protéines $G_{\beta\gamma}$. La phosphorylation du phosphatidylinositol (4,5)biphosphate produit du phosphatidylinositol(4,5) triphosphate [PI(3,4,5)P₃] qui peut attirer des protéines supplémentaires vers la membrane par l'intermédiaire de leur domaine PH ou SH2. Les protéines concernées sont des protéines Shc, la sous-unité p85 de PI3-K, la kinase Ser/Thr Akt (une protéine possédant une forte homologie avec PKC qui est capable d'activer p70^{S6K} et la glycogène synthase kinase – GSK3) et les PKC - ϵ et - λ (**Denhardt 99**).

Src

Src est le prototype d'une famille de neuf membres de tyrosine kinase non récepteurs (Src, Fyn, Yes, Fgr, Lyn, Lck, Hck, Blk et Yrk). Parmi ces protéines, seuls Src, Fyn et Yes sont exprimées dans de nombreux types cellulaires alors que les autres semblent spécifiques des cellules hématopoïétiques et lymphoïdes.

Les protéines de types Src sont généralement trouvées sous une forme inactive résultant du masquage du domaine SH1 par les motifs SH2 et SH3. L'activation résulte de la libération du site kinase SH1 lorsque les domaines SH2 et SH3 se lient, respectivement, à une phosphate tyrosine externe ou à un motif proline ou lorsque la tyrosine phosphate de l'extrémité C-terminale est déphosphorylée (**Denhardt 99**).

Autorégulation des cascades cytoplasmiques

La plupart des protéines de type Ras, PI3-K, PKC, PLC, Src, etc. régule plus d'une voie permettant ainsi l'initialisation d'une grande variété de signaux. Pour éviter les interférences, il existe certainement de nombreux contrôles négatifs de ces voies. Même si ces contrôles négatifs sont encore mal connus, on commence à avoir quelques idées, particulièrement dans le cas de boucles de contrôle négatives. Elles permettent de contrôler l'activité des éléments amonts des cascades par les éléments avals qui ont la possibilité de couper le signal.

Par exemple, la phosphorylation de SOS, probablement par une ERK, entraîne la dissociation de SOS et de Grb2 inhibant ainsi Ras. L'activation de RERK par Raf seule ne suffit pas entraîner de telles conséquences. Un signal additionnel serait donc nécessaire, peut-être impliquant Ras (**Denhardt 99**). Ce type de mécanisme permettrait à certaines des cascades de contrôler elles-mêmes leur exclusivité.

Conclusion

Les mécanismes présentés ici ont volontairement été simplifiés. Pour ne pas nuire à la compréhension de l'ensemble nous n'avons pas voulu rentrer dans tous les détails de ces régulations cytoplasmiques. La **Fig. 35** résume les connaissances actuelles en matière de cascades de phosphorylation cytoplasmique.

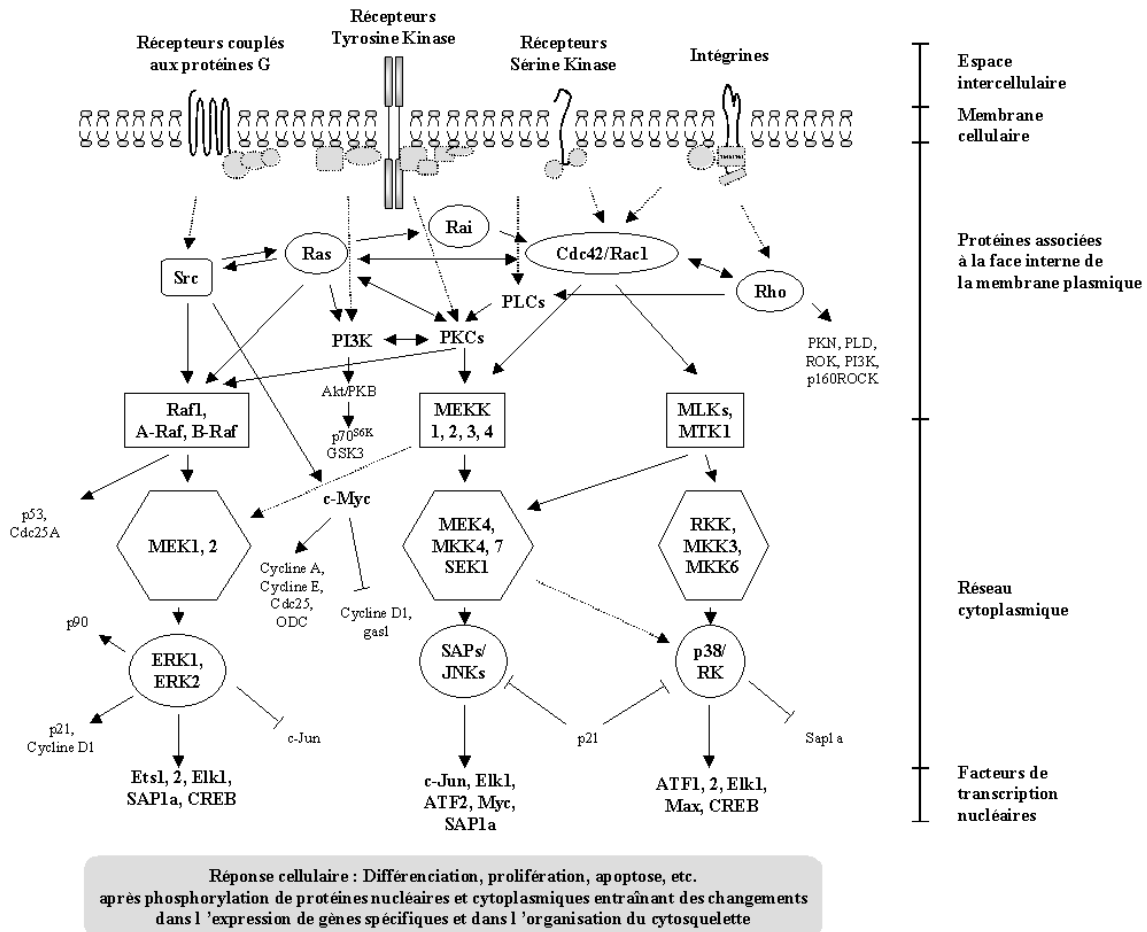


Fig. 35. Cascades de phosphorylation de protéines initialisées par des stimuli différents... (modifié d'après Denhardt 99).

7. Conclusion

La complexité que nous venons d'évoquer pourrait être le plus grand obstacle à la compréhension des contrôles de la prolifération cellulaire. Cette complexité est multiple, les mêmes protéines sont souvent impliquées dans des processus cellulaires différents, concurrents ou complémentaires. Il ne s'agit pas de redondance simple. Ce ne sont pas toujours les mêmes sites actifs (ou cibles) qui sont impliqués dans ces multiples régulations. Par exemple, onze sites de phosphorylation ou d'acétylation ont été découverts sur p53, ce qui correspondrait au nombre théorique de 2000 configurations possibles pour cette protéine. Ceci conférerait un rôle de processeur intégré de signaux convergents à p53 (Kohn, 99). Dans un tel contexte il est difficile de comprendre le rôle exact de p53 ou même d'interpréter des résultats d'expériences impliquant cette protéine. Un autre exemple est donné par le nombre potentiel de cibles des récepteurs Tyrosine Kinase. Au moins six sites de phosphorylation différents sont connus pour le récepteur PDGFR (Pawson *et al.* 99).

Actuellement, comme le suggère Baserga (Baserga 99), les chercheurs poursuivent des axes séparés : le cycle cellulaire des cyclines, le cycle cellulaire de p53, le cycle cellulaire des oncogènes, le cycle cellulaire des gènes suppresseurs de tumeurs, le cycle cellulaire des facteurs de croissance, et sûrement de nombreux autres encore inconnus. Il est temps d'unifier ces différentes approches qui sont certainement autant de points de vue différents d'un même paysage. Cette unification de ces approches est une démarche normale et nécessaire en science qui commence seulement à investir le domaine de la biologie. Il reste beaucoup à faire notamment lorsque l'on essaie de comprendre le fonctionnement cohérent ou pathologique des cellules au sein de la société tissulaire.

V. Régulation de l'homéostasie d'un épithélium stratifié

1. Introduction

C'est dans la couche basale des épithélia stratifiés normaux que les cellules prolifèrent et initialisent le long processus de différenciation qui aboutira à leur cornéification totale et leur desquamation. La régulation des deux processus cellulaires majeurs que sont la prolifération et la différenciation fait intervenir des mécanismes moléculaires dont les détails sont de mieux en mieux connus même si de nombreuses zones d'ombre subsistent. L'appréhension de ces mécanismes dans le cadre d'un tissu engendre une hausse considérable de la complexité liée notamment à la diversité de l'environnement cellulaire. Le comportement prolifératif de toutes les cellules de la couche basale est hétérogène. Certaines cellules prolifèrent lentement, d'autres prolifèrent plus rapidement et d'autres encore ne prolifèrent pas. Peu d'apoptose est observée dans les couches vivantes de l'épiderme (Gavrieli *et al.* 92). L'observation de ces comportements a permis l'élaboration du modèle actuellement dominant où les cellules basales peuvent être des cellules souches se divisant lentement, des cellules en transit se divisant rapidement et des cellules engagées qui ne prolifèrent plus et se détachent de la membrane basale pour se différencier irréversiblement (Fig. 36).

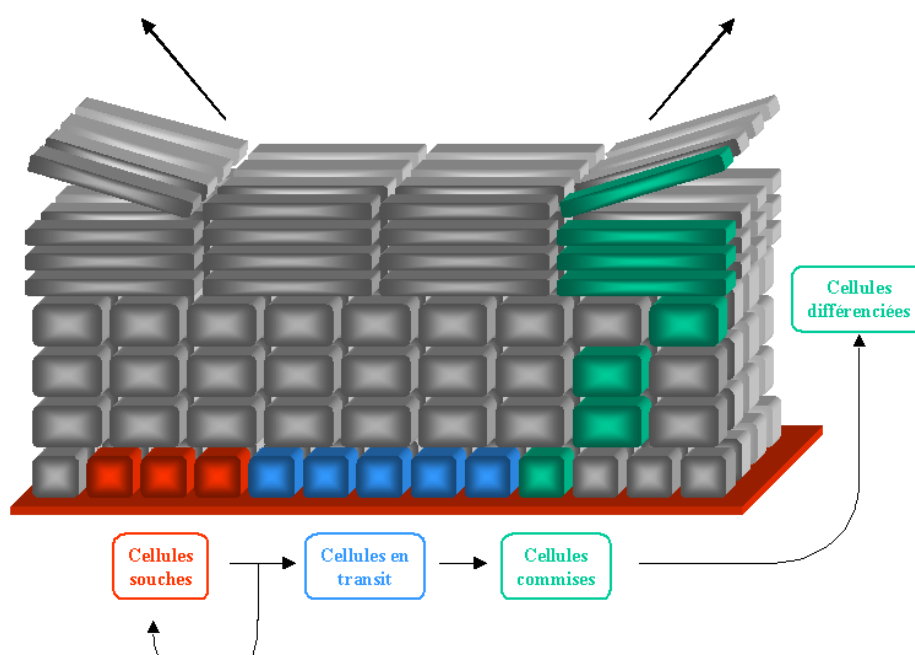


Fig. 36. Sous populations cellulaires de la couche basale aux comportements prolifératifs différents : Cellules souches (rouge), en transit (bleu) et commises (vert).

Au niveau tissulaire, l'organisation cinétique de l'hétérogénéité de la couche basale et sa relation avec la descendance cellulaire en cours de différenciation ou différenciée des couches suprabasales semblent être des éléments clés de la régulation de l'homéostasie.

2. Théorie des cellules souches

a. Introduction

L'hétérogénéité des comportements prolifératifs des cellules de la couche basale des épithélia stratifiés a suggéré l'applicabilité à ces tissus, dans une tentative unificatrice, du modèle des cellules souches déjà connu dans

d'autres types de tissus, notamment la moelle osseuse et les épithélia intestinaux. Les cellules souches sont généralement définies comme des cellules possédant un potentiel prolifératif illimité par rapport à la durée de vie de l'organisme (**Jones 97**). Une variante de cette définition présente les cellules souches comme les cellules capables de produire une grande famille de descendants dans leur propre environnement (**Wright et al. 84**). Dans le modèle des cellules souches, la production d'une descendance différenciée résulte de l'amplification de la division initiale d'une cellule souche par la prolifération de cellules qualifiées de cellules de transit (*transit amplifying cells*) (**Fig. 37**). Dans certaines conditions (e.g. forte stimulation par des facteurs de croissance) les cellules en transit de première génération seraient capables de retrouver un état de cellule souche (**Watt et al. 00** et **Potten et al. 90**).

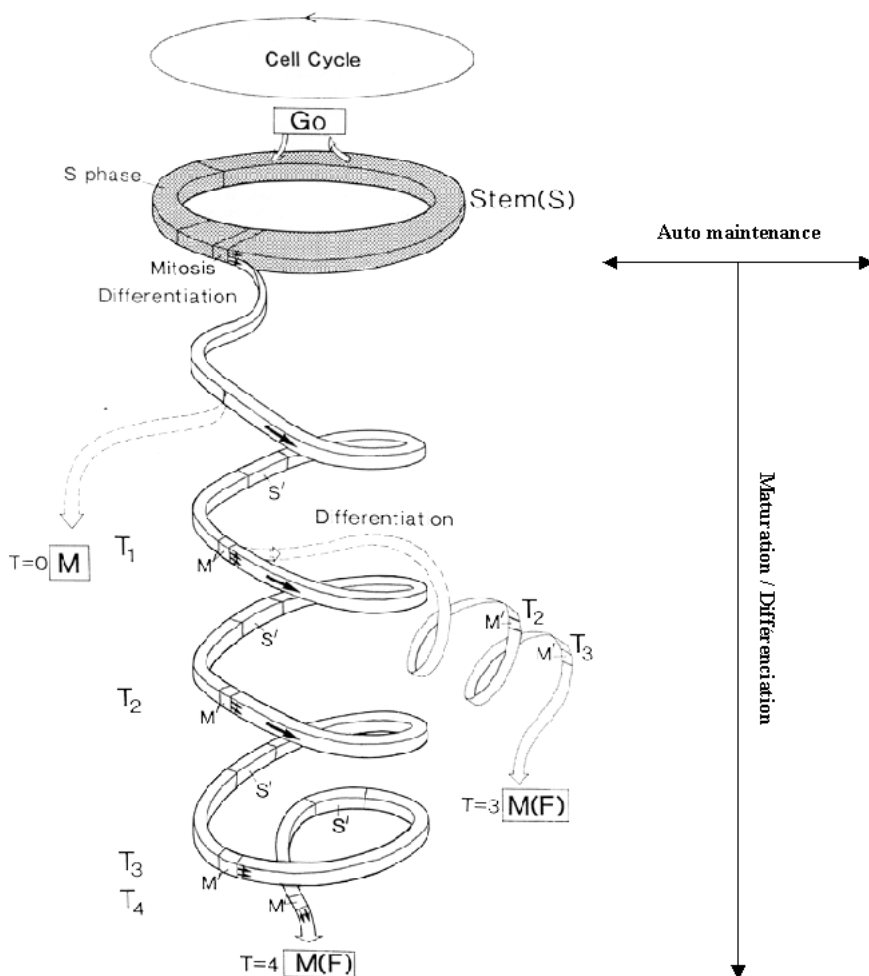


Fig. 37. Représentation d'une cellule souche et de sa descendance. L'histoire de la cellule est mise en perspective. Chaque cycle cellulaire est différent de celui qui le précède et de celui qui lui succède (tiré de Potten et al. 88).

Aucun marqueur spécifique des cellules souches n'a encore été identifié avec certitude. Quelques travaux ont essayé de définir la surexpression des intégrines $\beta 1$ comme spécifique des cellules souches, mais les données sont contradictoires. Actuellement, seule l'utilisation de critères fonctionnels (grande capacité à se renouveler, résistance au TPA ou culture en suspension) permet l'identification des cellules souches et leur distinction des cellules en transit.

Pour être parfaitement identifiées comme telles, les cellules souches *in situ* doivent répondre à plusieurs critères : ce sont des cellules indifférenciées capables de prolifération, d'automaintenance, de production d'une descendance différenciée fonctionnelle et de régénération d'un tissu après dommage (**Potten et al. 90**). L'identification des cellules souches dans leur environnement naturel est très difficile puisqu'elle nécessite des

approches expérimentales lourdes et fortement invasives, voir destructrices. Ces approches expérimentales sont susceptibles de perturber le comportement prolifératif des cellules souches rendant leur détection plus difficile et aléatoire. Comme le suggère Potten (**Potten *et al.* 90**), cette situation présente donc quelques similitudes avec *le principe d'incertitude de Heisenberg* selon lequel la mesure des propriétés d'un système altère ses caractéristiques créant une incertitude sur l'exactitude de la mesure.

La fonction biologique des cellules souches est aussi âprement discutée. Tout d'abord, cette hétérogénéité permet d'éviter les aléas du flux tendu par la gestion d'un tampon, au sens informatique du terme. Dans les tissus où une voie de différenciation unique est observée, comme l'épiderme interfolliculaire, l'existence d'une population intermédiaire permet d'augmenter le nombre de cellules différenciées pour la division de chaque cellule souche. De plus, les cellules souches forment un ensemble de cellules se divisant moins souvent que les autres cellules proliférantes, elles sont donc susceptibles de posséder un génotype le plus intact possible. Ce dernier argument sous entend aussi une contre partie importante : si une cellule souche subit une mutation, celle-ci, du fait du cycle long, peut résider plus longtemps dans le tissu. Ainsi cette erreur, si elle reste non corrigée, pourrait être suivie d'autres erreurs plus tard alors que la multiplication de la descendance de la cellule souche se fait plus rapide. La durée du cycle cellulaire des cellules souches n'est pas liée à des mécanismes de correction d'erreurs particulièrement actifs lors de la phase G₁ du cycle cellulaire des cellules souches. Il est d'autant plus difficile de répondre à de telles questions que les cellules souches ne sont pas identifiables spécifiquement d'après leur caractéristiques moléculaires.

b. Hypothèse des niches : les cellules souches dans leur micro environnement

En 1967, Curry et Trentin proposèrent que les voies de différenciation suivies par la descendance des cellules souches soient déterminées par des micro environnements inductifs à l'intérieur de la moelle osseuse (**Curry *et al.* 67**). Ce modèle a été étendu par l'hypothèse des « niches » de Schofield (**Schofield 78**) qui propose que les cellules souches soient situées dans un micro environnement optimal appelé niche. Quand une cellule souche se divise, seule une cellule fille peut rester dans la niche et l'autre cellule fille est engagée dans la différenciation à moins qu'une autre niche soit disponible (**Fig. 38**).

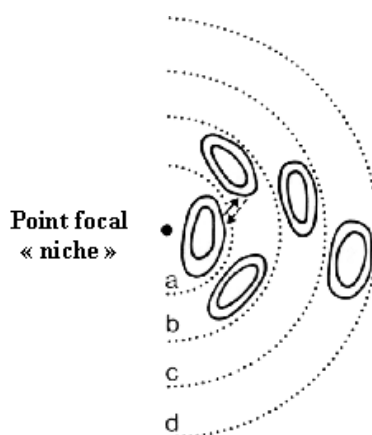


Fig. 38. Concept de niche de cellules souches. La cellule souche pluripotente occupe le point focal hypothétique et est entourée par des zones concentriques indiquant une décroissance de la probabilité de présence de cellule souche (a-d). Les cellules de la niche possèdent un fort potentiel prolifératif et sont protégées de signaux de différenciation. Les cellules hors-niche possèdent une forte probabilité de différenciation mais peuvent remplacer les cellules de la niche en cas de besoin (modifié d'après Wright *et al.* 84).

A l'intérieur de sa niche, une cellule souche aurait une forte probabilité de se renouveler mais une faible probabilité de proliférer et suivrait donc un cycle cellulaire lent. Différents sites à l'intérieur d'une même niche pourraient avoir des caractéristiques légèrement différentes contrôlant la prolifération des cellules souches selon

leur position. Ainsi, le comportement des cellules situées à l'intérieur de la niche serait très dépendant de la division dont elles sont issues. La dépendance à l'asymétrie de cette division serait définie à la fois par la répartition des ressources de la cellule mère dans les deux cellules filles et par l'état local du micro environnement de chacune des cellules filles.

Les composants principaux de la niche seraient les autres types cellulaires environnants, les facteurs diffusibles et les molécules de la matrice extracellulaire (MEC). Chacun de ces composants ne peut-être considéré isolément puisque différents types cellulaires sécrètent différents facteurs diffusibles et produisent des MEC dont la composition diffère, les facteurs de croissance régule la formation et la destruction de la MEC et la MEC peut lier des facteurs de croissance spécifiques, permettant une régulation locale vraisemblablement très précise (Hall *et al.* 89).

Pour reprendre la formule de Watt : « la niche est le jardin d'Eden d'où les cellules souches sont expulsées pour se différencier et mourir » (Watt *et al.* 00).

c. Paradigme du petit intestin

L'épithélium du petit intestin est le tissu dans lequel la présence et la localisation des cellules souches et des cellules en transit ont été le mieux étudiées, principalement grâce à C. S. Potten. En utilisant des outils expérimentaux tels que l'irradiation et/ou l'injection de [³H]TdR en pulses, Potten et ses collaborateurs (revue dans Potten *et al.* 97) ont démontré l'existence et la localisation des sous populations cellulaires dans les cryptes du petit intestin (Fig. 39).

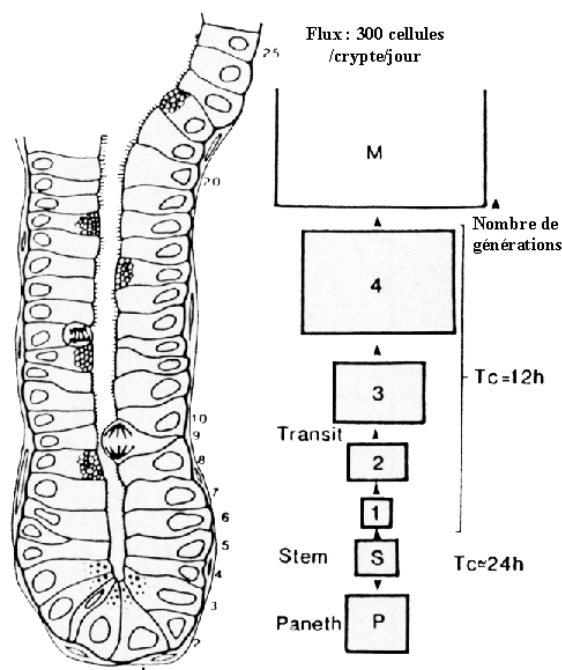


Fig. 39. Topologie des sous populations cellulaires de la muqueuse épithéliale du petit intestin de souris (tiré de Potten *et al.* 88).

Dans le petit intestin de souris, les cellules souches sont situées au fond des cryptes juste au-dessus des cellules de Paneth qui tapissent le fond des cryptes. Leur temps de cycle a été estimé à environ 24 heures et leur quantité à 16 par crypte au maximum. Ces cellules souches sont surplombées d'environ 150 cellules en transit possédant une durée de cycle estimée à 12 heures environ. Le flux de cellules différenciées par crypte et par jour serait donc de 300 cellules et à raison de 4 à 6 cryptes par villus le flux de cellules serait donc d'environ 1400 cellules par villus et par jour pour la souris (Potten *et al.* 88).

d. Propriété des cellules souches dans divers tissus

Les données disponibles dans la littérature concernant d'autres tissus (Potten *et al.* 88) montrent que les propriétés des cellules souches et de leurs descendances sont variables d'un tissu à l'autre pour une même espèce.

Les cellules souches cyclent très rapidement (24 h) dans les épithélia des muqueuses (Tab. 9) contrairement à celles de l'épiderme (jusqu'à 200 h). Les cellules souches intestinales semblent posséder des temps de cycles assez similaires (24 h pour le petit intestin et entre 15 et 22 h pour le colon).

Tab. 9. Temps de cycle cellulaire des cellules de différents tissus de souris (d'après Potten *et al.* 88).

Tissu	Durée du cycle cellulaire des cellules souches (h)
Langue	24
Epiderme	200
Petit intestin	24
Colon	15-22
Moelle osseuse	100-120
Testicule	> 60

La proportion de cellules souches parmi les cellules proliférantes varie de 50% dans l'épithélium de la langue, 10% dans le petit intestin et 0.1% dans les testicules lors de la spermatogénèse. Ces données sont inversement proportionnelles au nombre de générations observées chez les cellules en transit de différents tissus, lui-même aussi très variables (Fig. 40).

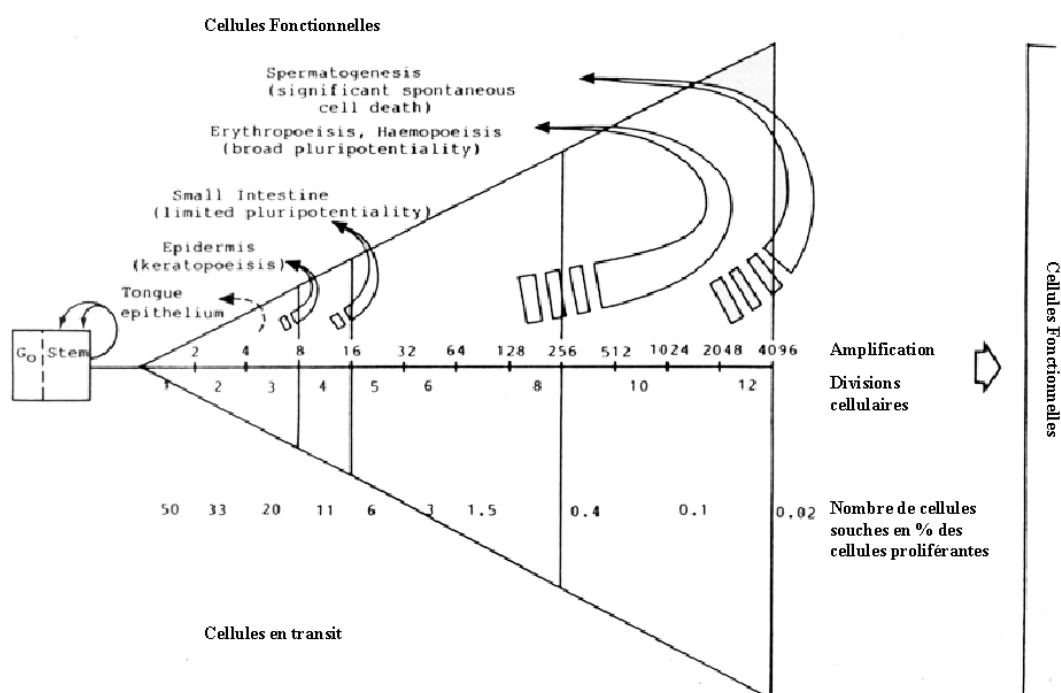


Fig. 40. Capacité à la division des cellules souches, en transit et commises de différents tissus de souris (d'après Potten *et al.* 88). Le schéma indique aussi la proportion de cellules souches par rapport au nombre de cellules proliférantes.

Les cellules souches d'une souris de laboratoire dont la durée de vie est de 3 ans devraient se diviser entre 100 fois (épiderme), 1000 fois (langue et intestin), 200-300 fois (moelle osseuse) et 400 fois (testicules). Dans le cas des cellules de la moelle osseuse il a été montré que les cellules hémopoïétiques peuvent être transplantées

jusqu'à 5 fois sur des souris ne possédant plus de cellules souches de la moelle osseuse à partir d'une cellule adulte et donc se diviser jusqu'à 5 fois la durée de vie de l'animal (5000 divisions en tout). La théorie des cellules souches est-elle compatible avec la limite de Hayflick (**Hayflick 65**) ? Cette limite est le nombre de générations maximum possibles pour des cellules embryonnaires normales *in vitro* dans un environnement propice à la prolifération. Il est d'environ 70 générations. Rappelons qu'une population de cellules issue de 1 cellule après 70 générations par divisions symétriques contient, théoriquement, 2^{70} soit environ 1.10^{21} cellules. Ces estimations tendraient à prouver que la limite de Hayflick serait un artefact expérimental lié à la culture de cellules embryonnaires *in vitro*. Les résultats récents mettant en lumière le rôle des télomérases dans le contrôle de l'état des télomères chromosomiaux, et donc du nombre de divisions total possible, n'ont pas encore permis de comprendre la variabilité du potentiel prolifératif des cellules souches dans ces différents tissus. Tous les tissus ne possèdent donc pas le même système d'amplification des divisions de cellules souches. La signification de telles variations est pour l'instant inconnue mais elle pourrait être liée à la fonction du tissu.

3. Organisation cinétique de la couche basale des épithélia stratifiés

a.. Introduction

Dans le cas de l'épiderme il n'existe pas de consensus sur la localisation des cellules souches similaire à celui existant dans les épithélia intestinaux. L'existence d'une hétérogénéité cinétique reflétant la présence de plusieurs sous populations cellulaires dans la couche basale de l'épiderme a été mise en évidence lors d'études d'irradiation de souris ou lors d'injection de thymidine tritiée - [^3H]TdR (**Bickenbach 81**, **Morris et al. 85** et **Potten et al. 82**).

Des expériences d'irradiation de la peau de souris ont montré que seulement 10% des cellules basales possèdent un fort potentiel prolifératif et sont capables de régénérer partiellement un tissu endommagé, 50% des cellules sont capables de se diviser mais sont incapables de régénérer le tissu endommagé, même partiellement, et les 40% restants seraient des cellules incapables de se diviser (**Potten et al. 73**). La proportion de 10% de cellules souches, 50% de cellules en transit et 40% de cellules commises à la différenciation n'a pas été invalidé depuis 1973 et reste donc la référence pour les épithélia stratifiés. Ces résultats ont été complétés *in vitro* par Barrandon et collaborateurs (**Barrandon et al. 87**) qui distinguèrent trois sous populations kératinocytaires suivant leur capacité à donner naissance à des colonies pérennes en culture (holoclones), de plus petites colonies dont les cellules se différencient après 15 divisions au maximum et dont la taille décroît rapidement (paraclones) et des colonies intermédiaires (meroclones). Les holoclones seraient des cellules souches et les paraclones des cellules en transit. Les conditions expérimentales ne permettent pas de quantifier le ratio de chacune de ces populations.

Les injections de [^3H]TdR ont montré que certaines cellules retiennent le marqueur pendant plus longtemps que d'autres. Dans le cas d'une injection de durée limitée, dite de marquage en pulse, le marqueur [^3H]TdR est incorporé à l'ADN lors de sa réplication. L'intensité des marquages montre donc une décroissance inversement proportionnelle au nombre de divisions survenues depuis l'incorporation du marqueur par les cellules. Les cellules les plus fortement marquées sont celles qui se sont le moins divisé depuis l'injection. Cette technique a permis l'identification de cellules se divisant plus de deux fois plus lentement que les autres. Ces cellules ont été désignées comme étant les cellules souches dont le temps de cycle a pu être estimé à environ 200 heures, soit plus de 8 jours, lors d'études complémentaires chez la souris (**Potten et al. 88**).

Une étude plus récente a été réalisée avec des techniques de marquage par pulse à l'aide de [^3H]TdR et de BrdU et a permis l'identification de cellules semblables avec beaucoup de précision dans la cornée (**Lehrer et al. 98**).

b. Cas des épidermes

i. Introduction

Nous avons déjà montré les différentes structures possibles des épithélia stratifiés qui possèdent une organisation tridimensionnelle plus ou moins marquée en couches et en colonnes suivant leur localisation. De nombreuses tentatives ont été menées pour prouver l'existence d'une organisation cinétique intrinsèque qu'il serait possible de corrélérer à la structure du tissu (organisation en colonnes des cellules notamment). Actuellement, il existe deux concepts principaux, apparemment antagonistes. L'un est basé sur des structures de petite taille (EPU) construite autour d'une cellule souche, l'autre décrit des structures de taille plus importante où les cellules souches seraient assemblées en amas.

ii. EPU

Des structures hexagonales ont été observées dans la couche basale des épidermes fins, notamment la peau des oreilles et du dos de souris, dont l'empilement des couches supra-basales est organisé en colonnes très distinctes. Appelées EPU (*Epidermal Proliferation Unit*) par Potten (**Potten 75**), ces structures pluricellulaires contiendraient une cellule souche centrale et sa descendance proche (**Fig. 41**). La migration des cellules engagées dans la différenciation serait localisée à la périphérie de l'EPU et se ferait verticalement, créant ainsi les colonnes observées dans les couches suprabasales.

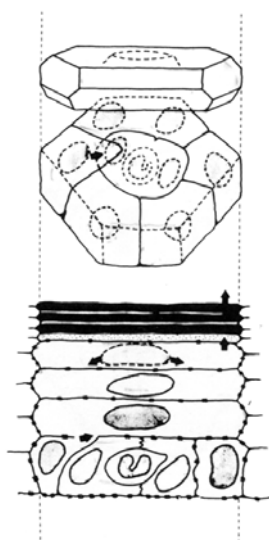


Fig. 41. Structure d'une EPU de souris. Dans la couche basale, la cellule centrale est une cellule de Langerhans. La migration est périphérique et trois couches de kératinocytes nucléés sont observées avant la stratum corneum (tiré de Potten *et al.* 74).

Dans le cas de la peau de l'oreille de souris, les EPU posséderaient un nombre de cellules constant pour un tissu donné, 20 en moyenne, dont 10-11 cellules basales, une cellule spinale, deux cellules granulaires et 5-7 cellules cornées (**Allen *et al.* 74**). Selon Potten (**Potten 76**), la division d'une cellule souche dans une EPU, pourrait générer une descendance de huit cellules filles qui se détacheraient de la membrane basale pour migrer dans les couches suprabasales. Il s'agirait d'un processus d'amplification particulièrement efficace fonctionnant avec 4 générations de cellules en transit (**Fig. 42a**). A l'intérieur de l'EPU, l'organisation des cellules suivrait un patron précis (**Fig. 42b**) avec une cellule souche centrale qui se divise une fois alors que les cellules périphériques se divisent plus rapidement jusqu'à la 4^{ème} génération. Les cellules engagées dans la différenciation se détachent alors de la couche basale et migrent vers la couche supérieure en laissant sa place à une cellule en transit moins avancée dans le processus de différenciation.

Cette caractérisation est principalement structurale. Selon Potten, l'organisation cinétique des EPU est basée sur les observations expérimentales suivantes (**Potten 76**) :

- Organisation structurale complexe des cellules basales de l'EPU avec une cellule centrale en cycle lent, des cellules en cycle plus rapide plus périphériques et des cellules engagées dans la différenciation à l'extrême périphérie ;
- La plupart des divisions surviennent à la périphérie de l'EPU ;
- Stabilité des paramètres cinétiques comme : le taux de production de cellule / EPU, constance du nombre de cellules / EPU, continuité de la présence de marqueurs de prolifération, temps de cycles rationnels.

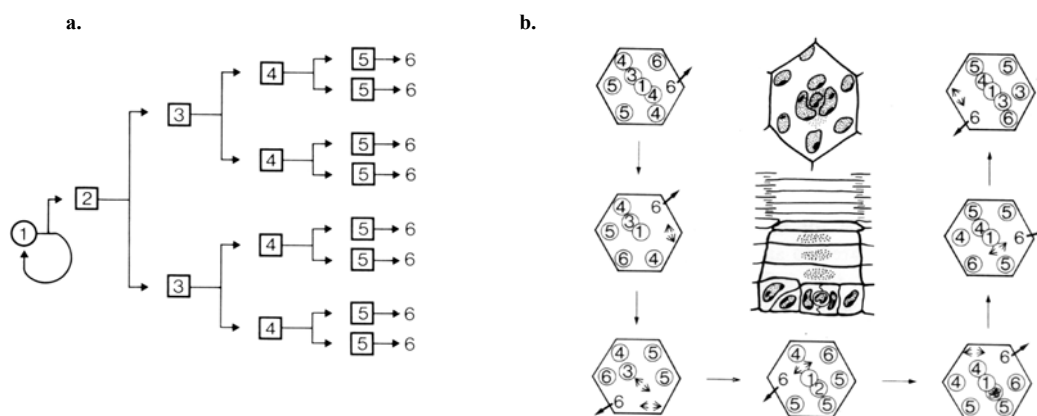


Fig. 42. Organisation dynamique des cellules basales d'une EPU. a. Processus d'amplification à partir d'une division d'une cellule souche et b. Dynamique de la division cellulaire dans une EPU (d'après Potten *et al.* 74, 76 tiré de Wright *et al.* 84).

Très peu de structures épithéliales semblent pouvoir être considérées comme des EPU si ces critères sont appliqués à la lettre. D'autre part, les variations de taille et de rendement (production de cellule/EPU) des EPU d'un tissu à l'autre et d'une espèce à l'autre sont assez importantes (**Tab. 10**).

Tab. 10. Estimations des taux moyens de production de cellules par EPU et par jour dans l'épiderme de souris (d'après Wright *et al.* 84 p294). Avec : E = empilement, EP = empilement partiel et PE = pas d'empilement.

	Dos de souris	Dos de souris chaude	Oreille de souris	Pied de souris	Queue de souris	Humain (peau glabre)
Cellules basales / EPU ¹	10.6	11	10-11-9.3 ²	14.1	25	20-28
Kératinocytes supra-basaux / EPU ¹	3.0	3.5	3, 15.3 ²	35.7-12 ²	5-6	~5
Cornéocytes / EPU ¹	6	7	6-8-10 ²	37-40 ²	32	10-28
Nombre total de cellules épidermiques / EPU ¹	~20	~21	~20-25.3 ²	72.7-52 ²	~80	35-60
Cellules proliférantes / EPU ¹	10.6	11	9.7	20	25	20-28
Production de cellules / EPU / jour ¹	1.3	2.4	1.0-0.6 ²	1.7-6.7 ²	4.1	2.6
Temps de transit observé (jours)	9	4-5	11-24-20-24 ²	6-7-7 ²	9	13.5
Organisation	E	EP	EP	PE	E	EP

1. Ou par cornéocyte à la surface dans le cas des épidermes ne possédant pas d'organisation en empilement

2. Ces valeurs proviennent de travaux aux protocoles expérimentaux. L'écart entre ces valeurs montre avec quelle méfiance il faut manier ces résultats.

Les données du **Tab. 10.** révèlent une relation possible entre l'épaisseur du tissu et la vitesse de production des cellules. Les tissus les plus organisés sont les plus fins et lents et les tissus les moins organisés sont les plus épais et rapides. Les contraintes extérieures, comme le poids imposé par le corps lors d'un contact avec un médium ou les frottements avec celui-ci, sont des paramètres supplémentaires qui sont aussi à prendre en compte. Il est difficile d'apprécier quantitativement l'influence de tels paramètres sur l'organisation des épithélia. Cette conclusion semble en contradiction avec les données du **Tab. 1 (page 11)** où une telle relation n'était pas observable. Les données disponibles datent des années 70 et ne sont pas assez fiables pour valider ou invalider convenablement la théorie des EPU en dehors des épithélia fins de rongeurs.

iii. Clusters de cellules souches

- Localisation par marquages des intégrines

Suite à l'étude de l'adhésivité des kératinocytes sur des supports de cultures, les intégrines ont été présentées comme un marqueur potentiel des cellules souches. Les kératinocytes expriment majoritairement les intégrines $\alpha 2\beta 1$ (récepteur du collagène et de la laminine 1), $\alpha 3\beta 1$ (récepteur des laminines 1 et 5), $\alpha 5\beta 1$ (récepteur de la fibronectine) et $\alpha 6\beta 4$ (récepteur des laminines 1 et 5).

De nombreuses données expérimentales tendraient à prouver que les cellules souches sont les cellules qui expriment le plus fortement les intégrines $\beta 1$ (**Jones 97**) :

- La fonction des intégrines $\beta 1$ est inhibée lors de l'induction de la différenciation (**Adams et al. 90**) ;
- Les kératinocytes des couches suprabasales n'expriment plus d'intégrines (**Fuchs et al. 97**) ;
- Il existe une relation de proportionnalité entre la quantité d'intégrines $\beta 1$ membranaires et la capacité à former des colonies *in vitro*. Les cellules capables de former des colonies *in vitro* expriment deux à trois fois plus d'intégrines $\beta 1$ que les autres (**Jones et al. 93**) ;
- Les kératinocytes isolés à partir de l'épiderme et exprimant plus d'intégrines $\beta 1$ adhèrent plus vite que les autres aux substrats riches en collagène de type IV et sont capables de former des colonies pérennes (**Jones et al. 93**). Ils sont aussi capables de reconstituer un épiderme *in vivo* lorsqu'ils sont greffés sur des souris *nude* (**Jones et al. 95**).

La localisation des zones intégrines brillantes varie suivant le type d'épiderme considéré (**Fig. 43**). Les épidermes épais, comme ceux de la paume de la main ou la plante des pieds, possèdent des zones d'expression élevée d'intégrines $\beta 1$ dans les crêtes des papilles dermiques. Les épidermes plus fins, comme ceux du scalp, possèdent des zones d'expression élevée d'intégrines $\beta 1$ sur les sommets des papilles dermiques.

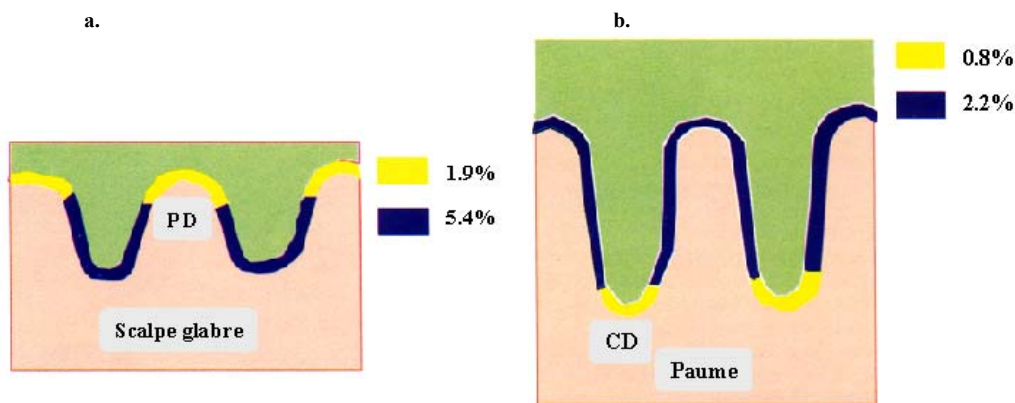


Fig. 43. Patron des zones surexprimant les intégrines $\beta 1$ dans : a. Scalp glabre et b. Paume. Le derme est présenté en rose et l'épiderme en vert. Les régions exprimant fortement les intégrines $\beta 1$ sont représentées en jaune. Elles sont observées au fond des crêtes des papilles dermiques (CD) des épidermes épais et sur les sommets des papilles dermiques (PD) des épidermes fins. Le pourcentage montre la proportion de cellules en phase S trouvées dans les zones d'expression différentielle des intégrines (modifié d'après Jones 97).

Dans tous les cas, les zones possédant le niveau le plus élevé d'intégrines $\beta 1$ sont aussi celles où la proportion de cellule en phase S est le plus faible (Jones *et al.* 95). Bien que le travail sur des coupes de tissu entraîne des imprécisions quantitatives notables la taille de ces zones a été estimée de 9 à 14 cellules et leur quantité à 30% des cellules de la couche basale. Ce résultat est différent des données de Potten (Potten *et al.* 73) cependant la technique basée sur la quantification des intégrines $\beta 1$ est beaucoup moins précise que celle basée sur la $[^3\text{H}]\text{TdR}$ et une partie non négligeable des cellules exprimant plus d'intégrines seraient en fait des cellules en transit.

Une étude complémentaire (Jensen *et al.* 99) basée sur l'utilisation de la microscopie confocale pour quantifier l'expression d'intégrines $\beta 1$ a permis de confirmer, dans le plan de la couche basale, l'organisation de zones à forte expression d'intégrines avec peu de prolifération. Confirmant les résultats de Jones (Jones *et al.* 95), il a été montré que les zones exprimant plus d'intégrines sont formées de 14 cellules en moyenne et que ces cellules constituent environ 30% de la population cellulaire basale totale. La localisation précise des cellules en cours de prolifération, mise en évidence à l'aide du marqueur de prolifération Ki67 (Schlüter *et al.* 90), a permis de montrer que non seulement celle-ci est significativement plus importante dans les zones exprimant moins d'intégrines mais aussi à la périphérie « interne » des zones exprimant plus d'intégrines. Ceci tendrait à prouver que la proportion de 30% de cellules souches est une surestimation liée à la technique basée sur la quantification de l'expression des intégrines $\beta 1$, qui assimile à des cellules souches une quantité importante de cellules en transit. Cette technique ne semble pas utilisable pour une quantification rigoureuse.

Notons au passage que cette étude a aussi permis de confirmer la localisation des intégrines $\alpha 6\beta 4$ au centre de la face en contact avec la membrane basale de toutes les cellules basales alors que les intégrines $\beta 1$ sont localisées à la périphérie des cellules basales formant un anneau à la base de chaque cellule (Jensen *et al.* 99).

Une autre série d'expérience (Kaur *et al.* 00) a suggéré l'utilisation des intégrines $\alpha 6$ plutôt que les intégrines $\beta 1$ pour distinguer les cellules souches des autres cellules de la couche basale des épidermes pileux de souris mais uniquement en utilisation simultanée avec des marqueurs supplémentaires (e.g. manque de récepteurs transférine). Il reste à connaître précisément le rôle joué par les intégrines dans le contrôle de la prolifération.

- Cas particulier des épidermes très kératinisés

Utilisant la peau de la paume de primates, Lavker et collaborateurs (Lavker *et al.* 83) ont développé un modèle expérimental à l'aide duquel ils ont montré que deux populations de cellules basales morphologiquement distinctes sont présentes dans ce tissu (Fig. 44). La première est localisée sur le sommet des papilles dermiques

et consiste en cellules possédant une base « particulière » permettant certainement l'ancrage de l'épiderme au derme. La seconde est localisée dans le creux des papilles dermiques et consiste en une population de cellules se divisant lentement. Une population de cellules se divisant très rapidement a aussi été identifiée au-dessus de cette population (**Fig. 44**).

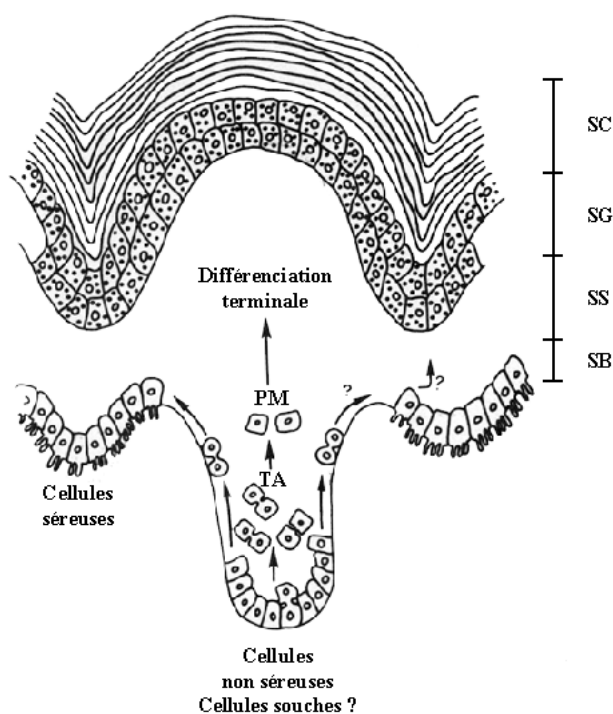


Fig. 44. Patron des zones de prolifération dans les épithélia épais très kératinisés. SB : Stratum germinativum, SS : Stratum spinosum, SG : Stratum granulosum et SC : Stratum corneum (tiré de Lavker *et al.* 83).

Ces données semblent plus vraisemblables que celles présentées par Jensen et collaborateurs (**Jensen *et al.* 99**). En effet, il serait surprenant que les cellules souches soient placées dans les régions les plus fines des épidermes interfolliculaires, justement là où elles sont les plus vulnérables à l'environnement et où les cellules possèdent l'ultrastructure la plus spécialisée (**Lavker *et al.* 00**). A l'instar de Lavker, il est donc justifié de remettre en cause l'utilisation des intégrines $\alpha 6$ ou $\beta 1$ comme marqueurs des cellules souches.

c. Cas particulier des épidermes pileux

La localisation des cellules dans les épidermes pileux semble suivre un patron particulier. Le bulge est une petite masse cellulaire située sous la glande sébacée du follicule pileux. Il contiendrait une population de cellules souches (**Lavker *et al.* 00, Taylor *et al.* 00**). Cette population pourrait donner naissance soit à une population de cellules en transit qui renouvelleront le poil en régénérant sa matrice soit à une population de cellules souches et de cellules en transit de l'épiderme (**Fig. 45**).

Il est possible d'isoler les cellules souches du bulge grâce à une approche mixte combinant une analyse cinétique de la prolifération cellulaire basée sur l'utilisation de $[^3\text{H}]\text{Tdr}$ au marquage conjoint des intégrines $\alpha 6$ et des récepteurs de la transférine CD71 (**Tani *et al.* 00**). Ainsi, deux sous populations cellulaires ont été distinguées. Tout d'abord, les cellules exprimant plus fortement $\alpha 6$ et très faiblement ou pas CD71 (notées $\alpha 6^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{dim}}$) ont été identifiées comme des cellules souches par leur prolifération lente. Ensuite, les cellules exprimant à la fois fortement $\alpha 6$ et CD71 (notées $\alpha 6^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{bri}}$) ont été identifiées comme des cellules en transit par un comportement prolifératif très actif.

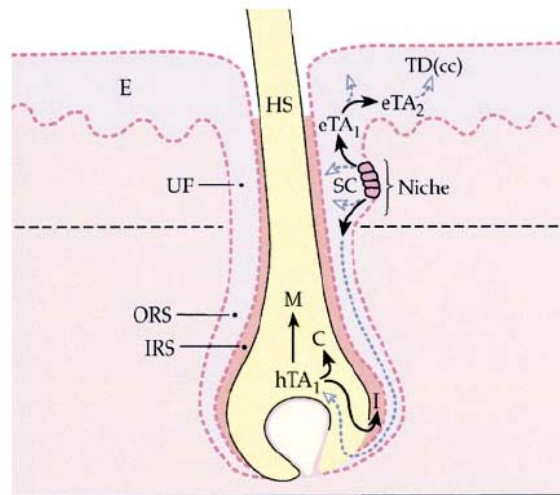


Fig. 45. Localisation des cellules souches dans l'épiderme pileux. E : épiderme, HS : poil, IRS et I : racine interne du poil, ORS : racine externe du poil, UF : follicule supérieur, C : cortex du poil, M : matrice du poil, eTA/hTA : cellule en transit de l'épiderme et du poil et SC : cellule souche (tiré de Taylor *et al.* 00).

Appliquée à la peau de dos de souris, la même technique a distingué une sous population d'hypothétiques cellules souches $\alpha 6^{\text{bri}}\text{CD}71^{\text{dim}}$ représentant $\sim 8\%$ des cellules basales et une sous population représentant d'hypothétiques cellules en transit $\alpha 6^{\text{bri}}\text{CD}71^{\text{bri}}$ représentant $\sim 60\%$ des cellules basales. Ces proportions confirment celles de Potten (Potten *et al.* 73) basées sur des caractères cinétiques et permettant d'estimer que le couple $\alpha 6/\text{CD}71$ est plus spécifique des cellules souches que la seule quantification de l'expression des intégrines $\beta 1$ (Jensen *et al.* 99).

d. Cas de la cornée

Les cellules souches de la cornée ne sont pas disposées uniformément dans la couche basale. Elles résident dans le limbe (Cotsarelis *et al.* 89, Lehrer *et al.* 98) comme le montrent les données expérimentales suivantes :

- Seules les cellules du limbe retiennent des marqueurs de type $[\text{}^3\text{H}]\text{Tdr}$ indiquant une prolifération lente (Cotsarelis *et al.* 89) ;
- Les kératines K3 (un marqueur de la différenciation des kératinocytes de l'épithélium cornéen) ne sont pas exprimées par les cellules du limbe mais par les cellules de la zone centrale de la cornée. Les cellules du limbe ne sont donc pas différenciées (Schermer *et al.* 86) ;
- Les cellules provenant du limbe possèdent une capacité à former des colonies plus pérennes *in vitro* (Ebato *et al.* 87, 88) ;
- Les cellules du limbe peuvent être efficacement transplantées et réparer une cornée endommagée (Pellegrini *et al.* 97).

Le modèle de la cornée a permis de confirmer l'existence d'une hiérarchie des cellules en transit où les cellules de la cornée périphérique se divisent au moins deux fois avant d'entrer dans un processus de différenciation. Les cellules en transit de la zone centrale de la cornée ne se divisent qu'une fois avant de se différencier. De plus la durée du cycle cellulaire de ces cellules en transit peut être raccourcie par blessure de la cornée et le nombre de divisions dont elles sont capables augmente alors pour participer à la réparation du tissu (Lehrer *et al.* 98).

D'autre part, une publication très récente fait état de la découverte d'un marqueur potentiel des cellules souches, la protéine p63, de la famille de la protéine p53, possédant un rôle encore non établi dans la morphogénèse (Pellegrini *et al.* 01). Ces résultats ont été obtenus sur la cornée et confirment la localisation du limbe comme le

réservoir de cellules souches de l'épithélium cornéen. Des travaux plus nombreux sont nécessaires dans d'autres tissus afin d'établir p63 comme un marqueur spécifique des cellules souches épithéliales.

e. Conclusion

Par manque de marqueurs spécifiques, la dynamique des processus prolifératifs homéostatique reste très difficile à apprécier *in vivo*. Les données sont cependant suffisantes pour confirmer l'existence de sous-populations cellulaires localisées dans des zones précises des épithélia stratifiés. Les données

Les propriétés des cellules souches kératinocytaires sont réunies dans le **Tab. 11**. Les données accessibles dans la littérature sont souvent contradictoires. Peu de données explicites sont disponibles pour la peau intrafolliculaire alors que la situation du bulge ou de la cornée semble plus clair (**Tab. 11**).

Tab. 11. Propriétés des cellules souches kératinocytaires (d'après Lavker *et al.* 00 p13474). Le nombre de (+) souligne le poids des données disponibles.

Propriétés	Identification expérimentale	Cornée			Epiderme		
		Limbe	Cornée centrale	Bulge	Fond des papilles dermiques	Sommet des papilles dermiques	EPU
Division lente	Cellules retenant les labels	+++	-	+++	+/-	+/-	+
Fort potentiel prolifératif	Expansion <i>in vitro</i> et résistance aux repiquages	+++	-	+++	?	+, ?	?
Phénotype relativement indifférencié	Manque de kératines liées à la différenciation ou d'autres marqueurs	++++	-	+++	++	-	?
Niche stromal spécifique	Cluster de LRC en contact avec un mésenchyme spécialisé	+++	-	+++	+	-	-
Protection physique	Localisation dans un environnement protégé	++	-	++++	++	-	-
Pigmentation	Enrichissement en mélanine	+++	-	N/A	++	+/-	N/A
Origine des tumeurs	Site de formation des tumeurs prédominant	++++	-	++	?	?	?

Ces différences de cinétiques ne sont pas encore expliquées mais quelques aspects moléculaires peuvent être avancés par déduction en comparant les données moléculaires exposées dans la partie « **Régulation moléculaire de la prolifération et de la différenciation cellulaire** » et les quelques données décrivant la localisation de l'expression des protéines concernées dans les épithélia stratifiés.

4. Contrôles moléculaires de l'homéostasie *in vivo*

a. Introduction

Les techniques privilégiées de l'étude de l'expression protéique sont l'immunochimie, l'immunofluorescence et l'hybridation *in situ*. Les deux premières techniques permettent de localiser des protéines nucléaires, cytoplasmiques, membranaires ou intercellulaires grâce à leur marquage par des anticorps spécifiques révélés à l'aide de réactions enzymatiques colorées ou par des fluorochromes et visualisables respectivement en microscopie à transmission de fluorescence. L'hybridation *in situ* permet d'étudier la présence des ARNm le

plus souvent par marqueurs fluorescent (FISH) mais aussi par enzymologie (ISH). Ces techniques sont utilisées en recherche et, pour certaines, en routine en Anatomopathologie où l'étude du marquage de protéines spécifiques, nommées marqueurs de prolifération, permet la quantification de pathologies cellulaires. Cependant, les données concernant la localisation de marqueurs moléculaires de la prolifération cellulaire dans la couche basale et son lien avec l'organisation spatiale du tissu sont étonnamment rare en quantité et en qualité dans les tissus normaux. Cette lacune immense s'explique par l'ampleur de la tâche : lourdeur des dispositifs expérimentaux, coûts élevés, faible rendement, etc... Il y'a beaucoup à attendre du récent pic d'intérêt pour la protéomique, notamment grâce aux « tissue arrays ». Ce sont des lames microscopiques sur lesquelles sont déposés plusieurs échantillons tissulaires. Cet outil permettra sous peu d'étudier la présence de protéines dans de nombreux échantillons en même temps, diminuant les coûts de telles expériences en temps et en argent.

b. Localisation

i. Protéines du cycle cellulaire

La source de données principale concernant la localisation de l'expression des protéines du cycle cellulaire est la cornée. Toutes les cellules du tissu expriment les cdk, CDK1 et CDK2 ainsi que le cycline B1. L'expression d'autres cyclines n'est pas détectée pour les cellules supra-basales. Quelques cellules expriment la cycline D et Ki67 dans la couche basale de la cornée centrale. Par contre, le nombre de cellules exprimant les cyclines D, E ou A augmente dans la zone périphérique de la cornée proximale du limbe. Dans le limbe la plupart des cellules sont cyclines D, E positives dans le cytoplasme mais seules quelques cellules basales sont positives pour ces protéines dans le noyau et Ki67 positives. La plupart de ces cellules montrent un marquage à la cycline A très faible (**Joyce et al. 96**). Il s'agirait d'un argument supplémentaire en faveur de leur localisation dans la couche basale du limbe cornéen où les cellules souches sont soit en G₀ (cellules Ki67 négatives mais cycline D positives) soit en phase longue phase G₁. Les cellules souches seraient donc réunies en une sous population du limbe où seulement quelques cellules seraient activement proliférantes, s'apprêtant à quitter la « niche ».

Les protéines poches semblent jouer un rôle spécifique et coordonné dans la différenciation épithéliale. pRb et p107 sont exprimés dans la couche basale de l'épiderme alors que p130 est exprimé dans les couches suprabasales (**Paramio et al. 98**). Une étude très récente de la localisation des ARNm des CKI p21 et p27 dans les épidermes pileux montrent que ces protéines sont exprimées dans la zone la plus élevée du bulbe et dans le cortex du follicule pileux (**Mitsui et al. 01**). Ces résultats montrent que les CKI sont exprimées dans les zones où le processus de différenciation des kératinocytes est enclenché et corrélerent les données montrant le rôle de p21 dans la différenciation (voir « **Base de la régulation moléculaire du cycle cellulaire** »).

Sur l'ensemble des publications disponibles sur le sujet, très peu de données sont finalement utilisables car se limitant souvent à des études partielles (**Goodger et al. 96, Kondo 99, Kusama et al. 96, Kushner et al. 97**). Les résultats sont très contradictoires d'une étude à l'autre, les anticorps utilisés sont différents laissant planer un doute sur la reconnaissance effective des protéines. Par exemple, quelques publications traitent de la localisation de p53 dans les épithélia stratifiés (e.g. **Ogden et al. 92, Ren et al. 96**). Souvent ces études s'intéressent à des cas pathologiques particuliers sans pour autant connaître la situation d'un cas normal, ce qui limite l'intérêt de l'approche.

ii. Récepteurs membranaires et facteurs extracellulaires

- Facteurs de croissance

L'expression des facteurs de croissances EGF (ou leur homologue TGF α) est observée dans les couches supra-basales des épithélia stratifiés alors que l'expression des TKR aux EGF est restreinte à la couche basale des

épithélia adultes (**Damjanov et al. 86, Fukuyama et al. 91, Green et al. 85, Nanney et al. 84, Wilson et al. 94**). Par contre les récepteurs EGF sont présents dans toutes les couches du périoderme lors de la morphogenèse embryonnaire du tissu à l'exception de la couche en contact avec le liquide amniotique (**Nanney et al. 90**). La localisation de la protéine sur la membrane des cellules est connue mais la localisation exacte de ces protéines à l'intérieur même de la couche basale n'est pas connue avec précision. Les récepteurs EGF disparaissent de la surface de la cellule au fur et à mesure du processus de différenciation et de la migration des cellules vers les couches suprabasales (**Nanney et al. 84**).

Les récepteurs IGF (*insuling-like growth factor*) sont aussi exprimés uniquement par les cellules des couches basales (**Hodak et al. 96, Rudman et al. 97**). Ils sont aussi exprimés par les cellules de la matrice des follicules pileux, confirmant leur localisation dans des zones où une prolifération active est observée. Ces récepteurs étant internalisés par les cellules après liaison du ligand, il n'est pas étonnant de retrouver une légère présence cytoplasmique dans les cellules des couches suprabasales (**Hodak et al. 96**). Les facteurs de croissance IGF sont produits par les fibroblastes du derme et par les cellules des couches suprabasales (**Rudman et al. 97**) suivant le patron d'expression des facteurs EGF (TGF α).

Il semble donc que les cellules de la couche basale reçoivent en permanence des signaux mitogéniques des cellules des couches suprabasales (**Fig. 46a, b**).

- Facteurs de différenciation

L'expression des trois isoformes connus de la famille TGF β est différentielle dans la peau humaine et dans la peau de souris (**Wataya-Kaneda et al. 94**). TGF β -2 est exprimé dans l'épiderme humain et TGF β -1 et 3 sont exprimés dans l'épiderme embryonnaire de souris. TGF β -3 et TGF β -2 sont exprimés par les fibroblastes des couches du derme connexe à la membrane basale respectivement chez l'homme et la souris (TGF β -1 n'est presque pas détecté dans l'épiderme humain).

La localisation des différents récepteurs TGF β a été étudiée en détails dans la cornée humaine. La plupart des cellules de la couche basale du limbe expriment les trois types de récepteurs TGF β (RI, RII et RIII). Par contre les cellules de toutes les couches de la cornée centrale et les cellules des couches suprabasales du limbe n'expriment pas les récepteurs de type RI et RII mais expriment fortement les récepteurs de type RIII (**Joyce et al. 97**). La signification de ces résultats n'est pas évidente. *In vitro*, les isoformes TGF β -1 et 3 se lient avec beaucoup d'affinité aux récepteurs RII et RI mais TGF β -2 nécessite la présence du récepteur de type RIII pour activer RI ou RII et ainsi participer efficacement à l'activation de voies cytoplasmiques (**Joyce et al. 97**). Il semble donc que seules les cellules de la couche basale du limbe (des cellules souches) sont susceptibles de réagir aux signaux d'inhibition autocrine provenant des couches suprabasales de l'épiderme et paracrine provenant du derme sous-membranaire (**Fig. 46c, d**). Ces signaux pourraient induire l'arrêt (ou le ralentissement) des cellules souches en G₁ dans cette région. En l'état actuelle des connaissances, il n'est pas possible de généraliser ces résultats à l'épiderme, mais aucune donnée disponible ne s'oppose à la conservation de ce mécanisme.

La résolution des techniques expérimentales utilisées ne permet pas la quantification de l'intensité des signaux extracellulaires *in vivo*. Pourtant, l'équilibre de ces signaux positifs et négatifs à la fois autocrines (générés par les kératinocytes eux-mêmes) et paracrines (générés par le derme sous membranaire) doit être un élément clé du contrôle de la prolifération des cellules basales des épithélia stratifiés. En cas de dommage, il est probable que la différence de comportement prolifératif observé notamment dans la cornée (**Lehrer et al. 94**) soit le résultat d'un changement de cet équilibre (excès des facteurs de prolifération sur les facteurs de différenciation).

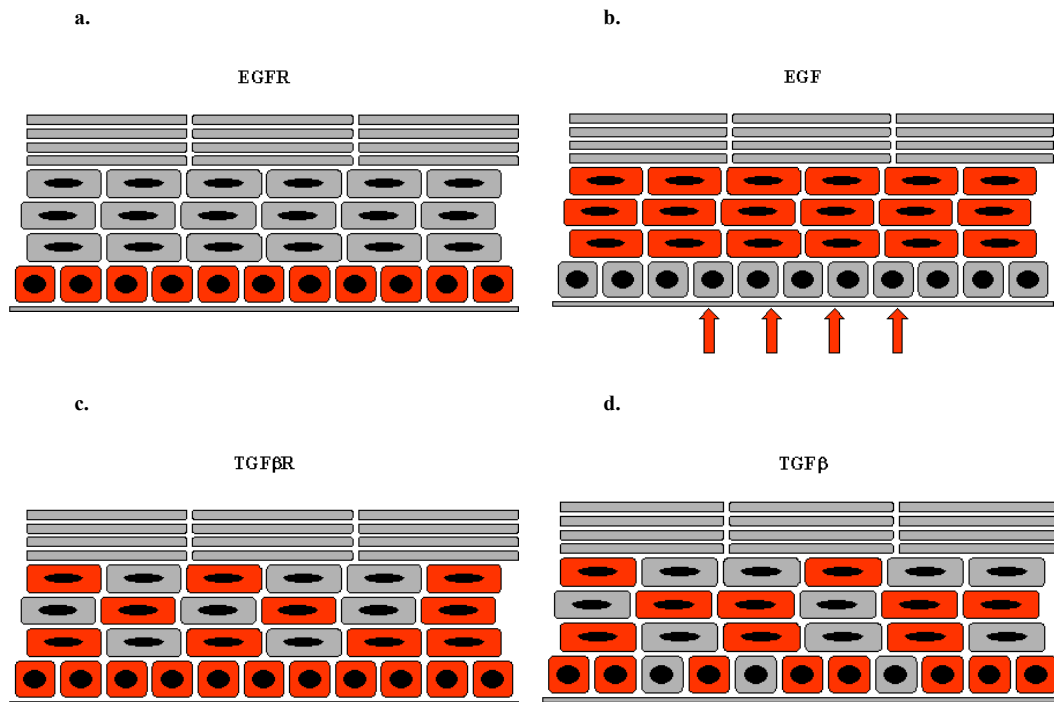


Fig. 46. Localisation des récepteurs membranaires dans les épithélia stratifiés adultes : a. Récepteurs EGF, b. Facteurs de croissance de type EGF, c. Récepteurs TGFβ et d. Facteurs de différenciation TGFβ. La couleur rouge représente les zones dans lesquelles l'expression des protéines a été observée.

iii. Molécules d'adhérences/cytosquelette

Les intégrines présentes dans la couche basale des épithélia stratifiés jouent un rôle pluriel dans le contrôle de la prolifération des kératinocytes *in vivo* (Fig. 47).

Les intégrines β1 auraient deux fonctions principales : organisation de la MEC, notamment par activation de l'expression de gènes nécessaire à la fabrication de la MEC (e.g. métalloprotéinases – Huhtala *et al.* 95) et maintien du potentiel prolifératif. En effet, il a été montré que l'expression ectopique d'intégrines β1 entraîne la présence de récepteurs EGFR (Rikimaru *et al.* 97). Les intégrines β1 permettraient à des cellules de la membrane basale de maintenir un équilibre stable en phase G₁ (rallonger la phase G₁ à volonté sans se retirer en phase G₀) où un petit changement dans l'état de l'environnement de la cellule suffirait à mettre en route le processus réplcatif (Jones 97). Ce rôle reste cependant discuté (Lavker *et al.* 01).

Les intégrines α6β4 semblent posséder un éventail de fonctions légèrement plus étendu : contrôle de l'adhésion forte à la MB, polarisation de l'épithélium et coopération avec les TKR lors de leur activation par des facteurs de croissance (Fuchs *et al.* 97). Le rôle des intégrines α6β4 lors de l'induction est difficile à établir. La perte des hémidesmosomes est observée durant les premières étapes de la maturation des kératinocytes *in vitro* lorsque celle-ci est induite par une augmentation du Ca²⁺ extracellulaire. Il semblerait donc que la perte des hémidesmosomes soit une conséquence et non pas une cause de l'initialisation de la différenciation. En effet, *in vitro*, le ligand des hémidesmosomes (principalement la laminine 5) est toujours présent dans le substrat (Tennenbaum *et al.* 96). Les deux processus pourraient être liés, mais dans quel ordre ? Est-ce le changement d'expression des kératines qui modifie l'environnement de la partie interne des hémidesmosomes entraînant la dégradation de ces complexes ou l'activation de mécanismes enzymatiques associés aux hémidesmosomes qui entraîne le démantèlement des liaisons kératine-hémidesmosomes induisant la destruction des kératines inutiles ?

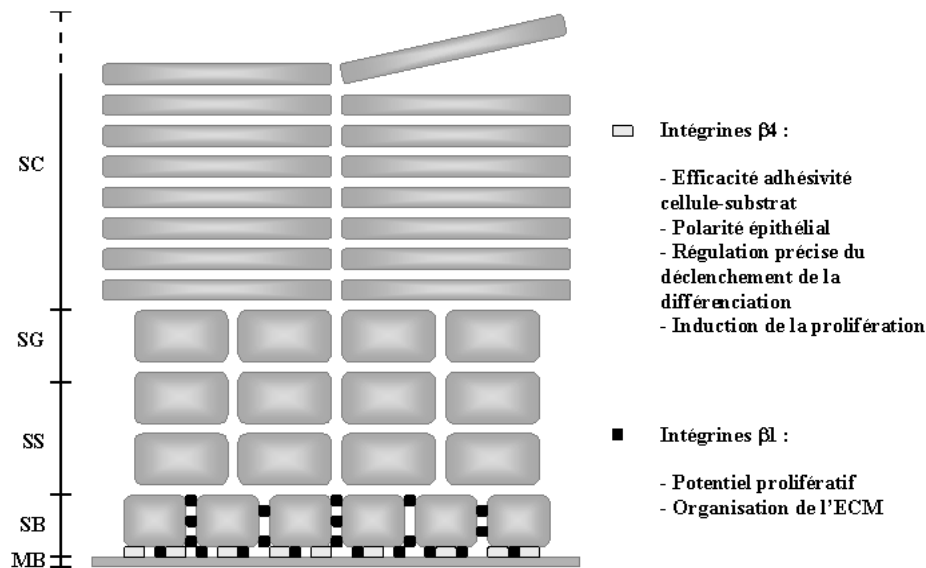


Fig. 47. Rôle des intégrines dans l'épiderme (d'après Fuchs *et al.* 97).

La perte de l'adhérence due aux hémidesmosomes intervient simultanément au remplacement de l'expression des kératines K5 et K14 par l'expression des kératines K1 et K10 par les kératinocytes basaux en voie de différenciation (Tennenbaum *et al.* 96). Les kératines K1 et K10 sont exprimées exclusivement dans les couches suprabasales (couche spinale) alors que les kératines K5 et K14 sont exprimées seulement dans la couche basale (Eckert *et al.* 97). Ce changement est certainement une conséquence du changement de mode de régulation des gènes lors de l'initialisation du processus de différenciation (Rikimaru *et al.* 97) et joue certainement un rôle dans le maintien des cellules suprabasales dans un état différencié comme le changement de structure et le nombre des desmosomes (Fig. 10).

c. Conclusion/vue d'ensemble : Intégration moléculaire de l'équilibre prolifération / différenciation

Un exemple significatif de la confusion générée lors de l'intégration de la complexité moléculaire de la régulation de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes *in vivo* est donné par le papier de Gandarillas et collaborateurs (Gandarillas *et al.* 97). c-myc est un facteur de transcription dont la surexpression est connue pour entraîner la prolifération et inhiber la différenciation dans de nombreux modèles cellulaires (DePihno *et al.* 91). Or l'expression constitutive de c-myc l'augmentation de la différenciation des kératinocytes (Gandarillas *et al.* 97). Cette apparente ambiguïté a donné lieu à une interprétation directe : le rôle de c-myc chez les kératinocytes est l'opposé de son rôle chez les fibroblastes (Gandarillas *et al.* 97). Or on peut raisonnablement douter de cet antagonisme. Pourquoi c-myc ne serait-il pas un activateur de la prolifération dont l'effet se traduit *in vivo* par l'augmentation de la prolifération des cellules souches et donc par l'augmentation du pool de cellules capables de se différencier, sous l'influence de leur environnement ? Une tentative de réponse à cette question paraît possible expérimentalement, mais coûteuse. Et surtout, sera-t-il possible de répondre à chaque fois qu'un cas semblable se présentera, la vue d'ensemble se compliquant sans cesse. La construction de modèles dans le but de disposer d'outils de simulations paraît une solution intéressante à ce type de problème puisqu'elle permet de poser des hypothèses et de disposer de réponse quand à la dynamique de systèmes complexes à moindre coût.

Partie 2 : Modélisation de la prolifération cellulaire

I. Introduction : modélisation de la prolifération, une discipline contemporaine

Bien que les biologistes frémissent à la seule mention de « modèles » ceux-ci font parti de leur quotidien. En effet, la notion de modèle est indissociable de celle de science. Rappelons, simplement, que la science peut-être définie comme la connaissance de domaines (ou de processus) acquise par l'expérimentation et qu'un modèle est une représentation de cette connaissance. Toute démarche expérimentale vise à accroître la connaissance par l'observation et/ou la mesure en améliorant la représentation de celle-ci. Or, les bases de l'approche expérimentale sont à la fois la connaissance **et** le cadre conceptuel de sa représentation. L'enjeu est la nécessité de confirmer des hypothèses posées dans le cadre conceptuel. L'expérimentation nourrit le modèle qui nourrit à son tour l'expérimentation afin d'améliorer le paradigme en cours ou d'en proposer un nouveau plus conforme aux données expérimentales et/ou aux suggestions émanant du modèle. Si l'utilisation de modèles en tant qu'outils d'investigation a part entière a toujours du mal à être acceptée par la communauté biologiste son rôle en tant qu'outils d'aide à l'expérimentation semble désormais en passe d'être reconnu (**Wiley 00**). Les ordinateurs jouent d'ailleurs déjà un rôle essentiel en biologie structurale et en génomique et ne tarderont pas à occuper une place plus grande encore.

L'appréhension de la dynamique des mécanismes de contrôle de la prolifération et de la différenciation *in vivo* reste l'obstacle principal à la compréhension de l'homéostasie. Grâce aux simulations sur ordinateur, l'usage des modèles mathématiques et informatiques permet de prendre en compte la dimension temporelle.

Il existe une très grande diversité des modèles dans le domaine de la biologie cellulaire et ils peuvent prendre des formes très diverses : simple schéma en deux dimensions (2D) au crayon sur une feuille de papier, équation mathématique ou animation en trois dimensions (3D) sur un écran d'ordinateur, par exemple. Le choix du type de modèle dépend du problème abordé, de l'approche scientifique souhaitée ou requise, ... Afin de souligner les bases de notre approche, nous avons voulu présenter un aperçu de cette discipline somme toutes assez récente et en pleine phase de croissance exponentielle. Notre but sera atteint si cette partie permet de bien saisir les raisons de chacun de nos choix quant à la construction de notre propre modèle.

Nous avons distingué les modèles de la prolifération avec ou sans visualisation des cellules et/ou des tissus. Les modèles sans représentation des cellules sont les plus nombreux et les plus anciens principalement basés sur un formalisme mathématique ou statistique (e.g. équations différentielles, systèmes discrets, systèmes logiques). Les progrès récents de la compréhension des mécanismes biochimiques de régulation de la prolifération ont rendu indispensable le développement d'outils de modélisation de la complexité de ces réseaux de régulation (**Thieffry 98**). L'utilisation de modèles utilisant une représentation 2 ou 3D dans un cadre dynamique a été rendu possible par les récents progrès en informatique et la démocratisation de cet outil qui a permis de disposer d'outils performants à de faibles coûts. La modélisation de la forme des cellules, de l'architecture des tissus permet de replacer les cellules dans leur contexte, de modéliser les relations sociologiques des cellules entre elles à l'intérieur d'un tissu (**Chandebois 77**).

II. Modèles de prolifération cellulaire

1. Introduction

De très nombreux modèles mathématiques ont été réalisés sur les croissances de populations cellulaires, en cultures, dans les tissus en général et les tissus cancéreux en particulier. Plutôt que de distinguer ces modèles suivant leur nature (modèles déterministes, basés pour la plupart sur des équations différentielles, modèles stochastiques, modèles compartimentaux, modèles à bases d'automates cellulaires, modèles logiques ou Baysiens, etc.), ou suivant les systèmes biologiques qu'ils abordent (cellules eucaryotes inférieures ou eucaryotes supérieurs, normales, embryonnaires ou cancéreuses), on distinguera les macro-modèles des micro-modèles⁷ comme le suggère Kholodenko (**Kholodenko *et al.* 99b**). La différence entre ces deux grandes familles de modèles réside dans leur résolution. Les micro-modèles, plus récents, détaillent les mécanismes biochimiques à la base des régulations biologiques ou physiologiques alors que les macro-modèles s'encombrent moins de détails et proposent un regard plus phénoménologique de ces mécanismes (e.g. caractérisation de la dynamique d'une population).

2. Macro-modèles

La plupart des macro-modèles traite de la dynamique de populations cellulaires *in vitro*. Il existe de très nombreuses d'approches de modélisation basées sur des modèles expérimentaux simples comme les cultures d'eucaryotes inférieurs, de cellules embryonnaires, de cellules tumorales ou les sphéroïdes tumoraux. De part sa relative simplicité, la prolifération *in vitro* des cellules eucaryotes inférieures (e.g. *Saccharomyces pombe* ou *cerevisiae*) est un modèle privilégié pour les amateurs de contrôle de cycle cellulaire (**Norris *et al.* 94**). Mais il peut-être périlleux de transposer les concepts sous-jacents de la prolifération des eucaryotes inférieurs vers celle des eucaryotes supérieurs (hétérogénéité des populations cellulaires, interaction avec l'environnement).

La culture de cellules embryonnaires ou cancéreuses présente des dangers pour la modélisation. Dans le cadre d'une modélisation phénoménologique, où la dynamique de la population est le principal centre d'intérêt, le risque de s'attacher à des artefacts est très important. Au risque de nous répéter rappelons encore une fois que non seulement les conditions de culture ne sont jamais identiques aux conditions de vie des cellules dans leur organisme d'origine. Dans la plupart des cas ce sont des conditions optimisées pour la prolifération cellulaire, en conséquence la mise en culture peut souvent être considérée comme une mise en conditions de stress. Ce point est excessivement important en modélisation puisque des hypothèses fausses induisent des modèles faux. Ces précautions prises, de nombreux modèles présentent un intérêt réel que nous allons souligner ici.

a. Modèles de prolifération (croissance) cellulaire

i. Cellules en cultures

- Modèles déterministes

Les cultures de cellules représentent le modèle le plus simple pour étudier les comportements de populations cellulaires. De très nombreux modèles ont été développés sur ce sujet. La dynamique d'une population cellulaire *in vitro* comprend généralement deux phases : une première phase de croissance exponentielle et une phase de ralentissement de la croissance où le nombre de cellules tend vers un plateau (**Fig. 48**).

⁷ La définition de Kholodenko ne correspond pas à d'autres plus communes en biologie comme celle de Vaidya *et al.* 91 où les micromodèles correspondent à une situation locale (e.g. tumeur) et les macromodèles correspondent à une extension de la situation locale (e.g. métastase).

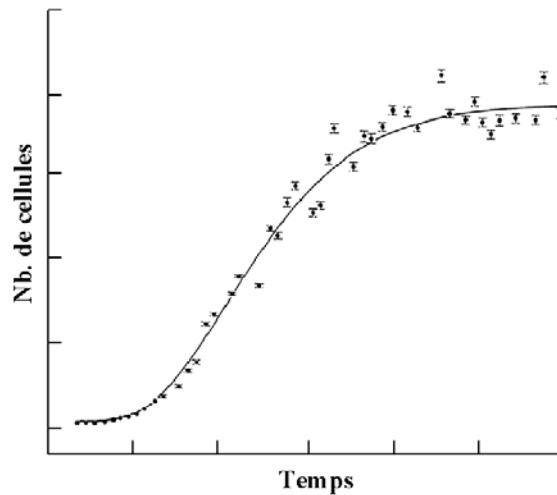


Fig. 48. Croissance d'une population cellulaire in vitro. Les points et les intervalles représentent des données expérimentales et la courbe est donnée par le modèle (de type Gompertz) dont les paramètres ont été estimés pour optimiser l'ajustement aux données expérimentales.

Le sens biologique du ralentissement de la croissance observé plus tard en culture est toujours sujet à caution, il est possible qu'il soit lié à une limitation de l'espace (inhibition de contact), des nutriments disponibles ou à l'atteinte d'une hypothétique limite du nombre de division par les cellules de la population (limite de Hayflick) et reste donc beaucoup plus difficile à modéliser. Plus précisément, il existe de nombreux modèles décrivant ce type de croissance mais de nombreux modèles ont été élaborés mais aucun n'apporte réellement d'éléments de réponse à ces questions. Ces modèles restent descriptifs. Comme le souligne Witten (**Witten 81**) dans une revue où sont comparés les intérêts respectifs d'approches discrètes, continues ou stochastiques, si la plupart des modèles arrive à rendre compte d'une situation particulière avec suffisamment de pertinence, très peu ont la capacité de s'adapter à des données différentes sans modifications majeures. D'autant que le modèle le plus simple possible de type : $\frac{dN(t)}{dt} = k \times N(t)$ et $N(t_0) = N_0$, où $N(t)$ est le nombre de cellules présentes dans la population à l'instant t et N_0 le nombre de cellules initial, peut devenir excessivement complexe dès lors que des mécanismes différents comme des flux de population entrant ou sortant (migrations), la mort cellulaire ou l'hétérogénéité des âges des cellules à l'intérieur de la population ou, par exemple, par ajout d'éléments probabilistes lorsque le comportement à modéliser est inconnu ou peu compris.

Il existe de nombreux modèles de prolifération de levures, eucaryotes unicellulaires pour lesquels les auteurs ont centré leur approche sur l'aspect cyclique de la prolifération de ces cellules en culture (**Lloyd et al. 92**, **Posadas et al. 96**). Parfois, ces modèles ont incorporé des éléments plus complexes pour évaluer l'importance de facteurs cellulaires sur cette prolifération (e.g. l'asymétrie de la division cellulaire : **Hejblum et al. 88**, **Treinin et al. 93**).

- Modèles Stochastiques – Probabilistes

Ces approches stochastiques ont souvent été raillées par les biologistes (**Wiley 00**) qui n'apprécient guère que l'on associe les termes *transition probabiliste* et *cycle cellulaire* (**Gilbert 82a, 82b**). Il s'agit souvent en effet d'associer un élément probabiliste à un processus inconnu.

Par exemple, Shall et collaborateurs développèrent un modèle de la limite de Hayflick observée chez les cellules embryonnaires de souris en culture (**Karatzas et al. 84, 84**). La croissance de la population de cellules embryonnaires est modélisée par une équation simple $P_m = \frac{t}{\gamma + t}$ où P_m est la probabilité de chaque nouvelle cellule fille de perdre sa capacité de prolifération (probabilité de mortalisation), γ étant le nombre de génération auquel la probabilité dite de « mortalisation » atteint 0.5. En modifiant γ suivant l'espèce (e.g. la croissance des

cellules de souris se stabilise plus vite que celle des cellules de rats), il est possible d'ajuster ce modèle de façon reproductible sur des données expérimentales de culture de cellules (rapport de maîtrise **Morel 95**) sans que le modèle n'apporte un quelconque élément de compréhension des mécanismes (moléculaires ou cellulaires) impliqués dans la limite de Hayflick.

En un sens ce modèle n'est pas très éloigné de celui de Kimmel et collaborateurs (**Kimmel et al. 91**) qui, bien que possédant une formulation mathématique beaucoup plus complexe, considère la mort et la quiescence cellulaire comme des processus stochastiques. C'est la limite de ce type de modèles, ils ne peuvent être que descriptifs, ils rendent compte d'une situation, peuvent à la limite, dans certains cas, faire preuve d'un certain potentiel prédictif (seulement quand les conditions expérimentales ne changent pas), en somme, ils sont utilisables mais pas très utiles...

Contrairement à ces modèles généralistes de première génération, les derniers modèles probabilistes à avoir été publiés montrent le souci de s'intéresser à des mécanismes moléculaires particuliers. Citons comme exemple le cas du modèle du comportement d'*E. coli* après infection par le phage λ proposé par Arkin et collaborateurs (**Arkin et al. 98**) ou encore l'exemple de Rubelj et collaborateurs (**Rubelj et al. 99**) qui ont proposé un modèle stochastique du vieillissement par raccourcissement des télomères lors du syndrome de sénescence soudaine (SSS). Ce syndrome pourrait être un des mécanismes de limitation important de la prolifération des cellules en cultures, caractérisé par la limite de Hayflick. Bien sûr, on pourra toujours discuter de la nature stochastique ou artefactuelle d'un tel processus... Ces derniers modèles semblent intéressants dans la mesure où ils permettraient d'obtenir des informations statistiques valables sur un mécanisme moléculaire précis pour des populations cellulaires très nombreuses. A ce titre, ils procureraient de nouveaux outils d'aide à l'expérience.

ii. Modèles de croissance de tumeur

- Modèles déterministes

Un grand nombre de modèles concernant la prolifération cellulaire sont des modèles de croissance de tumeur et de développement de cancers. Ces modèles furent développés dès les années 1960 mais c'est dans les années 1980 et 1990 que nombre de publications ont eu pour sujet la prédiction de croissance de tumeur.

Les modèles de croissance de sphéroïdes tumoraux sont une version évoluée des modèles de croissance de cellules tumorales en cultures permettant d'appréhender la croissance tumorale en 3 dimensions. Les approches les plus simples se sont limitées à une modélisation mathématique déterministe de cette croissance en adaptant des modèles de type Gompertz, Von Bertalanffy ou logistiques (**Marušić et al. 94, Demicheli et al. 91, Gatenby 91**).

Il existe aussi des modèles de croissance de tumeur par diffusion (e.g. **Glass 73**). Le mécanisme de base modélisé est celui du contrôle de la taille de la tumeur par une boucle en contrôle négatif. Greenspan développa des modèles plus complexes incluant les effets conjugués d'inhibiteurs et des nutriments dans une sphère à trois dimensions (**Greenspan 74**). Le modèle de Glass fût repris plus tard en introduisant la théorie des chalone (notion d'inhibiteurs de mitose pré-cyclines, **Bullough 65**) et la non-uniformité de la source d'inhibiteurs pour en tester la stabilité en 1D (**Adam 86**), 2 ou 3D (**Adam 87a**) avant d'être confronté aux données expérimentales (**Adam 87b**).

Par la suite, des modèles rendant compte des effets de facteurs de croissance autocrine et paracrine (**Michelson et al. 91, 93, Tomlinson et al. 97**) ou de l'effet de niveaux de récepteurs de facteurs de croissance anormalement hauts sur la croissance de tumeurs (**Pollak et al. 91**) ont été développés.

Malgré ces efforts, ces modèles restent pris au piège d'une approche phénoménologique, descriptive qui ne leur confère qu'un intérêt limité dans le cadre de la compréhension de la biologie. Par contre certains modèles

déterministes ont pu se montrer intéressants dans un cadre plus médical soit en pronostique soit en diagnostique. Peut-être que les modèles prospectifs de réponse à la chimiothérapie ou la radiothérapie sont les plus intéressants (**Retsky et al. 87**) parce qu'ils sont systématiquement comparés à des données expérimentales. D'autres modèles, élégants mais plus théoriques, potentiellement utilisables dans un cadre pronostique sont restés sans suite (e.g. l'application de la théorie de la bifurcation non-linéaire de **Vaidya et al. 91**). Dans un cadre diagnostique des modèles ont été utilisés pour donner un grade aux tumeurs, (**Chaplain et al. 93**). Le modèle reprend beaucoup celui de Greenspan (**Greenspan 76**) mais incorpore des éléments de théorie de l'élasticité non-linéaire en l'appliquant à la déformation de la tumeur (changement de forme en réponse à un stress, la tumeur possède plusieurs états d'équilibre différents soit plusieurs formes possibles). Malheureusement, certaines des hypothèses biologiques posées pour simplifier le modèle sont complètement fausses, notamment quant à la nature des contrôles de la division cellulaire, et rendent le modèle tout ou partiellement inacceptable. Cette difficulté est un phénomène récurrent en modélisation, les hypothèses de bases des modèles ne correspondant pas toujours à des faits biologiques avérés.

Le manque de répercussion de ces approches pourtant intéressantes peut s'expliquer par l'abord difficile d'une formulation exclusivement mathématique et la difficulté d'appliquer ces modèles dans un cadre différent. De plus, comme le montre le papier de Calderón et collaborateurs (**Calderón et al. 91**), le jeu mathématique prend très vite le pas sur la problématique biologique sous-jacente et la comparaison des modèles de Gompertz ou des équations de Von Bertalanffy n'apparaît pas immédiatement porteuse d'une quelconque justification biologique.

- Modèles Stochastiques – Probabilistes

De nombreux modèles stochastiques de l'émergence des tumeurs ont été réalisés. Dans le domaine de la prolifération cellulaire les modèles stochastiques ont pu être une façon d'améliorer les modèles déterministes classiques en rajoutant des éléments de probabilité permettant de rendre compte des croissances de tumeur non-bornées, ce qui est malheureusement souvent le cas. Les modèles déterministes de types Gompertz ont ainsi été modifiés pour donner des modèles de Gompertz stochastiques (**Tan 86**).

C'est aussi souvent l'apparition des mutations qui a été appréhendée comme un processus stochastique (**Conolly et al. 94**). D'autres approches associent à la fois une modélisation déterministe de type Gompertz couplée à une modélisation stochastique de type *branching process* utilisée pour rendre compte de la probabilité d'extinction de la tumeur avant sa détection (**Hanson et al. 81**).

iii. Modèles de croissance de tissus

Le recours à une modélisation mathématique simplificatrice des comportements cellulaires dans le cadre d'un tissu organisé a souvent été justifié par une incapacité à prendre en compte la complexité réelle des comportements biologiques, et ce jusqu'à très récemment. Le modèle de réparation de la cornée développé par Gaffney et collaborateurs illustre bien cette prise en compte de la complexité par les modèles déterministes à équations différentielles (**Gaffney et al. 99**). Plusieurs modèles de plus en plus complexes ont été conçus successivement à partir d'un système d'équations différentielles partielles non linéaires inspiré du modèle de Dale et collaborateurs (**Dale et al. 94a et 94b**) où, en contradiction flagrante avec les données expérimentales (**Sandvig et al. 93 et 94**), le taux des mitoses après blessure de la cornée centrale augmente de façon drastique là où le tissu a été blessé, soit la cornée centrale (**Fig. 49bis a**). Quand le modèle de Dale et collaborateurs n'était basé que sur le calcul de la variation de densité cellulaire et la variation de concentration d'un stimulus moléculaire, les versions successives du modèle de Gaffney et collaborateurs incluent : deux types cellulaires (souches ne proliférant qu'après stimulus et en transit), la durée moyenne du cycle cellulaire des cellules en transit, des facteurs inhibiteurs et activateurs de la prolifération, les coefficients de diffusion de ces facteurs, etc.

Ce nouveau modèle permet d'obtenir des résultats plus en concordance avec les données expérimentales (**Fig. 49b**).

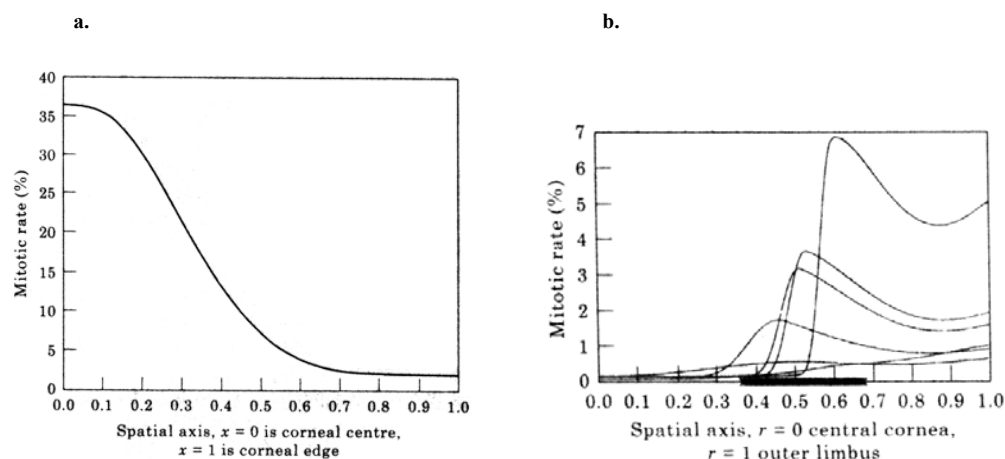


Fig. 49. Comportement de modèles de prolifération des cellules de la cornée lors d'une blessure centrale : a. Modèle de Dale et collaborateurs (tiré de Dale *et al.* 94a, 94b) et b. Modèle de Gaffney et collaborateurs (tiré de Gaffney *et al.* 99). L'axe des abscisses indique la position le long de la membrane basale de la cornée avec 0 le centre et 1 la limite externe de la cornée (bulge). L'axe des ordonnées indique le taux de mitoses.

Ce modèle montre que l'existence d'une population de cellules en quiescence (raccourcis abrupt des auteurs pour cellules souches), d'une population de cellules proliférantes, l'organisation des populations suivant les ages des cellules (organisation hiérarchique liée au nombre de générations), et la présence d'un système de signalisation latéral des cellules entre elles (signalisation juxtacrine) sont tous des paramètres essentiels à la réparation de l'épithélium cornéen. L'absence d'un de ces paramètres, le modèle ne se comporte pas en adéquation avec les données expérimentales.

b. Macro-modèles du cycle cellulaire

Les macro-modèles du cycle cellulaire sont pour la plupart des modèles mixtes (déterministes et stochastiques) dits compartimentaux. Ce type de démarche est généralement basé sur le découpage du cycle cellulaire en phases distinctes. Chronologiquement, ils correspondent à l'avènement de la cytométrie en flux au début des années 1980 qui permet de distinguer facilement les phases du cycle cellulaire suivant, notamment, le contenu en ADN des cellules.

Suivant les modèles, les compartiments ont été défini comme des phases du cycle cellulaire soit explicitement (G_1 , S, G_2 , M, etc.) soit implicitement (phase de prolifération active, phase de quiescence, état d'inhibition active, etc.). La part déterministe du modèle réside en général dans la durée de chacune des phases du cycle cellulaire qui est fixe et la part stochastique dans la probabilité de passer d'une phase à l'une des phases suivantes (**Adam 81, Alberghina *et al.* 86, Kimmel 81, Mitrani 81**). Les modèles de ce type les plus complexes intègrent la possibilité de choix multiples lors des passages d'une phase à d'autres, démontrant des comportements particuliers proches de ceux des réseaux de neurones (**Kimmel 81**). Dans de rares modèles l'élément stochastique est la durée de chaque phase (**Hayter *et al.* 91**).

Dans les modèles dits ici explicites (**Düchting *et al.* 81, 85, Guillaud *et al.* 93, Hayter *et al.* 91, Mitrani 81⁸**) les phases G_1 , S, G_2 , M sont considérées comme des compartiments du modèle. Le modèle de Alberghina et collaborateurs (**Alberghina *et al.* 86**) distingue une phase G_1 de croissance cellulaire et de production d'ARN

⁸ Nous aurons l'occasion de parler à nouveau des modèles de Düchting *et al.* et de Mitrani car ils intègrent une représentation respectivement 3 et 2D des cellules.

lors de laquelle la cellule doit être compétente (sensibles aux facteurs de croissance extracellulaires) pour entrer dans une phase de réplication de son ADN. La compétence est dépendante de l'héritage cellule mère / cellule fille suivant une loi probabiliste définie dans le modèle. Les modèles implicites tels que celui de Adam (**Adam 81**) distinguent trois phases avec des cellules (i) en cycle, (ii) subissant une inhibition réversible de la prolifération ou (iii) une inhibition irréversible de la prolifération. Les conditions externes sont considérées comme constantes (**Adam 81**) pour simplifier le modèle, ce qui limite grandement l'intérêt de l'approche puisqu'elle devient alors restreinte à ce cas particulier.

Les modèles compartimentaux permettent donc de rendre compte de plusieurs types de comportements cinétiques : prolifération, quiescence et différenciation. Bien sûr la majorité de ces modèles est de peu d'intérêt pour aider à comprendre les mécanismes de régulation de la prolifération, par contre, ils peuvent fournir des outils complémentaires à des techniques expérimentales descriptives basées sur des connaissances phénotypiques (la cellule se divise, la cellule meurt, la cellule réplique son ADN, etc.), notamment la cytométrie en flux.

L'utilisation de modèles compartimentaux dans le cadre de la croissance tumorale a aussi donné lieu à quelques travaux, soit en utilisant les compartiments sur la même base que celle décrite précédemment, les phases du cycle cellulaire étant les compartiments du modèle (**Düchting et al. 81, 85**), soit en utilisant des compartiments pour modéliser les différentes étapes de la carcinogenèse : cellules normales, cellules transformées et cellules malignes (**Kopp-Schneider et al. 93**) ou dans des versions plus complexes : cellules normales, cellules endommagées, cellules souches transformées, cellules transformées mortelles et cellules malignes (**Kopp-Schneider et al. 94, Portier et al. 93**).

c. Conclusion des macro-modèles

Les macro-modèles que nous venons de décrire sont pour la plupart hérités de la biologie des populations. Or, nous l'avons vu, les connaissances actuelles de la régulation de la prolifération et de la différenciation montrent que le nombre de molécules (protéines, gènes, ...) et de réactions impliquées dans cette régulation est immense. Si les macro-modèles peuvent se montrer efficaces dans un rôle descriptif, ils ne peuvent pas rendre compte de cette complexité. Ils sont trop réducteurs car basés sur des hypothèses trop simplificatrices.

Encore une fois, suffit-il qu'un modèle s'ajuste des données expérimentales pour qu'il soit intéressant. Cette idée induit une question essentielle, y'a-t-il un moyen de quantifier l'adéquation d'un modèle et des hypothèses sur lesquelles il se base autre que le propre ajustement aux données elles-mêmes ? Un tel outil permettrait de rejeter nombre de modèles insatisfaisants avec même de les utiliser.

3. Micro-modèles

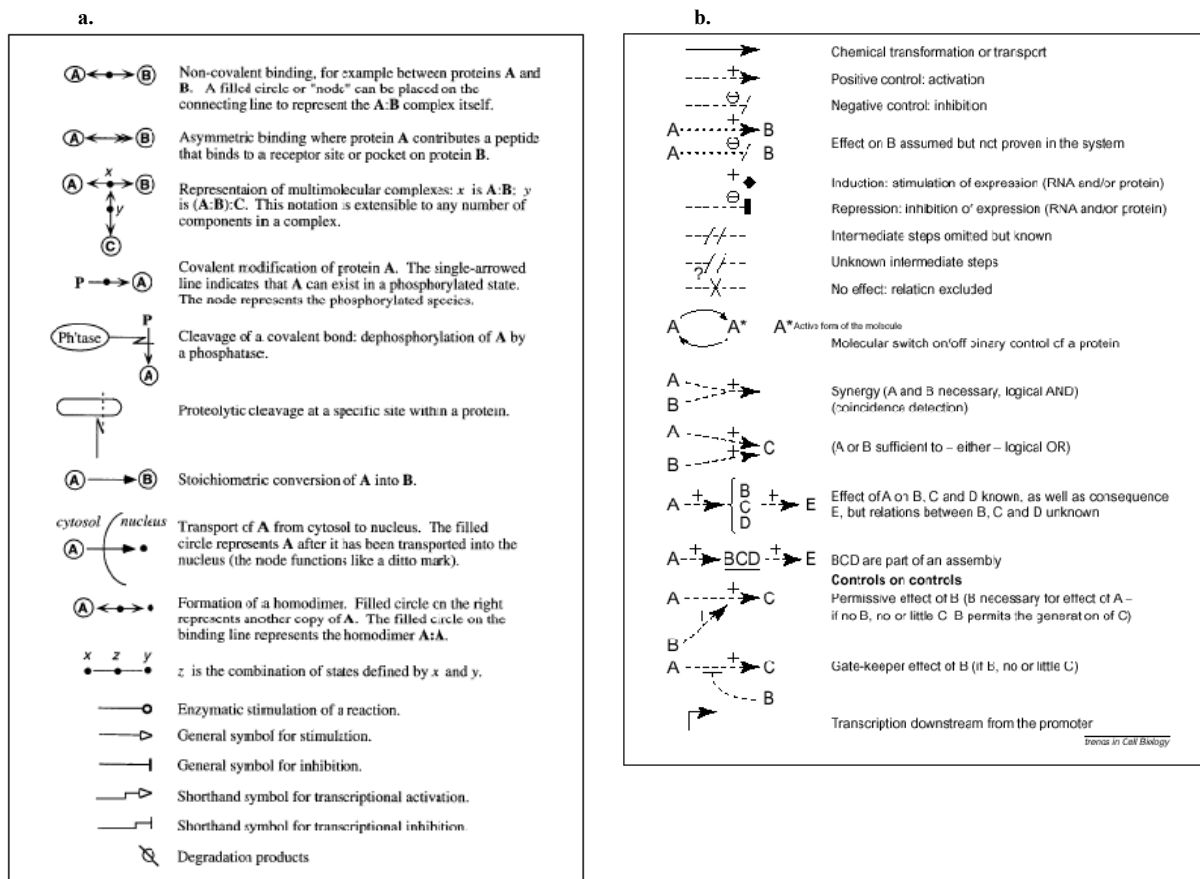
Le réseau très complexe de contrôle de la prolifération qui s'ébauche actuellement grâce aux progrès de la biologie moléculaire comporte des interactions moléculaires chaque jour plus nombreuses, découvrant de nouvelles boucles de régulation positives ou négatives et donc, du point de vue de la modélisation, une augmentation des possibilités de comportements non-linéaires. Les micro-modèles ont suivi de très près l'évolution récente des connaissances en biologie moléculaire et tentent d'aborder, par le biais de l'informatique, des mathématiques et des statistiques

a. Formalismes

Parvenir à des consensus de formalisation de la biologie moléculaire est une nécessité. Si l'intérêt pour le biologiste est évident - disposer d'un langage commun de description de la réalité - il l'est encore plus pour le modéliste - disposer du langage le plus explicite et optimale pour développer les modèles de la réalité les plus

simples et précis. De nombreux formalismes ont déjà été proposés, certaines approches étant manuelles et d'autres automatisées, liées à la construction de bases de données.

Parmi les approches manuelles on retrouve les essais de représentation complexes de la plupart des revues sur les voies de signalisation ou de contrôle de la prolifération cellulaire. Citons, pour l'exemple, les papiers de **Aguda 01**, **Hanahan et al. 00**, **Sherr et al. 95, 99**, **Shackney et al. 99** ou encore **Stein et al. 99**. En dehors de leur intérêt potentiel, c'est le manque d'unicité de ces représentations, avec les difficultés de compréhension lors du passage de l'une à l'autre que cela impose, qui a poussé d'autres auteurs à proposer des notations plus formelles. Elles s'appliquent à des cas plus ou moins particuliers. Certaines sont destinées aux systèmes biochimiques de types enzymatiques (**Voit 00**), d'autres aux interactions moléculaires en générale (**Kohn 99**, **Pirson et al. 00**). Des exemples de ces notations sont donnés par la **Fig. 50**.



c.

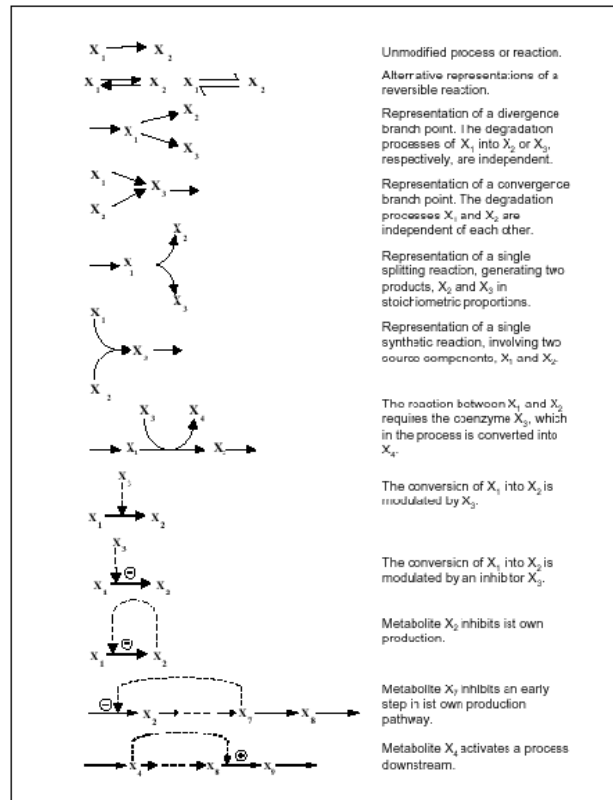


Fig. 50. Comparaison des formalismes proposés par a. Kohn 99⁹, b. Pirson *et al.* 00 et c. Voit 00.

Il y'a beaucoup trop d'exemples pour les détailler tous, certains restent cependant remarquables par la quantité d'information qu'ils réunissent et permettent d'exploiter de façon relativement simple, comme la carte du métabolisme et celle des processus cellulaires et moléculaires développées par le Dr Gerhard Michal pour *Roche Molecular Biochemicals* (disponible en version électronique sur le site de l'Université de Genève, Expasy¹⁰) ou l'encyclopédie des gènes et du génome de Kyoto (**Ogata *et al.* 99**). On retrouve le même type de carte pour les voies de signalisation cellulaire (**Kanehisa *et al.* 00**). Ce sont pour la plupart des cartes utilisées en parallèle à une base de données de gènes et/ou de protéines, d'ailleurs certains sont développés par des entreprises (**Biocarta**¹¹ et **Biobase**¹²).

L'automatisation du tracé des cartes des interactions moléculaires dans la cellule est un sujet de recherche très exploré actuellement, que ce soit dans le domaine des interactions protéiques (**Bader *et al.* 00, DIP**¹³), des voies métaboliques (**Karp *et al.* 00, Graphlet**¹⁴) ou les voies de transmission de signaux (**Takai-Igarashi *et al.* 98**). La génération automatique de ce type de cartes est un enjeu économique et plusieurs entreprise propose déjà des outils évolués comme **PIMRider (Hybrigenics**¹⁵), **π -SCOUT (Lion Bioscience**¹⁶) ou **Biobase (Biobase)**.

Aucune de ces approches ne présentes toutes les qualités que l'on pourrait attendre d'un formalisme utilisable à grande échelle (intuitivité, unicité des symboles, évolutivité, ...). Pour palier à ces lacunes, un groupe de travail

⁹ Kohn a proposé une carte de ces contrôles (**Kohn 99**) en appliquant son système de nomenclature à l'ensemble des régulations moléculaires connues de la prolifération cellulaire. L'intérêt de cette publication est immense, elle a été une des bases essentielle de notre propre travail et commence seulement maintenant à recevoir l'intérêt qu'elle mérite.

¹⁰ http://biochem.boehringer-mannheim.com/prodinfo_fst.htm?techserv/metmap.htm

¹¹ <http://www.biocarta.com>

¹² <http://www.biobase.de>

¹³ <http://dip.doe-mbi.ucla.edu>

¹⁴ <http://www.fmi.uni-passau.de/Graphlet>

¹⁵ <http://www.hybrigenics.com>

¹⁶ <http://www.lionbioscience.com>

international crée en 1999, nommé le *Biopathways Consortium* (BPC¹⁷), se propose de les évaluer, et d'apporter d'éventuelles améliorations. Les résultats de ce travail doivent être publiés vers la fin de l'année 2001. Comme nous allons le voir, seules quelques-unes de ces approches ont été couplées avec des simulations pour permettre de donner une vue dynamique du fonctionnement de ces réseaux.

b. Simulations

Le but des modèles de simulations des processus moléculaires de la cellule est de montrer comment, à partir d'un jeu de protéine précis aux interactions possédant une topologie donnée permet d'expliquer des comportements dynamiques qui reste difficilement explicables par l'expérimentation. Le point de restriction situé en G₁ avant la phase S est un de ces comportements.

i. Modèles d'horloge mitotiques

Alors que certains macro-modèles que nous avons décrit plus haut intégraient des notions de contrôle de la croissance de tissus (notamment tumoraux) par des facteurs de croissance, le rôle des facteurs de croissance ayant été découvert, les premiers micro-modèles de ce type étaient basés sur la découverte du MPF (*Maturation Promoting Factor* puis *Mitosis Promoting Factor*). Il s'agissait de développer l'idée d'horloge mitotique, une protéine comme le MPF étant supposé contrôler les variations de durée des premiers cycles cellulaires lors de la croissance embryonnaire. Cette vision des choses permettant d'expliquer les variations de durée de cycle cellulaire ne s'est avérée ni complètement fausse ni complètement vraie. Intégralement déterministes, ces modèles considéraient le cycle cellulaire comme un processus répétitif autonome gouverné uniquement par les variations de concentration du MPF (Norel *et al.* 91), du MPF et d'enzymes contrôlant son activité comme wee1, cdc25, CAK et INH (Novak *et al.* 93).

La découverte de nouvelles molécules a entraîné la construction de modèles plus complexes, intégrant de plus en plus de cyclines et de kinases, mais toujours basés sur la notion d'oscillation et de cycle autonome (cette évolution est bien rendue par l'évolution des modèles présentés dans les papiers de Obeyesekere *et al.* 92, 94, 95, 97). Ces modèles se sont donc peu à peu transformés en modèles de cascades (par exemple de phosphorylation) puis de réseaux de réactions (incluant tous les types de réactions enzymatiques possibles).

ii. Cascades d'activations

Il a été montré que la présence de plusieurs niveaux dans les cascades d'activation augmente la sensibilité des réactions cibles (réaction enzymatique, transcription) aux signaux extracellulaires (Brown *et al.* 97, Ferrel 96, 98, 99). Ceci expliquerait en partie cette complexité des cascades de phosphorylation cytoplasmique leur permettant d'agir comme des amplificateurs.

De plus, il semblerait que ces multiples niveaux puissent produire des bifurcations transcritives pouvant correspondre à des points de contrôle permettant le passage brusque d'un état à un autre (Aguda 98). Ce serait une autre particularité de ce type de réseau susceptible d'être utilisé par les cellules lors de transitions du type du point de restriction. Il s'agirait de transitions réversibles, contrairement aux états bistables, eux-mêmes irréversibles et caractéristiques des systèmes possédant à la fois des boucles de régulation positives et négatives (Novak *et al.* 98).

D'autres travaux ont tenté de définir, sur un plan très théorique les caractéristiques dynamiques de telles cascades (Goldbeter 91, Gonze *et al.* 01, James *et al.* 99 et Kærn *et al.* 99).

¹⁷ <http://www.biopathways.org>

iii. Modèles de réseaux de réactions

Dès lors que le nombre de molécules impliquées dans le modèle est grand et que certaines molécules, plus particulièrement les enzymes, sont impliquées dans plusieurs réactions à la fois, ou lorsque plusieurs isoformes possèdent des fonctions partiellement redondantes, il est possible de parler de réseaux de réactions (**Weng et al. 99**).

Le modèle de contrôle de la prolifération cellulaire le plus intéressant car très précis concernant le contrôle de la prolifération des eucaryotes simples unicellulaires a été développé par le tandem Novak et Tyson (**Novak et al. 93, 98, 99, Sveiczzer et al. 99, 00, Tyson 93, Tyson et al. 01**). Cette étude au long terme (8 ans entre leur premier et leur dernier papier) s'attache à décrire la dynamique des mécanismes de contrôle de la prolifération de levures. La dernière version du modèle a permis de décrire avec le meilleur rapport précision/simplicité le rôle des protéines Cycline B, CDK, CKI, cdc20, Cdh1 et APC qui sont l'équivalent chez les eucaryotes inférieurs des protéines de contrôle de la prolifération cellulaire que nous avons présenté ci-dessus. Malheureusement, ce modèle est basé sur des hypothèses qui ne sont pas transposables dans le cas de cellules d'eucaryotes supérieurs unicellulaires considérés comme des membres d'un organisme. Une version de ce modèle pour les eucaryotes supérieurs est cependant en préparation qui intégrerait la notion d'environnement (**Novak**, communication personnelle).

Les réseaux biochimiques existants chez les eucaryotes supérieurs sont très réticulés (i.e. hautement connectés) et il est possible, en théorie, que la perturbation d'un seul des paramètres (vitesse d'une réaction ou quantité d'une molécule) ait des effets importants sur de nombreux autres éléments du réseau. Cette complexité est susceptible de générer de l'instabilité. Pour échapper à cet inconvénient majeur, il est possible d'étudier la robustesse du système en isolant des sous-systèmes à l'intérieur du modèle pour fixer les valeurs des paramètres à l'intérieur de ces sous-systèmes (**Barkai et al. 97**). Le comportement du modèle dans son ensemble ne serait alors plus dépendant du choix de chacun de ses paramètres mais plutôt de l'équilibre entre ses sous-systèmes. Ces résultats sont proches des conclusions de travaux sur les réseaux génétiques montrant la prévalence de la structure du réseau sur les valeurs de ces paramètres, notamment par la présence de boucle de contrôle négative ou positive, sur la stabilité des systèmes (**Becksei et al. 00, Elowitz et al. 00**).

Faute d'outils suffisamment performants pour identifier l'ensemble des paramètres nécessaires à la construction de réseaux biochimiques réalistes et manque de données expérimentales la plupart des modèles de réseaux de signalisation cellulaire ont utilisé cette technique de découpages en sous-systèmes (**Aguda et al. 99, Bhalla et al. 99, Kohn 98, Tyson 93, Tyson et al. 01**).

Kohn (**Kohn 98**) a développé un modèle ne s'intéressant qu'aux interactions moléculaires possibles lors de la transition de la phase G₁ à la phase S pour une seule cellule d'eucaryote supérieur, considérée comme isolée de son voisinage. Pour arriver à ses fins le plus joliment possible il a utilisé le formalisme présenté dans la **Fig. 50a**. En associant cette syntaxe à un modèle de type Loi d'Action de Masse (LAM) permettant de quantifier le plus simplement possible les interactions moléculaires sans se soucier de leur type (phosphorylation, acétylation, ...) qu'elles soient stœchiométriques ou pas (**Gompert et al. 00**), Kohn a montré qu'un tel modèle pouvait permettre de mieux appréhender le comportement dynamique d'un réseau de régulation complexe sans l'aide d'outils de résolution numérique lourds pour l'identification des paramètres du modèle. Sa technique consiste à découper le modèle en sous-modules indépendants pour lesquels les valeurs de chacun des paramètres sont identifiées une par une. Les modules sont ensuite associés les uns aux autres pour finalement prendre une forme définitive (**Fig. 51**) sans qu'il soit nécessaire de modifier les valeurs des paramètres.

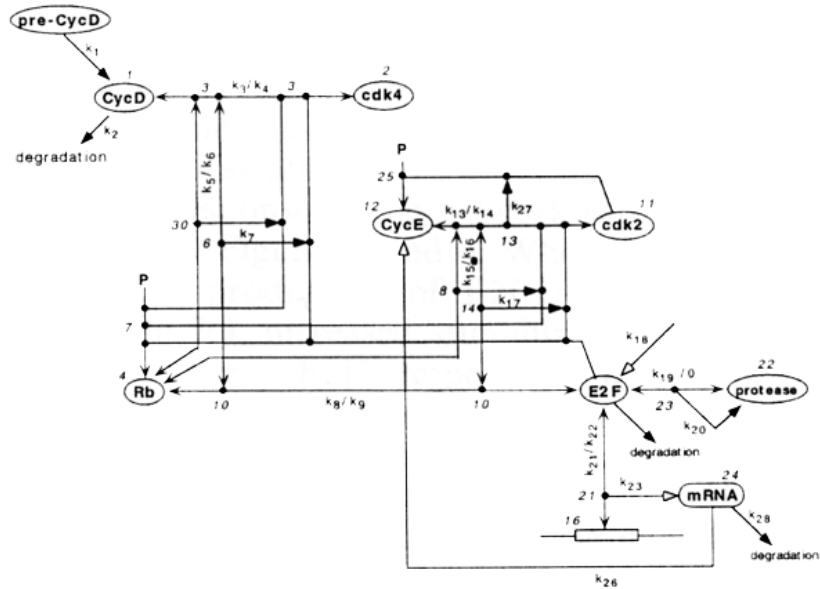


Fig. 51. Modèle de contrôle de la transition G1/S (tiré de Kohn 98).

Cette démarche n'est pas isolée, d'autres efforts ont été réalisés dans la même direction, certains moins complets (Hatzimanikatis *et al.* 99) et d'autres plus (Aguda *et al.* 99). En utilisant cette même technique dans un modèle comportant plus de paramètres (Fig. 52), les conclusions de Aguda complètent celles déjà obtenus grâce à la modélisation des cascades de phosphorylation-déphosphorylation (Aguda 98, 99) et montrent le rôle des boucles d'auto-amplification dans le point de restriction.

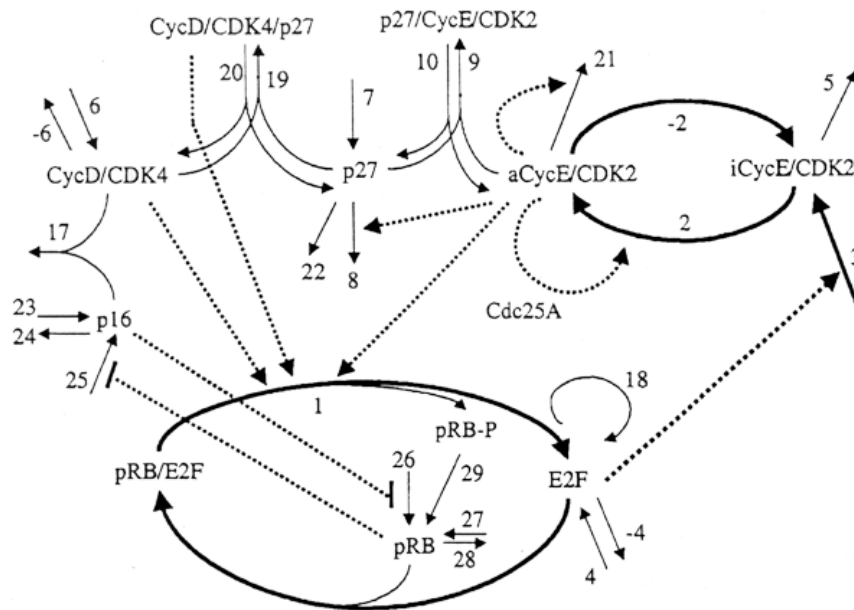


Fig. 52. Modèle de la transition G₁/S (tiré de Aguda *et al.* 99).

Poussant plus loin la logique des sous-systèmes, Bhalla et collaborateurs (Bhalla *et al.* 99) ont fabriqué une bibliothèque de réactions et de réseaux de réactions biochimiques qui peuvent être combinés ensemble et construire ainsi des réseaux de complexité variable. Les paramètres de chacun des sous-systèmes sont estimés par comparaison avec des données expérimentales *in vitro* ou *in vivo* lorsque celles-ci sont disponibles (ce qui est rarement le cas, en fait) ou simplement par comparaison avec des systèmes estimés comme similaires dont le

comportement dynamique est déjà connu. Le modèle et ses paramètres sont disponibles sur le sites Internet des auteurs¹⁸. Bhalla et collaborateurs (**Bhalla et al. 99**) ont montré que certains types de réseaux construits à partir de leur bibliothèque peuvent montrer des comportements bi-stables, et ce, quelles que soient les valeurs des paramètres des réactions impliqués. Il est important de noter que l'occurrence de cette robustesse a été variable suivant le paramètre considéré, allant de 100 à 30% suivant les cas.

En se limitant à une partie de la transmission de l'information de l'extérieur de la cellule vers l'intérieur de celle-ci, Kholodenko et collaborateurs (**Kholodenko et al. 95, 99**) ont proposé un modèle très précis de l'activation des récepteurs EGF. Le modèle intègre les multiples boucles de contrôle existant entre le récepteur lui-même et les protéines cytoplasmiques proches du récepteurs (**Fig. 53**). Tous les paramètres de ce modèles ont été fixés grâce à des expériences *in vitro*.

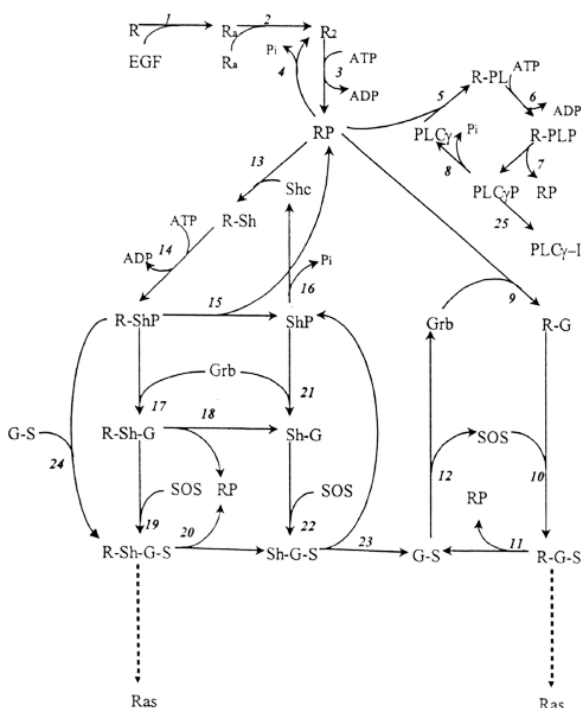


Fig. 53. Base du modèle de l'action des TKR de Kholodenko et collaborateurs (tiré de Kholodenko et al. 99).

Il existe de très nombreux modèles du métabolisme cellulaire empruntant des méthodes similaires à celles décrites ici pour la prolifération cellulaire (**Heinrich et al. 91, 99, Meric et al. 99, Schilling et al. 99**). Cependant, comme le montre le projet e-cell (**Tomita et al. 99**), il semble que soit venu le temps où, profitant des capacités de calcul des nouvelles générations d'ordinateurs, le métabolisme de la cellule puisse être intégré conjointement au mécanismes de contrôle moléculaire de la prolifération ou de la différenciation dans une vision plus globale de la cellule. Cette vision globale sera bientôt possible grâce aux données provenant de la génomique.

iv. Modèles de réseaux de gènes

La vie de la cellule ne peut pas se résumer à des interactions entre des protéines. Les modèles de Kohn (**Kohn 98**) ou Tomita (**Tomita et al. 99**) intègrent le contrôle de l'expression de gènes en modélisant les interactions entre les facteurs de transcriptions et les régions promotrices spécifiques de certains gènes (principalement les

¹⁸ <http://piris.pharm.mssm.edu/~rilab>

régions E2F). Cependant cette intégration reste très simple et d'autres modèles ont tenté d'abordé ce problème sous un angle plus spécifique (**Gardner et al. 00, McAdams et al. 97, 98, 99, 00, Szallasi 99, Thieffry 99, Thieffry et al. 98, Wahde et al. 00**). Ces modèles tentent surtout de répondre aux nouveaux besoins générés par les outils de la génomique comme les puces à ADN. Il s'agit surtout de déterminer l'architecture de réseaux génétiques en mettant à jour les éventuels « clustering » de gènes, i.e. les liens entre l'expression de certains gènes (**Szallasi 99, Tavazoie et al. 99**).

Nous n'entrerons pas plus dans les détails de ces modèles mais nous voulons juste souligner le fait qu'ils nous semblent complémentaires des modèles de réseaux de contrôle et de signalisation que nous venons de décrire. A court et moyen terme, ils pourraient être utilisés pour initialiser les micro-modèles dynamiques à partir des données expérimentales.

v. Modèles logiques

Certains chercheurs ont proposé des approches complètement qualitatives. Cette approche présente l'avantage (et l'inconvénient) de se rapprocher d'une approche déductive, du simple raisonnement intellectuel. Dans le cas de Gaglio et collaborateurs (**Gaglio et al. 91**), l'approche qualitative possède une base théorique et formelle importante (la théorie des processus qualitatifs de **Forbus 84**) permettant d'aborder le domaine avec rigueur. Un exemple de ce type de modélisation appliqué à la phase S du cycle cellulaire est donné par la **Fig. 54**.

Conditions à remplir :

- Quantité de protéine de croissance \geq seuil
- Quantité d'ADN \geq ADN normal avant duplication
- Quantité d'ADN $<$ après duplication

Si les conditions sont remplies :

- Assimilation
- Consommation
- Synthèse d'ARN
- Consommation d'Acides Aminés (AA)
- Synthèse d'ADN

Fig. 54. Description de la modélisation de la phase S (d'après Gaglio et al. 91).

Dans d'autres cas l'approche se montre simplement intuitive et déductive tout en restant riche d'enseignement. Le modèle de Shackney et collaborateurs (**Shackney et al. 99**) est un bon exemple de ce type d'approche où une réflexion poussée sur le rôle de la protéine pRb sur la prolifération cellulaire a permis de tirer des conclusions pertinentes sur le comportement de cellules pRb^{+/+} et des cellules pRb^{-/-}.

Reste que ce type de démarche, si elle est utilisée seule, pourrait se résumer en une phrase un peu ironique : « Regardez ce que vous auriez pu voir si vous aviez un peu réfléchi à tout ça » et ces limites tiennent à sa nature même, les informations obtenues ne sont tout simplement pas quantifiables, la complexité et la quantité des processus modélisés en même temps, et limitatives et ne peuvent donner, au mieux qu'une « impression » (de la croissance tumorale chez **Shackney et al. 89**) et au pire qu'une mauvaise impression quand la démarche qualitative est utilisée avec trop de confiance ou de naïveté (de la différenciation cellulaire chez **Pelletieri et al. 91**). Il semble cependant possible de remédier à ce défaut en considérant la modélisation qualitative comme la première étape d'une approche intégrée où elle permettrait d'estimer les jeux de paramètres à utiliser (**Kohn 98, 99**).

c. Conclusion sur les micro-modèles

Les projets « e-cell » (Tomita *et al.* 99) et « virtual cell » (Schaff *et al.* 99) poussent la logique de la micro-modélisation à son paroxysme en proposant des environnements configurables (molécules et réactions), avec un algorithme d'identification de paramètres intégrés et une interface conviviale dans le but avoué de modéliser la vie d'une cellule dans son ensemble. Le projet japonais e-cell implique plus de trente chercheurs dans tous les domaines de la biologie cellulaire et de la modélisation mathématique et le résultat est impressionnant. Les paramètres du modèle comprennent les systèmes de signalisation membranaires et cytoplasmiques, de la transcription et de la traduction (Tomita *et al.* 99).

En proposant des formalisations *ad hoc*, les micro-modèles fournissent le vocabulaire permettant de tenir compte de concepts tels qu'amplification, contrôle en retour (*feedback*), adaptation, robustesse, etc. et de les intégrer dans une vue plus globale des processus biologiques considérés. Ce travail de mise en perspective n'a pas toujours été fait, c'est un des risques de l'approche moléculaire qui, par nature mécaniste, peut vite faire passer la notion de fonction, essentielle en biologie, au second plan au profit d'une vision plus détaillée mais réductrice. L'engouement actuel dans le domaine des micro-modèles laisse supposer qu'ils fournissent la matière à la découverte d'outils performants de gestion de la complexité en biologie.

Pourtant, la plupart des micro-modèles sont peu évolutifs et donc rapidement périmés par des résultats expérimentaux apportant sans cesse de nouvelles connaissances. Paradoxalement, cette profusion cache une inadéquation entre modèles et données, condamnant les modèles à des objets théoriques et les données à une accumulation désordonnée. Ces modèles possèdent pourtant un potentiel impressionnant. Lorsque les données provenant des approches expérimentales à grande échelle à la fois dans le domaine de la génomique et dans celui de la protéomique seront quantifiées avec suffisamment de confiance ces modèles seront là pour accueillir toutes ces informations et fournir un outil d'analyse prospectif puissant.

5. Conclusion sur les modèles de prolifération cellulaire

Il nous semble que la plupart de ces modèles partagent deux handicaps importants : se plaçant dans le cadre de cellules en culture (eucaryotes inférieurs, embryonnaires ou tumorales) ils considèrent la cellule indépendamment de leur environnement et le cycle de division de la cellule comme « une répétition périodique de certains événements » (citation tirée de Novak *et al.* 93). Ces défauts sont indépendants de la forme du modèle, déterministes, stochastiques ou logiques, il s'agirait plutôt d'un manque d'adéquation particulier entre l'intérêt certain de problématiques mathématiques telles que le comportement de systèmes dynamiques complexes, les cycles limites, les bifurcations... appliquées à la croissance exponentielle de cellules *in vitro* et le degré supplémentaire de complexité des processus de régulation biologiques *in vivo*. Or nombre de comportements cellulaires *in vitro* sont sinon des artefacts au moins intimement liés à la culture de cellules *in vitro* qu'il est difficile de transposer à une problématique biologique *in vivo* beaucoup plus complexe. C'est pour cette raison que les modèles proposés par Kohn (Kohn 98) et Aguda (Aguda *et al.* 99) se basant sur une machinerie moléculaire complexe mais restreinte à une seule phase du cycle cellulaire, la phase G₁, montrant les différents comportements possibles du réseau suivant des conditions initiales variables apparaissent comme des approches prometteuses dans le cadre de l'homéostasie d'un tissu *in vivo* que nous nous sommes fixé.

Afin de mieux saisir les bénéfices d'une approche intégrée, il nous faut maintenant décrire les outils permettant de prendre en compte la complexité de la cellule dans son environnement, lui-même complexe.

III. Modèles et représentation de cellules et de tissus en 2 et 3 dimensions

“On growth and forms” de d’Arcy Thompson a été publié pour la première fois en 1917 mais ce n’est que lors de sa réédition en 1942 (**Thompson 1942**) que l’attention de la communauté scientifique fut attirée sur l’importance de l’étude, au travers de la modélisation, des relations entre la structure et la fonction en biologie. Dans le cadre plus restreint de la biologie cellulaire, l’intérêt de posséder une représentation des cellules (en 2 ou 3D) réside en son apport potentiel dans la modélisation du comportement des cellules. Les cellules font partie de structures tissulaires avec d’autres cellules et participe d’un tout, l’organisme. A ce titre elles sont toujours susceptibles de communiquer avec leur environnement en recevant et en émettant des signaux moléculaires et ainsi de modifier leur comportement ou celui de leur voisines (**Chandebois 86**). La machinerie moléculaire dont disposent les cellules (molécules d’adhérences, cytosquelette) leur donne la possibilité d’exercer, ou de résister activement à, des contraintes physiques sur leur environnement. Les modèles que nous avons présentés dans la partie précédente ne permettent pas pour la plupart de prendre cette dimension en compte, une seule cellule étant modélisée. Si la majorité des modèles cellulaires sont restés éloignés de la représentation spatiale des cellules c’est surtout parce que la plupart de leurs concepteurs ont jugé à juste titre que la complexité de leur modèle était déjà suffisante et qu’il n’était pas nécessaire d’en rajouter. De plus, pendant longtemps il a tout simplement été impossible de disposer de la puissance de calcul nécessaire à cette tâche. Grâce aux premiers micro-ordinateurs au début des années 1980 des modèles de représentation de cellules ont été développés. Nous verrons cependant que les impératifs liés au matériel (temps de calculs) ont grandement limité leur intérêt lorsqu’ils étaient utilisés pour des simulations dynamiques. C’est seulement depuis le début des années 1990 que l’arrivée d’ordinateurs meilleur marché et possédant des capacités de calcul beaucoup plus grande a permis la modélisation et la représentation réalistes de cellules et de tissus en leur associant des modèles de processus physiques et biochimiques complexes. Ils ont pour point commun l’utilisation d’unités spatiales (du simple carré au modèles déformables plus complexes) pour représenter des cellules ou des groupes de cellules.

1. Modèles non-déformables

a. Tableaux / Matrices / Tenseurs

Les premiers modèles de croissance de tissus ou de sphéroïdes tumoraux intégrant les interactions entre les cellules et leur environnement par le biais d’une représentation en 2 ou 3D ont dû se plier aux limites de l’outil de travail principal, soit l’informatique. Des temps de calculs élevés et des langages de programmation inadaptés ont imposés des représentation cellulaires et tissulaires très simplificatrices (**Ede 69, Eden 60**). Ces modes de représentation ont parfois été associés, où la représentation (relations de voisinages, ...) a été exploitée à l’intérieur du modèle de prolifération sont toujours intéressants (**Düchting et al. 81, 85, Mitrani 81**).

Certains modèles utilisent toujours de telles représentations pour des raisons de commodité. La simplicité des relations cellule-cellule et cellule-matrice peut se montrer très avantageuse dans les cas où l’intérêt ne réside ni dans une représentation réaliste des cellules et de leur déformations ni dans une quantification de leur échanges/interactions (**Agarwal 93, 94, 95**). Ainsi, en s’inspirant des travaux de Wolpert (**Wolpert 90**), considérant des animaux imaginaires bicellulaires, chacun possédant une fonction propre, Szathmáry propose un modèle « jouet » destiné à distinguer les importances respectives du déterminisme génétique (cellules souches / lignées) d’une part et des régulations cellule-cellule d’autre part (**Szathmáry 94**). Le modèle de vie cellulaire à la base de ces approches reste toujours très proche des automates cellulaires de Wolfram (**Wolfram 84**).

D'autres approches de ce type ont été appliquées à l'étude de la formation de patrons dans les cryptes intestinales avec des niveaux différents de complexités : l'approche compartimentale de Isele et collaborateurs (**Isele et al. 98**) ou celle de Loeffler et collaborateurs (**Loeffler et al. 88**). Ces deux approches permettent de modéliser la clonalité dans une crypte en décrivant le renouvellement de celle-ci par la prolifération des cellules basales du fond de la crypte puis la migration et la prolifération des cellules en transit vers le villus. Ces modèles sont restés très simples dans la représentation des cellules (un simple chiffre représentant l'âge ou le compartiment des cellules situé dans un tableau à deux dimensions représentant le tissu) mais ont ainsi pu être confrontés à des données expérimentales cinétiques obtenues par FLM.

Ce type de modèle discret a aussi été utilisé récemment pour modéliser le trie cellulaire et l'adhésion cellule/cellule à l'aide de processus stochastiques (**Mochizuki et al. 96**). Ce modèle fournirait un outil pour quantifier l'adhérence cellulaire à partir de patrons observés mais cette démarche, si elle est suggérée, n'a pas été réalisée. Cette approche rappelle celle, plus poussée, de Glazier ou Graner (voir ci-après).

b. Cercles et autres

Les modèles de représentation de cellules continus les plus simples associent des cercles (en 2D) ou des sphères (en 3D) aux cellules (**Bodenstein 86**). Dans le modèle de Bodenstein (**Fig. 55a**), le comportement des cellules se résume à un petit répertoire qui comprend la possibilité de se diviser de façon symétrique ou asymétrique, de se différencier (i.e. de se différencier pour la dernière fois), de mourir et de bouger. Les cellules peuvent aussi pousser leurs voisines (**Fig. 55b**).

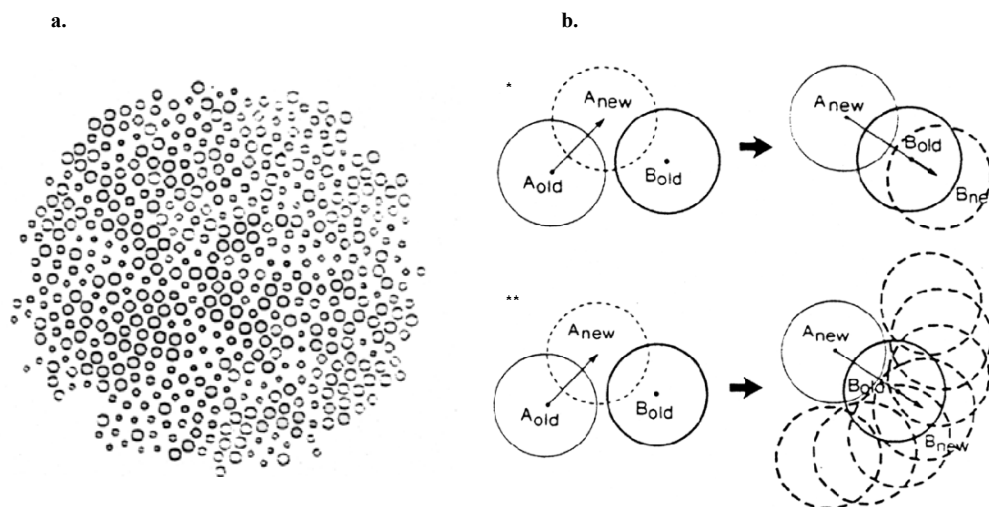


Fig. 55. Modèle de Bodenstein. a. Représentation des cellules et b. Règle de mouvement des cellules (tiré de Bodenstein 86).

Les simulations montrent que ce petit répertoire suffit pour que le comportement des cellules corresponde à celui de cellules d'embryon d'amphibien lors de formation de mosaïques, notamment lors de la formation de l'épithélium pigmenté de la rétine (**Bodenstein et al. 87**).

Rashbass et collaborateurs ont développé un modèle de l'homéostasie d'un épithélium stratifié en 2D à l'aide de cellules représentée par des cercles (**Rashbass et al. 96**). Puisque les cellules ne peuvent pas changer de forme, le rendu de l'architecture des tissus est donc très sommaire mais réaliste (**Fig. 56**).

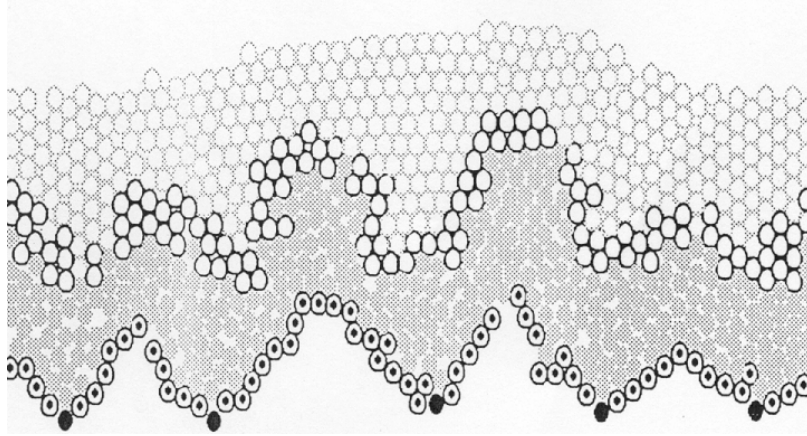


Fig. 56. Représentation d'un épithélium en 2D grâce au modèle de Rashbass et collaborateurs. Les cellules noires sont des cellules souches, les cellules blanches avec un point noir sont des cellules en transit. Les autres cellules sont des cellules différenciées à différents stades du processus de maturation (tiré de Rashbass *et al.* 96).

Un algorithme similaire à celui de Bodenstein (**Bodenstein 86**) permet d'intégrer le mouvement des cellules qui peuvent adhérer entre elles ou à la membrane basale. Cependant, le modèle de prolifération et de différenciation est très déterministe (**Vawer *et al.* 97**). Le comportement des cellules est associé explicitement à leur position et si les simulations permettent d'obtenir un comportement homéostatique (**Stekel *et al.* 95**) c'est parce que les conditions initiales ne laissent pas d'autre choix à la population.

Un modèle de diffusion de messagers extracellulaires et de transmission de signaux du type Smad a été développé sur une base de représentation similaire (cercles) par Kyoda et collaborateurs dans le groupe responsable du projet *Kitano Symbiotic Systems Project* à Tokyo (**Kyoda *et al.* 00**). Malheureusement, les résultats préliminaires exposés lors du Pacific Symposium on BioComputing ne permettent pas de juger des résultats obtenus à l'aide de ce modèle. Ces travaux sont inspirés de ceux de Marnellos et collaborateurs qui ont développé un modèle de communication cellule/cellule basé sur des hexagones appliqué à la neurogenèse de la drosophile (**Marnellos *et al.* 98**). Ce modèle simple montre que le niveau d'interaction cellule/cellule est suffisant pour permettre la maintenance de clusters. Cependant, ce modèle reste très théorique et implique seulement des facteurs qui ne correspondent pas à la réalité.

Le modèle de colonies de cellules en cultures de Furusawa et collaborateurs (**Furusawa *et al.* 98**) est lui aussi basé sur l'utilisation de cercles. La représentation des cellules permet de quantifier l'adhérence entre les cellules et d'introduire une topologie dans le modèle. Les résultats des simulations montrent que certaines propriétés d'adhérence cellulaire sont propices à la création de colonies périphériques à partir d'une colonie initiale (e.g. adhésion préférentielle pour des cellules de même type ou de même age).

Dans une optique différente, ce type de modèle a permis d'obtenir de très beaux résultats. Dans le cas de Bretschneider et collaborateurs (**Bretschneider *et al.* 99**) la simplicité des éléments de bases du modèle est un atout permettant de simplifier les calculs lors de simulations impliquant le mouvement coordonné de 10^5 cellules résultant dans le mouvement d'un pseudoplasmodium, *Dictyoplastelium discoideum* (**Fig. 57**). Il s'agit d'un modèle des interactions entre les cellules et pas d'un modèle de prolifération cellulaire mais il permet de montrer l'intégrer de ce type de modélisation où chacune des cellules de l'organisme modélisé possède un comportement propre mais dépendant de l'environnement local (une force est appliquée à chacune des cellules dont la norme est calculée comme suit : $F = F_{\text{chimiotaxie}} + F_{\text{adhésion}} + F_{\text{pression}} + F_{\text{friction}}$) et où l'organisme montre un comportement finalement cohérent.



Fig. 57. Représentation du mouvement de *Dictyoplastelium discoideum* (tiré de Bretschneider *et al.* 99).

Si ce modèle n'est pas lié directement au sujet principal de ce mémoire, il serait très intéressant de disposer d'un tel modèle, adapté à un tissu plutôt qu'un organisme, dans lequel le comportement du tissu résulterait du comportement de chacune des cellules.

2. Modèles déformables

Tranchant avec la simplicité des représentations carrées, hexagonales ou circulaire rigides, des approches plus complexes, basées sur l'utilisation de graphes mathématiques, ont été suggérées dès la fin des années 1970 (**Honda 78, Matela *et al.* 79**). Ces graphes permettent d'associer un polygone à chaque cellule du tissu et de lui appliquer un automate mimant la vie de cellules ou des forces pour pouvoir modéliser la déformation d'un tissu (**Childress *et al.* 81**).

a. Graphe de Voronoï

i. Définition

Le graphe de Voronoï est une partition polygonale du plan. . Etant donné un jeu de germes, chaque polygone du graphe de Voronoï est l'ensemble des points les plus proches du germe du polygone que de n'importe quel autre germe (**Fig. 58**). Il existe d'autres formes plus complexes du graphe de Voronoï (**Okabe *et al.* 92**) mais nous nous en tiendrons à cette forme simple.

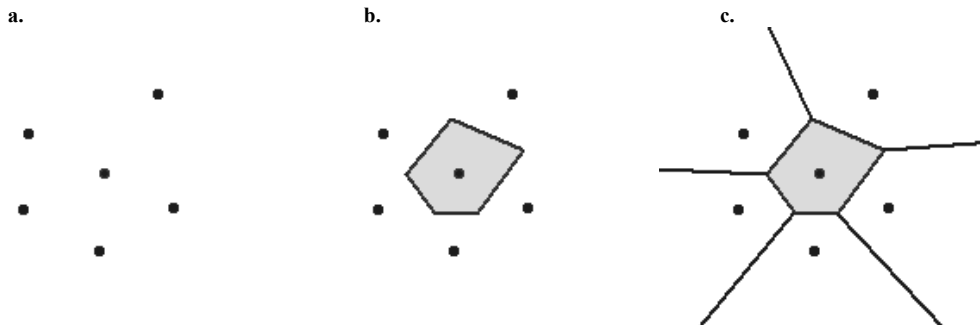


Fig. 58. Définition du graphe de Voronoï : a. Germes, b. Polygone associé à un des germes et c. Graphes de l'ensemble des germes du plan

ii. Historique

Le concept à la base du graphe de Voronoï, aussi appelé graphe de Dirichlet, est certainement très ancien, de nombreuses structures naturelles possèdent une forte ressemblance avec le graphe de Voronoï. Cependant, c'est Descartes qui utilisa pour la première fois un graphe semblable au graphe de Voronoï pour montrer la répartition de matière dans le système solaire. Il le fit à deux reprises : à la fois dans « *Le monde de Descartes, ou Le traité de la lumière* » et dans la troisième partie de « *Principia Philosophiae* », ouvrages publiés en 1644. C'est au milieu du XIX^{ème} siècle que le graphe de Voronoï fût défini en tant que concept mathématique par le mathématicien allemand G. L. Dirichlet qui étudia ce graphe en 2 et 3 dimensions (**Dirichlet 1850**). Par la suite, G. Voronoï, un autre mathématicien allemand donna son nom au graphe en donnant une définition plus générale en n dimensions (**Voronoi 08**).

L'utilisation du graphe de Voronoï fut rapidement étendue à la météorologie (**Thiessen 11**) et à bien d'autres domaines scientifiques : géologie (**Popoff 66**), écologie (**Brown 65**). Il faut attendre 1978 pour que la similitude entre le graphe de Voronoï et la forme des cellules dans certains tissus soit remarquée (**Honda 78, 79**). Sans utiliser le graphe de Voronoï lors de simulation dynamiques, Honda montra la précision avec laquelle ce graphe pouvait représenter la mitose dans un tissu épithélial (**Honda 84**). Marcelpoil et collaborateurs (**Marcelpoil et al. 92**) utilisèrent le graphe de Voronoï pour quantifier l'ordre et le désordre dans un tissu et pour les corrélés aux grades utilisés couramment en anatomo-pathologie.

iii. Graphe de Voronoï en biologie cellulaire

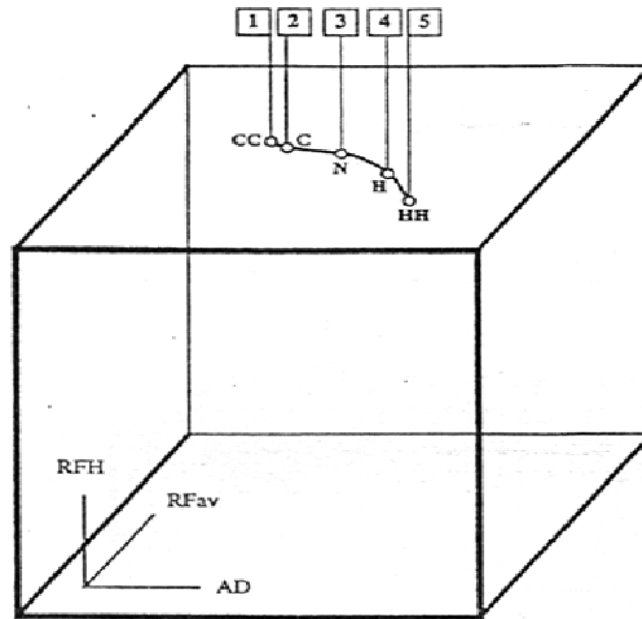
- Quantification de l'ordre et du désordre dans une population cellulaire en histologie

Chaque polygone du graphe de Voronoï représente alors la zone d'influence (de *Wirkungsbereich*, **Niggli 27**) des cellules et le calcul de trois paramètres permet de quantifier l'organisation du tissu (**Bigras et al. 96, Marcelpoil et al. 92, Sudbo et al. 00a, 00b**) : le facteur de circularité moyen (R_{fav}), le facteur de l'homogénéité du facteur de forme (RFH) et la mesure de l'hétérogénéité de la surface des polygones du graphe de Voronoï (AD). L'utilisation de ces trois facteurs pour discriminer des pathologies se révèle efficace dans le cas du cancer de la prostate où ils quantifient précisément les différences structurales entre des tissus hyperplasiques, normaux et des carcinomes (**Fig. 59**).

Les paramètres obtenus grâce au graphe de Voronoï ne se limitent pas à des paramètres globaux. L'utilisation simultanée du graphe de Voronoï et de l'arbre de Ulam a complété la panoplie avantageusement en permettant de quantifier le désordre dans le tissu à un niveau local, pour chaque cellule et son environnement proche (**Marcelpoil 93a**). Le graphe de Voronoï a aussi permis de normaliser l'arbre de recouvrement minimum (MST pour *minimum spanning tree* - **Dussert et al. 86**), un autre graphe utilisé lui aussi pour quantifier ordre et désordre dans des populations cellulaires normales ou pathologiques (**Brinkhuis et al. 97, Dussert et al. 87**) ou l'anisotropie dans un tissu (**Dussert et al. 88**). Cette normalisation consiste en l'élimination des points susceptibles d'introduire un important biais en augmentant les effets de bord (**Marcelpoil 93b**).

De plus, la possibilité d'étendre le graphe de Voronoï en 3D (**Bertin 94, Honda et al. 79, 96**) le rend très intéressant pour modéliser des volumes (**Eils et al. 95**).

a.



b.

c.

d.

e.

f.

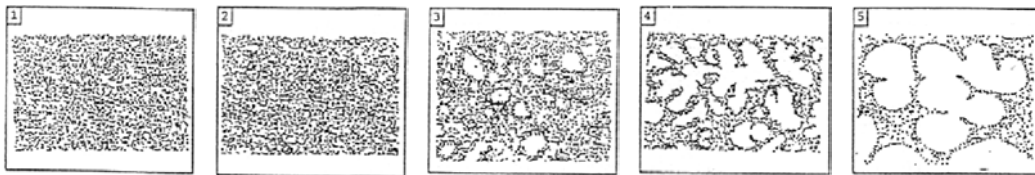


Fig. 59. Corrélation entre grade de tumeur de la prostate et représentation du désordre dans l'espace 3D défini par les trois paramètres AD , RFH et $RFav$ (tiré de Marcelpoil *et al.* 93a). Avec : b. carcinome grade 5 de Gleason (CC), c. carcinome grade 2 de Gleason (C), d. tissu normal (N), e. hyperplasie (H) et f. hyperplasie (HH).

- Représentation de cellules lors de simulations

Le graphe de Voronoï peut représenter des populations théoriques (Marcelpoil *et al.* 94) ou au contraire des populations épithéliales réelles (Honda *et al.* 79, 96) au cours de simulations. Le graphe est à la base de la quantification du mouvement des cellules (Fig. 60), d'un pas de simulation à l'autre les germes sont déplacés soit par relaxation soit en imposant des forces provenant du modèle de comportement des cellules.

Le graphe de Voronoï est aussi un outil capable de représenter la mitose lors de simulation dynamique. Il suffit de remplacer le germe définissant la cellule en cours de division par deux germes définissant les cellules filles (Honda *et al.* 84). Les échanges biochimiques entre cellules sont quantifiés grâce à la taille des contacts entre cellules. Cette propriété permet de modéliser les échanges entre cellules voisines mais aussi la répartition des « ressources » d'une cellule lorsque celle-ci est supprimée de la population (Beaurepaire 93). Il fournit un outil beaucoup plus simple d'utilisation que d'autres approches polygonaux intéressantes mais difficiles à mettre en œuvre au niveau informatique (e.g. Duvdevani-Bar *et al.* 94).

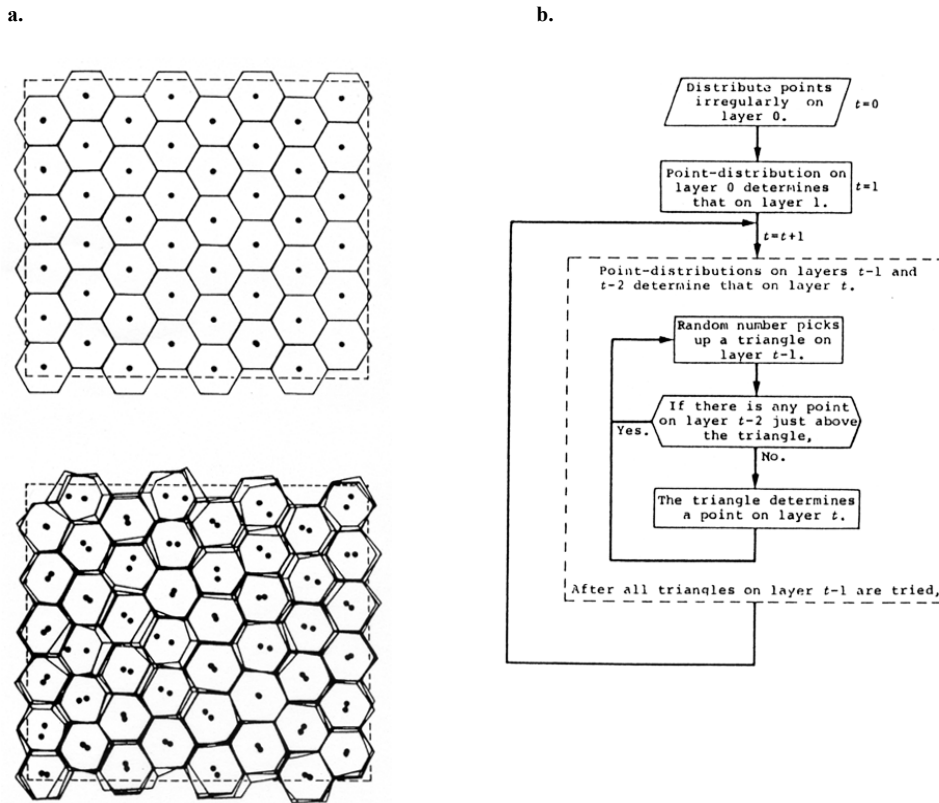


Fig. 60. Etablissement des colonnes épidermiques en 3D (a). La migration des cellules d'une couche à une autre (cadre du haut : position des cellules dans la couche basale, cadre du bas : position des cellules des différentes couches en vue superposée) est obtenue à l'aide d'un algorithme simple (b) (tiré de Honda *et al.* 79).

b. Autres modèles polygonaux

Le modèle de gestion des relations mécaniques dans un tissu le plus aboutit est certainement le modèle de Odell et collaborateurs (Odell *et al.* 81). Ce modèle prend en compte l'asymétrie des cellules épithéliales disposées en monocouches en modélisant le réseau de filaments contractiles situés dans leur région apicale (Fig. 61a). La dynamique de ce réseau est modélisée par un élément viscoélastique (Fig. 61b).

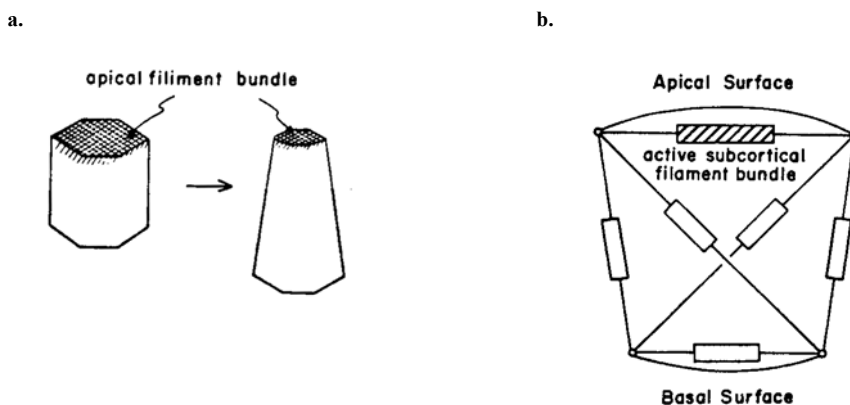


Fig. 61. Description du modèle de Odell et collaborateurs. a. Résultat de la contraction du réseau de filament apical d'une cellule épithéliale et b. Coupe d'une cellule montrant l'arrangement d'une cellule et son cytosquelette (tiré de Odell *et al.* 81).

Les résultats des simulations comprennent une modélisation de la gastrulation de l'oursin ou de la formation du tube neural des amphibiens (**Fig. 62**).

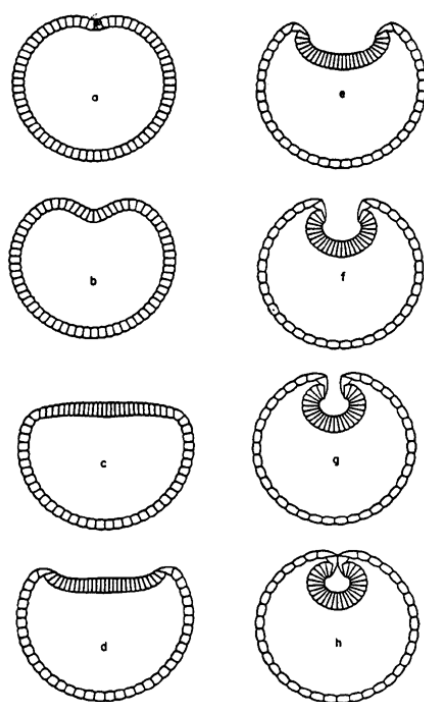


Fig. 62. Simulation de la formation du tube neural des amphibiens (tiré de Odell *et al.* 81).

Weliky et collaborateurs développèrent un modèle sur les mêmes bases en associant un élément viscoélastique à chacune des faces des cellules (**Weliky *et al.* 90**). La forme des cellules dépend alors d'équilibres entre des forces de contractions et des forces d'expansion. Ce modèle, plus complexe que celui de Odell et collaborateurs, a été appliqué à la simulation de la morphogenèse épithéliale durant « l'épibolie » du poisson *Fundulus*. De plus, le nombre de faces et de sommets des cellules est variable. Les problèmes de création de sommets découlant de ces approches sont en partie gérées en appliquant un algorithme simple de permutation de sommets (**Weaire *et al.* 84**) et par la création de nouveaux sommets appelés nœuds de protrusion dont la position dépend de l'équilibres des forces de pressions internes et externes à la cellule.

Ces modèles n'intègrent pas la division cellulaire, toutes les simulations se déroulent avec un nombre de cellules constant. Ils sont basés sur l'hypothèse que certains changements de formes durant la morphogenèse sont dus à des mouvements cellulaires résultant d'équilibres mécaniques existant entre les cellules. Le concept récent de tensegrité (**Ingber 98**), suivant lequel de nombreux mécanismes biochimiques cellulaires sont dépendants de la géométrie des cellules et de leurs interactions physiques avec leur environnement, souligne l'intérêt de ces approches. Un modèle mathématique de la tensegrité a d'ailleurs été développé (**Wendling *et al.* 99**) mais, très théorique, n'a pour l'instant pas été utilisé pour modéliser le comportement de plusieurs cellules au sein d'une structure tissulaire.

c. Autres modèles

i. Modèles d'énergie d'adhérence : les boules de Graner-Glazier

Le modèle de Graner (**Graner 93, Graner et al. 93**) est un modèle de la mobilité cellulaire *in vitro* comme un processus basé uniquement sur l'adhésion entre cellules. La représentation des cellules est dérivée du graphe de Voronoï à la différence près qu'une distance limite est fixée à partir du germe des polygones. Chaque cellule possède une énergie d'adhérence résultant à la fois de son adhérence pour ses voisines et de son adhérence pour le milieu. Le modèle montre, par exemple, le réarrangement survenant dans des agrégats cellulaires lorsque un des deux types de cellules tend à diminuer son interface avec le milieu et à augmenter le contact avec les cellules de même type (**Fig. 63**). Lors de ces simulations le modèle prend aussi en compte l'inertie des cellules par rapport à leur support de culture.

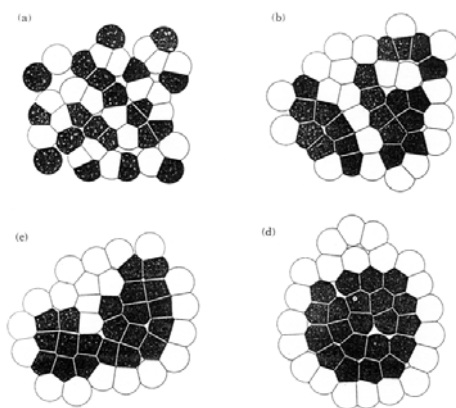


Fig. 63. Modèle de Graner : Réarrangement cellulaire lorsque deux populations sont en contact (tiré de Graner et al. 93).

Des modèles basés sur le même principe (l'adhérence différentielle entre cellules de types différents) a été développée à l'aide d'autres modèles mathématiques (**Glazier et al. 93, Mombach et al. 95, 95**).

iii. Les boules rouges : Clem

Le modèle des boules rouges de Clem n'est pas tout à fait un modèle de représentation des cellules (**Clem et al. 92**). Le noyau des cellules est représenté en 3D par des ellipsoïdes dont la forme précise est fixée à partir d'images de coupes d'épithélium nasal (**Fig. 64**). La première vocation de ce modèle a été de fournir un outil de quantification des déformations nucléaires observées dans certaines pathologies, notamment les épithélia nasaux dans des états dysplasiques et métaplasiques.

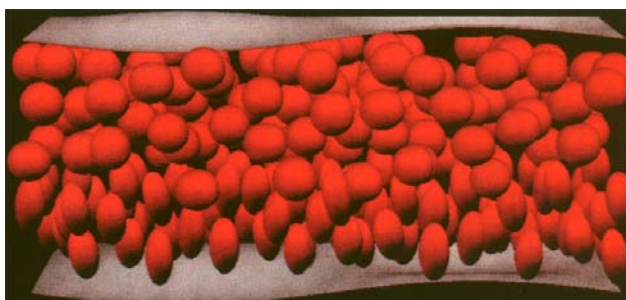


Fig. 64. Modèle des boules rouges de Clem (tiré de Clem et al. 92).

Ce modèle a aussi été utilisé lors de simulations dynamiques. Les règles de division des cellules sont similaires aux règles utilisées par Stekel et collaborateurs (**Stekel et al. 95**) et le modèle de déplacement des cellules après division est identique à celui utilisé par Bodenstein et collaborateurs où les cellules poussent leurs voisines dans leur direction et leur sens (**Bodenstein et al. 86**). Des simulations du renouvellement de l'épithélium basal ont été réalisées mais très peu de résultats sont disponibles (**Clem et al. 96**).

3. Modèles continus

De très nombreux modèles ne prennent en compte les interactions entre les cellules que par l'intermédiaire d'une formulation mathématique continue, les cellules ne sont plus représentées elles-mêmes mais font partie d'un tout où les relations biochimiques et physiques sont modélisées par des systèmes d'équations différentielles. Iizuka et collaborateurs ont proposé un modèle de la remodelisation de l'épiderme lors du Psoriasis, une pathologie des épidermes liée à une surprolifération des cellules du tissu (**Iizuka et al. 97**). Le modèle est basé sur la proportionnalité de la vitesse de croissance des papilles dermique et de la taille du compartiment prolifératif des cellules de la couche basale. Dans ce cas précis, la représentation du tissu n'est pas cruciale et le modèle pourrait fonctionner sans. Il s'agit juste d'une aide à la visualisation des résultats. Entre autre, les relations entre cellules ne sont pas prises en compte, c'est uniquement le comportement global du tissu épithélial qui prime.

Quelques modèles se sont particulièrement attachés à modéliser la déformation dynamique de tissus en 2 ou 3D. Certains s'intéressent particulièrement aux interactions cellulaires au niveau du cytosquelette s'attachant à montrer l'influence de celui-ci sur la propagation de déformation sous forme de vague dans le tissu (**Brodland et al. 94**), l'invagination de l'épiderme lors de la formation du tube neural (**Brodland et al. 94, Odell et al. 81, Oster et al. 83**) ou de formation de patrons liés à l'application de forces mécaniques (**Brodland et al. 94**).

Ces modèles mathématiques se sont montrés particulièrement efficaces pour modéliser la formation de patrons comme ceux de plumes de poulet soit par des modèles de réaction-diffusion (**Wolpert 71, 81**) soit par modélisation des phénomènes d'activation et d'inhibition latérale (**Gierer 81**) soit en incorporant des notions d'interaction entre le derme, l'épiderme par des modèles de viscoélasticité incorporant même l'idée de switch – une région montre la formation de plumes alors qu'une région connexe non, les deux subissant un même gradient (**Cruywagen et al. 92, Nagorcka et al. 87, Shaw et al. 90**). **Dallon et al.** ont développé un superbe modèle de déformation de matrice extracellulaire (MEC) sous l'effet de l'adhérence et du mouvement cellulaire (**Dallon et al. 99**). La MEC est un continuum alors que les cellules sont discrètes. Cette démarche mixte leur permet d'étudier les effets des propriétés cellulaires et de la variation des interactions cellule/collagène sur l'orientation des fibres de collagène de la MEC ou des fibres produites par les cellules elle-même.

Les modèles de Cummings intègrent des doubles vagues de signalisation Hh (*hedgehog*) et Dpp (*decapentaplegic*) (**Cummings 99b**) ou la signalisation par protéines membranaires possédant deux ligands (PTP) (**Cummings 99a**). Malheureusement, il n'a pas essayé de mélanger ces deux modèles pour modéliser à la fois la propagation d'un message dans un tissu et son utilisation « en cours de route » par les cellules du tissu. En effet, les cellules se servent du message à leur propre fin, modifiant l'intensité du signal lors de son passage.

Le plus beau de ces modèles a été développé par Dillon et collaborateurs (**Dillon et al. 99**). Il s'agit d'un modèle de contrôle de la croissance d'aile de poulet prenant en compte l'influence des morphogènes produits dans les zones d'activité polarisante (ZPA pour *zone of polarizing activity*) et la crête épidermique apicale (AER pour *apical epidermal ridge*). Ils montrent notamment l'importance primordiale du positionnement des cellules subissant les gradients de morphogènes lors des toutes premières étapes du développement du bourgeon de l'aile.

Les bases biologiques de l'activation des gènes en patron par les gradients de morphogènes étant encore floues ce modèle a su rester générique et pourrait être d'une grande utilité pour l'étude de l'effet de gradients multiples lors du développement embryonnaire (**Viallet, communication personnelle**). Il pourrait se montrer très utile comme outils de support à l'expérience.

4. Conclusion

Ces modèles de représentation cellulaire partages certains points communs (**Tab. 12**).

Tab. 12. Propriétés des modèles de représentations cellulaires (Honda *et al.* 78, Odell *et al.* , Childress *et al.* 81, Sulsky *et al.* 84, Weliky *et al.* 90, Graner *et al.* 93, Rashbass *et al.* 96, Marnellos *et al.* 98, Kyoda *et al.* 00)

Source	Honda	Odell	Childress	Sulsky	Weliky	Graner	Rashbass	Marnellos	Kyoda
Mécanisme	Division et mort cellulaire	Gastrulation	Déformation	Tri cellulaire	Epibolie	Réarrangement cellulaire	Différenciation tissulaire	Patronage cellulaire/signalisation	Signalisation
Base géométrique	Voronoi	Polygone	Rectangle	Voronoi	Polygone	Voronoi pondéré	Cercle	Hexagone	Cercle
Conditions au bord	-	Membrane libre	Sommets libres	-	Forces sur sommets	Forces sur germes	Membrane fixe	-	-
Déplacement cellulaire	Local	-	Local	Local-	Longue Distance	Longue Distance	Longue Distance	-	-
Nombre de types cellulaires	1	1	1	2	1	2	3	1	1
Changement de voisins	Oui	-	-	Oui	Oui		Oui	Non	Non

Les représentations les plus simples ont été les plus utilisées (cercles et carrés) mais leurs limitations sont trop importantes pour permettre d'utiliser à la fois une approche de la modélisation des relations physiques et biochimiques entre les cellules. Le graphe de Voronoi est la représentation qui semble le plus adaptée à cette tâche puisqu'elle permet à la fois de modéliser la présence de forces entre les cellules (en appliquant celles-ci aux arêtes ou aux germes) et de quantifier les échanges entre les cellules voisines (proportionnels à la taille des arêtes par exemple).

IV. Conclusion générale sur les modèles

La plupart des modèles que nous avons exposés possèdent des aspects très intéressants mais aussi des lacunes importantes pour combler les lacunes expérimentales concernant le contrôle de l'homéostasie dans un tissu épithélial stratifié. Le modèle se positionnant au plus près de cet objectif est celui de Rashbass (**Rashbass *et al.* 96, Vawer *et al.* 97**), mais il n'aborde pas les régulations moléculaires et reste trop déterministe, limité par ses propres règles de fonctionnement. La richesse proposée par l'ensemble des approches laisse entrevoir qu'une approche intégrée proposant à la fois - **a.** un modèle des contrôles moléculaires de la prolifération et de la différenciation cellulaire pour chaque cellule placée dans un cadre tissulaire simulé grâce à une modélisation quantitative des voies de signalisation cellule / cellule et cellule / MEC entre les cellules – et - **b.** un modèle de représentation des cellules permettant de représenter celles-ci ainsi que la structure du tissu qu'elles forment à la fois de façon réaliste et quantifiée - serait à même d'apporter des éléments de réponse intéressants à la question de la régulation de l'homéostasie des épithélia stratifié.

METHODES

Introduction

Afin de disposer d'un outil de modélisation des comportements cellulaires au sein d'un tissu épithélial stratifié, deux étapes de développement ont été suivies :

- Construction d'un modèle des contrôles moléculaires de la prolifération cellulaire, fondés sur les approches récentes de Aguda, Kholodenko *et al.* et Kohn (**Aguda 98, 99, Kohn 98 et Kholodenko et al. 99**) ;
- Association du modèle de contrôle moléculaire avec le modèle de représentation des cellules en 2D introduit par Honda en biologie cellulaire : le graphe de Voronoï (**Honda 78**). Cette association fournit un outil de modélisation des interactions cellules / cellules et cellules / environnement.

Partie 1 : Modèle des réseaux de contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire

I. Modèle de réseau de contrôle de la prolifération

1. Introduction

L'état de l'art présenté dans la partie précédente souligne la complexité des mécanismes moléculaires contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaires qui forment des réseaux très complexes impliquant des niveaux de contrôle de nature différente. Cette complexité augmente sans cesse, au fil des découvertes de la biologie moléculaire : nouvelles protéines, nouvelles réactions, nouveaux substrats... De plus ces réseaux de contrôles, même de taille raisonnable, présentent des particularités :

- Les enzymes sont elles-mêmes les substrats d'autres enzymes (e. g. kinases, phosphatases et protéases) ;
- Certaines protéines sont des facteurs de transcription ou participent d'une façon ou d'une autre (aux niveaux transcriptionnels, traductionnels ou post-traductionnels) à la modification des protéines présentes dans le système en modifiant la vitesse de la production ;
- Les enzymes et les protéines régulatrices de leur activité forment de nombreux complexes multimériques fonctionnels ou non fonctionnels ;
- Les éléments des réseaux de contrôle forment de nombreuses boucles positives ou négatives rendant particulièrement difficile l'interprétation rigoureuse de résultats expérimentaux où il devient incertain de situer un élément ou un événement en amont ou en aval d'un autre (**Kohn 98**).

Il a été suggéré que la validité d'un modèle de la prolifération soit dépendante de sa capacité à prendre en compte à la fois une modélisation de l'ARNm et des protéines (**Hatzimanikatis et al. 99**). Cependant, intégrer à la fois l'ARNm et les protéines dans le modèle aurait pour conséquence une augmentation trop importante du

nombre de paramètres. Même si la qualité des données disponibles sur le sujet est susceptible d'accroître sous peu de façon drastique grâce aux technologies à haut débit, en l'état actuel une telle augmentation n'est pas justifiée. C'est pourquoi le modèle présenté ici se restreint aux protéines et à certains gènes dont l'expression est E2F dépendante et propose une approche empruntant autant à la modélisation quantitative (modèle des réactions) qu'à la modélisation qualitative (validation des résultats), dans l'espoir que la nécessité imminente de le nourrir à l'aide des données obtenues par microarray et protéomique soit bientôt satisfait.

La construction du modèle de réseau de contrôle de la prolifération cellulaire a suivi deux étapes :

- Construction d'un réseau le plus simple possible réduit à ses éléments jugés les plus significatifs mettant en relief la diversité des éléments du réseau (protéines membranaires, cytoplasmiques et nucléaires, boucles positives et négatives, gènes, ...);
- Choix du modèle cinétique le plus adapté à la modélisation dynamique des contrôles moléculaires de la prolifération et application de ce modèle à un cas particulier.

2. Construction d'un réseau de contrôle de la phase G1 par assemblage de sous-réseaux

a. *pRb* et facteurs de transcriptions

Actuellement, il n'existe pas de consensus sur une définition précise du point de restriction (R) au niveau moléculaire. En pratique, celui-ci est considéré comme le moment à partir duquel la cellule perd sa sensibilité aux facteurs de croissance, où elle devient irrémédiablement engagée dans le cycle cellulaire. Ainsi, il s'agirait du moment à partir duquel la transcription des gènes E2F dépendants devient forte.

Les premiers éléments à incorporer dans le modèle sont donc les protéines poches et les protéines de la famille E2F. Dans un premier temps, pour ne pas surcharger le modèle inutilement, la famille des protéines poches est représentée par la seule pRb, protéine dont le rôle est central à la fois dans les processus de prolifération et les processus de différenciation. Les protéines de la famille E2F et DP sont regroupées sous le terme générique *E2F*.

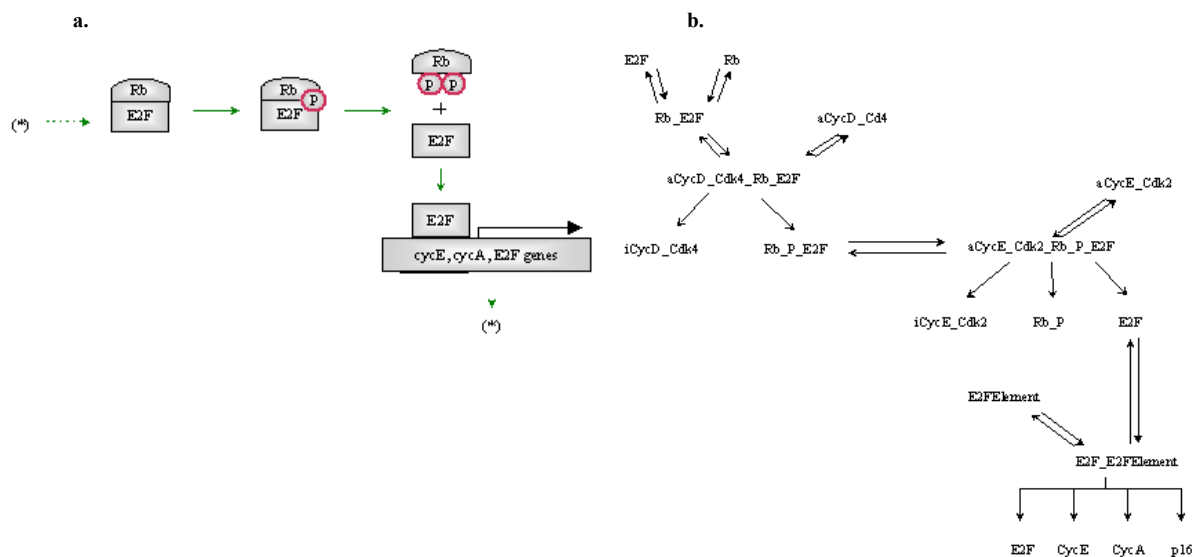


Fig. 65. pRb et facteurs de transcriptions : a. Schéma simplifié des interactions servant de base au modèle et b. Traduction dans le modèle

Dans le modèle, le complexe pRb-E2F existe sous deux formes : une forme normale de séquestration de E2F par pRb (notée *pRb_E2F*) et une forme phosphorylée intermédiaire (notée *pRb_P_E2F*). Ceci permet de rendre compte de l'effet différentiel des deux complexes kinases cycline D-CDK4 et cycline E-CDK2 (Fig. 65) : le

premier complexe (*CycD_Cdk4*) catalysant la transformation de *pRb_E2F* en *pRb_P_E2F* et le second complexe (*CycE_Cdk2*) catalysant la transformation de *pRb_P_E2F* en *pRb_P* et *E2F* libre).

Lors de simulations, ce modèle possède ainsi suffisamment d'éléments pour permettre d'évaluer la pertinence des différentes définitions du point de restriction. A l'instar de Aguda (**Aguda *et al.* 99**), on pourra tester s'il est défini par un pic dans l'activité du complexe cycline E-CDK2 ou s'il est plus intéressant de l'associer à un seuil de *E2F* libre permettant la transcription rapide et forte des gènes *E2F* dépendants (**Kohn 98**).

b. Cyclines, CDK et CKI

L'intégration dans le modèle des deux complexes kinases cycline D-CDK4 et cycline E-CDK2 et non pas d'un seul de ces deux complexes (comme dans le cas de **Kohn 98**) permet de dissocier le rôle de la cycline D, un élément de réponse précoce aux facteurs de croissance, du rôle de la cycline E, un élément de réponse tardive dont l'expression est, au moins en partie, contrôlée par *E2F*.

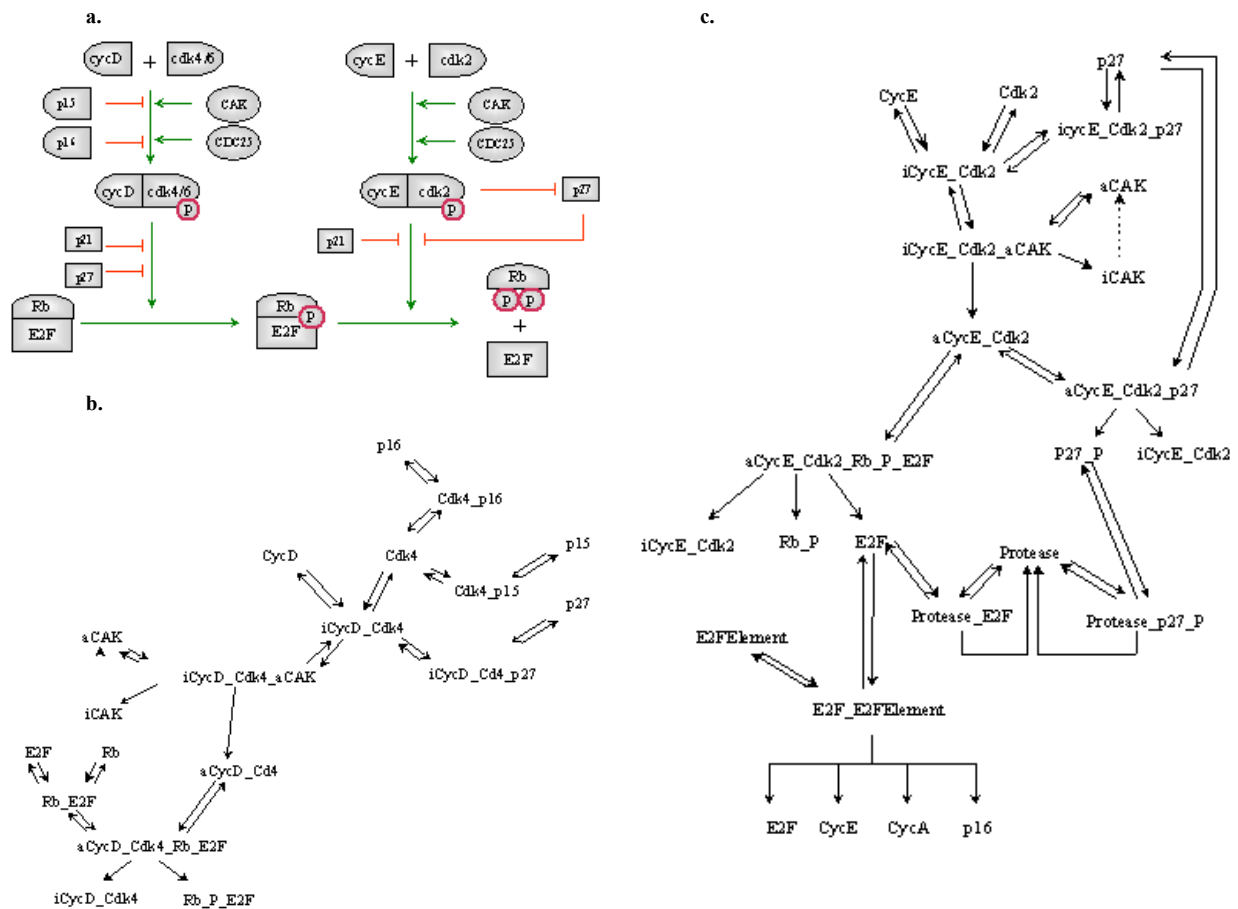


Fig. 66. Cyclines, CDK et CKI : a. Schéma simplifié des interactions servant de base au modèle, b. Traduction dans le modèle pour le complexe cycline D-CDK4 et c. Traduction dans le modèle pour le complexe cycline E-CDK2. Le détail de c. met en évidence la dualité de la relation entre le complexe Cycline E-CDK2 et p27. p27 se lie à la forme inactive du complexe et la forme active du complexe phosphoryle p27 entraînant sa dégradation par une protéase.

Le contrôle de l'activité de ces deux complexes a été détaillé dans l'état de l'art : les CKIs exercent un contrôle négatif spécifique : p15 et p16 inhibent la formation du complexe cycline D-CDK4 et p21 et p27 inhibent à la fois l'activité des complexes kinase cycline D-CDK4 et cycline E-CDK2. Les phosphatases de la famille Cdc25 et le complexe kinase CAK exercent un contrôle positif sur les complexes cycline D-CDK4 et cycline E-CDK2. Les facteurs de contrôle de l'activité de ces deux complexes retenus pour la construction du modèle sont *p15*, effecteur potentiel des facteurs de différenciation, *p16*, élément d'une boucle négative de contrôle de l'activité de cycline D-CDK4 dont l'expression est contrôlée par *E2F* et donc par le complexe cycline D-CDK4 lui-même,

p27, dont l'interaction duale avec le complexe cycline E-CDK2 (*p27* inhibe cycline E-CDK2 qui inhibe *p27*) pourrait être un élément essentiel du point de restriction et le complexe *CAK* qui peut être considéré comme l'activateur des complexes kinases toujours présent dans la cellule (**Fig. 66**). *CDC25* et *p21* sont tout d'abord écartés de la première version du modèle à cause des redondances possibles entre leurs rôles et ceux de *CAK* et *p27*, respectivement.

c. Cascades cytoplasmiques, protéines membranaires et signaux extracellulaires

Lors de la construction du modèle simple, il a semblé plus intéressant d'attacher une plus grande importance à la diversité des contrôles du comportement cellulaire par l'environnement qu'à la multitude des éléments de transmission de l'information au niveau cytoplasmique. D'une part, le but final du modèle est de modéliser la diversité des comportements cinétiques dans un tissu en intégrant l'influence de l'environnement et d'autre part, comme nous l'avons détaillé au préalable, les connaissances concernant les réseaux cytoplasmiques de transmission de l'information sont extrêmement floues actuellement. Ainsi, le réseau de transmission de l'information extracellulaire vers le noyau a été réduit au strict minimum, à savoir, la protéine *Ras* (notée *Ras*) qui permet de modéliser la convergence de signaux extracellulaires vers le contrôle de la quantité de cycline *D* dans la cellule (**Fig. 67a**). Ces signaux convergents proviennent des récepteurs *TKR* (noté *EGFR*) et des intégrines de type $\beta 4$ (notées *integrin $\beta 4$*) qui sont présents dans le modèle pour deux raisons différentes mais complémentaires. Un récepteur de type *TKR* a été intégré au modèle afin de disposer d'un élément de contrôle strictement positif de la prolifération. Par contre, l'intégrine $\beta 4$ a été intégrée au modèle pour permettre à la fois de modéliser l'adhésivité cellule/MB (on verra que lorsque le modèle prend en compte plusieurs cellules, les intégrines $\beta 1$ sont utilisées pour modéliser l'adhésivité cellule/cellule dans la couche basale) et le contrôle de la prolifération par l'adhérence des cellules à la MB.

De façon complémentaire, un récepteur de type *SKR* (noté *TGF β R*) est présent dans le modèle pour modéliser un contrôle négatif de l'environnement sur la prolifération cellulaire et l'induction de la différenciation cellulaire. Ici, les protéines considérées comme des effecteurs de *SKR* lors de l'inhibition de la prolifération sont *p15* et *p27* : *p15*, en inhibant l'association du complexe cycline *D*-*CDK4* et *p27* en inhibant les deux complexes kinases cycline *D*-*CDK4* et cycline *E*-*CDK2* (**Fig. 67b**).

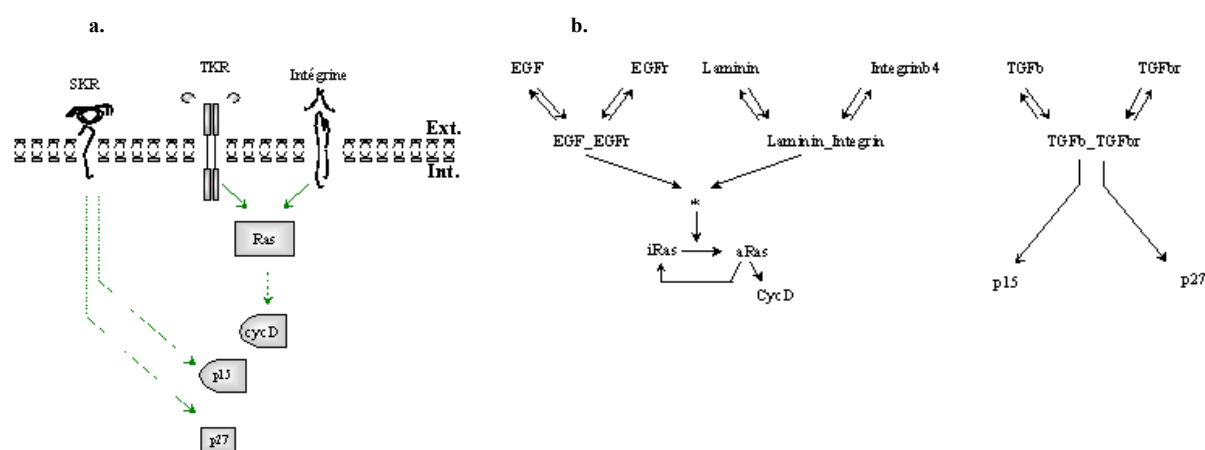


Fig. 67. Cascades cytoplasmiques, protéines membranaires et signaux extracellulaires : a. Schéma simplifié des interactions servant de base au modèle et b. Traduction dans le modèle.

3. Conclusion : réseau entier

Le modèle de réseau que nous avons développé comprend donc les éléments suivants (**Fig. 68**) : facteur de croissance (*EGF*) et son récepteur (*EGFR*) ; facteur de différenciation (*TGFb*) et son récepteur (*TGFbr*) ; intégrine $\alpha\beta4$ (*Integrinb4*) et son ligand (*Laminin*) ; protéines *Ras* ; Cyclines A (*CycA*) ; D (*CycD*) et E (*CycE*) ; CDK4 (*Cdk4*) ; CDK2 (*Cdk2*) ; pRb (*Rb*) ; E2F (*E2F*) ; p15 (*p15*) ; p16 (*p16*) ; p27 (*p27*) ; Eléments E2F des gènes E2F (*E2FPromotor*) ; Cycline A (*CycAPromotor*) ; Cycline E (*CycEPromotor*) et p16 (*p16Promotor*).

Les techniques de calibration rudimentaires utilisées ici imposent de conserver un modèle aussi simple, surtout en prévision de son utilisation dans un cadre formel où de nombreuses cellules seront présentes.

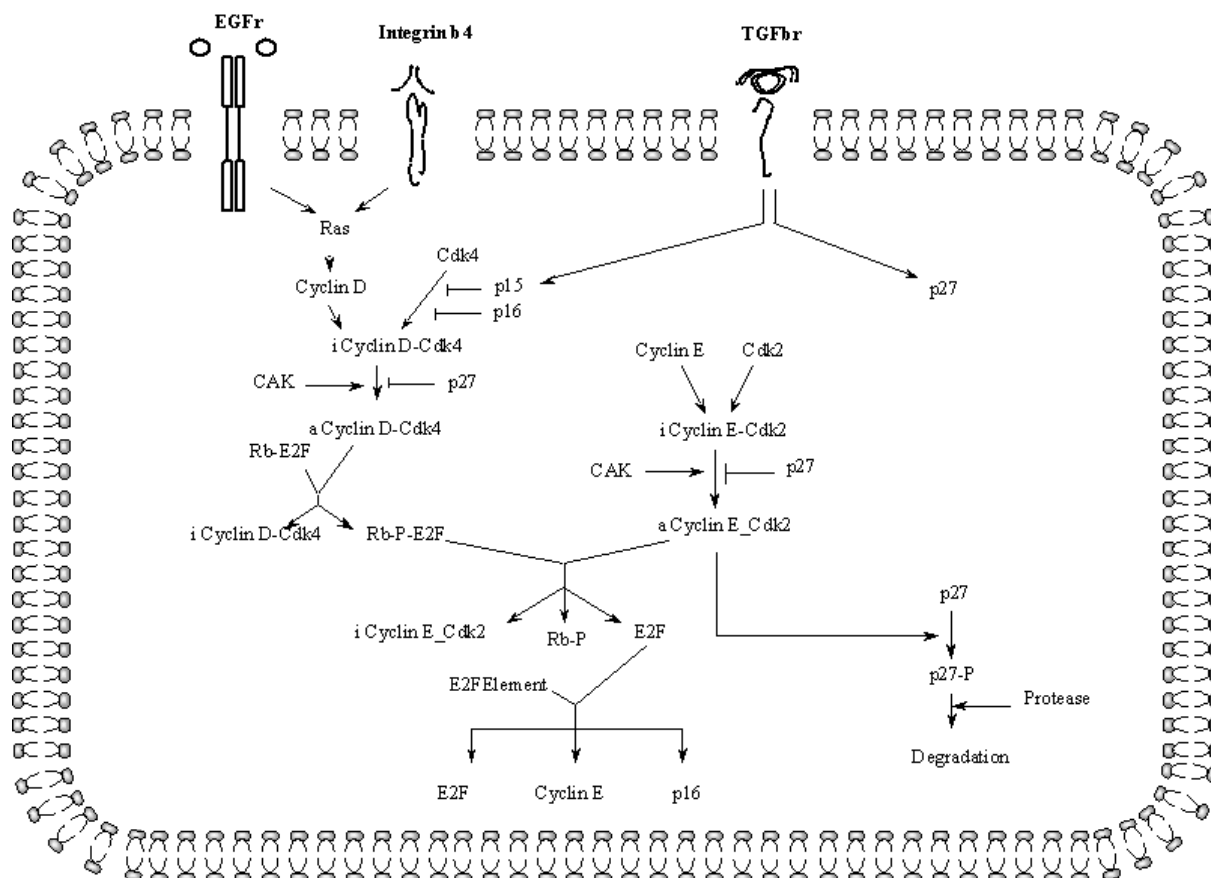
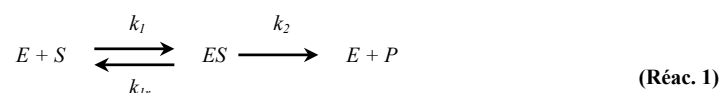


Fig. 68. Schéma du réseau de contrôle de la phase G1.

II. Modèle stœchiométrique et cinétique

1. Généralité sur l'équation de Michaelis et Menten

L'équation de Michaelis et Menten est un outil très utilisé pour la modélisation des réactions biochimiques depuis sa formulation en 1913 par Leonor Michaelis et Maud Menten. La réaction biochimique, la plus simple possible, modélisable à l'aide de cette équation, comporte une enzyme (E), un substrat (S) et un produit (P). Si K_m est la constante de Michaelis et Menten de la réaction et V_{max} sa vitesse maximale, alors :



L'équation donnant la vitesse de formation du produit P a la forme suivante :

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq. 1})$$

où la constante K_m de la réaction enzymatique est :

$$K_m = \frac{k_2 + k_{lr}}{k_1} \quad (\text{Eq. 2})$$

Cette équation devient très complexe quand la complexité de la réaction augmente. La modélisation de réactions réversibles, d'inhibition compétitive, de réactions allostériques ou de réactions à catalyses ordonnées impliquerait d'autres paramètres et des équations différentes de celle de Michaelis et Menten (**Mendes 97**).

De plus, les valeurs des paramètres K_m et V_{max} ne sont pas connues dans la plupart des cas et la nature des réactions impliquées n'est pas toujours connue avec précision.

2. Loi d'Action de Masse

Contrairement à la loi de Michaelis et Menten, l'application de la loi d'action de masse (LAM) ne nécessite pas de connaissance *a priori* sur le type de la réaction ni sur sa vitesse. Avec la LAM, la valeur de K_m n'est pas utilisée au profit des constantes k_l , k_{lr} et k_2 (**Réac. 1** et **Eq. 2**) qui sont conservées pour modéliser aussi bien les réactions biochimiques « idéales » que les réactions biochimiques « non-idéales », i.e. respectivement des réactions au cours desquelles les enzymes ne séquestrent pas ou séquestrent leur substrat ou leur co-enzymes (**Kholodenko et al. 99b**). Ainsi, l'application de la LAM donne autant d'importance au complexe ES qu'aux formes libres E , S ou P .

L'intérêt est de prendre en compte la durée des réactions qui empêche les molécules impliquées d'intervenir dans d'autres réactions susceptibles de se dérouler au même moment. Cette approche se démarque de celles de Aguda (**Aguda et al. 99**) et Kohn (**Kohn 98**) où seules les protéines formant des complexes covalents deviennent inaccessibles à d'autres enzymes ou ligands potentiels. Ici, même les substrats de réactions enzymatiques sont considérés comme participant de la formation de complexes, même si les durées de ces réactions sont extrêmement courtes. La même équation est donc utilisée pour modéliser de nombreux types de réactions différentes transformant le défaut apparent d'un trop grand nombre de paramètres en un avantage puisque le nombre et la complexité des équations utilisées sont moindres.

L'utilisation de la LAM dans notre modèle nécessite son implémentation sous une forme discrète. En effet, le modèle est destiné à être intégré dans un modèle de représentation des cellules où les valeurs des paramètres

seront influencées par l'évolution simultanée des paramètres des cellules voisines. Un système d'équations aux différences a donc été préféré aux habituelles équations différentielles¹⁹.

3. Application de la LAM aux réactions de contrôle de la prolifération cellulaire

a. Exemple de l'association de la cycline D avec la Cdk4 et l'activation du complexe par le complexe CAK

Un exemple d'utilisation de la LAM est le modèle de l'association de la cycline D avec la Cdk4 et l'activation de ce complexe par le complexe CAK (Fig. 69) :

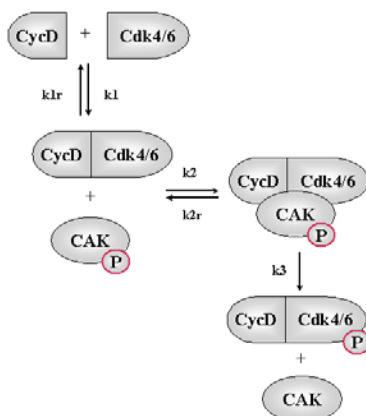


Fig. 69. Modèle de l'association et de l'activation du complexe cycD_CDK4.

Les équations permettant de calculer la variation de quantité du complexe $CycD_Cdk4_CAK_{t+\delta t}$ au cours des réactions détaillées dans la Fig. 69, sont les suivantes :

CycD se lie à Cdk4 pour former le complexe CycD_Cdk4 avec la constante k_1 et la vitesse de réaction est :

$$v_1 = k_1 \times CycD \times Cdk4 \quad (\text{Eq. 3})$$

La réaction inverse possède la constante k_{1r} et la vitesse de la réaction est :

$$v_{1r} = k_{1r} \times CycD_Cdk4 \quad (\text{Eq. 4})$$

La constante d'association du complexe CycD_Cdk4_CAK est :

$$v_2 = k_2 \times CycD_Cdk4 \times CAK \quad (\text{Eq. 5})$$

et la vitesse de la réaction inverse est :

$$v_{2r} = k_{2r} \times CycD_Cdk4_CAK \quad (\text{Eq. 6})$$

La vitesse d'activation du complexe CycD_Cdk4 est :

$$v_3 = k_3 \times CycD_Cdk4_CAK \quad (\text{Eq. 7})$$

ainsi, la vitesse de variation du complexe CycD_Cdk4_CAK est :

$$\frac{dCycD_Cdk4_CAK}{dt} = v_2 - v_{2r} - v_3 \quad (\text{Eq. 8})$$

donc la variation de la quantité du complexe CycD_Cdk4_CAK durant δt est :

$$CycD_Cdk4_CAK_{t+\delta t} = CycD_Cdk4_CAK_t + \frac{dCycD_Cdk4_CAK}{dt} \times \delta t \quad (\text{Eq. 9})$$

¹⁹ Les équations aux différences sont la forme discrète des équations différentielles, considérées par défaut comme continues.

Cette approche discrète n'est valide que tant que δt est très petit comparativement aux vitesses des réactions qui dépendent de valeurs choisies arbitrairement : les concentrations et les constantes des réactions (unités arbitraires). Le manque de données expérimentales quantifiées rend inutile le choix d'une unité telle que, par exemple, mol.l⁻¹. Notons qu'un tel choix n'est pas irréversible, dès que des données expérimentales suffisamment précises seront disponibles seules les valeurs des paramètres seront susceptibles de changer, pas les équations du modèle.

b. Application au réseau

i. Description du réseau et de ces paramètres

L'application de ces équations au réseau décrit dans la Fig. 68 donne un modèle à plus de 100 paramètres (Fig. 70).

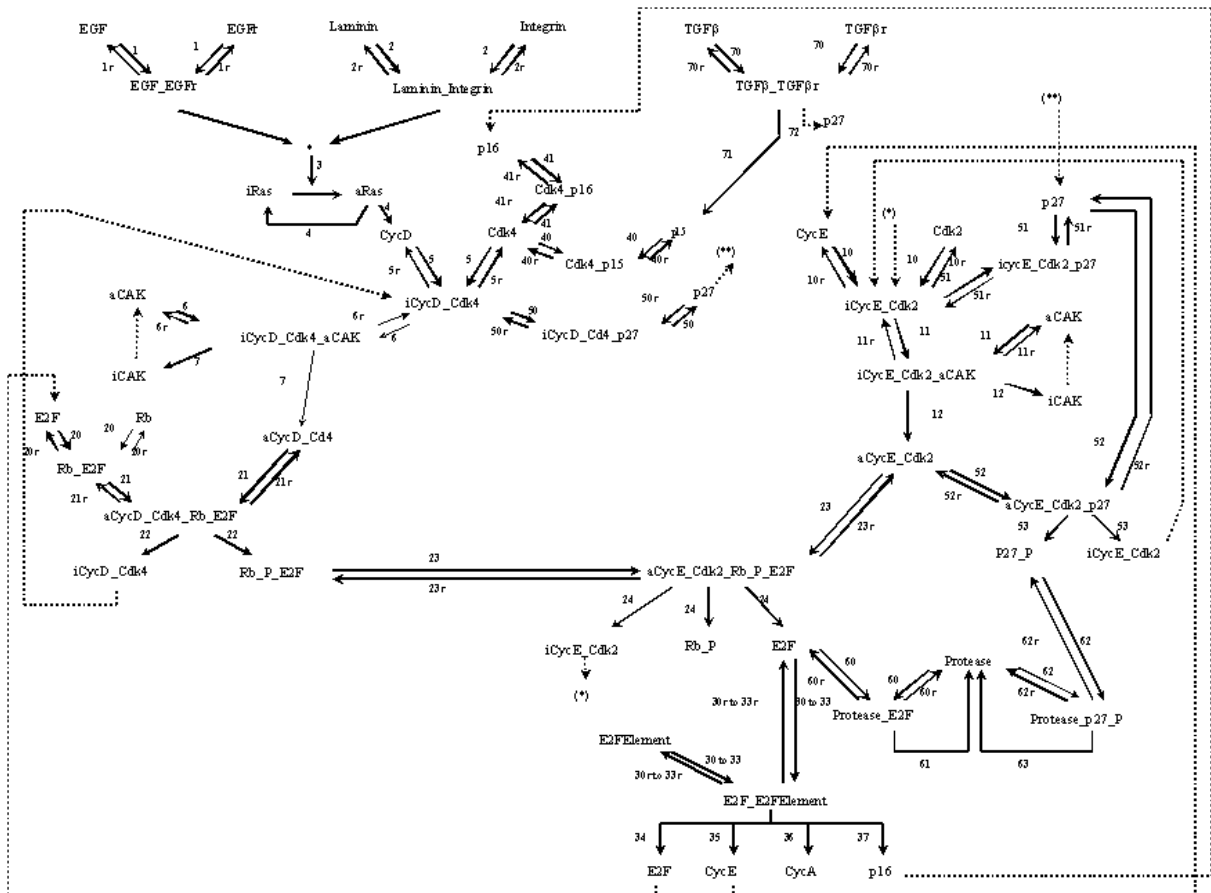


Fig. 70. Structure du modèle, réactions et paramètres. Les réactions sont numérotées permettant de retrouver les paramètres les décrivant dans les Tab. 13 et 14.

L'identification des valeurs des paramètres d'un tel modèle pose de nombreux problèmes. Le nombre des possibilités semblent *a priori* presque infini. Cependant, des travaux récents (Feinberg *et al.* 74) ont montré que la topologie de tels réseaux est plus importante que les valeurs des paramètres elles-mêmes. C'est pourquoi nous avons décidé d'appliquer la technique, artisanale et laborieuse décrite par Kohn (Kohn 98). Il s'agit de décomposer le modèle en sous-modèles de taille raisonnable, d'une façon similaire à celle utilisée pour expliquer la construction du réseau, contenant un maximum de 10 paramètres chacun. Le comportement de chaque sous-modèle est étudié séparément de l'ensemble et les paramètres sont estimés en se fondant sur les quelques

données expérimentales disponibles (*in vitro* ou *in vivo*). La faiblesse de cette approche réside évidemment dans cette phase, décrite dans la partie concernant les résultats.

ii. Equations

Les équations appliquant la LAM au modèle décrit par la **Fig. 70** sont décomposées en plusieurs parties : calcul des vitesses de chacune des réactions (**Tab. 13**) et calcul des variations des quantités de chacune des molécules du modèle par unité de temps (dQ/dt) (**Tab. 14**).

Tab. 13. Vitesse des réactions.

Vitesse	Formule	Vitesse	Formule	Vitesse	Formule
v1	$k1 * EGF * EGF_r$	v20r	$k20r * Rb_E2F$	v41r	$k41r * Cdk4_p16$
v1r	$k1r * EGF_EGF_r$	v21	$k21 * aCycD_Cdk4 * Rb_E2F$	v50	$k50 * iCycD_Cdk4 * p27$
v2	$k2 * Laminin * Integrin$	v21r	$k21r * aCycD_Cdk4_Rb_E2F$	v50r	$k50r * iCycD_Cdk4_p27$
v2r	$k2r * Laminin_Integrin$	v22	$k22 * aCycE_Cdk2 * Rb_E2F$	v51	$k51 * iCycE_Cdk2 * p27$
v3	$k3 * iRas * (EGF_EGF_r * Laminin_Integrin)$	v23	$k23 * aCycE_Cdk2 * Rb_P_E2F$	v51r	$k51r * iCycE_Cdk2_p27$
v4	$k4 * aRas$	v23r	$k23r * aCycE_Cdk2_Rb_P_E2F$	v52	$k52 * aCycE_Cdk2 * p27$
v5	$k5 * CycD * Cdk4$	v24	$k24 * aCycE_Cdk2_Rb_P_E2F$	v52r	$k52r * aCycE_Cdk2_p27$
v5r	$k5r * iCycD_Cdk4$	v30	$k30 * E2F * E2FPromotor$	v53	$k53 * aCycE_Cdk2_p27$
v6	$k6 * iCycD_Cdk4 * aCAK$	v30r	$k30r * E2F_E2FPromotor$	v55	$k55 * aCycE_Cdk2 * CycD$
v6r	$k6r * iCycD_Cdk4_aCAK$	v31	$k31 * E2F * CycEPromotor$	v55r	$k55r * aCycA_Cdk2_CycD$
v7	$k7 * iCycD_Cdk4_aCAK$	v31r	$k31r * E2F_CycEPromotor$	v56	$k56 * aCycA_Cdk2_CycD$
v10	$k10 * CycE * Cdk2$	v32	$k32 * E2F * CycAPromotor$	v60	$k60 * Protease * E2F$
v10r	$k10r * iCycE_Cdk2$	v32r	$k32r * E2F_CycAPromotor$	v60r	$k60r * Protease_E2F$
v11	$k11 * iCycE_Cdk2 * aCAK$	v33	$k33 * E2F * p16Promotor$	v61	$k61 * Protease_E2F$
v11r	$k11r * iCycE_Cdk2_aCAK$	v33r	$k33r * E2F_p16Promotor$	v62	$k62 * Protease * p27_P$
v12	$k12 * iCycE_Cdk2_aCAK$	v34	$k34 * E2F_E2FPromotor$	v62r	$k62r * Protease_p27_P$
v15	$k15 * CycA * Cdk2$	v35	$k35 * E2F_CycEPromotor$	v63	$k63 * Protease_p27_P$
v15r	$k15r * iCycA_Cdk2$	v36	$k36 * E2F_CycAPromotor$	v70	$k70 * TGFb * TGFbr$
v16	$k16 * iCycA_Cdk2 * aCAK$	v37	$k37 * E2F_p16Promotor$	v70r	$k70r * TGFb_TGFbr$
v16r	$k16r * iCycA_Cdk2_aCAK$	v40	$k40 * Cdk4 * p15$	v71	$k71 * TGFb_TGFbr$
v17	$k17 * iCycA_Cdk2_aCAK$	v40r	$k40r * Cdk4_p15$	v72	$k72 * TGFb_TGFbr$
v20	$k20 * Rb * E2F$	v41	$k41 * Cdk4 * p16$	v100	$k100 * iCAK$

Tab. 14 Variations des concentrations de protéines (Q est le terme générique désignant la quantité des protéines exprimée en unité arbitraire).

dQ/dt	Formule	dQ/dt	Formule
dEGF	$-v1 + v1r$	dRb_P	$+v24$
dEGFr	$-v1r + v1$	dE2F	$-v20 + v20r + v24 - v30 + v30r - v31 + v31r - v32 + v32r - v33 + v33r + v34 - v60 + v60r + v20 - v20r - v21 + v21r$
dEGF_EGF_r	$+v1 - v1r$	dRb_E2F	$+v22 - v23 + v23r$
dLaminin	$-v2 + v2r$	dRb_P_E2F	$+v21 - v21r - v22$
dIntegrin	$-v2 + v2r$	daCycD_Cdk4_Rb_E2F	$+v23 - v23r - v24$
dLaminin_Integrin	$+v2 - v2r$	daCycE_Cdk2_Rb_P_E2F	$-v30 + v30r$
dTGFb	$-v70 + v70r$	dE2FPromotor	$-v31 + v31r$
dTGFbr	$-v70 + v70r$	dCycEPromotor	$-v32 + v32r$
dTGFb_TGFbr	$+v70 - v70r$	dCycAPromotor	$-v33 + v33r$
diRas	$-v3 + v4$	dp16Promotor	$+v30 - v30r$
daRas	$+v3 - v4$	dE2F_E2FPromotor	$+v31 - v31r$
dCycD	$+v4 - v5 + v5r$	dE2F_CycEPromotor	$+v32 - v32r$
dCdk4	$-v5 + v5r - v40 + v40r - v41 + v41r$	dE2F_CycAPromotor	$+v33 - v33$
diCycD_Cdk4	$+v5 - v5r - v6 + v6r + v22 - v50 + v50r$	dE2F_p16Promotor	$-v40 + v40r + v71$
daCycD_Cdk4	$+v7 - v21 + v21r$	dp15	$+v37 - v41 + v41r$
diCycD_Cdk4_aCAK	$+v6 - v6r - v7$	dp16	$-v50 + v50r - v51 + v51r - v52 + v52r + v72$
dCycE	$-v10 + v10r + v35$	dp27	$+v53 - v62 + v62r$
dCdk2	$-v10 + v10r$	dp27_P	$+v40 - v40r$
diCycE_Cdk2	$+v10 - v10r - v11 + v11r + v16 - v51 + v51r + v53$	dCdk4_p15	$+v41 - v41r$
daCycE_Cdk2	$+v12 + v14 - v15 + v15r - v23 + v23r - v52 + v52r$	dCdk4_p16	$+v50 - v50r$
diCycE_Cdk2_aCAK	$+v11 - v11r - v12$	diCycD_Cdk4_p27	$+v51 - v51r$
diCAK	$+v7 + v12 - v100$	diCycE_Cdk2_p27	$+v52 - v52r - v53$
daCAK	$-v6 + v6r - v11 + v11r - v16 + v16r + v100$	dProtease	$-v60 + v60r + v61 - v62 + v62r + v63$
dCycA	$+v36 - v15 + v15r$	dProtease_E2F	$+v60 - v60r$
diCycA_Cdk2	$+v15 - v15r - v16 + v16r$	dProtease_p27_P	$+v62 - v62r - v63$
daCycA_Cdk2	$+17 - v55 + v55r$	dProtease_CycD_P	$+v64 - v64r - v65$
diCycA_Cdk2_aCAK	$+v16 - v16r - v17$		
daCycA_Cdk2_CycD	$+v55 - v55r - v56$		
dRb	$-v20 + v20r$		

c. Gestion de la complexité des interactions

Avec tant de paramètres, la plupart étant inconnue, l'étude complète du système à l'aide de méthodes de résolution numérique classiques serait très coûteuse en temps.

A une telle approche mathématique, Kohn (**Kohn 98**) a préféré une étude du système « petit bout par petit bout », définissant les valeurs de paramètres de chaque réaction indépendamment des autres. Aguda (**Aguda et al. 99**) a procédé avec les mêmes techniques montrant que, dans son modèle, le passage du point de restriction est robuste et peut être obtenu avec un grand jeu de valeurs de paramètres. De plus, il a été montré que le

comportement qualitatif de certains systèmes en réseau est très dépendant de la structure du réseau (**Feinberg et al. 74**). Pour limiter le poids de la technique de résolution c'est cette option que nous avons retenue, et ce, malgré ses inconvénients évidents.

4. Implémentation

a. Langage et environnement de programmation

Le langage utilisé pour implémenter le modèle est le C++ (e.g. **Schildt 94**, **Stroustrup 96** et **Winder 94**). Il s'agit d'un langage de programmation compilé et orienté objet. Il permet une programmation très pratique pour les biologistes en leur permettant de conserver dans le programme de nombreux concepts propres à la biologie (cellule, compartiment, environnement, ...). De plus, une fois optimisés, les programmes obtenus à l'aide de ce langage sont suffisamment rapides pour satisfaire nos besoins en vitesse de calcul pour des simulations malheureusement très consommatrices de temps de calcul.

Les systèmes d'exploitations utilisés ont été Windows™ NT versions 3.51, 4.0 puis Windows™ 2000 (Service Pack 6). Le programme a été développé dans l'environnement de programmation Visual Studio™ C++ 6.0. Tous ces logiciels sont des produits de la firme Microsoft®. Ce choix a été motivé par la qualité de l'environnement de travail de Visual Studio™ C++ 6.0 qui intègre un compilateur C/C++, un gestionnaire d'interface graphique générant automatiquement une partie du code nécessaire et les bibliothèques de fonctions et de classes préprogrammées disponibles MFC (*Microsoft Foundation Class*), e.g. les tableaux dynamiques de types *CObArray* ou encore les objets *CObject* permettant de gérer facilement, au travers de la notion d'héritage du C++, des tableaux ou des listes d'objets de types différents. De plus, l'omnipotence de Microsoft dans les domaines de l'informatique personnelle et professionnelle imposait ce choix pour de simples raisons de compatibilité notamment lors de l'implémentation du graphe de Voronoï, décrite dans la partie abordant l'implémentation de la représentation des cellules en 2D.

L'anglais a été choisi comme langue des commentaires internes au programme et comme langue de nomenclature. Les variables sont nommées en anglais, elles sont très proches de ce qu'elles représentent. Le code a été développé suivant la norme propre à Microsoft® qui est une variante de la norme ANSI. Les différences sont minimales. Par exemple, le nom des objets débute toujours par un *C* majuscule (e.g. *CProlifération*), le préfixe *m_* signifie que l'on a affaire à une variable membre d'une classe, les préfixes *n* ou *d* indiquent respectivement un entier ou un réel double), etc. Cette nomenclature a été appliquée à tous les éléments du programme à l'exception des paramètres des modèles moléculaires qui ont conservé leur nomenclature originale (e.g. *iCycD_Cdk4_p15* ou *aCycE_Cdk2_Rb_P_E2F*).

Afin de faciliter la lecture du code, les déclarations de classes, de variables et de fonctions globales ou membres sont réalisées dans des fichiers possédant l'extension « .h » alors que la définition et l'utilisation de ces éléments sont circonscrites aux fichiers possédant l'extension « .cpp ».

b. Structure

La structure de l'implémentation est très simple (**Fig. 71**). Les paramètres et les fonctions du modèle sont implémentés comme des variables et des fonctions membres d'une classe créée automatiquement par Visual Studio nommée *CProliférationDoc*. Cette classe est liée à l'interface par l'intermédiaire d'une seconde classe nommée *CProliférationView* qui gère les événements générés lors de l'utilisation de l'interface (e.g. modifications des valeurs des paramètres, clique sur un ou plusieurs boutons, etc.). Cette structure en Document/Vue, c'est à dire Données/Représentation des données, répond aux canons de la programmation sous Windows NT/2000.

L'algorithme du programme de simulation est représenté en **Fig. 71**.

```

CProliferationDoc
Entrée:
    TempsCourant (t=0)
    PasSimulation (dt=0.0001)
    DuréeSimulation (m_dSimulationLength=n)

FonctionSimulation()
{
    OuvertureFichierStockageDonnées (.dat)
    EcritureFichierResultats (t=0)
    De t=0 à t=m_dSimulationLength
    (
        t=t+dt
        FonctionCalculVariationsConcentrations ()
        {
             $v_i = k_i * C_a * C_b$ 
             $dC_a = -v_i + v_{ir}$ 
        }
        FonctionRemiseAJourConcentrations ()
        {
             $C_a = C_a + dC_a * dt$ 
        }
        EcritureFichierResultats (t)
    )
}

Sortie:
    SauvegardeFichierResultats ()
    AffichageCourbesResultats ()

```

Fig. 71. Algorithme du programme de simulation. Le temps *t* est en unité arbitraire. Les fonctions possèdent des parenthèses et les variables sont écrites en italiques. v_i , v_{ir} , k_i , C_a , C_b , et dC_a sont respectivement les vitesses des réactions *i*, vitesse de la réaction inverse *ir*, constante de la réaction *i*, quantité de la protéine *a*, quantité de la protéine *b* et variation de la quantité de la protéine *a*.

Le bon fonctionnement du programme dépend de quelques impératifs liés au modèle lui-même :

- Il est essentiel que la remise à jour des concentrations du modèle soit faite une fois que les variations des quantités de toutes les protéines ont été calculées. Il s'agit d'une certaine façon d'une émulation de parallélisme. Dans le cas contraire, des problèmes de récursivité surviendraient dans le programme.

- Comme indiqué à propos du choix de la LAM comme outils de base de la modélisation des réactions biochimiques, δt doit rester suffisamment petit lors du déroulement des simulations. Ici, le pas de calcul a été fixé à 0.0001 (unité de temps arbitraire) pour éviter que des quantités de protéines deviennent négatives. C'est la discrétisation des systèmes d'équations différentielles qui rend cet inconvénient possible. Si un tel cas survenait lors d'une simulation, il s'agirait d'un non-sens biologique.

Cette dernière obligation entraîne un coût de calcul élevé. Ainsi, une simulation de 100 unités de temps correspond donc à 1.000.000 pas de calculs. Il est important de retenir cet ordre de grandeur pour la mise en œuvre du modèle.

c. Interface

L'interface du programme permet une interaction facile avec le modèle en affichant les valeurs de ces différents paramètres (**Fig. 72**). Elle s'est révélée très utile lors de l'évaluation des paramètres du modèle.

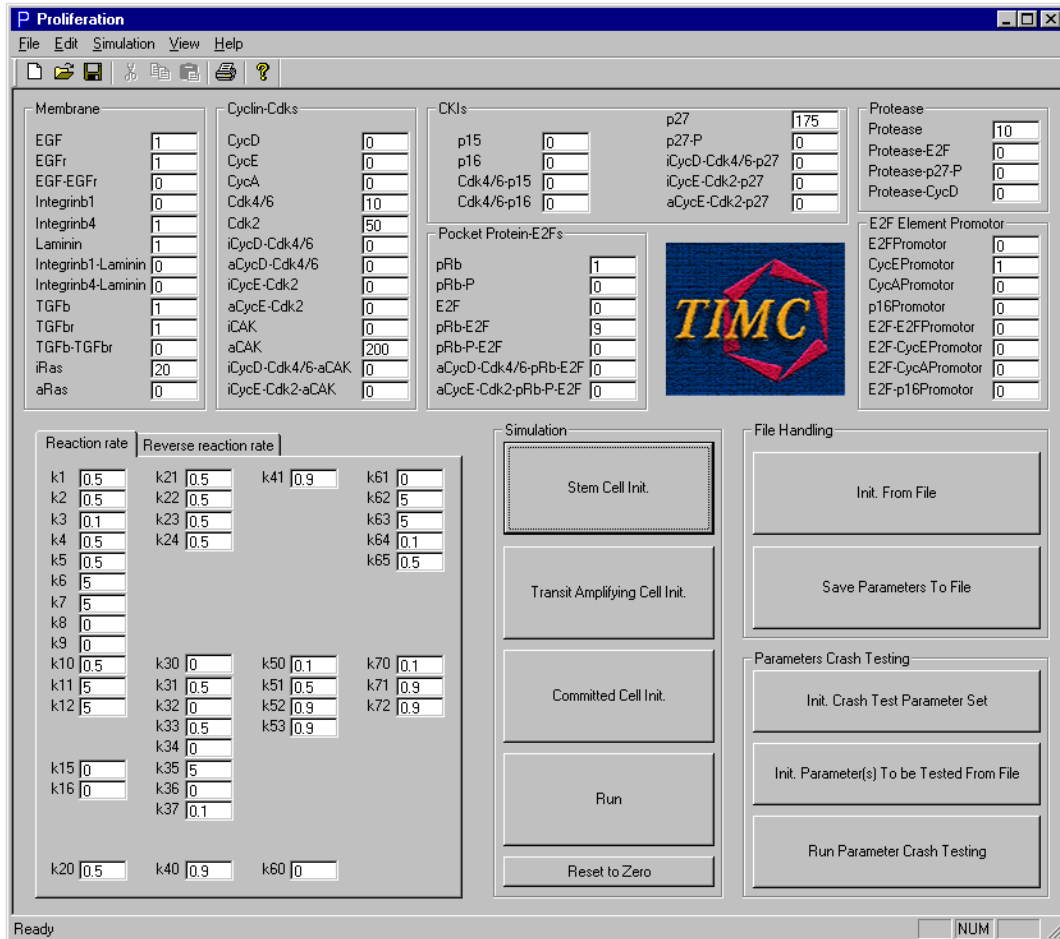


Fig. 72. Interface du programme de simulation des contrôles moléculaires de la prolifération d'une cellule. Les différents éléments du modèle sont classés d'après leur type ou leur localisation : protéines membranaires ou sous-membranaires (*Membrane*), protéines des complexes cycline-CDK (*Cyclins-Cdks*), inhibiteurs de complexes cycline-CDK (*CKIs*), protéines impliquées dans les processus d'ubiquitination (*Protease*), Constante des réactions.

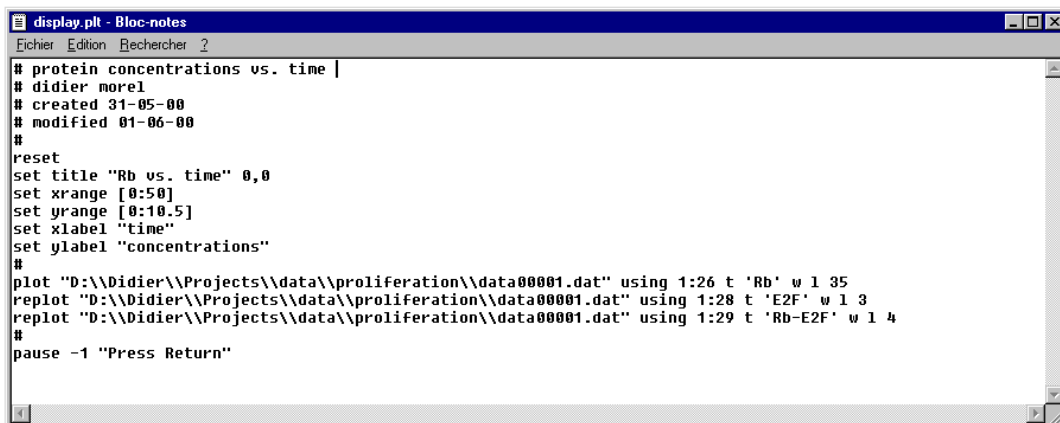


Fig. 73. Fichier de configuration des paramètres à représenter par le logiciel GnuPlot.

Après avoir lancé l'exécutable (*Proliferation.exe*), il est possible d'initialiser les valeurs des paramètres soit en chargeant des données stockées au préalable dans un fichier d'extension « .dat » (*Init. From File*) ou à partir de jeux de paramètres prédéfinis lors d'une étude précédente et décrivant un comportement cinétique caractéristique typique d'un état cellulaire (e.g. *Stem Cell Init.*, *Transit Amplifying Cell Init.* ou *Committed Cell Init.*). Les simulations sont ensuite lancées (*Run*) et les courbes représentant l'évolution des quantités de protéines sont

tracées par le logiciel GnuPlot, lancé dès la fin de la simulation par le programme lui-même. Pour obtenir un affichage adéquat de ces courbes, l'écriture préalable d'un petit fichier de configuration est nécessaire (**Fig. 73**). Pour faciliter la phase d'évaluation des paramètres et pour montrer l'effet de la variation des valeurs d'un ou plusieurs paramètres, la possibilité de lancer plusieurs simulations successives avec des intervalles prédéfinis pour certains paramètres a été intégrée à l'interface. Il suffit de définir au préalable les intervalles de valeurs pour les paramètres à étudier en créant un fichier de configuration (**Fig. 74**), d'initialiser les valeurs initiales de l'ensemble des paramètres du modèle (*Init. Crash Test Parameter Set*), d'ouvrir le fichier de configuration du test (*Init. Parameter(s) To be Tested From File*) puis de lancer le test (*Run Parameter Crash Testing*). Les simulations sont ensuite réalisées pour toutes les combinaisons de paramètres possibles et les courbes de l'évolution des quantités des protéines sont affichées par le programme à l'aide du logiciel GnuPlot. Cette technique, fondée sur l'utilisation d'une fonction récursive, n'est bien sûr pas adaptée à de grands jeux de paramètres mais se montre très pratique lors de l'étude du comportement du modèle dans un nombre limité de cas, à des fins de test.

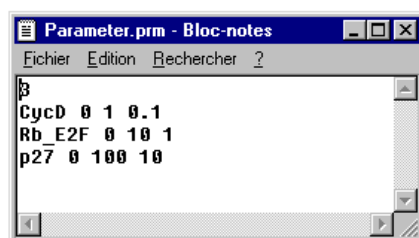


Fig. 74. Fichier de configuration des paramètres à tester. Le chiffre de la première ligne indique le nombre de paramètres à tester (ici : 3), les lignes suivantes fonctionnent de façon identique : nom du paramètre à tester (), borne inférieure de l'intervalle de test, borne supérieure de l'intervalle de test et pas de l'incrément à l'intérieur de l'intervalle.

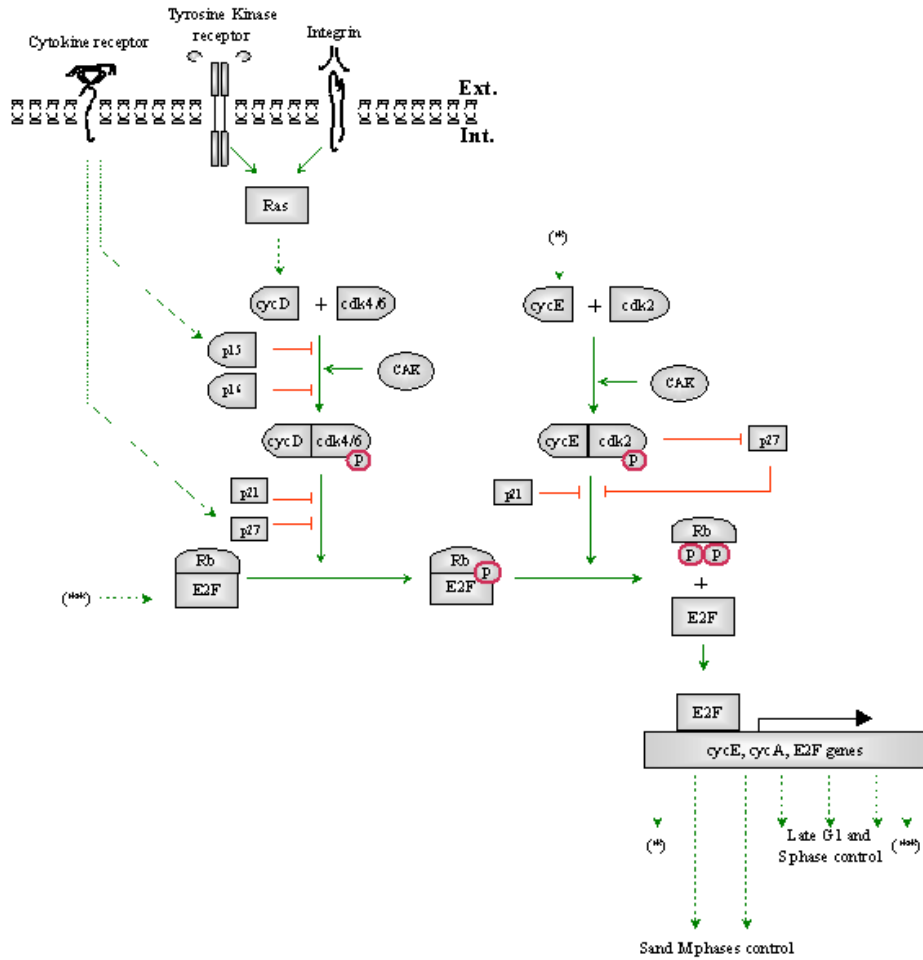
6. Nomenclature et formalisation

Les formalismes évoqués lors de l'état de l'art nous ont semblé de prime abord très intéressants. Le formalisme de Kohn qui est sans doute le plus abouti présente notamment les avantages suivants :

- Chaque type de monomère est présent seulement une seule fois.
- Chaque complexe moléculaire est représenté comme un point ou un nœud.
- Des symboles uniques sont utilisés pour représenter les mécanismes suivants :
 - Liaison entre molécules ;
 - Conversion stœchiométrique d'une espèce vers une autre ;
 - Stimulation de la production d'une protéine par une autre molécule ;
 - Modification de molécules monomères par addition de petites molécules.

Cependant, une tentative rapide de construction de notre modèle à l'aide de ce formalisme montre que son utilisation n'est pas indispensable (**Fig. 75**). C'est notamment le manque de clarté du formalisme dans le maniement des complexes macromoléculaires qui est gênant. En effet, la volonté de gérer les réactions biochimiques de façon non-idéale engendre la prise en compte de nombreux complexes de ce type. Dans l'attente d'un formalisme plus pratique à utiliser, il a été décidé de se passer d'un tel outil.

a.



b.

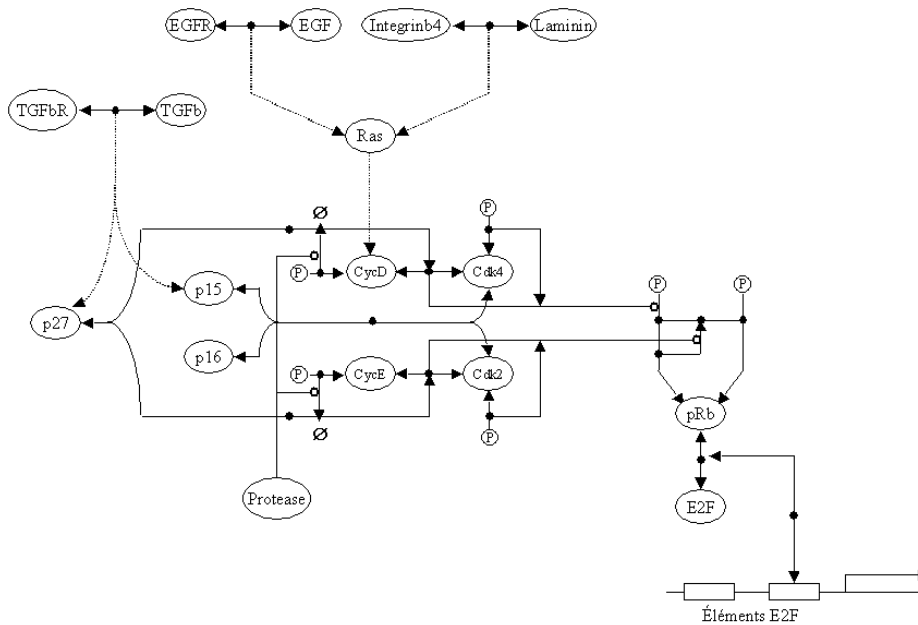


Fig. 75. Représentations comparées du même réseau moléculaire : a. représentation intuitive et b. en appliquant la représentation de Kohn (Fig. 71).

Partie 2 : Représentation d'un tissu en 2D

I. Graphe de Voronoï

1. Définition

Etant donné un jeu de germes (**Fig. 76**), le graphe de Voronoï est une partition polygonale du plan où chaque polygone est l'ensemble des points les plus proches du germe du polygone que de n'importe quel autre germe (**Marcelpoil et al. 92**).

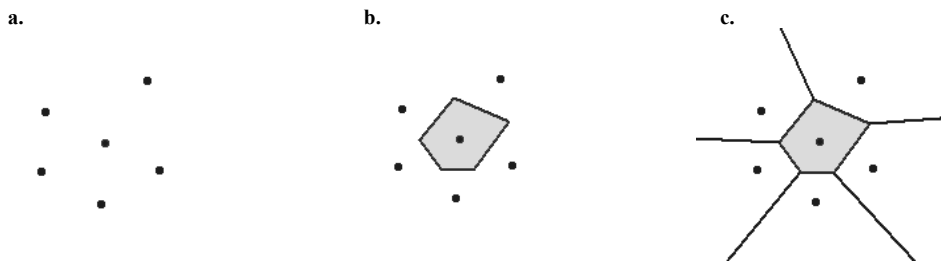


Fig. 76. Définition du graphe de Voronoï : a. Germes, b. Polygone associé à un des germes et c. Graphes de l'ensemble des germes du plan.

Il existe plusieurs algorithmes de construction du graphe de Voronoï : incrémental (**Fig. 77**) ou « *divide and conquer* » (diviser pour régner), par exemple.

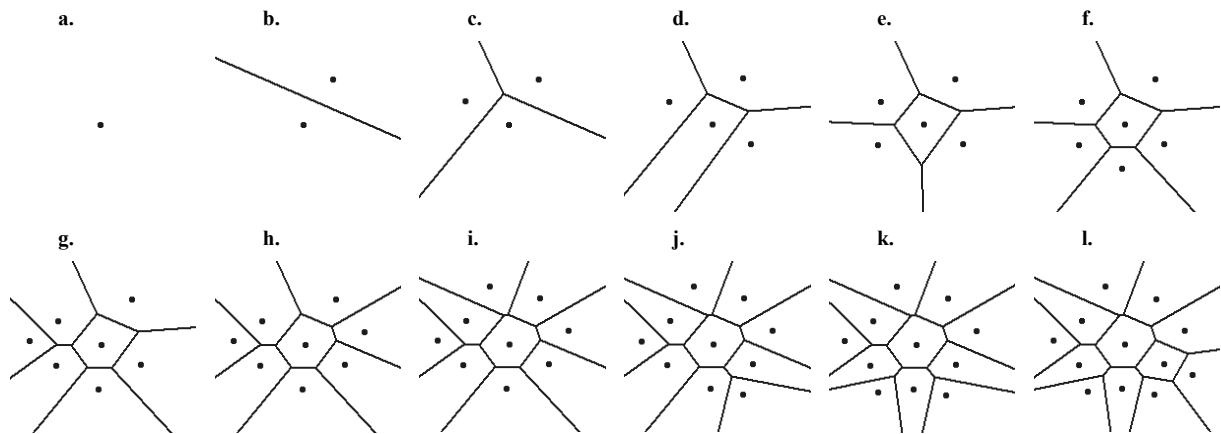


Fig. 77. Exemple de construction du graphe par ajouts successifs de germes (algorithme incrémentale). Suivant les conditions, un premier polygone peut être formé si au moins quatre germes sont présents (ici, il faut cinq germes). Les bordures des polygones sont appelées arêtes (*edges*) et leurs sommets sont aussi appelés vertex (*vertices*).

2. Applicabilité à un tissu épithélial

Le graphe de Voronoï offre des propriétés intéressantes :

- Il permet de rendre compte de la structure d'un tissu épithélial avec suffisamment de réalisme pour faciliter toute interprétation visuelle (**Fig. 78**). Ce réalisme est présent à la fois dans les représentations du tissu en coupe transversale qu'en coupe frontale (**Fig. 78c**) ;

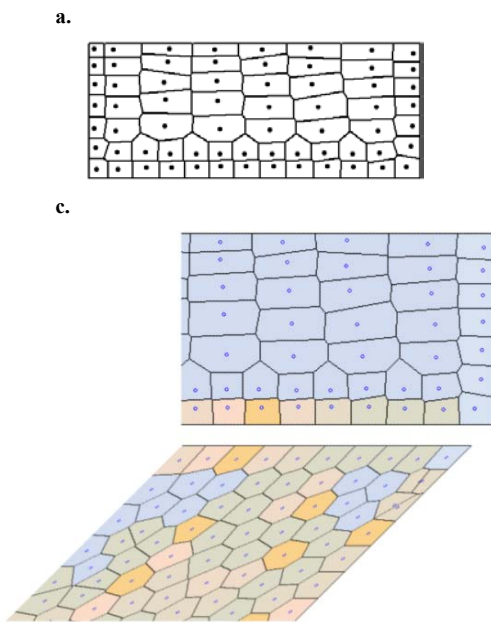


Fig. 78. Réalisme de la représentation d'un tissu épithélial stratifié par le graphe de Voronoï : a. Représentation noir et blanc mettant en évidence la structure du tissu en coupe transversale ; b. Représentation en couleur du tissu en coupe transversale, la couleur de chaque polygone montrant une propriété cellulaire (e.g. concentration d'une protéine) et c. Représentation simultanée d'une vue de coupe transversale et d'une vue de coupe frontale (les couleurs représentent ici les différents types cellulaires présents : cellules souches, en transit, engagées, différenciées et cellules du bord).

- Il contient d'autres graphes (Arbre de Recouvrement Minimum, Gabriel, ...) et il est le dual de la triangulation de Delaunay (Fig. 79) ; il fournit donc une approche « tout en un » pour quantifier ordre et désordre dans une population ;

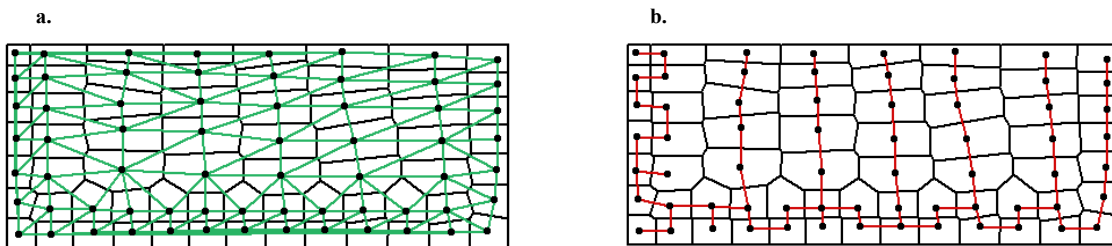


Fig. 79. Graphe de Voronoï et graphes duaux ou inclus : a. Graphe de Delaunay et b. Arbre de recouvrement minimum (MST).

- Il est stable, ce qui signifie que l'addition ou la suppression d'un germe modifie seulement la configuration locale du graphe et non pas l'ensemble de la population (Fig. 80). Cette propriété est importante à la fois lors de la représentation de comportement biologique que lors de l'implémentation de l'algorithme de calcul du graphe (performance du programme).

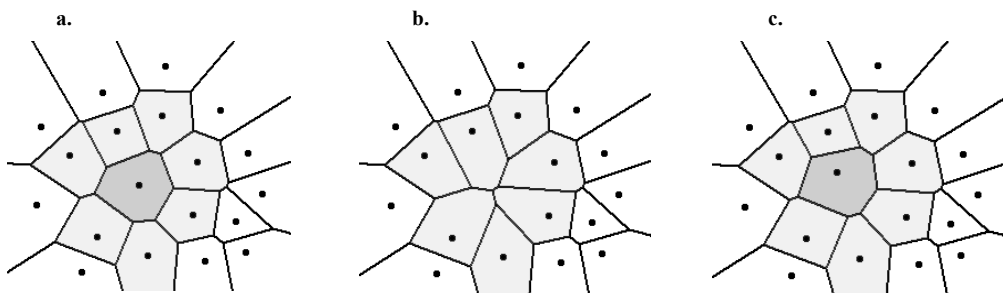


Fig. 80. Stabilité du graphe de Voronoï lors de : b. la suppression et c. l'addition de points.

Cette dernière propriété permet notamment de représenter la mitose de façon réaliste, et de gérer alors une asymétrie et une direction potentielle (**Fig. 81**).

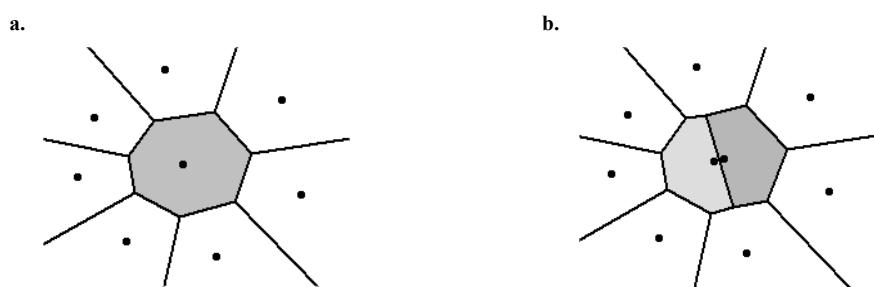


Fig. 81. Représentation de la division d'une cellule en deux cellules filles à l'aide du graphe de Voronoï : a. Avant la mitose et b. Après la mitose. Le germe représentant la cellule mère est remplacé par deux germes dont les coordonnées peuvent être choisies au hasard ou calculées suivant un paramètre spécifique au modèle (respectivement : une variable aléatoire ou une formule mathématique est appliquée aux coordonnées de la cellule mère).

- Parce qu'il rend aussi bien compte de la forme des cellules, c'est un outil idéal pour quantifier les échanges entre les cellules, garantissant la proportionnalité des échanges à la longueur des arêtes.

II. Intégration du modèle de prolifération et du graphe de Voronoï

1. Généralités

Grâce au graphe de Voronoï, chaque cellule est représentée par un polygone. A l'instar du modèle moléculaire, le modèle tissulaire est implanté en C++ (e.g. **Schildt 94**, **Stroustrup 96** et **Winder 94**). Les outils informatiques et la nomenclature ont été les mêmes dans les deux cas. Cette implémentation permet donc de gérer parallèlement des cellules et le graphe de Voronoï en attribuant à ces éléments des objets spécifiques, ce qui rend la structure du modèle très intuitive pour un biologiste. Ainsi, les cellules de la population sont construites sur le même canevas mais se comportent différemment suivant leur position et les événements survenant dans la population et disponibles par l'intermédiaire du graphe de Voronoï (relations de voisinage direct, gradients, déformation, ...). Par exemple, les arêtes de chaque polygone sont les contacts de la cellule avec son environnement, que ce soit une autre cellule ou la membrane basale du tissu épithélial. Chaque cellule connaît donc la nature exacte de son environnement et peut interagir avec celui-ci tout comme son environnement peut interagir avec elle.

2. Implémentation du modèle

a. Structure du modèle

La structure du modèle (**Fig. 82**) incluant une représentation des cellules est plus complexe que celle du modèle de réseau de contrôle moléculaire pour une cellule isolée (**Fig. 71**).

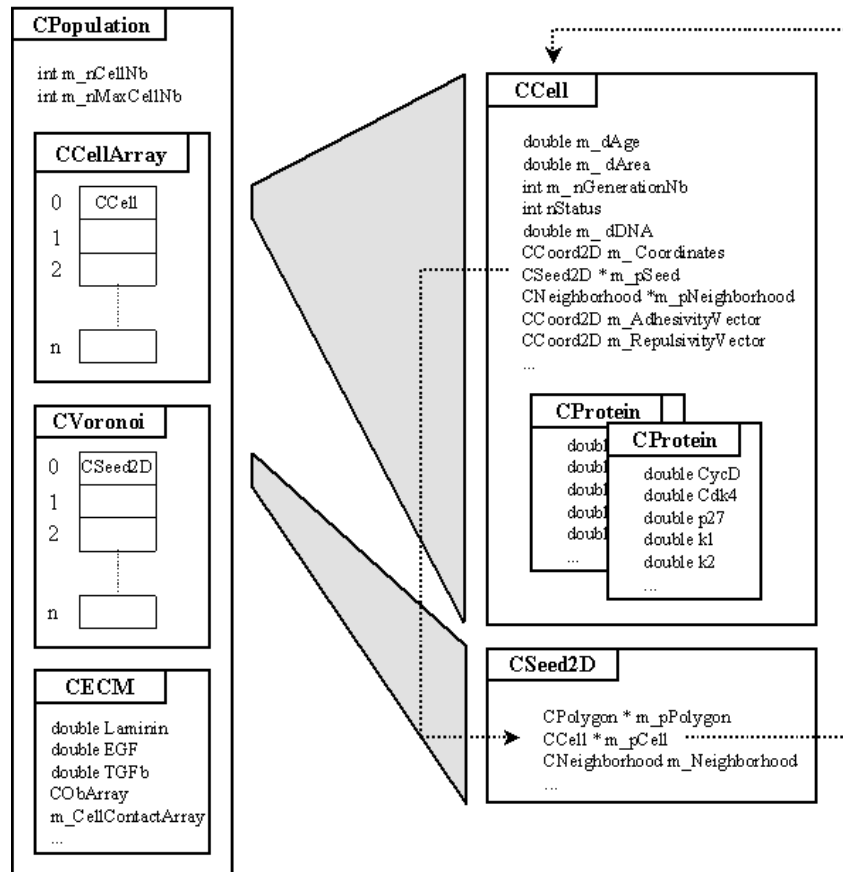


Fig. 82. Structure du modèle implémenté en C++.

L'objet principal est celui (nommé *CPopulation*) qui gère le parallélisme entre la population de cellules et le graphe de Voronoï.

Cet objet *CPopulation* est défini par :

- Un tableau dynamique (objet de la classe MFC *CObArray* nommé *m_CellArray*) de pointeurs²⁰ vers des objets de type cellule (nommé *CCell*) ;
- Un pointeur vers un objet définissant le graphe de Voronoï (objet de la classe *CVoronoi* nommé *m_pVor*) ;
- Un pointeur vers un objet définissant la membrane basale du tissu (objet de la classe *CECM* nommé *m_pECM*) ;
- Des variables et fonctions permettant de gérer ces objets, en outre des variables définissant cette « population de cellules », e.g. taille courante de la population (*m_nCellNb*).
- Des fonctions membres permettant de coordonner le déroulement de la simulation : la fonction *Clock()* appelle successivement les fonctions *Timer()* et *UpdateProteins()* de chacune des cellules. Ces fonctions sont dédiées aux calculs des variations des paramètres du modèle entre le temps t et le temps $t+\delta t$. La fonction *UpdatePopulation()* réactualise le graphe de Voronoï en fonction des nouveaux paramètres des cellules (addition et soustraction de germes, respectivement dans le cas de mitose ou de mort cellulaire). D'autres fonctions utilitaires gèrent des aspects purement informatiques et fonctionnels de la population lors des simulations (initialisations de la population, remise à zéro du graphe de Voronoï, ajout de cellules dans la population, remise à jour du nombre de cellules de la population, etc.).

L'objet *CCell* est défini par :

- Des variables de fonctionnement : principalement des booléens utilisés comme références, e.g. la valeur de la variable *m_bPresence* indique la nécessité de conserver (1) ou non (0) l'objet *CCell* dans le tableau dynamique la population à la fin d'un pas de simulation.
- Des variables membres définissant des propriétés générales de l'objet cellule – son âge (*m_dAge*), sa surface (*m_dArea*), son contenu en ADN (*m_dDNA*), les coordonnées de son germe (objet de la classe *Ccoord2D* nommé *m_Coordinates*), le nombre de génération depuis la première division (*m_nGenerationNb*), etc.
- Un pointeur vers le germe du graphe de Voronoï associé à la cellule (pointeur vers un objet de type *CSeed2D* nommé *m_pSeed*). Ce pointeur permet à la cellule d'avoir accès à tout moment aux propriétés de son polygone associé.
- Un pointeur vers un objet de classe *CCellNeighborhood* qui contient une liste de pointeurs vers les objets *CCell* considérés comme voisins
- Deux vecteurs de mouvement de classe *CCoord2D* : le premier donné par les propriétés adhésives de la cellule (*m_AdhesivityVector*) et le second par ses propriétés répulsives (*m_RepulsivityVector*). Les propriétés de ces vecteurs sont détaillées dans « IV. Modélisation des échanges biochimiques ».
- Deux pointeurs vers des objets de classe *CProtein* servant de container à l'ensemble des variables du modèle (quantité de protéines et vitesse des réactions). Ainsi, la structure de cette classe reprend celle du modèle moléculaire, de nombreuses variables et des fonctions de calcul des variations de leurs valeurs. Ces deux objets sont utilisés en parallèle pour éviter de générer des problèmes de récursivité dans le système d'équations aux différences du modèle. Le premier objet (nommé *m_pProteins*) contient les variables au temps t , i.e. dont les valeurs ont été calculées lors du pas de calcul précédant alors que le second objet (*m_pTmpProteins*) contient les variables au temps $t+\delta t$, soit les variables calculées au cours du pas de calcul courant. Les valeurs des variables de *m_pProteins* sont réactualisées à l'aide des valeurs des variables *m_pTmpProteins* par la fonction *UpdateProteins()* pour toutes les cellules de la population seulement une fois que les valeurs des variables de *m_pTmpProteins* ont été calculées pour toutes les cellules de la population. Ce système de tampon permet au programme de fonctionner en pseudo-parallélisme.
- Des fonctions membres permettant de gérer le déroulement de la simulation au niveau de l'objet lui-même. La plus importante de ces fonctions est appelée *Timer()* qui coordonne l'ensemble des fonctions lancées à chaque pas de simulation :
 - *ProcessNeighborhoodLinkedProteins()* : gère l'implication des protéines membranaires de la cellule dans des processus à la fois biochimiques (activation) et physiques (adhérence) qui impliquent aussi l'environnement de la cellule (cellules voisines et membrane basale) ;
 - *ProcessProteins()* : gère les réactions du modèle moléculaire ;
 - *ProcessMotility()* : gère les mouvements de la cellule suivant l'adhérence différentielle de la cellule à son voisinage et les pressions exercées par celui-ci sur la cellule ;
 - *CheckProteins()* : gère le comportement de la cellule suivant les paramètres du modèle : e.g. si la cellule est en phase de mitose et qu'elle doit se diviser, deux cellules filles sont créées par la fonction *Mitosis()*. Les caractéristiques de ces deux cellules sont

²⁰ Un pointeur est une variable dont la valeur est une adresse mémoire. Ce type de variable est très utilisé dans les programmes où de la mémoire doit être allouée très fréquemment en cours d'exécution. Le C++ est particulièrement adapté à l'usage de telles variables.

données par cette fonction qui partage les ressources de la cellule mère (possibilité de gérer l'asymétrie de la mitose, l'orientation de l'axe de division, etc.).

L'objet *CECM* est défini par :

- Des variables décrivant les quantités de protéines présentes dans la matrice extracellulaire (MEC) : *Laminin*, *EGF*, *TGFb* ;
- Un tableau dynamique de classe *COBArray* contenant l'ensemble des contacts entre l'objet *CECM* et les cellules de la population.

L'objet *CVoronoi*, développé par R. Marcelpoil et E. Bertin lors de leurs thèses au sein du laboratoire TIMC, fournit de nombreux outils de calcul des graphes de Voronoï, de Delaunay, du MST, etc. En simplifiant à l'extrême, on dira qu'il est défini par :

- Les germes du graphe (objets de la classe *CSeed2D*) et un tableau de pointeurs vers ces germes (objet de la classe MFC *CArray* nommé *m_ArrayDelPtSeed*) permettant d'accéder à ces germes ;
- Des fonctions calculant les différents graphes à partir des germes.

Afin d'optimiser le programme lors des simulations, l'objet *CSeed2D* a été modifié pour lui permettre de « connaître » l'objet cellule qui lui est associé. Ainsi, il possède un pointeur vers un objet de la classe *CCell* (nommé *m_pCell*).

b. Modélisation du cycle cellulaire

Le modèle de réseau de contrôle de la prolifération cellulaire est dédié à la modélisation de la transition entre la phase G_1 et la phase S du cycle cellulaire. Les autres phases ont été gérées de façon déterministes. Les phases S, G_2 et M sont considérées comme possédant des durées fixes. L'objet *CCell* possède donc des variables *m_dSPhaseLength* et *m_dG2MPhaseLength* qui permettent de gérer ces durées pour chacune des cellules.

3. Déroulement des simulations : gestion du temps et émulation du parallélisme

L'architecture du modèle détaillée précédemment, permet de lancer des simulations dynamiques de la croissance de la population. Ces simulations sont fondées sur un processus discret au cours duquel, à la fois, le modèle de contrôle de prolifération, et la construction dynamique du graphe de Voronoï, sont remis à jour suivant un algorithme pseudo-parallèle (**Fig. 83**). La population est tout d'abord initialisée à un temps t_0 dont l'incrément donne lieu aux simulations. Tout comme dans le cas du modèle moléculaire fonctionnant pour une cellule seule, l'intervalle de temps (δt) doit être très petit par rapport aux valeurs des paramètres du modèle pour éviter que les concentrations ne deviennent négatives, ce qui induirait une possibilité de non-continuité (du comportement) du modèle. Ceci implique que le graphe de Voronoï soit reconstruit à chaque pas de simulation, ce qui reste d'un coût de calcul raisonnable étant donné l'efficacité de l'algorithme de calcul du graphe de Voronoï. Par contre l'affichage du graphe est très coûteux en temps et sa fréquence est donc fixée de préférence au minimum utile (e.g. 1/10000 pas de simulation). L'affichage peut correspondre ou non à l'écriture de l'image affichée dans un fichier suivant la configuration du programme de simulation.

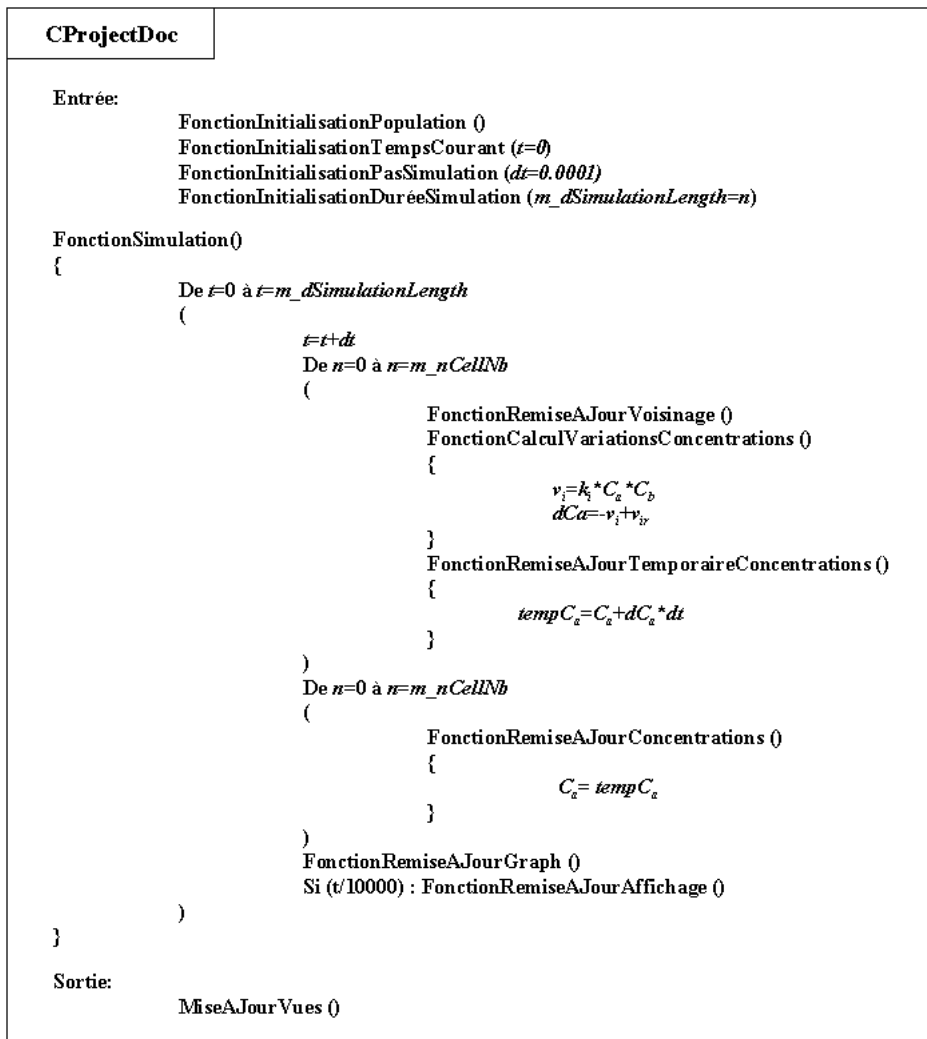


Fig. 83. Algorithme du programme de simulation. La nomenclature est identique à celle de Fig. 74.

A chaque pas de simulation, chaque cellule de la population effectue, dans l'ordre, les actions suivantes (Fig. 83) :

- Mise à jour de la base de connaissance du voisinage ;
- Calcul des concentrations des protéines pour le pas de calcul suivant ;
- Mise en mémoire des données dans un objet temporaire.

C'est seulement après que les concentrations ont été calculées pour toutes les cellules qu'elles sont mises à jour cellule après cellule pour toute la population. C'est la façon la plus simple de manier à la fois le voisinage des cellules et leurs propriétés internes en restant synchrone.

Ensuite le graphe est remis à jour en tenant compte des cellules à rajouter à la population et de celles à effacer de la population. Ces événements sont respectivement dus aux éventuelles divisions des cellules en mitose au pas précédent (la variable $m_bPresence$ a pris la valeur 0 au cours de sa division, indiquant à la fonction de remise à jour qu'elle doit être effacée) et aux cellules différenciées qui disparaissent de la population par « desquamation ».

III. Modélisation des échanges biochimiques entre les cellules ou entre la cellule et la membrane basale

L'état de l'art a mis en évidence que les cellules possèdent une sensibilité à leur environnement par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires (e.g. récepteurs à des facteurs mitogéniques, intégrines, etc.). De plus, cette communication est réciproque puisque les cellules informent leur environnement en utilisant à la fois des molécules membranaires (e.g. intégrines, cadhérines, Notch, etc.) ou sécrétées (e. g. facteurs mitogéniques, de différenciation, etc.). Chaque cellule ne produit pas toutes ces molécules au même moment, leur expression suit une topologie spatiale et temporelle particulière. Par exemple, seules les cellules basales proliférantes expriment des intégrines $\alpha\beta4$ dont le ligand est la laminine 5 présente dans la membrane basale : il s'agit de communication à court terme. De plus, ces cellules basales sont les seules à exprimer des EGFR, alors que seules les cellules supra-basales ont la capacité d'exprimer des EGF. Ce type d'interaction nécessite que le modèle permette la diffusion des facteurs EGF : il s'agit d'échanges à long terme. Ainsi, le modèle doit intégrer à la fois les échanges à court terme (cellule à cellule) et les échanges à long terme (gradients).

Le modèle ne prend pas en compte la polarité des cellules (les cellules ne possèdent pas de haut ni de bas) à l'exception de leur contact avec la MB. Par contre, le modèle utilise les dimensions du graphe de Voronoï (longueurs des arêtes) pour quantifier les échanges entre les cellules.

1. Echanges à court terme

Dans le modèle, les échanges à court terme sont considérés comme étant les échanges cellule / cellule ou cellule / membrane basale (MB) lorsque les molécules impliquées dans l'échange ne sont pas diffusibles dans l'espace intercellulaire. L'interaction des intégrines $\alpha\beta4$ des cellules de la couche basale avec la laminine 5 de la membrane basale est un bon exemple d'échange à court terme (Fig. 84).

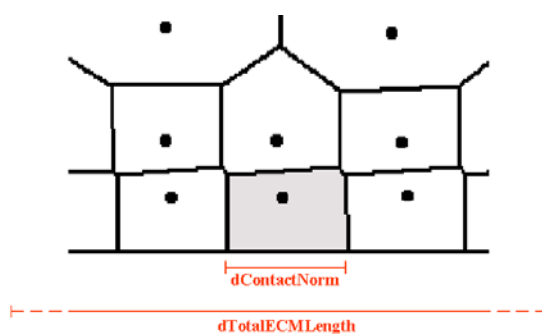


Fig. 84. Echanges locaux entre deux cellules. Une des deux cellules produit une protéine qui est utilisée par sa voisine comme un ligand d'une de ses propres protéines membranaires. Le complexe ainsi formé sera alors pris en compte par le modèle enzymatique de la cellule lors du pas de simulation suivant.

Voici l'équation permettant de calculer la variation v de la quantité du complexe *Integrin β 4* *Laminin* :

Si k est la constante d'association du complexe *Integrin β 4* *Laminin*, $dContactNorm$ est la longueur de l'arête d'une cellule basale en contact avec la MB, $dTotalContactLength$ est le contact total de la cellule avec la MB (au cas non représenté ou la cellule posséderait plusieurs contact avec la MB) et $dTotalECMLength$ la longueur totale de la MB dans le modèle (Fig 84) :

$$v = k \times \frac{ECMLaminin \times dContactNorm}{dTotalECMLength} \times \frac{Integrin \times dContactNorm}{dTotalContactLength} \quad (\text{Eq. 10})$$

L'éventualité que la cellule possède plusieurs contact avec la MB correspond au cas où celle-ci serait représentée non plus comme un segment mais comme un polygone, ce qui est possible si le cadre de simulation est un tore (cf. partie consacrée au cadre de simulation).

2. Signalisation à distance et gradients

Même si notre modèle n'intègre pas explicitement une description de la dynamique et de la fluidité extracellulaire, il permet de modéliser la signalisation à long terme dans le tissu. Ici, les échanges à long terme ne sont en fait qu'une extension des échanges à court terme. Les molécules synthétisées par une cellule et exportées dans l'espace intercellulaire sont partagées par celle-ci avec ses voisines. Cet échange n'est pas directionnel mais les cellules peuvent ainsi utiliser les molécules qui sont à leur portée si elles possèdent les molécules capables de lier celles-ci. Un facteur de diffusion est associé à chacune des molécules diffusibles du modèle.

Voici les équations permettant de calculer la variation de quantité du complexe EGF_EGFR :

Si k est la constante d'association du complexe EGF_EGFR , $dContactNorm$ est la longueur de l'arête entre la cellule b exprimant des facteurs EGF et la cellule a exprimant des récepteurs EGFR, $dTotalContactLength_b$ est la norme du contact total de la cellule b avec son environnement et $dTotalContactLength_a$ est la norme du contact total de la cellule a avec son environnement (y compris la MB) (Fig 85).

La vitesse de formation v_f du complexe EGF_EGFR est :

$$v_f = k_f \times \frac{EGF_b \times dContactNorm}{dTotalContactLength_b} \times \frac{EGF_a \times EGFR_a \times dContactNorm}{dTotalContactLength_a} \quad (\text{Eq. 11})$$

La vitesse de diffusion v_d de EGF entre les deux cellules a et b est :

$$v_d = k_d \times \frac{\frac{EGF_b \times dContactNorm}{dTotalContactLength_b} - v_f \times \delta t}{2} \quad (\text{Eq. 12})$$

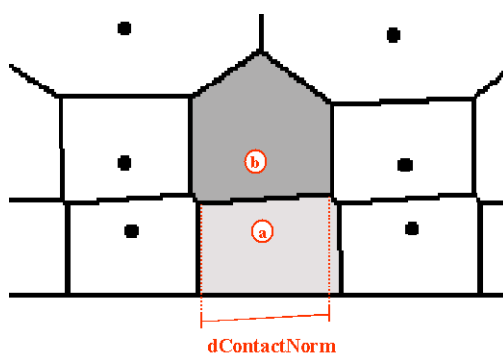


Fig. 85. Modélisation des échanges au long terme.

IV. Modélisation des relations physiques entre les cellules

1. Mobilité cellulaire, lien avec les échanges biochimiques

La mobilité cellulaire a principalement été étudiée *in vitro* avec le modèle de cicatrisation de blessures artificielles. Une fois de plus, la dynamique de la mobilité cellulaire dans un tissu est mal connue. Principalement, une cellule est attachée à ses cellules voisines (différents types d'adhérence, ...), à la matrice

extracellulaire (MEC) et à la membrane basale, ces deux derniers étant partiellement produit par les cellules elles-mêmes. Ces liens assurent la cohésion du tissu et, bien sûr, parce qu'ils sont la somme de processus dynamiques, produisent des mouvements. A l'opposé, le cytosquelette assure la souplesse de la cellule et sa résistance au déchirement et à la compression. Ingber (**Wand et al. 93**) a défini cette propriété par le terme de tensegrité.

Cette propriété est introduite dans le modèle à l'aide de deux vecteurs de mobilité appliqués à chacun des germes du graphe. Le premier vecteur résulte de l'interaction des protéines d'adhérence sur chacun des bords des polygones (**Fig. 86a**). Le second vecteur est la réaction cellulaire à la compression et il est inversement proportionnel à la surface des polygones (**Fig. 86b**).

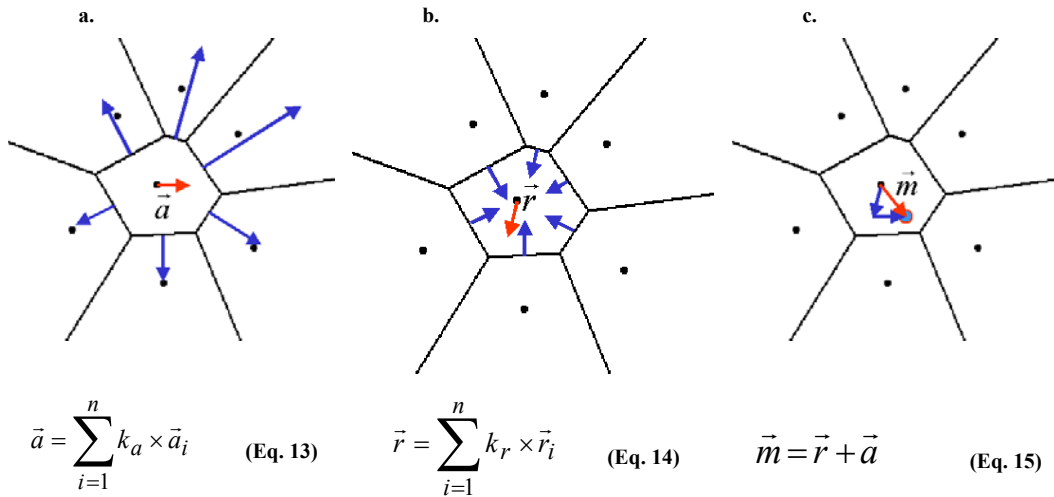


Fig. 86. Bases géométriques du modèle de la mobilité cellulaire : le mouvement du germe du polygone de Voronoï associé à la cellule est donné par un vecteur (\vec{m}) qui est la somme des vecteurs d'adhésion (\vec{a}) et de répulsion (\vec{r}) dont la norme est calculée à partir des propriétés biochimiques de la cellule.

2. Calcul de l'adhérence cellulaire

A l'instar des échanges biochimiques à court terme, l'adhérence cellulaire est déduite des propriétés moléculaires de la cellule par un calcul de l'interaction des protéines membranaires avec :

- Des protéines membranaires des cellules voisines (cas des cadhérines des cellules supra-basales) ;
- Des protéines membranaires avec leur ligand produit par les cellules voisines ou présentes dans la membrane basale (cas respectivement des intégrines $\beta 1$ ou $\alpha 6\beta 4$).

Ici, l'adhérence est un vecteur appliqué au germe associé à la cellule qui est la somme des vecteurs obtenus pour chacune des arêtes du polygone associé à une cellule (**Fig. 86a**). Chaque vecteur est perpendiculaire à l'arête à laquelle il est associé et sa norme est calculée comme suit :

Dans le cas des cadhérines :

Avec $\|\vec{N}\|$ la norme du vecteur, $Cell_a Cadherin$ et $Cell_b Cadherin$ respectivement les quantités de cadhérines de chacune des cellules a et b impliquées dans l'interaction, k la constante d'association du complexe Cadherin_Cadherin et $Kadh_{Cad}$ la constante d'adhésivité du complexe Cadherin_Cadherin :

$$\|\vec{N}\| = Kadh_{Cad} \times k \times Cell_a Cadherin \times Cell_b Cadherin \times \delta t \quad (\text{Eq. 16})$$

Dans le cas des intégrines $\alpha6\beta4$:

Avec $\|\vec{N}\|$ la norme du vecteur, k la constante d'association du complexe Integrin $\beta4$ _Laminin et $Kadh_{\beta4}$ la constante d'adhésivité du complexe Integrin $\beta4$ _Laminin :

$$\|\vec{N}\| = Kadh_{\beta4} \times k \times CellIntegrin\beta4 \times ECMLaminin \times \delta t \quad (\text{Eq. 17})$$

2. Calcul de la répulsion cellulaire

La répulsion cellulaire correspond à un processus cellulaire connu : la résistance à la compression (**Ingber 93**). En dehors de toute considération biologique, il est très important que le modèle intègre une notion de résistance à la compression sans laquelle la population, dont les cellules sont sujettes à des forces d'adhérence d'intensité variables, s'écraserait sur elle-même. Cette force est appliquée au germe si et seulement si la distance minimum entre les germes impliqués est minimum à un seuil déterminé lors de la configuration des simulations. La justification biologique de ce seuil est la nécessité pour la cellule de posséder un volume suffisant à un fonctionnement normal.

Ici, la résistance à la compression est un vecteur appliqué au germe associé à la cellule qui est la somme des vecteurs obtenus pour chacune des arêtes du polygone associé à une cellule (**Fig. 86b**). Chaque vecteur est perpendiculaire à l'arête à laquelle il est associé et sa norme est calculée comme suit :

Avec $\|\vec{N}\|$ la norme du vecteur, k la constante de répulsion cellulaire, d la distance du germe à l'arête considérée, $dContactNorm$ la longueur de l'arête considérée et $dTotalContactLength$ la longueur totale des contacts de la cellule avec son voisinage :

$$\|\vec{N}\| = \frac{k}{d^2} \times \frac{dContactNorm}{dTotalContactLength} \times \delta t \quad (\text{Eq. 18})$$

Ainsi la répulsion entre cellules voisines est proportionnelle à la taille de leur contact.

V. Cadre des simulations et gestion des effets de bord

1. Cadre des simulations

La **Fig. 87** illustre le rendu d'une structure par le graphe de Voronoï. Les simulations prennent place dans un cadre rectangulaire où le bord inférieur est la membrane basale.

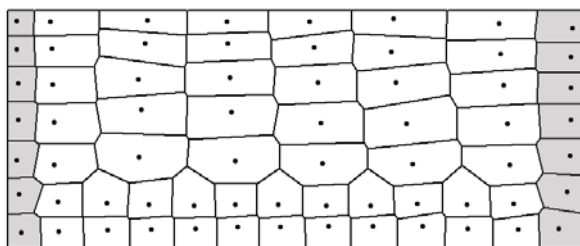


Fig. 87. Cadre des simulations en coupe transversale. Les cellules sujettes aux effets de bord sont distinguées des autres par une coloration grise.

Lorsque l'on veut étudier uniquement les interactions des cellules de la couche basale, une autre façon de voir ce tissu en 2D est de le visualiser à l'aide d'une coupe frontale. Dans ce second cas, le graphe de Voronoï permet aussi une représentation satisfaisante (**Fig. 88**).

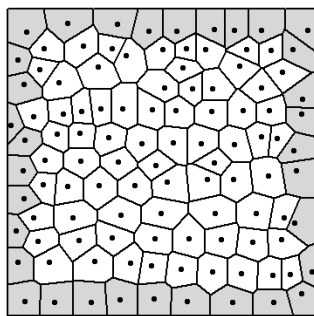


Fig. 88. Cadre des simulations en coupe frontale. Les cellules susceptibles de subir des effets de bord sont colorées en gris.

2. Bords absorbants

Une technique commune de gestion des bords, notamment utilisée dans le jeu de la vie, est la création de bords absorbants. Les bords de la simulation ne sont pas considérés comme des barrières physiques mais simplement comme les bords d'une fenêtre ouverte sur une partie de la population. Appliqués à notre modèle, ils introduiraient des effets indésirables tels que la disparition des cellules ou des gradients de protéines au-delà des bords de la population. Ceci ne nous convient pas car nous voulons que le contact des cellules avec le bord de la population soit défini avec précision.

3. Bords réfléchissants

Dans le but de diminuer l'influence des bords sur la population, un effet miroir a été introduit. L'idée des bordures miroir est que les cellules partageant un contact avec le cadre de la simulation perçoivent ce contact comme celui avec une cellule possédant exactement leurs caractéristiques (excepté leur coordonnées). Ces cellules possèdent toutes les caractéristiques des cellules n'ayant aucun contact avec le bord. Cependant, elles sont dépourvues de mobilité liée à l'adhésivité.

4. Cas particulier de la membrane basale

La membrane basale est un cas particulier dans le modèle car c'est la seule bordure du cadre de simulation qui a une signification biologique. Elle est maniée comme un objet par le programme de simulation et les cellules de la couche basale peuvent interagir avec elle. Jusqu'à maintenant, cet objet a seulement une propriété biochimique, une concentration en laminin 5, le ligand des intégrines. Cela permet aux cellules de s'attacher à la membrane basale.

VI. Interface

Une interface graphique a été développée pour permettre une configuration et une visualisation aisée des simulations. Elle permet notamment d'initialiser des simulations d'après des fichiers de configurations contenant les paramètres de populations prédéfinies. Les simulations peuvent être lancées pour des durées variables et les images obtenues sont stockées sur le disque dur dans un répertoire dédié aux formats *bitmap* ou *jpeg*, suivant les préférences de l'utilisateur. Ces images sont ensuite utilisées pour construire des films des simulations.

La population est représentée par un graphe de Voronoï où la couleur des polygones peut-être associée à des caractéristiques moléculaires des cellules ou bien à la visualisation des états des cellules, une couleur peut par exemple être associée aux cellules souches, une autre aux cellules en transit, etc. (**Fig. 89**).

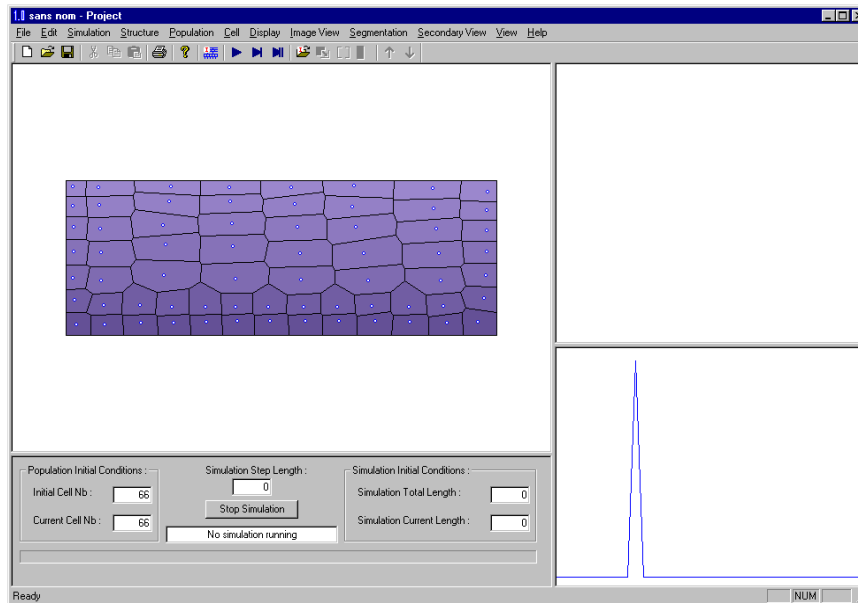


Fig. 89. Interface du programme de simulation. Les simulations se déroulent dans la fenêtre principale. La fenêtre de status des simulations permet de disposer des paramètres de la simulations (nombre de cellules, état d'avancement de la simulation). Les deux autres fenêtres permettent d'afficher, au choix, des courbes représentant l'évolution dans le temps des valeurs de paramètres sélectionnés avant le lancement de la simulation (ici, la quantité d'ADN moyenne).

L'interface permet aussi d'afficher les propriétés des cellules dans une boîte de dialogue (**Fig. 90**). En utilisant cette boîte de dialogue, il est aussi possible de modifier les valeurs des paramètres de la cellule sélectionnée. Durant les simulations, il est possible d'observer les variations des quantités de protéines pour chaque cellule de façon quantitative. Une table de correspondance est construite qui permet de lier une couleur à une concentration (**Fig. 91**). Par convention, le bleu représente la concentration la plus faible et le rouge la plus forte. Une variante de l'interface a été développée pour permettre d'initialiser la population grâce à des images histologiques (**Fig. 92**). Elle n'a cependant pas été utilisée pour l'instant.

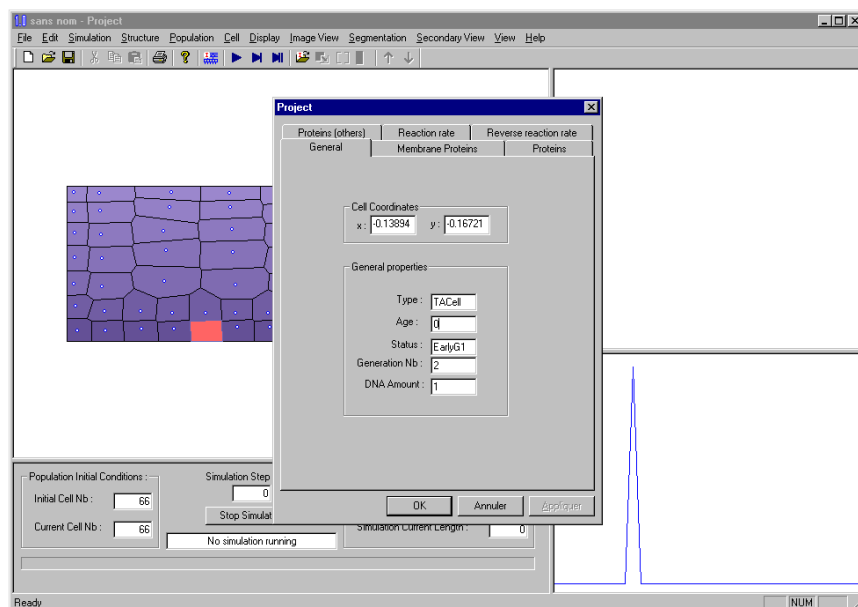


Fig. 90. Carte d'identité des cellules. Cette carte permet de modifier les propriétés des cellules, même en cours de simulation. Les propriétés de la cellule sont accessibles par les index de la boîte de dialogue.



Fig. 91. Table de correspondance donnant la quantité relative des protéines du réseau de contrôle de la prolifération des cellules. La quantité minimum est représentée par le bleu et la quantité maximum est représentée par le rouge.

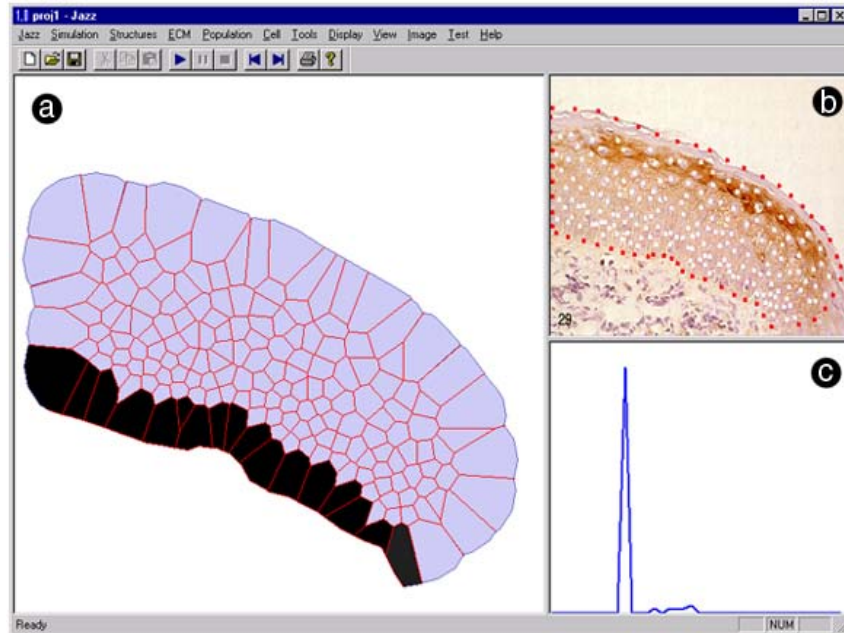


Fig. 92. Variante de l'interface. Cette variante permet d'initialiser l'architecture du tissu à partir d'images histologiques obtenues par microscopie à transmission. La position des cellules peut-être sélectionnée directement en cliquant sur l'image qui se trouve dans la fenêtre de droite et les germes sont ajoutés à la population se trouvant dans la fenêtre principale. Les caractéristiques de chacune des cellules peuvent être définies par l'intermédiaire de boîtes de dialogue similaires à celles décrites précédemment (Fig. 90).

RESULTATS

Partie 1 : Modèle de réseau de contrôle

Le modèle de réseau de contrôle de la prolifération est tout d'abord étudié par blocs qui sont ensuite associés. Le comportement dynamique de l'ensemble du réseau est associé à des comportements cinétiques caractéristiques des cellules souches et des cellules en transit des épithélia stratifiés.

I. Etude des comportements dynamiques du réseau

1. Forme simple (cellule isolée)

a. Complexe *cycD_Cdk4*

Réactions

L'étude du comportement dynamique du réseau de régulation a débuté par l'étude de la formation du complexe *CycD_Cdk4* et son activation par le complexe *CAK* (Fig. 93). Ce groupe de quatre réactions est un exemple type d'une réaction enzymatique simple : la réaction de formation du complexe *iCycD_Cdk4* est réversible. Une fois ce complexe formé il est activé par le complexe *aCAK*. Cette activation comprend deux étapes, tout d'abord l'association réversible de *iCycD_Cdk4_aCAK* puis la réaction elle-même, irréversible, résultant en la libération du complexe activé *aCycD_Cdk4* et du complexe *iCAK* inactif. Au niveau du modèle, la réversibilité d'une réaction est donnée par la valeur d'un paramètre (e.g. k_{5r} pour la réaction $CycD + Cdk4 \leftrightarrow iCycD_Cdk4$).

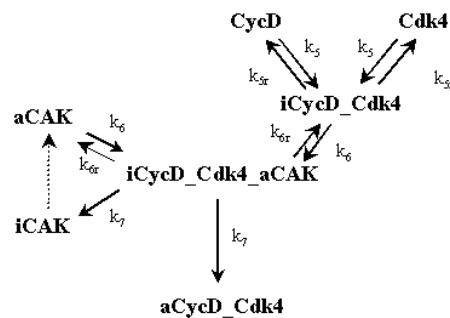


Fig. 93. Réactions impliquées dans la formation du complexe *CycD_Cdk4*.

Comportements cinétiques¹

Lorsque les deux molécules *CycD* et *Cdk4* sont présentes, le complexe *iCycD_Cdk4* se forme avec le ratio k_5 jusqu'à ce qu'au moins une des molécules soit épuisée. Si *Cdk4* est en excès et que la réversibilité de la réaction

¹ Toutes les durées sont ici exprimées en unité arbitraire (u.a.). Les résultats ne sont donc pas comparables directement à des valeurs cinétiques expérimentales, il s'agit uniquement d'une indication, particulièrement utile pour comparer les comportements dynamiques des cellules lors des simulations.

de formation du complexe est égale à zéro ($k5r=0$) alors un état d'équilibre est atteint lors duquel $iCycD_Cdk4$ est égale à la quantité initiale de $CycD$ (Fig. 94a).

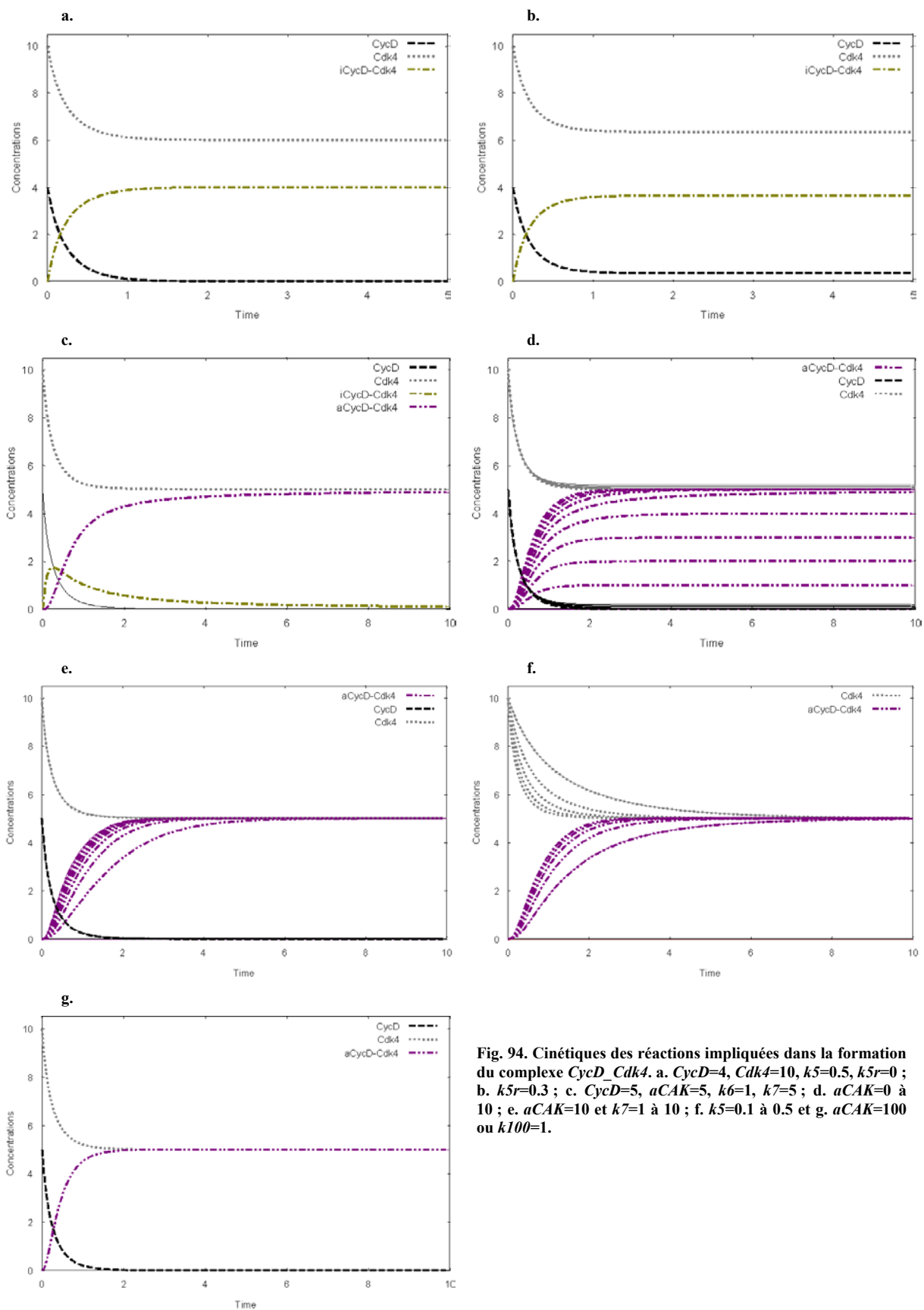


Fig. 94. Cinétiques des réactions impliquées dans la formation du complexe $CycD_Cdk4$. a. $CycD=4, Cdk4=10, k5=0.5, k5r=0$; b. $k5r=0.3$; c. $CycD=5, aCAK=5, k6=1, k7=5$; d. $aCAK=0$ à 10; e. $aCAK=10$ et $k7=1$ à 10; f. $k5=0.1$ à 0.5 et g. $aCAK=100$ ou $k100=1$.

Si *Cdk4* est en excès et que la réversibilité de la réaction de formation du complexe n'est pas nulle, l'état d'équilibre atteint par *iCycD_Cdk4* ne correspond plus qu'à une fraction de *CycD* initial (**Fig. 94b**).

Lorsque *aCAK* est activé et en excès, le complexe *iCycD_Cdk4* est activé en *aCycD_Cdk4* dont la quantité atteint un plateau dont la valeur dépend du composant le moins présent, e.g. *CycD* (**Fig. 94c**). La diminution de la concentration de *aCAK* entraîne principalement une diminution de la valeur du plateau atteint par le produit de la réaction, *aCycD_Cdk4* (**Fig. 94d**) alors que l'augmentation du ratio de la réaction principale irréversible - libération de *aCycD_Cdk4* et *iCAK* - entraîne bien une augmentation de la vitesse de la réaction mais n'a aucune incidence sur la valeur du plateau atteint (**Fig. 94e**). La vitesse de formation plus faible entraîne une plus grande disponibilité de *CycD* et *Cdk4* (**Fig. 94f**), ce qui se révèle important lors de l'introduction d'inhibiteurs de formation du complexe *CycD_Cdk4*.

Notons que la présence d'un ratio d'activation de *iCAK* en *aCAK* (k_{100}), suffisamment élevé pour entretenir *aCAK* en excès, « optimise » la réaction d'activation en lui donnant la vitesse la plus importante possible pour les concentrations données (**Fig. 94g**). Lorsque cette réaction est optimisée, c'est alors en modifiant la valeur du ratio de formation du complexe (k_6) que l'on peut jouer sur la vitesse de la réaction.

b. Complexe pRb_E2F

Réactions

L'étape suivante est la formation du complexe *pRb_E2F* et sa phosphorylation par le complexe *CycD_Cdk4*. Le comportement cinétique de ce groupe de réaction ne montre pas de différence par rapport au groupe précédent. En effet, il s'agit du même type de réaction, *pRb*, *E2F* et *aCycD_Cdk4* remplaçant respectivement *CycD*, *Cdk4* et *aCAK*.

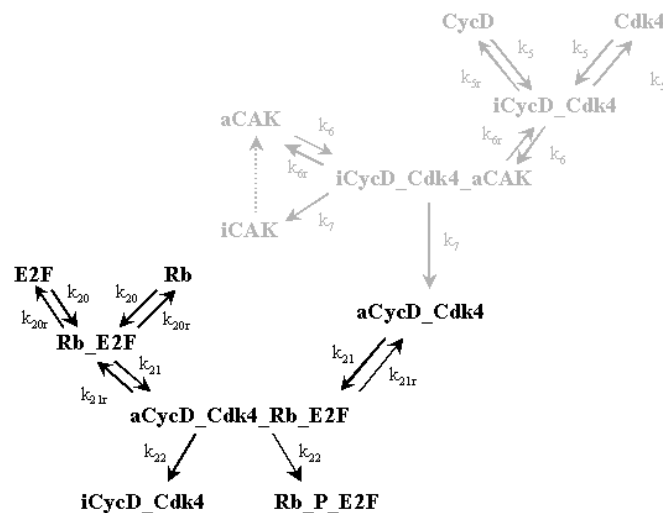


Fig. 95. Réactions impliquées dans la formation du complexe *Rb_E2F*. Phosphorylation de *Rb_E2F* par *CycD_Cdk4*.

Par contre, la combinaison des deux groupes de réactions permet d'obtenir une cascade au nombre de niveau double. Le comportement cinétique de la formation du complexe *Rb_P_E2F* (**Fig. 96**) est donc légèrement différent de celui de *aCycD_Cdk4* (**Fig. 94**).

Comportements cinétiques

Il faut distinguer trois cas, *Rb_E2F* est présent à l'état initial du modèle, *Rb* et *E2F* sont présents sous formes libres, les deux formes sont présentes à la fois.

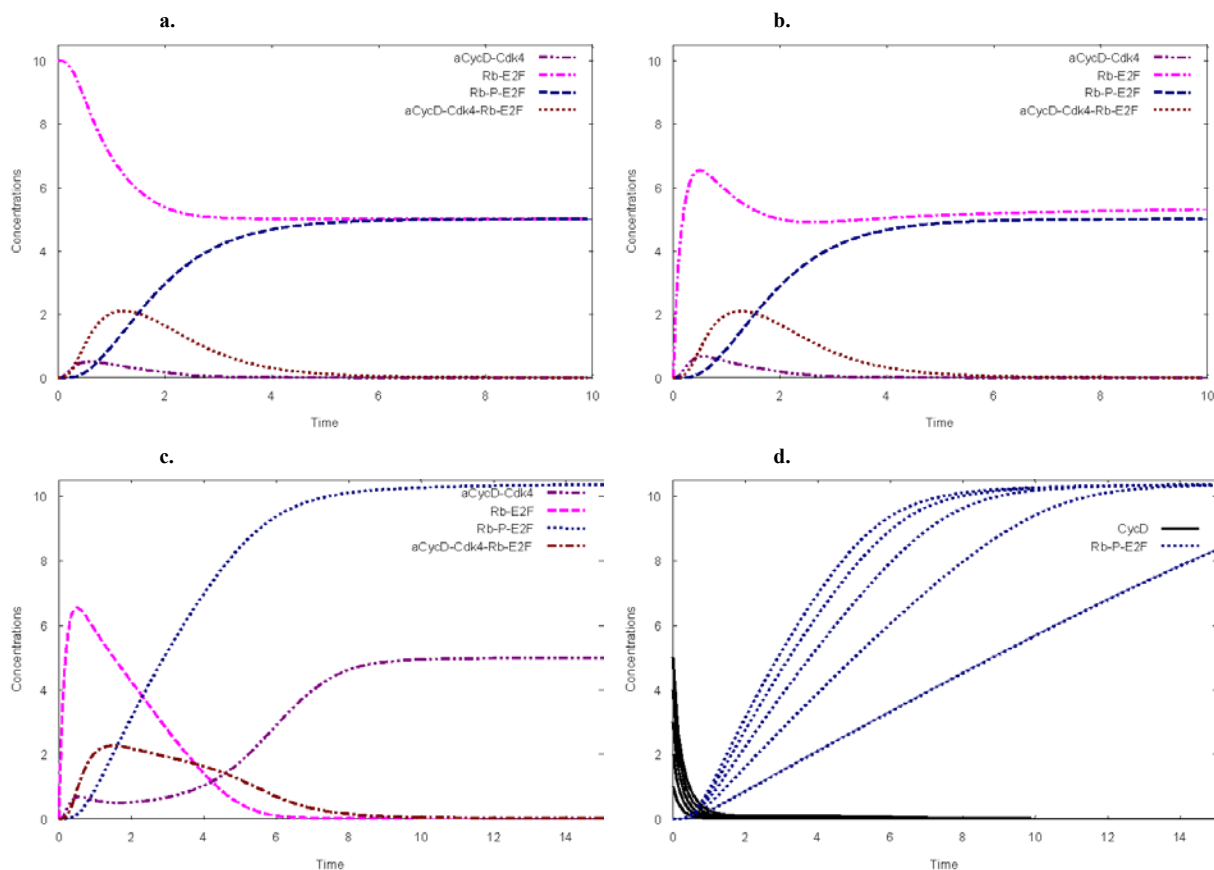


Fig. 96. Cinétiques des réactions impliquées dans la formation du complexe Rb_E2F . a. $Rb=0, E2F=0, Rb_E2F=10$; b. $Rb=10, E2F=10$ et $Rb_E2F=0$; c. $k100=0.5$ et d. $CycD=0$ à 5.

Le fait que Rb et $E2F$ soient sous forme libre (**Fig. 96a**) ou complexée (**Fig. 96b**) n'a pas d'incidence notable sur la cinétique de libération de Rb_P_E2F . La forme de la courbe représentant la variation de Rb_E2F est certes différente au début de la simulation, mais cette forme correspond seulement au temps de la formation de Rb_E2F lorsque seules les formes libres de Rb et $E2F$ sont présentes dans les conditions initiales.

Logiquement, la quantité de Rb_E2F qui est phosphorylée en Rb_P_E2F dépend principalement de l'activité de $aCycD_Cdk4$ présente. Si l'activité de $aCycD_Cdk4$ est suffisante, Rb_E2F est complètement phosphorylé (**Fig. 96c**). Cette quantité est elle-même dépendante à la fois des quantités de $CycD$, de $Cdk4$ et de $aCAK$. On considérera que $aCAK$ est toujours en excès, ce qui semble être le cas en général bien qu'il ne soit pas exclu que l'activité du complexe CAK fournisse un contrôle potentiel sur la phosphorylation du complexe Rb (**Fig. 96c**) et que c'est surtout $CycD$ qui est susceptible d'être l'élément régulateur de cet ensemble de réactions (**Fig. 96d**). De faibles variations de la quantité initiale de $CycD$ entraînent des variations proportionnelles de la vitesse de libérations de Rb_P_E2F .

c. Complexe $CycE_Cdk2$: interaction avec pRb_P_E2F

Réactions

L'étape suivante est la formation du complexe $CycE_Cdk2$ et l'hyperphosphorylation de pRb_P_E2F (**Fig. 97**). Les cinétiques de la formation du complexe $iCycE_Cdk2$ et de son activation en $aCycE_Cdk2$ possède des caractéristiques identiques au cas de $iCycD_Cdk4$ et $aCycD_Cdk4$ et ne sont donc pas détaillées ici.

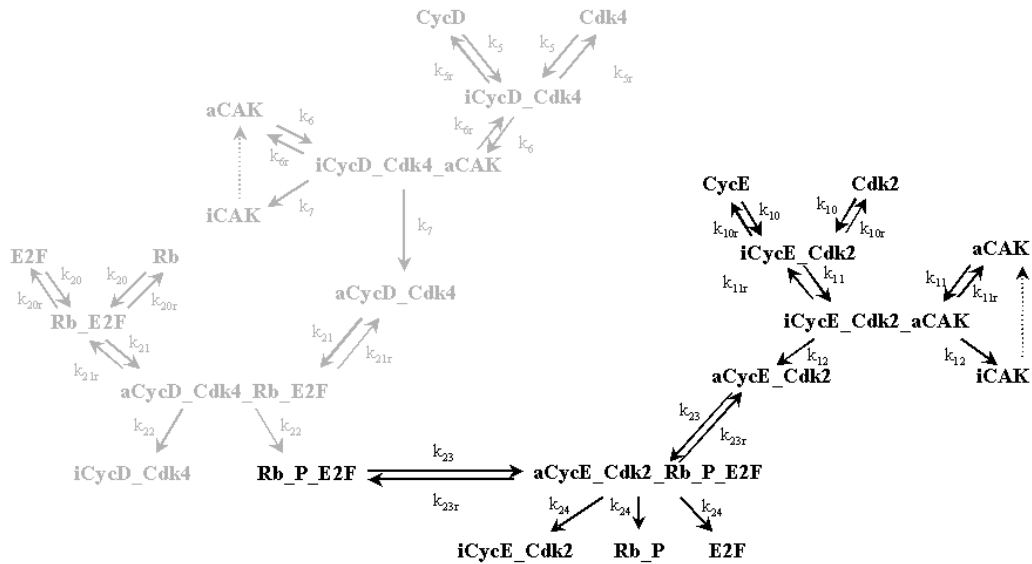


Fig. 97. Réactions impliquées dans la formation du complexe *CycE_Cdk2* et dans l'hyperphosphorylation de *pRb*.

Comportements cinétiques

Le cas le plus simple consiste à donner à *CycE*, *Cdk2*, *iCycE_Cdk2* et *aCycE_Cdk2* les mêmes propriétés qu'à *CycD*, *Cdk4*, *iCycD_Cdk4* et *aCycD_Cdk4* (Fig. 98a). *Rb_P* et *E2F* sont bien libérés un peu après *Rb_P_E2F*. Ce délai correspond au temps de formation de *Rb_P_E2F*.

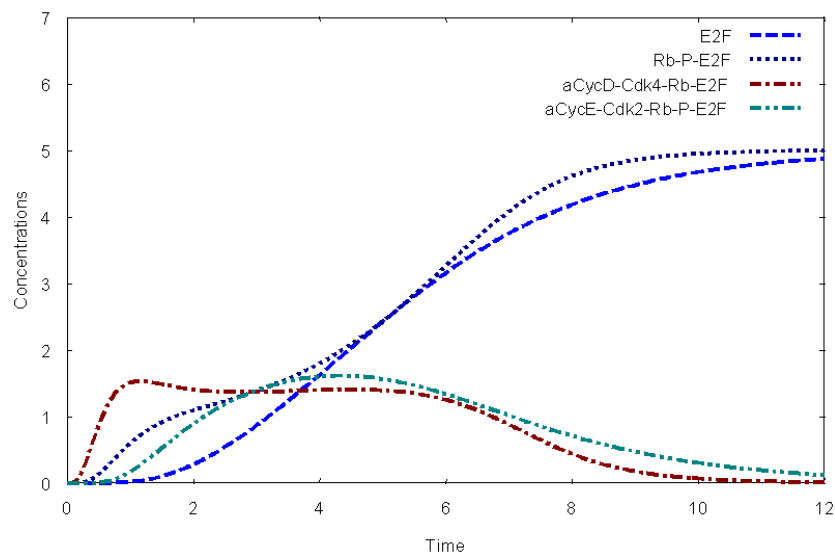


Fig. 98. Cinétiques des réactions impliquées dans la formation du complexe *CycE_Cdk2* et dans l'hyperphosphorylation de *pRb*. $CycE=5$, $Cdk2=10$, $k_{10}=0.5$, $k_{10r}=0.1$, $k_{11}=1$, $k_{11r}=0.1$, $k_{12}=5$, $k_{23}=0.1$.

Ce comportement simple n'est pas suffisant pour correspondre à un état biologique particulier. Il correspond à un ensemble de deux cascades d'activations à plusieurs niveaux se recoupant sur l'hyperphosphorylation de *Rb_E2F*. De plus, *CycE* n'est pas présente au début du cycle cellulaire. Le modèle tel qu'il est présenté ici (Fig. 97) ne suffit pas à modéliser cette variation de l'expression de *CycE*. L'étape de développement suivante du modèle consiste donc à intégrer le contrôle de la formation de *CycE* par *E2F*.

d. Boucles de contrôles positives : *E2F* et *CycE*

Réactions

La libération de *E2F* est susceptible d'entraîner l'expression de gènes dont les protéines sont des éléments de contrôle de la prolifération. Dans le modèle, ce type de contrôle implique *E2F* lui-même ainsi que *CycE*.

En théorie, il est possible d'associer n'importe quelle valeur à une protéine ou au ratio d'une réaction (entre 0 et $+\infty$). Les unités sont arbitraires et seules les proportions des protéines entre elles sont importantes. Dans le cas des promoteurs, il nous a semblé logique de ne pouvoir définir ceux-ci que par les valeurs 0, 1 ou 2, i.e. il n'est possible d'avoir que 0, 1 ou 2 promoteurs pour un gène dans une cellule normale.

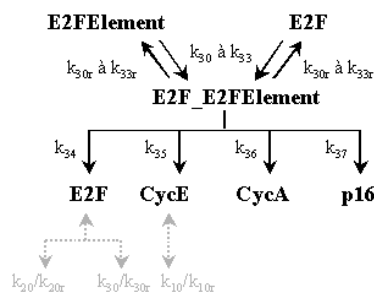


Fig. 99. Réactions impliquées dans le contrôle de l'expression de *E2F* et *CycE*²¹.

Il est nécessaire de distinguer l'effet du contrôle de l'expression de *CycE* de l'éventuelle auto amplification de *E2F*.

Comportements cinétiques lors du contrôle de l'expression de *CycE*

Les variations du ratio de libération de *CycE* (k_{35}) permettent d'obtenir une grande dynamique de la cinétique de libération de *E2F* (**Fig. 100a, b et c**). Cette dynamique est la plus forte pour de faibles valeurs de k_{35} , lorsque k_{35} varie de 0 à 10 (**Fig. 100d**). Des valeurs plus importantes de ce paramètre entraînent un effet proportionnellement moins important car *CycE* se retrouve alors en excès.

²¹ Par soucis de concision le reste du modèle n'est pas présenté. Il correspond à ce qui est montré en **Fig. 97**. Les figures suivantes reprennent ce principe.

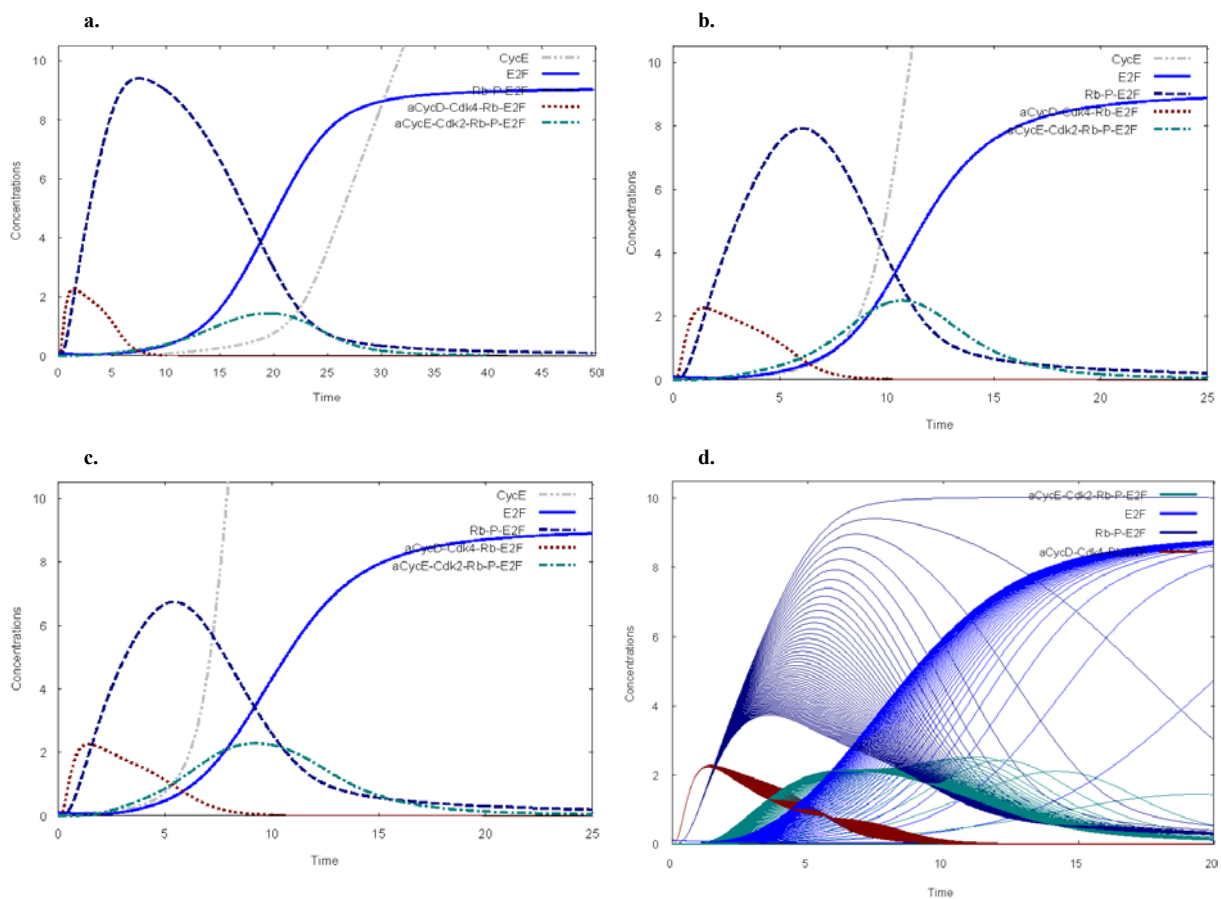


Fig. 100. Cinétiques des réactions induites par l'expression *E2F* dépendante de *CycE*. a. $CycE=0$, $CycEPromotor=1$, $k31=0.5$, $k31r=0.1$ et $k35=1$; b. $k35=5$; c. $k35=10$ et d. $k35=0$ à 50.

Le modèle ne peut donc pas fonctionner sans une toute petite quantité de *E2F* initiale, ce qui pourrait être le cas dans la cellule où la présence de complexes *Rb_E2F* entraîne certainement la présence de *E2F* libre.

Comportements cinétiques lors du contrôle de l'expression de *E2F*

L'autoamplification des gènes de la famille *E2F*, due à la présence de sites de liaison *E2F* dans leur région promotrice, permet certainement d'accroître rapidement le potentiel transcriptionnel des facteurs *E2F*. Dans le modèle, la plupart des réactions sont stœchiométriques. Comme dans le modèle de Kohn (**Kohn 99**), la relation entre *E2F* et ses promoteurs déroge à cette règle dans notre modèle. Dans le cas où plusieurs promoteurs *E2F* sont présents, il est possible que la quantité initiale de *E2F* ne soit pas suffisante pour induire l'expression de plusieurs protéines par association à leurs éléments promoteurs, la boucle *E2F* peut alors se montrer très utile pour ne pas être dépendant d'un comportement qui reste un artefact du modèle. Il s'agit d'une astuce de modélisation (conservation d'une valeur de *E2F* libre constante et le contrôle d'un nombre variable de gène) qui possède une signification biologique.

Le modèle comportait aussi la possibilité de la destruction de *E2F* par le système ubiquitine dépendant. Cependant, le modèle se limitant à la transition G_1/S , cette possibilité ne s'est pas révélée très intéressante et n'a finalement pas été exploitée.

e. Complexe CycE_Cdk2 : interaction avec p27

Réactions

L'étape suivante est la modélisation de la relation duale entre le complexe *CycE_Cdk2* qui est inhibé par *p27* tout en contrôlant l'activité de cet inhibiteur en le phosphorylant. Cette phosphorylation entraîne la destruction de *p27* par une protéase (**Fig. 101**).

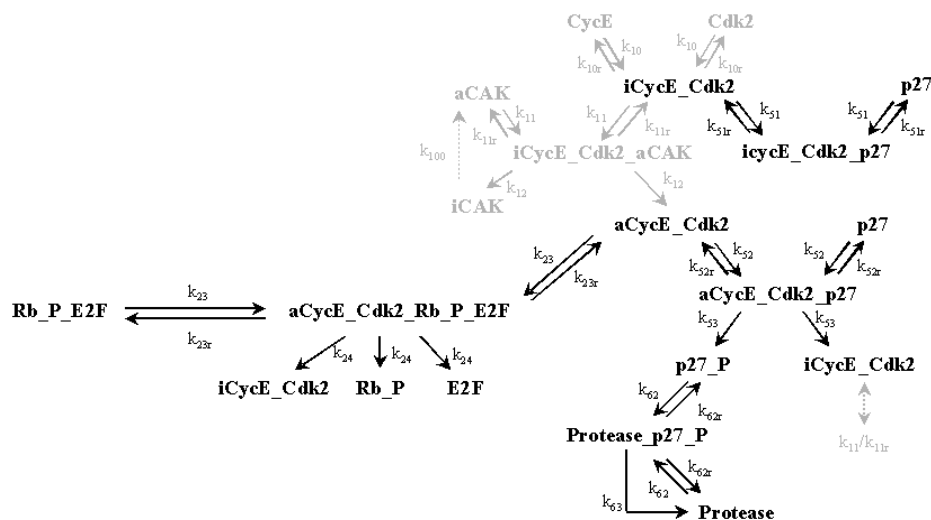


Fig. 101. Réactions impliquées dans la relation duale entre *CycE_Cdk2* et *p27*.

Comportements cinétiques

p27 est tout d'abord considéré comme un inhibiteur « absolu » de *iCycE_Cdk2*. La réaction de formation de *iCycE_Cdk2_p27* est alors irréversible (**Fig. 102b**). L'hyperphosphorylation de *Rb_E2F* s'interrompt dès que l'inhibiteur empêche complètement l'activation de *iCycE_Cdk2*. La référence est donnée dans la **Fig. 102a** où la valeur initiale de *p27* est 0.

Si la réaction de formation de *iCycE_Cdk2_p27* est réversible, E2F est entièrement libéré, bien que beaucoup plus lentement qu'en l'absence de *p27* (**Fig. 102c**). Il est intéressant de noter que l'inhibition due à *p27* n'est sensible qu'après un temps dépendant non pas de *p27* mais de la quantité de *E2F* libre présent au début de la simulation pour lancer l'amplification de *CycE*. Ceci est dû à l'activation de *iCycE_Cdk2* par *aCAK* qui est toujours en excès et qui prend l'avantage sur l'action de *p27*. *iCycE_Cdk2* est transformé en *iCycE_Cdk2* et *p27* n'a donc plus de substrat.

La seconde partie de la relation entre *p27* et *CycE_Cdk2* concerne la phosphorylation de *p27* par *aCycE_Cdk2*. La phosphorylation de *p27* par *aCycE_Cdk2* retarde la réaction (**Fig. 102d**) de libération de *E2F*.

En modélisant la double relation lors d'une même simulation, on voit que les deux effets se combinent pour accroître le délai précédent la libération de *E2F* grâce à la relation duale entre *p27* et *CycE_Cdk2* à la fois sous sa forme active et sous sa forme inactive (**Fig. 102e**).

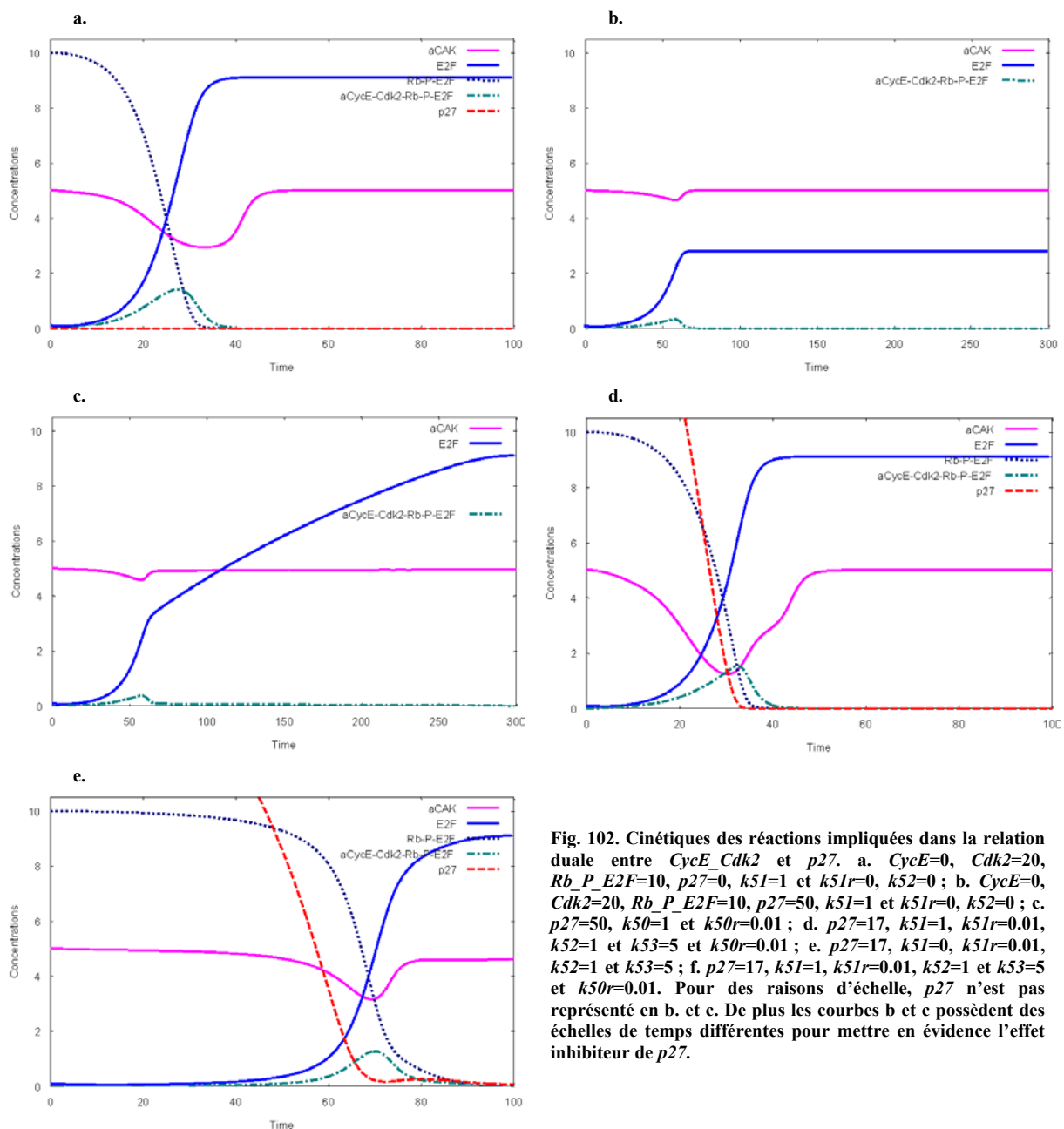


Fig. 102. Cinétiques des réactions impliquées dans la relation duale entre *CycE_Cdk2* et *p27*. a. $CycE=0$, $Cdk2=20$, $Rb_P_E2F=10$, $p27=0$, $k51=1$ et $k51r=0$, $k52=0$; b. $CycE=0$, $Cdk2=20$, $Rb_P_E2F=10$, $p27=50$, $k51=1$ et $k51r=0$, $k52=0$; c. $p27=50$, $k50=1$ et $k50r=0.01$; d. $p27=17$, $k51=1$, $k51r=0.01$, $k52=1$ et $k53=5$ et $k50r=0.01$; e. $p27=17$, $k51=0$, $k51r=0.01$, $k52=1$ et $k53=5$; f. $p27=17$, $k51=1$, $k51r=0.01$, $k52=1$ et $k53=5$ et $k50r=0.01$. Pour des raisons d'échelle, *p27* n'est pas représenté en b. et c. De plus les courbes b et c possèdent des échelles de temps différentes pour mettre en évidence l'effet inhibiteur de *p27*.

La double relation que nous venons de décrire permet de modéliser l'allongement de la phase G_1 liée à la variation de la quantité d'une seule protéine : *p27* (Fig. 103). Les groupes liés à la formation du complexe *Rb_E2F* sont réintégrés dans le modèle et les simulations sont initialisées avec des valeurs de *p27* variant de 0 à 100. Le temps pour atteindre le plateau de libération maximum de *E2F* est alors allongé de façon proportionnelle à la quantité de *p27*.

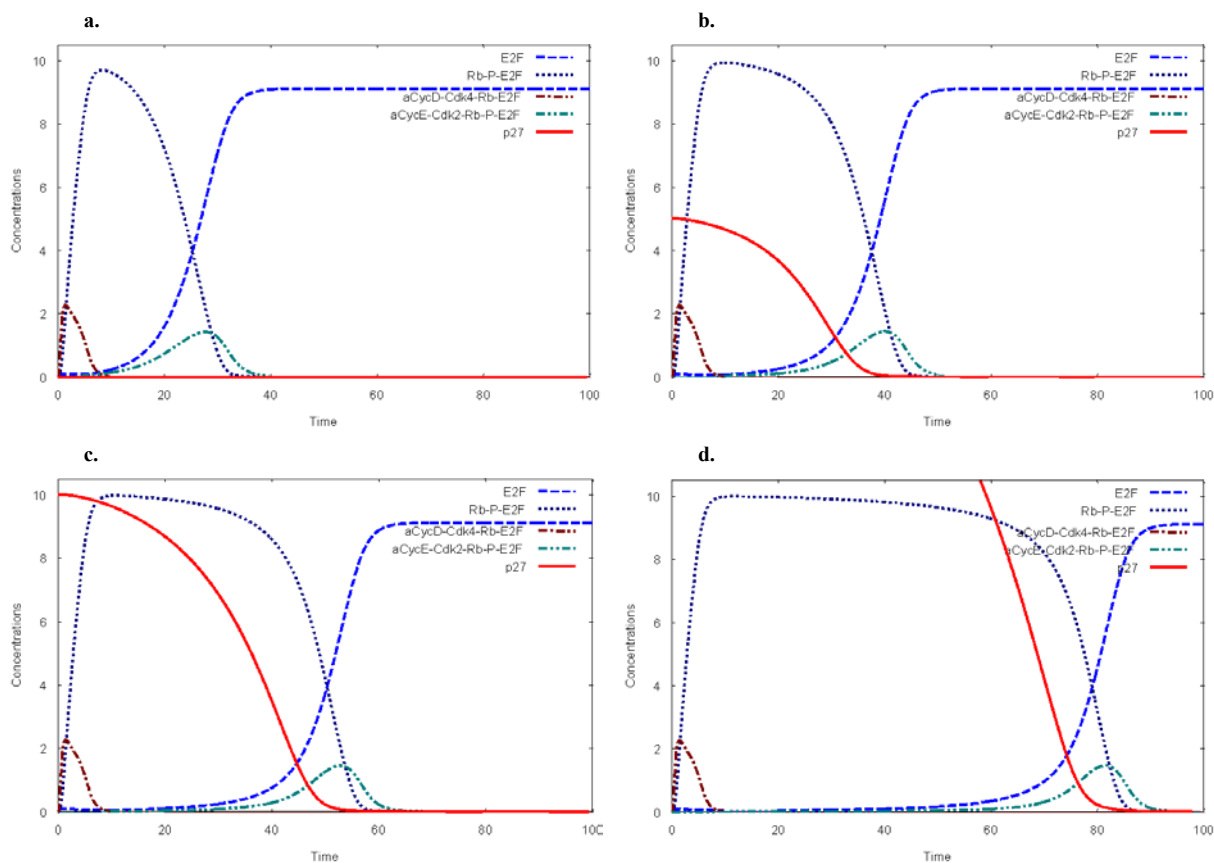


Fig. 103. Cinétiques des réactions impliquées dans la relation duale entre *CycE_Cdk2* et *p27*. a. $p27=0$; b. $p27=5$; c. $p27=10$; d. $p27=25$ et e. $p27=50$.

Le point le plus important de cet ensemble de cinétiques biochimiques est la conservation de la pente de la libération de *E2F* lorsque la quantité de *p27* augmente. Ainsi, malgré la variation de la phase précédant la libération de *E2F*, cette libération est toujours rapide, de type « switch ». Contrairement au modèle de Aguda (Aguda *et al.* 99) notre modèle privilégie des réactions non-idéales réversibles à des réactions idéales irréversibles et il est très intéressant de retrouver ce type de comportement dans un système qui, de par sa prise en compte de la réversibilité de l'association des complexes biochimiques, a plutôt tendance à amortir les variations rapides de ses divers composants. Il convient maintenant d'exposer les effets de l'intégration du contrôle extracellulaire sur le comportement dynamique du réseau que nous venons d'étudier. Cette intégration présente une nouveauté puisque ni le modèle de Aguda (Aguda *et al.* 99) ni celui de Kohn (Kohn 98) n'ont pris en compte l'environnement de la cellule.

3. Forme complexe incluant les effets de l'environnement (cellule socialisée)

a. Activation simultanée des récepteurs *EGFr* et des intégrines : effet sur l'activation consécutive de *Ras*

Réactions

L'intégration des facteurs extracellulaires activateur de la prolifération a été réalisée par l'intermédiaire de la modélisation de la dynamique de l'activation simultanée de *Ras* par l'activation simultanée des récepteurs *EGFr* et des intégrines à la suite de leurs liaisons à leurs ligands respectifs (Fig. 104).

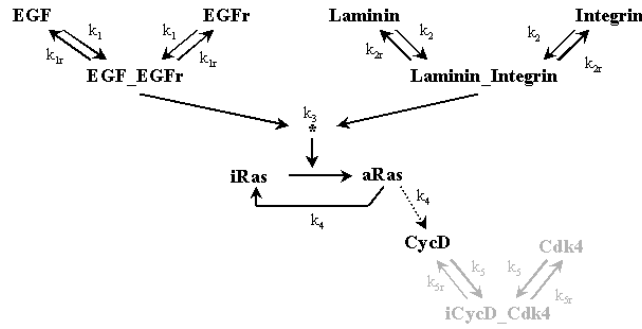


Fig. 104. Réactions impliquées dans l'activation du récepteur *EGFr* et l'activation consécutive de *Ras*.

Comportements cinétiques

La réaction d'activation de *iRas* par les complexes *EGF_E2GFr* et *Laminin_Integrin* est modélisée par l'équation : $v_3 = k_3 \times iRas \times EGF_EGFr \times Laminin_Integrin$. Cette équation permet de tenir compte du fait que dans le cas où l'un des deux récepteurs membranaires ne serait pas activé, l'activation de *iRas* n'aurait pas lieu (Fig. 105a). *iRas* est activée uniquement lorsque les deux systèmes *EGFr* et *Integrin* sont activés simultanément (Fig. 105b).

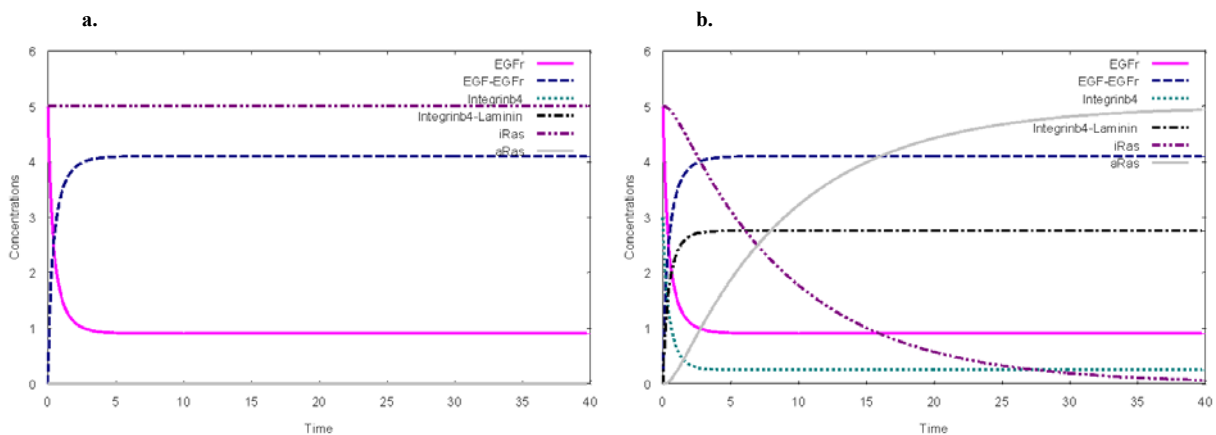


Fig. 105. Cinétiques des réactions impliquées dans l'activation du récepteur *EGFr* et l'activation consécutive de *Ras*. a. $EGF=5, EGFr=5, Integrinb4=3, Laminin=0, iRas=5, aRas=0, k1=0.5, k1r=0.1, k2=0.5, k2r=0.1, k3=0.01, k5=0.5$; b. $EGF=5, EGFr=5, Integrinb4=3, Laminin=5, iRas=5, aRas=0, k1=0.5, k1r=0.1, k2=0.5, k2r=0.1, k3=0.01, k5=0.5$; c. et d. .

b. Comportement du réseau à la suite de l'activation simultanée des récepteurs *EGFr* et des intégrines

Comportements cinétiques

Les paramètres utilisés précédemment pour la mise au point de l'activation de *aRas* par les récepteurs *EGFr* et *Integrin* ont été conservés pour étudier le comportement du réseau sous l'influence de l'environnement extracellulaire. Le comportement final du modèle diffère en deux points de celui observé lorsque *CycD* était présent dès le début des simulations :

- Un léger délai est présent dans le début de la simulation (Fig. 106a) ;
- Lorsque *EGFr*, *Integrin* ou *EGFr* et *Integrin* sont moins activées par leur ligands extracellulaires le temps nécessaire à la libération totale de *E2F* augmente et cette libération est simplement ralentie (Fig.

106b, c et d). Il ne s'agit plus, comme lors de la présence de *p27*, d'un délai à la suite duquel la libération de *E2F* est réalisée à la même vitesse.

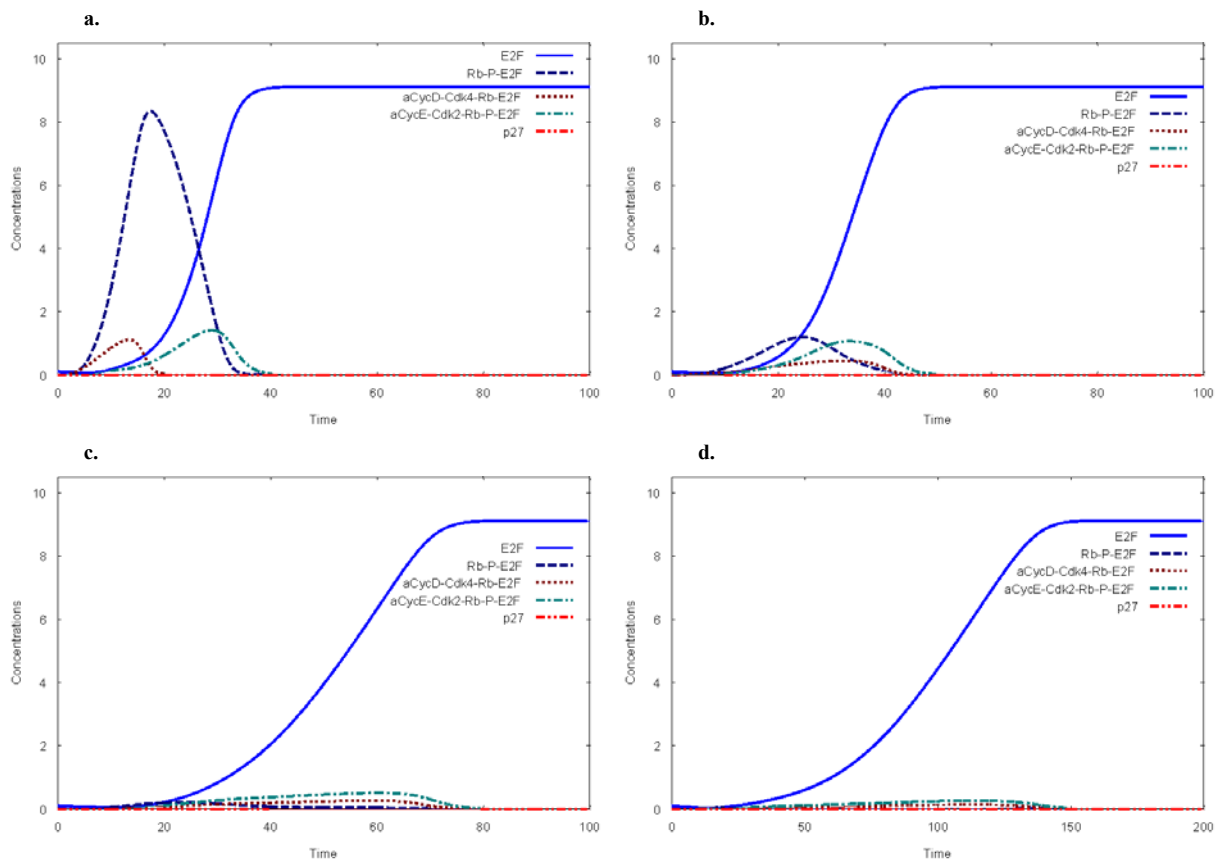
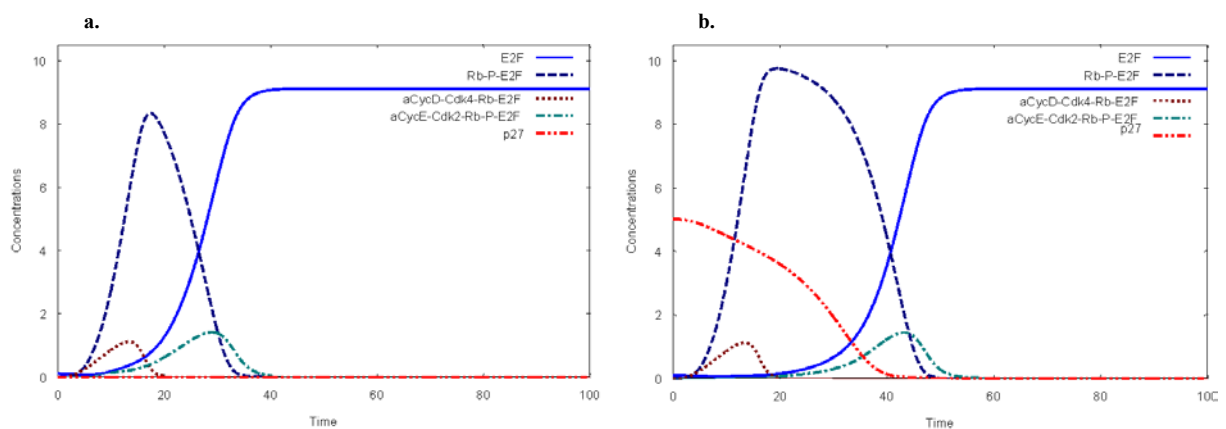


Fig. 106. Cinétiques de l'ensemble du réseau sous l'influence d'un environnement globalement positif. a. $EGF=5$, $Integrin=5$, $EGF=5$ et $Laminin=5$; b. $EGF=1$ et $Laminin=1$; c. $EGF=0.5$ et $Laminin=0.5$; d. $EGF=0.5$ et $Laminin=0.1$ et e. $EGF=0.1$ et $Laminin=0.1$. L'échelle des temps a changé entre c. et d (100 à 200).

Dans un environnement extrêmement favorable à la prolifération, la présence de *p27* dès le début des simulations accompagne les mêmes propriétés d'allongement de la phase G_1 que lorsqu'il est présent en quantités variables dès le début des simulations (**Fig. 107**).



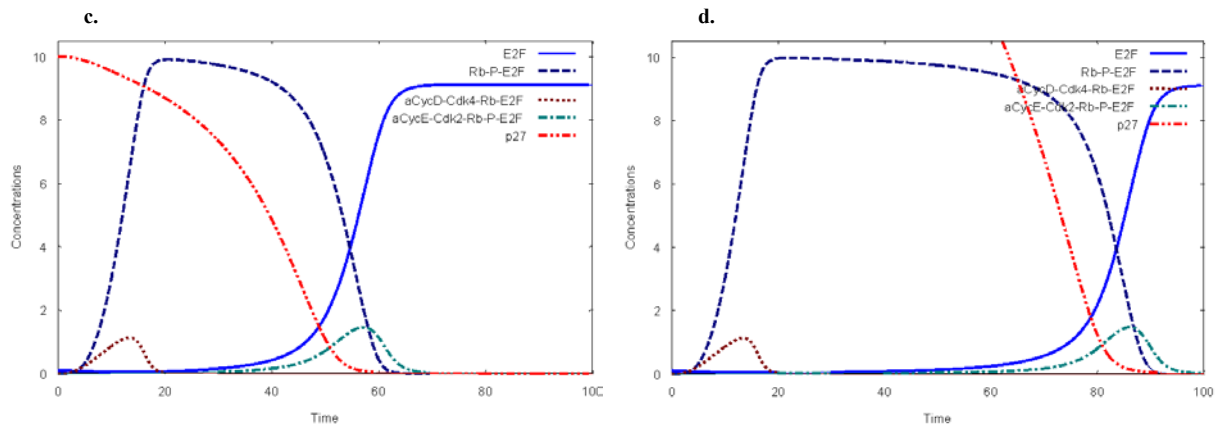


Fig. 107. Cinétiques de l'ensemble du réseau sous l'influence d'un environnement globalement favorable à la prolifération et de *p27*. a. $EGFr=5$, $Integrin=5$, $EGF=0.5$ et $Laminin=0.5$ et $p27=0$; b. $p27=5$; c. $p27=10$ et d. $p27=50$.

Par contre, dans un environnement moins positif vis à vis de la prolifération, *p27* est un inhibiteur efficace mais ne montre d'action de déclencheur de type « switch » qu'à forte concentration initiale (**Fig. 108**).

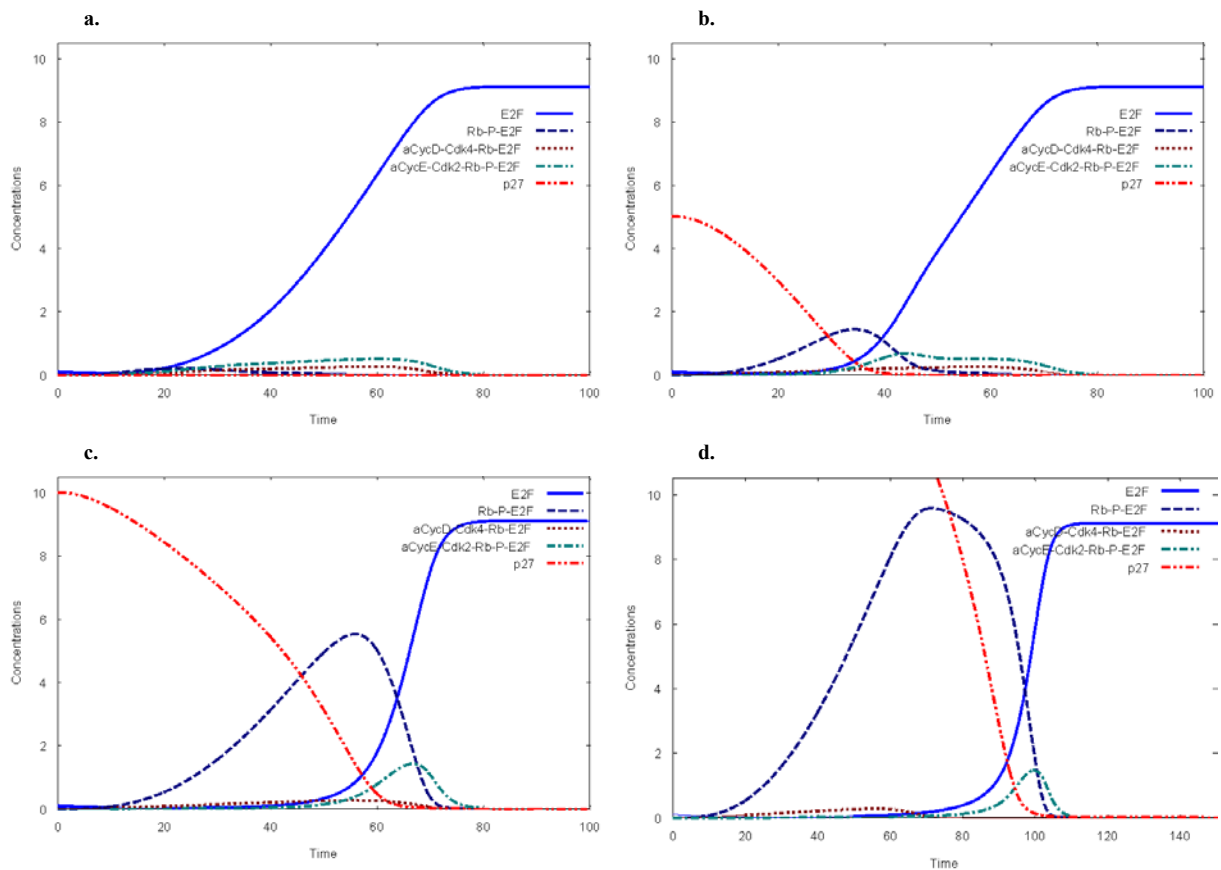


Fig. 108. Cinétiques de l'ensemble du réseau sous l'influence d'un environnement globalement favorable à la prolifération et de *p27*. a. $EGFr=5$, $Integrin=5$, $EGF=0.5$ et $Laminin=0.5$ et $p27=0$; b. $p27=5$; c. $p27=10$ et d. $p27=50$. L'échelle des temps a changé entre c. et d. (100 à 150).

c. Activation des récepteurs *TGFbr*

Réactions

L'étape suivante est la modélisation de l'activation des récepteurs *EGFr* et son effet sur l'induction de l'activité de *p15* et *p27* (**Fig. 109**). Il s'agit donc de la modélisation du comportement global du réseau sous l'effet d'un environnement potentiellement inhibiteur de la prolifération.

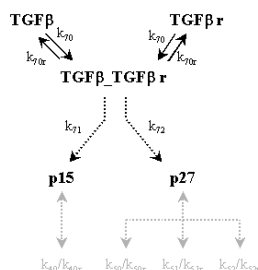


Fig. 109. Réactions impliquées dans l'activation du récepteur *TGFbr* et l'activation consécutive de *p15* et *p27*.

Comportements cinétiques

L'intégration de *TGFb* et de son récepteur *TGFbr* dans le modèle permet de moduler la quantité de *p27* présente dans la cellule au cours de la phase G_1 . Ainsi, la présence de récepteurs *TGFbr* lorsqu'ils sont stimulés par *TGFb* permet la régulation de la durée de la phase G_1 par l'environnement de la cellule (**Fig. 110**).

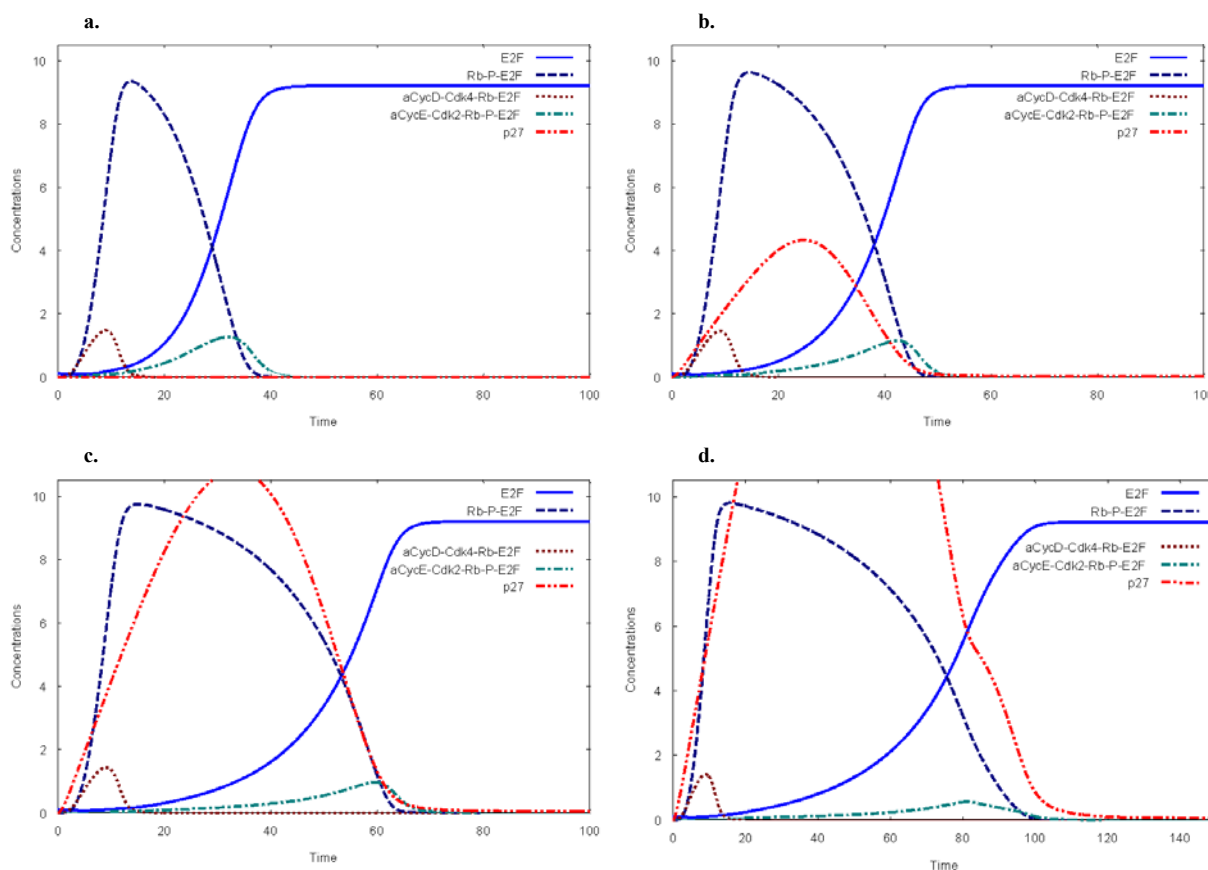


Fig. 110. Cinétiques des réactions impliquées dans l'activation du récepteur *TGFbr* et l'activation consécutive de *p27* : a. $TGFb=0$, $TGFbr=5$, $k70=0.5$, $k70r=0.1$, $k71=0$ (pas de production de *p15* sous l'effet de l'activation de *TGFbr*), $k72=0.1$, $k40=5$, $k40r=0$, $EGFr=5$, $Integrin=5$, $EGF=5$ et $Laminin=0.1$; b. $TGFb=1$; c. $TGFb=5$ et d. $TGFb=10$. Note : l'échelle du temps a été modifiée entre c. et d.

L'absence de $p27$ au début de la simulation permet au complexe $CycE-Cdk2$ de catalyser la phosphorylation de pRb_P_E2F plus rapidement. L'effet de switch est donc moins marqué que lorsque $p27$ est présent dès le début de la simulation. Or, le rôle de $p27$ a principalement été étudié chez les cellules en culture synchronisées par privation de sérum de croissance. Ce résultat permet de relativiser l'importance de $p27$ dans le contrôle du passage du point de restriction dont il est certainement un des acteurs mais pas l'élément central.

Une variante du modèle nous a permis de tester un autre type d'activation de l'expression de $p27$ par les récepteurs $TGFbr$. En effet, dans le modèle, l'expression de $p27$ est directement contrôlée par l'association de $TGFb$ à son récepteur. Ce type de contrôle implique une régulation extrêmement rapide. Or, le parti pris même de notre modélisation ne permet pas d'obtenir des changements de concentration suffisamment rapide de $p27$ suite à l'activation de $TGFbr$. En modifiant légèrement les équations donnant la variation de TGF_TGFbr et de $TGFbr$ en fonction de l'activation de l'expression de $p27$ ²² il devient possible de modéliser la possibilité que le rapport entre $TGFb$ et $p27$ soit stœchiométrique. Bien que cela reste une hypothèse, ceci pourrait correspondre au mécanisme biologique d'activation des récepteurs de type $TGFbr$ (Fig. 29). En utilisant des valeurs suffisamment grandes pour $TGFb$ et $TGFbr$, on retrouve alors des résultats similaires à ceux obtenus lorsque $p27$ est présent dès la naissance de la cellule (Fig. 111).

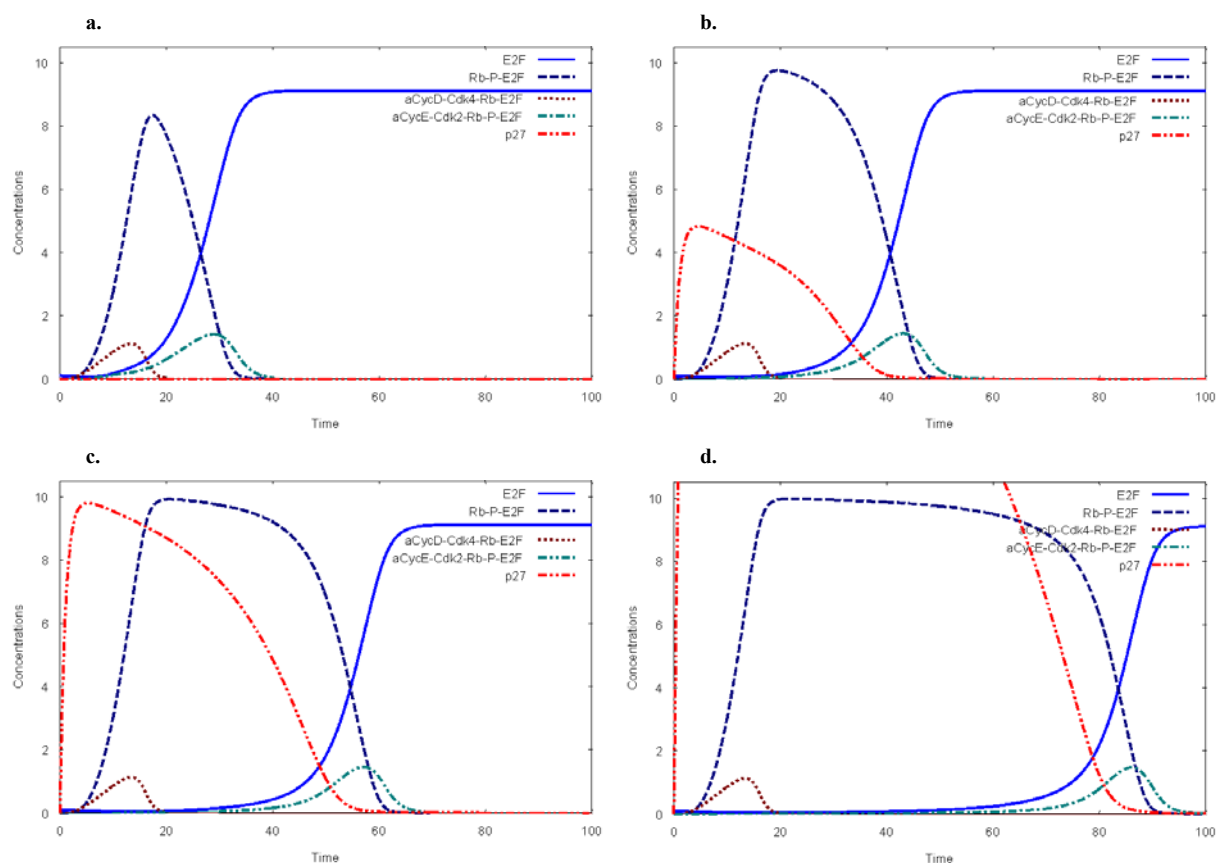


Fig. 111. Cinétiques des réactions impliquées dans l'activation du récepteur $TGFbr$ et l'activation consécutive de $p27$: a. $TGFb=0$, $TGFbr=50$, $k70=0.5$, $k70r=0.1$, $k71=0$ (pas de production de $p15$ sous l'effet de l'activation de $TGFbr$), $k72=1$, $k40=10$, $k40r=0$, $EGFr=5$, $Integrin=5$, $EGF=5$ et $Laminin=0.1$; b. $TGFb=5$; c. $TGFb=10$ et d. $TGFb=20$.

²² $dTGFb_TGFbr = +v70 - v70r - v71 - v72$ et $dTGFbr = -v70 + v70r + v71 + v72$ plutôt que $dTGFb_TGFbr = +v70 - v70r$ et $dTGFbr = -v70 + v70r$, respectivement.

Contrairement à $p27$, $p15$ ne s'est pas montré un excellent inhibiteur de la prolifération dans notre modèle. Le fait que le modèle permette de considérer toute réaction d'associativité entre deux protéines comme étant réversible est une propriété intéressante dans certain cas mais qui pose des problèmes dans le cas des inhibitions simples (par opposition à $p27$ que l'on qualifiera de complexe), du type de celle de $Cdk4$ par $p15$ ou $p16$. Des difficultés importantes ont été rencontrées pour déterminer des états stables lorsque la cellule est soumise à la fois à des stimuli positifs et négatifs au regard de la prolifération. Pour des valeurs proportionnelles à celles utilisées dans le cas de $p27$, l'inhibition de $Cdk4$ par $p15$ n'est pas efficace, que l'association de $p15$ et de $Cdk4$ soit réversible ou non (**Fig. 112a et b**). Par contre, l'expression de $p15$ permet d'allonger la durée précédant la libération de E2F lorsque EGF est faible, suggérant que sa présence accentue l'inhibition de la prolifération liée à une trop faible présence de facteurs de croissance (**Fig. 112c**).

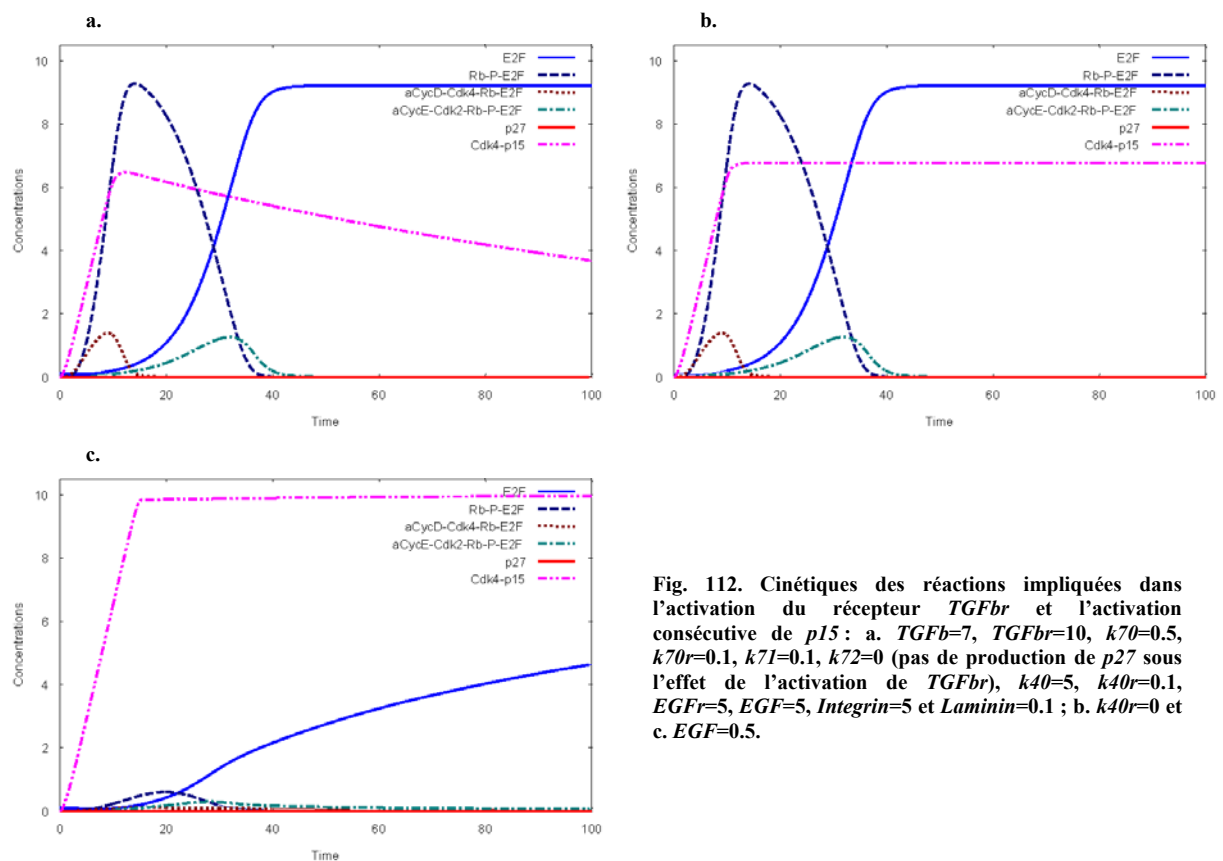


Fig. 112. Cinétiques des réactions impliquées dans l'activation du récepteur $TGFbr$ et l'activation consécutive de $p15$: a. $TGFb=7$, $TGFbr=10$, $k70=0.5$, $k70r=0.1$, $k71=0.1$, $k72=0$ (pas de production de $p27$ sous l'effet de l'activation de $TGFbr$), $k40=5$, $k40r=0.1$, $EGFr=5$, $EGF=5$, $Integrin=5$ et $Laminin=0.1$; b. $k40r=0$ et c. $EGF=0.5$.

Dans le cas où l'association de $p15$ et de $Cdk4$ serait irréversible, un effet intéressant est observé lorsque $p27$ et $p15$ sont régulés stœchiométriquement par l'activation de $TGFbr$. Une faible activation des récepteurs $TGFbr$ n'induit pas de différence majeure avec la situation où seul l'expression de $p27$ est régulée par $TGFbr$ (**Fig. 113a, b, c, d et e**). Par contre, lorsque l'activation de $TGFbr$ devient plus importante, l'effet inhibiteur de $p27$ tend à disparaître pour laisser la place à celui de $p15$, inhibant complètement les autres réactions de phosphorylation de la phase G_1 (**Fig. 113f, g, h, i et j**).

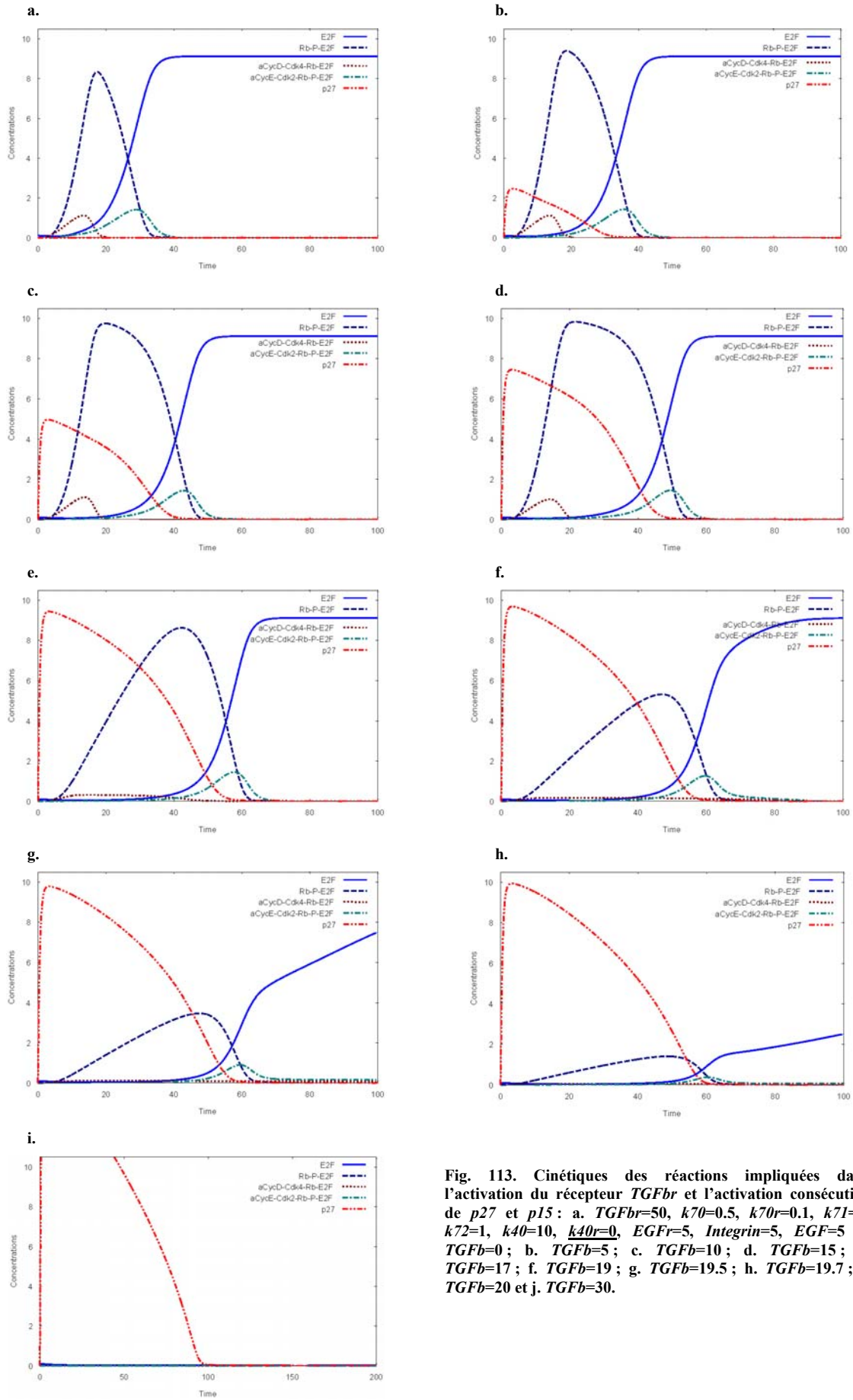


Fig. 113. Cinétiques des réactions impliquées dans l'activation du récepteur *TGFbr* et l'activation consécutive de *p27* et *p15*: a. *TGFb*=50, $k70=0.5$, $k70r=0.1$, $k71=1$, $k72=1$, $k40=10$, $k40r=0$, *EGFr*=5, *Integrin*=5, *EGF*=5 et *TGFb*=0; b. *TGFb*=5; c. *TGFb*=10; d. *TGFb*=15; e. *TGFb*=17; f. *TGFb*=19; g. *TGFb*=19.5; h. *TGFb*=19.7; i. *TGFb*=20 et j. *TGFb*=30.

Cependant, cet effet est lié à la modification du modèle et pourrait se révéler artefactuelle par rapport à la nature des relations moléculaires mises en jeu. Nous n'avons donc pas retenu ce type de régulation comme significatif.

4. Conclusion et critiques

Le modèle des interactions entre les récepteurs aux facteurs de croissance et de différenciations, les complexes cyclines-Cdks, les inhibiteurs de ces complexes (CKIs) et le complexe Rb-E2F qui a été construit et testé permet de simuler des réactions biochimiques du contrôle de la prolifération d'une cellule à la fois dans un environnement stimulant et dans un environnement inhibant sa prolifération. Il permet en outre de contrôler la vitesse de libération d'un facteur de transcription de la famille E2F. Il convient maintenant de lier certains comportements cinétiques du modèle résultants de conditions initiales différentes à des comportements cinétiques cellulaires tels qu'ils sont observés dans un tissu.

II. Identification de comportements cinétiques différents biologiquement significatifs

1. Introduction

Dans un tissu, les cellules sont à la fois susceptibles de recevoir des signaux positifs et des signaux négatifs vis à vis de leur prolifération. Le point de restriction marque la fin de la période de sensibilité des cellules à ces facteurs environnementaux. Le modèle que nous avons développé permet la modélisation du comportement des cellules jusqu'au point de restriction. Le modèle se fonde donc sur le contrôle de la durée de la phase G_1 comme principal contrôle de la durée du cycle cellulaire. Une cellule montrant une phase G_1 très longue posséderait donc le phénotype cinétique d'une cellule souche, par exemple. Intentionnellement, le modèle ne permet donc pas de distinguer une cellule engagée dans une phase G_1 de durée étendue d'une cellule en phase G_0 .

2. Modèle de cellules souches : cellule à prolifération lente

Dans les épithélia stratifiés, la seule propriété établie permettant de distinguer les cellules souches des cellules en transit réside dans leur durée de cycle cellulaire. Celles-ci sont supposées proliférer approximativement deux fois plus lentement que les autres cellules proliférantes du tissu (**Wright *et al.* 84**). Les données expérimentales disponibles ne permettent pas d'affirmer que cette différence de comportement réside dans un environnement différent avec des variations de facteurs de croissance résultants dans le doublement (au moins) de la durée de la phase G_1 .

A l'aide du modèle, la différence de durée du cycle cellulaire peut-être expliquée par un contrôle environnemental particulier. Dans ce cas, les facteurs de différenciation pourraient-être prédominants par rapport aux facteurs de croissance et l'équilibre penche dans le sens d'une expression plus importante de *p27* et, dans une plus faible proportion, de *p15*. La cellule montre alors une phase G_1 beaucoup plus longue pour de petites variations de *TGF β* (**Fig. 114**). Ce comportement dynamique du modèle illustre la possibilité pour les cellules de réagir brusquement à de faibles variations d'un élément de son environnement (e.g. *TGF β*) alors qu'elle réagit plus lentement à un autre facteur (e.g. *EGF*). La faible variation de *TGF β* nécessaire à un allongement très significatif de la durée de G_1 permet d'envisager un contrôle extracellulaire précis de la cinétique de prolifération des cellules souches.

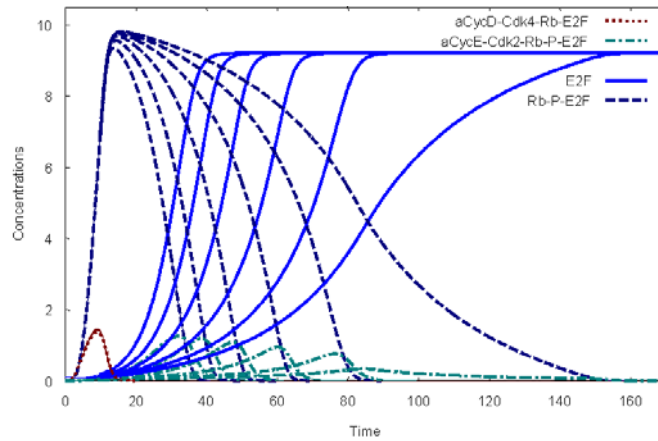


Fig. 114. Cinétiques du réseau dans le cas d'une cellule souche lorsque l'association de *p15* et *Cdk4* est : a. Réversible avec $EGF=5$, $EGFr=5$, $Laminin=5$, $Integrinb4=4$, $TGFb=de\ 0\ à\ 10\ (par\ pas\ de\ 2)$, $TGFbr=10$, $iRas=5$, $Cdk4=10$, $Cdk2=30$, $aCAK=5$, $CycEPromotor=1$, $Protease=1$, $k1=0.5$, $k1r=0.1$, $k2=0.5$, $k2r=0.1$, $k3=0.01$, $k4=0.1$, $k5=0.5$, $k5r=0.1$, $k6=1$, $k6r=0.1$, $k7=5$, $k10=0.5$, $k10r=0.1$, $k11=1$, $k11r=0.1$, $k12=5$, $k20=0.5$, $k20r=0$, $k21=1$, $k21r=0.1$, $k22=1$, $k23=0.5$, $k23r=0.1$, $k24=0.5$, $k31=0.1$, $k31r=0.01$, $k33=0.5$, $k33r=0.1$, $k34=0.4$, $k34r=0$, $k35=1$, $k37=0.1$, $k40=5$, $k40r=0.01$, $k41=0.9$, $k51=1$, $k51r=0.01$, $k52=1$, $k52r=0.1$, $k53=5$, $k70=0.5$, $k70r=0.1$, $k71=0.1$, $k72=0.1$, $k100=0.5$ et b. Irréversible avec $k40r=0$.

De plus, contrairement à *EGFr* dont la présence est quasiment ubiquitaire dans les cellules de la couche basale, la présence de *TGFbr* est plus sporadique et pourrait être liée à la localisation des cellules souches (données existantes pour le limbe : **Joyce et al. 97**). Par manque de données expérimentales, il n'est pas possible de dire quelle hypothèse est la plus correcte et détermine effectivement un comportement de cellule souche. Ces deux hypothèses sont donc testées dans un cadre étendu à une population de cellules.

3. Modèle de cellules en transit : cellule à prolifération rapide

Les cellules en transit sont des cellules d'amplification (comme leur nom anglais le souligne explicitement : cellules de transit et d'amplification). Il est possible qu'elles soient moins sensibles aux inhibiteurs de la prolifération que les cellules souches et possèdent moins de récepteurs *TGFbr* que celles-ci. Des simulations dynamiques ont montré que si ces cellules possèdent moins de récepteurs *TGFbr* elles ne peuvent plus, pour les mêmes concentrations en *TGFb* que pour des cellules possédant plus de récepteurs, répondre à un stimulus inhibiteur de la prolifération (**Fig. 115**).

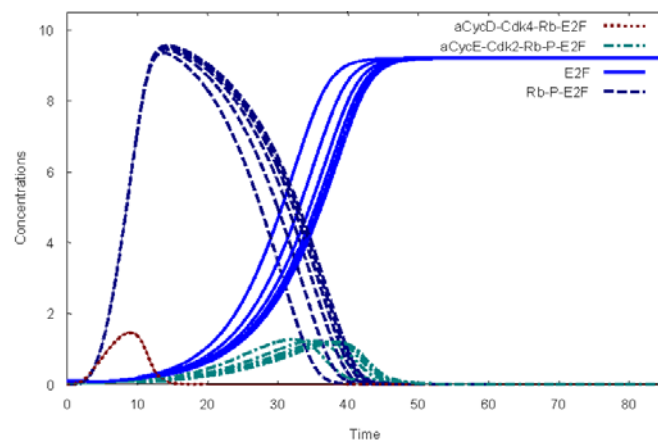


Fig. 115. Variation des cinétiques du réseau dans le cas d'une cellule en transit lors de la variation de la quantité de *TGFbr*. a. $EGF=5$, $EGFr=5$, $Laminin=5$, $Integrinb4=4$, $TGFb=de\ 0\ à\ 10\ par\ pas\ de\ 2$, $TGFbr=2$, $iRas=5$, $Cdk4=10$, $Cdk2=30$, $aCAK=5$, $CycEPromotor=1$, $Protease=1$, $k1=0.5$, $k1r=0.1$, $k2=0.5$, $k2r=0.1$, $k3=0.01$, $k4=0.1$, $k5=0.5$, $k5r=0.1$, $k6=1$, $k6r=0.1$, $k7=5$, $k10=0.5$, $k10r=0.1$, $k11=1$, $k11r=0.1$, $k12=5$, $k20=0.5$, $k20r=0$, $k21=1$, $k21r=0.1$, $k22=1$, $k23=0.5$, $k23r=0.1$, $k24=0.5$, $k31=0.1$, $k31r=0.01$, $k33=0.5$, $k33r=0.1$, $k34=0.4$, $k34r=0$, $k35=1$, $k37=0.1$, $k41=0.9$, $k51=1$, $k51r=0.01$, $k52=1$, $k52r=0.1$, $k53=5$, $k70=0.5$, $k70r=0.1$, $k71=0.1$, $k72=0.1$, $k100=0.5$.

L'absence de récepteurs *TGF β* dans les zones où les cellules en transit sont identifiées dans la cornée (**Joyce et al. 97**) serait un argument en faveur d'une telle hypothèse. Cependant, ceci reste une hypothèse à vérifier par des données expérimentales.

4. Modèle de cellules engagées dans la différenciation : cellule ne proliférant plus

Une cellule engagée (dans la différenciation) est une cellule qui débute un long processus de différenciation avant de quitter la couche basale de l'épithélium stratifié et de migrer vers les couches supra-basales. Comme nous l'avons vu, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'initialisation de la différenciation cellulaire sont largement incompris. Les cellules des couches supra-basales ne possèdent plus de récepteurs aux facteurs de croissance ni d'intégrines. Dans le modèle, sans récepteur de facteur de croissance ni intégrine, il n'y a plus de libération de E2F dans la cellule, qui ne peut donc pas être considérée comme une cellule passant le point de restriction car les cellules ne produisent alors plus assez de *CycD* pour lancer les cascades entraînant la cellule dans le cycle cellulaire. Sous sa forme actuelle, le modèle ne peut pas apporter de réponse satisfaisante aux questions relatives à l'initialisation de la différenciation. Plutôt que d'introduire des paramètres supplémentaires dont l'existence ne reposerait sur aucune donnée expérimentale solide, nous avons préféré par la suite considérer l'initialisation de la différenciation sous un angle déterministe (une cellule en transit perd ses récepteurs EGFr, ne peut donc plus être stimulée et devient une cellule engagée).

5. Conclusion

Ce modèle de contrôle moléculaire de la prolifération d'une cellule nous permet donc de disposer d'une bibliothèque de comportements cinétiques de cellules liés à des jeux de paramètres. Cependant, nous disposons de cellules souches, en transit et engagées potentielles dont il est difficile de tester si elles correspondent réellement à des cellules souches, en transit ou engagées. Les paramètres de ce modèle ont ensuite été mis à l'épreuve en étant utilisés pour initialiser des simulations de populations dont chacune des cellules est définie par un jeu différent de paramètres décrivant son état moléculaire.

Partie 2 : Application du modèle de réseau de contrôle de la prolifération à l'homéostasie d'un épithélium stratifié

I. Simulations déterministes

En guise d'étude préalable, les simulations de renouvellement de population ont été effectuées à l'aide de cellules dont le modèle moléculaire a été remplacé par des comportements cinétiques déterministes des cellules. Ces comportements ont été définis d'après les données disponibles (**Wright et al. 84**). Ces simulations ont permis de tester à la fois :

- La validité cinétique du modèle de Potten *et al.*¹ (**Potten et al. 74**) de proportion de cellules souches, en transit et donnant les proportions des cellules souches, en transit et engagées dans la différenciation dans la couche basale des épithélia stratifiés. Ce modèle a été construit à partir de données expérimentales provenant de différents tissus (**Fig. 42** et **Tab. 10**) ;
- La stabilité du graphe de Voronoï lors de simulations dynamiques où les contraintes appliquées au graphe sont peu nombreuses.

Deux types de populations ont été considérés : couche basale d'un épithélium stratifié en coupe frontale et système stratifié d'un épithélium stratifié en coupe transversale (**Fig. 78c**). Le modèle intègre quatre types cinétiques différents : souches, en transit, engagées et différenciées.

1. Cas d'une population cellulaire épithéliale de la couche basale d'un épithélium stratifié en coupe frontale

a. Comportements cinétiques cellulaires possibles

La durée du cycle cellulaire et le nombre de divisions possibles sont définis pour chacun des types cellulaires présents dans la couche basale :

- Cellules souches :

Les cycles cellulaires ont une durée comprise entre 0.8 et 1.2 (unité arbitraire). Pour permettre au système de se comporter avec plus de vraisemblance les durées de cycle cellulaire sont tirées au hasard pour chaque cellule dans cet intervalle. Les cellules souches peuvent se diviser un nombre illimité de fois. Leur division produit une cellule souche et une cellule en transit de première génération. Les cellules souches ont un temps de cycle cellulaire deux fois plus long que celui des cellules en transit.

- Cellules en transit :

Les cycles cellulaires ont une durée comprise entre 0.3 et 0.7. Pour permettre au système de se comporter avec plus de vraisemblance les durées de cycle cellulaire sont tirées au hasard pour chaque cellule dans cet intervalle. Les cellules en transit ne peuvent se diviser qu'un nombre limité de fois. Leur division résulte en la création de deux cellules en transit de génération suivante de la cellule mère. Une cellule de génération 2 se divise en deux cellules de génération 3. Pour correspondre au modèle de Potten *et al.*¹ (**Potten et al. 74**), une cellule en transit de génération 4, dont la durée de vie est fixée arbitrairement à la même valeur que les cellules en transit des autres générations, devient une cellule engagée.

- Cellules engagées :

¹ Cf. **Fig. 42**.

Les cellules engagées ne peuvent pas se diviser et quittent la population à la suite d'une durée variant de 0.1 à 0.2. La soustraction de ces cellules à la population représente le départ de celles-ci pour les couches supra-basales. C'est une façon de prendre en compte la troisième dimension dans le modèle.

b. Contraintes physiques dans la population

Des forces liées au modèle moléculaire, seule la répulsion entre germes a été conservée. Elle est gérée de façon identique à celle décrite dans le matériel et méthode pour le modèle moléculaire. Ce modèle est uniquement un modèle cinétique et les contraintes physiques associées aux germes ont été minimisées. Une force supplémentaire dite « de relaxation » a été ajoutée pour permettre au graphe de retrouver un état homogène (les polygones tendant à devenir des hexagones). Par ailleurs, l'intérêt du modèle réside principalement dans l'approche cinétique, aucune contrainte n'a été placée sur la taille des cellules.

c. Simulations

i. Cinétique

Les simulations ont été initialisées avec une population de 10 cellules souches désynchronisées (positions dans le cycle cellulaire : 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 et 90 % du temps de cycle total). La durée des simulations retenues pour illustrer ces résultats était de 15 (u. a.), des simulations plus longues ont été effectuées mais n'apportent pas plus d'information. La **Fig. 116** montre des captures d'écran réalisées au cours d'une de ses simulations.

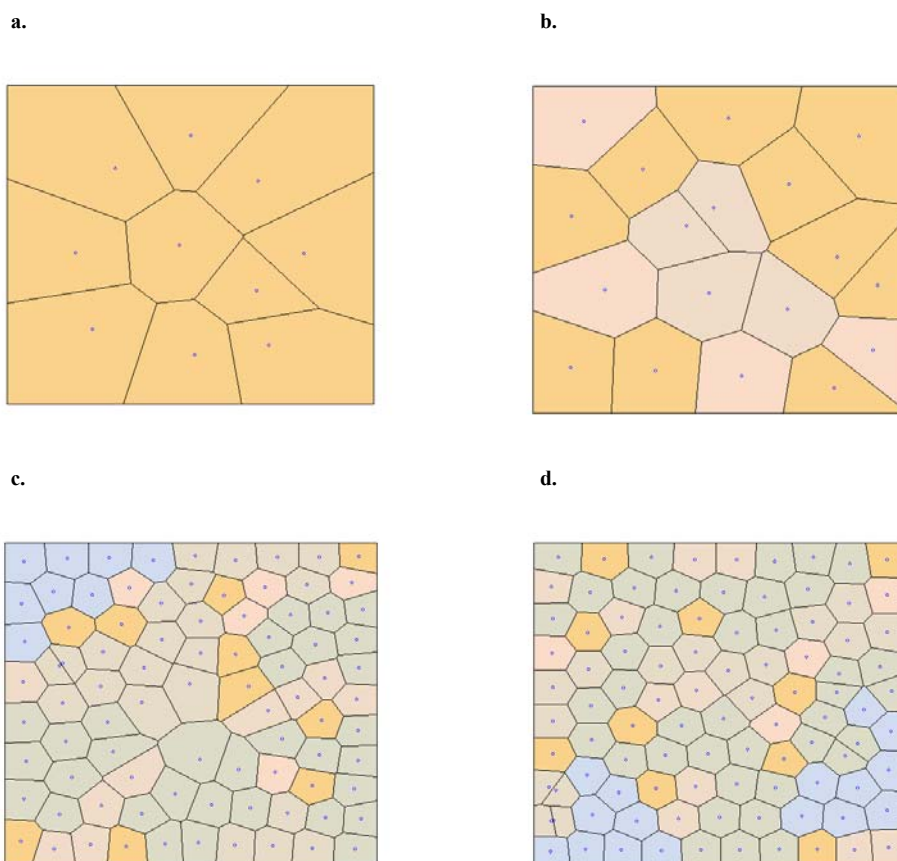


Fig. 116. Comportement du graphe de Voronoï lors de simulation d'une population en coupe frontale contenant des cellules souches (ocre), des cellules en transit (sable à kaki) et des cellules engagées (bleu ciel) aux comportements déterministes : a. $t=0$; b. $t=0.6$; c. $t=2$; d. $t=14.6$

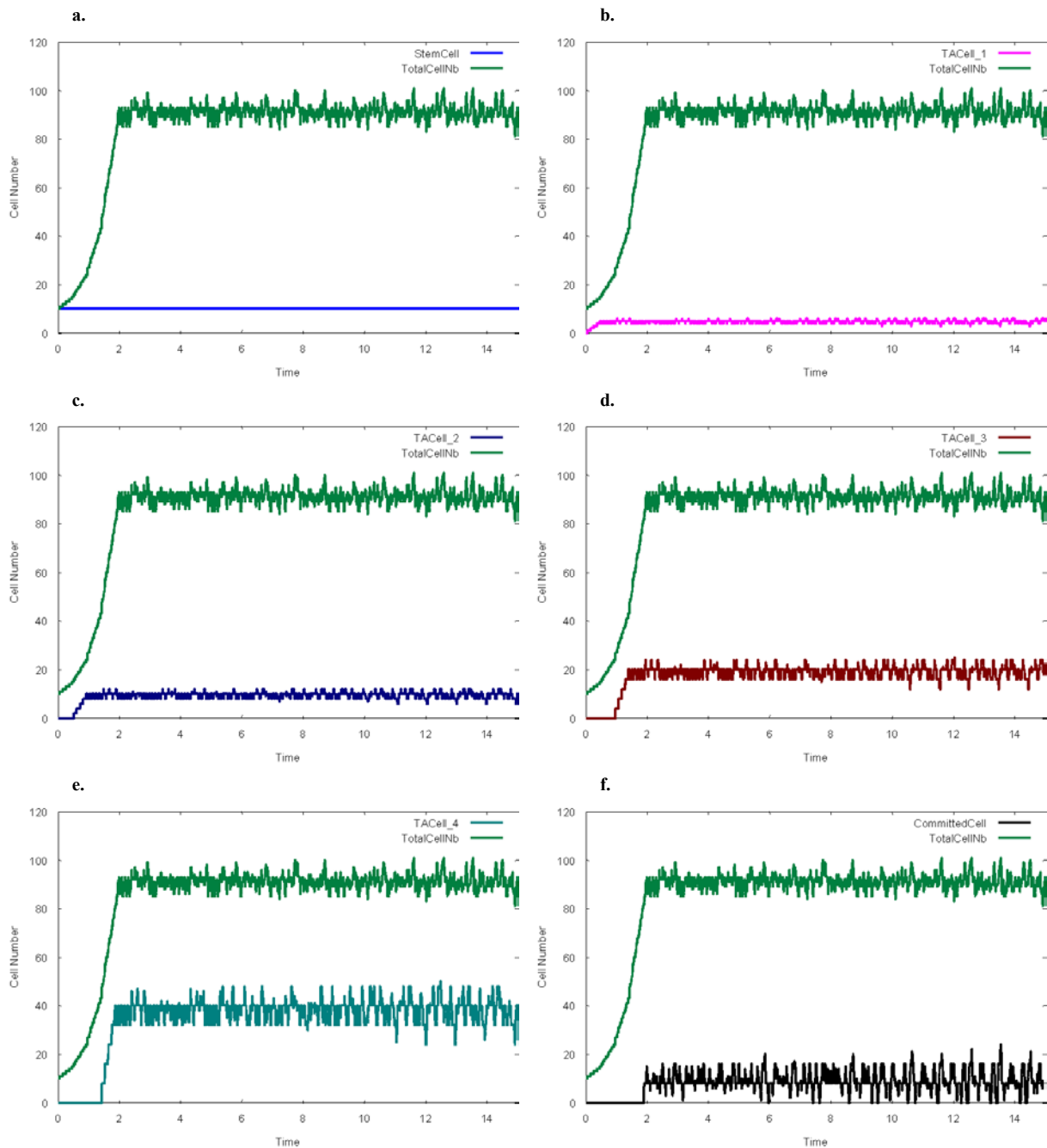


Fig. 117. Evolution des différents types cellulaires de la population au cours de la simulation : a. Nombre de cellules souches (StemCell) ; b. Nombre de cellules en transit de génération 1 (TA_Cell1) ; c. Nombre de cellules en transit de génération 2 (TA_Cell2) ; d. Nombre de cellules en transit de génération 3 (TA_Cell3) ; e. Nombre de cellules en transit de génération 4 (TA_Cell4) et f. Nombre de cellules engagées (CommittedCell).

La population croît jusqu'à atteindre un effectif stable après un temps de simulation d'environ 2 (u.a.). Ensuite, l'effectif de la population se maintient par oscillations autour d'une moyenne de 91.26 cellules possédant visiblement une fréquence que nous n'avons pas quantifiée mais certainement due à une légère synchronisation de la population (**Fig. 117**). Ceci expliquerait des variations d'amplitude du nombre de cellules totales légèrement plus importantes plus tard au cours de la simulation.

ii. Validation du modèle de Potten *et al.* (Potten *et al.* 74)

Les proportions moyennes des différentes sous-populations, une fois la population stabilisée, sont proches de celles données par Potten *et al.* (Potten *et al.* 74). Les seules valeurs dont la différence est significative sont les proportions de cellules en transit de génération 4 et de cellules engagées (**Tab. 15**). Ceci est certainement lié à

notre façon de modéliser ces deux phases : transition sans division entre les cellules en transit. Mais c'est ce comportement qui est décrit par le modèle de Potten.

Tab. 15. Proportions des sous populations cellulaires présentes dans la couche basale par rapport au nombre de cellules total du modèle présenté ici et des données expérimentales de Potten *et al.* (Potten *et al.* 74). Avec CS : cellules souches, CT1, CT2, CT3 et CT4 : cellules en transit respectivement de génération 1, 2, 3 et 4 et CC : cellules engagées

	CS	CT1	CT2	CT3	CT4	CC
Modèle	10.96 %	5.26 %	10.49 %	21.08 %	41.99 %	10.22 %
Potten <i>et al.</i>	12.96 %	3.7 %	7.41 %	22.22 %	27.78 %	25.93 %

Ces simulations ont rempli leur rôle en retrouvant les proportions données par le modèle de Potten *et al.* (Potten *et al.* 74) indiquant la possibilité que la proportion des différentes sous-populations cellulaires de la couche basale est directement liée à leurs propriétés cinétiques respectives. La proportion de 10.91 % de cellules souches est très proche de celle observée dans les résultats les plus récents utilisant le double marqueur potentiel de cellules souches a6triCD71bri qui donnent une proportion d'environ 8 % de cellules souches

La structure du modèle, où la division d'une cellule souche est amplifiée par les divisions successives de trois générations de cellules en transit, permet de conserver une population globale suffisamment stable avec 91 cellules en moyenne (coefficient de variation du nombre de cellules total : 0.03) alors que les effectifs des sous-populations montrent eux mêmes une variation beaucoup plus importante (Coefficients de variation du nombre de cellules en transit de génération 1, 2, 3 et 4 respectivement de 0.13, 0.13, 0.13 et 0.12). Les variations peuvent paraître trop importantes mais il ne faut pas oublier que ce système n'est complet qu'en considérant aussi les cellules des couches suprabasales qui représentent la majorité des cellules du tissu.

iii. Cinétique de la création d'une population de cellules engagées

Une analyse rapide de ce modèle montre que, étant donnée la vitesse de prolifération des cellules souches et des cellules en transit, une cellule souche produit une population de 8 cellules souches en 2.85 u.a. en moyenne (3 u.a. en théorie si les vitesses de prolifération de cycle cellulaire n'étaient pas légèrement aléatoires). Suivant les conditions de vitesse (durée des cycles pour les différents types cellulaires) et d'amplification (nombre de générations possible des cellules en transit) une population initiale de 10 cellules souches donne donc naissance à une population se renouvelant de 91.26 cellules en moyenne avec une vitesse moyenne de 0.36 cellule engagée / cellule souche / u.a.

2. Cas d'une population cellulaire épithéliale stratifiée en coupe transversale

Réaliser des simulations déterministes de l'homéostasie dans le cadre de la représentation du tissu en coupe transversale nécessite d'apporter des modifications essentielles au modèle cinétique. Au niveau de la cinétique individuelle des cellules, la seule différence réside dans le comportement des cellules engagées. A la suite de la création des cellules engagées, celles-ci vont se détacher de la membrane basale pour migrer vers la surface du tissu. Leur temps de présence dans le cadre de la population est donc plus long. Cependant, il n'y a pas de raison pour que la durée du cycle cellulaire ainsi que le nombre de divisions possibles des cellules souches et des cellules en transit définis dans le cas du tissu considéré en coupe frontale ne soient pas conservés.

Ainsi, la modification principale à apporter au modèle est lié à ce que ce type de représentation ne permet pas de prendre en compte aussi facilement la troisième dimension que dans le cas de la coupe frontale. Les cellules sont susceptibles de se déplacer dans toutes les directions du plan du tissu (Fig. 118). Il faudrait donc utiliser soit une

représentation 3D soit une représentation comportant plusieurs plans 2D pour reconstituer une population dont les cellules peuvent passer d'un plan à l'autre tout en gardant leurs propriétés.

Des tentatives dans ce sens ont été décevantes au regard des résultats obtenus dans le cas des coupes frontales et la lourdeur informatique de telles simulations était beaucoup trop importante par rapport à leur apport réel. Ainsi, nous avons principalement utilisé cette représentation en 2D de coupes transversales pour illustrer certains des aspects de l'intégration du modèle moléculaire.

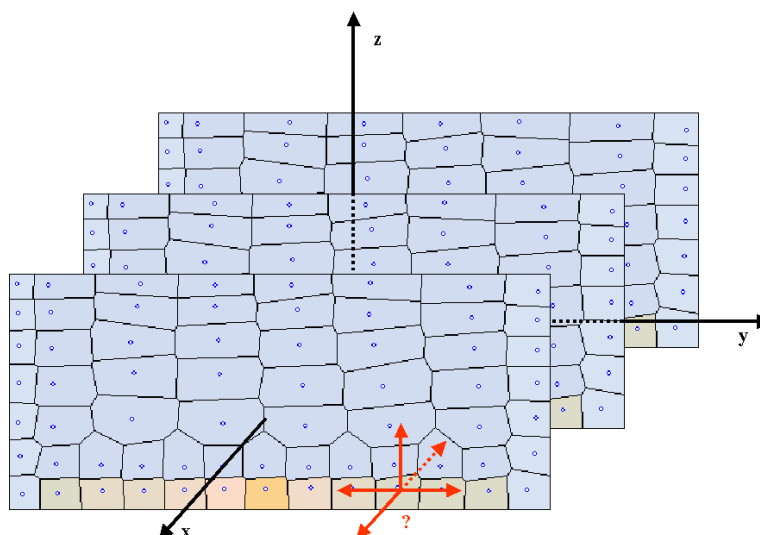


Fig. 118. Illustration des difficultés d'intégration de la mobilité des cellules en dehors du plan de la simulation.

II. Simulations semi-déterministes

L'intégration du modèle de réseau moléculaire dans le cadre de représentation donné par le graphe de Voronoï a permis de simuler des comportements cellulaires simples dont le déroulement est dépendant à la fois de l'état de la cellule et de l'état de l'environnement. Ces simulations ont été qualifiées de semi-déterministes car le modèle moléculaire permet de rendre compte du contrôle de la durée de la phase G_1 par l'environnement de la cellule mais pas des durées des phases S, G_2 et M ou du nombre de générations possibles pour les cellules en transit. Afin de ne pas avoir à faire des simulations trop longues les durées des phases S, G_2 et M ont été ramenés à une valeur très faible au regard de la valeur de la durée de la phase G_1 . Ceci est critiquable sur le plan de la biologie mais nous a été imposé par des problèmes de stabilité du modèle lors de simulations. Nous reviendrons sur ces problèmes. Par exemple la durée de la phase G_1 varie entre 50 à 60 u.a. pour une cellule en transit, la durée cumulée des phases S, G_2 et M ne représente que 10 u.a. Cette simplification n'a pas d'incidence sur le fonctionnement du modèle lui-même puisque l'implémentation du modèle moléculaire implique qu'une fois passé le point de restriction une cellule ne calcule plus l'évolution des concentrations des protéines intracellulaires. Le nombre de générations possibles pour les cellules en transit a lui aussi été géré de façon déterministe puisque les cellules souches se divisent forcément en une cellule souche et une cellule fille et qu'une cellule en transit de première génération se divise en deux cellules filles de seconde génération. Le cas est légèrement différent pour les cellules en transit de quatrième génération qui restent des cellules en transit pendant un temps de l'équivalent à une phase G_1 puis deviennent des cellules engagées dans la différenciation.

1. Cas d'une population cellulaire épithéliale de la couche basale d'un épithélium stratifié en coupe frontale

a. Définition d'une population cellulaire de référence

Une population « type » est obtenue à partir d'une population issue des simulations déterministes (**Fig. 119**). Elle contient donc des cellules souches, des cellules en transit et des cellules engagées dans des proportions correspondant à celles données par le modèle déterministe dont nous avons vu qu'elles correspondent aux proportions moyennes résumées par Potten *et al.* sous la forme d'un modèle (**Potten *et al.* 74**). Le modèle déterministe qui n'incluait que des durées de vie pour chaque type cellulaire est alors remplacé pour chacune des cellules de la population par le modèle détaillé dans la partie I des résultats dont les paramètres sont initialisés à l'aide des valeurs obtenues lors des simulations effectuées pour une cellule seule. La différence principale entre cellules souches et cellules en transit réside donc dans la quantité de récepteurs *TGF β r* qui est fixée à 10 pour les cellules souches et à 2 pour les cellules en transit.

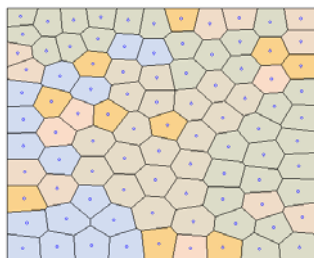


Fig. 119. Morphologie de la population témoin. Dix cellules souches sont présentes dans la population dont la composition résulte des simulations déterministes décrites ci-dessus.

Afin d'étudier le comportement du modèle moléculaire au cours de la dynamique de la population, des simulations de cas particuliers ont été réalisées. Il s'agissait de tester les interactions biochimiques et physiques sur quelques cellules de la population avant d'étudier le comportement potentiellement homéostatique des simulations lorsque toutes les cellules possèdent des caractéristiques similaires.

b. Interactions biochimiques

Pour simuler un gradient de diffusion de facteurs extracellulaire (e.g. *EGF*), les cellules de la population conservent leurs propriétés à l'exception des facteurs *EGF* et des récepteurs *EGFr*. Une première simulation (**Fig. 120**) est réalisée pour montrer l'évolution de la quantité d'*EGF* dans la population lorsqu'un petit groupe de cellules expriment *EGF* alors que les autres cellules ne possèdent ni *EGF* ni récepteurs *EGFr*. Les facteurs extracellulaires diffusent bien dans la population au fil de la simulation.

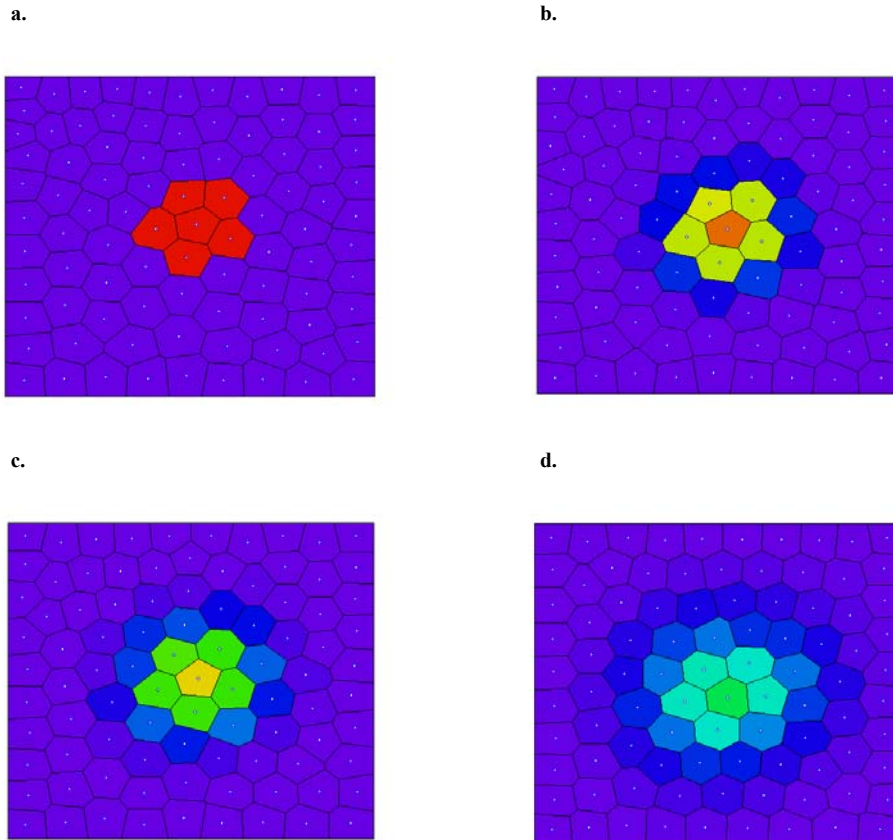
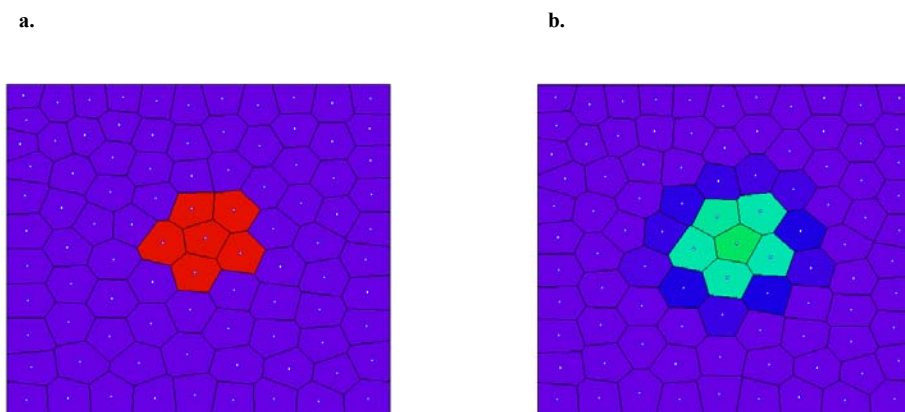
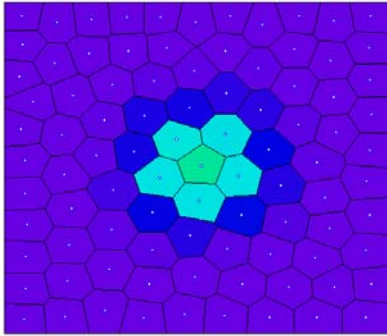


Fig. 120. Diffusion d'un gradient lorsque les molécules ne sont pas utilisées par les cellules voisines de la cellule émettrice ($EGFr=0$). La couleur donne la variation de EGF libre par cellule : a. Etat de la population à $t=0$; b. $t=5$; c. $t=10$ et d. $t=30$.

Une seconde simulation montre l'évolution du même facteur *EGF* dans le cas où toutes les cellules possèdent des récepteurs *EGFr* (**Fig. 121**). La vitesse de propagation de *EGF* est alors beaucoup plus lente puisque ce facteur est utilisé par les cellules possédant *EGFr*. L'implémentation du modèle ne permet pas de donner les courbes d'évolution de la quantité de *EGF* en fonction du temps pour chacune des cellules de la population. Cependant l'usage de la table de correspondance lors de l'affichage permet une représentation suffisamment précise de la variation des quantités des protéines. Ces images tentent de montrer le rendu dynamique de la diffusion dans le temps



c.



d.

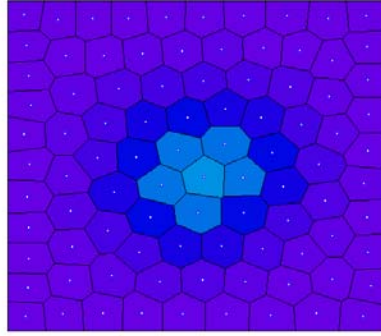
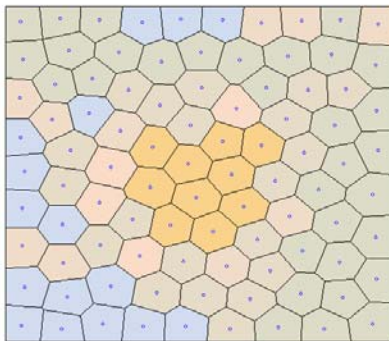


Fig. 121. Diffusion d'un gradient lorsque les molécules sont utilisées par les cellules voisines de la cellule émettrice ($EGF_r=5$). La couleur donne la variation de EGF libre par cellule : a. Etat de la population à $t=0$; b. $t=5$; c. $t=10$ et d. $t=30$.

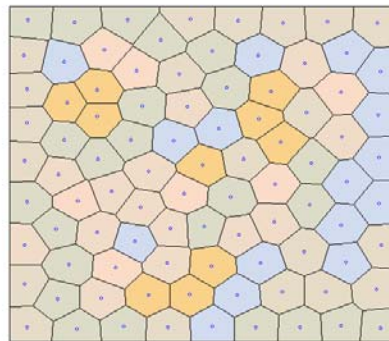
c. Interactions physiques

La localisation des cellules est toujours un sujet controversé. Comme nous l'avons vu dans l'état de l'art, une hypothèse probable est la surexpression des intégrines $\beta 1$ par les cellules souches de la couche basale. Il existerait donc, au moins dans le cas de certains tissus, une relation de régulation biochimique ou physique entre des cellules souches qui surexpriment les intégrines $\beta 1$. Dans le modèle, en suivant les propositions de Watt *et al.* (Watt *et al.* 01), les intégrines $\beta 1$ peuvent être considérées comme spécifiques des cellules souches. L'attribution de paramètres d'adhésion préférentielle aux cellules souches entre-elles liée à la présence des intégrines $\beta 1$ permet à la population de conserver la cohésion des agrégats de cellules souches (Fig. 122).

a.



b.



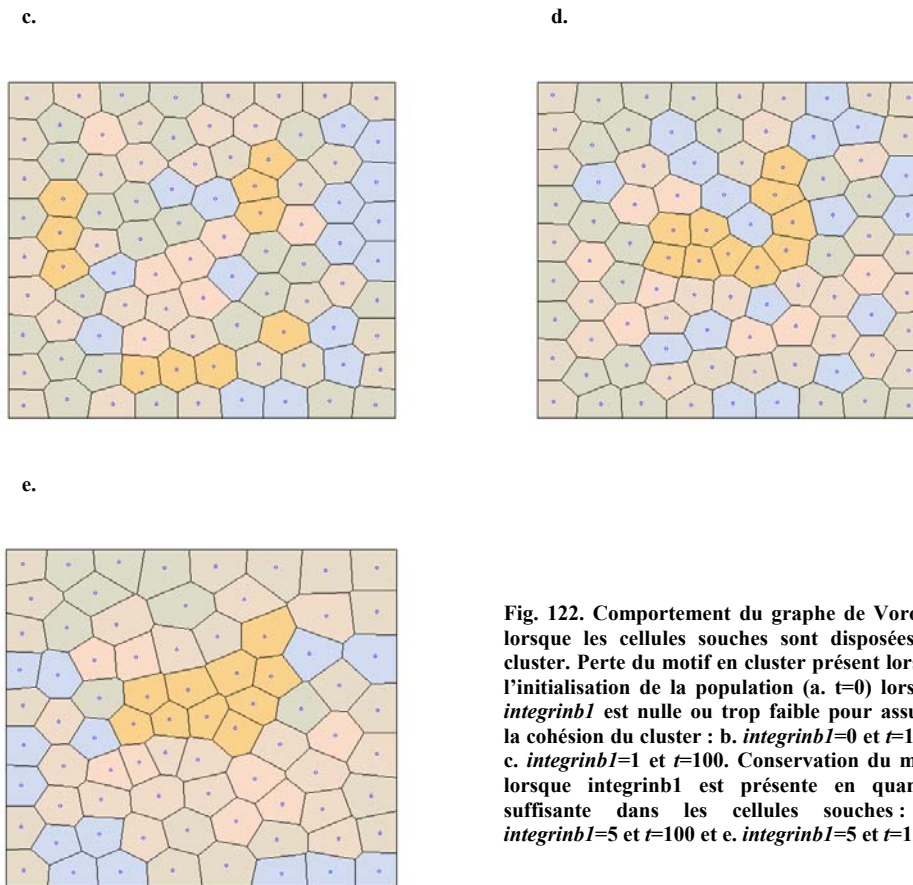


Fig. 122. Comportement du graphe de Voronoï lorsque les cellules souches sont disposées en cluster. Perte du motif en cluster présent lors de l'initialisation de la population (a. $t=0$) lorsque *integrin1* est nulle ou trop faible pour assurer la cohésion du cluster : b. *integrin1*=0 et $t=100$; c. *integrin1*=1 et $t=100$. Conservation du motif lorsque *integrin1* est présente en quantité suffisante dans les cellules souches : d. *integrin1*=5 et $t=100$ et e. *integrin1*=5 et $t=120$.

Sous certaines conditions, le modèle permet donc la conservation d'agrégats cellulaires au cours des simulations dynamiques. L'avantage éventuel de telles structures sur une répartition homogène des cellules souches dans le plan de la couche basale est discuté plus loin lors de la simulation d'états homéostatiques.

d. Simulations lors de cas particuliers

Des simulations de cas particuliers ont été réalisées afin de permettre l'étude du comportement d'une cellule soumise à l'effet de son environnement. La population initiale a été utilisée mais les paramètres de la plupart des cellules ont été ajustés pour permettre d'étudier l'effet de gradients de *EGF* et de *TGFb* sur la prolifération d'une cellule.

i. Induction de la prolifération d'une cellule par son voisinage

- Voisinage proche

Les cellules de la population sont toutes initialisées sans facteurs extracellulaires ni récepteurs. Une cellule est initialisée au centre de la population qui possède des récepteurs *EGFr* ($EGFr=5$) mais pas de *EGF* ($EGF=0$). Elle possède aussi les récepteurs *TGFbr* considérés comme typiques d'une cellule souche ($TGFbr=10$) et une quantité de facteurs *TGFb* faible ($TGFb=1$) permettant de ne pas occulter l'action, même minime, de *p27* lorsque la population contient *TGFb* en faible quantité. Les cinq cellules constituant le voisinage immédiat de la cellule étudiée possèdent des facteurs de croissance ($EGF=5$) mais pas de récepteurs *EGFr* ($EGFr=0$). La **Fig. 123** montre l'évolution de la population dans le temps.

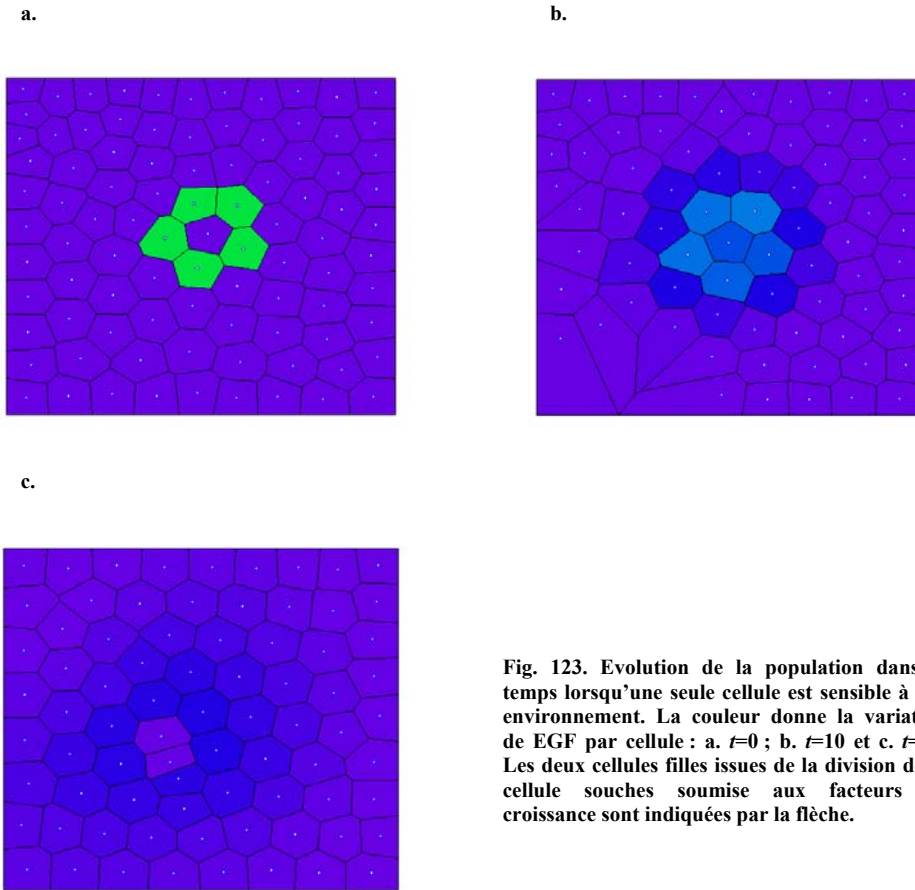


Fig. 123. Evolution de la population dans le temps lorsqu'une seule cellule est sensible à son environnement. La couleur donne la variation de EGF par cellule : a. $t=0$; b. $t=10$ et c. $t=62$. Les deux cellules filles issues de la division de la cellule souches soumise aux facteurs de croissance sont indiquées par la flèche.

Le temps de cycle de la cellule souche initialisée au centre de la population a été de 61.31 u.a. Comme dans le cas du modèle moléculaire considéré seul, il est possible de raccourcir légèrement la durée de la phase G_1 de cette cellule en augmentant la quantité de *EGF* présente dans les cellules voisines de la cellule considérée même si l'amplitude de cette variation reste faible. L'évolution des quantités de protéines présentes dans la cellule soumise au stimulus de *EGF* est détaillée dans le **Fig. 124**.

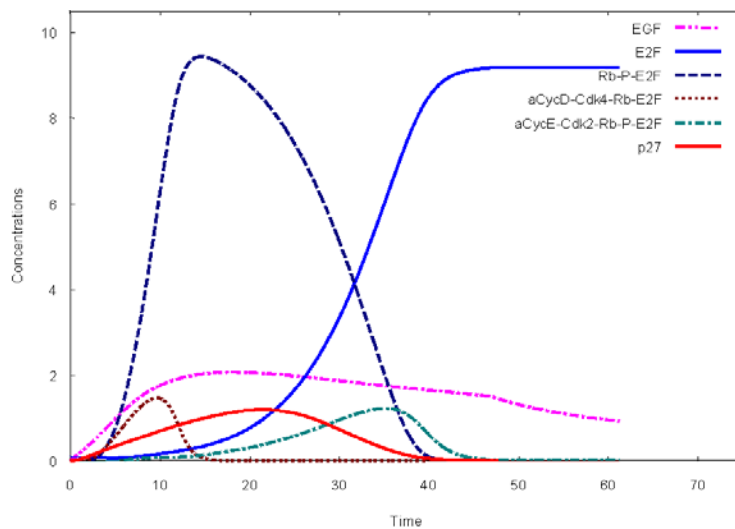


Fig. 124. Cinétique du modèle moléculaire de la cellule présente au centre de la population.

La légère diminution de *EGF* observée lorsque la cellule passe le point de restriction est lié à l'implémentation du modèle qui rend compte de l'insensibilité de la cellule à son environnement par l'arrêt du calcul des concentrations des protéines après le passage du point de restriction. La quantité de *EGF* varie alors puisque ce facteur diffuse dans l'environnement.

- Voisinage lointain

Dans ce cas, les cellules de la population sont toutes initialisées sans facteurs extracellulaires ni récepteurs. Une cellule est initialisée au centre de la population comme précédemment. Elle possède les mêmes caractéristiques ($EGFr=5$, $EGF=0$, $TGFbr=10$ et $TGFb=1$), ce qui n'est pas le cas des cellules situées sur le bord de la population qui possèdent des facteurs de croissance ($EGF=5$) mais pas de récepteurs à ces facteurs ($EGFr=0$). La **Fig. 125** montre l'évolution de la population dans le temps.

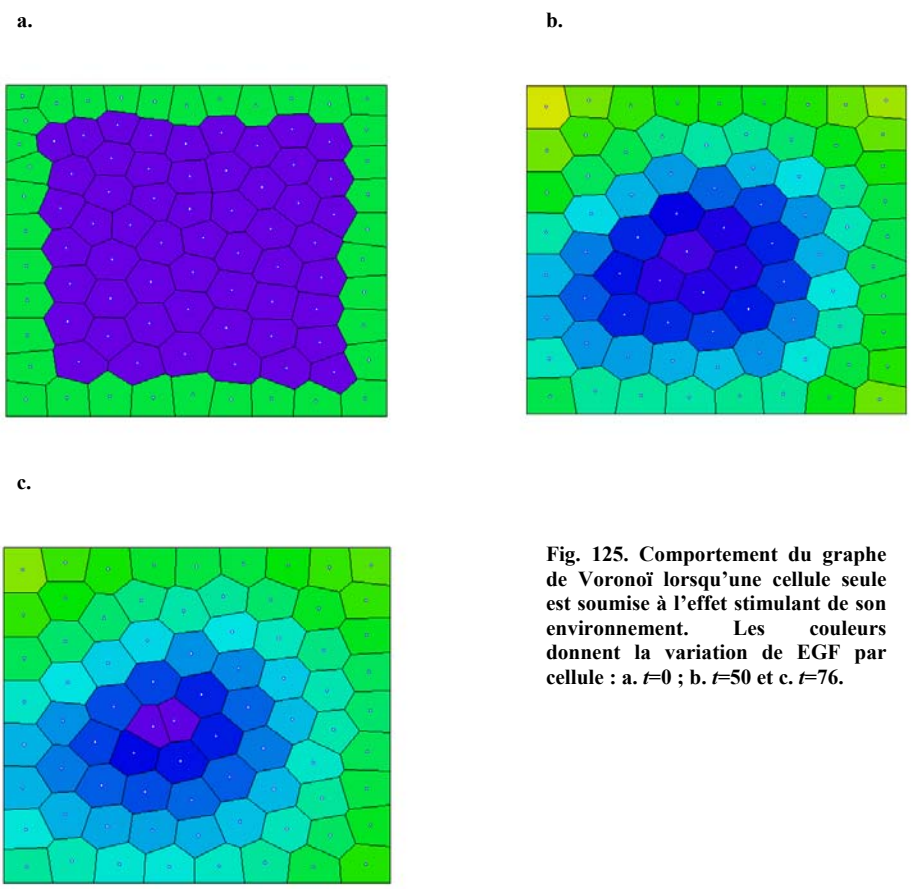


Fig. 125. Comportement du graphe de Voronoï lorsqu'une cellule seule est soumise à l'effet stimulant de son environnement. Les couleurs donnent la variation de *EGF* par cellule : a. $t=0$; b. $t=50$ et c. $t=76$.

Le temps de cycle de la cellule « souche » initialisée au centre de la population a été de 75.68 u.a. L'évolution des quantités de protéines présentes dans la cellule soumise au stimulus de *EGF* est donnée par la **Fig. 126**.

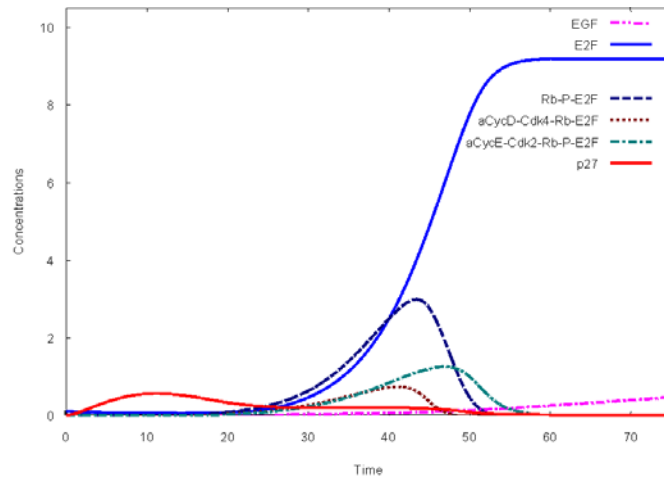


Fig. 126. Cinétique du modèle moléculaire de la cellule présente au centre de la population.

Le temps nécessaire à la diffusion des facteurs *EGF* des bords de la population vers son centre entraîne donc un allongement de la durée du cycle cellulaire de la cellule placée au centre de la population.

ii. Inhibition de la prolifération d'une cellule par son voisinage

- Voisinage proche peu inhibiteur

Afin de mesurer l'influence d'un gradient de *TGFb* sur une cellule, des simulations ont été réalisées avec une approche complémentaire à celles réalisées pour *EGF*. Les cellules de la population sont toutes initialisées sans facteurs extracellulaires ni récepteurs. Une cellule est initialisée au centre de la population qui possède des récepteurs *EGFr* ($EGFr=5$) et des récepteurs *TGFbr* ($TGFbr=10$) mais pas de *EGF* ($EGF=0$) ni de *TGFb* ($TGFb=0$). Les cinq cellules constituant son voisinage immédiat possèdent des facteurs de croissance ($EGF=5$) et des facteurs de différenciation ($TGFb=5$) mais pas de récepteurs *EGFr* ($EGFr=0$) ni *TGFbr* ($TGFbr=0$). La **Fig. 127** montre l'évolution de la population dans le temps.

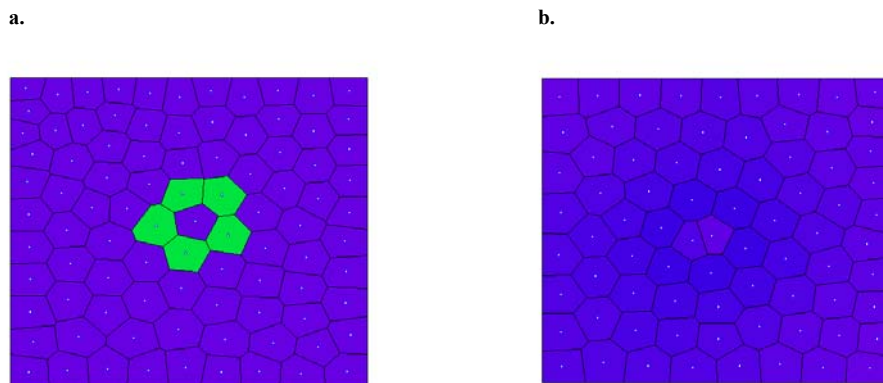


Fig. 127. Comportement du graphe de Voronoï lorsqu'une seule cellule est soumise à l'effet stimulant de son environnement. La couleur donne la variation de *TGFb* par cellule : a. $t=0$ et b. $t=96$.

Le temps de cycle de la cellule « souche » initialisée au centre de la population a été de 95.23 u.a. Comme dans le cas du modèle moléculaire considéré seul, il est possible de raccourcir légèrement la durée de la phase G_1 de cette cellule en augmentant la quantité de *EGF* présente dans les cellules voisines de la cellule considérée même

si l'amplitude de cette variation reste faible (données non montrées). L'évolution des quantités de protéines présentes dans la cellule soumise au stimulus de *EGF* est illustrée par la **Fig. 128a**.

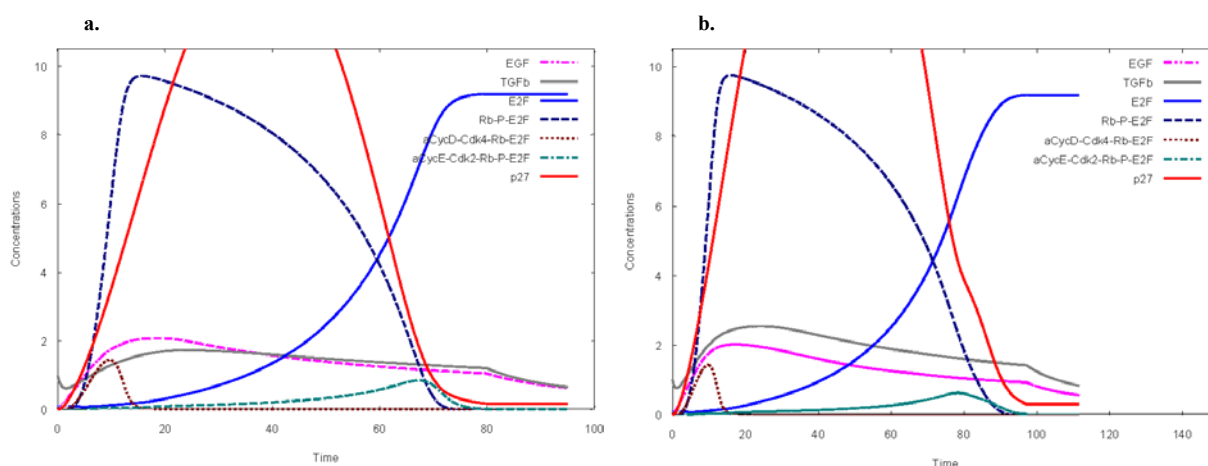


Fig. 128. Cinétique du modèle moléculaire de la cellule présente au centre de la population dans des conditions différentes : a. $TGFb=5$ et b. $TGFb=7$.

Le cas où l'inhibiteur est présent en quantité plus importante dans le voisinage proche de la cellule ($TGFb=7$) permet de retrouver le comportement caractéristique des cellules souches en fonction de $TGFb$, soit un allongement très important de la durée de la phase G_1 pour une variation faible de la quantité de $TGFb$ (**Fig. 128b**). Le temps de cycle de la cellule est alors de 115.34.

- Voisinage lointain

Des simulations ont été lancées où les quantités de $TGFb$ sont importantes dans les cellules du bord de la population. A nouveau, les cellules de la population sont toutes initialisées sans facteur extracellulaire ni récepteur. Une cellule est initialisée au centre de la population qui possède des récepteurs $EGFr$ ($EGFr=5$) et des récepteurs $TGFbr$ ($TGFbr=10$) mais pas de EGF ($EGF=0$) ni de $TGFb$ ($TGFb=0$). Les cinq cellules constituant son voisinage immédiat possèdent des facteurs de croissance ($EGF=5$) mais pas de facteurs de différenciation ni de récepteurs $EGFr$ ($EGFr=0$) ni $TGFbr$ ($TGFbr=0$). Les **Fig. 129a** et **129b** montrent l'évolution de la quantité des protéines du modèle moléculaire lorsque les cellules du bord possèdent des facteurs $TGFb$ en quantités variables : $TGFb=5$ et $TGFb=10$.

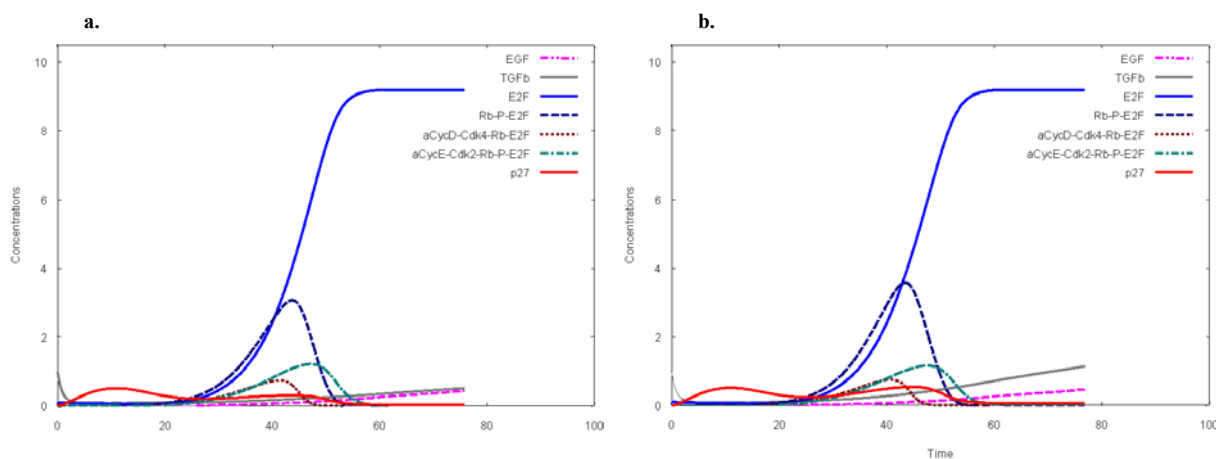


Fig. 129. Cinétique du modèle moléculaire de la cellule présente au centre de la population. a. $TGFb=5$ et b. $TGFb=10$.

Lorsque $TGFb=5$ la durée du cycle cellulaire est de 77.21 u.a. alors que lorsque $TGFb=10$ cette durée est de 78.12 u.a. $TGFb$ se montre donc un très mauvais inhibiteur à distance lorsque les cellules sont stimulées par leur cellules directement voisines.

iii. Contrôle de la prolifération par les couches suprabasales

Même si la représentation du tissu dans le plan frontal ne tient pas compte des couches suprabasales, le modèle intègre la possibilité de la régulation de la prolifération de la couche basale par les cellules des couches suprabasales. A chaque pas de la simulation, une quantité de facteurs extracellulaires peut être ajoutée à la population et distribuée à chaque cellule de la population en fonction de sa surface, i.e. de sa surface potentielle de communication avec les couches suprabasales. Deux paramètres sont définis pour la population qui sont les quantités de EGF et de $TGFb$ disponibles à chaque pas de calcul : $SuprabasalEGF$ et $SuprabasalTGFb$.

Des simulations ont été réalisées pour illustrer l'effet de ce contrôle sur le comportement de la population cellulaire. C'est principalement $TGFb$ qui s'est révélé important dans ce contexte. La **Fig. 130** montre l'influence du gradient sur la population. Les paramètres de la population cellulaire sont identiques à ceux de la simulation correspondant à l'inhibition par un voisinage proche (**Fig. 127**).

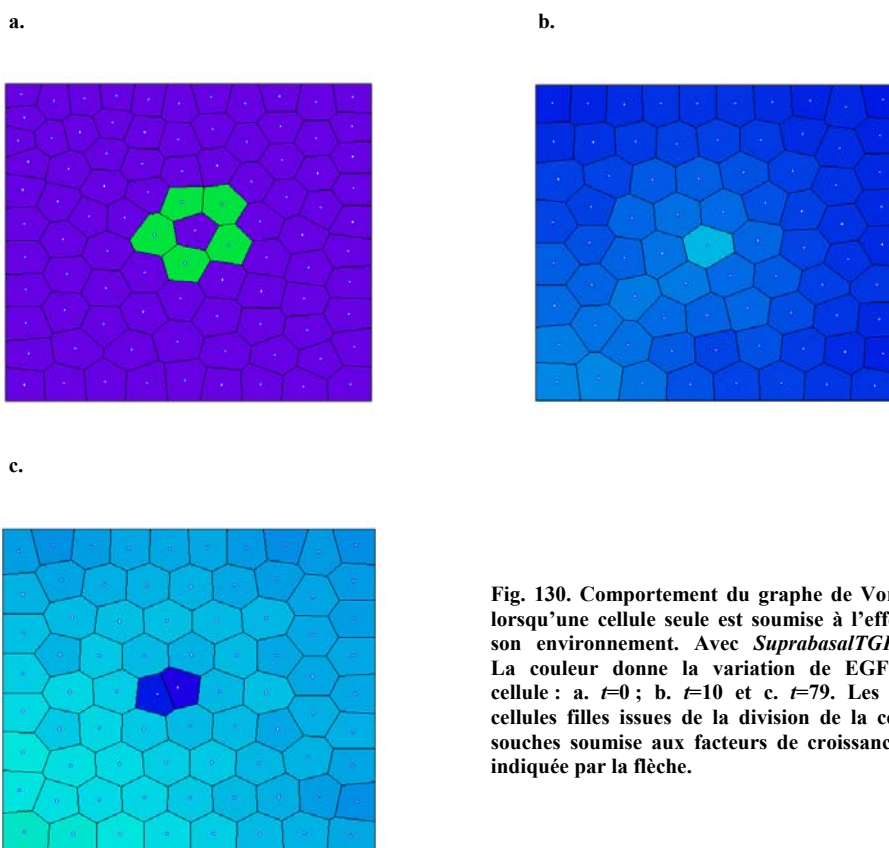


Fig. 130. Comportement du graphe de Voronoï lorsqu'une cellule seule est soumise à l'effet de son environnement. Avec $SuprabasalTGFb=2$. La couleur donne la variation de EGF par cellule : a. $t=0$; b. $t=10$ et c. $t=79$. Les deux cellules filles issues de la division de la cellule souches soumise aux facteurs de croissance est indiquée par la flèche.

Le temps de cycle de la cellule « souche » initialisée au centre de la population qui était de 95.23 u.a. sans apport de $TGFb$ par les cellules des couches suprabasales devient alors 105.06 u.a. L'apport de $TGFb$ permet donc de contrôler la durée de la phase G_1 . Il est susceptible de toucher chacune des cellules de la population. L'évolution des quantités de protéines présentes dans la cellule soumise au gradient de $TGFb$ est décrite dans le **Fig. 131**.

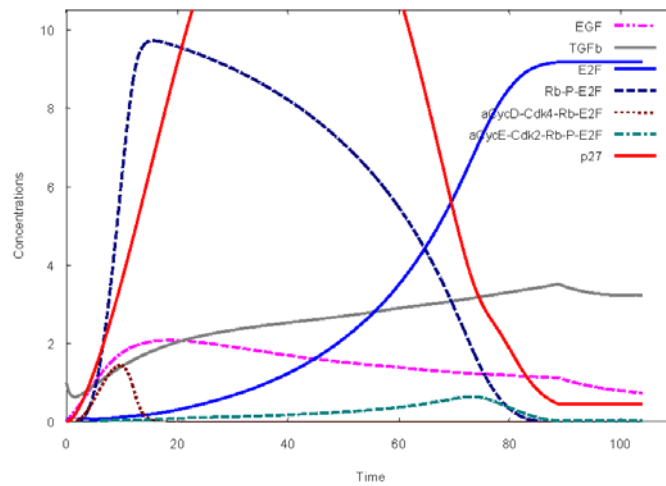


Fig. 131. Cinétique du modèle moléculaire de la cellule présente au centre de la population lorsqu'un gradient est ajouté à la population pour modéliser l'influence des couches suprabasales : a. Reprenant les paramètres de la Fig. 137 et b. Reprenant les paramètres de la Fig. 138 et 139.

Le plateau que semble atteindre *p27* à la fin de la simulation est un artefact du modèle. En effet, le modèle moléculaire étant dédié à la transition G_1/S , le programme ne calcule plus les variations de concentrations intracellulaires une fois que la cellule a passé le point de restriction. La baisse de la quantité de *EGF* au même moment correspond donc au moment où la cellule n'utilise plus les facteurs *EGF* de son environnement, ce sont donc ses voisins qui les utilisent à sa place.

iv. Conclusion

Ces cas particuliers ont présenté le fonctionnement dynamique des aspects environnementaux et leur influence sur une cellule de la population. Les facteurs *EGF* sont très efficaces dans l'induction de la prolifération d'une cellule à la fois lorsque celle-ci est proche de la source de facteurs ou éloignée. Par contre les facteurs *TGFb* sont moins efficaces lorsque la cellule est éloignée de la source. Ceci est un comportement intéressant qui n'apparaissait pas lorsque le modèle était considéré pour une cellule seule (Partie I), une plus grande quantité de *TGFb* est proportionnellement nécessaire à la cellule pour assurer efficacement un ralentissement de sa prolifération sous effet inhibiteur lorsque *EGF* est déjà présent dans la population au début de la phase G_1 . En extrapolant ce résultat à une population de cellules, il semble donc qu'il soit important pour la population d'assurer des quantités de *EGF* et de *TGFb* minimum constante dans la couche basale et d'ajuster le contrôle par des variations plus rapides mais très faibles. Dans ce cadre, la diffusion des facteurs dans le plan de la couche basale permettrait plutôt d'homogénéiser les concentrations de facteurs extracellulaires entre les cellules qui seraient alors régulées par les apports des couches suprabasales.

2. Cas d'une population cellulaire épithéliale stratifiée en coupe transversale

Après de nombreux efforts, notre modèle s'est révélé trop difficile à appliquer pour permettre la modélisation de l'homéostasie dans le cas d'une coupe transversale. Malgré ces limitations, nous avons voulu étudier la différence de comportement dynamique de simulations dans le plan transversal plutôt que frontal. Il s'agissait avant tout de montrer l'intérêt d'un développement de notre approche dans cette direction dans l'espoir que nous pourrions étendre le modèle en 3D. Cette extension reste à réaliser.

Tout d'abord il s'agissait de vérifier les paramètres physiques impliqués dans la migration des cellules engagées dans la différenciation de la couche basale vers la couche supérieure du tissu. Une population « type » a été définie (Fig. 132) et, à l'instar des simulations en coupe frontale, a été utilisée comme état initial dans toutes les simulations.

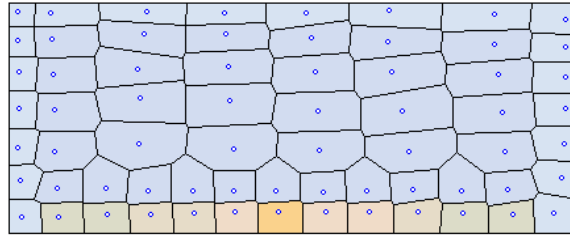


Fig. 132. Morphologie de la population témoin. Dix cellules souches sont présentes dans la population dont la composition résulte des simulations déterministes décrites ci-dessus.

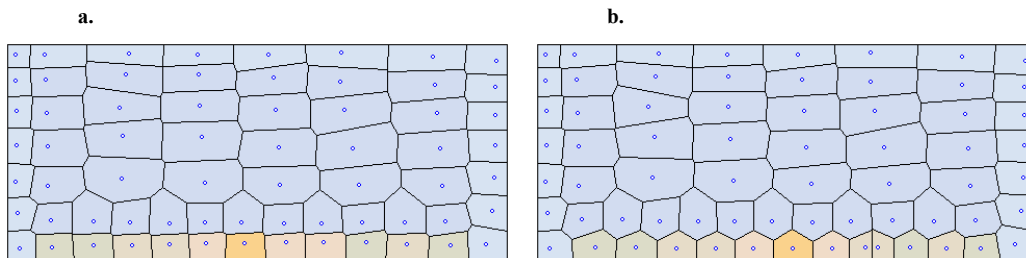
Les cellules des couches suprabasales sont considérées comme étant des cellules en maturation qui expriment des facteurs *EGF* et *TGFb* alors que les cellules de la couche basale peuvent être des cellules souches, en transit ou bien engagées dans le processus de différenciation.

b. Interactions biochimiques

Le comportement du modèle est identique et l'on retrouve exactement les mêmes types de comportements que dans le cas des coupes frontales : division cellulaire stimulée ou inhibée par des gradients de facteurs *EGF* et *TGFb*.

c. Interactions physiques

Le seul mécanisme qui n'était pas modélisable à l'aide des simulations de coupes frontales est la migration des cellules de la couche basale vers les couches suprabasales. Dans le modèle, *integrinb4* assure l'adhérence des cellules de la couche basale à la membrane basale par son association avec le facteur *laminin* de celle-ci. Les cellules de la couche basale exercent une répulsion les unes envers les autres leur permettant de conserver une taille constante lors des simulations. Les cellules engagées dans la différenciation n'expriment plus d'*integrinb4* dès qu'elles perdent le contact avec la membrane basale. Ainsi il a été possible de simuler la migration de cellules basales vers la couche suprabasale. Ce processus est illustré par la **Fig. 133**. Il n'a cependant pas été possible de retrouver des comportements plus stables dans le temps qui prendraient en compte à la fois la migration vers les couches suprabasales des cellules de la couche basale engagées dans la différenciation et la prolifération des cellules souches et en transit restant dans le plan de la couche basale.



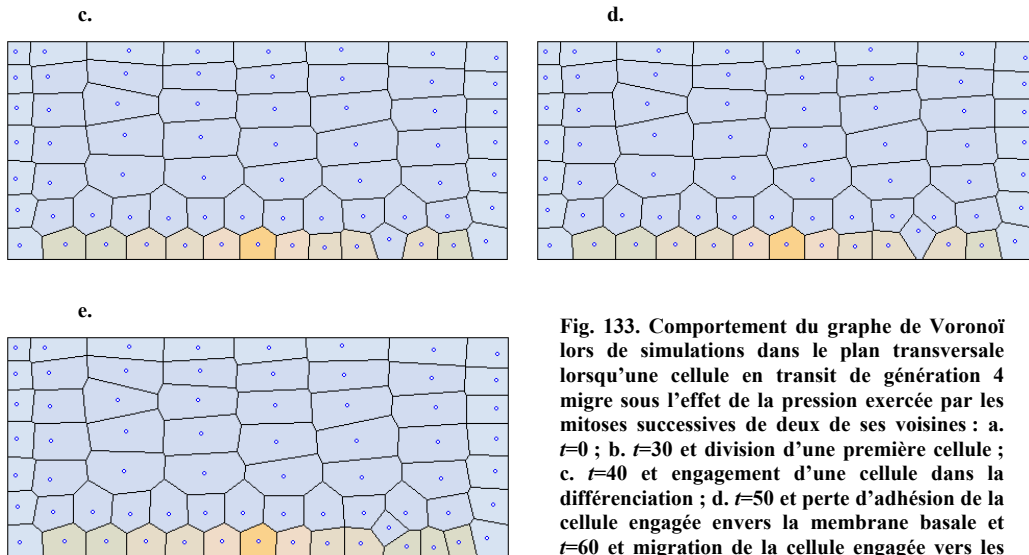


Fig. 133. Comportement du graphe de Voronoï lors de simulations dans le plan transversale lorsqu'une cellule en transit de génération 4 migre sous l'effet de la pression exercée par les mitoses successives de deux de ses voisines : a. $t=0$; b. $t=30$ et division d'une première cellule ; c. $t=40$ et engagement d'une cellule dans la différenciation ; d. $t=50$ et perte d'adhésion de la cellule engagée envers la membrane basale et $t=60$ et migration de la cellule engagée vers les couches supérieures du tissu.

Le modèle physique que nous avons conçu n'était visiblement pas assez efficace pour assurer la maintenance de la structure d'une telle population (cf. différence dans la structure des couches supérieures entre **Fig. 133a** et **e**). N'ayant pas la possibilité de poursuivre ces simulations dans cette direction pour obtenir des comportements homéostatiques nous avons renoncé à ce type de simulations. Cependant, elles nous semblent très intéressantes pour montrer l'intérêt d'une approche en 3 dimensions qui permettrait d'intégrer au sein d'une seule visualisation l'ensemble de ces relations que nous avons qualifié de physiques et biochimiques. C'est certainement une voie dans laquelle se diriger par la suite.

3. Conclusion

Ces simulations ont permis de comprendre le fonctionnement du modèle sous deux angles de vue différents : coupes frontale et transversale. Dans le cas des coupes frontales, il est possible de modéliser les relations entre les cellules placées dans ce plan mais aussi l'apport de facteurs extracellulaires de couches suprabasales vers la couche basale. Ces simulations ont montré que le modèle n'était pas adapté à la simulation de variations brusques à longue distance dans le plan de la couche basale mais plutôt au maintien de conditions équilibrées alors que les variations plus importantes peuvent être intégrées plutôt par les apports des couches suprabasales. Cependant, l'étude du comportement du modèle dans le cas de coupes transversale s'est montrée très décevante. Elle nous a seulement permis de montrer que le modèle tel qu'il a été implémenté permet de simuler la migration des cellules engagées dans la différenciation vers les couches suprabasales sous l'effet conjugué de la perte d'adhésion envers la membrane basale et de la répulsion exercée par d'autres cellules de la couche basale, notamment lorsqu'elles se divisent et cherchent donc à augmenter leur contact avec la membrane basale.

III. Simulations de l'homéostasie

En utilisant les connaissances du comportement dynamique du modèle moléculaire acquises lors des simulations précédentes, les meilleures conditions ont été recherchées pour simuler l'homéostasie d'un tissu épithélial stratifié en obtenant un modèle de couche basale au comportement le plus stable possible et dont la prolifération dépend des facteurs environnementaux (gradients de facteurs *EGF* et *TGF β*).

1. Définition de populations cellulaires de référence

Lors des simulations semi-déterministes, contrairement aux simulations déterministes, le comportement des cellules est régulé par leur environnement. L'initialisation de la population cellulaire est donc crucial pour espérer obtenir des états stables, homéostatiques. En effet, il n'est pas possible d'initialiser une population de 10 cellules souches pour atteindre un état stable comme dans le cas des simulations déterministes, leur environnement montrerait des variations trop brusques et ne correspondrait alors pas à celui d'un contrôle homéostatique. Ainsi, nous avons choisi d'initialiser les populations à partir de certains paramètres décrivant les populations stables obtenues lors des simulations déterministes. Ces paramètres sont le type des cellules, leur position et leur âge. Les cellules sont alors initialisées une à une par le programme de simulation qui calcule l'état moléculaire correspondant à leur âge. Une population « type » est ainsi obtenue qui peut-être utilisée comme état initial dans toutes les simulations. Deux types de populations ont été distingués : population dans laquelle la répartition des cellules souches est homogène (**Fig. 134a**) et population dans laquelle les cellules souches sont disposées en agrégats (**Fig. 134b**).

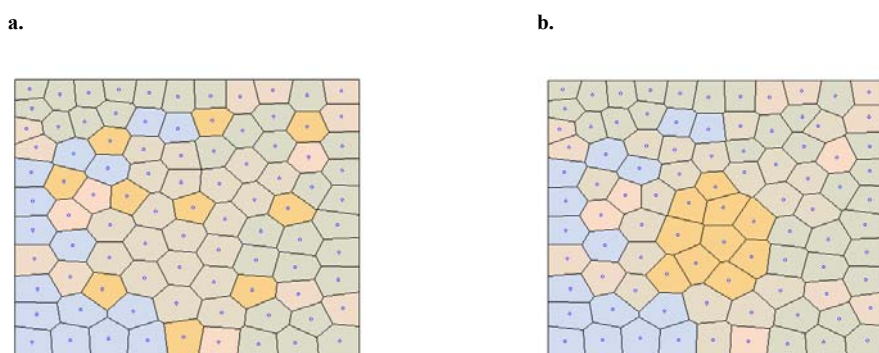


Fig. 134. Morphologie des deux types de populations considérés. Dix cellules souches sont présentes dans la population dont la composition résulte des simulations déterministes décrites ci-dessus. a. La répartition des cellules souches est homogène dans la population et b. Les cellules souches sont rassemblées en agrégat au centre de la population.

2. Cellules souches réparties de façon homogène

Les simulations des cas particuliers nous ont montré que c'est en induisant des variations de l'apport des facteurs extracellulaire par les couches suprabasales que le contrôle de la durée du cycle des cellules de la couche basale est le plus précis. Ces résultats ont été corroborés par les simulations suivantes.

a. Sans gradient des couches suprabasales

Lorsqu'il n'y a pas d'apport de facteur *EGF* ni *TGFb* ($SupraBasalEGF=0$ et $SupraBasalTGFb=0$) les simulations montrent un comportement logique par rapport au modèle de contrôle moléculaire. Les cellules souches ou en transit cessent de se diviser et les cellules engagées disparaissent lorsque la durée de leur présence dans la population est écoulée (**Fig. 135 et 136**). Paradoxalement, la population semble donc adopter un état stable. Il s'agit tout simplement du fait que dans le modèle, si les conditions sont réunies (suffisamment peu de *EGF*), la durée de la phase G1 des cellules souches ou en transit peut s'allonger indéfiniment.

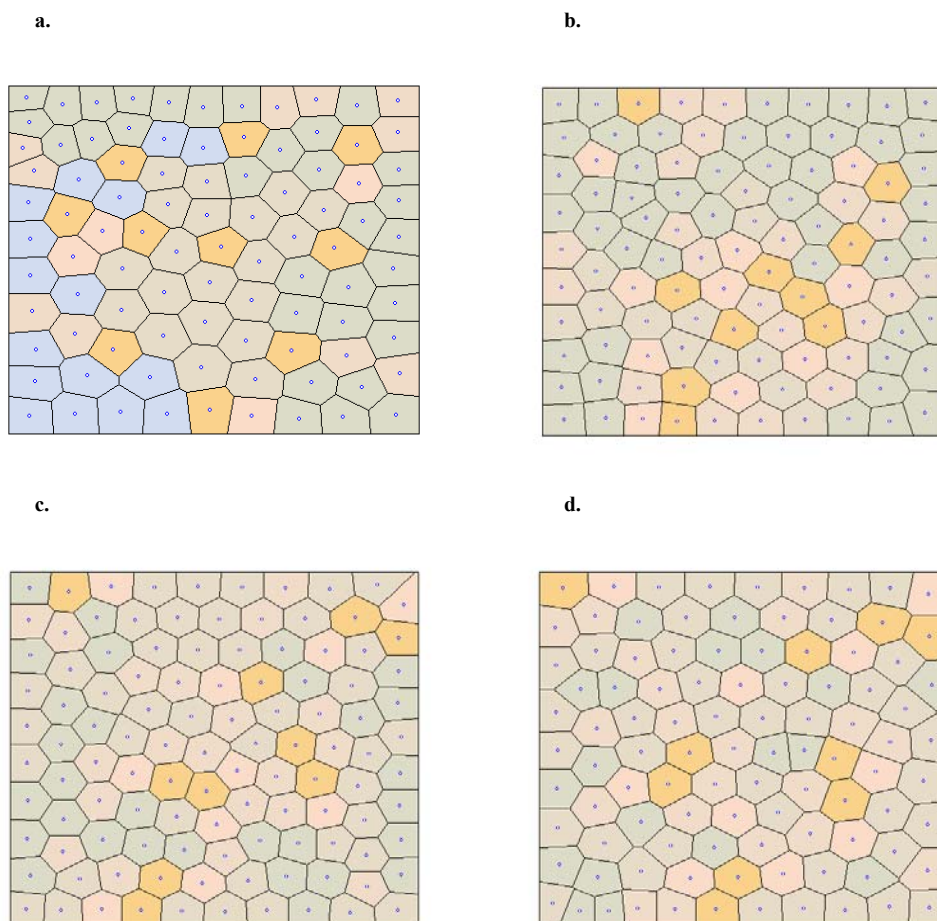


Fig. 135. Simulation avec une répartition homogène des cellules souches et un apport suprabasal nul de *EGF* et *TGFb*. a. $t=0$; b. $t=300$; c. $t=600$ et d. $t=900$.

La courbe illustrant l'évolution de la quantité globale de *EGF* et de *TGFb* dans la population montre l'épuisement de ces ressources (**Fig. 136b**) alors que la population atteint un état artificiellement stable. Notons que la sous-population de cellules engagées disparaît de la population (**Fig. 136a**).

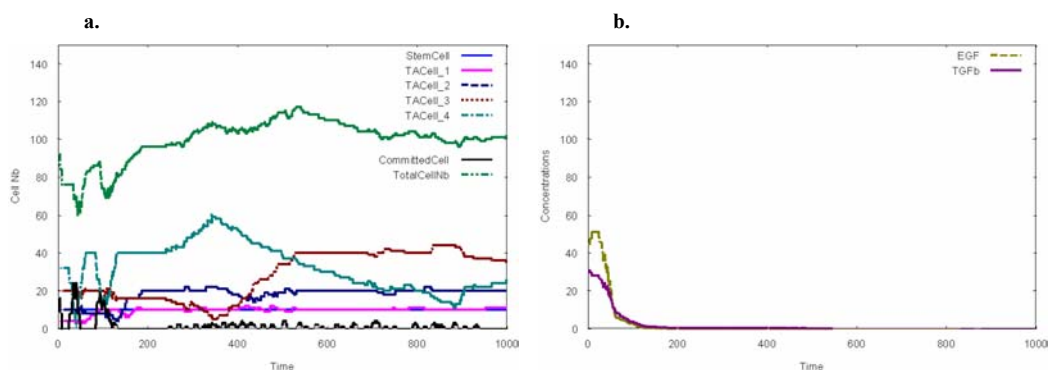


Fig. 136. Evolution des caractéristiques de la population au cours de la simulation. a. Cinétique de l'évolution des différentes sous populations cellulaires et b. Cinétique de l'évolution des quantités de *EGF* et *TGFb* totales dans la population (pour plus de lisibilité les valeurs de *EGF* et *TGFb* ont été multipliées d'un facteur 10).

La quantité initiale de *EGF* et de *TGFb* n'était pas nulle. En effet, lorsque la population est initialisée à partir d'une population dite « de référence » obtenue par simulation, les cellules possèdent les quantités de facteurs de

croissance et de différenciation correspondant aux conditions initiales du modèle moléculaire définies lors de la Partie I des résultats ($EGF=5$ et $TGFb=7$). On peut considérer cette situation comme un artefact du modèle.

b. Avec un gradient déséquilibré

i. Apport de $TGFb$ en excès important par rapport à EGF

Lorsque l'apport de facteur EGF et $TGFb$ est excessivement déséquilibré en faveur de $TGFb$ ($SupraBasalEGF=0.1$ et $SupraBasalTGFb=10$) les simulations montrent une diminution régulière de la taille de la population caractérisée par une chute de la quantité de cellules en transit de toutes les générations à l'exception de la quatrième génération (**Fig. 138**). Dans un premier temps, celles-ci sont moins sensibles aux facteurs $TGFb$ que les cellules souches et continuent à se diviser tant que la quantité de $TGFb$ est suffisamment faible. Ensuite, le rapport entre $TGFb$ et EGF est trop important et les cellules sont bloquées en phase G_1 .

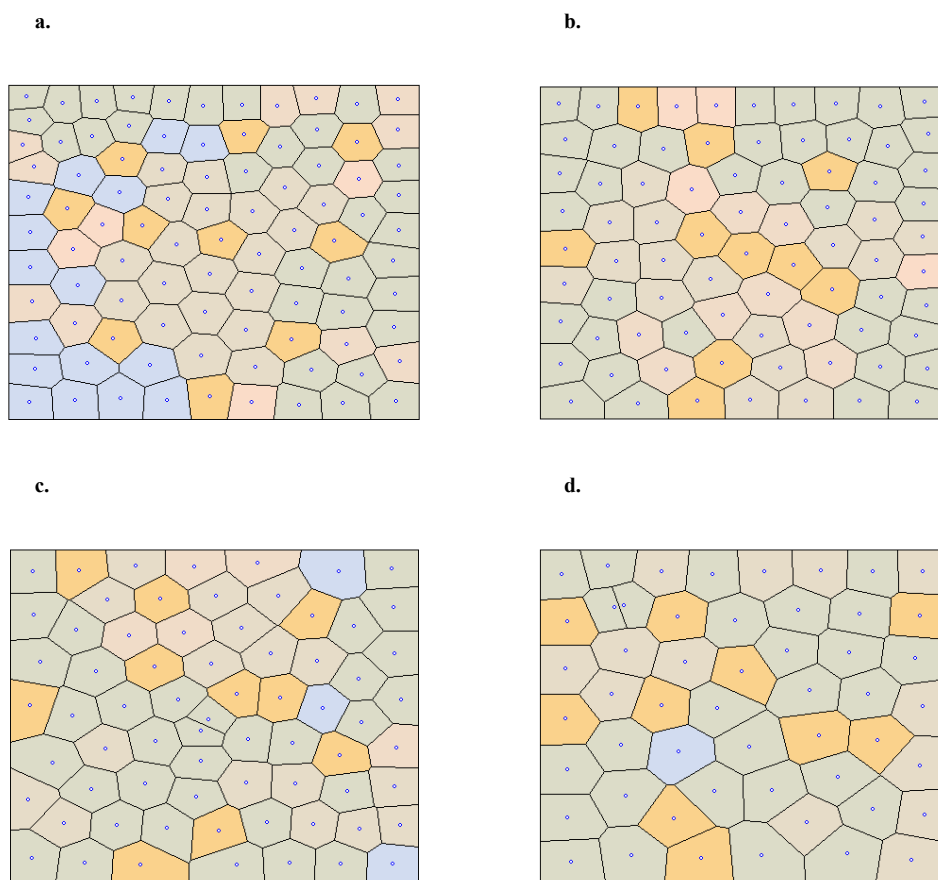


Fig. 137. Comportement du graphe de Voronoï lorsque la répartition des cellules souches est homogène dans la population. a. $t=0$; b. $t=150$; c. $t=300$ et d. $t=380$. Avec $SupraBasalEGF=0.1$ et $SupraBasalTGFb=10$.

Il est intéressant de noter que dans le cas des cellules souches c'est $p27$ qui est principalement responsable de cet arrêt alors que dans le cas des cellules en transit c'est $p15$ qui est l'acteur principal de l'inhibition de la prolifération. Ces résultats montrent que le comportement du modèle moléculaire est le même que celui décrit par la **Fig. 138**.

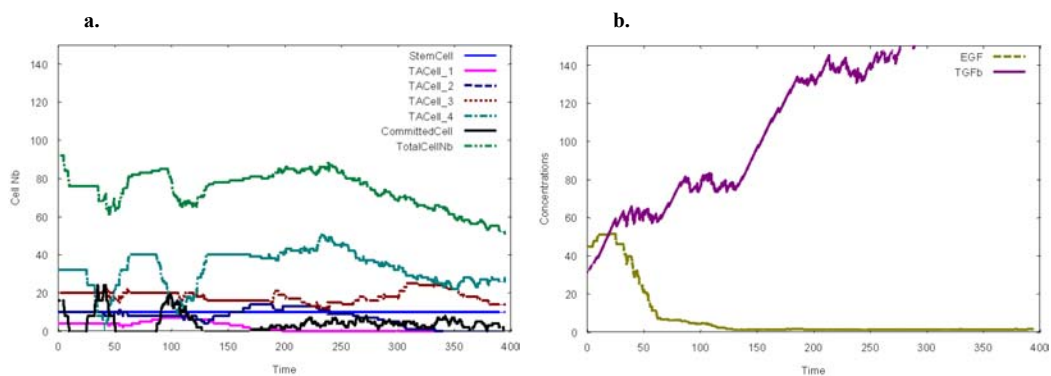


Fig. 138. Evolution des caractéristiques de la population au cours de la simulation. a. Cinétique de l'évolution des différentes sous populations cellulaires et b. Cinétique de l'évolution des quantités de *EGF* et *TGFb* totales dans la population (pour plus de lisibilité les valeurs de *EGF* et *TGFb* ont été multipliée d'un facteur 10).

ii. Apport de *TGFb* en excès léger par rapport à *EGF*

Lorsque l'apport de facteur *EGF* et *TGFb* est excessivement déséquilibré en faveur de *TGFb* ($SupraBasalEGF=0.1$ et $SupraBasalTGFb=2.5$) les simulations montrent une diminution régulière de la taille de la population caractérisée par la disparition de toutes les cellules à l'exception des cellules souches (Fig. 139).

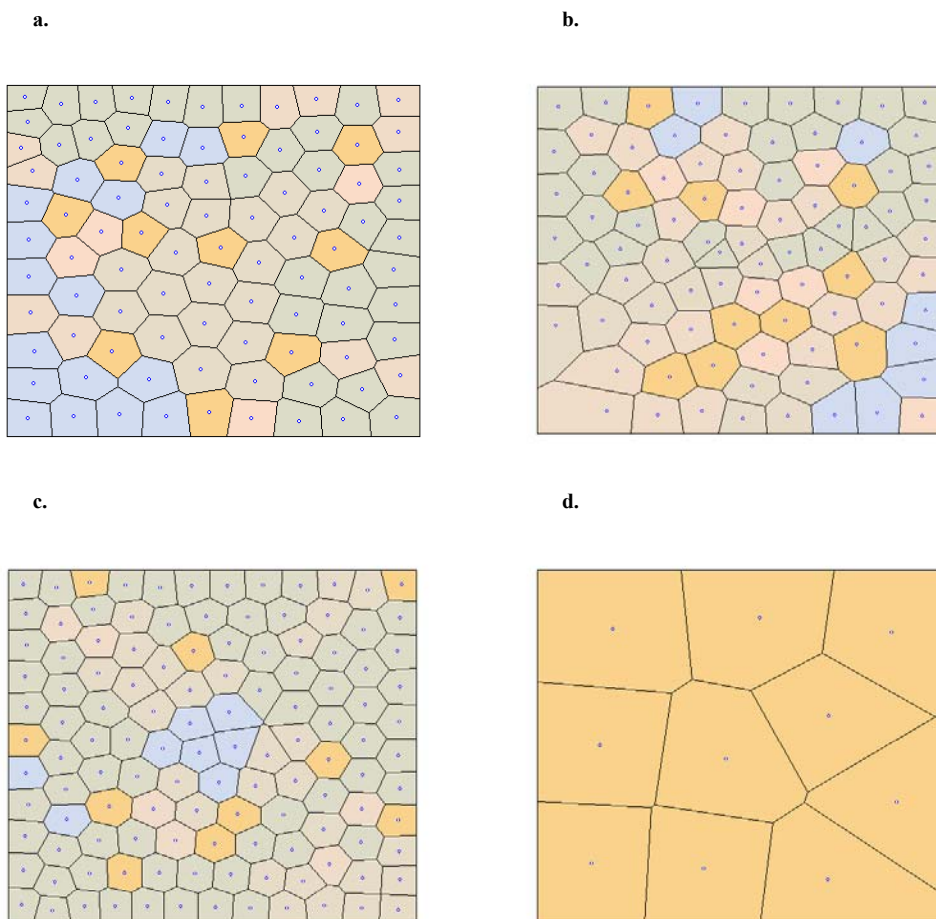


Fig. 139. Comportement du graphe de Voronoï lorsque la répartition des cellules souches est homogène dans la population. a. $t=0$; b. $t=200$; c. $t=400$ et d. $t=640$. Avec $SupraBasalEGF=0.1$ et $SupraBasalTGFb=2.5$.

Cette simulation est très complémentaire de la précédente et montre que dans ce cas le rapport entre *TGFb* et *EGF* n'a pas permis à *p15* de jouer son rôle d'inhibiteur des cellules en transit. Par contre, ce rapport a suffi pour inhiber complètement la prolifération des cellules souches.

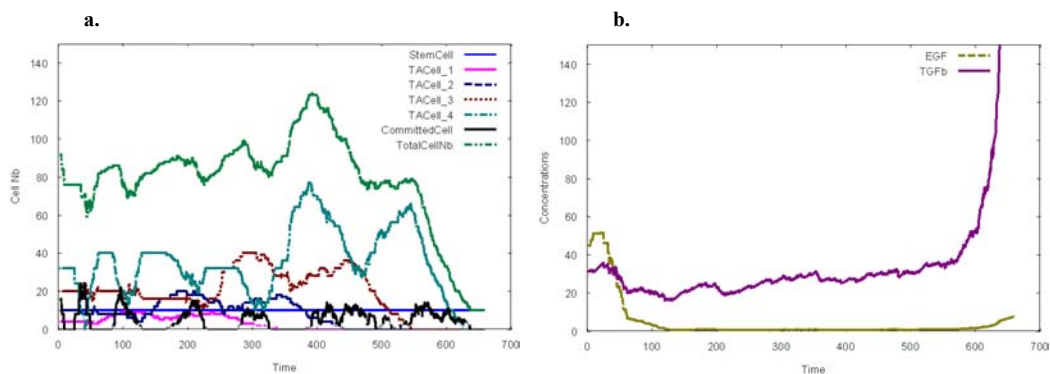
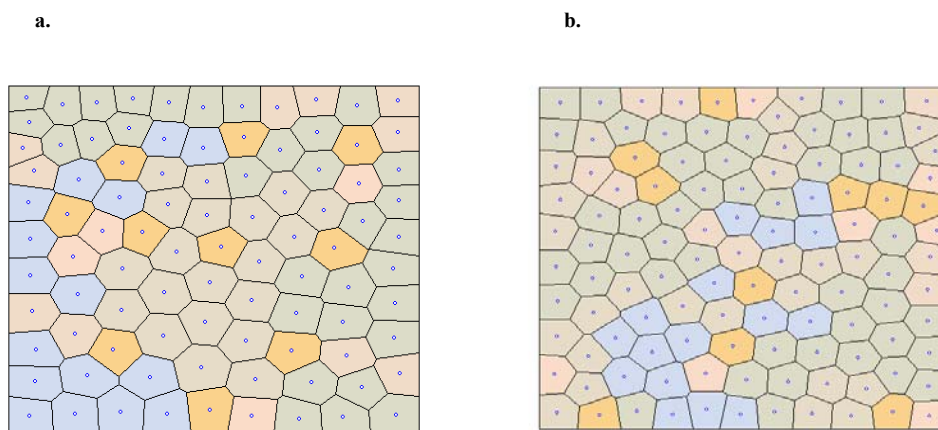


Fig. 140. Evolution des caractéristiques de la population au cours de la simulation. a. Cinétique de l'évolution des différentes sous-populations cellulaires et b. Cinétique de l'évolution des quantités de *EGF* et *TGFb* totales dans la population (pour plus de lisibilité les valeurs de *EGF* et *TGFb* ont été multipliée d'un facteur 10).

Ces simulations montrent que c'est moins les valeurs des facteurs extracellulaires que le rapport entre *EGF* et *TGFb* qui permet de découpler la prolifération des deux compartiments que forment les cellules en transit et les cellules souches.

c. Etat le plus homéostatique possible

L'identification du rapport correct permettant d'obtenir un comportement stable pour la population a posé de nombreux problèmes liés à la fois à la construction du graphe de Voronoï et à la sensibilité du modèle envers les facteurs *TGFb*. Il n'a pas été possible de définir un couple de valeurs pour les apports de *EGF* et *TGFb* permettant d'obtenir une stabilité parfaite du modèle. Les résultats satisfaisant au mieux les critères cinétiques évoqués lors des simulations déterministes sont détaillés par les **Fig. 141** et **Fig. 142**. Le couple de valeurs correspondant à ces simulations est : $SupraBasalEGF=1.0$ et $SupraBasalTGFb=5.1$.



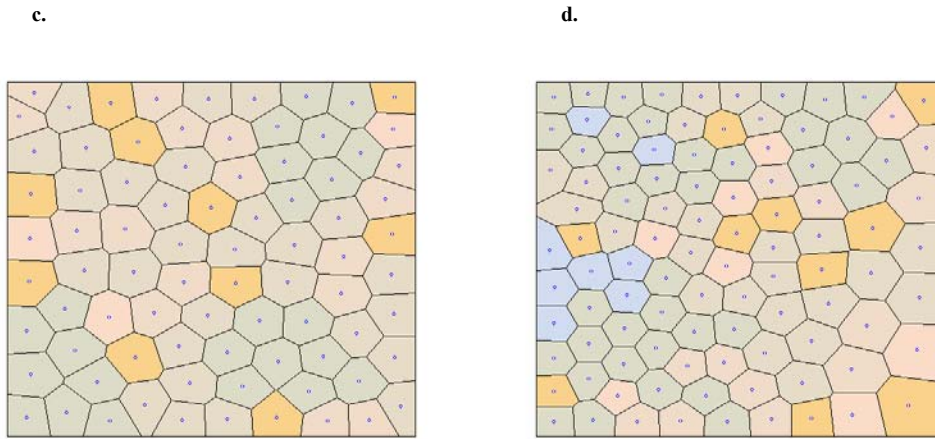


Fig. 141. Comportement du graphe de Voronoï lorsque la répartition des cellules souches est homogène dans la population. a. $t=0$; b. $t=300$; c. $t=600$ et d. $t=900$. Avec $SupraBasalEGF=1.0$ et $SupraBasalTGFb=5.1$.

La population atteint un état stable mais semble le perdre légèrement sur la fin des simulations, ce qui entraîne un léger raccourcissement de la durée de cycle cellulaire des cellules souches, suffisant pour entraîner une légère augmentation du nombre total de cellules (**Fig. 142a**). C'est le résultat le plus probant que nous ayons pu obtenir. Les durées moyennes des cycles cellulaires des cellules souches et des cellules en transit étaient respectivement de 115.12 u.a. et 67.34 u.a. Ces valeurs ne correspondent pas au postulat du modèle déterministe où les cellules souches se divisent deux fois plus lentement que les cellules en transit mais aucune population stable n'a pu être obtenue dans de telles conditions. Ce résultat est intéressant car le modèle moléculaire considéré pour une cellule seule sans environnement (Partie I des résultats) ou même une cellule seule dans un environnement (Partie II) permettait facilement d'obtenir des différences de temps de cycle allant du simple au double.

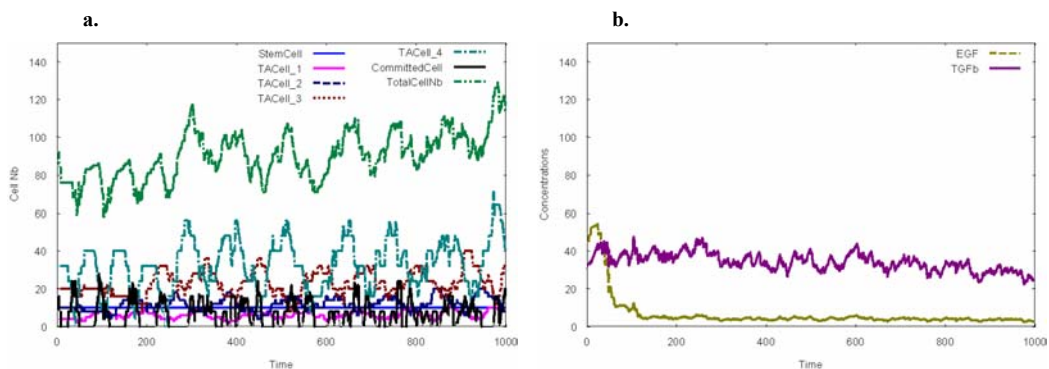


Fig. 142. Evolution des caractéristiques de la population au cours de la simulation. a. Cinétique de l'évolution des différentes sous populations cellulaires et b. Cinétique de l'évolution des quantités de *EGF* et *TGFb* totales dans la population (pour plus de lisibilité les valeurs de *EGF* et *TGFb* ont été multipliée d'un facteur 10).

Nous avons ensuite comparé les proportions moyennes des sous-populations cellulaires (cellules souches, cellules en transit de génération 1, 2, 3 et 4 et cellules engagées) avec les valeurs obtenues lors des simulations déterministes (**Tab. 16**).

Tab. 16. Proportions des sous populations cellulaires présentes dans la couche basale par rapport au nombre de cellules total des modèles déterministes et semi-déterministes et des données expérimentales de Potten *et al.* (Potten *et al.* 74). Avec CS : cellules souches, CT1, CT2, CT3 et CT4 : cellules en transit respectivement de génération 1, 2, 3 et 4 et CC : cellules engagées

	CS	CT1	CT2	CT3	CT4	CC
Modèle déterministe	10.96 %	5.26 %	10.49 %	21.08 %	41.99 %	10.22 %
Modèle semi-déterministe	10.94 %	6.95 %	12.89 %	25.23 %	36.5 %	7.49 %
Potten <i>et al.</i>	12.96 %	3.7 %	7.41 %	22.22 %	27.78 %	25.93 %

La proportion de cellules souches est identique dans le modèle déterministe et dans le modèle semi-déterministe, ce qui était possible étant donné que le nombre total de cellules est resté proche de celui obtenu dans le modèle déterministe : 92 cellules en moyenne (avec un coefficient de variation de 0.10 qui indique des écarts beaucoup plus grands que dans le cas déterministe où un coefficient de variation de 0.03 était observé).

Les effectifs des sous-populations montrent des variations extrêmement élevées : avec des coefficients de variation de 0.27, 0.28, 0.25, 0.35 et 0.89, respectivement pour les cellules en transit de génération 1, 2, 3 et 4 et les cellules engagées. Ces oscillations auraient peut-être été réduites en optimisant la désynchronisation des cellules souches dans la population initiale. Ceci reste cependant à démontrer.

3. Cellules souches en groupes

Pour chercher le meilleur couple *EGF / TGF β* ans le cas des agrégats, nous avons défini le cas le plus simple où toutes les cellules de l'agrégat possèdent un contact avec des cellules en transit et où les divisions cellulaires des cellules souches donnent une cellule souche et une cellule en transit qui est repoussée de l'agrégat par une force centrifuge. Lorsque cette dernière condition n'était pas remplie, toutes nos simulations ont montré l'éclatement des agrégats lors de simulations suffisamment longues.

Dans le cas où la force de cohésion des agrégats de cellules souches est suffisante et la cellule en transit de première génération s'éloigne de l'agrégat de façon centrifuge, le modèle conserve au mieux des agrégats de taille faible où toutes les cellules souches maintiennent un contact avec les cellules en transit connexes à l'agrégat et quelques cellules souches perdent le contact avec les agrégats et se retrouvent isolées. Lorsque la force de cohésion était suffisante pour maintenir les agrégats formés plus longtemps les problèmes de stabilité du graphe de Voronoï augmentaient et il n'était plus possible d'assurer des simulations suffisamment longues pour déduire des résultats intéressants au niveau de la stabilité du comportement homéostatique obtenu.

Les résultats les plus proches de l'homéostasie sont résumés par les **Fig. 143** et **144**. La seule différence notable est visible dans les derniers pas de la simulation, en effet l'agrégation des cellules souches (**Fig. 143a**) empêche les cellules en transit de se disperser de façon homogène dans la population, créant de véritables vagues de cellules en transit puis de cellules engagées dans la différenciation (**Fig. 143d**). Un comportement de ce type est caractéristique du comportement des cellules en transit observé dans la cornée lors de la réponse du tissu à un dommage expérimental (**Lehrer *et al.* 98**). Ceci tendra à montrer qu'il n'est pas nécessaire que les cellules souches soient groupées de façon continue ou en agrégats très cohésifs pour générer de telles vagues de cellules engagées nécessaires à la réparation d'un tissu endommagé. Etant donné les problèmes rencontrés lors des simulations, il convient cependant d'être prudent dans les conclusions qu'il est possible de tirer de ces résultats.

De fait, les résultats sont extrêmement similaires de ceux obtenus à l'aide des populations où les cellules souches sont disposées de façon homogène dans la population.

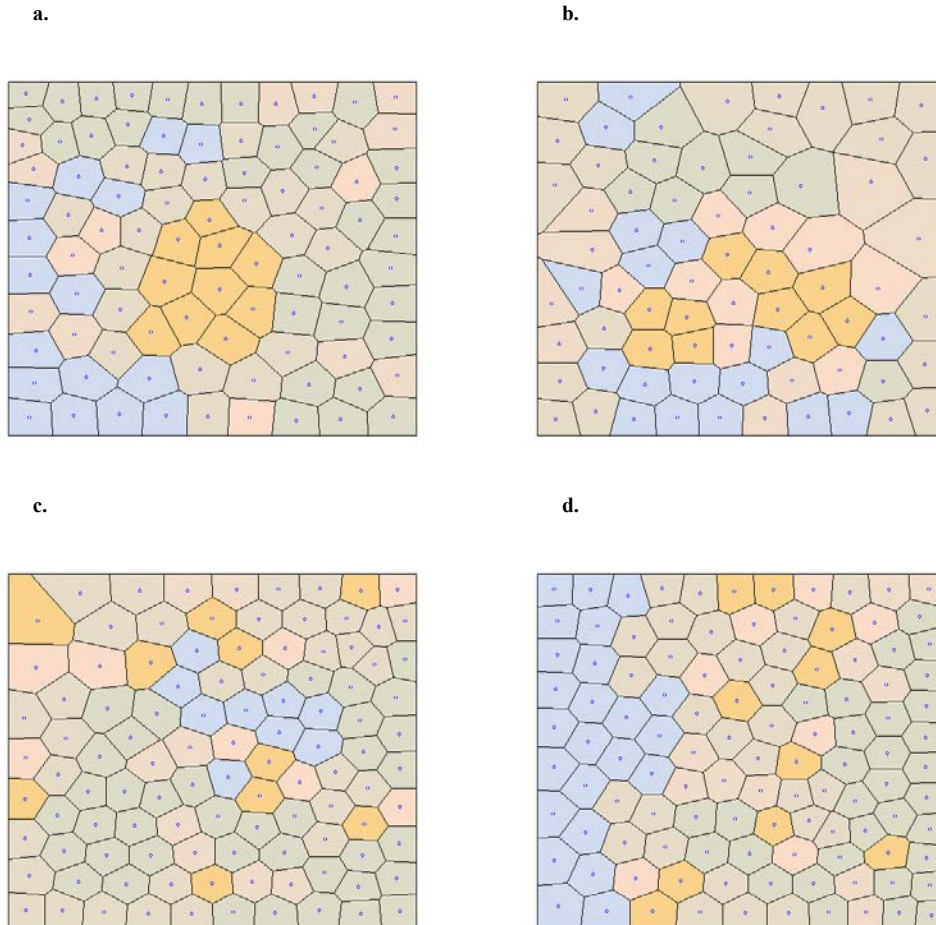


Fig. 143. Comportement du graphe de Voronoï lorsque la répartition des cellules souches est homogène dans la population. a. $t=0$; b. $t=100$; c. $t=600$ et d. $t=900$.

Le couple de valeurs correspondant à ces simulations est : $SupraBasalEGF=1.0$ et $SupraBasalTGFb=5.5$.

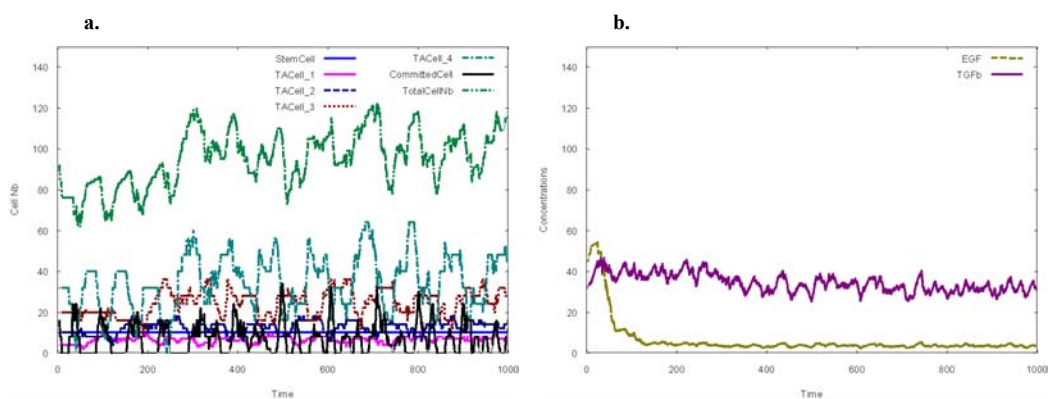


Fig. 144. Evolution des caractéristiques de la population au cours de la simulation. a. Cinétique de l'évolution des différentes sous populations cellulaires et b. Cinétique de l'évolution des quantités de *EGF* et *TGFb* totales dans la population (pour plus de lisibilité les valeurs de *EGF* et *TGFb* ont été multipliée d'un facteur 10).

La proportion de cellules souches est identique dans le modèle déterministe et dans le modèle semi-déterministe, ce qui était possible étant donné que le nombre total de cellules est resté proche de celui obtenu dans le modèle déterministe : 99 cellules en moyenne (avec un coefficient de variation de 0.10 identique au cas précédent).

A nouveau, les effectifs des sous-populations montrent des variations extrêmement élevées : avec des coefficients de variation de 0.22, 0.23, 0.23, 0.35 et 1.0, respectivement pour les cellules en transit de génération 1, 2, 3 et 4 et les cellules engagées.

Tab. 17. Proportions des sous populations cellulaires présentes dans la couche basale par rapport au nombre de cellules total des modèles déterministes et semi-déterministes et des données expérimentales de Potten *et al.* (Potten *et al.* 74). Avec CS : cellules souches, CT1, CT2, CT3 et CT4 : cellules en transit respectivement de génération 1, 2, 3 et 4 et CC : cellules engagées

	CS	CT1	CT2	CT3	CT4	CC
Modèle	10.96 %	7.2 %	14 %	25.03 %	35.63 %	7.18 %

La force de cohésion de notre modèle ne suffisait pas à conserver les agrégats de cellules souches formés durant toute la durée des simulations mais il ne prenait pas en compte les processus de migration contrôlée par les cellules qui leur permettraient de rejoindre un agrégat dont elles auraient été séparées. Il s'agit d'un élément qu'il serait intéressant d'inclure au modèle par la suite, il a en effet été démontré qu'une des fonctions des intégrines $\beta 1$ des cellules souches serait de contrôler la composition de la membrane basale pour l'adapter à leur besoin et ainsi servir de repère à leur positionnement dans le temps (Giancotti 97).

4. Conclusion

En cherchant le meilleur couple *EGF / TGF β* apporté par les cellules suprabasales de la population, des conditions de simulations ont été obtenues qui permettent d'approcher un comportement homéostatique. Cette population homéostatique résiste à la comparaison avec la population de référence et l'hypothèse initiale de l'existence de sous-populations cellulaires possédant des caractéristiques cinétiques différentes. Le modèle s'est montré extrêmement sensible aux variations de *TGF β* . Lors de la Partie I des résultats nous avons montré que de faibles variations de la quantité de *TGF β* entraînait de grandes variations de durée du cycle cellulaire dans le cas des cellules souches (définies par $TGF\beta r=10$). Or, cette propriété s'est révélée extrêmement difficile à utiliser dans le cas d'une population. Un allongement, même minime, de la durée de cycle des cellules souches entraîne rapidement un déficit en cellules en transit et une exposition accrue des cellules souches aux facteurs *TGF β* provenant des couches suprabasales. La critique principale que nous pouvons faire vis à vis de ces simulations reste que la variation de la production de cellules engagées et migrant vers les couches suprabasales n'est pas prise en compte par le modèle pour ajuster l'intensité du gradient de contrôle.

Il n'a pas été possible d'insérer un tel contrôle en retours (positif pour *EGF* et négatif pour *TGF β*) dans notre modèle car des simulations extrêmement longues auraient dû être effectuées, de l'ordre de 10000 u.a. Or, l'usage simultané du modèle moléculaire et de l'algorithme de calcul du graphe de Voronoï était très difficile sur de longues simulations et de nombreux problèmes sont apparus lorsque le graphe de Voronoï devait être reconstruit un trop grand nombre de fois. Pour une simulation de 1000 u.a. le graphe de Voronoï doit être reconstruit 1.e-5 fois (le pas de calcul étant de 1.e-2 u.a.). Cet ordre de grandeur a pu être atteint grâce à l'utilisation d'un pas de calcul plus élevé que lorsque le modèle moléculaire était utilisé seul, sans le graphe de Voronoï (1.e-3). Cette modification était impérative mais s'est faite au détriment de la linéarité du comportement dynamique du modèle moléculaire qui aurait nécessité 1.e-6 reconstructions pour un pas de 1.e-3. Ainsi, il a fallu gérer les exceptions possibles de perte de linéarité du modèle moléculaire, parce qu'il s'agit d'un modèle discret, en faisant en sorte que ceci n'altère évidemment pas la validité des résultats obtenus. C'est un problème que nous avons essayé de régler sans succès au cours de ce travail. En tout cas, l'intégration réciproque du modèle moléculaire et du modèle de représentation rendait impossible leur découplage qui aurait permis d'utiliser un pas de calcul

différent pour l'un et l'autre. Ce problème reste en suspens, il pourrait peut-être trouver une solution en remplaçant l'algorithme de calcul du graphe de Voronoï. Certaines approches développées récemment laissent présager qu'il est possible d'obtenir un comportement stable du graphe de Voronoï en utilisant un algorithme fondé sur un calcul arithmétique exact du graphe.

DISCUSSION

Le développement du modèle que nous avons présenté ici est une tentative pour aborder un processus biologique possédant plusieurs niveaux d'organisation : moléculaire, cellulaire et tissulaire. Cette tentative a été réalisée en associant un modèle de réseau de contrôle moléculaire et le graphe de Voronoï en guise de modèle de représentation des cellules permettant de tenir compte des échanges entre les cellules.

Notre modèle des contrôles moléculaires de la prolifération est une simplification des réseaux de contrôle que les connaissances actuelles en biologie moléculaire suggèrent mais ses éléments appartiennent aux appareils de régulation nucléaires, cytoplasmiques et membranaires. Les éléments membranaires ont deux types d'actions différentes : régulation de l'activité d'une protéine par modélisation des interactions biochimiques entre protéines (régulation conjuguée de l'activité de Ras par les récepteurs EGF et les intégrines $\alpha 6\beta 4$) ou bien régulation de la quantité de protéine présente dans la cellule (régulation de p15 et p27 par les récepteurs TGF β r). Nous avons estimé que le flou actuel en matière de régulations cytoplasmiques ne nous permettait pas de construire un modèle suffisamment simple de ces régulations et un seul élément a été intégré au modèle. Il s'agit de la protéine Ras qui sert d'intégrateur de deux voies de signalisation : EGFr et intégrines $\alpha 6\beta 4$ dépendantes. Dans le modèle, l'activité de cette protéine contrôle la quantité de protéine Cycline D présente dans la cellule. L'appareil de régulation nucléaire est celui qui a été modélisé avec le plus de précision. La prise en compte du système incluant les complexes cycline D-Cdk4, cycline E-Cdk2 et pRb-E2F ainsi que les inhibiteurs p27 et p15 nous a permis de modéliser le passage du point de restriction et la transition de type « switch » entre un état où la quantité de E2F libre est faible et un état où la quantité de E2F libre est proche de la quantité de E2F totale. A cet égard, les travaux de Aguda et Kohn (**Aguda *et al.* 99** et **Kohn 98**) nous ont servi de base. Notre modèle diffère de ces deux précurseurs dans le type de modélisation des interactions entre les molécules. Ici, quel que soit leur type, les réactions enzymatiques possèdent toutes deux étapes : association des protéines (sans préciser le type de l'association) et réaction catalytique. Chacune de ces réactions possède ces propres paramètres qui correspondent à une décomposition du modèle de Michaelis et Menten. Cette technique permet de tenir compte à la fois des réactions idéales et non-idéales et ainsi de modéliser la possibilité de l'inhibition implicite d'une réaction due à l'implication d'un des substrats dans une autre réaction. Cette différence a une incidence importante sur la dynamique du système. Lorsque Aguda obtenait des transitions extrêmement rapides entre plusieurs états (**Aguda *et al.* 99**), notamment dans les réponses de type « switch », notre modèle a montré un léger amortissement des transitions. Cependant, malgré ces différences, des résultats similaires à ceux obtenus par Aguda et Kohn ont pu être obtenus. La libération de E2F a pu être modulée en fonction de la présence de p27. Lorsque p27 était présent dès le début de la simulation ou lorsque l'expression de cette protéine était induite très rapidement et de façon stœchiométrique en réponse à l'activation des récepteurs TGF β r, la libération de E2F débutait à des temps proportionnels à la quantité initiale de p27 (où à la quantité de TGF β initiale, respectivement) mais se déroulait à la même vitesse. Ce comportement de type « switch », similaire à celui décrit par Aguda, n'était plus aussi marqué dans le cas où p27 n'était pas présent dès le début de la simulation (Aguda n'a pas testé cette possibilité) et la quantité de p27 était contrôlée par l'activation d'un récepteur TGF β r de façon

non-stœchiométrique. Par contre, la libération de E2F était toujours contrôlable par la quantité de TGF β lorsque la valeur de TGF β r était suffisante.

Ces résultats nous ont permis de définir des comportements cinétiques du réseau moléculaire potentiellement représentatifs de certains comportements cellulaires observés *in vivo*. En l'occurrence, c'est grâce à une différence de quantité de récepteurs TGF β r (inhibiteurs de la prolifération) que les cellules du modèle montrent des cinétiques de phase G₁ très différentes. Le modèle montre que les cellules possédant plus de récepteurs TGF β r possèdent non seulement une plus grande sensibilité au TGF β mais aussi une plus grande variation de l'amplitude dans la libération de E2F et donc dans la complétion de la phase G₁. Ces cellules étaient donc susceptibles de se comporter comme les cellules souches d'un épithélium stratifié. Par contre les cellules possédant moins de récepteurs TGF β r montrent une plus faible sensibilité au TGF β mais aussi une très faible variation de l'amplitude dans la libération de E2F. Ces cellules étaient donc susceptibles de se comporter comme les cellules en transit d'un épithélium stratifié avec une phase G₁ courte et donc un temps de cycle jusqu'à plus de deux fois plus faible que dans le cas des cellules souches pour des conditions initiales en EGF et TGF β identiques. A notre connaissance, il s'agit du premier modèle prenant en compte la complexité des interactions moléculaires régulant le cycle cellulaire et permettant de contrôler le comportement cinétique de la prolifération d'une cellule tout en conservant une dynamique de type « switch ». De plus, quelques données expérimentales pourraient confirmer ces hypothèses par la description d'une expression plus importante des récepteurs TGF β r par les cellules basales de la zone périphérique de la cornée appelée le limbe (**Joyce et al. 97**) montrant une phase G₁ très longue et donc une forte probabilité d'être des cellules souches de la cornée.

A l'instar de Kohn (**Kohn 98**), l'identification des paramètres du modèle a été réalisée d'une façon très empirique, en testant les sous-groupes du modèle avant de les insérer dans le modèle. Cette technique est critiquable mais était la seule envisageable en l'absence de données expérimentales valides et en quantité suffisante pour permettre de tester l'ensemble des paramètres. Parmi les inconvénients de cette technique on retiendra la difficulté de manipuler le modèle au fur et à mesure de sa complexification ou la possibilité de trouver des comportements ne correspondant qu'à des minima ou maxima locaux. Ainsi, il serait intéressant d'adapter des techniques d'identification de paramètres telles que celles développées dans le projet E-cell (**Tomita et al. 99**). Au risque de nous répéter rappelons que ce développement n'a pas été réalisé ici car le manque de données expérimentales le rendait inutile. L'exemple de Kholodenko (**Kholodenko et al. 99**) montre que, dans le cas particulier de la régulation du récepteur EGFr, les résultats obtenus par un modèle moléculaire validé par des données expérimentales sont très intéressants.

Une autre version de ce programme de simulation a été développée en collaboration avec un étudiant en informatique de l'UFR IMA, lors d'un stage de Maîtrise. Ce programme permet de rajouter dynamiquement, à l'aide de l'interface graphique, des protéines et des réactions à volonté dans le modèle. En effet, l'interface existante était plutôt difficile à utiliser en dehors du cadre du laboratoire. Pour rajouter une variable ou une réaction dans le modèle, il fallait reprogrammer le modèle avant de le compiler sous sa nouvelle forme. Le choix de cette structure avait été suggéré par une simplicité de programmation et une rapidité de fonctionnement lors des simulations. Sans rentrer dans les détails, disons simplement que la nouvelle forme du modèle est fondée sur un ensemble de listes dynamiques liées les unes aux autres. Son fonctionnement au cours des simulations est légèrement plus lent. Ce logiciel est encore en phase de test et il n'a pas été utilisé pour obtenir ces résultats.

La seconde partie de notre travail consistait à associer le modèle de contrôle moléculaire à une représentation des cellules en 2D. L'outil de représentation choisi a été le graphe de Voronoï très adapté à la représentation des

cellules en 2D (**Honda 78**) et pour lequel nous disposions d'une expérience préalable au sein du laboratoire (**Guillaud 93** et **Marcelpoil 93a**).

Le graphe de Voronoï nous a permis de vérifier que les paramètres du modèle moléculaire étaient toujours significatifs lorsqu'ils étaient adaptés à l'échelle d'une population et que la prolifération d'une cellule pouvait être stimulée ou inhibée par son environnement proche ou lointain. Il a aussi été possible de modéliser l'effet de facteurs liés à la structure tridimensionnelle d'un épithélium stratifié et des simulations ont été réalisées successivement dans les plans de coupes frontales et transversales. Dans le cas des coupes frontales, il a été possible de nous rapprocher de conditions homéostatiques permettant à la population de maintenir sa démographie lorsque les simulations étaient réalisées d'une façon semi-déterministe. Ces simulations ont permis de retrouver des résultats similaires à ceux que le modèle de Potten *et al.* (**Potten *et al.* 74**) mettait en exergue. Les résultats de Potten étaient déduits de l'observation de résultats expérimentaux obtenus sur des tissus d'origine diverse (peau de souris, de singe ou humaine). Il a été très difficile d'obtenir des comportements stables associables à un comportement homéostatique. En effet, le comportement cinétique des cellules était régi par leur environnement et celles-ci n'avaient pas de contrôle en retour sur celui-ci. La quantité de facteurs EGF et TGF β disponibles pour la population était constante tout au long des simulations sans possibilité de faire varier ces quantités en fonction de la production de cellules engagées dans la différenciation et disparaissant de la population pour migrer vers les couches suprabasales. Il aurait été intéressant de faire varier les quantités de facteurs EGF et TGF β de cette façon. Malheureusement, cet ajout aurait nécessité des modifications majeures de l'algorithme de calcul du graphe de Voronoï pour permettre d'effectuer des simulations suffisamment longues et sur un nombre de cellules beaucoup plus grand. De nombreux problèmes de stabilité dans le calcul du graphe de Voronoï ont été rencontrés que nous n'avons pas été capables de résoudre dans le cadre de cette thèse. Malgré ces déboires, il nous a été possible de montrer que la cinétique de notre modèle était valide et qu'il était plausible que la différence de sensibilité aux facteurs TGF β puisse expliquer les différences de cinétique observées au sein d'un tissu épithélial stratifié et l'homéostasie d'une population stable dont la composition en cellules souches, en transit et différenciées correspondrait à celle généralement constatée dans des épithélia stratifiés (**Jensen *et al.* 99**, **Jones *et al.* 99**, **Lavker *et al.* 00**, **Lehrer *et al.* 98**, **Wright *et al.* 84**) et plus particulièrement celle donnée par le modèle de Potten (**Potten *et al.* 74**).

De plus, le modèle moléculaire a montré de légères différences de comportement lorsqu'il était associé à des cellules faisant partie d'une population (e.g. difficulté d'atteindre des temps de cycle double dans le cas des cellules souches). Il était donc important de le tester dans ce cadre pluricellulaire. La plupart des modèles développés jusqu'alors considéraient une cellule seule, sans son environnement alors que dans un tissu normal, une cellule est soumise aux signaux de son environnement et peut répondre de diverses manières, y compris en modifiant celui-ci. Bien entendu, notre modèle ne permettait pas de prendre en compte toutes les interactions qu'une cellule peut entretenir avec son environnement mais il a permis de montrer que même une population dont le voisinage était réduit à sa plus simple expression (un signal activateur et un signal inhibiteur de la prolifération) était capable de développer des comportements très différents variant de l'homéostasie à l'extinction pour de faibles variations de l'un des facteurs.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En général, toute démarche de modélisation débute par l'identification des paramètres du modèle dans le but de réduire leur nombre. Il semble qu'il soit actuellement difficile de respecter cette démarche dans le cas de la biologie moléculaire où le nombre d'éléments actifs à prendre en compte est très important. La recherche bibliographique que nous avons menée sur les contrôles moléculaires de l'homéostasie tissulaire nous a montré que, malgré la masse d'information disponible, peu de données quantitatives fiables sont accessibles. Ce manque est lié à l'approche expérimentale dominant actuellement la biologie moléculaire qui préfère la partie à l'ensemble.

Lors du choix des paramètres du modèle nous avons dû nous accommoder de ces limites. Il aurait bien sûr été possible de rentrer plus dans le détail en augmentant le nombre de paramètres mais le modèle serait devenu difficile à utiliser, à valider et à expliquer. Il aurait été aussi possible de simplifier encore le modèle en limitant le nombre de paramètres à des données quantitatives précises au risque d'être trop concentré sur un élément particulier. Or, nous voulions absolument vérifier que des comportements cellulaires simples, ici allongement de la durée de la phase G_1 , pouvaient émerger d'un ensemble complexe de régulations moléculaires. Ainsi, suivant l'angle de vue, on pourra reprocher à notre modèle de posséder trop ou trop peu de paramètres. Trop pour permettre une validation mathématique rigoureuse ; trop peu pour rendre compte de la complexité réelle des réseaux moléculaires de contrôle de la prolifération.

Lors de ce travail, il nous a semblé essentiel de sortir les modèles moléculaires de leur carcan « unicellulaire » en utilisant une représentation des cellules qui permette non seulement de représenter les cellules d'une façon réaliste mais aussi de quantifier les échanges entre les cellules. Il peut sembler que les efforts nécessaires au développement d'un modèle moléculaire et d'une représentation cellulaire en 2D sont démesurés par rapport à la qualité des résultats obtenus. Ce sont principalement des problèmes de mise en œuvre qui ont limité cette qualité et nous sommes convaincus que le déploiement de plus de compétences, notamment dans le domaine de l'algorithmique et de la programmation, aurait pu résoudre nombre des problèmes que nous avons rencontrés. Il convient donc d'insister sur le potentiel de notre approche et il nous semble que le choix de la modélisation de la dualité cellule/environnement possède un potentiel remarquable.

Parmi les perspectives de ce travail, la connexion de l'outil de modélisation des interactions moléculaires aux gigantesques bases de données actuellement en cours de construction nous semble une priorité. Il serait alors possible d'utiliser cet outil dans la recherche des inférences dans l'immense réseau de régulations moléculaires qui semble émerger actuellement en multipliant le nombre d'acteurs moléculaires à volonté pour accepter ou rejeter des relations après les avoir testées dans un cadre dynamique, potentiellement validées par des expériences dédiées où les microarrays permettraient de suivre l'évolution d'un système biologique dans toute sa complexité.

D'autre part, la représentation des cellules aurait avantage à être réalisée en 3D en utilisant soit le graphe de Voronoï soit des modèles permettant d'intégrer plus efficacement des contraintes physiques sur les cellules, par

exemple en appliquant aux épithélia le modèle développé par Promayon, originellement dédiée à la simulation de la respiration (**Promayon 97**). Il serait alors impératif de définir plus précisément les interactions physiques présentes tant au niveau d'une cellule qu'entre une cellule et son environnement. Un tel modèle serait très intéressant pour compléter les aspects du contrôle de la prolifération à l'interface physique / biochimique (e.g. tensegrité de Ingber – **Ingber 98**) que nous avons effleuré en intégrant les contrôles liés aux intégrines.

Une fois mis au point, un tel outil posséderait tous les éléments lui permettant de modéliser l'homéostasie d'un tissu en 3D en se débarrassant des éléments déterministes que nous avons inclus dans le modèle actuel. Le cadre expérimental de validation pourrait alors être la cornée et l'utilisation de la microscopie confocale permettrait de donner, en 3D, des aperçus de l'architecture du tissu et de la localisation de certaines cellules (e.g. souches, en transit, engagées ...) tout en fournissant des indications qualitatives et quantitatives sur les acteurs moléculaires concernés. Grâce aux simulations, le modèle serait alors capable de répondre à la question que se posent tous les biologistes : « que se passe-t-il dans un tissu lorsque je ne le regarde pas ? »

REFERENCES

- [1.] **Abram, C. L and Courtneidge, S. A** (2000) Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp. Cell Research*. 254. 1-13.
- [2.] **Adam, G** (1981) Three-state models of the cell cycle describing dependence of transition probabilities on cell density. *Biomathematics and cell kinetics*. 177-193.
- [3.] **Adam, J. A** (1986) A simplified mathematical model of tumor growth. *Math. Biosci.* 81 : 229-244.
- [4.] **Adam, J. A** (1987a) A mathematical model of tumor growth II. Effects of geometry and spatial non-uniformity on stability. *Math. Biosci.* 86 : 183-211.
- [5.] **Adam, J. A** (1987b) A mathematical model of tumor growth III. Comparison with experiment. *Math. Biosci.* 86 : 213-227.
- [6.] **Adams, J. C and Watt, F. M** (1990) Changes in keratinocytes adhesion during terminal differentiation : reduction in fibronectin binding precedes $\alpha 5\beta 1$ integrin loss from the cell surface. *Cell*. 63. 425-435.
- [7.] **Adams, J. C and Watt, F. M** (1991) Expression of $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ and $\beta 5$ integrins by human epidermal keratinocytes and non-differentiating keratinocytes. *J. Cell Biol.* 115. 829-841.
- [8.] **Agarwal, P** (1993) The Cell Programming Language. Symposium on Pattern Formation, Claremont CA, February.
- [9.] **Agarwal, P** (1993) Cell-based computer models in developmental biology. A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degrees of doctor of Philosophy Departement of Computer Science New York University.
- [10.] **Agarwal, P** (1994) Simulation of aggregation in *Dictyostelium* Using the Cell Programming Language. *Comput. Appl. Biosci.* Vol. 10. No. 6. 647-655.
- [11.] **Agarwal, P** (1995) Cellular segregation and engulfment simulations using the Cell Programming Language. *Journal of Theoretical Biology*. 176 (1). 79-89.
- [12.] **Aguda, B. D** (1999) A quantitative analysis of the kinetics of the G₂ DNA damage checkpoint system. *PNAS*. Vol. 96. 11352-11357.
- [13.] **Aguda, B. D** (1999) Instabilities in phosphorylation-dephosphorylation cascades and cell cycle checkpoints. *Oncogene*. 18. 2846-2851.
- [14.] **Aguda, B. D** (2001) Kick-starting the cell cycle: from growth-factor stimulation to initiation of DNA replication. *Chaos*. Vol. 11. No. 1. 269-276.
- [15.] **Aguda, B. D and Tang, Y** (1999) The kinetic origins of the restriction point in the mammalian cell cycle. *Cell Proliferation*. 32. 321-335.
- [16.] **Aktas, H ; Cai, H and Cooper, G. M** (1997) Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27^{KIP1}. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 17. No. 7. 3850-3857.
- [17.] **Alberghina, L ; Mariani, L and Martegani, E** (1986) Cell cycle modelling. *Biosystems*. 19. 23-44.
- [18.] **Alberts, B ; Bray, D ; Lewis, J ; Raff, M ; Roberts, K and Watson, J. D** (1994) Molecular biology of the cell. 3rd edition. Garland publishing.
- [19.] **Allen, T. D and Potten, C. S** (1974) Fine structural identification and organisation of the epidermal proliferative unit. *J. Sci.* 15. 291-319.
- [20.] **Aplin, A. E ; Howe, A. K and Juliano, R. L** (1999) Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11. 737-744.
- [21.] **Arkin, A ; Ross, J and McAdams, H. H** (1998) Stochastic kinetic analysis of developmental pathway bifurcation in phage λ -infected *Escherichia coli* cells. *Genetics*. 149. 1633-1648.
- [22.] **Aumeilley, M et Verrando, P** (1993) Structure et pathologie des membranes basales. *Médecine / Sciences*. 9. 926-933.
- [23.] **Axelrod, D. E ; Gusev, Y and Kuczek, T** (1993) Persistence of cell cycle times over many generations as determined by heritability of colony sizes of ras oncogene-transformed and non-transformed cell. *Cell Prolif.* Vol. 26. No. 3. 235-249.
- [24.] **Barkai, N and Leibler, S** (1997) Robustness in simple biochemical networks. *Nature*. Vol. 387. 913-917.
- [25.] **Barone, M. V and Courtneidge, S. A** (1995) Myc but not Fos rescue of PDGF signaling block caused by kinase-inactive Src. *Nature*. 378. 509-511.
- [26.] **Barrandon, Y and Green, H** (1987) Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84. 2302-2306.
- [27.] **Bartek, J and Lukas, J** (2001) Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS*. 490. 117-122.
- [28.] **Baserga, R** (1985) The biology of cell reproduction. Harvard University Press.
- [29.] **Baserga, R** (1999) Introduction to the cell cycle. In : The molecular basis of cell cycle and cell growth. Ed. Stein, G. S ; Baserga, R ; Giordano, A and Denhardt, D. T.1-14.
- [30.] **Beaurepaire, E** (1993) Simulation comportementale et locale des phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaire dans un tissu. Mémoire de recherche dans le cadre du Diplôme d'Etude Approfondies De Génie Biologique et Médical.
- [31.] **Becskei, A and Serrano, L** (2000) Engineering stability in gene networks by autoregulation. *Nature*. Vol. 405. 590-593.
- [32.] **Bernard, A et Bernard, G** (2000) Les intégrines ou le contrôle du cycle cellulaire par l'environnement. *Pathol. Biol.* 48. 3. 328-339.
- [33.] **Bernards, R** (1997) E2F : a nodal point in cell cycle regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1333. M33-M40.
- [34.] **Bhalla, U. S and Iyengar, R** (1999) Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science*. Vol. 283. 381-386.
- [35.] **Bickenbach, J. R** (1981) Identification and behaviour of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J. Dent. Res.* 60. 1611-1620.
- [36.] **Bigras, G ; Marcelpoil, R ; Brambilla, E and Brugal, G** (1996) Cellular sociology applied to neuroendocrine tumors of the lung: quantitative model of neoplastic architecture. *Cytometry*. 24. 1. 74-82.
- [37.] **Blanchard, J. M** (2000) Small GTPases, adhesion, cell cycle control and proliferation. *Pathol. Biol.* 48. 3. 318-327.
- [38.] **Blasko, M. A ; Gasser, S. M and Lingner, J** (1999) Telomeres and telomerase. *Genes and Development*. 13. 2353-2359.
- [39.] **Bodenstein, L** (1986) A dynamic model of tissue growth and cell patterning. *Cell Differentiation*. 19. 19-33.
- [40.] **Bodenstein, L and Sidman, R. L** (1987) Growth and development of the mouse retinal pigment epithelium. I. Cell and tissue morphometrics and topography of mitotic activity. *Dev. Biol.* 121. (1). 192-204.
- [41.] **Bodenstein, L and Sidman, R. L** (1987) Growth and development of the mouse retinal pigment epithelium. II. Cell patterning in experimental chimaeras and mosaics. *Dev. Biol.* 121. (1). 205-219.
- [42.] **Borradori, L and Sonnenberg, A** (1996) Hemidesmosomes : roles in adhesion, signaling and human diseases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8. 5. 647-656.
- [43.] **Boudreau, N and Bissell, M. J** (1998) Extracellular matrix signaling : integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10. 640-646.
- [44.] **Boulaire, J ; Fotedar, A and Fotedar, R** (2000) The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21^{WAF1}. *Pathol. Biol.* 48. 3. 190-202.
- [45.] **Braga, V. M. M ; Betson, M ; Li, X and Lamarche-Vane** (2000) Activation of the small GTPase Rac is sufficient to disrupt cadherin-dependent cell-cell adhesion in normal human keratinocytes. *Mol. Biol. Cell*. Vol. 11. 3703-3721.
- [46.] **Bretschneider, T ; Vasiev, B and Weijer, C. J** (1999) A model for *Dictyostelium* slug movement. *J. Theor. Biol.* 199. 125-136.
- [47.] **Brinkhuis, M ; Meijer, G ; van Diest, P ; Schuurmans, L. T Baak, J. P. A** (1995) Minimum spanning tree analysis in advanced ovarian carcinoma. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*. Vo. 19. No 3. 194-201.

- [48.] **Brodland, G. W and Clausi D. A** (1994) Embryonic tissue morphogenesis modeled by FEM. *J. Biomech. Eng.* Vol. 116. No. 2. 146-155.
- [49.] **Brown, G. C ; Hoek, J. B and Kholodenko, B. N** (1997) Why do protein kinase cascades have more than one level ? *Trends Biochem. Sci.* 22. 288.
- [50.] **Brun, C ; Marcand, S and Gilson, E** (1997) Proteins that bind to double-stranded regions of telomeric DNA. *trends in Cell Biology.* Vol. 7. 317-323.
- [51.] **Bullough, W. S** (1965) Mitotic and functional homeostasis: a speculative review. *Cancer Res.* 25. 1683-1727.
- [52.] **Burgeson, R. E and Christiano, A. M** (1997) The dermal-epidermal junction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9. 5. 651-658.
- [53.] **Cannon, W. B** (1932) *The Wisdom of the Body.* Norton, New York.
- [54.] **Calderon Calixto, P and Kwembe, T. A** (1991) Modeling tumor growth. *Mathematical biosciences.* 103 : 97-114.
- [55.] **Cardoso, M. C and Leonhardt, H** (1999) Differentiation, development, and programmed cell death. In: *The molecular basis of cell cycle and growth control.* Ed. G. S. Stein *et al.* Wiley-Liss. Inc. 305-347.
- [56.] **Carrano, A. C ; Eytan, E ; Hershko, A and Pagano, M** (1999) SKP2 is required for ubiquitin mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat. Cell Biol.* 1. 193-199.
- [57.] **Cavalla, P and Schiffer, D** (1997) Cell cycle and proliferation markers in neuroepithelial tumors. *Anticancer Research.* 17. 6B. 4135-4143.
- [58.] **Chandebois, R** (1977) Cell sociology and the problem of position effect: pattern formation, origin and role of gradients. *Acta Biotheoretica.* 26. 4. 203-238.
- [59.] **Chaplain, M. A. J ; Slemman, B. D** (1993) Modelling the growth of solid tumours and incorporating a method for their classification using nonlinear elasticity theory. *J. Math. Biol.* 31. 431-473.
- [60.] **Chellapan, S ; Hiebert, S ; Mudryj, M ; Horowitz, J and Nevins, J** (1991) The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell.* 65. 1053-1061.
- [61.] **Childress, S and Percuss, J. K** (1981) Modeling of cell and tissue movements in the developing embryo. *Lect. Math. Life ci.* 14. 59-88.
- [62.] **Chin, L ; Tam, A ; Pomerantz, J ; Wong, M ; Holash, J ; Bardeesy, N ; Shen, Q ; O'Hagan, R ; Pantginis, Zhou, H ; Horner, J. W II ; Cordon-Cardo, C ; Yancopoulos, G. D and DePinho, R. A** (1999) Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature.* Vol. 400. 468-472.
- [63.] **Christian, J. L** (2000) BMP, Wnt and Hedgehog signals : how far can they go ? *Curr. Opin. Cell Biol.* 12. 244-249.
- [64.] **Christian, J. L and Nakayama, T** (1999) Can't get no SMADification : Smad proteins as positive and negative regulators of TGF β family signals. *BioEssays.* 21. 5. 382-390.
- [65.] **Clark, W. H. Jr** (1995) The nature of cancer : morphogenesis and progressive (self-) disorganization in neoplastic development and progression. *Acta Oncologica.* Vol. 34. No. 1. 3-21.
- [66.] **Clark, E. A ; King, W. G ; Brugge, J. S ; Symons, M and Hynes, R. O** (1998) Integrin-mediated signals regulated by members of the Rho family of GTPases. *J. Cell Biology.* Vol. 142. No. 2. 573-586.
- [67.] **Claudy, A** (1995) La desquamation. In. *Biologie de la peau. Séminaire d'enseignement INSERM.* Les Editions INSERM. Ed. D. Smith.
- [68.] **Clem, C. J ; Boysen, M and Rigaut, J-P** (1992) Towards 3-D modeling of epithelia by computer simulation. *Analytical Cellular Pathology.* 4. 287-302.
- [69.] **Clem, C. J ; Konig, D and Rigaut, J-P** (1997) A three-dimensional dynamic simulation model of epithelial tissue renewal. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 19. 174-184.
- [70.] **Clurman, B. E ; Sheaff, R. J ; Thress, K ; Groudine, M and Roberts, J. M** (1996) Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by Cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev.* 10. 1979-1990.
- [71.] **Coats, S ; Flanagan, W. M ; Nourse, J and Roberts, J. M** (1996) Requirement of p27^{KIP1} for restriction point control of fibroblast cell cycle. *Science.* Vol. 272. 877-880.
- [72.] **Cochran, B. H ; Reffel, A. C and Stiles, C. D** (1983) Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell.* 33. 939-947.
- [73.] **Cohen, S** (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J. Biol. Chem.* 237-1555-1562.
- [74.] **Cohen, S. M and Ellwein, L. B** (1991) Genetic errors, cell proliferation and carcinogenesis. *Cancer research.* 51 : 6493-6505.
- [75.] **Cohen, S and Simons, K** (1997) Editorial review on cell asymmetry in development. *Current Opinion in Cell Biology.* 9. 6. 831-832.
- [76.] **Cohen-Fix, O and Koshland, D** (1997) The metaphase-to-anaphase transition : avoiding a mid-life crisis. *Curr. Opinion in Cell Biology.* 9. 6. 800-806.
- [77.] **Conolly, R. B and Kimbell, J. S** (1994) Computer simulation of cell growth governed by stochastic processes : application to clonal growth cancer model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Vol. 124 (2). p 284-295.
- [78.] **Cooper, S** (1988) The continuum model and c-myc synthesis during the division cycle. *J. Theor. Biol.* 135. 393-400.
- [79.] **Cotsarelis, G ; Cheng, S. Z ; Dong, G ; Sun, T. T and Lavker, R. M** (1989) Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implication on epithelial stem cells. *Cell.* 57. 201-209.
- [80.] **Cotsarelis, G ; Kaur, P ; Dhouailly, D ; Hengge, U and Bickenbach, J** (1999) Epithelial stem cells in the skin: definition, markers, localization and functions. *Exp Dermatol.* 8(1). 80-8.
- [81.] **Cruywagen, G. C ; Maini, P. K and Murray, J. D** (1992) Sequential pattern formation in a model for skin morphogenesis. *IMA J. Math. Appl. Med. Biol.* 9. 227-248.
- [82.] **Cummings, F. W** (1999a) Spatial patterning via FTP adhesive phosphatases. *J. Theor. Biol.* 196. 19-26.
- [83.] **Cummings, F. W** (1999b) Waves of pattern formation and signal pathways. *J. Theor. Biol.* 196. 27-31.
- [84.] **Curry, J. L and Trentin, J. J** (1987) Haemopoietic spleen colony studies I. Growth and differentiation. *Devl. Biol.* 15. 395-413.
- [85.] **Dagnino, L ; Pietenpol, J. A ; Yang, E. Y and Moses, H. L** (1993) Transforming growth factor regulation of keratinocyte growth. Recent results in *Cancer Research.* Vol. 128. 15-29.
- [86.] **Dale, P. D ; Maini, P. K and Sherratt, J. A** (1994a) Mathematical modelling corneal epithelial wound healing. *Math. Biosci.* 124. 127.
- [87.] **Dale, P. D ; Sherratt, J. A and Maini, P. K** (1994b) On the speed of corneal epithelial wound healing. *Appl. Math. Lett.* 7. 11-14.
- [88.] **Dallon, J. C ; Sherratt, J. A and Maini, P. K** (1999) Mathematical modelling of extracellular matrix dynamics using discrete cells: fiber orientation and tissue regeneration. *J. Theor. Biol.* 199. 449-471.
- [89.] **Damjanov, I ; Mildner, B and Knowles, B. B** (1986) Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor receptor in normal human tissues. *Laboratory investigation.* Vol. 55. No. 5. 588-592.
- [90.] **D'Arcy Thompson** (1942) *Of growth and form.* Cambridge University Press.
- [91.] **Darzynkiewicz, Z ; Gong, J ; Juan, G ; Ardelt, B and Traganos, F** (1996) Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry.* 25. 1-13.
- [92.] **Darzynkiewicz, Z ; Traganos, F and Melamed, M. R** (1980) New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry. *Cytometry.* Vol. 1. No. 2. 98-108.
- [93.] **Davezac, N ; Ducommun, B et Baldin, V** (2000) Rôle des phosphatases CDC25 dans le contrôle de la prolifération. *Pathol. Biol.* 48. 3. 182-189.
- [94.] **Davies, J. A and Garrod, D. R** (1997) Molecular aspects of the epithelial phenotype. *BioEssays.* Vol. 19. No. 8. 699-704.
- [95.] **Dedhar, S** (2000) Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12. 250-256.

- [96.] **Demicheli, R ; Pratesi, G and Foroni, R** (1991) The Exponential-Gompertzian tumor growth model : data from six tumor cell lines in vitro and in vivo. Estimate of the transition point from Exponential to Gompertzian growth and potential clinical implications. *Tumori*. 77 : 189-195.
- [97.] **Deng, C ; Zhang, P ; Harper, J. W ; Elledge, S and Leder, P** (1995) Mice lacking p21^{CIP1/WAF1} undergo normal development, but are defective in the G1 checkpoint control. *Cell*. 82. 675-684.
- [98.] **Denhardt, D. T** (1999) Signal transduction pathways and regulation of the mammalian cell cycle: cell type-dependent integration of external signals. In: *The molecular basis of cell cycle and growth control*. Ed. G. S. Stein *et al.* Wiley-Liss.
- [99.] **DePinho, R. A ; Schreiber-Agus, N and Alt, F. W** (1991) myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. *Adv. Cancer Res.* 57. 1-46.
- [100.] **Dhanasekaran, N ; Tsim, S-T, Dermott, J. M and Onesime, D** (1998) Regulation of cell proliferation by G proteins. *Oncogene*. 17. 1383-1394.
- [101.] **Diehl, J. A ; Zindy, F and Sherr, C. J** (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 11. 957-972.
- [102.] **Dillon, R and Othmer, H. G** (1999) A mathematical model for outgrowth and spatial patterning of the vertebrate limb bud. *J. Theor. Biol.* 197. 295-330.
- [103.] **Düchting, W and Vogelsaenger, T** (1981) A cell-cycle model of a tumor cell growing in a nutritient medium. *Biomathematics and cell kinetics*. 311-328.
- [104.] **Düchting, W and Vogelsaenger, T** (1985) Recent progress in modelling and simulation of three-dimensional tumor growth and treatment. *Biosystems*. 18 : 79-91.
- [105.] **Dussert, C ; Rasigni, G ; Rasigni, M and Palmary, J** (1986) Minimum spanning tree : a new approach for studying order and disorder. *Physical review B*. 34. 5.
- [106.] **Dussert, C ; Rasigni, G ; Palmary, J ; Llebaria, A ; Rasigni, M and Marty, F** (1987) Minimum spanning tree analysis of biological structures. *J. Theor. Biol.* 125. 317-323.
- [107.] **Duvdevani-Bar, S and Segel, Lee** (1994) On topological simulations in developmental biology. *J. Theor. Biology*. 166. 33-50.
- [108.] **Dyson, N** (1999) The regulation of E2F by pRb-family proteins. *Genes Development*. 12. 2245-2262.
- [109.] **Ebato, B ; Friend, J and Thoft, R. A** (1987) Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28. 1450-1456.
- [110.] **Ebato, B ; Friend, J and Thoft, R. A** (1988) Comparison of limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29. 1533-1537.
- [111.] **Eckert, R. L ; Crish, J. F ; Banks, e. B and Welter, J. F** (1997) The epidermis : Genes On – Genes Off. *J. of Invest. Dermat.* Vol. 109. No. 4. 501-509.
- [112.] **Ede, D. A and Law, J. T** (1969) Computer simulation of vertebrate limb node morphogenesis. *Nature*. London. 221. 244-248.
- [113.] **Eden, M** (1960) A two dimensional growth process. In: *Proceedings of the 4th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*. Berkeley. University of California Press. 223-228.
- [114.] **Eils, R ; Bertine, E ; Saracoglu, K ; Rinke, B ; Schrock, E ; Parazza, F ; Usson, Y ; Robert-Nicoud, M ; Stelzer, E. H ; Chassery, J-M *et al.*** (1995) Application of confocal laser microscopy and three-dimensional Voronoi diagrams for volume and surface estimates of interphase chromosomes. *J. Microsc.* 177. Pt. 2. 150-161.
- [115.] **El-Deiry, W. S ; Harper, J. W. O ; *et al.*** (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 75. 817-825.
- [116.] **Elowitz, M. B and Leibler, S** (2000) A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*. Vol. 403. 335-338.
- [117.] **Endicott, J. A ; Noble, M. E. M. and Tucker, J. A** (1999) Cyclin-dependent kinases : inhibition and substrate recognition. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9. 738-744.
- [118.] **English, J ; Pearson, G ; Wilsbacher, J ; Swantek, J ; Karandikar, M ; Xu, S and Cobb, M. H** (1999) New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp. Cell Research*. 253. 255-270.
- [119.] **Fambrough, D ; McClure, K ; Kazlauskas, A and Lander, E. S** (1999) Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping rather than independent, sets of genes. *Cell*. Vol. 97. 727-741.
- [120.] **Fang, F ; Orend, G ; Wanatabe, N ; Hunter, T and Ruoslahti, E** (1996) Dependence of cyclin E-CDK2 kinase activity on cell anchorage. *Science*. 271. 499-502.
- [121.] **Feinberg, M and Horn, F. J. M** (1974) Dynamics of open chemical systems and the algebraic structure of the underlying reaction network. *Chem. Eng. Sci.* 29. 775.
- [122.] **Ferrell, J. E. Jr** (1996) Tripping the switch fantastic : how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *TIBS*. 21. 460-466.
- [123.] **Ferrell, J. E. Jr** (1997) How responses get more switch-like as you move down a protein kinase cascade. *Trends Bioch. Sci.* 22. 288-289.
- [124.] **Ferrell, J. E. Jr** (1998) How regulated protein translocation can produce switch-like responses. *Trends Bioch. Sci.* 23. 461-465.
- [125.] **Ferrell, J. E. Jr** (1999) Xenopus Oocyte maturation : new lessons from a good egg. *BioEssays*. 21. 10. 833-842.
- [126.] **Ferrell, J. E. Jr** (1999) Building a cellular switch : more lessons from a good egg. *BioEssays*. 21. 10. 866-870.
- [127.] **Ferrell, J. E. Jr and Machleder, E. M** (1999) The biochemical basis of an All-or-None cell fate switch in Xenopus Oocytes. *Science*. Vol. 280. 895-898.
- [128.] **Fisher, R. P ; Jin, P ; Camberlin, H. M and Morgan, D. O** (1995) Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase. *Cell*. 83. 47-57.
- [129.] **Fotadar, A ; Cannella, D ; Fitzgarald, P ; Rousselle, T ; Gupta, S ; Dorée, M and Fotadar, R** (1996) Role for cyclin A-dependent kinase in DNA replication in human S phase cell extracts. *J. Biol. Chem.* Vol. 271. No. 49. 31627-31637.
- [130.] **Frame, S and Balmain, A** (2000) Integration of positive and negative growth signals during ras pathway activation in vivo. *Curr. Opin. Gen. Dev.* Vol. 10. No. 1. 106-113.
- [131.] **Fuchs, E ; Dowkling, J ; Segre, J ; Lo, S. H ; Qian-Chun Yu** (1997) Integrators of epidermal growth and differentiation for β 1 and β 4 integrins. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 7. 672-682.
- [132.] **Fuchs, E and Segre, J. A** (2000) Stem cells : a new lease on life. *Cell*. Vol. 100. 143-155.
- [133.] **Fukuyama, R and Shimizu, N** (1991) Expression of Epidermal Growth Factor (EGF) and the EGF receptor in human tissues. *The Journal of Experimental Zoology*. 258. 336-343.
- [134.] **Furukawa, F ; Imamura, S ; Fujita, M ; Kinoshita, K ; Yoshitake, K ; Brown, W. R and Norris, D. A** (1992) Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen / cyclin in human skin; *Arch. Dermatol. Res.* 284. 86-91.
- [135.] **Furusawa, C and Kaneko, K** (1998) Emergence of rules in cell society : differentiation, hierarchy and stability. *Bull. Math. Biol.* 60. 659-687.
- [136.] **Gaffney, E. A ; Maini, P. K ; Sherratt, J. A and Tuft, S** (1999) The mathematical modelling of cell kinetics in corneal epithelial wound healing. *J. Theor. Biol.* 197. 15-40.
- [137.] **Gaglio, S ; Giacomini, M ; Nicolini, C and Ruggiero, C** (1991) A qualitative approach to cell growth modeling and simulation for cancer chemotherapy. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* Vol. 38 (4). p 386-391.
- [138.] **Gandarillas, A and Watt, F. M** (1997) c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev.* 11. 21. 2869-2882.

- [139.] Gardner, T. S ; Cantor, C. R and Collins, J. J (2000) Construction of a genetic toggle switch in Escherichia coli. Nature. Vol. 403. 339-342.
- [140.] Garrod, D ; Chidgey, M and North, A (1996) Desmosomes : differentiation, development, dynamics and disease. Curr. Opin. Cell Biol. 8. 5. 670-678.
- [141.] Gartel, A. L ; Goufman, E ; Tevosian, S. G ; Shih, H ; Yee, A. S and Tyner, A. L (1998) Activation and repression of p21^{WAF1/CIP1} transcription by pRb binding protein. Oncogene. 17. 3464-3469.
- [142.] Gartner, L. P et Hiatt, J. L (1992) Atlas d'histologie en couleurs. Version française. De Boeck Université.
- [143.] Gatenby, R. A (1991) Population ecology issues in tumor growth. Cancer Res. 51. 2542-2547.
- [144.] Gavrieli, Y ; Sherman, Y and Ben-Sasson, S. A (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol. 119. 493-501.
- [145.] Giancotti, F. G (1997) Integrin signaling : specificity and control of cell survival and cell cycle progression. Curr. Opin. Cell Biol. 9. 5. 691-700.
- [146.] Gierer, A (1981) Generation of biological patterns and form : some physical, mathematical and evolutionary aspects of biological pattern formation. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. Vol. 295. No. 1078. 429-440.
- [147.] Gilbert, D. A (1982a) Cell cycle variability : the oscillator model of the cell cycle yields transition probability alpha and beta type curves. Biosystems. 15. 317-330.
- [148.] Gilbert, D. A (1982b) An oscillator cell cycle model needs no first or second chance event. Biosystems. 15. 331-339.
- [149.] Glass, L (1973) Instability and mitotic patterns in tissue growth. J. Dyn. Syst. Meas. Control. 95. 324-327.
- [150.] Glazier, J. A and Graner, F (1993) Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells. Physical Review E. Vol. 47. No. 3. 2128-2154.
- [151.] Glotzer, M ; Murray, A. W and Kirschner, M. W (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. Nature. Vol. 349. 132-138.
- [152.] Goding, C. R and Fisher, D. E (1997) Regulation of melanocyte differentiation and growth. Cell Growth and Differentiation. Vol. 8. 935-940.
- [153.] Goldbeter, A (1991) A minimal cascade model for the mitotic oscillator involving cyclin and cdc2 kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88. 9107-9111.
- [154.] Gombert, A. K and Nielsen, J (2000) Mathematical modelling of metabolism. Curr. Opin. Biotech. 11. 180-186.
- [155.] Gonze, D and Goldbeter, A (2000) A model for a network of phosphorylation-dephosphorylation cycles displaying the dynamics of dominoes and clocks. J. Theor. Biol. 210. 167-186.
- [156.] Goodger, N. M ; Gannon, J ; Hunt, T and Morgan, P. R (1996) The localization of p34^{cdc2} in the cells of normal, hyperplastic and malignant epithelial and lymphoid tissues of the oral cavity. J. Pathology. Vol. 178. 422-428.
- [157.] Gotoh, N ; Toyoda, M and Shibuya, M (1997) Tyrosine phosphorylation sites at amino acids 239 and 240 of Shc are involved in epidermal growth factor-induced mitogenic signaling that is distinct from ras/mitogen-activated protein kinase activation. Mol. Cell Biol. 17. 1824-1831.
- [158.] Graña, X and Premkumar Reddy, E (1995) Cell cycle control in mammalian cells : role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). Oncogene. 11. 211-219.
- [159.] Graner, F (1993) Can surface adhesion drive cell-rearrangement ? Part I : Biological cell-sorting. J. Theor. Biol. 164. 455-476.
- [160.] Graner, F and Sawada, Y (1993) Can surface adhesion drive cell-rearrangement ? Part II : a geometrical model. J. Theor. Biol. 164. 477-506.
- [161.] Green, M. R ; Phil, D and Couchman, J. R (1985) Differences in human skin between the epidermal growth factor receptor distribution detected by EGF binding and monoclonal antibody recognition. The J. Inv. Dermatology. 85. 239-245.
- [162.] Greenspan, H. P (1974) On the self-inhibited growth of cell cultures. J. Th. Biol. Vol. 38. 81-97.
- [163.] Greenspan, H. P (1976) On the growth and stability of cell cultures and solid tumors. J. Th. Biol. Vol. 56. No. 1. 229-242.
- [164.] Gu, W ; Schneider, J. W ; Condorelli, G ; Kaushal, S ; Mahdavi, V and Nadal-Ginard, B (1993) Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. Cell. 72. 309-324.
- [165.] Guillaud, M (1993) Modélisation et contrôle statistique de l'analyse de la ploïdie en cancérologie. Thèse présentée pour obtenir le titre de Docteur de l'UJF-Grenoble I.
- [166.] Guo, K ; Wang, G ; Adres, S *et al.* (1995) MyoD induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. Mol. Cell Biol. 15. 3823-3829.
- [167.] Haftek, M (1995) Jonctions et cohésion dans l'épiderme humain. In. Biologie de la peau. Séminaire d'enseignement INSERM. Les Editions INSERM. Ed. D. Smith.
- [168.] Hall, M ; Bates, S and Peters, G (1995) Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors : p15 and p16 bind to kinases, p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. Oncogene. 11. 1581-1588.
- [169.] Hall, P. A and Watt, F. M (2000) Stem cells : the generation and maintenance of cellular diversity. Development. 106. 619-633.
- [170.] Hanahan, D and Weinberg, R. A (2000) The hallmarks of cancer. Cell. Vol. 100. 57-70.
- [171.] Hannon, G. J and Beach, D (1994) p15^{INK4B} is a potential effector of TGF-beta induced cell cycle arrest. Nature. 257-261.
- [172.] Hanson, F and Tier, C (1982) A stochastic model of tumor growth. Math. Biosci. 61 : 73-100.
- [173.] Hartwell, L. H (1971) Genetic control of the cell division cycle in yeast. J. Mol. Biol. 59. 183-194.
- [174.] Harvat, B. L ; Wang, A ; Seth, P and Jetten, A. M (1998) Up-regulation of p27^{KIP1}, p21^{WAF1/Cip1} and p16^{INK4a} is associated with, but not sufficient for, induction of squamous differentiation. J. Cell Science. 111. 1185-1196.
- [175.] Hatzimanikatis, V ; Lee K. H and Bailey J. E (1999) A mathematical description of regulation of the G₁-S transition of the mammalian cell cycle. Biotechnol. Bioeng. 65.6. 631-637.
- [176.] Haugh, J. M ; Huang, A. C ; Wiley, S ; Wells, A and Lauffenburger, D. A (1999) Internalized epidermal growth factor receptors participate in the activation of p21^{ras} in fibroblasts. J. Biol. Chem. Vol. 274. No. 48. 34350-34360.
- [177.] Hayflick, L (1965) The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 37. 614-636.
- [178.] Hayter, G. A and Alexandro, F. J Jr (1991) Identification of compartmental models for perturbed cell populations using state-space parameter estimation techniques. Int. J. Biomed. Comput. Vol. 28. No. 4. 231-247.
- [179.] Heinrich, R ; Schuster, S and Holzhütter, H. G (1991) Mathematical analysis of enzymic reaction systems using optimization principles. Eur. J. Biochem. 201. 1-21.
- [180.] Heinrich, R and Schuster, S (1998) The modelling of metabolic systems. Structure, control and optimality. Biosystems 47(1-2). 61-77.
- [181.] Hejblum, G ; Costagliola, D ; Valleron, A. J and Mary, J. Y (1988) Cell cycle models and mother-daughter correlation. J. Theor. Biol. Vol. 131. No. 2. 255-262.
- [182.] Hershko, A (1997) Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. 9. 6. 788-799.
- [183.] Hoang-Xuan, T and Prisant, O (1998) Restauration de l'épithélium cornéen à partir des cellules souches limbiques. Médecine/Sciences. No. 12. Vol. 14. 1375-1377.
- [184.] Hodak, E ; Gottlieb, A. B ; Anzilotti, M and Krueger, J. G (1996) The insulin-like growth factor 1 receptor is expressed by epithelial cells with proliferative potential cells with proliferative potential in human epidermis and skin appendages : correlation of increased expression with epidermal hyperplasia. J. Invest. Dermatol. 106. 564-570.
- [185.] Holtzer, H *et al.* (1983) Quantal and proliferative cell cycles : how lineages generate cell diversity and maintain fidelity. Progr. in Clin. Biol. Res. 134 : 213-227.

- [186.] **Honda, H** (1978) Description of cellular patterns by Dirichlet domains : the two-dimensional case. *J. Theor. Biol.* 72. 523-543.
- [187.] **Honda, H ; Morita, T and Tanabe, A** (1979) Establishment of epidermal cell columns in mammalian skin : computer simulation. *J. Theor. Biol.* 81. 745-759.
- [188.] **Honda, H ; Tanemura, M and Imayama, S** (1996) Spontaneous architectural organization of mammalian epidermis from random cell packing. *J. Invest. Dermatol.* 106. 312-315.
- [189.] **Honda, H and Yamanaka, H** (1984) A computer simulation of geometrical configurations during cell division. *J. Theor. Biol.* 106 : 423-435.
- [190.] **Howard, A and Pelc, S. R** (1951) Nuclear incorporation of P^{32} as demonstrated by autoradiographs. *Expl Cell Res.*, 2. 178-187.
- [191.] **Howard, A and Pelc, S. R** (1953) Synthesis of deoxynucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity. Lond. (Suppl. 6).* 261-273.
- [192.] **Howe, A ; Aplin, A. E ; Alahari, S. K and Juliano, R. L** (1998) Integrin signaling and cell growth control. *Current Opinion in Cell Biology.* 10. 220-231.
- [193.] **Hu, P P-C ; Shen, X ; Huang, D ; Liu, Y ; Counter, C and Wang, X-F** (1999) The MEK pathway is required for simulation of p21^{WAF1/CIP1} by transforming Growth Factor- β . *J. Biol. Chem.* Vol. 274. No. 50. 35381-35387.
- [194.] **Huang, S ; Chen, C. S and Ingber, D. E** (1998) Control of cyclin D1, p27^{Kip1}, and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. *Mol. Biol. Cell.* Vol. 9. 3179-3193.
- [195.] **Hughes, W. L ; Bond, V. P ; Brecher, G ; Cronkite, E. P ; Painter, R. B and Sherman, F. G** (1958) Cellular proliferation in the mouse as revealed by autoradiography with tritiated thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 44. 476-483.
- [196.] **Huthala, P ; Humphries, M. J ; McCarthy, J. B ; Tremble, P. M ; Werb, Z and Damsky, C. H** (1995) Cooperative signaling by $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *J. Cell. Biol.* 129. 867-879.
- [197.] **Hynes, R. O** (1987) Integrins : a family of cell surface receptors. *Cell.* 48. 549-554.
- [198.] **Iavarone, A and Massagué, J** (1997) Repression of the CDK activator Cdc25A and cell cycle arrest by cytokine TGF β in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature.* Vol. 387. 417-422.
- [199.] **Iizuka, H ; Honda, H and Ishida-Yamamoto, A** (1997) Epidermal remodeling in Psoriasis (II): a quantitative analysis of the epidermal architecture. *J. Invest. Dermatol.* 109. 806-810.
- [200.] **Ingber, D** (1993) Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *Journal of Cell Science.* Vol. 104. 3. 613-627.
- [201.] **Ingber, D** (1998) Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annual Review of Physiology.* Vol. 59. 575-599.
- [202.] **Inohara, S ; Kitano, Y and Kitagawa, K** (1995) Cell cycle regulators in the keratinocyte (cyclin-cdk). *Exp. Dermatol.* 4. 1-8..
- [203.] **Isele, W. P and Meinzer, H. P** (1998) Applying computer modeling to examine complex dynamics and pattern formation of tissue growth. *Computers and Biomed. Research.* 31. 476-494.
- [204.] **James, A ; Swann, K and Recce, M** (1999) Cell behaviour as a dynamic attractor in the intracellular signalling system. *J. Theor. Biol.* 196. 269-288.
- [205.] **Jaspersen, S. L ; Charles, J. F and Morgan, D. O** (1999) Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr. Biol.* 9. 227-236.
- [206.] **Jensen, U. B ; Lowell, S and Watt, F. M** (1999) The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis : a new view based on whole mount labelling and lineage analysis. *Development.* 126. 2409-2418.
- [207.] **Jinno, S ; Suto, K ; Nagata, A ; Igarashi, M ; Kanaoka, Y ; Nojima, H and Okayama, H** (1994) Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO. J.* 13. 1549-1556.
- [208.] **Jones, P. H** (1997) Epithelial stem cells. *BioEssays.* Vol. 19. No. 8. 683-690.
- [209.] **Jones, P. H ; Harper, S and Watts, F. M** (1995) Stem cells patterning and fate in human epidermis. *Cell.* 80. 83-93.
- [210.] **Jones, P. H and Watt, F. M** (1993) Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell.* 69. 713-724.
- [211.] **Joyce, N. C ; Mekli, B ; Joyce, S. J and Zieske, J. D** (1996) Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Invest. Ophthalmology and Visual Science.* Vol. 37. No. 4. 645-655.
- [212.] **Joyce, N. C and Zieske, J. D** (1997) Transforming growth factor- β receptor expression in human cornea. *Invest. Ophthalmology and Visual Science.* Vol. 38. No. 10. 1922-1928.
- [213.] **Kaelin, W. G. Jr.** (1999) Functions of the retinoblastoma protein. *BioEssays.* 21. 11. 950-958.
- [214.] **Kaern, M and Hunding, A** (1999) The effect of slow allosteric transitions in a coupled biochemical oscillator model. *J. Theor. Biol.* 198. 269-281.
- [215.] **Kaibuchi, K ; Kuroda, S ; Fukata, M and Nakagawa, M** (1999) Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases. *Curr. Opin. Cell Biology.* 11. 591-596.
- [216.] **Kanehisa, M and Goto, S** (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research.* Vol. 28. No. 1. 27-30.
- [217.] **Karatza, C and Shall, S** (1984) The reproductive potential of normal mouse embryo fibroblasts during culture in vitro. *J. Cell Sci.* 66. 401-409.
- [218.] **Karatza, C ; Stein, W. D and Shall, S** (1984) Kinetics of in vitro ageing of mouse fibroblasts. *J. Cell Sci.* 65. 163-175.
- [219.] **Karp, P. D ; Riley, M ; Saier, M ; Paulsen, I. T ; Paley, S. M and Pellegrini-Toole, A** (2000) The EcoCyc and MetaCyc databases. *Nucleic Acids Res.* 1. 28(1). 56-59.
- [220.] **Kato, J. Y ; Matsuoka, M ; Polyak, K ; Massague, J and Sherr, C. J** (1994) Cyclic AMP-induced G₁ phase arrest mediated by an inhibitor (p27^{Kip1}) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell.* 79. 487-496.
- [221.] **Kaur, P and Li, A** (2000) Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *J Invest Dermatol* 2000 Mar;114(3):413-20.
- [222.] **Kerkhoff, E and Rapp, U. R** (1998) Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene.* 17. 1457-1462.
- [223.] **Kholodenko, B. N ; Demin, O. V ; Moehren, G and Hoek, J. B** (1999a) Quantification of short term signaling by the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chemistry.* Vol. 274. No. 42. 30169-30181.
- [224.] **Kholodenko, B. N and Westerhoff, H. V** (1999b) The macroworld versus the microworld of biochemical regulation and control. *Trends Biochem. Sci.* 20. 52-54.
- [225.] **Kikuchi, A** (2000) Regulation of β -catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochemical and Biophysical Communications.* 268. 243-248.
- [226.] **Kimmel, M** (1981) General theory of cell cycle dynamics based on branching processes in varying environment. *Biomathematics and cell kinetics.* 357-373.
- [227.] **Kimmel, M and Arino, O** (1991) Cell cycle kinetics with supramitotic control, two type of cells, and unequal division : a model of transformed embryonic cells. *Mathematical biosciences.* 105 : 47-79.
- [228.] **Kimmel, M and Axelrod, D.E** (1991) Unequal cell division, growth regulation and colony size of mammalian cells: a mathematical model and analysis of experimental data. *Journal of Theoretical Biology.* 153, 157-180.
- [229.] **King, R. W ; Deshaies, R. J ; Peters, J-M and Kirshner, M. W** (1996) How proteolysis drives the cell cycle. *Science.* Vol. 274. 1652-1659.

- [230.] **Koegl, M ; Hoppe, T ; Schlenker, S ; Ulrich, H. D ; Mayer, T. U and Jentsch, S** (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*. 96. 635-644.
- [231.] **Kohn, K. W** (1998) Functional capabilities of molecular network components controlling the mammalian G₁/S cell cycle phase transition. *Oncogene*. 16. 1065-1075.
- [232.] **Kohn, K. W** (1999) Molecular interaction map of the mammalian cell cycle control and DNA repair systems. *Mol. Biol. Cell*. Vol. 10. 2703-2734.
- [233.] **Kondo, S** (1999) The roles of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their possible responses to UVA-irradiation. *J. Invest. Dermatology. Dermatology Symposium Proceedings*. 4. 177-183.
- [234.] **Konig, A and Bruckner-Tuderman, L** (1992) Transforming growth factor β stimulates collagen VII expression by cutaneous cells in vitro. *J. Cell Biol*. 117. 679-685.
- [235.] **Kopp-Schneider, A and Portier, C. J** (1994) A stem cell model for carcinogenesis. *Mathematical biosciences*. 120 : 211-232.
- [236.] **Kornitzer, D and Ciechanover, A** (2000) Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Cell. Physiol.* 182. 1-11.
- [237.] **Krek, W ; Ewen, M. E ; Shirodkar, S ; Arany, Z ; Kaelin, W. G. Jr and Livingston, D. M** (1994) Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell*. Vol. 78. 161-172.
- [238.] **Kretzschmar, M ; Doody, J and Massagué, J** (1997) Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF β family mediator Smad1. *Nature* 389. 618-622.
- [239.] **Kusama, K ; Okutsu, S ; Takeda, A ; Himiya, T ; Kojima, A ; Kidokoro, Y ; Chu, L ; Iwanari, S ; Kudo, I and Moro, I** (1996) p53 gene alterations and p53 protein in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J. Pathology*. 178. 415-421.
- [240.] **Kushner, J ; Bradley, G and Jordan, R. C. K** (1997) Patterns of p53 and Ki67 protein expression in epithelial dysplasia from the floor of the mouth. *J. Pathology*. 183. 418-423.
- [241.] **Kyoda, K. M ; Muraki, M and Kitano, H** (2000) Construction of a generalized simulator for multi-cellular organisms and its application to SMAD signal transduction. In : *Proceedings Pacific Symposium on BioComputing*.
- [242.] **Lauweryns, B ; van den Oord, J. J and Missotten, L** (1993) The transitional zone between limbus and peripheral cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. Vol. 34. No. 6. 1991-1999.
- [243.] **Lavia, P and Jansen-Dürr, P** (1999) E2F target genes and cell cycle checkpoint control. *BioEssays*. 21. 3. 221-230.
- [244.] **Lavker, R. M and Sun, T-T** (1983) Rapid modulation of keratinocyte differentiation by the external environment. *J. Invest. Dermatology*. 80. No. 4. 228-237.
- [245.] **Lavker, R. M and Sun, T-T** (1983) Epidermal stem cells. *J. Invest. Dermatology*. 81. Supplement. 121s-127s.
- [246.] **Lavker, R. M and Sun, T-T** (2000) Epidermal stem cells: properties, markers and location. *PNAS*. Vol. 97. No. 25. 13473-13475.
- [247.] **Leblond, C. P and El-Alfy, M** (1998) The eleven stages of the cell cycle, with emphasis on the changes in chromosomes and nucleoli during interphase and mitosis. *The anatomical record*. 252. 426-443.
- [248.] **Lee, E. C ; Lotz, M. M ; Steele, G. D and Mercurio, A. M** (1992) The integrin $\alpha 6 \beta 4$ is a laminin receptor. *J. Cell. Biol*. 117. 671-678.
- [249.] **Lehrer, M. S ; Sun, T-T and Lavker, M** (1998) Strategies of epithelial repair : modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *Journal of Cell Science*. 111. 2867-2875.
- [250.] **Leof, E. B** (2000) Growth factor receptor signalling : location, location, location. *TICB*. Vol. 10. 343-348.
- [251.] **Leone, G ; DeGregori, J ; Sears, R ; Jakoi, L and Nevins, J. R** (1997) Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature*. Vol. 387. 422-426.
- [252.] **Levenberg, S ; Yarden, A ; Kam, Z and Geiger, B** (1999). p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene*. 18. 869-876.
- [253.] **Lieberman, I ; Abrams, R and Ove, P** (1963) Changes in the metabolism of ribonucleic acid preceding the synthesis of deoxyribonucleic acid in mammalian cells cultured from the animal. *J. Biol. Chem*. 238. 2141-2149.
- [254.] **Lloyd, D ; Lloyd, A. L and Olsen, L. F** (1992) The cell division cycle : a physiologically plausible dynamic model can exhibit chaotic solutions. *BioSystems*. 27. 17-24.
- [255.] **Loeffler, M ; Potten, C. S and Wichmann, H. E** (1987) Epidermal cell proliferation. I. A comprehensive mathematical model of cell proliferation and migration in the basal layer predicts some unusual properties of epidermal stem cells. *Vorchows Arch. B*. 53. 286-300.
- [256.] **Loeffler, M ; Potten, C. S ; Paulus, U ; Glatzer, J and Chwalinski, S** (1988) Intestinal crypt proliferation. II. Computer modelling of mitotic index data provides evidence for lateral and vertical cell migration in the absence of mitotic activity. *Cell Tissue Kinet*. Vol. 21. No. 4. 247-258.
- [257.] **Lukas, J ; Bartkova, J and Bartek, J** (1996) Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin dependent kinase-pRb-controlled G₁ checkpoint. *Molecular and Cell. Bio*. Vol. 16. No. 12. 6917-6925.
- [258.] **Lukas, J ; Parry, D ; Aagaard, L ; Mann, J ; Bartkova, J ; Strauss, M ; Peters, G and Bartek, J** (1995) Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*. 375. 503-506.
- [259.] **Lukas, J ; Sorensen, C. S ; Lukas, C ; Santoni-Rugiu, E and Bartek, J** (1999) p16^{INK4a}, but not constitutively active pRb, can impose a sustained G₁ arrest : molecular mechanisms and implications for oncogenesis. *Oncogene*. 18. 3930-3935.
- [260.] **Lundberg, A. S and Weindberg, R. A** (1998) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Molecular and Cell. Bio*. Vol. 18. No. 2. 753-761.
- [261.] **Mackenzie, I. C** (1969) Ordered structure of the stratum corneum of mammalian skin. *Nature*. 222. 881-882.
- [262.] **Mackenzie, I. C** (1975) Spatial distribution of mitosis in mouse epidermis. *Anat. Rec*. 181. 705-710.
- [263.] **Mackenzie, I. C** (1977) Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure. *J. of Invest. Dermat*. Vol. 109. 377-383.
- [264.] **Mackenzie, I. C ; Zimmerman, K and Peterson, L** (1981) The pattern of cellular organization of human epidermis. *J. Invest. Dermat*. 76. 459-461.
- [265.] **Macleod, K** (1999) pRb and E2F-1 in mouse development and tumorigenesis. *Curr. Opin. Gen. Dev*. 9. 31-39.
- [266.] **Magnaghi-Jaulin, L ; Groisman, R ; Naguibneva, I ; Robin, P ; Lorain, S ; Le Villain, J-P ; Troalen, F ; Trouche, D and Harel-Bellan, A** (1998) Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature*. 391. 601-604.
- [267.] **Mainiero, F ; Murgia, C ; Wary, K. K ; Curatola, A. M ; Pepe, A ; Blumberg, M ; Westwick, J. K ; Der, C. J and Giancotti, F. G** (1997) The coupling of $\alpha 6 \beta 4$ integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. *EMBO Journal*. Vol. 16. No. 9. 2365-2375.
- [268.] **Mainiero, F ; Pepe, A ; Wary, K. K ; Spinardi, L ; Mohammadi, M ; Schlessinger, J and Giancotti, F. G** (1995) Signal transduction by the $\alpha 6 \beta 4$ integrin : distinct $\beta 4$ subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes. *EMBO J*. 14. 4470-4481.
- [269.] **Maione, R and Amati, P** (1997) Interdependence between muscle differentiation and cell-cycle control. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1332. M19-M30.
- [270.] **Marcelpoil, R** (1993a) Méthodologie pour l'étude de la sociologie cellulaire : application à l'étude du tissu prostatique normal et pathologique. Thèse présentée pour obtenir le titre de Docteur de l'UJF-Grenoble I.
- [271.] **Marcelpoil, R** (1993b) Normalisation of minimum spanning tree. *Analytical cellular pathology*. 5.177-186.
- [272.] **Marcelpoil, R ; Beaurepaire, E and Pesty, S** (1994) La sociologie cellulaire : modéliser et simuler une « société » cellulaire pour étudier le vivant. *Intellectica*. 2. 19. 53-72.

- [273.] **Marceauil, R ; Usson, Y** (1992) Methods for the study of cellular sociology : Voronoï diagrams and parametrization of the spatial relationships. *J. Theor. Biol.* 154 : 359-369.
- [274.] **Marnellos, G and Mjolsness, E** (1998) A gene network approach to modeling early neurogenesis in drosophila. In : Proceedings Pacific Symposium on BioComputing.
- [275.] **Marshall, C** (1999) How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11. 732-736.
- [276.] **Martelli, F ; Cenciarelli, C ; Santarelli, G ; Polikar, B ; Felsani, A and Caruso, M** (1994) MyoD induces retinoblastoma gene expression during myogenic differentiation. *Ocogene.* 9. 3579-3590.
- [277.] **Marti, A ; Wirbelauer, C ; Scheffner, M and Krek, W** (1999) Interaction between SCFSkp2 ubiquitin protein ligase and E2F-1, underlies regulation of E2F-1 degradation. *Nat. Cell Biol.* 1. 14-19.
- [278.] **Martinez, L. A ; Chen, Y ; Fisher, S. M ; Conti, C. J** (1999) Coordinated changes in cell cycle machinery occur during keratinocyte terminal differentiation. *Oncogene.* 18. 397-406.
- [279.] **Marušić, M ; Bajzer, Z ; Freyer, J. P and Vuk-Pavlovic, S** (1994) Analysis of growth of multicellular tumour spheroids by mathematical models. *Cell proliferation.* 27 : 73-94.
- [280.] **Massague, J ; Cheifetz, S ; Endo, T and Nadal-Ginard, B** (1986) Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83. 8206-8210.
- [281.] **Matela, R. J and Fletterick, R. J** (1979) A topological exchange model for cell-sorting. *J. Theor. Biol.* 76. 403-414.
- [282.] **Mayol, X and Grana, X** (1998) The p130 pocket protein : keeping order at the cycle exit/re-entrance transitions. *Frontiers in Bioscience.* 3. 11-24.
- [283.] **McAdams, H. H and Arkin, A** (1997) Stochastic mechanisms in gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 94. 814-819.
- [284.] **McAdams, H. H and Arkin, A** (1998) Simulation of prokaryotic genetic circuits. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27. 199-224.
- [285.] **McAdams, H. H and Arkin, A** (1999) It's a noisy business ! Genetic regulation at the nanomolar scale. *TIG.* Vol. 15. No. 2. 65-69.
- [286.] **McAdams, H. H and Arkin, A** (2000) Gene regulation : towards a circuit engineering discipline. *Curr. Biol.* 10. R318-R320.
- [287.] **Mendes, P** (1997) Biochemistry by numbers : simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. *Trends Biochem. Sci.* 22. 361-363.
- [288.] **Meric, P. A and Wise, M. J** (1999) Quantitative, scalable discrete-event simulation of metabolic pathways. *Congress of the Am. Ass. Art. Intell.*
- [289.] **Michelson, S and Leith, J** (1991) Autocrine and paracrine growth factors in tumor growth : a mathematical model. *Bulletin of mathematical biology.* 53 : 639-656.
- [290.] **Michelson, S and Leith, J** (1993) Growth factors and growth control of heterogeneous cell populations. *Bulletin of mathematical biology.* 55 : 993-1011.
- [291.] **Missero, C ; Calautti, E ; Eckner, R ; Chin, J ; Tsai, L ; Livingston, D. M and Dotto, G. P** (1995) Involvement of the cell cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A associated p300 protein in terminal differentiation. *PCNAS. USA.* 92. 5451-5455.
- [292.] **Mitev, V and Miteva, L** (1999) Signal transduction in keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 8. 96-108.
- [293.] **Mitrani, E** (1981) A computer model for epidermal cellular interactions. *BioSystems.* 14. 179-191.
- [294.] **Mitsui, S ; Ohuchi, A ; Adachi-Yamada, T ; Hotta, M ; Tsuboi, R and Ogawa, H** (2001) Cyclin-dependent kinase inhibitors, p21(waf1/cip1) and p27(kip1), are expressed site- and hair cycle-dependently in rat hair follicles. *J. Dermatol. Sci.* 25(2). 164-9.
- [295.] **Mochizuki, A ; Iwasa, Y and Takeda, Y** (1996) A stochastic model for cell sorting and measuring cell-cell adhesion. *J. Theor. Biol.* 179. 129-146.
- [296.] **Mombach, J. C. M and Glazier, J. A** (1995) Single cell motion in random aggregates of embryonic cells.
- [297.] **Mombach, J. C. M ; Glazier, J. A ; Raphael, R. C and Zajac, M** (1995) Quantitative comparison between differential adhesion models and cell sorting in the presence and absence of fluctuations. *Physical review letters.* Vol. 75. No. 11.
- [298.] **Montagnoli, A ; Fiore, F ; Eytan, E ; Carrano, A. C ; Draetta, G. F ; Hershko, A and Pagano, M** (1999) Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev.* 13. 1181-1189.
- [299.] **Montgomery Gill, R and Hamel, P. A** (2000) Subcellular compartmentalization of E2F family members is required for maintenance of the postmitotic state in terminally differentiated muscle. *J. Cell Biol.* Vol. 148. No. 6. 1187-1201.
- [300.] **Morel, D** (1995) Modeling the growth of mouse embryo fibroblasts in culture. *School of Biological Sciences. University of Sussex. Brighton. Rapport de maîtrise.*
- [301.] **Morel, D ; Marceauil, R and Brugal, G** (2001) A proliferation control networks model: application to the simulation of epithelial homeostasis in 2D. *Acta Biotheoretica.* In press.
- [302.] **Morgan, D. O** (1995) Principles of CDK regulation. *Nature.* Vol. 374. 131-134.
- [303.] **Morgan, D. O** (1996) The dynamics of cyclin dependent kinase structure. *Current Opinion in Cell Biology.* 8. 6. 767-772.
- [304.] **Morris, R. J ; Fischer, S. M and Slaga, T. J** (1985) Evidence that the centrally and peripherally located cells in the murine epidermal proliferative unit are two distinct cell populations. *J. Invest. Derm.* 84. 277-281.
- [305.] **Murgia, C ; Blaikie, P ; Kim, N ; Dans, M ; Petrie, H. T and Giaccotti, F. G** (1998) Cell cycle and adhesion defects in mice carrying a targeted deletion of the integrin $\beta 4$ cytoplasmic domain. *the EMBO Journal.* vol. 17. No. 14. 3940-3951.
- [306.] **Nagahara, H ; Ezhevsky, S. A ; Vocero-Akbani, A. M ; Kaldis, P ; Solomon, M. J and Dowdy, S. F** (1999) Transforming growth factor β targeted inactivation of cyclin E : cyclin-dependent kinase 2 (Cdk 2) complexes by inhibition of Cdk2 activating kinase activity. *PNAS.* Vol. 96. No. 26. 14961-14966.
- [307.] **Nagorcka, B. N ; Manoranjan, V. S and Murray, J. D** (1987) Complex spatial patterns from tissue interactions – An illustrative model. *J. Theor. Biol.* 128. 359-374.
- [308.] **Nanney, L. B ; McKanna, J. A ; Stoscheck, C. M ; Carpenter, G and King, L. E** (1984) Visualization of epidermal growth factor receptors in human epidermis. *J Invest Dermatol* Feb;82(2):165-9
- [309.] **Nanney, L. B ; Stoscheck, C. M ; King, L. E Jr ; Underwood, R. A and Holbrook, K. A** (1990) Immunolocalization of epidermal growth factor receptors in normal developing human skin. *J Invest Dermatol* Jun;94(6):742-8
- [310.] **Nevins, J. R** (1998) toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell growth and differentiation.* Vol. 9. 585-593.
- [311.] **Nguyen, B. P ; Ryan, M. C ; Gil, S. G and Carter, W. G** (2000) Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12. 554-562.
- [312.] **Norel, R and Agur, Z** (1991) A model for the adjustment of the mitotic clock by cyclin and MPF levels. *Science.* 251. 1076-1078.
- [313.] **Norris, V ; Ayala, J. A ; Begg, K ; Bouché, J-P ; Bouloc, P et al.** (1994) Cell cycle control : Prokaryotic solutions to Eukaryotic problems ? *J. Theor. Biol.* 168. 227-230.
- [314.] **Novak, B ; Csikasz-Nagy, A ; Gyorffy, B ; Nasmyth, K and Tyson, J. J** (1998) Model scenarios for evolution of the eukaryotic cell cycle. *Phil. Trans. R. Soc. London. B.* 353. 2063-2076.
- [315.] **Novak, B ; Toth, A ; Csikasz-Nagy, A ; Gyorffy, B ; Tyson, J. J and Nasmyth, K** (1999) Finishing the cell cycle. *J. Theor. Biol.* 199. 223-233.
- [316.] **Novak, B and Tyson, J. J** (1993) Modeling the cell division cycle: M-phase trigger, oscillations, and size control. *J. Cell Science.* 106. 1153-1168.
- [317.] **Obeyesekere, M. N ; Herbert, J. R and Zimmerman, S. O** (1995) A model of the G₁ phase of the cell cycle incorporating cyclin E/cdk2 complex and retinoblastoma protein. *Oncogene.* 11. 1199-1205.
- [318.] **Obeyesekere, M. N ; Knudsen, E. S ; Wang, J. Y. J and Zimmerman, S. O** (1997) A mathematical model of the G₁ phase of Rb^{+/+} and Rb^{-/-} mouse embryonic fibroblasts and an osteosarcoma cell line. *Cell Prolif.* 30. 171-194.

- [319.] **Obeyesekere, M. N ; Tucker, S. L and Zimmerman, S. O** (1992) Mathematical models for the cellular concentrations of cyclin and MPF. *Biochemical and biophysical research communications*. Vol. 184. No. 2. 782-789.
- [320.] **Obeyesekere, M. N ; Tucker, S. L and Zimmerman, S. O** (1994) A model for regulation of the cell cycle incorporating cyclin A, cyclin B and their complexes. *Cell Prolif.* 27. 105-113.
- [321.] **Odell, G. M ; Oster, G ; Albrech, P and Burnside, B** (1981) The mechanical basis of morphogenesis. I. Epithelial folding and invagination. *Develop. Biol.* 85. 446-462.
- [322.] **Ogata, H ; Goto, S ; Sato, K ; Fujibuchi, W ; Bono, H and Kanehisa, M** (1999) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome. *Nucleic Acids Research*. Vol. 27. No. 1. 29-34.
- [323.] **Ogden, G. R ; Kiddie, R. A ; Lunny, D. P and Lane, D. P** (1992) Assessment of p53 protein expression in normal, benign and malignant oral mucosa. *J. Pathology*. 166. 389-394.
- [324.] **Okabe, A ; Boots, B and Sugihara, K** (1992) Spatial tessellations concepts and applications of Voronoi diagrams. John Wiley & sons.
- [325.] **Olson, R. L ; Nordgrist, R. E and Everett, M. A** (1969) Mitosis in human epidermis. An ultrastructural study. *Dermatologica*. Basel. 138. 268-283.
- [326.] **Oster, G ; Murray, J. D and Harris, A. K** (1983) Mechanical aspects of mesenchymal morphogenesis. *J. Embryol. exp. Morphol.* 78. 83-125.
- [327.] **Padgett, R. W ; Das, P and Krishna, S** (1999) TGF β signaling, Smads, and tumor suppressors. *BioEssays*. 20. 5. 382-391.
- [328.] **Pagano, M ; Tam, S. W ; Theodoras, A. M ; Beer-Romero, P ; Del Sal, G. Chau, V ; Yew, P. R ; Draetta, G. F and Rolfe, M** (1995) Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*. 269. 682-685.
- [329.] **Paramio, J. M ; Lain, S ; Segrelles, C ; Lane, E. B and Jorcano, J. L** (1998) Differential expression and functionally co-operative roles for the retinoblastoma family of proteins in epidermal differentiation. *Oncogene*. 17. 949-957.
- [330.] **Pardee, A. B** (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 71. No. 4. 1286-90
- [331.] **Pardee, A. B** (1986) Biochemical and molecular events regulating cell proliferation. *Journal of Pathology*. Vol. 149. 1-2.
- [332.] **Parker, S ; Eichele, B. G ; Zhang, P et al.** (1995) p53-Independent expression of p21 in muscle and other terminally differentiated cells. *Science*. 267. 1024-1027.
- [333.] **Pawson, T** (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature*. Vol. 373. 573-580.
- [334.] **Pawson, T and Saxton, T. M** (1999) Signaling networks - Do all roads lead to the same genes. *Cell*. Vol. 97. 675-678.
- [335.] **Pece, S and Gutkind, J. S** (2000) Signaling from E-cadherin to the MAPK pathway by the recruitment and activation of the epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J. Biochem*. Vol. 275. 41227-41233.
- [336.] **Pellegrini, G ; Dellambra, E ; Golisano, O ; Martinelli, E ; Fantozzi, I ; Bondanza, S ; Ponzin, D ; McKeon, F and De Luca, M** (2001) p63 identifies keratinocyte stem cells. *PNAS*. Vol. 98. No. 6. 3156-3161.
- [337.] **Pellettieri, L ; Carlsson, C. A and Grusell, E** (1993) Cellular differentiation : a theory based on simulation with computer graphics. *Med. Hypothesis*. Vol. 41. No. 6. 529-541.
- [338.] **Petritsch, C ; Beug, H ; Balmain, A and Oft, M** (2000) TGF-beta inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G(1) arrest. *Genes Dev*. 14. 24. 3093-3101.
- [339.] **Pines, J** (1999) Four-dimensional control of the cell cycle. *Nature. Cell Biol.* Vol. 1. E73-E79.
- [340.] **Pirson, I ; Fortemaison, N ; Jacobs, C ; Dremier, S ; Dumont, J. E and Maenhaut, C** (2000) The visual display of regulatory information and networks. *Trends Cell Biol.* 10 (10). 404-408.
- [341.] **Pollak, M ; Boyarsky, A and Gora, P** (1991) A mathematical model describing consequences of abnormally high levels of epidermal receptor on the proliferation of neoplastic cells. *Cancer investigation*. 9 : 513-520.
- [342.] **Polyak, K ; Kato, J. Y ; Solomon, M. J ; Sherr, C. J ; Massague, J ; Roberts, J. M and Koff, A** (1994) p27^{Kip1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev*. 8. 9-22.
- [343.] **Porter-Jordan, K and Lippman, M. E** (1994) Overview of the biologic markers of breast cancer. *Breast cancer*. Vol. 8. No. 1. 73-100.
- [344.] **Portier, C. J ; Kopp-Schneider, A and Sherman, C. D** (1993) Using cell replication data in mathematical modeling in carcinogenesis. *Environmental health perspectives*. 101(Suppl. 5) : 79-86.
- [345.] **Posadas, E. M ; Criley, s. R and Coffey, D. S** (1996) Chaotic oscillations in cancer cells. *Cancer Res*. 56. 3682-3688.
- [346.] **Potten, C. S** (1975) Epidermal production rates. *J. Invest. Derm.* 65. 488-506.
- [347.] **Potten, C. S ; Booth, C and Pritchard, D. M** (1997) The intestinal epithelial stem cell : the mucosal governor. *Int. J. Exp. Pathol.* 78. 4. 219-243.
- [348.] **Potten, C. S and Hendry, J. H** (1973) The segregation of DNA in epithelial stem cells. *Cell*. 15. 889-906.
- [349.] **Potten, C. S and Loeffler, M** (1990) Stem cells : attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties lessons for and from the crypt. *Development*. 110. 1001-1020.
- [350.] **Potten, C. S and Morris, R. J** (1988) Epithelial stem cells *in vivo*. *J. Cell Sci.* (Suppl.) 10. 45-62.
- [351.] **Potten, C. S ; Wichmann, H. E ; Loeffler, M ; Dobek, K and Major, D** (1982) Evidence for discrete cell kinetic subpopulations in mouse epidermis based on mathematical analysis. *Cell Tissue Kinetic*. 15. 305-329.
- [352.] **Promayon, E** (1997) Modélisation et simulation de la respiration. Thèse de 3^{ème} cycle de l'UJF.
- [353.] **Puri, P. L ; Maclachlan, T. K ; Levrero, M and Giordano, A** (1999) The intrinsic cell cycle: from yeast to mammals. In *The Mol. Basis Cell Cycle Growth Control*. Ed. G. Stein. 15-79.
- [354.] **Puri, P. L ; Avantaggiati, M. L ; Balsano, C ; Sang, N ; Graessmann, A ; Giordano, A and Levrero, M** (1997) p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. *EMBO. J.* 16. 369-383.
- [355.] **Pustzai, L ; Lewis, C. E ; Lorenzen, J and McGee, O'D** (1993) Growth factors : regulation of normal and neoplastic growth. *J. Pathology*. 169. 191-201.
- [356.] **Raghavan, S ; Bauer, C ; Mundschau, G ; Li, Q and Fuchs, E** (2000) Conditional ablation of β 1 integrin in skin : severe defects in epidermal proliferation, basement membrane formation and hair follicle invagination. *J. Cell Biol.* Vol. 5. No. 4. 1149-1160.
- [357.] **Rao, S. S ; Chu, C and Kohtz, D. S** (1995) Positive and negative regulation of D-type cyclin expression in skeletal myoblasts by basic fibroblasts factor b. A role for cyclin D1 in control of myoblasts differentiation. *J. Biol. Chem.* 270. 4093-4100.
- [358.] **Rashbass, J ; Stekel, D and Dillwyn Williams, E** (1996) The use of a computer model to simulate epithelial pathologies. *J. Pathology*. 179. 333-339.
- [359.] **Ren, Z-P ; Pontén, F ; Nistér, M and Pontén, J** (1996) Two distinct p53 immunohistochemical patterns in human squamous-cell skin cancer, precursors and normal epidermis. *Int. J. Cancer*. 69. 174-179.
- [360.] **Resnitzky, D** (1997) Ectopic expression of cyclin D1 but not cyclin E induces anchorage-independent cell cycle progression. *Mol. Cell. Bio.* Vol. 17. No. 9. 5640-5647.
- [361.] **Retsky, M. W ; Wardwell, R. H ; Swartzendruber, D. E and Headley, D. L** (1987) Prospectives computerized simulation of breast cancer : comparison of computer predictions with nine sets of biological and clinical data. *Cancer research*. 47 : 4982-4987.
- [362.] **Reuther, G. W and Der, C. J** (2000) The Ras branch of small GTPases : Ras family members don't fall far from the tree. *Curr. Opin. Cell Biol.* 157-165.

- [363.] **Reynisdottir, I and Massagué, J** (1995) The subcellular locations of p15^{Ink4b} and p27^{Kip1} coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev.* 11. 492-503.
- [364.] **Reynisdottir, I Polyak, K ; Iavarone, A and Massagué, J** (1997) Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF β . *Genes Dev.* 9. 1831-1845.
- [365.] **Rikimaru, K ; Moles, J. P and Watt, F. M** (1997) Correlation between hyperproliferation and suprabasal integrin expression in human epidermis reconstituted in culture. *Exp. Dermatology.* 6. 5. 214-221.
- [366.] **Roussel, M. F** (1999) The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene.* 18. 5311-5317.
- [367.] **Rubelj, A and Vondracek, Z** (1999) Stochastic mechanism of cellular aging-abrupt telomere shortening as a model for stochastic nature of cellular aging. *J. Theor. Biol.* 197. 425-438.
- [368.] **Rudman, S. M ; Philpott, M. P ; Thoman, G. A and Kealey, T** (1997) The role of IGF-I in human skin and its appendages : morphogen as well as mitogen ? *J. Invest. Dermatol.* 109. 770-777.
- [369.] **Sandvig, K. U and Haaskjold, E** (1993) The proliferative response during regeneration of a ring-shaped defect in the corneal epithelium. *Acta Ophthalmol.* 71. 39.
- [370.] **Sandvig, K. U ; Haaskjold, E ; Bjerknes, R ; Refsum, S. B and Kravik, K** (1994) Cell kinetics of conjunctival and corneal epithelium during regeneration of different sized corneal epithelial defects. *Acta Ophthalmol.* 72. 43.
- [371.] **Sarret, Y** (1995) La jonction dermo-épidermique en 1995. In. *Biologie de la peau. Séminaire d'enseignement INSERM. Les Editions INSERM.* Ed. D. Smith.
- [372.] **Schaff, J and Loew, L. M** (1999) The virtual cell. *Pac Symp Biocomput* 1999. 228-39
- [373.] **Schermer, A ; Galvin, S and Sun, T. T** (1986) Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J. Cell Biol.* 103. 49-62.
- [374.] **Schilling, C. H ; Schuster, S ; Palsson, B. O and Heinrich, R** (1999) Metabolic pathway analysis: basic concepts and scientific applications in the post-genomic era. *Biotechnol. Prog.* 15. 296-303.
- [375.] **Schittny, J. C and Yurchenko, P. D** (1990) Terminal short arm domains of basement membrane laminin are critical for its-self assembly. *J. Cell Biol.* 110. 825-832.
- [376.] **Schmidt, C. A and Lowe, S. W** (1999) Apoptosis and therapy. *J. of Pathology.* 187. 127-137.
- [377.] **Schofield, R** (1978) The relationship between the spleen colony forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells.* 4. 7-25.
- [378.] **Schneider, J. W ; Gu, W ; Zhu, L et al.** (1994) Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in pRb^{-/-} muscle cells. *Science.* 264. 1467-1470.
- [379.] **Sexl, V ; Diehl, J. A ; Sherr, C. J ; Ashmun, R ; Beach, D and Roussel, M. F** (1999) A rate limiting function of cdc25A for phase entry inversely correlates with tyrosine dephosphorylation of Cdk2. *Oncogene.* 18. 573-582.
- [380.] **Shackney, S. E and Shankey, T. V** (1999) Cell cycle models for molecular biology and molecular oncology : exploring new dimensions. *Cytometry.* 35. 97-116.
- [381.] **Shaw, L. J and Murray, J. D** (1990) Model for complex skin patterns. *SIAM. J. Appl. Math.* 50. 2. 628-648.
- [382.] **Sheaff, R. J ; Groudine, M ; Gordon, M ; Roberts, J. M and Clurman, B. E** (1997) Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27^{KIP1}. *Genes and development.* 11. 1464-1478.
- [383.] **Sherr, C. J and Roberts, J. M** (1996) Inhibitors of mammalian G₁ cyclin-dependent kinases. *Genes and development.* 9. 1149-1163.
- [384.] **Sherr, C. J and Roberts, J. M** (1999) CDK inhibitors : positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes and development.* 13. 1501-1512.
- [385.] **Shields, J. M ; Pruitt, K ; McFall, A ; Shaub, A and Der, C. J** (2000) Understanding Ras : 'it ain't over 'til it's over'. *TICB.* 10. 147-154.
- [386.] **Shteinberg, M and Hershko, A** (1999) Role of Suc1 in the activation of the cyclosome by protein kinase Cdk1/cyclin B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257. 12-18.
- [387.] **Shtutman, M ; Zhurinsky, J ; Simcha, I ; Albanese, C ; D'amico, M; Pestell, R and Ben-Ze'ev** (1999) The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *PCNAS USA.* 96. 5522-5527.
- [388.] **Simon, M and Serre, G** (1995) Cornéodesmosomes et cohésion inter-cornéocytaire. In. *Biologie de la peau. Séminaire d'enseignement INSERM. Les Editions INSERM.* Ed. D. Smith.
- [389.] **Smith, J. A** (1982) The cell cycle and related concepts in cell proliferation. *J. Pathology.* Vol. 136. 149-166.
- [390.] **Smith, J. A and Martin, L** (1973) Do cells cycle ? *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 70. 1263-1267.
- [391.] **Staquet, M. J ; Levarlet, B ; Dezutter-Dambuyant, C ; Schmitt, D and Thivolet, J** (1990) Identification of specific human epithelial cell integrin receptors as VLA proteins. *Exp. Cell Res.* 187. 277-283.
- [392.] **St. Croix, B ; Sheehan, C ; Rak, J. W ; Florenes, V. A ; Slingerland, J. M and Kerbel, R. S** (1998) E-cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{KIP1}. *J. Cell Biology.* Vol 142. No. 2. 557-571.
- [393.] **Stein, G. S ; Baserga, R ; Giordano, A and Denhardt, D. T** (1999) The molecular basis of cell cycle and growth control. *Wiley-Liss.*
- [394.] **Steinberg, M and McNutt, P. M** (1999) Cadherins and their connections : adhesion junctions have broader functions. *Curr. Opin. Cell Biology.* 11. 554-560.
- [395.] **Stekel, D ; Rashbass, J and Williams, E. D** (1995) A computer graphic simulation of squamous epithelium. *J. Theor. Biol.* Vol. 173. No. 3. 283-293.
- [396.] **Streuli, C** (1999) Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr. Opin. Cell Biology.* 11. 634-640.
- [397.] **Stroustrup, B** (1996) *Le langage C++.* 2nd edition. *Int. Thomson Pub.*
- [398.] **Sudbo, J ; Marcelpoil, R and Reith, A** (2000a) New algorithms based on the Voronoi Diagram applied in a pilot study on normal mucosa and carcinomas. *Anal Cell Pathol.* 21(2):71-86.
- [399.] **Sudbo, J ; Marcelpoil, R and Reith, A** (2000b) Caveats: numerical requirements in graph theory based quantification of tissue architecture. *Anal Cell Pathol.* 21(2):59-69.
- [400.] **Sveiczzer, A ; Csikasz-Nagy, A ; Gyorffy, B ; Tyson, J and Novak, B** (2000) Modeling the fission yeast cell cycle: quantized cycle times in wee1⁻ cdc25 Δ mutant cells. *PNAS.* Vol. 97. No. 14. 7865-7870.
- [401.] **Sveiczzer, A ; Novak, B and Mitchison, J. M** (1999) Mitotic control in the absence of cdc25 mitotic inducer in fission yeast. *J. Cell Science.* 112. 1085-1092.
- [402.] **Swann**(1957) The control of cell division: a review. *Cancer Res.* 17. 727-757.
- [403.] **Szathmáry, E** (1994) Toy models for simple forms of Multicellularity, Soma and Germ. *J. Theor. Biol.* 169. 125-132.
- [404.] **Takai-Igarashi, T and Kaminuma, T** (1998) A pathway finding system for the cell signaling networks database. In *Silico Biology.* <http://www.bioinfo/isb/1998/01/0012/main.html>.
- [405.] **Takizawa, C. G and Morgan, D. O** (2000) Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12. 658-665.
- [406.] **Tan, W. Y** (1986) A stochastic Gompertz birth-death process. *Stat. Probab. Lett.* 4 : 25-28.
- [407.] **Tani, H ; Morris, R. J and Kaur, P** (2000) Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *PNAS.* Vol. 97. No. 20. 10960-10965.
- [408.] **Tavazoie, S ; Hughes, J. D ; Campbell, M. J ; Cho, R. J and Church, G. M** (1999) Systematic determination of genetic network architecture. *Nature Genetics.* Vol. 22. 281-285.

- [409.] **Taylor, G ; Lehrer, M. S ; Jensen, P. J ; Sun, T-T and Lavker, R** (2000) Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*. Vol. 102. 451-461.
- [410.] **Tennenbaum, T ; Adam, L. L ; Belanger, A. J ; De Luca, L. M and Yuspa, S. H** (1996) Selective changes in laminin adhesion and $\alpha\beta 4$ integrin regulation are associated with the initial steps in keratinocyte maturation. *Cell Growth and Differentiation*. Vol. 7. 615-628.
- [411.] **Thieffry, D** (1999) From global expression data to gene networks. *BioEssays*. 21. 895-899.
- [412.] **Thompson, D'A. W** (1942) *On Growth and Form*. Cambridge University Press.
- [413.] **Thornburn, A. M ; Walton, P. A and Feramisco, J. R** (1993) MyoD induced cell cycle arrest is associated with increased nuclear affinity of the Rb protein. *Mol. Biol. Cell*. 17. 705-713.
- [414.] **Till, J. E and McCulloch, E. A** (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow. *Radiat. Res*. 14. 213-222.
- [415.] **Timpl, R** (1989) Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur. J. Biochem*. 180. 487-502.
- [416.] **Timpl, R** (1996) Macromolecular organization of basement membranes. *Curr. Opin. Cell Biol*. 8. 5. 618-624.
- [417.] **Tomita, M ; Hashimoto, K ; Takahashi, K ; Shimizu, T. S ; Matsuzaki, Y ; Miyoshi, F ; Saito, K ; Tanida, S ; Yugi, K ; Venter, J. C and Hutchison, C. A. III** (1999) E-CELL: software environment for whole cell simulation. *Bioinformatics*. Vol. 15. No. 1. 72-84.
- [418.] **Tomlinson, I. P. M and Bodmer, W. F** (1997) Modelling the consequences of interactions between tumour cells. *British J. Cancer*. 75. 2. 157-160.
- [419.] **Treinin, M and Feitelson, D, G** (1993) Unequal cell division as a driving force during differentiation. *J. Theor. Biol*. 160. 85-95.
- [420.] **Tyers, M and Jorgensen, P** (2000) Proteolysis and the cell cycle : with this RING I do thee destroy. *Curr. Opin. Gen. Dev*. 10. 54-64.
- [421.] **Tyson, J. J and Novak, B** (2001) Regulation of the eukaryotic cell cycle: molecular antagonism, hysteresis and irreversible transitions. *J. Theor. Biol*. 210. 249-263.
- [422.] **Vaidya P. G ; Vaidya, V. G and Martin, D. G** (1991) An application of the non-linear bifurcation theory to tumor growth modeling. *Int. J. Biomed. Computing*. 27. 27-46.
- [423.] **Vaver, A and Rashbass, J** (1997) The biological toolbox : a computer program for simulating basic biological and pathological processes. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 52. 203-211.
- [424.] **Vidal, A and Koff, A** (2000) Cell-cycle inhibitors : three families united by a common. *Gene*. 247. 1-15.
- [425.] **Voit, E. O** (2000) *Computational analysis of biochemical systems*. Cambridge University Press. ISBN: 0-521-78579-0.
- [426.] **Wang, N ; Butler, J. P and Ingber, D. E** (1993) Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*. Vol. 260. 1124-1127.
- [427.] **Wataya-Kaneda, M ; Hashimoto, K ; Miyazono, K and Yoshikawa, K** (1994) Differential localization of TGF- β precursor isoforms in normal human skin. *J. Dermatol. Science*. 8. 38-44.
- [428.] **Watt, F. M** (1984) Selective migration of terminally differentiating cells from the basal cells from the basal layer of cultured human epidermis. *The Journal of Cell Biology*. Vol. 98. 16-21.
- [429.] **Watt, F. M** (1989) Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr. Opin. Cell Biol*. 1. 1107-1115.
- [430.] **Watt, F. M** (1998) Epidermal stem cells : markers, patterning and the control of stem cell fate. *Phil. Trans. R. Soc.Lond*. 353. 831-837.
- [431.] **Watt, F. M and Hogan, B. L. M** (2000) Out of Eden : stem cells and their niches. *Science*. Vol. 287. 1427-1430.
- [432.] **Watt, F. M and Jones, P. H** (1993) Expression and function of the keratinocyte integrins. *Dev. Suppl*. 185-193.
- [433.] **Weaire, D and Rivier, N** (1984) Soap, cells and statistics - Random patterns in two dimensions. *Contemp. Phys*. 25. 1. 59-99.
- [434.] **Weliki, M and Oster, G** (1990) The mechanical basis of cell rearrangement. I. Epithelial morphogenesis during *Fundulus epiboly*. *Development*. 108. 373-386.
- [435.] **Wendling, S ; Oddou, C and Isabey, D** (1999) Stiffening response of a cellular tensegrity model. *J. Theor. Biol*. 196. 309-325.
- [436.] **Weng, G ; Bhalla, U. S and Iyengar, R** (1999) Complexity in biological signaling systems. *Science*. Vol. 284. 92-96.
- [437.] **Wieser, R. J ; Faust, D ; Dietrich, C and Oesch, F** (1999) p16INK4 mediates contact-inhibition of growth. *Oncogene*. 18. 277-281.
- [438.] **Wiley, H. S** (2000) Are computers evolving in biology. *HMS Beagle. BioMedNet Magazine*. Issue 75.
- [439.] **Wilson, S. E ; Schultz, G ; Chegini, N ; Weng, J and He, Y-G** (1994) Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor and interleukin-1 Proteins in the cornea. *Exp. Eye Res*. 59. 63-72.
- [440.] **Winder, R** (1994) *Le développement de logiciel en C++*. Masson.
- [441.] **Witten, M** (1981) Modeling cellular systems and aging processes : I. Mathematics of cell system models. A review. *Mechanisms of Ageing and Development*. 17. 53-94.
- [442.] **Wolfram, St** (1984) Cellular automata as a model of complexity. *Nature*. 311 : 419-424.
- [443.] **Wolpert, L** (1971) Positional information and pattern formation. *Curr. Top. Devl. Biol*. 6. 183-224.
- [444.] **Wolpert, L** (1990) The evolution of development. *Biol. J. Linn. Soc*. 39. 109-124.
- [445.] **Woollard, A and Nurse, P** (1995) G₁ regulation and checkpoints operating around START in fission yeast. *Bioessays*. 17. 6. 481-90.
- [446.] **Wright, N and Alison, M** (1984) *The biology of epithelial cell populations*. Vol. 1 and 2. Clarendon Press. Oxford.
- [447.] **Xu, X ; Nakano, T ; Wick, S ; Dubay and Bizuela, L** (1999) Mechanism of Cdk2/Cyclin E inhibition by p27 and p27 phosphorylation. *Biochemistry*. 38. 27. 8713-8722.
- [448.] **Yam, C. H ; Ng, R. W ; Siu, W. Y ; Lau, A. W and Poon, R. Y** (1999) Regulation of cyclin A-Cdk2 by SCF component Skp1 and F-box protein Skp2. *Mol. Cell Biol*. 19. 635-645.
- [449.] **Yang, J and Kornbluth, S** (1999) All aboard the cyclin train : subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends in cell Biology*. Vol. 9. 207-210.
- [450.] **Zachariae, W and Nasmyth, K** (1999) Whose end is destruction : cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Development*. 13. 2039-2058.
- [451.] **Zhang, H. S ; Gavin, M ; Dahiya, A ; Postigo, A. A ; Ma, D ; Luo, R. X ; Harbour, J. W and Dean, D. C** (2000) Exit from G₁ and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell*. Vol. 101. 79-89.
- [452.] **Zhang, P ; Wong, C ; Liu, D ; Finegold, M ; Harper, J. W and Elledge, S. J** (1999) p21^{CIP1} and p57^{KIP2} control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Development*. 13. 213-224.
- [453.] **Zhu, X ; Ohtsubo, M ; Bohmer, R ; Roberts, J. M and Assoian, R. K** (1996) Adhesion dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J. Cell. Biol*. 133. 391-403.
- [454.] **Zimmerman, C. M and Padgett, R. W** (2000) Transforming growth factor β signaling mediators and modulators. *Gene*. 249. 17-30.

RESUME

Les mécanismes moléculaires et cellulaires contrôlant l'homéostasie dans un tissu normal ne sont pas complètement élucidés *in vivo* même si nombre d'entre eux sont connus *in vitro*. Ils présentent une telle complexité qu'on parle généralement de réseaux de contrôles.

Les simulations sur ordinateur représentent un outil puissant pour étudier les réseaux de contrôle de la prolifération cellulaire. Elles possèdent une puissance de calcul permettant de tester des hypothèses, notamment sur les redondances et les retro contrôles que l'on suppose impliqués dans ces réseaux et d'observer les conséquences de modifications (e.g. mutations) dans un contexte *in vivo* simulé.

Notre approche combine une représentation spatiale des cellules en deux dimensions (2D) par le graphe de Voronoï et un modèle de vie cellulaire. Le graphe de Voronoï associe un polygone à chaque cellule et l'ensemble de ces polygones définit un modèle de l'architecture du tissu. Le modèle des réseaux de régulation de la prolifération cellulaire inclut des éléments intracellulaires (cyclines, Cyclin Dependent Kinases, pRb, inhibiteurs de CDK) et des éléments extracellulaires (récepteurs membranaires aux facteurs de prolifération, intégrines). L'intégration de la représentation spatiale des cellules permet une modulation quantitative des signaux extracellulaires en fonction du voisinage des cellules et une modélisation du mouvement des cellules dans le temps. Ainsi la caractérisation des cellules du modèle en tant que cellules souches, en transit ou bien engagées dans la différenciation est réalisée en fonction de leur statut moléculaire (e.g. quelle protéine est exprimée, active, inhibée, etc ...) à un instant donné.

Nos résultats montrent le rôle des inhibiteurs de CDKs (p15 et p27) et de la proportion des récepteurs aux facteurs de croissance et de différenciation (EGFr et TGF β) dans le contrôle du passage de G₁ à S. Les simulations en 2D illustrent l'influence de l'environnement et du pattern des cellules souches sur la prolifération dans les couches basales des épithélia stratifiés et de l'adhérence différentielle lors de la différenciation et de la migration des kératinocytes vers les couches suprabasales.

Mots clés : modèle, simulation, réseau de contrôle, prolifération cellulaire, homéostasie épithélial.

SUMMARY

The mechanisms controlling the homeostasis in a normal stratified epithelium are still unclear *in vivo* although many of them are now well characterized *in vitro*. They show such a complexity that they are generally mentioned as control networks.

Computer simulations represent a powerful tool to investigate the complex field of cell proliferation regulation networks. It provides huge computation capabilities to test hypotheses about redundant pathways and feedback loops that are now thought to be involved in these networks and to observe the consequences of modifications (e.g. mutations) in a simulated *in vivo* context.

Our approach combined a spatial representation of cells in two dimensions (2D) using the Voronoi graph and a model of cell life. The Voronoi graph associates a polygon to every cell and the set of these polygons defines a model of the tissue architecture. The model for cell proliferation regulation network includes intracellular (cyclins, Cyclin Dependent Kinases, Rb, CDKs inhibitors) and extracellular controls (growth and differentiation factors, integrins). This model, which integrates the spatial representation of cells, enables a quantitative modulation of the extracellular signals as a function of the cell neighborhood and a model of cell motility during time dependent simulations. Thus, the characterization of the modeled cells as Stem, Transit Amplifying or Committed cells is determined according to their molecular status (e.g. which protein is expressed, active, inhibited, etc ...) at a given time.

Our results show the role of CDK inhibitors (p15 and mainly p27) and of the ratio of growth and differentiation factor receptors in the G₁ to S phase control. The 2D simulations illustrate the influence of the microenvironment and the patterning of stem cells on cell proliferation in basal layers of stratified epithelia and of differential adherence in keratinocytes differentiation and related upward migration.

Keywords: computer model, simulation, control network, cell proliferation, epithelial homeostasis.