



Régulation mécanique de l'angiogenèse in vitro: analyse par un modèle aux dérivées partielles des interactions cellules-substrat

Patrick Namy

► To cite this version:

Patrick Namy. Régulation mécanique de l'angiogenèse in vitro: analyse par un modèle aux dérivées partielles des interactions cellules-substrat. Autre [q-bio.OT]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2004. Français. $\langle$ NNT : $\rangle$. $\langle$ tel-00007601 $\rangle$

HAL Id: tel-00007601

<https://theses.hal.science/tel-00007601v1>

Submitted on 2 Dec 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.



HAL Authorization

Régulation mécanique de l'angiogenèse *in vitro* : analyse par un modèle aux dérivées partielles des interactions cellules-substrat.

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 22 octobre 2004

pour l'obtention du

Doctorat de l'Université Joseph Fourier - Grenoble I
(spécialité Modèles et Instruments en Médecine et Biologie)

par

Patrick NAMY

Composition du jury :

<i>Président :</i>	Pr. J. Demongeot
<i>Rapporteurs :</i>	Pr. J.-P. François Pr. C. Oddou
<i>Examineurs :</i>	Pr. J. Ohayon Dr. P. Tracqui Dr. B. Vailhé
<i>Directeur de thèse :</i>	Dr. P. Tracqui

Remerciements

Bien que la thèse soit un diplôme, c'est avant tout un travail collectif. Il est donc naturel de commencer mes remerciements en pensant à mon équipe.

Je tiens à remercier M. Philippe Tracqui, mon directeur de thèse, qui m'a encadré pendant quatre années. C'est grâce à lui que j'ai découvert les biomathématiques. Il a su, par ses conseils éclairés, orienter mon travail dans des directions porteuses de résultats. Je lui en suis reconnaissant.

De même, j'ai beaucoup appris avec M. Jacques Ohayon, avec qui cela a été un plaisir de travailler. Je lui suis également reconnaissant d'avoir accepté d'être présent à mon jury de thèse.

Je remercie également M. Jean-Pierre Françoise, Professeur à l'Université Paris VI, et M. Christian Oddou, Professeur à l'université Paris XII, d'avoir accepté de juger ces travaux de doctorat et d'en être les rapporteurs.

Ma gratitude va aussi au Pr. J. Demongeot et au Dr. B. Vailhé pour avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie tous les doctorants et stagiaires de TIMC pour leur présence amicale.

Enfin, ces remerciements ne seraient pas complets sans un grand merci à ma fiancée et à mes amis pour leur soutien et leur affection. Cette thèse est aussi la leur.

Table des matières

I. Contexte général	15
1. Avant-propos/Objectif	17
1.1. Introduction : modélisation des structures auto-organisées	17
1.2. L'angiogenèse	18
1.3. Contexte de l'étude	18
1.4. Plan de la thèse	19
2. Contexte expérimental mécanique des interactions cellules-matrice. Présentation de l'angiogenèse in vitro	23
2.1. Introduction	23
2.2. Contexte mécanique des interactions cellules-matrice	24
2.2.1. Structure et propriétés de la matrice extracellulaire	24
2.2.2. Interactions mécaniques cellules-matrice	25
2.2.3. Expériences de quantification de la traction cellulaire	26
2.2.3.1. Travaux de R. T. Tranquillo	26
2.2.3.2. Travaux de Benkherourou <i>et al.</i>	27
2.3. L'angiogenèse	28
2.3.1. L'angiogenèse <i>in vivo</i>	28
2.3.1.1. Dynamique de l'angiogenèse <i>in vivo</i>	28
2.3.1.2. Le rôle de la mécanique dans ce processus	29
2.3.2. Présentation des expériences <i>in vitro</i>	30
2.3.2.1. Protocole	30
2.3.2.2. Résultat expérimentaux	30
2.3.3. Les principaux régulateurs de l'angiogenèse <i>in vitro</i>	32
2.3.4. L'angiogenèse <i>in vitro</i> dans le contexte des interactions mécaniques cellules-matrice	33
2.3.4.1. Expériences de Vernon <i>et al.</i> (1992)	33
2.3.4.2. Expériences de Vailhé <i>et al.</i> (1997)	34
2.4. Bilan expérimental	35
II. Modélisation	37

3. Modélisation biomécanique et mathématique de l'angiogenèse in vitro	39
3.1. Positionnement du problème et objectifs	39
3.2. Modélisation	40
3.2.1. Définition des variables	40
3.2.2. Contraintes actives et passives au sein de la MEC	40
3.2.2.1. Contraintes de traction cellulaire	41
3.2.2.2. Rhéologie du biogel	41
3.2.3. Modélisation de la migration des cellules endothéliales	43
3.2.4. Modélisation de l'évolution de la densité du biogel	46
3.2.5. Réduction de l'analyse à un domaine à deux dimensions	47
3.2.6. Conditions initiales, conditions aux limites	48
3.2.7. Normalisation et système complet	49
3.3. Conclusion	49
4. Analyse de stabilité linéaire du modèle	51
4.1. Introduction	51
4.2. Calculs algébriques	52
4.2.1. Linéarisation du système au voisinage de l'état homogène	52
4.2.2. Calculs	52
4.3. Détermination des valeurs critiques pour le paramètre de bifurcation τ	53
4.4. Influence des différents paramètres sur la condition de bifurcation	58
4.4.1. Propriétés mécaniques du biogel	58
4.4.1.1. Influence de la rigidité du biogel	58
4.4.1.2. Influence des termes d'élasticité longue-portée	59
4.4.1.3. Influence du rappel élastique	61
4.4.2. Caractéristiques cellulaires	62
4.4.2.1. Influence de l'haptotaxie	62
4.4.2.2. Influence de l'inhibition de contact	63
4.5. Conclusion	64
5. Simulations du modèle de réorganisation matricielle et cellulaire	67
5.1. Introduction	67
5.2. Valeurs des paramètres expérimentaux	67
5.3. Paramètres de la résolution numérique par la méthode des éléments finis	68
5.4. Régulation de l'angiogenèse <i>in vitro</i>	69
5.4.1. Aspects qualitatif de formation des lacunes	69
5.4.1.1. Auto-organisation du milieu tissulaire et cellulaire	69
5.4.1.2. Influence des lignes de tension créées par les CE sur leur comportement migratoire	70
5.4.2. Comparaison avec les expériences <i>in vitro</i>	74
5.4.2.1. Dynamique de formation des lacunes	74
5.4.2.2. Seuil critique de la concentration des CE	76
5.4.2.3. Seuil critique de la densité de fibrine	80
5.4.2.4. Influence de la variation d'épaisseur du gel	81
5.5. Conclusion	83

6. Modélisation du remodelage matriciel. Étude de la régulation mécanique de la protéolyse	85
6.1. Introduction	85
6.2. La dégradation de la matrice extracellulaire	86
6.2.1. Contexte biologique	86
6.2.2. Modélisation de la dégradation	86
6.2.2.1. Processus de Michaelis-Menten	86
6.2.2.2. Équation d'évolution des protéases	88
6.2.2.3. Lien entre la dégradation de la MEC et sa rigidité	88
6.2.2.4. Intégration de ces données au modèle	89
6.2.3. Formulation d'une hypothèse sur la régulation mécanique de la dégradation	90
6.3. Étude théorique sur la condition de bifurcation	91
6.3.1. Calculs algébriques	93
6.3.2. Potentiel du modèle de formation de motifs	94
6.4. Résultats	95
6.4.1. Résultats théoriques : La protéolyse matricielle contrôle le phénomène d'angiogenèse <i>in vitro</i>	95
6.4.2. Comparaisons avec les expériences <i>in vitro</i>	97
6.4.2.1. Dynamique de formation des lacunes et des réseaux vasculaires	97
6.4.2.2. Comparaison quantitative avec l'évolution temporelle des PD de la fibrine	99
6.4.2.3. Corrélation entre la morphologie du réseau et le profil de dégradation	101
6.4.3. Autre voie de régulation mécanique de la protéolyse	103
6.5. Conclusion	106
 III. Méthodologie	 109
7. Méthodes de modélisation du comportement mécanique du biogel	111
7.1. Introduction et Objectifs	111
7.2. Formulation théorique	112
7.2.1. Les différents états du système	112
7.2.2. Expressions des différentes grandeurs	113
7.2.2.1. Choix des coordonnées curvilignes $(\theta^1, \theta^2, \theta^3)$	113
7.2.2.2. Vecteurs covariants $\mathbf{G}_k$ et $\mathbf{g}_k(t)$	113
7.2.2.3. Vecteurs contravariants $\mathbf{G}^k$ et $\mathbf{g}^k$	113
7.2.2.4. Tenseur gradient de la transformation $\mathbf{F}$	114
7.2.2.5. Tenseur des dilatations $\mathbf{C}$	114
7.2.2.6. Tenseur des déformations de Green-Lagrange $\mathbf{E}$	114
7.2.2.7. Tenseur des contraintes de Cauchy $\boldsymbol{\tau}$	115
7.3. Élasticité linéaire	116
7.3.1. Principes	116
7.3.2. Formules des contraintes de von Mises σ_{vm} et des déformations effectives e_{ff}	117

7.4.	Modélisation du comportement hyperélastique du biogel en mécanique des grandes déformations	117
7.4.1.	Expression du tenseur des contraintes de Cauchy en grandes déformations	117
7.4.2.	Revue bibliographique des fonctions d'énergie élastique	118
7.4.2.1.	Cas des matériaux incompressibles	118
7.4.2.2.	Cas des matériaux compressibles	120
7.4.3.	Revue bibliographique des différentes fonctions d'énergie visqueuses	121
7.4.3.1.	Modèle de Pioletti	122
7.4.3.2.	Modèle de Ramtani	122
7.5.	Choix des fonctions d'énergie	122
7.6.	Étude de fonctions d'énergie particulière	123
7.6.1.	Fonctions d'énergie retenues	123
7.6.2.	Études théorique de la loi de comportement par linéarisation	123
7.6.2.1.	Intérêt de la linéarisation de la loi de comportement	123
7.6.2.2.	Comparaison avec les résultats obtenus par petites déformations	123
7.6.3.	Étude de la loi de comportement élastique	124
7.6.3.1.	Formulation de l'expérience de traction uniaxiale	124
7.6.3.2.	Étude de l'influence des paramètres élastiques lors d'une expérience de traction uniaxiale	125
7.6.3.3.	Étude de la loi contraintes-déformations	126
7.7.	Caractérisation des paramètres biomécaniques. Validation du choix de la fonction d'énergie	128
7.7.1.	Expérience de relaxation : résultats expérimentaux	128
7.7.2.	Détermination de c_1	129
7.7.3.	Détermination de η	130
7.7.3.1.	Solution numérique	130
7.7.3.2.	Recherche du coefficient de viscosité le plus réaliste	131
7.8.	Conclusion	131
8.	Validation mathématique des méthodes de résolution numérique	133
8.1.	Introduction : de la nécessité de vérifier les résultats numériques	133
8.2.	La méthode des éléments finis	133
8.2.1.	Principe de la méthode	134
8.2.2.	Formulation variationnelle	134
8.2.3.	Implémentation	135
8.3.	Validation de la méthode	135
8.3.1.	Validation qualitative (AL)	135
8.3.1.1.	Cas stable : retour à l'état homogène	135
8.3.1.2.	Cas instable : création de lacunes	136
8.3.2.	Validation quantitative : Analyse non-linéaire de perturbation	137
8.3.2.1.	Principe de l'analyse de perturbation	137
8.3.2.2.	Simplification du modèle	138
8.3.2.3.	Équations résultantes	138
8.3.2.4.	Conditions aux limites	139

8.3.2.5.	Développement en puissance entière du paramètre de bifurcation τ et du temps t	139
8.3.2.6.	Calculs algébriques	139
8.3.2.7.	Comparaison résultats théoriques - simulations numériques	144
8.4.	Conclusions	147
IV.	Conclusion générale-Discussion	149
9.	Discussion générale et perspectives	151
V.	Appendices	159
10.	Appendice de l'analyse de stabilité non-linéaire	161
10.1.	Valeur des coefficients K et Γ dans l'équation de Landau	161
10.2.	Un autre exemple : mode instable 5	161
10.2.1.	valeurs numériques des paramètres	161
10.2.2.	Prédiction de l'analyse non-linéaire	162
10.2.3.	Comparaison qualitative et quantitative avec la simulation numérique	163
11.	Appendice de la mécanique en grandes déformations	165
11.1.	Calcul des vecteurs contravariants $\mathbf{g}^k$	165
11.2.	Expression de la base locale déformée $\mathbf{g}_i \otimes \mathbf{g}_j$	166
11.3.	Calcul des composantes du tenseur des contraintes de Cauchy	166
11.3.1.	Expression explicite de la composante élastique	166
11.3.1.1.	Expression des dérivées de W_e en fonction des invariants	167
11.3.1.2.	Expression des invariants I_1 et I_3 en fonction des composantes E_{ij}	167
11.3.2.	Expression explicite de la composante visqueuse	167
11.3.2.1.	Expression des dérivées de W_v en fonction des invariants	168
11.3.2.2.	Expression de J_2 en fonction de $\dot{E}_{ij}$	168
11.4.	Comparaison avec les valeurs des paramètres en petites déformations	168
11.4.1.	Composante (1,1) en petites déformations	168
11.4.2.	Composante (1,1) en grandes déformations	169
11.4.2.1.	Linéarisation de J	169
11.4.2.2.	Linéarisation de $\frac{\partial W}{\partial I_3}$	169
11.4.2.3.	Linéarisation de τ^{11}	169
11.4.3.	Identification des termes de (11.7) et (11.10)	169
11.5.	Application au cas de traction/compression multiaxiales	169
VI.	Publication	187

Table des figures

1.1.	<i>Processus de modélisation mathématique d'un phénomène biologique.</i>	19
2.1.	<i>Nature fibreuse de la MEC.</i>	25
2.2.	<i>Membrane de silicone contractée par des cellules mésenchymateuses.</i>	26
2.3.	<i>Schéma du dispositif expérimental utilisé par Benkherourou (1999) pour mesurer les forces de traction cellulaire.</i>	27
2.4.	<i>Résultats expérimentaux, issus de Benkherourou (1999).</i>	28
2.5.	<i>Représentation schématique des différentes étapes de l'angiogenèse in vivo. Images adaptées de Rakusan (1995).</i>	29
2.6.	<i>Évolution dynamique de l'angiogenèse in vitro.</i>	31
2.7.	<i>Détails d'un cordon de CE.</i>	32
2.8.	<i>Assemblage des cordons entre eux, anastomoses.</i>	32
2.9.	<i>Formation de structures de cellules influencée par l'épaisseur du gel.</i>	34
4.1.	<i>Schéma récapitulatif du raisonnement.</i>	56
4.2.	<i>Diagramme de stabilité obtenu par la relation de dispersion (4.2).</i>	57
4.3.	<i>Diagramme de bifurcation $\tau_{turing} - E$.</i>	59
4.4.	<i>Diagramme de bifurcation $\tau_{turing} - \beta_1 - \beta_2$.</i>	60
4.5.	<i>Diagramme de bifurcation $\tau_{turing} - s$.</i>	61
4.6.	<i>Diagramme de bifurcation $\tau_{turing} - h$.</i>	62
4.7.	<i>Diagramme de bifurcation $\tau_{turing} - h/D_0$.</i>	63
4.8.	<i>Diagramme de bifurcation $\tau_{turing} - N_2$.</i>	64
5.1.	<i>États stationnaires à partir de différentes distributions spatiales initiales.</i>	69
5.2.	<i>Influence des déformations sur la migration cellulaire</i>	71
5.3.	<i>Champs de déformations dans un gel précontraint.</i>	72
5.4.	<i>Comparaison de l'indice directionnel.</i>	73
5.5.	<i>Comparaison de l'influence de la diffusion sur les motifs spatiaux à l'état stationnaire, avec une diffusion constante et homogène (a), ou dépendante des déformations (b).</i>	74
5.6.	<i>Dynamique de formation des lacunes.</i>	75
5.7.	<i>Dynamique de l'épaisseur de la MEC.</i>	76
5.8.	<i>Influence de la concentration initiale de CE.</i>	78
5.9.	<i>Différents motifs spatiaux à l'état stationnaire en fonction de la concentration initiale de CE.</i>	79

Table des figures

5.10. Influence de la densité initiale de MEC, et donc de la rigidité de la MEC, sur la formation du réseau.	80
5.11. Influence d'un gradient d'épaisseur de la MEC sur le réseau de CE.	82
6.1. Courbe paramétrée $\tau_{turing}^d(t)$ en fonction de A_t	95
6.2. Corrélation entre les pseudo-états du système et la morphologie du réseau.	96
6.3. Dynamique de formation des pseudo-capillaires.	98
6.4. Évolution dynamique de la quantité globale (normalisée) de MEC.	98
6.5. Évolution de la déformation effective maximale.	99
6.6. Profil dynamique des PDF pour des HUVEC.	100
6.7. Profil dynamique des PDF pour des BREC.	101
6.8. Corrélation entre la mesure des PDF et la morphologie du réseau.	102
6.9. Influence du coefficient de diffusion enzymatique, D_c , sur la formation de pseudo-capillaires.	104
6.10. Profil dynamique des PDF pour des HUVEC sous l'hypothèse H_i	105
7.1. Déformation d'un biogel : schématisation du passage de la configuration à contraintes nulles du matériau (I) à la configuration déformée au temps t ($A(t)$).	112
7.2. Mesure de la contrainte sur le bord fixe en fonction du coefficient élastique c_1	125
7.3. Influence de coefficient de Poisson sur la réponse mécanique du milieu lors d'une compression uniaxiale.	126
7.4. Relation contraintes-déformations en mécanique des grandes déformations.	127
7.5. Schéma du dispositif expérimental de Benkherourou (1999).	128
7.6. Résultats expérimentaux de la réponse mécanique d'un biogel lors d'une expérience de relaxation.	129
7.7. Réponse en contrainte du matériau à l'échelon de déformation pour différentes valeurs de viscosité η	130
8.1. Validation qualitative du comportement du système dans le cas stable.	136
8.2. Validation qualitative du comportement du système dans le cas instable.	137
8.3. Tracé du maximum des parties réelles (non-nulles) des valeurs propres en fonction des modes propres.	144
8.4. Comparaison entre la prédiction de l'analyse de stabilité non-linéaire et la simulation numérique de la distribution de la densité de CE (n) à l'état stationnaire.	145
8.5. Comparaison entre la prédiction de l'analyse de stabilité non-linéaire et la simulation numérique de la dilatation (θ) à l'état stationnaire.	146
10.1. Tracé de la plus grande partie réelle des valeurs propres en fonction des modes propres.	162
10.2. Comparaison entre la prédiction de l'analyse de stabilité non-linéaire et la simulation numérique pour la densité de CE (n).	163

Liste des tableaux

5.1. Valeurs des paramètres cellulaires.	68
5.2. Valeurs des paramètres mécaniques.	68
5.3. Comparaisons quantitatives, entre l'expérience et le modèle, des valeurs des paramètres critiques.	81
6.1. Valeur des paramètres cinétiques du processus de dégradation.	87
8.1. Comparaison quantitative entre la prédiction théorique et la simulation numérique.	146
11.1. Expressions des vecteurs et des tenseurs dans le cas d'une traction multiaxiale. .	170
11.2. Expressions des tenseurs et des invariants.	170

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
CE	cellules endothéliales
MEC	matrice extracellulaire
HUVEC	cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humain
BREC	cellules endothéliales de rétine de bœuf
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
PD	produit de dégradation
PDF	produit de dégradation de la fibrine
PA/plasmine	plasminogène/plasmine
MEF	méthodes des éléments finis
EDP	équation aux dérivées partielles

Première partie .

Contexte général

1. Avant-propos/Objectif

1.1. Introduction : modélisation des structures auto-organisées

Que ce soit dans le règne animal ou végétal, l'évolution des espèces a engendré une variété de motifs colorés et d'architectures spécifiques qui manifeste avec évidence les capacités d'organisation des systèmes naturels. Les bandes de la peau du zèbres, la pigmentation des léopards ou encore les ailes des papillons en sont des exemples (PourlaScience (2004)). A une autre échelle, lors de la morphogenèse, les cellules s'organisent également pour permettre la mise en place des organes de l'embryon. D'une façon générale, la formation de motifs est donc un processus relativement courant en biologie mais reste encore mal compris.

En 1952, Turing (1952) a développé une théorie de réaction-diffusion permettant de modéliser ces mécanismes. Il a montré que les substances chimiques (les morphogènes) pouvaient réagir et diffuser de façon à engendrer, spatialement, un état stationnaire hétérogène des concentrations de ces produits. Ces mécanismes ont inspiré les travaux développant des modèles permettant de reproduire la formation de motifs sur les coquillages (Meinhardt (2003)), sur la peau des poissons (Painter *et al.* (1999)) ou sur les ailes des papillons (Sekimura *et al.* (2000)).

Au début des années 70, Wolpert (1969) a développé un concept phénoménologique, appelé "information positionnelle", pour expliquer la formation des motifs de concentration chimique et la différenciation. Il a suggéré que les cellules étaient pré-programmées pour réagir aux différentes concentrations spatiales des morphogènes, leur permettant de se positionner dans l'espace pour organiser la différenciation cellulaire. Cette approche phénoménologique de l'information positionnelle a conduit à de nombreuses explications dans le domaine du développement (Richardson *et al.* (1991)), mais ne permet pas d'appréhender les mécanismes sous-jacents aux processus observés.

Ce n'est que depuis une vingtaine d'années que les biologistes ont pris conscience de l'importance des facteurs mécaniques dans la régulation de nombreux processus physiologiques ou pathologiques. Murray (1983); Oster *et al.* (1983); Murray et Oster (1984) ont été les premiers à modéliser la façon dont les phénomènes biologiques sont influencés par l'environnement physique où ils se déroulent. Leurs travaux ont donné naissance aux modèles biomécaniques, où la biochimie et la biomécanique interagissent. Les différents équilibres résultant de ces interactions permettent d'expliquer des phénomènes à l'échelle cellulaire et tissulaire, par exemple la cicatrisation d'une blessure, directement liée à la réorganisation structurelle des tissus (Tracqui *et al.* (1995)).

Les études sur la formation des motifs hétérogènes ont souvent été critiquées pour ne pas incorporer l'influence des gènes dans leur modèle. Nous pourrions rappeler que la génération de formes et de motifs est un processus long, relativement éloigné du niveau du génome. Évidemment, les gènes jouent un rôle fondamental, et ces mécanismes doivent être génétiquement contrôlés. Toutefois, les gènes ne peuvent pas créer, seuls, les motifs ; ils fournissent seulement

1. Avant-propos/Objectif

une direction générale pour leur formation. Il est d'ailleurs intéressant de constater que des travaux expérimentaux récents ont montré la régulation de l'activité des gènes par les effets mécaniques : la mécanotransduction (Chen *et al.* (2001); Ingber (2002)).

Dans ce contexte théorique, nous nous sommes attachés à étudier comment les interactions mécaniques pouvaient réguler les premières étapes du processus de développement des vaisseaux sanguins : l'angiogenèse.

1.2. L'angiogenèse

L'angiogenèse, *i. e.* la néo-vascularisation, se définit comme le développement de vaisseaux sanguins à partir d'un réseau pré-existant (Vailhé (1997); Cines *et al.* (1998)). Elle se distingue de la vasculogenèse qui correspond à la mise en place d'un réseau vasculaire, lors du développement embryonnaire, par différenciation des angioblastes, des cellules précurseurs des cellules formant les vaisseaux sanguins : les cellules endothéliales (CE).

Cette néo-vascularisation se produit, chez l'adulte, dans des contextes physiologiques : lors de la cicatrisation tissulaire (Lockhart *et al.* (2003)), lors du cycle reproducteur femelle (Popovici *et al.* (1999)), ou encore lors des processus inflammatoires (Chavakis *et al.* (2004)). Dans de nombreux contextes pathologiques, la néo-vascularisation joue un rôle aggravant (Carmeliet (2003)) : en cancérogenèse, par exemple, l'irrigation d'une tumeur solide par les vaisseaux sanguins fournit une source de nutriment et permet le phénomène de métastases (Gupta et Qin (2003); Kirsch *et al.* (2004)). L'angiogenèse intervient également lors de certaines affections oculaires graves et de maladies inflammatoires, telles les hépatites auto-immune du foie (Medina *et al.* (2004)). On considère que ces maladies touchent plus de 3% de la population mondiale, et même plus de 7% quand on ajoute le cas du cancer (Varner (1997)). Le contrôle de l'angiogenèse représente donc un grand enjeu clinique, ce qui explique les nombreux travaux pour mieux connaître les facteurs régulant ce phénomène.

Les modèles biomécaniques nous semblent être particulièrement intéressants pour expliquer comment les cellules intègrent les signaux extérieurs, biochimiques et biomécaniques, de leur environnement pour former un réseau fonctionnel de capillaires (Murray (2003c)). Nous verrons en effet que les interactions mécaniques jouent un rôle majeur au cours du processus d'angiogenèse.

1.3. Contexte de l'étude

La biologie théorique est un domaine interdisciplinaire par excellence. Nos travaux sont à l'intersection de la biologie, de la biochimie, de la médecine, de l'informatique, de la mécanique et des mathématiques. Ils prennent en compte des phénomènes aussi variés que la migration cellulaire, la nature fibreuse des tissus, leur dégradation par des enzymes, le tonus du cytosquelette générant une force de traction cellulaire ou la résistance mécanique de leur environnement.

Cette pluridisciplinarité peut être source d'incompréhension entre les spécialistes des différents domaines. Cependant, cet aspect multi-factoriel constitue, à nos yeux, un des points les plus excitants de la biologie théorique. Elle permet de s'ouvrir à de nouveaux domaines afin d'appréhender les processus dans leur globalité (biologiquement, mécaniquement...) et oblige à redéfinir ses méthodes de communications pour se faire comprendre des non-spécialistes de son domaine (et réciproquement).

Nos travaux s'inscrivent dans un dialogue permanent entre l'expérience et la modélisation théorique. Une telle méthodologie permet de formuler des hypothèses, à partir d'observations expérimentales, qui conduisent à l'élaboration d'un modèle mathématique. Ce modèle consiste en un système d'équation couplées non-linéaires qui, dans l'état actuel de nos connaissances, ne peut être résolu que numériquement. Cette composante de nos travaux sera réalisée à l'aide d'ordinateurs et de code de calculs adaptés pour obtenir les résultats numériques. Ces résultats nous permettront d'une part de valider ou d'infirmer les hypothèses formulées, et d'autre part de donner de nouvelles pistes de réflexion conduisant à la réalisation de nouvelles expériences. Il s'agit alors "d'expérimentations guidées par le modèle".

Notre démarche de recherche peut être schématisée ainsi :

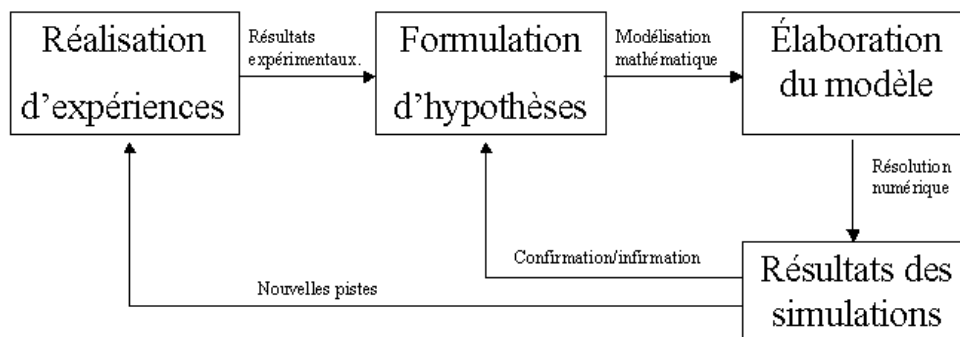


FIG. 1.1.: *Processus de modélisation mathématique d'un phénomène biologique.*

Un des buts de la biologie théorique, et de la modélisation en général, est de mettre en évidence les processus biologiques essentiels des observations expérimentales (modèle minimal) et de comprendre la façon dont ils interagissent.

La modélisation mathématique permet l'intégration des connaissances que nous avons du niveau cellulaire des différents phénomènes (adhésion, cytosquelette) pour en déterminer un comportement caractéristique global au niveau de la population de cellule. Elle permet donc de transformer nos connaissances des phénomènes, à l'échelle cellulaire, en une science prédictive de ces phénomènes macroscopiques. Nous pouvons ainsi étudier l'influence d'un paramètre donné sur le comportement global des solutions du modèle. Il ne s'agit pas de créer un modèle intégrant tous les processus biologiques actuellement connus chez la cellule ou dans les tissus, car même si cela était possible (tant au niveau de la modélisation que de la résolution), cela ne nous aiderait pas à mieux comprendre le phénomène. Ces considérations incitent donc bien à développer des modèles minimaux, dont le but est d'isoler les paramètres critiques des phénomènes étudiés.

1.4. Plan de la thèse

Nous avons vu que le contrôle de l'angiogenèse *in vivo* est un enjeu de santé publique considérable. Pour simplifier l'étude de ce phénomène multi-factoriel, des modèles d'angiogenèse *in vitro* ont été développés (Vernon *et al.* (1992); Nehls et Drenckhahn (1995); Pepper *et al.* (1995); Vailhé *et al.* (1997); Korff et Augustin (1999)). Au chapitre (2) seront présentés les

1. Avant-propos/Objectif

principaux résultats expérimentaux d'angiogenèse *in vitro*, ainsi que des résultats mettant en évidence l'importance des facteurs mécaniques.

Dans la continuité des travaux de J. D. Murray, nous considérons, comme hypothèse fondamentale de notre modèle, que l'angiogenèse *in vitro* est induite par une instabilité dynamique, résultant d'un déséquilibre mécanique entre les forces de traction cellulaire et la résistance passive viscoélastique de la matrice extracellulaire. Notre modélisation (chapitre 3) consiste en un système d'équations aux dérivées partielles couplées non-linéaires : la dynamique de la population de cellules résulte de l'intégration des composantes diffusive, convective et haptotactique de chaque cellule, et la matrice extracellulaire, un gel de fibrine, est considérée comme un milieu continu viscoélastique. Nous avons d'abord mené des analyses de stabilité linéaire (chapitre 4) et non-linéaire (chapitre 8) au voisinage de l'état stationnaire homogène pour déterminer les points de bifurcations intéressants, correspondants à une instabilité de Turing. Ces analyses de bifurcation servent de base aux simulations numériques réalisées par la méthode des éléments finis. Ces résultats permettent de déterminer l'influence de paramètres expérimentaux (concentration initiale en cellule, densité initiale du biogel, épaisseur du biogel) lors des expériences d'angiogenèse *in vitro*, sur la réorganisation des cellules endothéliales en réseau vasculaire. Les prédictions théoriques sont confirmées par les résultats expérimentaux et montrent qu'une réorganisation cellulaire et matricielle n'est possible que pour des jeux de valeurs précis des paramètres expérimentaux. Les résultats de ces simulations numériques seront présentés au chapitre (5).

Dans la deuxième partie de notre thèse (chapitre 6), nous nous sommes intéressés à une autre voie possible de régulation du phénomène d'angiogenèse *in vitro* par les facteurs mécaniques : le contrôle de la dégradation du biogel. En se dégradant, la matrice devient plus malléable, facilitant ainsi son remodelage par les cellules et le processus d'angiogenèse. Cette hypothèse se traduit par des lois de comportement mécanique non-linéaires de la matrice (biogel), où le module de Young dépend spatialement de la densité de matrice extracellulaire. La protéolyse matricielle est donc vue, dans ce contexte, comme le déclencheur de l'instabilité dynamique provoquant le processus de formation des pseudo-capillaires. Nous analyserons cette voie de régulation en formulant deux hypothèses pour interpréter l'augmentation de la protéolyse de la matrice lorsque celle-ci est soumise à une contrainte mécanique. Dans notre première hypothèse, les déformations mécaniques favorisent l'accès aux sites de dégradation pour les enzymes (le taux de réaction cinétique est alors modélisé comme une fonction croissante des déformations). Dans la seconde, les effets mécaniques stimulent la sécrétion de protéases par les cellules (la vitesse de biosynthèse des protéases est alors supposée dépendante des déformations mécaniques). A partir de ces deux hypothèses alternatives, nous discuterons des niveaux auxquels les effets mécaniques influencent la protéolyse matricielle.

Ces résultats ont été obtenus dans le cadre classique de la viscoélasticité linéaire, valable sous l'hypothèse que la matrice subit de "petites déformations". Cependant, les expériences nous montrent que la réorganisation du biogel est associée à des déformations de plus en plus importantes de celui-ci. Nous avons alors étudié le comportement mécanique, en trois dimensions, du biogel en grandes déformations en ne postulant aucune loi de comportement cinématique. Nous expliquons la rhéologie du biogel par une loi néo-hookéenne, couplée à une formulation visqueuse, où les paramètres mécaniques sont caractérisés par les résultats d'expériences de traction uniaxiale. Nous discuterons la validité de cette loi viscoélastique.

Enfin, le chapitre (9) présentera une conclusion générale sur l'état actuel de nos travaux et sur les perspectives qu'ils dessinent. Nous verrons en particulier qu'ils pourraient avoir des retombées cliniques importantes. Nous y préciserons également comment nous envisageons l'évolution de notre modèle.

1. Avant-propos/Objectif

2. Contexte expérimental mécanique des interactions cellules-matrice.

Présentation de l'angiogenèse *in vitro*

2.1. Introduction

Nous avons vu que l'angiogenèse avait un rôle fondamental *in vivo* lors de nombreux processus physiopathologiques. En cancérologie par exemple, la prolifération des vaisseaux sanguins est un facteur aggravant le développement de tumeurs solides en favorisant leur apport en nutriments et en permettant la formation de métastases (Kirsch *et al.* (2004)). Le contrôle et la régulation de l'angiogenèse apparaissent donc comme un véritable enjeu.

Depuis une vingtaine d'années, de nombreux travaux ont été effectués pour mieux comprendre ce phénomène. Toutefois, les études *in vivo* sont difficiles à mener, car beaucoup de paramètres sont susceptibles d'intervenir et d'interagir. Ces nombreuses interactions, et les différents équilibres en résultant, rendent délicate l'appréhension du phénomène de façon globale (détermination des paramètres critiques (§ 1.3)), et rendent également plus difficile la reproductibilité des résultats. Ces considérations expliquent pourquoi la plupart des travaux expérimentaux ont été menés *in vitro*. Folkman et Haudenschild (1980) ont montré que les modèles expérimentaux d'angiogenèse *in vitro* fournissaient une méthode contrôlable permettant l'étude de la formation des vaisseaux sanguins. L'hypothèse sous-jacente est que, si les modèles *in vitro* reproduisent les caractéristiques observées *in vivo* dans le contexte de l'angiogenèse, alors ils peuvent fournir des informations sur les mécanismes *in vivo* de formation des motifs spatiaux.

Dans une première partie, nous rappellerons le contexte mécanique des interactions entre les cellules endothéliales (CE) et la matrice extracellulaire (MEC, § 2.2). Ce sont essentiellement les travaux de Harris *et al.* (Harris *et al.* (1981); Stopak et Harris (1982)) qui, en montrant l'importance des déformations mécaniques des MEC sous l'effet des forces de traction cellulaire, ont donné naissance à ce large champ de recherche. Dans ce contexte mécanique, nous présenterons les résultats expérimentaux obtenus par Tranquillo *et al.* (1992) et Benkherourou *et al.* (1999) (§ 2.2.3). Ces travaux montrent que les CE exercent des forces de traction sur leur environnement, et que ce comportement mécanique dépend des propriétés rhéologiques (élasticité/viscosité) du substrat.

Nous présenterons ensuite le processus d'angiogenèse *in vivo* et les expériences d'angiogenèse *in vitro*. Selon le contexte expérimental, de nombreux paramètres peuvent réguler ce phénomène. Ils se divisent en deux types : les facteurs solubles, dont une revue détaillée peut être trouvée dans Vailhé (1997) et dont nous rappellerons brièvement les principaux agents, et les facteurs insolubles : les différents composants de la matrice extracellulaire (§ 2.3.3). En considérant des expériences menées au sein de notre laboratoire (§ 2.3.2), nous verrons que la MEC joue un rôle privilégié par ses interactions mécaniques avec les cellules.

Soulignons un point de vocabulaire important concernant notre utilisation des termes de remodelage et la réorganisation de la MEC. Un remodelage de la matrice implique des processus de biosynthèse et/ou de dégradation de celle-ci (Ramtani *et al.* (2002)), tandis que la réorganisation de la MEC est un ré-arrangement spatial du milieu, qui peut avoir lieu sans biosynthèse ni dégradation.

2.2. Contexte mécanique des interactions cellules-matrice

2.2.1. Structure et propriétés de la matrice extracellulaire

La MEC est le support biomécanique où reposent les cellules dans l'organisme. Ainsi, elle assure la cohésion des tissus (Hubbell (2003)). Sa structure n'est pas statique, mais évolue dynamiquement en fonction des événements physiologiques (le vieillissement par exemple) et pathologiques.

Les MEC utilisées lors des expériences *in vitro* sont nombreuses. Nous pouvons distinguer les matrices complexes (gels de collagène natifs, gel de MatrigelTM) (Vernon *et al.* (1992); Ferrenq *et al.* (1997); Vailhé *et al.* (1998, 2001)) et les matrices purifiées (gel de collagène ou de fibrine) (Vernon *et al.* (1995); Knapp *et al.* (1999); Enever *et al.* (2002); Vernon et Gooden (2002)). La fibrine, dont nous nous sommes servis dans les expériences menées au laboratoire, est une matrice provisoire, fréquemment présente lors de l'angiogenèse *in vivo*. Elle est un élément constitutif de la MEC, et est impliquée dans la cicatrisation, l'invasion tumorale (Hayen *et al.* (1999); van Hinsbergh *et al.* (2001)) et dans l'élaboration de biomatériaux (Grassl *et al.* (2002)).

Ces matrices sont de natures fibreuses (Fig. 2.1, a-b), chaque fibre étant elle-même constituée de nombreuses fibrilles (Fig. 2.1, c). L'organisation de ces fibres au sein de la MEC a fait l'objet d'études spécifiques (Bellows *et al.* (1982); Dallon *et al.* (1999)). Barocas et Tranquillo (1997) ont montré un alignement de celles-ci, lorsqu'une contrainte mécanique est appliquée au milieu.

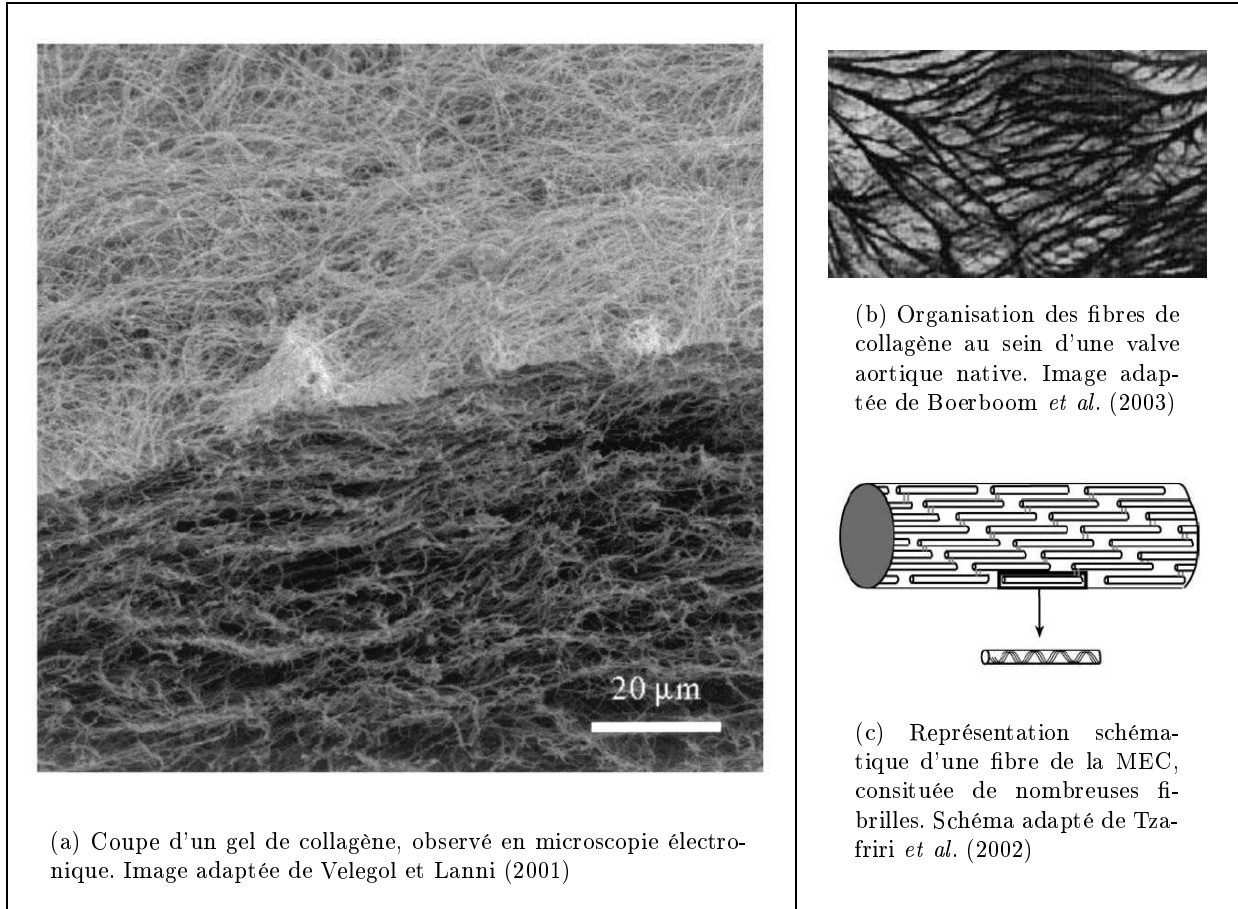


FIG. 2.1.: Nature fibreuse de la MEC.

2.2.2. Interactions mécaniques cellules-matrice

De nombreux travaux mettent en évidence les liaisons entre les cellules et les fibres du gel. Ces liaisons font intervenir différents récepteurs transmembranaires de la cellule, en particulier ceux appartenant à la famille des intégrines (Huang et Ingber (1999); Ingber (2002)). Ces récepteurs font des liens structuraux entre la MEC et le cytosquelette, assurant ainsi un continuum mécanique des champs de contraintes et de déformations entre la MEC déformable et une organisation interne spécifique du cytosquelette. Ces récepteurs sont donc capables de transmettre des signaux de la MEC vers le noyau des cellules (Alenghat et Ingber (2002)) via des complexes de signalisation appelés plaques focales d'adhésion (Ingber (2002)).

Chaque cellule va exercer, grâce à la contractilité de son cytosquelette, une force de traction sur la MEC. L'intégration de toutes les forces de traction cellulaire engendre, à l'échelle de la population cellulaire, un champ de contraintes mécaniques au sein de la MEC dont la réponse passive, dépendant directement des propriétés rhéologiques (élasticité, viscosité), influence à son tour les cellules. Huang et Ingber (1999) ont montré que la MEC pouvait réguler les cellules en les faisant migrer, se différencier ou rentrer en apoptose. Les facteurs mécaniques jouent donc

un rôle essentiel dans la modulation de l'activité cellulaire en déterminant l'intensité des effets antagonistes entre les forces de traction exercées par les cellules adhérant sur la MEC d'une part, et la résistance mécanique passive de celle-ci d'autre part.

Par ses interactions mécaniques avec les CE, la MEC peut également réguler l'expression de paramètres solubles dans le milieu tels les protéases. WuDunn (2001) et Seliktar *et al.* (2003) ont montré que la synthèse et l'activation de certaines protéines par les cellules étaient fortement dépendantes des contraintes mécaniques au sein de la MEC. Huang et Ingber (1999) et Ingber (2002) rapportent que l'accélération de la dégradation matricielle, assouplissant ainsi la membrane basale, permet *in vivo* le phénomène de bourgeonnement (*cf* § 2.5). Une étude précise de cette question sera menée dans le chapitre (6).

2.2.3. Expériences de quantification de la traction cellulaire

La caractérisation des forces de traction cellulaire a fait l'objet de nombreux travaux expérimentaux. Des travaux pionniers de Harris *et al.* (Harris *et al.* (1981)) à ceux plus récents de Tranquillo *et al.* (Shreiber *et al.* (2003)), de grands progrès ont été accomplis : ils ont permis d'observer les plis induits par la traction de cellules mésenchymateuses sur une membrane de silicone (Fig. 2.2) et de mesurer de façon de plus en plus précise les forces de traction cellulaire.

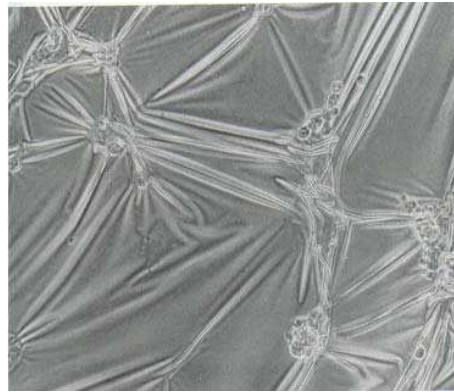


FIG. 2.2.: *Membrane de silicone contractée par des cellules mésenchymateuses. Les forces de traction générées par les cellules déforment le substrat et plissent le milieu (Harris et al. (1981)).*

Nous présentons deux résultats expérimentaux. De plus amples détails pourront être trouvés dans Benkherourou (1999).

2.2.3.1. Travaux de R. T. Tranquillo

L'équipe de Tranquillo a développé, depuis plus de dix ans, de nombreux modèles expérimentaux, couplés à des modèles théoriques pour quantifier les forces de tractions cellulaires (Tranquillo *et al.* (1992); Moon et Tranquillo (1993); Barocas *et al.* (1995)). Ce dialogue expérimentation-modélisation théorique leur a permis d'estimer la valeur du paramètre de traction cellulaire (Tranquillo *et al.* (1992)). Qualitativement, nous constatons que des fibroblastes,

déposés sur un gel de collagène, exercent une force de traction sur celui-ci conduisant à sa contraction (Tranquillo *et al.* (1992); Moon et Tranquillo (1993)).

Lors d'expériences plus récentes, Shreiber *et al.* (2003) ont mesuré l'évolution dynamique de la traction des cellules lors de la contraction des gels sur lesquelles elles étaient cultivées, et ont montré que ce paramètre tendait asymptotiquement vers une valeur constante.

2.2.3.2. Travaux de Benkherourou *et al.*

Au sein de notre laboratoire, Benkherourou *et al.* (1999) ont développé un banc de mesure de forces de traction cellulaire pour quantifier celles-ci en observant la contraction d'un gel par des cellules. Les cellules sont déposées sur le gel entre deux flotteurs : l'un est fixe, l'autre est relié au capteur de force qui enregistre l'évolution de la contrainte (voir dispositif Fig. 2.3).

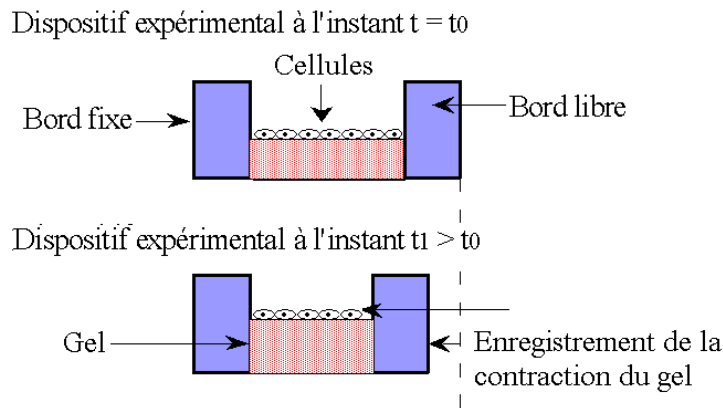


FIG. 2.3.: Schéma du dispositif expérimental utilisé par Benkherourou (1999) pour mesurer les forces de traction cellulaire.

La figure suivante présente les résultats obtenus avec ce dispositif expérimental, pour deux lignées cellulaires différentes : les cellules EAhy926 et HUVEC. Dans les deux situations, un déplacement, correspondant à des forces de traction cellulaire significatives, a été mesuré.

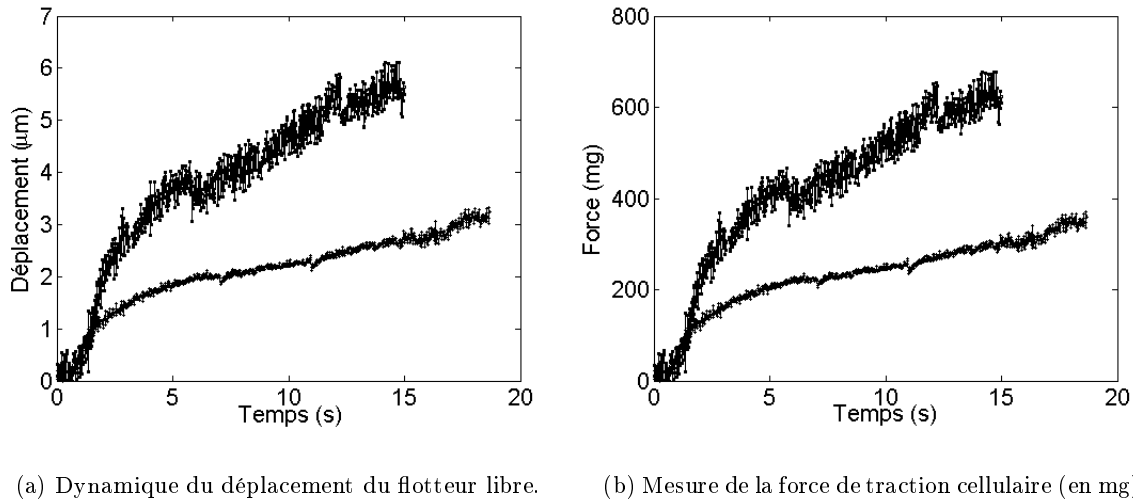


FIG. 2.4.: Résultats expérimentaux, issus de Benkherourou (1999).
 (a) Mesure du déplacement du flotteur libre, dû aux forces de traction de 2×10^6 cellules EAhy926 (symbole □) ou de 10^6 HUVEC (symbole +), ensemencées sur une matrice de concentration 1 mg/mL.
 (b) Le dispositif expérimental schématisé figure (2.3) permet, grâce à un capteur de force, de mesurer la force de traction cellulaire (symbole □ : HUVEC, symbole + : EAhy926). Les deux courbes se déduisent l'une de l'autre par l'étalonnage force/déplacement du capteur.

2.3. L'angiogenèse

2.3.1. L'angiogenèse *in vivo*

2.3.1.1. Dynamique de l'angiogenèse *in vivo*

In vivo, le phénomène d'angiogenèse est un phénomène de bourgeonnement, au cours duquel se réorganisent les CE et leur environnement, la MEC. Les CE restent quiescentes (Fig. 2.5, a), jusqu'à ce qu'un stimulus angiogène viennent déclencher le processus de néo-vascularisation en stimulant certaines fonctions cellulaires (Fig. 2.5, b). La dégradation de la membrane basale permet alors aux CE d'envahir l'espace périvasculaire (2.5, c). Par prolifération et par migration cellulaire, se crée alors un nouveau tube capillaire connecté au précédent (Fig. 2.5, c-d), qui se stabilise par synthèse de nouvelles protéines matricielles (Fig. 2.5, d). Cette réorganisation tissulaire et cellulaire permet la création de structures tubulaires appelées capillaires (en anglais : "capillary-like structure", Folkman et Haudenschild (1980)).

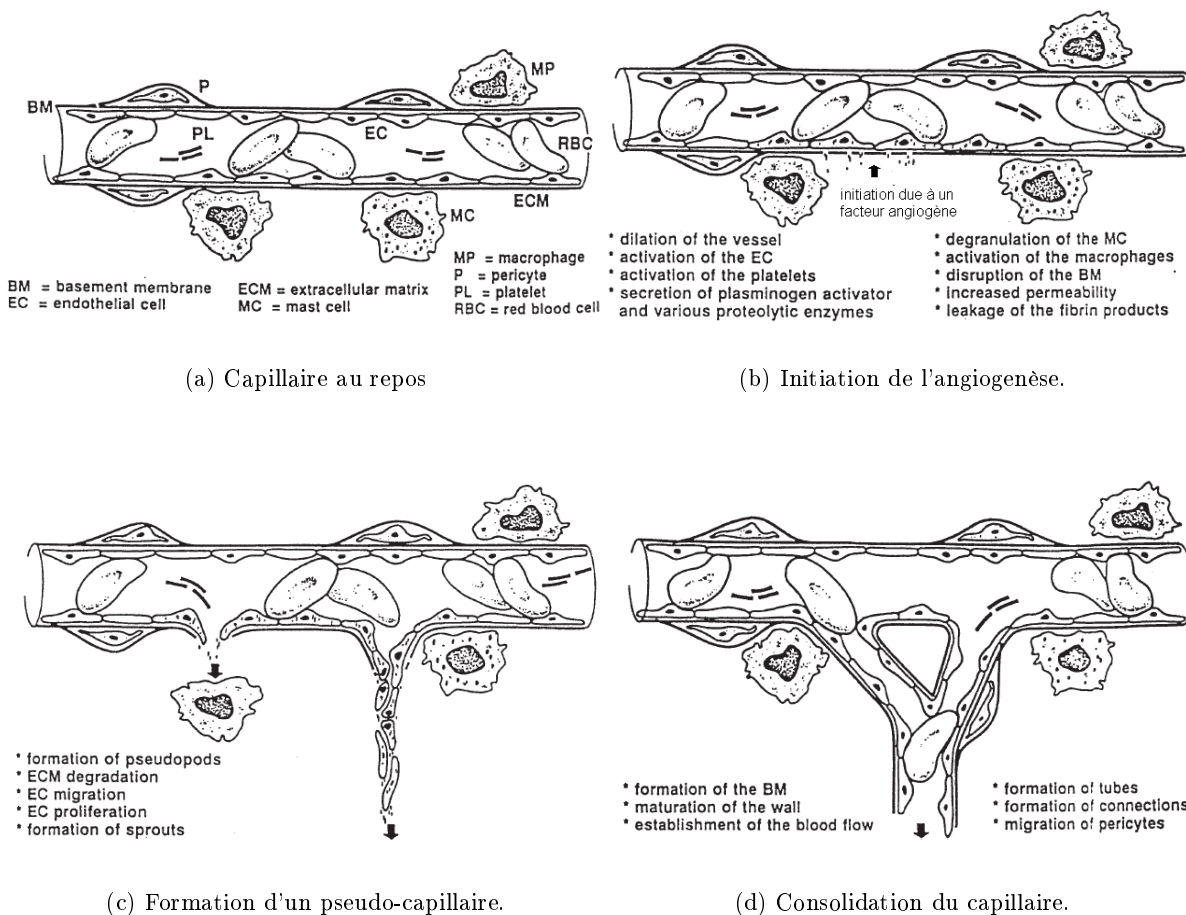


FIG. 2.5.: Représentation schématique des différentes étapes de l'angiogenèse *in vivo*. Images adaptées de Rakusan (1995).

2.3.1.2. Le rôle de la mécanique dans ce processus

Les effets mécaniques interviennent à plusieurs niveaux dans ce processus :

- le stimulus angiogène peut être du aux contraintes de cisaillement exercées par le flux sanguins sur la membrane (Egginton *et al.* (2001); Stéphanou *et al.* (2004)).
- l'endothélium est constitué de cellules endothéliales jointes entre elles. Les interactions mécaniques cellules-cellules et cellules-matrice peuvent donc être d'une grande importance lors du bourgeonnement (Balaban *et al.* (2001)).
- la dégradation de la membrane basale peut être favorisée par les effets mécaniques. Prajapati *et al.* (2000) ont montré que des cellules soumises à une contrainte mécanique augmentaient leur sécrétion de protéase, favorisant ainsi la dégradation matricielle. Ellsmere *et al.* (1999) ont émis l'hypothèse que les contraintes mécaniques pouvaient induire un changement de configuration spatiale des protéines de la MEC, rendant ainsi accessibles

- aux enzymes de nouveaux sites de liaison.
- la dégradation de la membrane basale peut être interprétée comme une perte de rigidité de cette structure, provoquant, à contrainte égale, une extension membranaire (Ingber (2002)).

2.3.2. Présentation des expériences *in vitro*

Dans cette section, nous détaillons l'expérience d'angiogenèse *in vitro* effectuée selon le protocole mis au point au sein de notre laboratoire par C. Rosello. Les expériences d'angiogenèse *in vitro* sont réalisées sur des gels de fibrine.

2.3.2.1. Protocole

Les gels de fibrine utilisés ont une épaisseur de 1 mm, et sont préparés selon le protocole expérimental décrit par Vailhé *et al.* (1997, 1998). Nous le rappelons brièvement : 1 mL de fibrinogène, de concentration variant entre 0.5 et 8 mg/mL, a été mélangé dans une boîte de Petri stérile de 35 mm de diamètre avec du PBS 1X dépourvu de Ca^{2+}/Mg^{2+} , de la thrombine (0.4 U/mL) et de l'aprotinine (5 µg/mL), un inhibiteur des protéases, qui est utilisé pour contrôler la dégradation des gels de fibrine. Ces gels sont ensuite mis à polymériser, durant une nuit, à 37°C dans une atmosphère humide, et sont utilisés le jour suivant. Les expériences *in vitro*, réalisées principalement par C. Rosello, ont été effectuées avec des CE issues d'une lignée cellulaire permanente, EAhy926, obtenues de la fusion de cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humain (HUVEC) avec des cellules cancéreuses. Plusieurs densités cellulaires ont été utilisées (0.5, 1, 1.5, 2, 3×10^5 cell/mL). Les résultats que nous présenterons (§ 2.3.2.2) sont obtenus avec une concentration de 1.5×10^5 cellules dans un millilitre de milieu contenant des antibiotiques.

Les lacunes et les réseaux cellulaires sont observés grâce à un microscope inversé à contraste de phase (Axiovert 135M, Zeiss Achrostigmat 5×0,12), équipé d'une chambre d'incubation et d'un contrôle de la température (37°C, 5% CO₂, degré hygrométrique de 90%) (Carl Zeiss, Germany). Les dynamiques spatiale et temporelle des réseaux cellulaires ont été enregistrées grâce à une caméra refroidie CoolSNAP (Photometrics®/ Roper Scientific), permettant une détection de faibles intensités lumineuses et de courts temps d'exposition.

2.3.2.2. Résultat expérimentaux

Les expériences réalisées selon le protocole précédent montrent que, partant d'une distribution quasi-homogène en CE et en MEC, des dépressions apparaissent dans le biogel après environ 12 heures. Ces dépressions, appelées lacunes (marquées par des 'x'; figure 2.6, c), augmentent en nombre et s'agrandissent rapidement. Cette réorganisation matricielle est couplée à une réorganisation cellulaire, provoquant des changements morphologiques importants. A la jonction de deux lacunes, nous constatons une agrégation de cellules pour former des pseudo-capillaires (marquées par des flèches; figure 2.6, c). Il s'agit bien d'une réorganisation cellulaire, car la prolifération cellulaire est très faible lors de ces premières étapes du processus (Vailhé *et al.* (1997)). Ces pseudo-capillaires, composés de CE liées (Fig. 2.7), sont connectés (Fig. 2.8) et

forment un réseau (Fig. 2.6, d-f). En fin de processus (Fig. 2.6, g-i), nous constatons que ce réseau est détruit.

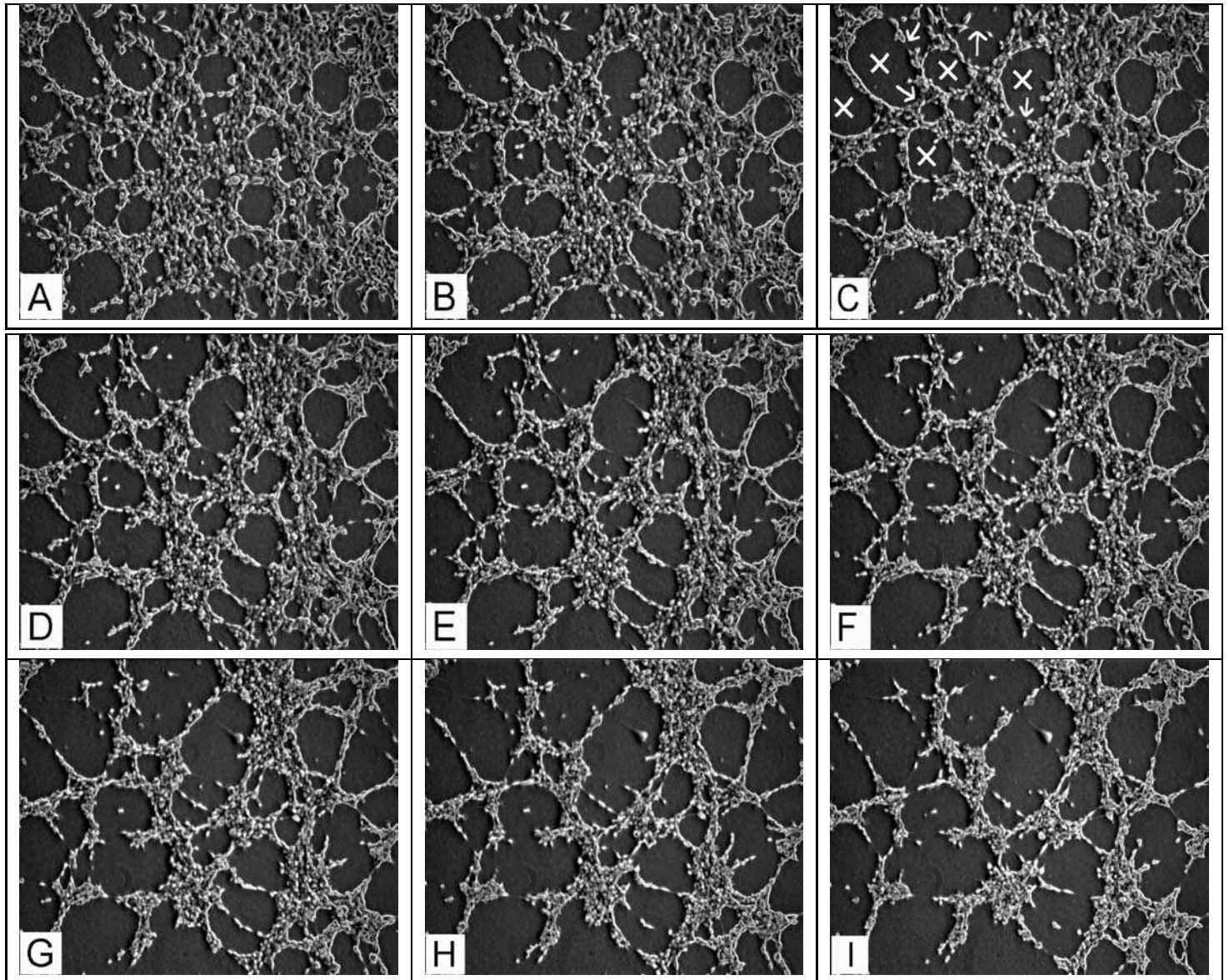


FIG. 2.6.: Évolution dynamique de l'angiogenèse *in vitro*.

(a)-(i) Évolution dynamique d'un réseaux de cellules EAhy926, cultivées sur un gel de fibrine selon le protocole décrit (§ 2.3.2.1). (c) Les flèches montrent les cordons de CE formés, et les 'x' symbolisent les dépressions créées dans le biogel : les lacunes.

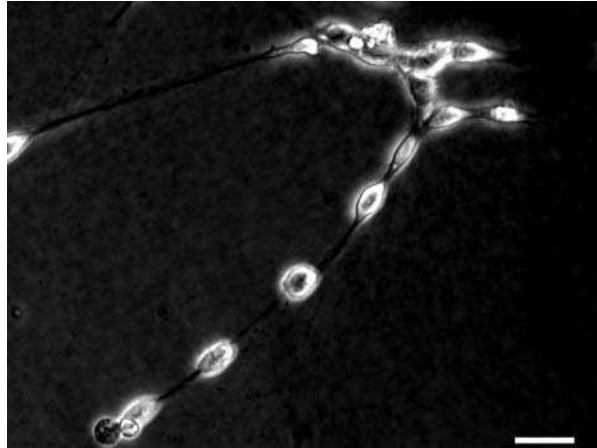


FIG. 2.7.: Détails d'un cordon de CE.

Les CE se joignent les unes aux autres pour former les pseudo-capillaires. Observations obtenues avec les matériels et méthodes décrits précédemment, lors de la phase d'initiation de l'angiogenèse. La barre horizontale représente 40 μm .

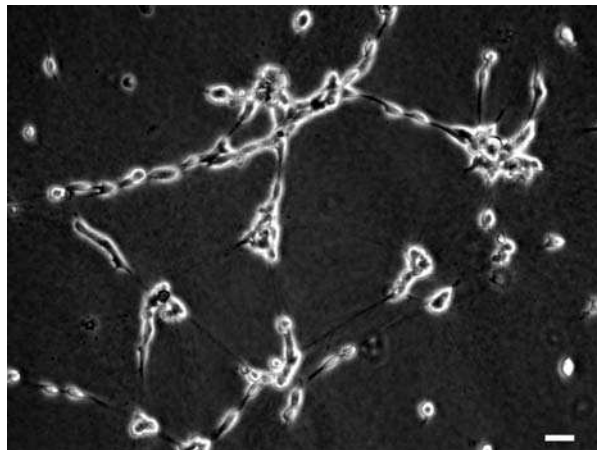


FIG. 2.8.: Assemblage des cordons entre eux, anastomoses.

Les pseudo-capillaires sont connectés entre eux pour former un réseau. Observations obtenues avec les matériels et méthodes décrits précédemment. La barre horizontale représente 40 μm .

2.3.3. Les principaux régulateurs de l'angiogenèse *in vitro*

L'angiogenèse *in vitro* est un processus multi-factoriel qui, en fonction du contexte, peut être contrôlé par deux types de paramètres expérimentaux : les facteurs solubles (Vailhé (1997)), que nous rappelons brièvement, et les facteurs insolubles constitués par les différents composants de la MEC.

Il existe de nombreux agents régulateurs solubles. Citons principalement :

- les cytokines. Ces facteurs de croissances sont capables d'induire des effets aussi variés que la migration des cellules par chimiotaxie (Folkman et Shing (1992); Gerhardt *et al.* (2003)), ou la synthèse de protéases matricielles (Hagedorn *et al.* (2001)). Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est l'une des cytokines les plus importantes. Il permet de stimuler la migration et la prolifération cellulaire (Gerhardt *et al.* (2003)). Les facteurs de croissance jouent un rôle prépondérant lors du processus de vascularisation de la tumeur solide. En effet, Folkman et Klagsbrun (1987) ont montré qu'une tumeur solide sécrétait des facteurs angiogènes pour être irriguée par les vaisseaux sanguins.
- les conditions chimiques du milieu. Des études récentes ont montré que l'absence d'oxygène dans le milieu, l'hypoxie, pouvait avoir une influence sur le processus de réorganisation cellulaire (Daniel et Abrahamson (2000)). L'hypoxie se produit dans diverses situations physiologiques (entraînement musculaire, adaptation à l'altitude (Nummela et Rusko (2000))) ou pathologiques : une tumeur non irriguée dépassant un volume de 1 mm^3 se trouve en état d'hypoxie (Folkman (1971); Byrne et Chaplain (1995); Subarsky et Hill (2003); Owen *et al.* (2004)). Cette influence de l'hypoxie sur le développement des réseaux sanguins a été quantifiée par Helmlinger *et al.* (2000), qui ont émis l'hypothèse selon laquelle une absence d'oxygène créait un gradient de VEGF de sens opposé. De même, le pH ou la température du milieu semblent être des facteurs influençant la réorganisation des cellules (Gillies *et al.* (1999); Egginton (2002)). En cancérologie par exemple, une tumeur solide, de pH neutre, abaisse le pH de son environnement, créant ainsi un gradient de pH qui rend l'invasion des capillaires plus rapide (Webb *et al.* (2001)).

Les facteurs insolubles régulant le processus d'angiogenèse sont les différents composants de la MEC. Cette régulation peut être biochimique, car la MEC peut assurer le stockage des molécules de signalisation telles que les cytokines, ce qui lui confère un rôle de réservoir (Stupack et Cheresch (2003)), mais est essentiellement mécanique grâce aux liaisons cellules-matrice via les plaques focales d'adhésion (§ 2.2.2). Dans le contexte expérimental des expériences menées au sein de notre laboratoire, la réorganisation des CE en pseudo-capillaires s'effectue en moins de 20 heures. Cette réorganisation se fait dans des conditions de prolifération cellulaire quasi-nulle, et n'est pas induite par l'utilisation de source exogène de chimioattractant comme dans van Hinsbergh *et al.* (2001) ou dans Tille *et al.* (2003). Notre hypothèse est que le processus d'angiogenèse *in vitro*, dans ce contexte expérimental, soit issu d'une instabilité mécanique entre les forces de traction cellulaire et la résistance passive viscoélastique de la MEC (Murray et Oster (1984)).

Sur la base de cette hypothèse, des travaux expérimentaux ont été menés pour quantifier l'influence des facteurs mécaniques sur ce processus *in vitro*.

2.3.4. L'angiogenèse *in vitro* dans le contexte des interactions mécaniques cellules-matrice

2.3.4.1. Expériences de Vernon *et al.* (1992)

Vernon *et al.* (1992) ont étudié l'influence de la rigidité du gel sur la réorganisation matricielle et cellulaire, en réalisant des expériences originales d'angiogenèse *in vitro* sur des gels d'épaisseur variable. Ces expériences ont été réalisées avec différents types cellulaires (CE, fibroblastes,

cellules musculaires lisses, cellules TM3 (lignée cellulaire murine de cellules de Leydig)), sur des gels de MatrigelTM de différentes inclinaisons (2.8 % et 9.7 %). Ces expériences montrent que :

- Les CE ne sont pas les seules à se réorganiser en réseaux structurés. Les expériences menées avec des cellules TM3 montrent une organisation analogue.
- La réorganisation cellulaire est plus importante aux endroits où le gel est le plus épais. Sur le gel fin, les cellules sont dispersées aléatoirement, tandis que plus l'épaisseur du gel augmente, plus les CE sont organisées (Fig. 2.9, b). En faisant l'hypothèse qu'à concentration égale, un gel très mince est plus rigide qu'un gel épais, les auteurs déduisent de ce résultat que le gel doit être suffisamment malléable, *i. e.* peu rigide, pour permettre sa réorganisation.
- La transition entre un état homogène et un état organisé de pseudo-capillaires est plus brutale lorsque les cellules sont cultivées sur des gels de plus fort gradient d'épaisseur.

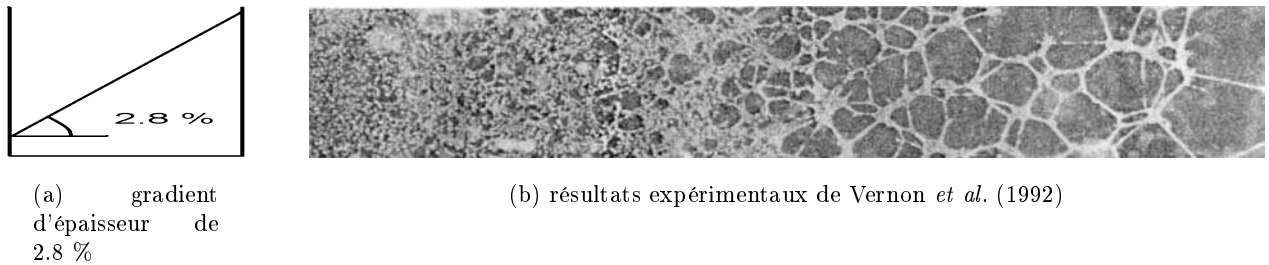


FIG. 2.9.: *Formation de structures de cellules influencée par l'épaisseur du gel.*
Des cellules TM3 ont été cultivées sur un gel de MatrigelTM, dont l'épaisseur varie de 10 μm à 400 μm sur une longueur de 17 mm.

2.3.4.2. Expériences de Vailhé *et al.* (1997)

Vailhé *et al.* (1997) ont quantifié l'influence de la malléabilité des gels de fibrine sur la réorganisation cellulaire et matricielle lors de l'angiogenèse *in vitro* présentée précédemment. Pour cela, ils ont fait varier deux paramètres expérimentaux :

- la concentration du biogel (0.5, 1, 1.5, 2 mg/mL). En effet, il est établi que les propriétés mécaniques des biogels sont déterminées directement par leurs concentrations (pour une quantification, voir par exemple Benkherourou (1999); Benkherourou *et al.* (2000)).
- l'épaisseur du biogel (250 μm et 1 mm). Ces expériences se rapprochent qualitativement de celles faites par Vernon *et al.* (1992) sur des gels inclinés.

Nous présenterons ici une description synthétique de leur résultats, qui seront plus détaillés lors de la figure (5.10) :

- la variation d'épaisseur des gels a montré une modification dans l'organisation des CE : après 48 heures de culture, il n'y a pas de réorganisation des CE sur les gels les plus fins (250 μm), tandis qu'un début de réorganisation était observé, dans ces conditions expérimentales, sur les gels plus épais (1 mm).
- En faisant varier la concentration du gel de fibrine, ces chercheurs ont montré qu'il n'y avait pas de réorganisation des CE sur les gels les plus rigides.

Comme l'ont proposé Vailhé *et al.* (1997), ces résultats sont des arguments supplémentaires, prouvant que les facteurs mécaniques jouent un rôle prépondérant dans l'induction du processus de morphogenèse de pseudo-capillaires.

2.4. Bilan expérimental

Le contexte expérimental, dont le protocole est détaillé au paragraphe (2.3.2.1), établit un système de culture dans lequel les CE se réorganisent en une dizaine d'heures pour former un réseau de pseudo-capillaires, avec une prolifération cellulaire quasi-nulle. Cette formation de pseudo-capillaires n'est pas induite par l'ajout de cytokines exogènes. Une analyse approfondie des différents facteurs régulant l'angiogenèse nous laisse penser que, dans ce contexte expérimental, une régulation mécanique a lieu. En effet, les travaux expérimentaux de Tranquillo *et al.* (1992) (§ 2.2.3.1) et Benkherourou *et al.* (1999) (§ 2.2.3.2) ont montré que les cellules exercent des forces de traction significatives sur leur environnement et, en faisant varier la malléabilité de la matrice, soit en modifiant son épaisseur, soit en modifiant sa concentration, Vernon *et al.* (1992) (§ 2.3.4.1) et Vailhé *et al.* (1997) (§ 2.3.4.2) ont constaté et quantifié de grandes différences morphologiques dans l'organisation des cellules.

Il est intéressant également de noter que cette capacité de réorganisation n'est pas spécifique aux CE. Vernon *et al.* (1992) ont observé des morphologies similaires avec des cellules TM3 (lignée cellulaire murine de cellules de Leydig) (Fig. 2.9), des fibroblastes humains ou avec des cellules musculaires lisses. De même, ce phénomène de réorganisation cellulaire peut avoir lieu avec différents types de matrices : avec du MatrigelTM (Kubota *et al.* (1988); Vernon *et al.* (1992)), de la fibrine (Vailhé *et al.* (1997)), ou du collagène (Vernon *et al.* (1995)). Certes, des différences quantitatives peuvent être notées entre les valeurs des différents paramètres cellulaires (près de 200% pour les forces de traction cellulaires entre les HUVEC et les EAhy926), mais le comportement qualitatif des cellules reste semblable (traction, migration, organisation en réseaux). Cette remarque explique pourquoi nous nous intéresserons surtout, par la suite, aux caractéristiques fonctionnelles des différents agents (traction, migration pour les cellules, viscosité et élasticité des biogels) plutôt qu'à leur nature biochimique.

Tous ces résultats incitent à penser que le comportement complexe des cellules, dans le développement des vaisseaux sanguins, est contrôlé par l'équilibre entre les forces actives de traction cellulaire et la résistance, passive, de la MEC (Murray et Oster (1984)). Les modifications spatiales dans la MEC ou dans les tissus vont conduire à une réorganisation cellulaire et donc à une modification du champ des contraintes au sein de la MEC. Cette dernière apparaît donc comme un échafaudage permettant, dans certaines conditions, la réorganisation des cellules en réseau de pseudo-capillaires. Ces hypothèses seront à la base du modèle biomécanique que nous développerons au chapitre (3).

2. *Contexte expérimental mécanique des interactions cellules-matrice. Présentation de l'angiogenèse in vitro*

Deuxième partie .

Modélisation

3. Modélisation biomécanique et mathématique de l'angiogenèse *in vitro*

3.1. Positionnement du problème et objectifs

Pour comprendre l'apparition et la régulation des structures capillaires lors d'expériences d'angiogenèse *in vitro*, différents modèles mathématiques ont été développés en prenant directement en compte les facteurs angiogènes solubles (Sherratt *et al.* (1993); Anderson et Chaplain (1998); Levine *et al.* (2001); Sherratt et Chaplain (2001)). Anderson et Chaplain (1998) ont simulé l'angiogenèse induite par une tumeur solide en modélisant la migration cellulaire en fonction des signaux chimiotactiques. Plus récemment, Levine *et al.* (2001) ont considéré des interactions biochimiques très détaillées entre les CE et les substances extracellulaires, et ont simulé la création d'un unique pseudo-capillaire, sans obtenir la formation d'un réseau global. Cependant, même si ces modèles peuvent simuler la formation de réseaux de CE sur des substrats rigides recouverts de protéines matricielles, le scénario fondé sur une migration active due à la chimiotaxie ne peut pas expliquer, à lui seul, le processus de morphogenèse des réseaux cellulaires observé sur les gels épais.

Pour comprendre l'initiation du processus d'angiogenèse *in vitro* dans ce contexte expérimental, des modèles continus ont été développés dans le cadre théorique des interactions mécaniques cellules-matrice défini par Murray et Oster (1984). Dans ces modèles, une attention particulière a été portée au rôle morphogénétique joué par les forces de traction cellulaire (Manoussaki *et al.* (1996); Olsen *et al.* (1998); Murray *et al.* (1998); Holmes et Sleeman (2000); Tranqui et Tracqui (2000)). Considérant que de telles interactions mécaniques sont de la première importance lors de l'initiation de l'angiogenèse *in vitro*, Manoussaki *et al.* (1996) et Murray *et al.* (1998) ont proposé un modèle en 2D, essentiellement mécanique, qui reproduit avec succès la distribution spatiale hétérogène de la densité cellulaire observé expérimentalement.

Nous avons vu que, lorsque les CE sont cultivées *in vitro* sur des MEC de diverses épaisseurs (§ 2.3.2.1), les interactions mécaniques étaient au cœur du processus de formation des réseaux cellulaires. Il nous apparaît donc nécessaire de considérer, dans notre modélisation, à la fois les caractéristiques de la migration cellulaire (§ 3.2.3) et les interactions mécaniques CE-MEC (§ 3.2.2) pour expliquer comment une instabilité, générée mécaniquement, peut conduire à la réorganisation du milieu. Notre modèle est une extension du modèle de Manoussaki *et al.* (1996); Murray *et al.* (1998) pour permettre d'étudier comment la formation des réseaux cellulaires est influencée par le couplage entre la migration haptotactique des cellules le long des gradients de MEC et les forces de traction cellulaire, induisant des champs de contraintes dans la MEC.

Nous formulons deux hypothèses théoriques pour expliquer le processus de réorganisation par les interactions mécaniques. Dans la première hypothèse (H1), nous considérons l'angiogenèse *in vitro* comme un processus issu d'une instabilité mécanique générée par le déséquilibre entre les forces de traction cellulaire et la résistance passive de la MEC, sans remodelage de celle-ci. Nous

verrons que cette absence de remodelage peut se justifier au regard des expériences précédentes (§ 3.2.4). Cette hypothèse permet de considérer trois contrôles possibles par la MEC de la migration et de la traction cellulaire. Le premier contrôle serait une modulation de la migration cellulaire par la rigidité du substrat. Le deuxième serait fondé sur les possibles effets d'élasticité à longue-portée, dus à la nature fibreuse de la MEC. Enfin, le troisième contrôle serait un biais directionnel, dû au champ des déformations, dans la diffusion cellulaire. L'objectif est de déterminer quantitativement la valeur critique de l'amplitude de la traction cellulaire au delà de laquelle une réorganisation matricielle et cellulaire peut avoir lieu, et de rechercher si ces valeurs numériques trouvées correspondent à des valeurs biologiquement réalistes. Cette étude sera menée au cours des chapitres (4) et (5).

La deuxième hypothèse d'étude (H2) développe l'idée originale selon laquelle les interactions mécaniques pourraient faciliter la protéolyse de la MEC, dont le remodelage provoquerait alors la réorganisation du milieu. Cette théorie a été élaborée grâce aux nombreux travaux expérimentaux (voir chapitre 6) corrélant le niveau des contraintes mécaniques d'un milieu contenant des cellules et l'augmentation de la protéolyse de la MEC. Sous cette hypothèse, la protéolyse matricielle est vue comme le déclencheur de l'instabilité dynamique provoquant la formation des lacunes et des pseudo-capillaires. Cette hypothèse permet d'appréhender à quels niveaux les effets mécaniques peuvent influencer la protéolyse, soit en favorisant la sécrétion de protéases par les CE, soit en favorisant l'accès aux sites de dégradation de la MEC, pour ces enzymes, afin de remodeler le milieu. Nous pourrions alors expliquer si ces phénomènes sont des facteurs clefs du processus d'angiogenèse *in vitro*.

3.2. Modélisation

3.2.1. Définition des variables

Nous modélisons le gel de fibrine comme un milieu continu viscoélastique, soumis au couplage entre, d'une part, la migration cellulaire active sur les gradients de densité de la MEC induits par les forces de traction cellulaire, d'autre part, le niveau croissant des contraintes cellulaires lorsque la densité de MEC augmente. Les interactions entre ces deux phénomènes vont générer un processus mécanique auto-catalytique, que nous allons analyser en considérant un modèle minimal (*cf* § 1.3) de trois variables :

- $n(\mathbf{x}, t)$ représente la concentration en CE à la position $\mathbf{x}$ au temps t ,
- $\rho(\mathbf{x}, t)$ est la densité de MEC à la position $\mathbf{x}$ au temps t ,
- $\mathbf{u}(\mathbf{x}, t)$ est le vecteur déplacement de la MEC entre sa position initiale et sa position déformée. Si $\mathbf{x}_0$ et $\mathbf{x}_1$ sont respectivement les positions initiale et déformée, au temps t , d'un point de la MEC, le vecteur déplacement correspondant à ce point, au temps t , vaudra $\mathbf{u}(\mathbf{x}_0, t) = \mathbf{x}_1 - \mathbf{x}_0$.

3.2.2. Contraintes actives et passives au sein de la MEC

Les interactions mécaniques entre les CE et la MEC résultent principalement de l'équilibre entre les forces de tractions exercées par les CE et la résistance passive viscoélastique de la MEC en réponse à ces stimulations mécaniques.

3.2.2.1. Contraintes de traction cellulaire

Nous avons vu (§ 2.2.3) que les cellules exercent des forces de tractions conséquentes sur leur milieu environnant (tissulaire ou matriciel) via les plaques focales (Balaban *et al.* (2001)). Au niveau macroscopique, nous supposons que ces forces de traction sont :

- proportionnelles à la densité de gel (Delvoye *et al.* (1991); Barocas *et al.* (1995); Ferrenq *et al.* (1997)).
- limitées, pour les fortes densités de CE, par le phénomène d’inhibition de contact lors de la compétition pour les sites d’adhésion de la matrice (Moon et Tranquillo (1993); Ferrenq *et al.* (1997)).

Nous modélisons donc le tenseur des contraintes actives des CE par la formulation suivante :

$$\boldsymbol{\sigma}_{cell} = \tau \rho n (N_2 - n) \mathbf{Id} \quad (3.1)$$

où le paramètre τ contrôle l’amplitude de la traction cellulaire, reliée au tonus de contractilité des cellules, la constante positive N_2 ($N_2 > n$) traduit l’inhibition de la traction cellulaire lorsque la densité des CE augmente, et $\mathbf{Id}$ est le tenseur identité (Ferrenq *et al.* (1997)).

3.2.2.2. Rhéologie du biogel

Nous supposons que le relation contrainte-déformation décrivant la viscoélasticité de la MEC est donnée par l’addition du tenseur des contraintes élastiques, $\boldsymbol{\sigma}_{mec}^{élastique}$, proportionnel aux déformations, et du tenseur des contraintes visqueuses, $\boldsymbol{\sigma}_{mec}^{visqueux}$, proportionnel à la vitesse des déformations (Fung (1993); Murray (2003b)).

$$\boldsymbol{\sigma}_{mec} = \boldsymbol{\sigma}_{mec}^{visqueux} + \boldsymbol{\sigma}_{mec}^{élastique} \quad (3.2)$$

La formulation du tenseur de contrainte élastique, $\boldsymbol{\sigma}_{mec}^{élastique}$, est, dans un premier temps, proposée dans le cadre de la théorie de l’élasticité linéaire (loi de Hooke) détaillé au paragraphe (7.3). Une approche de la mécanique en grandes déformations sera envisagée lors de la section (7.4).

$$\boldsymbol{\sigma}^{élasticité linéaire} = \frac{E}{1 + \nu} \left[\boldsymbol{\epsilon} + \frac{\nu}{1 - 2\nu} \theta \mathbf{Id} \right] \quad (3.3)$$

où $\boldsymbol{\epsilon}$ est le tenseur des déformations linéarisées ($\boldsymbol{\epsilon} = \frac{1}{2} (\nabla \mathbf{u} + {}^t \nabla \mathbf{u})$), E est le module de Young, ν le coefficient de Poisson, θ la dilatation du milieu ($\theta = \nabla \cdot \mathbf{u}$), et $\mathbf{Id}$ est le tenseur identité.

Cependant, nous devons garder à l’esprit que la nature fibreuse de la MEC peut induire des effets mécaniques non locaux, parce que les fibres peuvent transmettre des contraintes élastiques entre deux points éloignés de la MEC.

Pour modéliser ces effets élastiques à “longue-portée”, nous complétons la loi (3.3) par l’ajout du laplacien du tenseur des déformations $\boldsymbol{\epsilon}(\mathbf{x})$ et du laplacien de la dilatation $\theta(\mathbf{x})$ (Cruywagen *et al.* (1997); Murray (2003b)). Cette modification permet de moyenner la valeur de ces grandeurs sur un domaine plus grand que celui considéré dans la loi de Hooke, qui n’est réduit qu’au point $\mathbf{x}$. En effet nous avons, par définition :

$$\langle \epsilon_{ij} \rangle = \frac{3}{4\pi R^3} \int_V \epsilon_{ij}(\mathbf{x} + \mathbf{r}, t) d\mathbf{r} \quad (3.4)$$

3. Modélisation biomécanique et mathématique de l'angiogenèse in vitro

où $\langle \epsilon_{ij} \rangle$ est la moyenne, dans la sphère élémentaire de volume V et de rayon R , de la composante ij du tenseur ϵ . La sphère étant élémentaire, nous pouvons écrire $\epsilon_{ij}(\mathbf{x} + \mathbf{r}, t)$ selon son développement limité en $\mathbf{x}$ pour un vecteur $\mathbf{r}$ élémentaire :

$$\epsilon_{ij}(\mathbf{x} + \mathbf{r}, t) = \epsilon_{ij}(\mathbf{x}, t) + (\mathbf{r} \cdot \nabla) \epsilon_{ij} + (\mathbf{r} \cdot \nabla)^2 \epsilon_{ij} + O(\|\mathbf{r}\|^3) \quad (3.5)$$

où $(\mathbf{r} \cdot \nabla)^2 \equiv (\mathbf{r} \cdot \nabla) \circ (\mathbf{r} \cdot \nabla)$ et $\circ$ représente la composition de fonctions.

En substituant (3.5) dans (3.4), nous obtenons :

$$\langle \epsilon_{ij} \rangle = \frac{3}{4\pi R^3} \int_V \left[\epsilon_{ij}(\mathbf{x}, t) + (\mathbf{r} \cdot \nabla) \epsilon_{ij} + (\mathbf{r} \cdot \nabla)^2 \epsilon_{ij} + O(\|\mathbf{r}\|^3) \right] \mathbf{dr} \quad (3.6)$$

la fonction $\mathbf{r} \rightarrow (\mathbf{r} \cdot \nabla) \epsilon_{ij}$ est impaire, nous en déduisons que

$$\int_V (\mathbf{r} \cdot \nabla) \epsilon_{ij} \mathbf{dr} = 0$$

La relation (3.6) s'écrit donc :

$$\langle \epsilon_{ij} \rangle = \frac{3}{4\pi R^3} \left[\epsilon_{ij}(\mathbf{x}, t) \int_V \mathbf{dr} + \nabla^2 \epsilon_{ij}(\mathbf{x}, t) \int_V \frac{r^2}{2} \mathbf{dr} \right] + O(\|\mathbf{r}\|^3)$$

où r est la norme de $\mathbf{r}$.

Nous en déduisons que

$$\nabla^2 \epsilon_{ij} \propto \frac{\langle \epsilon_{ij} \rangle - \epsilon_{ij}(\mathbf{x}, t)}{R^2} \quad \text{quand } R \rightarrow 0 \quad (3.7)$$

La relation (3.7) montre que l'utilisation du laplacien de ϵ_{ij} , en un point $\mathbf{x}$ de l'espace, moyenne les valeurs de ϵ_{ij} dans un voisinage de $\mathbf{x}$. Cela explique pourquoi nous parlerons de termes "longue-portée", en opposition aux termes locaux ou "courte-portée".

Ces effets élastiques à longue-portée sont donc modélisés en considérant le tenseur des déformations élastiques du deuxième ordre (Cruywagen *et al.* (1997); Murray (2003b)) :

$$\sigma^{\text{élasticité longue-portée}} = \frac{E}{1 + \nu} \left[-\beta_1 \nabla^2 \epsilon - \frac{\nu}{1 - 2\nu} \beta_2 \nabla^2 \theta \mathbf{Id} \right]$$

où β_1 et β_2 sont les paramètres d'élasticité longue-portée (β_1 et β_2 sont des constantes positives, exprimées en m^2). Comme nous le montrerons dans l'analyse théorique du modèle (chapitre 4), de tels effets longue-portée peuvent stabiliser le système CE-MEC.

En combinant l'élasticité linéaire et l'élasticité longue-portée, nous obtenons comme expression du tenseur des contraintes élastiques :

$$\sigma_{mec}^{\text{élastique}} = \sigma^{\text{élasticité linéaire}} + \sigma^{\text{élasticité longue portée}} \quad (3.8)$$

Les composantes visqueuses du tenseur des contraintes de la MEC sont également décrites dans un cadre linéaire, et sont supposées proportionnelles au tenseur taux de déformation $\frac{\partial \epsilon}{\partial t}$.

$$\sigma_{mec}^{\text{visqueux}} = \mu_1 \frac{\partial \epsilon}{\partial t} + \mu_2 \frac{\partial \theta}{\partial t} \mathbf{Id}$$

où μ_1 et μ_2 sont respectivement les coefficients de viscosité de cisaillement et de dilatation volumique.

3.2.3. Modélisation de la migration des cellules endothéliales

La migration cellulaire est un processus multi-factoriel très complexe à modéliser. En effet, nous devons considérer au moins trois niveaux : le niveau moléculaire (liaisons intégrines-MEC au niveau des plaques focales d'adhésion), le niveau cellulaire (traction cellulaire, migration cellulaire) et le niveau de la population de cellules, qui intègre toutes les caractéristiques individuelles (coefficient de diffusion, chimiotaxie, chimiocinétique, haptotaxie, haptokinésie (Maheshwari et Lauffenburger (1998))) .

Nous allons modéliser la migration de la population de cellules par des flux macroscopiques, en gardant à l'esprit l'idée qu'ils doivent mettre en évidence comment la migration, conjointement à la traction cellulaire, contrôle le processus de réorganisation des CE en réseau de pseudo-capillaires.

Comme nous l'avons déjà expliqué dans la partie (§ 2.3.4), nous nous intéressons à la régulation par les effets mécaniques de l'angiogenèse *in vitro*. Nous nous concentrons donc principalement sur une migration cellulaire dépendante de la mécanique, plutôt que sur une migration dans un contexte chimiotactique. Cela est justifié par nos modèles expérimentaux (quantification des forces mécaniques ; pas de source de chimioattractants, contrairement aux expériences sur la croissance de tumeur *in vitro*) et parce que nous recherchons un modèle minimal (chapitre 1). Privilégier le contrôle par les interactions mécaniques du processus d'angiogenèse est également justifié par de récentes preuves expérimentales montrant que l'expression et la sécrétion de chimioattractants, tels les VEGF, pouvaient être dépendants des facteurs mécaniques (Warner et Mitchell (2003); Yoshino *et al.* (2003)).

Dans la formulation du modèle, la migration aléatoire des cellules, *i. e.* la diffusion cellulaire, lorsqu'un gradient spatial cellulaire existe, est équilibrée par la migration vers les régions les plus denses en MEC (haptotaxie), supposée proportionnelle au gradient de la densité matricielle. Le flux haptotactique, $\mathbf{J}_h$, s'écrit :

$$\mathbf{J}_h = hn\nabla\rho$$

où h est le coefficient d'haptotaxie.

Une autre composante de la mécanotaxie cellulaire est le guidage par contact, où le substrat extracellulaire définit des directions de migration privilégiées pour les cellules (Barocas et Tranquillo (1997); Girton *et al.* (2002)). En particulier, Korff et Augustin (1999) ont réalisé des expériences d'angiogenèse sur des gels précontraints pour quantifier l'anisotropie migratoire induite. Ces résultats serviront de validation expérimentale à notre analyse d'une diffusion dépendante des déformations mécaniques locales, fondée sur l'approche théorique de Cook (1995), afin de prendre en compte l'orientation des fibres de la MEC. Ce chercheur a en effet proposé de modifier l'expression usuelle de la diffusion isotrope des cellules (loi de Fick) en considérant que les champs de contraintes, présents dans la MEC, pouvaient introduire un biais directionnel. En effet, dans un domaine non-contraint, l'équation de diffusion de la densité cellulaire n s'écrit :

$$\frac{\partial n}{\partial t} = \nabla \cdot (D_0 \nabla n) \quad (3.9)$$

3. Modélisation biomécanique et mathématique de l'angiogenèse in vitro

Supposons que le domaine se déforme, déplaçant le point de l'espace $\mathbf{x}$ à la position $\mathbf{y}$ selon une transformation $\mathbf{F}$ de composantes :

$$F_{ij} \equiv \partial x_i / \partial y_j$$

où x_i et y_j constituent les composantes, respectivement, des points $\mathbf{x}$ et $\mathbf{y}$. Posons $\Delta \equiv \det(\mathbf{F})$. Nous supposons qu'il s'agit d'une transformation réversible, donc bijective :

$$\forall t, \forall \mathbf{x}, \quad \Delta(\mathbf{x}, t) \neq 0 \quad (3.10)$$

A $t = 0$, nous avons :

$$\forall \mathbf{x}, \quad \Delta(\mathbf{x}, 0) = 1 \quad (3.11)$$

Nous déduisons des relations (3.10) et (3.11), d'après la continuité de l'application multilinéaire $\cdot \rightarrow \det(\cdot)$, que :

$$\forall t, \forall \mathbf{x}, \quad \Delta(\mathbf{x}, t) > 0$$

La variation d'aire, associée à cette transformation, vaut $1/\Delta$. Soient F^{ij} les composantes de l'inverse de $\mathbf{F}$ (qui existent et sont uniques, d'après la relation 3.10).

La nouvelle densité cellulaire N , due au changement d'aire, s'écrit :

$$n(\mathbf{x}, t) = \frac{N(\mathbf{y}, t)}{\Delta} \quad (3.12)$$

Nous obtenons alors une nouvelle équation d'évolution de la densité cellulaire, N , en combinant les relations (3.9) et (3.12) :

$$\frac{\partial N(\mathbf{y}, t)}{\partial t} = \Delta \sum_{s,r,i} F^{si} \frac{\partial}{\partial y_s} \left[D_0 F^{ri} \frac{\partial}{\partial y_r} \left(\frac{N(\mathbf{y}, t)}{\Delta} \right) \right] \quad (3.13)$$

Pour alléger les notations, nous utiliserons la convention d'Einstein sur la sommation des indices répétés, nous noterons $P_{,i} = \partial P / \partial y_i$ et $N(\mathbf{y}, t)$ sera noté N .

Nous avons donc :

$$\frac{\partial N}{\partial t} = \Delta F^{si} \left[D_0 F^{ri} \left(\frac{N_{,r}}{\Delta} - \frac{\Delta_{,r}}{\Delta^2} N \right) \right]_{,s} \quad (3.14)$$

Posons alors :

$$A^i \equiv D_0 F^{ri} \left(\frac{N}{\Delta} \right)_{,r} \quad (3.15)$$

En reportant (3.15) dans (3.14), nous trouvons que :

$$\frac{\partial N}{\partial t} = [\Delta F^{si} A^i]_{,s} - \underbrace{A^i (\Delta F_{,s}^{si} + F^{si} \Delta_{,s})}_{(\Delta F^{si})_{,s}} \quad (3.16)$$

En calculant $(\Delta F^{si})_{,s}$, nous trouvons que :

$$\forall i = 1..3, \quad (\Delta F^{si})_{,s} = 0 \quad (3.17)$$

Nous déduisons de (3.16) et (3.17) la relation suivante :

$$\frac{\partial N}{\partial t} = \left[D_0 F^{ri} F^{si} \left(N_{,r} - \frac{\Delta_{,r}}{\Delta} N \right) \right]_{,s} \quad (3.18)$$

Soit $\mathbf{D}$ le tenseur suivant :

$$\mathbf{D} = D_0 ({}^t\mathbf{F}\mathbf{F})^{-1} \quad (3.19)$$

où ^{t} correspond à la transposée. Les composantes de $\mathbf{D}$ valent donc :

$$D_{rs} = D_0 F^{ri} F^{si} \quad (3.20)$$

et le déterminant de $\mathbf{D}$ vaut :

$$|D| \equiv \det(\mathbf{D}) = D_0^K \Delta^{-2} \quad (3.21)$$

où K est la dimension de l'espace.

En reportant (3.20) et (3.21) dans (3.18), nous obtenons l'équation d'évolution de N sous forme conservative :

$$\frac{\partial N}{\partial t} = \left[D_{rs} N_{,r} + \frac{D_{rs} |D|_{,r}}{2|D|} N \right]_{,s} = \left[\frac{D_{rs}}{\sqrt{|D|}} \left(\sqrt{|D|} N \right)_{,r} \right]_{,s} \quad (3.22)$$

Sous l'hypothèse des petites déformations (Cook (1995)), nous avons :

$${}^t\mathbf{F}\mathbf{F} = (\mathbf{Id} - 2\boldsymbol{\epsilon}) \quad (3.23)$$

où $\mathbf{Id}$ et $\boldsymbol{\epsilon}$ sont les tenseurs précédemment définis.

L'expression du tenseur de diffusion peut être déduite de (3.19), (3.21) et (3.23) (formule 3.33).

Le flux diffusif $\mathbf{J}_d$, dans ce cas, s'écrit :

$$\mathbf{J}_d = -\nabla \cdot (\mathbf{D}(\boldsymbol{\epsilon}) n)$$

où $\mathbf{D}(\boldsymbol{\epsilon})$ est le tenseur de diffusion dépendant des déformations.

Enfin, les cellules migrent également lorsque le substrat sur lequel elles sont déposées est convecté. Ce flux passif convectif s'écrit :

$$\mathbf{J}_c = n \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t}$$

En intégrant toutes ces composantes de la migration cellulaire, la variation de la concentration cellulaire est donnée par l'équation :

$$\begin{array}{ccccccccc} \textit{variation de la} & & + & \textit{convection} & + & \textit{diffusion} & + & \textit{haptotaxie} & = & \textit{prolifération} & - & \textit{mort} \\ \textit{concentration cellulaire} & & & \textit{cellulaire} & & \textit{cellulaire} & & \textit{cellulaire} & & \textit{cellulaire} & & \textit{cellulaire} \end{array} \quad (3.24)$$

3. Modélisation biomécanique et mathématique de l'angiogenèse *in vitro*

Typiquement, le temps de doublement, mesuré expérimentalement, est de l'ordre de 30 heures pour les cellules EAhy926 (Liu *et al.*, communication personnelle). Nous négligeons donc la prolifération cellulaire lors de la première étape du processus de réorganisation. Les observations expérimentales (§ 2.3.2) ont montré également que les détachements des cellules du substrat et leur apoptose étaient limités lors des premiers temps du processus d'angiogenèse. Ainsi, l'équation de la dynamique cellulaire (3.24) se réduit à l'équation suivante :

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \nabla \cdot [\mathbf{J}_c + \mathbf{J}_d + \mathbf{J}_h] = 0 \quad (3.25)$$

3.2.4. Modélisation de l'évolution de la densité du biogel

La modélisation de l'évolution temporelle et spatiale de la densité du biogel s'écrit, de façon générique :

$$\text{variation de la densité matricielle} + \text{convection} = \text{biosynthèse} - \text{dégradation}$$

soit, mathématiquement,

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot \left[\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} \right] = \text{biosynthèse} - \text{dégradation} \quad (3.26)$$

Nous supposons que la biosynthèse de MEC est négligeable. En effet, même si celle-ci peut avoir des effets significatifs sur des substrats rigides, les quantités sécrétées de matrice restent faibles par rapport à la quantité initialement présente dans les expériences (Murray (2003d)). De plus, Vernon *et al.* (1995) ont montré que des CE, qui ne synthétisaient pas de collagène de type I, étaient capables de se réorganiser, sur une plus longue échelle de temps, en créant des réseaux de pseudo-capillaires. La biosynthèse ne nous semble donc pas être un facteur clef pour l'initiation du processus d'angiogenèse *in vitro*.

Dans le cas de l'hypothèse 1 (H1, § 3.1), où la réorganisation cellulaire s'expliquerait par la recherche d'équilibre mécanique entre les forces de traction de CE et la résistance de la MEC, sans remodelage de celle-ci, nous considérons la dégradation de la MEC négligeable. Cette simplification se justifie à la fois expérimentalement et théoriquement. Expérimentalement, la dégradation de la MEC est limitée considérablement, dans les premières phases de l'angiogenèse *in vitro*, par l'utilisation d'aprotinine (*cf* chapitre 2), un inhibiteur des enzymes protéolytiques de la matrice (Vailhé *et al.* (1998)). Théoriquement, en négligeant une évolution de la quantité globale de MEC, le système peut tendre vers des états stationnaires, qui permettent alors une étude mathématique de la distribution spatiale des CE.

Dans le cas de l'hypothèse 2 (H2, § 3.1), où la mécanique influence le processus d'angiogenèse *in vitro* également par le remodelage de la MEC, la dégradation n'est plus supposée nulle, et suit différentes formulations en fonction de sa régulation par la mécanique (voir chapitre 6). Sous cette hypothèse, la protéolyse matricielle est vue comme le déclencheur de l'instabilité dynamique provoquant la formation de lacunes et des pseudo-capillaires.

3.2.5. Réduction de l'analyse à un domaine à deux dimensions

Pour simplifier la résolution numérique, nous avons restreint notre analyse à un domaine à deux dimensions en considérant d'une part que le gel était suffisamment mince (1 mm d'épaisseur) et d'autre part que, puisque les cellules étaient déposées à la surface du biogel et non dispersées lors de sa polymérisation, la composante principale du tenseur des contraintes dans la direction verticale, σ_{33} , était négligeable.

Pour pouvoir cependant suivre les variations de l'épaisseur du gel en tout point du domaine 2D, nous pouvons déduire de la loi de Hooke (chapitre 3.3), une relation entre l'épaisseur de gel $e(x, y, t)$ et la densité locale de MEC $\rho(x, y, t)$.

La loi de Hooke, présentée précédemment, est une loi de comportement mécanique en trois dimensions. Pour se rapporter au cas bi-dimensionnel de notre étude, nous avons supposé que les contraintes verticales étaient négligeables ($\sigma_{33}^{Hooke}(x, y, t) = 0$), et que toutes les composantes du tenseur de déformation ne sont spatialement dépendantes que de x et de y . Sous ces hypothèses, nous pouvons déduire que toutes les composantes du tenseur de contraintes ne sont spatialement dépendantes que de x et y . Nous avons alors :

$$\sigma_{33}^{Hooke}(x, y, t) = \frac{E}{1 + \nu} \epsilon_{33}(x, y, t) + \frac{E\nu}{(1 + \nu)(1 - 2\nu)} \theta_{3D}(x, y, t)$$

où $\theta_{3D}(x, y, t) = \frac{\partial u_1(x, y, z, t)}{\partial x} + \frac{\partial u_2(x, y, z, t)}{\partial y} + \frac{\partial u_3(x, y, z, t)}{\partial z}$, les fonctions $u_i(x, y, z, t)$ étant les composantes du vecteur déplacement $\mathbf{u}(x, y, z, t)$. En supposant que les contraintes verticales soient négligeables, nous obtenons alors :

$$\epsilon_{33}(x, y, t) = -\frac{\nu}{1 - 2\nu} \theta_{3D}(x, y, t) \quad (3.27)$$

D'après l'équation bilan sur la densité de la MEC (eq. 3.26), dans le cas où la dégradation de la MEC est supposée négligeable, nous pouvons écrire la relation de conservation locale de MEC : $\rho dV = \rho_0 dV_0$, où dV_0 et dV , ρ_0 et ρ , sont respectivement les volumes et densités élémentaires initialement et à l'état déformés. Sachant que $dV = dX^1 dX^2 dX^3$, $dV_0 = dX_0^1 dX_0^2 dX_0^3$, où dX_0^1 , dX_0^2 , dX_0^3 et dX^1 , dX^2 , dX^3 sont respectivement les dimensions des volumes élémentaires dV_0 et dV , et en écrivant que $dX^i = (1 + \epsilon_{ii})dX_0^i$ pour chaque $i = 1..3$, nous obtenons, sous l'hypothèse des petites déformations, la relation suivante :

$$\rho(x, y, t) = \rho_0(1 - \theta_{3D}(x, y, t)) \quad (3.28)$$

L'épaisseur, $e(x, y, t)$, est alors calculée par la formule $e(x, y, t) = e_0(x, y)(1 + \epsilon_{33})$, où $e_0(x, y)$ est l'épaisseur initiale de MEC. En combinant cette expression de $e(x, y, t)$ avec les relations (3.27) et (3.28), nous obtenons la formule (3.29) :

$$e(x, y, t) = e_0(x, y) \left(\frac{1 - 3\nu}{1 - 2\nu} + \frac{\nu}{1 - 2\nu} \frac{\rho(x, y, t)}{\rho_0} \right) \quad (3.29)$$

où $e_0(x, y)$ et $e(x, y)$ représentent respectivement l'épaisseur de la MEC aux temps initial t_0 et t .

3. Modélisation biomécanique et mathématique de l'angiogenèse *in vitro*

Une approximation supplémentaire est nécessaire pour prendre en compte l'effet de la condition aux limites sur la face inférieure de la boîte de Petri, où le biogel est attaché. Cette condition aux limites induit une contrainte de cisaillement qui décroît avec l'épaisseur de la MEC. Nous modélisons cet effet par l'ajout, dans l'équation d'équilibre mécanique, d'une force externe volumique de rappel $\mathbf{R}_{ext}$, qui se déduit de l'évaluation des contraintes de cisaillement, $\sigma_{i3}(x, y, t)$, $i = 1, 2$, pour $z = e(x, y, t)$. Grâce à la théorie de l'élasticité linéaire (§ 7.3), nous obtenons :

$$\sigma_{i3}(x, y, t) = \frac{E u_i(x, y, t)}{(1 + \nu) e(x, y, t)} \quad i = 1, 2 \quad (3.30)$$

où u_i est la $i^{ième}$ composante du vecteur déplacement.

Ainsi, en combinant les relations (3.29) et (3.30), nous modélisons la force d'attachement du gel à la boîte de Petri par $\mathbf{R}_{ext} = s\mathbf{u}/\rho$, où s est le paramètre de rappel élastique, dépendant du module de Young E et du coefficient de Poisson ν .

Dans ces expériences, les effets inertiels sont négligeables par rapport aux effets visqueux. Nous obtenons alors l'équation finale d'équilibre mécanique :

$$\nabla \cdot [\boldsymbol{\sigma}_{cell} + \boldsymbol{\sigma}_{mec}] = \mathbf{R}_{ext} \quad (3.31)$$

En combinant les équations (3.1), (3.2) et (3.31), l'équation d'équilibre mécanique s'écrit explicitement :

$$\begin{aligned} \nabla \cdot \left[\frac{E}{1 + \nu} \left(\boldsymbol{\epsilon} - \beta_1 \nabla^2 \boldsymbol{\epsilon} + \frac{\nu}{1 - 2\nu} (\theta - \beta_2 \nabla^2 \theta) \mathbf{Id} \right) + \mu_1 \frac{\partial \boldsymbol{\epsilon}}{\partial t} \right. \\ \left. + \mu_2 \frac{\partial \theta}{\partial t} \mathbf{Id} + \tau \rho n (N_2 - n) \mathbf{Id} \right] = s \frac{\mathbf{u}}{\rho} \end{aligned} \quad (3.32)$$

Finalement, il nous faut spécifier l'expression analytique en deux dimensions du tenseur de diffusion cellulaire dépendant des déformations $\mathbf{D}(\boldsymbol{\epsilon})$ (Cook (1995); Manoussaki *et al.* (1996)) :

$$\mathbf{D}(\boldsymbol{\epsilon}) = D_0 \begin{bmatrix} 1 + \frac{\epsilon_{11} - \epsilon_{22}}{2} & \frac{\epsilon_{12} + \epsilon_{21}}{2} \\ \frac{\epsilon_{12} + \epsilon_{21}}{2} & 1 - \frac{\epsilon_{11} - \epsilon_{22}}{2} \end{bmatrix} \quad (3.33)$$

où D_0 est un scalaire et ϵ_{ij} sont des composantes du tenseur de déformations.

3.2.6. Conditions initiales, conditions aux limites

Les simulations d'angiogenèse *in vitro* sont conduites dans un domaine carré Ω , de côté L et de frontière $\partial\Omega$, imperméable aux cellules et à la MEC. Par conséquence, les conditions aux limites pour les CE sont des conditions de flux nuls :

$$\mathbf{J}_d \cdot \boldsymbol{\eta} = \mathbf{J}_h \cdot \boldsymbol{\eta} = \mathbf{J}_c \cdot \boldsymbol{\eta} = 0$$

où $\boldsymbol{\eta}$ est le vecteur normal à la frontière.

De plus, comme le biogel est attaché, aux bords, à la boîte de Petri, nous imposons un déplacement nul sur les frontières du domaine ($\mathbf{u}|_{\partial\Omega} = 0$), et une propagation nulle des contraintes à travers elles ($(\nabla \cdot \boldsymbol{\epsilon}) \cdot \boldsymbol{\eta} = 0$ sur $\partial\Omega$). Ces conditions impliquent une conditions de flux nul pour la MEC (voir eq. 3.26).

Comme condition initiale de la concentration cellulaire, nous considérons une distribution spatiale quasi-homogène, perturbée aléatoirement ($\pm 10\%$) autour de la valeur d'équilibre homogène n_0 . D'autres distributions spatiales seront envisagées au chapitre (5). Nous supposons que, à l'état initial, la matrice est homogène ($\rho(\mathbf{x}, 0) = \rho_0$) et que le biogel est dans un état non déformé ($\mathbf{u} = \mathbf{0}$).

3.2.7. Normalisation et système complet

Les équations du modèle mécano-cellulaire peuvent être adimensionnalisées en les normalisant avec le temps caractéristique T (heures), la taille caractéristique L (diamètre de la boîte de Petri) du domaine Ω , la concentration initiale en CE n_0 et la densité initiale en fibrine ρ_0 . Les variables adimensionnalisées sont :

$$\rho^* = \frac{\rho}{\rho_0}, \quad n^* = \frac{n}{n_0}, \quad \mathbf{u}^* = \frac{\mathbf{u}}{L}, \quad x^* = \frac{x}{L}, \quad y^* = \frac{y}{L}, \quad t^* = \frac{t}{T}$$

Les paramètres adimensionnalisés s'écrivent alors :

$$D_0^* = \frac{D_0 T}{L^2}, \quad \mu_1^* = \frac{\mu_1 \rho_0}{L^2 T}, \quad \mu_2^* = \frac{\mu_2 \rho_0}{L^2 T}, \quad N_2^* = \frac{N_2}{n_0}, \quad h^* = \frac{h T \rho_0}{L^2}, \quad \beta_1^* = \frac{\beta_1}{L^2}, \quad \beta_2^* = \frac{\beta_2}{L^2}$$

$$\lambda^* = \frac{E \nu \rho_0}{L^2 (1 + \nu)(1 - 2\nu)}, \quad \mu^* = \frac{E \rho_0}{2(1 + \nu)L^2}, \quad \tau^* = \frac{\tau \rho_0^2 n_0^2}{L^2} \quad (3.34)$$

λ^* et μ^* sont appelés les coefficients (adimensionnalisés) de Lamé. Dans toute la suite du texte, les astérisques seront omis pour alléger les notations.

Le système complet d'EDP s'écrit donc :

$$\left\{ \begin{array}{l} \nabla \cdot [2\mu (\boldsymbol{\epsilon} - \beta_1 \nabla^2 \boldsymbol{\epsilon}) + \lambda (\theta - \beta_2 \nabla^2 \theta) \mathbf{Id} + \mu_1 \frac{\partial \boldsymbol{\epsilon}}{\partial t} \\ \quad + \mu_2 \frac{\partial \theta}{\partial t} \mathbf{Id} + \tau \rho n (N_2 - n) \mathbf{Id}] = s \frac{\mathbf{u}}{\rho} \\ \frac{\partial n}{\partial t} + \nabla \cdot [-\nabla \cdot (\mathbf{D}(\boldsymbol{\epsilon}) n) + h n \nabla \rho + n \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t}] = 0 \\ \frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot [\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t}] = -\text{dégradation} \end{array} \right. \quad (3.35)$$

3.3. Conclusion

Pour comprendre l'apparition et la régulation des structures cellulaires dans le contexte expérimental présenté au chapitre (2), en particulier en absence de source exogène de chimioattractants, il est nécessaire de développer de nouveaux modèles, différents de ceux proposés récemment expliquant l'angiogenèse *in vitro* par une approche chimiotactique (Gamba *et al.* (2003); Serini *et al.* (2003)). En effet, dans ce contexte expérimental, le scénario fondé sur une migration active due à la chimiotaxie ne peut pas expliquer, à lui seul, le processus de morphogénèse. Nous avons alors complété le modèle biomécanique de Manoussaki *et al.* (1996) et de Murray *et al.* (1998) par la prise en compte d'une composante haptotactique de la migration cellulaire le long des gradients de la MEC. En effet, nous avons vu que les cellules pouvaient

3. Modélisation biomécanique et mathématique de l'angiogenèse *in vitro*

former des liaisons avec la MEC via les plaques focales d'adhésion (chapitre 2). Comme les cellules ont une meilleure adhérence quand les sites d'adhésion sont plus nombreux, nous avons supposé cette composante haptotactique de la migration cellulaire proportionnelle au gradient de MEC et à la densité cellulaire.

Notre modèle intègre à la fois les caractéristiques de la migration cellulaire (§ 3.2.3) et les paramètres mécaniques des CE et de la MEC (§ 3.2.2) pour expliquer comment une instabilité, générée mécaniquement, peut conduire à la réorganisation du milieu. En effet, dans le contexte des expériences que nous avons présentées, il semble maintenant établi que les effets mécaniques peuvent réguler et contrôler le processus d'angiogenèse *in vitro* (Ingber (2002)).

Deux hypothèses ont été formulées pour appréhender comment les interactions mécaniques régulaient le processus. La première explique l'angiogenèse *in vitro* comme issue d'une instabilité mécanique, générée par la recherche d'équilibre entre les forces actives de traction cellulaire et la résistance passive viscoélastique de la MEC, sans remodelage de celle-ci (§ 3.2.4). L'absence de la prise en compte de la dégradation du gel est justifiée par les travaux expérimentaux de Vailhé *et al.* (1998). Ces chercheurs ont mesuré l'évolution temporelle des produits de dégradation de la fibrine durant le processus de formation des pseudo-capillaires et ont montré que la dégradation de la fibrine était très limitée lorsque les premières lacunes se formaient dans le biogel. Sous cette hypothèse, nous avons considéré plusieurs contrôles possibles des caractéristiques fonctionnelles des cellules : la modulation de la migration cellulaire par la rigidité du substrat, les effets d'élasticité non-locale due à la nature fibreuse de la MEC et la diffusion cellulaire anisotrope due au champ des déformations.

Le développement du flux diffusif cellulaire, dans le cas d'une diffusion dépendante des déformations, donne $\mathbf{J}_d = -\mathbf{D}(\epsilon) \nabla n - n \nabla \cdot [\mathbf{D}(\epsilon)]$. En le comparant avec le terme de diffusion classique de la loi de Fick, $\mathbf{J}_d = -\mathbf{D} \nabla n$, nous constatons l'existence d'un terme supplémentaire. Cette relation peut être comparée avec l'expression spécifique des flux utilisés par Othmer et Stevens (1997), fondée sur le principe d'un renforcement de la migration aléatoire. Dans le contexte d'une migration active cellulaire chimiotactique, ils l'ont appelé "sensibilité chimiotactique". Dans notre cas, il s'agirait plutôt de sensibilité mécanique. L'influence de ce terme sur la réorganisation de la MEC sera analysée dans le paragraphe (5.4.1.2).

La deuxième hypothèse s'inscrit dans la continuité de la première, c'est-à-dire dans l'existence d'un équilibre mécanique entre la traction cellulaire et la résistance matricielle, mais nous supposons, dans ce cas, que l'instabilité dynamique est déclenchée par la dégradation du milieu : les effets mécaniques réguleraient la protéolyse matricielle, soit en favorisant la sécrétion de protéases par les CE, soit en leur favorisant l'accès aux sites de dégradation de la MEC. Ce remodelage rendrait alors le gel plus malléable et permettrait alors la réorganisation cellulaire en réseaux tubulaires.

Avant de présenter les résultats des simulations numériques du modèle (3.35), nous allons mener, au chapitre 4, une analyse mathématique permettant de mettre en évidence l'influence des différents paramètres sur la réorganisation du milieu.

4. Analyse de stabilité linéaire du modèle

4.1. Introduction

Les systèmes dynamiques de réaction-diffusion, composés de N substances chimiques, sont des systèmes d'équations aux dérivées partielles (EDP) qui s'écrivent de façon générique :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial c_i}{\partial t} + \nabla \cdot \left(\sum_{j=1}^N D_j \nabla c_j \right) = F_i(c_1, \dots, c_N), \quad i = 1..N \\ + \text{conditions aux limites} \\ + \text{conditions initiales} \end{array} \right.$$

où c_i correspond à la concentration de $i^{\text{ème}}$ substance chimique, de coefficient de diffusion D_i , et F_i est le terme réactionnel de l'équation i .

Dans de tels systèmes dynamiques, la diffusion peut induire une instabilité. Cette instabilité, plus connue sous le nom d'instabilité de Turing, est relativement contre-intuitive. En effet, dans une équation isolée de diffusion :

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \nabla \cdot (D \nabla c) = F(c)$$

la diffusion tend à rendre homogène la distribution spatiale de la concentration chimique c . Cet effet stabilisant intervient également lors de la résolution numérique, par l'apport d'un terme parabolique (Le Pourhiet (1988)). Turing (1952) a montré que, dans les systèmes de réaction-diffusion, les substances chimiques (ou morphogènes) pouvaient réagir et diffuser de façon à engendrer, spatialement, un état stationnaire hétérogène des concentrations de ces produits. Ces mécanismes de réaction-diffusion sont, de nos jours, fréquemment utilisés pour expliquer la formation des motifs sur les coquillages (Meinhardt (2003)), sur la peau des poissons (Painter *et al.* (1999)) ou sur les ailes des papillons (Sekimura *et al.* (2000)). Mathématiquement, cela se traduit par une bifurcation noeud-col, correspondant à un changement de signe d'une des valeurs propres réelles de la matrice de Jacobi associée au système (D'Andréa-Novet et Cohen de Lara (1994)).

Lors des expériences d'angiogenèse *in vitro* (chapitre 2), nous avons constaté que la formation des lacunes dans le biogel était fortement dépendante des conditions expérimentales (concentration initiale de CE, densité de MEC,...). Pour traduire correctement la physique de ce phénomène, il faut donc que l'espace des paramètres $(\mathbb{R}^+)^D$, où D est le nombre de paramètres de notre modèle, comporte deux sous-ensembles non-vides Υ_1 et Υ_2 ($\Upsilon_1 \subset (\mathbb{R}^+)^D$, $\Upsilon_2 \subset (\mathbb{R}^+)^D$ non nécessairement connexes) tels que tous jeux de paramètres de Υ_1 conduisent à un état stationnaire homogène en $(n, \rho, \mathbf{u})$, tandis que tous les jeux de paramètres de Υ_2 peuvent conduire à une réorganisation du milieu.

La frontière, $\Gamma_{\Upsilon_1}^{\Upsilon_2}$, séparant Υ_1 et Υ_2 , est déterminée par les conditions de bifurcation du modèle. Pour mettre en évidence le rôle des interactions mécaniques lors des premières phases

4. Analyse de stabilité linéaire du modèle

de l'angiogenèse *in vitro*, comme nous l'avions annoncé précédemment (§ 3.1), nous choisissons comme paramètre de bifurcation l'amplitude de la force de traction cellulaire τ .

Nous modélisons l'irrégularité du dépôt des CE sur le biogel (*cf* § 2.3.2.1) par une perturbation de l'état d'équilibre homogène, et nous nous intéressons à la stabilité de cet état pour de petites perturbations. Pour cela, nous mènerons une analyse de stabilité linéaire de l'état d'équilibre homogène $(n, \rho, \mathbf{u}) = (1, 1, \mathbf{0})$ en cherchant à écrire les perturbations spatiales $(\delta n, \delta \rho, \delta \mathbf{u})$ sous la forme suivante :

$$(\delta n, \delta \rho, \delta \mathbf{u}) \propto e^{i(kx+ly)+\xi(k,l)t}$$

où k, l sont les nombres d'ondes spatiaux respectivement dans la direction x et y , et $\xi(k, l)$ est une valeur propre de la matrice de Jacobi de l'état d'équilibre homogène.

Cette analyse de stabilité linéaire permettra de déterminer la frontière $\Gamma_{\Upsilon_1}^{\Upsilon_2}$, dont nous déduirons une condition nécessaire et suffisante, sur le paramètre de bifurcation τ , pour que les paramètres appartiennent à Υ_2 .

4.2. Calculs algébriques

4.2.1. Linéarisation du système au voisinage de l'état homogène

La linéarisation, au voisinage de l'état d'équilibre homogène $(n, \rho, \mathbf{u}) = (1, 1, \mathbf{0})$, du système d'EDP (eq. 3.35) s'écrit :

$$\left\{ \begin{array}{l} \nabla \cdot [2\mu (\boldsymbol{\epsilon} - \beta_1 \nabla^2 \boldsymbol{\epsilon}) + \lambda (\theta - \beta_2 \nabla^2 \theta) \mathbf{Id} + \mu_1 \frac{\partial \boldsymbol{\epsilon}}{\partial t} \\ \quad + \mu_2 \frac{\partial \theta}{\partial t} \mathbf{Id} + \tau \delta n (N_2 - 2) \mathbf{Id} + \tau \delta \rho (N_2 - 1) \mathbf{Id}] - s \delta \mathbf{u} = \mathbf{0} \\ \frac{\partial \delta n}{\partial t} + \nabla \cdot [-D_0 \nabla \delta n - \frac{D_0}{2} \nabla^2 \delta \mathbf{u} + h \nabla \delta \rho + \frac{\partial \delta \mathbf{u}}{\partial t}] = 0 \\ \frac{\partial \delta \rho}{\partial t} + \nabla \cdot [\frac{\partial \delta \mathbf{u}}{\partial t}] = 0 \end{array} \right. \quad (4.1)$$

où $\delta n = n - 1$, $\delta \rho = \rho - 1$ et $\delta \mathbf{u} = \mathbf{u}$.

4.2.2. Calculs

Nous recherchons des perturbations spatiales $(\delta n, \delta \rho, \delta \mathbf{u})$ sous la forme (Britton (2003)) :

$$(\delta n, \delta \rho, \delta \mathbf{u}) \propto e^{i(kx+ly)+\xi(k,l)t}$$

où k, l sont les nombres d'ondes spatiaux respectivement dans la direction x et y , et $\xi(k, l)$ est une valeur propre de la matrice de Jacobi du système linéarisé en $(n, \rho, \mathbf{u}) = (1, 1, \mathbf{0})$ (système 4.1). Ces nombres d'ondes sont de la forme $k = \pi k^*/L$, $l = \pi l^*/L$, où k^* et l^* sont des entiers et L est la longueur du côté du domaine carré Ω . $\xi(k, l)$ détermine le taux de croissance de la perturbation.

L'état stationnaire homogène est linéairement stable si toutes les valeurs propres de la matrice de Jacobi associée à l'état d'équilibre homogène ont une partie réelle négative. Dans ce cas, l'amplitude des perturbations associées tend vers 0 quand t tend vers l'infini. A l'inverse,

4.3. Détermination des valeurs critiques pour le paramètre de bifurcation τ

toutes les perturbations spatiales associées à des valeurs propres à partie réelle positive croissent exponentiellement au voisinage de l'état stationnaire.

La relation de dispersion est obtenue en calculant le déterminant de la matrice de Jacobi du système linéarisé en $(n, \rho, \mathbf{u}) = (1, 1, \mathbf{0})$. Nous posons alors $r = k^2 + l^2$ et nous nous intéresserons au cas non-dégénéré $r \in \mathbb{R}^{*+}$. Pour alléger les notations, $\xi(r)$ sera noté ξ .

$$\begin{vmatrix} \xi + D_0 r & -hr & ik\xi & il\xi \\ 0 & \xi & ik\xi & il\xi \\ ik\tau(N_2 - 2) & ik\tau(N_2 - 1) & -\mu\beta_1(2k^4 + 3k^2l^2 + l^4) - \xi k^2(\mu_1 + \mu_2) + \dots & -\frac{1}{2}kl(2\mu\beta_1 r + 2\lambda\beta_2 r + 2\mu + 2\lambda + \xi(\mu_1 + 2\mu_2)) \\ il\tau(N_2 - 2) & il\tau(N_2 - 1) & -\lambda k^2\beta_2 r - \frac{1}{2}\xi l^2\mu_1 - \mu(2k^2 + l^2) - \lambda k^2 - s & -\mu\beta_1(k^4 + 3k^2l^2 + l^4) - \xi l^2(\mu_1 + \mu_2) + \dots \end{vmatrix} = 0$$

Nous obtenons alors comme relation de dispersion une fonction polynomiale du quatrième degré en ξ :

$$\xi(\xi - \xi_1)(a(r)\xi^2 + b(r)\xi + c(r)) = 0 \quad (4.2)$$

où la valeur propre ξ_1 est égale à :

$$\xi_1 = -2 \frac{\mu\beta_1 r^2 + s + \mu r}{\mu_1 r}$$

Par conséquent, la partie réelle de ξ_1 est toujours négative. Les coefficients $a(r)$, $b(r)$ et $c(r)$ utilisés dans cette relation de dispersion valent :

$$\begin{cases} a(r) &= r(\mu_1 + \mu_2) \\ b(r) &= (D_0(\mu_1 + \mu_2) + 2\mu\beta_1 + \lambda\beta_2)r^2 \\ &\quad + (2\mu + \lambda + \tau(3 - 2N_2))r + s \\ c(r) &= D_0(2\mu\beta_1 + \lambda\beta_2)r^3 + (D_0(2\mu + \lambda) \\ &\quad + \tau(h(2 - N_2) + D_0(2 - \frac{3N_2}{2})))r^2 + D_0sr \end{cases} \quad (4.3)$$

4.3. Détermination des valeurs critiques pour le paramètre de bifurcation τ

L'équation de dispersion (eq. 4.2) admet deux solutions évidentes : 0 et ξ_1 . Les deux autres valeurs propres ξ_2 et ξ_3 (dans $\mathbb{C}$) sont les racines de la fonction polynomiale, de degré 2 :

$$f : \xi \rightarrow a(r)\xi^2 + b(r)\xi + c(r)$$

La fonction f est à coefficients réels ; ses deux racines (dans $\mathbb{C}$) sont donc soit complexes conjuguées, soit réelles. Une bifurcation noeud-col, conduisant à une instabilité de Turing (Murray (2003d)), correspond au changement de signe d'une de ces deux valeurs propres, dans le cas où elles sont réelles (D'Andréa-Novet et Cohen de Lara (1994)). Nous nous intéressons donc au signe du produit de ces deux valeurs propres. Comme $\forall r \in \mathbb{R}^{*+}$, $a(r) > 0$, alors le produit des

4. Analyse de stabilité linéaire du modèle

racines de f est du signe de $c(r)$. Nous recherchons donc dans l'espace des paramètres $(\mathbb{R}^+)^D$, où D est le nombre de paramètres de notre modèle, une condition nécessaire et suffisante telle que :

$$\{\exists r \in \mathbb{R}^{*+} / c(r) < 0\} \quad (4.4)$$

La condition (4.4) équivaut à ce que les deux valeurs propres soient réelles et de signes différents. En effet, si elles étaient complexes conjuguées, alors leur produit serait positif ou nul. Leur produit serait également positif si elles étaient du même signe. La réciproque est évidente.

Nous avons donc :

$$\{\exists r \in \mathbb{R}^{*+} / c(r) < 0\} \Leftrightarrow \{\exists \xi_2 \in \mathbb{R}, \exists \xi_3 \in \mathbb{R} / \xi_2 \xi_3 < 0\}$$

Étude de la fonction c :

La fonction $r \rightarrow c(r)$ est polynomiale de degré 3, elle est donc C^∞ et continue. Sachant que le coefficient du terme de plus haut degré est strictement positif, rechercher le signe de $c(r)$ ($r > 0$) équivaut à trouver les solutions de l'équation $c(r) = 0$.

En factorisant $c(r)$, nous avons :

$$c(r) = r \left(D_0 (2\mu\beta_1 + \lambda\beta_2) r^2 + \left(D_0 (2\mu + \lambda) + \tau \left(h(2 - N_2) + D_0 \left(2 - \frac{3N_2}{2} \right) \right) \right) r + D_0 s \right)$$

0 est donc racine évidente de c .

Posons alors :

$$\tilde{c}(r) \equiv \left(D_0 (2\mu\beta_1 + \lambda\beta_2) r^2 + \left(D_0 (2\mu + \lambda) + \tau \left(h(2 - N_2) + D_0 \left(2 - \frac{3N_2}{2} \right) \right) \right) r + D_0 s \right)$$

Comme $r \in \mathbb{R}^{*+}$, alors les fonctions $\tilde{c}$ et c sont du même signe.

Une condition nécessaire pour qu'une des valeurs propres réelles soit positive est qu'au moins un des coefficients de $\tilde{c}(r)$ soit négatif. Nous en déduisons les conditions nécessaires de bifurcation noeud-col suivantes :

$$\begin{aligned} \{\exists r \in \mathbb{R}^{*+} / \tilde{c}(r) < 0\} &\Rightarrow \begin{cases} h(2 - N_2) + D_0 \left(2 - \frac{3N_2}{2} \right) < 0 \\ \text{et} \\ D_0 (2\mu + \lambda) + \tau \left(h(2 - N_2) + D_0 \left(2 - \frac{3N_2}{2} \right) \right) < 0 \end{cases} \\ (\tau \in \mathbb{R}^{*+}) &\Rightarrow NP > 0 \text{ et } \tau > \tau_{CN} \end{aligned} \quad (4.5)$$

où

$$\tau_{CN} \equiv \frac{\lambda + 2\mu}{\left(\frac{3N_2}{2} - 2 \right) + \frac{h}{D_0} (N_2 - 2)} \text{ et } NP \equiv \frac{h}{D_0} (N_2 - 2) + \left(\frac{3N_2}{2} - 2 \right) \quad (4.6)$$

La fonction $r \rightarrow \tilde{c}(r)$ est polynomiale de degré 2, avec le coefficient du terme de plus haut degré strictement positif. Elle admet donc un minimum dans $\mathbb{R}$. Ce minimum est atteint pour une valeur r_{min} de r telle que $\frac{d}{dr} \tilde{c}(r_{min}) = 0$. Nous déduisons alors trivialement r_{min} :

$$r_{min} = \frac{-2(\lambda + 2\mu) + 2\tau \left(\frac{h}{D_0} (N_2 - 2) + \left(\frac{3N_2}{2} - 2 \right) \right)}{(2\mu\beta_1 + \beta_2\lambda)}$$

4.3. Détermination des valeurs critiques pour le paramètre de bifurcation τ

Remarquons que r_{min} est de la forme :

$$r_{min} = \frac{-2(\lambda + 2\mu) + 2\tau NP}{(2\mu\beta_1 + \beta_2\lambda)} \quad (4.7)$$

où NP est le réel précédemment défini (eq. 4.6).

Le minimum, dans $\mathbb{R}$, de la fonction $r \rightarrow \tilde{c}(r)$ vaut donc :

$$\tilde{c}(r_{min}) = \frac{(2\beta_1\mu D_0 + D_0\lambda\beta_2)(-2D_0\lambda - 4D_0\tau - 4\mu D_0 + 2\tau N_2 h + 3D_0\tau N_2 - 4\tau h)^2}{16D_0^2(\beta_2\lambda + 2\mu\beta_1)^2} + \dots \quad (4.8)$$

$$= \frac{(D_0\lambda + 2D_0\tau + 2\mu D_0 - \tau N_2 h - 3/2 D_0\tau N_2 + 2\tau h)(-2D_0\lambda - 4D_0\tau - 4\mu D_0 + 2\tau N_2 h + 3D_0\tau N_2 - 4\tau h)}{4D_0(2\mu\beta_1 + \beta_2\lambda)} + sD_0$$

Une condition nécessaire pour qu'il y ait une bifurcation noeud-col est que $\tilde{c}(r_{min}) < 0$. En résolvant l'équation $\tilde{c}(r_{min}) = 0$ en τ , sous la condition $NP > 0$, nous trouvons alors la valeur critique τ_{turing} pour le coefficient de bifurcation τ (étape ① de la figure 4.1). Cette valeur critique de l'amplitude de la traction cellulaire τ est donnée par :

$$\tau_{turing} = \frac{\lambda + 2\mu + 2\sqrt{s(2\mu\beta_1 + \lambda\beta_2)}}{\left(\frac{3N_2}{2} - 2\right) + \frac{h}{D_0}(N_2 - 2)} \quad (4.9)$$

A priori, il ne s'agit que d'une condition nécessaire, car r_{min} n'appartient pas nécessairement à $\mathbb{R}^+$. Toutefois, nous pouvons démontrer qu'il s'agit également d'une condition suffisante.

D'après la relation (4.7), si $NP > 0$, la fonction $\tau \rightarrow r_{min}(\tau)$ est strictement croissante et s'annule en $\tau = \tau^{r_{min}=0}$, dont la valeur est précisée ci-dessous :

$$\tau^{r_{min}=0} = \frac{\lambda + 2\mu}{\left(\frac{3N_2}{2} - 2\right) + \frac{h}{D_0}(N_2 - 2)}$$

Remarquons que $\tau_{CN} = \tau^{r_{min}=0}$.

Nous en déduisons que (étape ② de la figure 4.1) :

$$((\tau > \tau^{r_{min}=0}) \text{ et } (NP > 0)) \Rightarrow r_{min} \in \mathbb{R}^+ \quad (4.10)$$

Réciproquement, sous la condition $NP > 0$ il est immédiat d'obtenir (étape ③ de la figure 4.1) :

$$r_{min} \in \mathbb{R}^+ \Rightarrow ((\tau > \tau^{r_{min}=0}) \text{ et } (NP > 0))$$

Par transitivité des assertions logiques précédemment déterminées, résumées à la figure (4.1), nous en déduisons la relation suivante :

$$\{\exists r \in \mathbb{R}^+ / \tilde{c}(r) < 0\} \Rightarrow r_{min} \in \mathbb{R}^+ \quad (4.11)$$

Par définition du minimum d'une fonction, nous obtenons (étape ④ de la figure 4.1) :

$$\{\exists r \in \mathbb{R}^+ / \tilde{c}(r) < 0\} \Rightarrow \tilde{c}(r_{min}) < 0 \quad (4.12)$$

4. Analyse de stabilité linéaire du modèle

D'après les assertions (4.11) et (4.12), nous déduisons que :

$$\{\exists r \in \mathbb{R}^+ / \tilde{c}(r) < 0\} \Rightarrow (r_{min} \in \mathbb{R}^+ \text{ et } \tilde{c}(r_{min}) < 0) \quad (4.13)$$

D'après (4.5) et (4.13), nous avons l'équivalence suivante :

$$\{\exists r \in \mathbb{R}^{*+} / c(r) < 0\} \Leftrightarrow \left(\frac{h}{D_0} (N_2 - 2) + \left(\frac{3N_2}{2} - 2 \right) > 0 \text{ et } \tau > \tau_{turing} \right) \quad (4.14)$$

L'état d'équilibre homogène $(n, \rho, \mathbf{u}) = (1, 1, \mathbf{0})$ est donc instable si et seulement si la condition (4.14) est satisfaite.

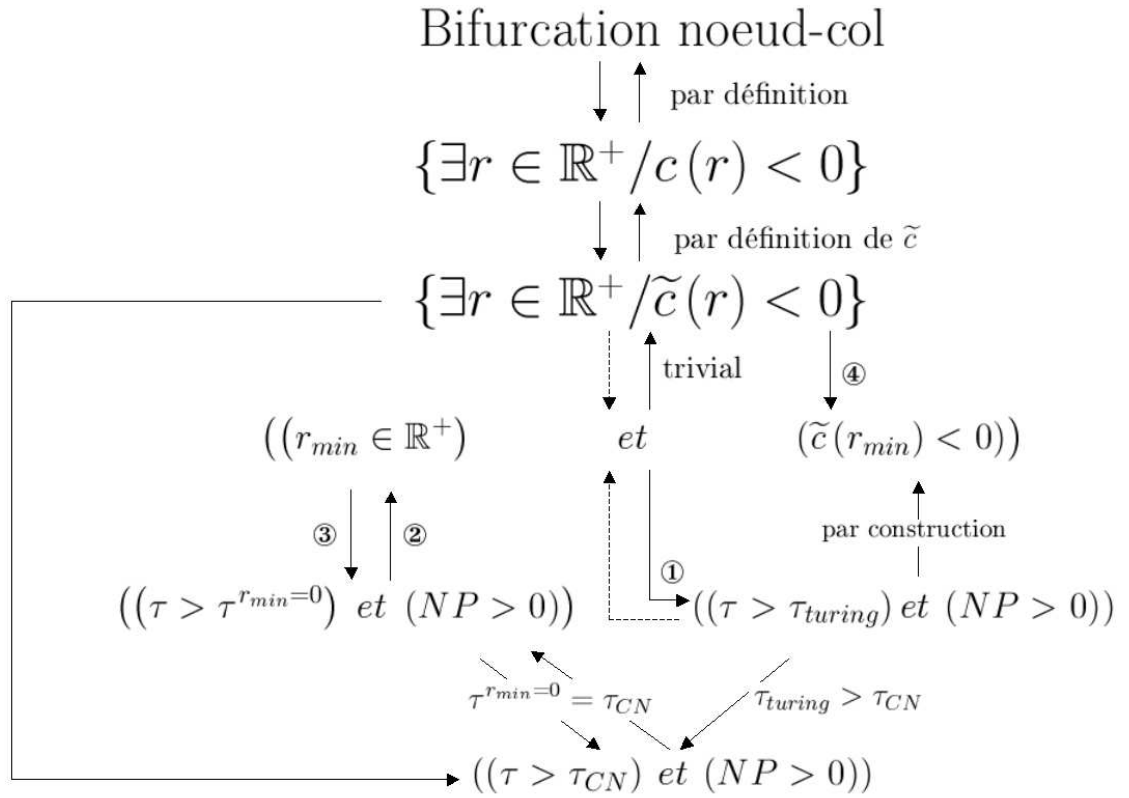


FIG. 4.1.: Schéma récapitulatif du raisonnement.

Les étapes démontrées dans le texte sont symbolisées par des flèches en trait plein, tandis que les déductions logiques effectuées par transitivité des assertions sont représentées par des traits en pointillés.

Cependant, les nombres d'ondes sont de la forme $k = \pi k^*/L$, $l = \pi l^*/L$, où k^* et l^* sont des entiers, pour $0 \leq x \leq L$ et $0 \leq y \leq L$. Ainsi, l'ensemble des valeurs propres associées à $r = \pi^2 N/L^2$, où $N = k^{*2} + l^{*2}$, est discret.

4.3. Détermination des valeurs critiques pour le paramètre de bifurcation τ

Soit Ξ cet ensemble discret ($\Xi \subset \mathbb{R}$) :

$$\Xi \equiv \left\{ \xi_i(r) / r = \pi^2 \frac{k^{*2} + l^{*2}}{L^2}, i = 0..3, k^* \in \mathbb{N}, l^* \in \mathbb{N} \right\}$$

où ξ_i ($i = 0..3$) est l'une des valeurs propres de la matrice de Jacobi du système linéarisé en $(n, \rho, \mathbf{u}) = (1, 1, \mathbf{0})$.

Pour qu'une structure organisée spatialement apparaisse, il faut et il suffit qu'au moins un élément de Ξ soit à partie réelle positive.

Nous avons tracé, pour deux jeux de paramètres, la plus grande des parties réelles des valeurs propres non nulles ($\max_{i=1..3} \Re(\xi_i(r))$) en fonction de la somme N des carrés des modes k^*

et l^* , dans les directions x et y ($N = k^{*2} + l^{*2}$ avec k^*, l^* entiers) avec $L = 1$ (Fig. 4.2). La condition de bifurcation (4.14) est satisfaite dans ces deux cas. Toutefois, seul un de ces deux cas sera susceptible de conduire à une réorganisation des CE et de la MEC : en effet, la condition sur N (somme de carré d'entiers) n'est satisfaite que dans le cas de la courbe en trait plein, avec $k^* = l^* = 2$, correspondant au mode $(2, 2)$ ($8 = 2^2 + 2^2$), contrairement à l'autre cas qui ne contient pas de modes propres instables (7 ne peut pas se décomposer en somme de carrés d'entier) (courbe en pointillé).

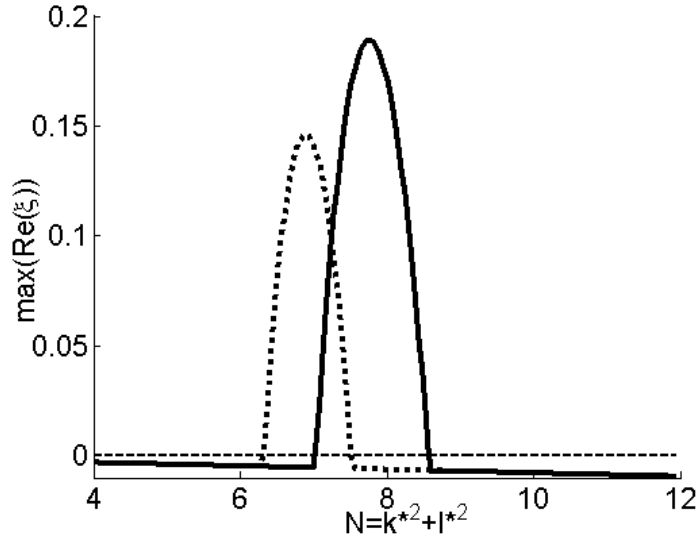


FIG. 4.2.: Diagramme de stabilité obtenu par la relation de dispersion (4.2). La courbe en trait plein est obtenue avec les paramètres normalisés : $\tau = 2.39$, $\lambda = 1.2$, $\mu = 1.8$, $\mu_1 = \mu_2 = 0.03$, $\beta_1 = \beta_2 = 0.0031$, $D_0 = 8 \times 10^{-5}$, $h = 4 \times 10^{-5}$, $N_2 = 3$, $s = 90$.

4.4. Influence des différents paramètres sur la condition de bifurcation

La condition (4.14) permet de déterminer des jeux de paramètres pour lesquels une réorganisation cellulaire peut avoir lieu. Une condition nécessaire pour cela est que $\frac{h}{D_0}(N_2 - 2) + (\frac{3N_2}{2} - 2) > 0$. Dans ces conditions un état stationnaire non-homogène peut apparaître, pour des valeurs de τ supérieures à la valeur critique τ_{turing} . Cet état correspond à des variations locales de l'épaisseur de la matrice (phase de création de lacunes).

Il est important de voir quelle est l'influence des différents paramètres sur la condition de bifurcation (4.9). Cela est un moyen qualitatif de vérifier notre résolution numérique (§ 8.3.1), et cela peut également mettre en évidence l'importance de certains rapports entre les paramètres.

4.4.1. Propriétés mécaniques du biogel

L'importance des propriétés mécaniques de la MEC sur la réorganisation de la MEC (création de lacunes) apparaît explicitement dans la relation (4.9). Nous allons alors mener une étude détaillée de l'influence de ces différents paramètres grâce aux différents diagrammes de bifurcation.

4.4.1.1. Influence de la rigidité du biogel

Le module de Young E traduit la rigidité du biogel. Nous pouvons exprimer τ_{turing} en fonction de ce paramètre :

$$\tau_{turing} = \frac{\frac{E^*(1-\nu)}{(1+\nu)(1-2\nu)} + 2\sqrt{\frac{sE^*}{1+\nu}(\beta_1 + \frac{\beta_2}{1-2\nu})}}{\frac{h}{D_0}(N_2 - 2) + (\frac{3N_2}{2} - 2)} \quad (4.15)$$

où E^* est un paramètre normalisé valant $E^* \equiv \frac{E\rho_0}{L^2}$.

4.4. Influence des différents paramètres sur la condition de bifurcation

Nous en déduisons le diagramme de bifurcation $\tau_{turing} - E$ (Fig. 4.3) :

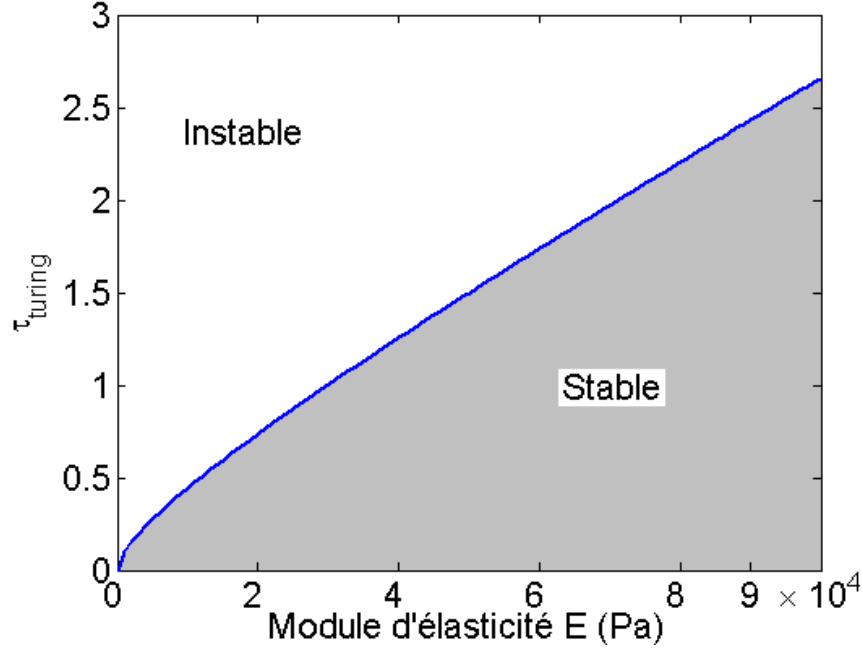


FIG. 4.3.: *Diagramme de bifurcation $\tau_{turing} - E$.*

Ce diagramme de bifurcation a été tracé avec $\rho_0 = 1 \text{ mg/cm}^3$, $L = 3 \text{ cm}$, $\nu = 0.2$ pour des valeurs biologiquement réalistes du module de Young E (cf Tab. 5.2). Les paramètres normalisés utilisés valent : $\beta_1 = \beta_2 = 0.003$, $D_0 = 4 \times 10^{-5}$, $h = 4 \times 10^{-4}$, $N_2 = 2.5$, $s = 200$.

D'après la relation (4.15), nous constatons que la fonction $E \rightarrow \tau_{turing}(E)$ est strictement croissante, comme l'illustre la figure (4.3) pour un jeu de paramètres donné. Nous en déduisons que plus le milieu est rigide, plus la valeur du paramètre critique τ_{turing} est grande. Ainsi, une plus grande traction cellulaire est requise pour déstabiliser l'état d'équilibre homogène. La rigidité du milieu est donc un facteur stabilisant de cet état d'équilibre.

4.4.1.2. Influence des termes d'élasticité longue-portée

La relation (4.9) permet d'étudier l'influence des termes d'élasticité à longue-portée β_1 et β_2 . D'après cette relation, il apparaît clairement que les fonctions $(\cdot, \beta_2) \rightarrow \tau_{turing}(\cdot, \beta_2)$ et $(\beta_1, \cdot) \rightarrow \tau_{turing}(\beta_1, \cdot)$ sont strictement croissantes. Ces résultats sont illustrés par la figure (4.4), pour un jeu donné de paramètres.

4. Analyse de stabilité linéaire du modèle

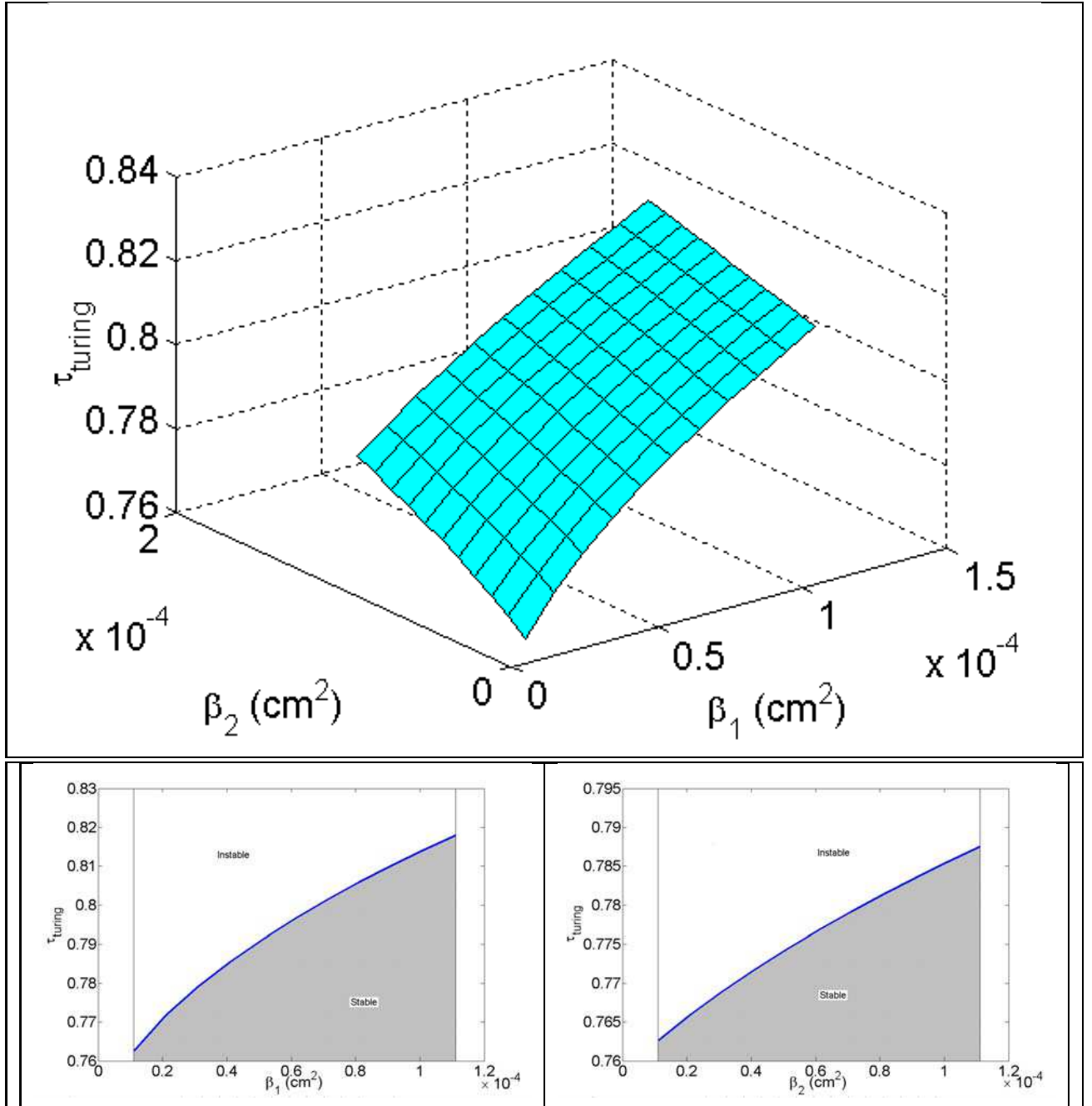


FIG. 4.4.: Diagramme de bifurcation $\tau_{turing} - \beta_1 - \beta_2$.

Les paramètres normalisés sont les mêmes qu'à la figure (4.3), exceptés β_1 et β_2 , avec $\lambda = 1.23$ et $\mu = 1.85$.

D'après la monotonie de ces fonctions, nous déduisons que plus les paramètres d'élasticité longue-portée β_1 et β_2 sont grands, plus le seuil critique pour le paramètre de bifurcation, τ_{turing} ,

4.4. Influence des différents paramètres sur la condition de bifurcation

est grand. Ces paramètres d'élasticité longue-portée tendent donc à empêcher la réorganisation matricielle, dans le sens où une plus forte traction cellulaire est nécessaire pour déstabiliser l'état d'équilibre homogène.

Nous avons établi (§ 3.2.2.2) que la prise en compte du laplacien de $\epsilon(\mathbf{x})$ permettait de moyenner la valeur de ses composantes dans un voisinage de $\mathbf{x}$. Ces termes bi-harmoniques sont connus pour être des facteurs stabilisants lorsqu'ils sont utilisés pour modéliser une diffusion non-locale (Murray (2003a)). Le fait qu'ils tendent à prévenir de la réorganisation matricielle n'est donc pas surprenant.

4.4.1.3. Influence du rappel élastique

Enfin, la relation (4.9) permet d'étudier l'influence de l'amplitude de la force de rappel élastique modélisant l'attachement du biogel sur la face inférieure de la boîte de Petri. Nous constatons immédiatement que $s \rightarrow \tau_{turing}(s)$ est une fonction strictement croissante (cf Fig. 4.5).

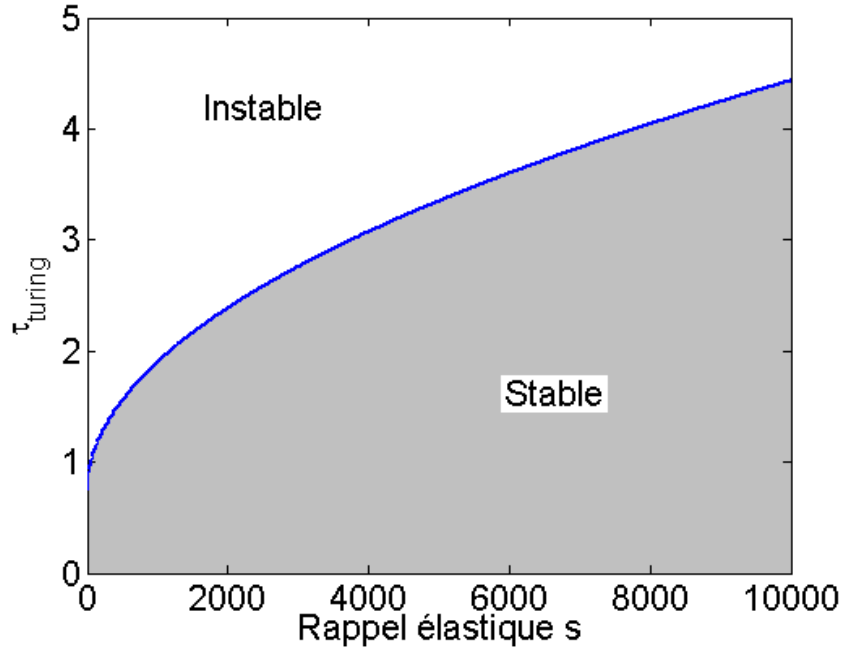


FIG. 4.5.: Diagramme de bifurcation $\tau_{turing} - s$.

Les paramètres normalisés utilisés sont les mêmes que ceux des figures (4.3) et (4.4), excepté s .

Nous déduisons de ce résultat que le facteur s est un facteur stabilisant l'état d'équilibre homogène. Cela semble assez intuitif : en effet, ce rappel élastique traduit l'influence de l'attachement du gel à la face inférieure de la boîte de Petri. Il apparaît donc logique que, plus ce rappel est grand, c'est-à-dire plus l'influence de l'attachement du biogel sur la face inférieure de la boîte de Petri est importante, plus il est difficile de déstabiliser le milieu.

4. Analyse de stabilité linéaire du modèle

4.4.2. Caractéristiques cellulaires

La relation (4.9) permet également d'étudier l'influence des caractéristiques cellulaires sur la valeur critique τ_{turing} du paramètre de bifurcation τ .

4.4.2.1. Influence de l'haptotaxie

D'après la relation (4.9), la fonction $h \rightarrow \tau_{turing}(h)$ est strictement décroissante, comme l'illustre la figure 4.6.

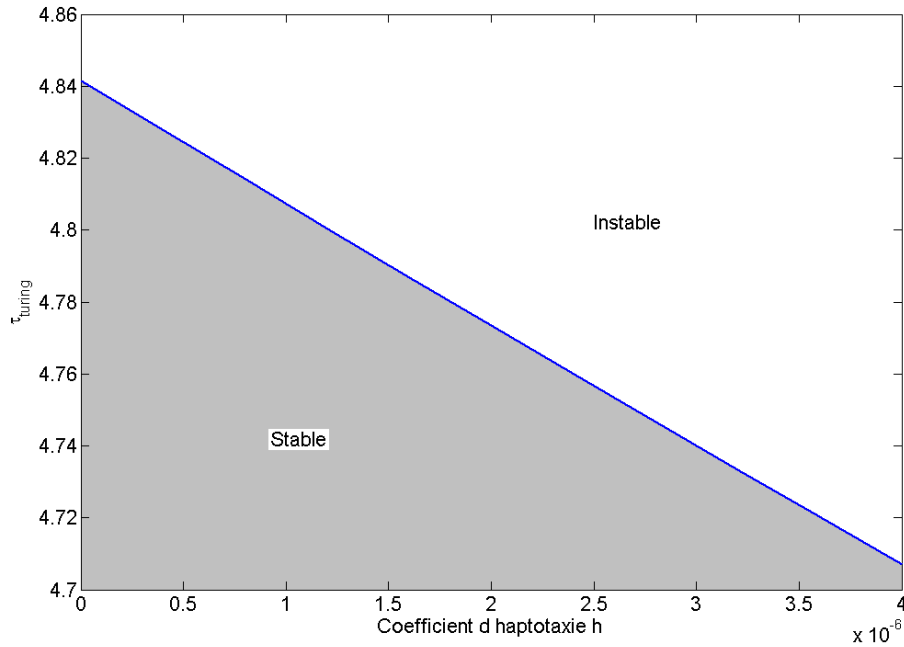


FIG. 4.6.: *Diagramme de bifurcation $\tau_{turing} - h$.*

Les paramètres normalisés utilisés sont les mêmes que ceux des figures (4.3) et (4.4), excepté h .

L'haptotaxie est donc un paramètre favorisant la réorganisation de la MEC. En effet, la fonction $h \rightarrow \tau_{turing}(h)$ est strictement décroissante.

Plus généralement, la formule (4.9) met en évidence le fait que le rapport $\frac{h}{D_0}$ est un facteur clé de la formation de lacunes. En effet, la migration cellulaire peut se faire dans deux directions opposées : soit en remontant un gradient d'adhésion si l'haptotaxie est plus importante que la diffusion, soit en le descendant si la diffusion prédomine (Fig. 4.7).

4.4. Influence des différents paramètres sur la condition de bifurcation

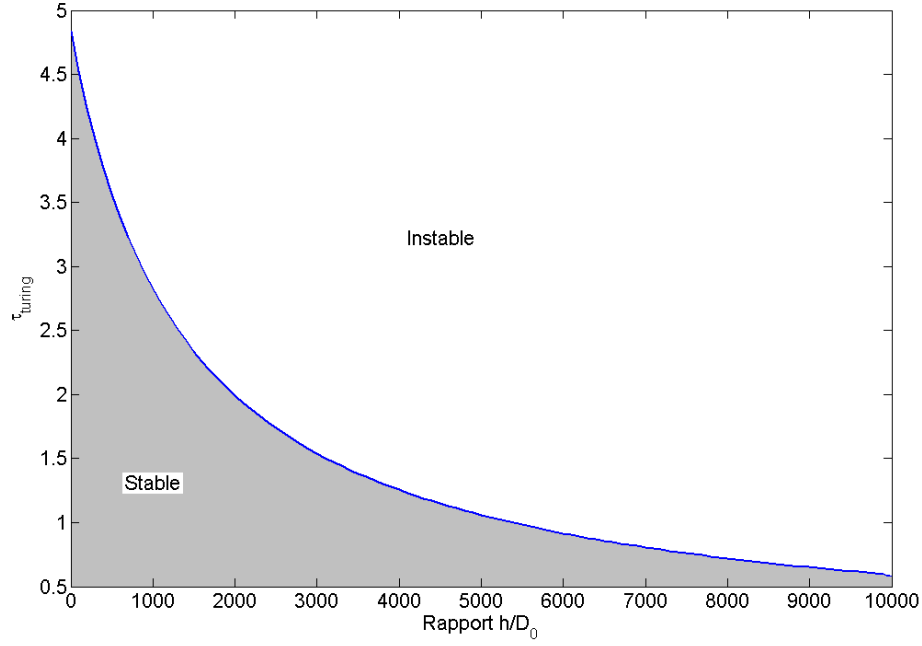


FIG. 4.7.: *Diagramme de bifurcation $\tau_{turing} - h/D_0$.*

Les paramètres normalisés utilisés sont les mêmes que ceux des figures (4.3) et (4.4), exceptés h et D_0 .

Partant d'une distribution bruitée mais quasiment homogène, nous pouvons imaginer intuitivement comment les instabilités apparaissent : si l'haptotaxie est assez grande par rapport à la diffusion, cela favorise localement la concentration de CE, d'où une augmentation locale de la traction cellulaire pouvant induire un processus auto-catalytique assez important pour dépasser la résistance viscoélastique de la MEC.

4.4.2.2. Influence de l'inhibition de contact

Enfin, en étudiant l'influence du paramètre d'inhibition de contact N_2 grâce à la relation (4.9), nous constatons que la réorganisation de la MEC est contrôlée par l'inhibition de la traction cellulaire : la fonction $N_2 \rightarrow \tau_{turing}(N_2)$ est strictement décroissante (Fig. 4.8).

4. Analyse de stabilité linéaire du modèle

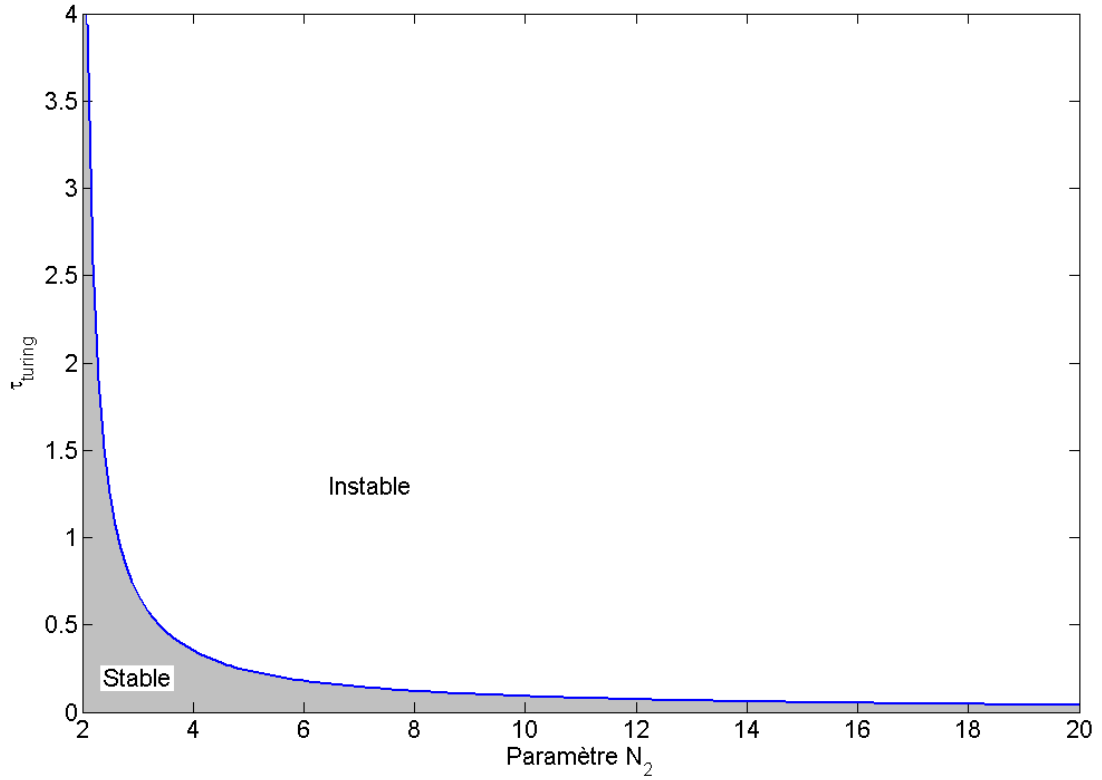


FIG. 4.8.: Diagramme de bifurcation $\tau_{turing} - N_2$.

Les paramètres normalisés utilisés sont les mêmes que ceux des figures (4.3) et (4.4), excepté N_2 .

L'augmentation de l'effet l'inhibition cellulaire (diminution de N_2) fait augmenter le paramètre critique τ_{turing} , rendant ainsi la réorganisation cellulaire et matricielle plus difficile, dans le sens où une traction cellulaire plus grande sera nécessaire pour déstabiliser l'état d'équilibre homogène.

4.5. Conclusion

Nous avons mené, dans ce chapitre, une étude théorique de notre modèle mathématique grâce à une analyse précise des diagrammes de bifurcation. Nous avons interprété l'irrégularité du dépôt des CE sur le biogel comme une perturbation de l'état d'équilibre homogène, pour analyser la stabilité de cet état. Une condition nécessaire et suffisante a alors été déterminée (relation 4.14) pour prédire, a priori, si le système allait retourner vers cet état d'équilibre (état d'équilibre stable) ou si une réorganisation spatiale des CE et de la MEC pouvait avoir lieu (état d'équilibre instable). Cette condition d'instabilité permet de trouver, dans l'espace des paramètres, des sous-ensembles de valeurs pour lesquelles une réorganisation cellulaire et

matricielle peut avoir lieu. En confrontant ces sous-ensembles avec les échelles de valeurs des paramètres mesurées expérimentalement, nous déduisons des jeux de paramètres dont nous nous servons, lors des simulations numériques, pour l'étude du processus d'angiogenèse *in vitro*.

La détermination de cette condition permet également d'analyser l'influence des différents facteurs mécaniques sur la stabilité de l'état d'équilibre, en traçant les diagrammes de bifurcation correspondants (§ 4.4). Nous avons vu que l'influence de la rigidité du biogel sur la condition de bifurcation était conforme à l'intuition : plus le substrat est rigide, plus l'état d'équilibre homogène est stable. De même, les paramètres d'élasticité longue-portée β_1 et β_2 sont des facteurs stabilisant cet état d'équilibre, dans le sens où une plus grande force de traction cellulaire est nécessaire pour réorganiser le milieu quand ceux-ci augmentent.

De même, cette condition permet d'étudier l'influence des caractéristiques cellulaires sur le processus de réorganisation. Nous avons montré que, théoriquement, l'haptotaxie apparaissait comme un moyen d'augmenter la "réactivité" du système CE-MEC pour le processus de formation des pseudo-capillaires : plus l'haptotaxie est grande, plus le seuil d'instabilité pour le paramètre de bifurcation diminue. Plus généralement, la formule (4.9) met en évidence le fait que le rapport $\frac{h}{D_0}$ est un facteur clé de la formation de lacunes.

De plus, l'analyse mathématique développée dans ce chapitre permet de valider qualitativement nos méthodes de résolution numérique, en prédisant le comportement du système selon les valeurs des paramètres (§ 8.3.1). Elle est donc un outil théorique puissant relativement simple de prédiction du comportement du système, et un moyen de vérifier la validité de nos algorithmes numériques.

Cependant, cette méthode comporte des limitations : elle n'est valable, théoriquement, qu'au voisinage de l'état d'équilibre homogène, et ne donne aucun renseignement quantitatif sur les solutions, à l'état stationnaire, dans le cas d'une réorganisation. Ces difficultés seront résolues en partie par une analyse de stabilité non-linéaire, que nous développerons au chapitre (8). Cette analyse de stabilité non-linéaire de l'état d'équilibre homogène permettra de considérer l'apport des termes non-linéaires, et donc d'augmenter le diamètre du voisinage où l'analyse reste valable. De plus, en écrivant le terme de traction au voisinage de la valeur critique par un développement asymptotique en puissances entières d'une perturbation, nous pourrions prédire quantitativement les solutions du système d'EDP dans des cas simples.

Après avoir déterminé des jeux de paramètres, biologiquement réalistes, conduisant à une réorganisation matricielle, nous allons maintenant présenter, dans le chapitre (5), les résultats numériques de notre modélisation.

4. *Analyse de stabilité linéaire du modèle*

5. Simulations du modèle de réorganisation matricielle et cellulaire

Formation de motifs et de pseudo-capillaires *in vitro*

5.1. Introduction

Lors du chapitre 2, nous avons vu que de nombreux facteurs expérimentaux pouvaient réguler le processus d'angiogenèse *in vitro*. Nous nous interrogeons alors, dans ce chapitre, sur la façon dont l'organisation spatiale des CE est contrôlée dynamiquement au sein du gel de fibrine. Pour cela, nous allons présenter les résultats des simulations numériques, obtenus par la méthode des éléments finis (MEF), du comportement dynamique non-linéaire du modèle biomécanique (eq. 3.35).

Notre objectif est de démontrer que les réorganisations cellulaire et matricielle, sans remodelage de la MEC (hypothèse 1, § 3.1), peuvent expliquer, avec des valeurs de paramètres biologiquement réalistes, les résultats expérimentaux obtenus avec des gels de fibrine (chapitre 2). Ces résultats ont montré (Vailhé *et al.* (1997)) que les réseaux de pseudo-capillaires ne pouvaient apparaître que pour certaines valeurs des paramètres du système, la réorganisation du biogel apparaissant alors comme un échafaudage nécessaire à la formation des réseaux de CE. Le modèle sera ainsi validé qualitativement et quantitativement, en faisant varier la concentration des CE initialement déposées et la rigidité du gel, par une comparaison avec les résultats expérimentaux (Vailhé *et al.* (1997); Deroanne *et al.* (2001)). Finalement, nous étudierons les échelles spatiale et temporelle du processus morphogénétique, et l'influence des caractéristiques géométriques, telles que l'épaisseur de la MEC, sur le processus de réorganisation.

5.2. Valeurs des paramètres expérimentaux

Nous avons résumé, dans le tableau (5.1), les valeurs des paramètres liés aux CE et à la MEC, et dans le tableau (5.2) les valeurs des paramètres mécaniques utilisées lors des simulations numériques.

Une attention particulière a été portée à ces valeurs. Elles sont issues de mesures expérimentales sur la quantification des forces de traction (Ferrenq *et al.* (1997); Shreiber *et al.* (2003)), de l'analyse rhéologique des gels de fibrine en fonction de la densité et de l'élasticité du gel (Benkherourou *et al.* (2000)) ou de la littérature. Les sources bibliographiques auxquelles elles font référence sont citées précisément en dernière colonne.

5. Simulations du modèle de réorganisation matricielle et cellulaire

paramètre	valeurs	unités	référence
Diffusion cellulaire D_0	$10^{-9}..10^{-6}$	cm^2/s	DiMilla <i>et al.</i> (1992) Barocas <i>et al.</i> (1995)
Haptotaxie h	$10^{-8}..10^{-5}$	$cm^2/(s.g)$	Dickinson et Tranquillo (1993) Perumpanani et Byrne (1999)
Concentration initiale de CE n_0	$0.5 \times 10^5..5 \times 10^5$	$cell/cm^3$	Delvoye <i>et al.</i> (1991); Vailhé <i>et al.</i> (1997) Murray <i>et al.</i> (1998)
Densité initiale de gel ρ_0	0.5..8	mg/cm^3	Delvoye <i>et al.</i> (1991); Vernon <i>et al.</i> (1992) Vailhé <i>et al.</i> (1997)
Inhibition de contact N_2	$2 \times 10^5 - 2 \times 10^6$	$cell/cm^3$	Ferrenq <i>et al.</i> (1997) Tranqui et Tracqui (2000)

TAB. 5.1.: Valeurs des paramètres cellulaires.

paramètres	valeurs	unités	référence
Module de Young E	$10^3..10^4$	Pa	Benkherourou <i>et al.</i> (2000)
Coefficient de Poisson ν	0.15..0.25	—	Scherer <i>et al.</i> (1991) Shreiber <i>et al.</i> (2003)
Viscosité de cisaillement μ_1	$10^5..10^8$	$Pa.s$	Barocas et Tranquillo (1997)
Viscosité de dilatation volumique μ_2	$10^5..10^8$	$Pa.s$	Murray <i>et al.</i> (1998) Holmes et Sleeman (2000)
Force de traction cellulaire τ	$10^{-9}..10^{-5}$	$Pa.cm^9/(g.cell^2)$	Tranquillo <i>et al.</i> (1992) ($\tau = 0.001 \text{ dyne.cm}^4/(mg.cell)$) Ferrenq <i>et al.</i> (1997) Shreiber <i>et al.</i> (2003) ($\tau = 0.015 \text{ dyne.cm/cell}$)

TAB. 5.2.: Valeurs des paramètres mécaniques.

5.3. Paramètres de la résolution numérique par la méthode des éléments finis

Nous avons résolu le système d'EDP (eq. 3.35) par la méthode des éléments finis (MEF), avec le logiciel Femlab[®] (Comsol, France) sur un ordinateur personnel (PC) Pentium IV et sur la grappe de calcul intensif BioImage (projet CIMENT : 20 PC biprocesseurs avec 3Go de RAM chacun). Nous avons utilisé pour le domaine carré 2D un maillage constitué de 1000 noeuds et de 2500 éléments triangulaires. L'intégration numérique de la formulation dépendante du temps a été résolue par les algorithmes de résolution à plusieurs pas *ode15s* de Matlab[®] et *fdaspk* de Femlab[®]. La conservation totale des CE et de la MEC, due aux conditions aux limites et aux équations de conservation (eq. 3.25 et eq. 3.26 sous l'hypothèse 1, paragraphe 3.1), a été contrôlée pour s'assurer de la stabilité et de la précision de nos méthodes numériques.

Des détails plus précis sur la MEF ainsi qu'une validation qualitative et quantitative de nos algorithmes de résolution numérique sont présentés en partie Méthodologie, chapitre (8).

5.4. Régulation de l'angiogenèse *in vitro*

5.4.1. Aspects qualitatif de formation des lacunes

Les simulations du comportement dynamique du modèle ont été effectuées pour différents jeux de paramètres pris dans le domaine d'instabilité défini par la relation (4.14).

5.4.1.1. Auto-organisation du milieu tissulaire et cellulaire

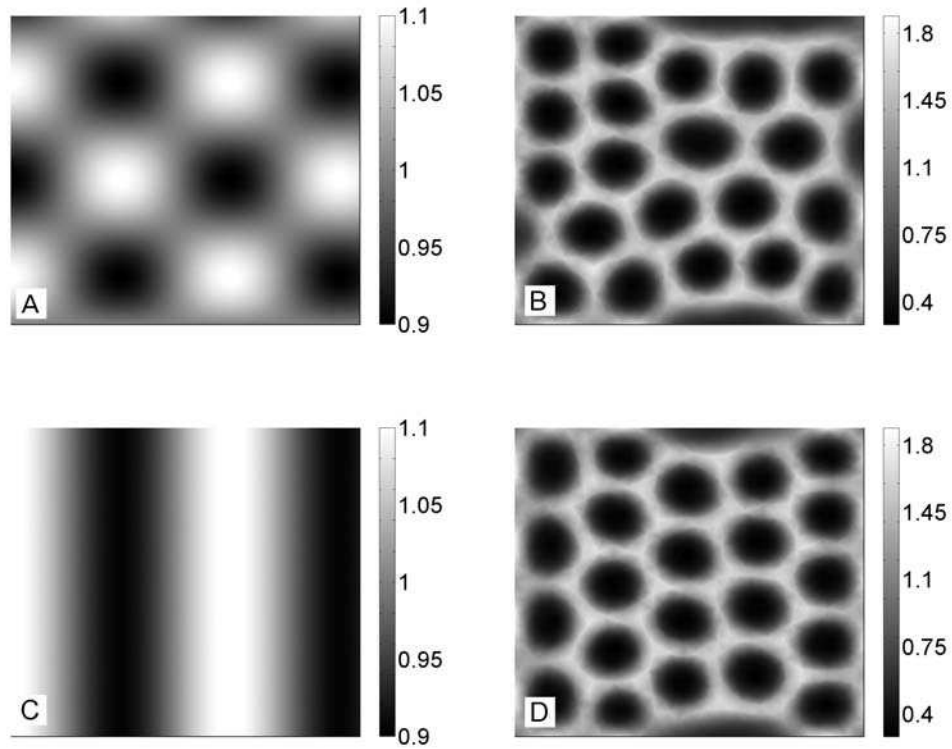


FIG. 5.1.: États stationnaires à partir de différentes distributions spatiales initiales. Motifs spatiaux obtenus à l'état stationnaire (B, D), à partir d'une même quantité de CE, répartie spatialement en "pic" (A) ou en "bande" (C). Les paramètres normalisés utilisés valent : $\tau = 3.41$, $\lambda = 0.15$, $\mu = 0.23$, $\mu_1 = \mu_2 = 0.003$, $\beta_1 = \beta_2 = 0.01$, $D_0 = 8 \cdot 10^{-6}$, $h = 4 \cdot 10^{-5}$, $N_2 = 2.72$, $s = 8800$. L'échelle de gris correspond à la densité normalisée de MEC.

Les simulations préliminaires (Fig. 5.1) montrent la robustesse de la réorganisation de la MEC vis-à-vis de la forme spatiale de la condition initiale des CE. En effet, l'analyse de stabilité

5. Simulations du modèle de réorganisation matricielle et cellulaire

linéaire ne pouvait pas prédire quel(s) mode(s) allait(en)t prédominer dans la gamme des modes propres instables. Nous avons simulé numériquement le modèle (eq. 3.35) pour différentes formes spatiales des conditions initiales des variables du modèle (en conservant cependant la même quantité globale de matière de chaque variable), les autres paramètres étant identiques. La figure (5.1) montre des états stationnaires similaires obtenus à partir d'une distribution initiale des CE en "pic" ou en "bande", la densité initiale de MEC étant spatialement homogène.

La réorganisation de la MEC n'est donc pas une amplification d'un "bruit initial", mais est la résultante des propriétés d'auto-organisation du milieu composé des CE et de la MEC.

5.4.1.2. Influence des lignes de tension créées par les CE sur leur comportement migratoire

En analyse préliminaire aux résultats du modèle, nous cherchons à quantifier, indépendamment de la modélisation globale, l'influence des déformations subies par le milieu dans la modélisation de la diffusion cellulaire (§ 3.2.3).

Pour montrer les différences de comportement migratoire en fonction du type de diffusion considéré (isotrope ou dépendante des déformations mécaniques locales), nous avons simulé la migration cellulaire sur un milieu élastique, précontraint par une extension uniaxiale, dans ces deux cas.

La figure (5.2) montre qu'il existe un biais directionnel significatif dans la migration cellulaire lorsque la diffusion cellulaire est dépendante des effets mécaniques : les cellules diffusent plus vite dans la direction des dilatations les plus grandes (Fig. 5.3, b), avec un rapport moyen entre les coefficients de diffusion dans les directions horizontale et verticale ($\frac{D_{11}(\epsilon)}{D_{22}(\epsilon)}$) de l'ordre de 1.4.

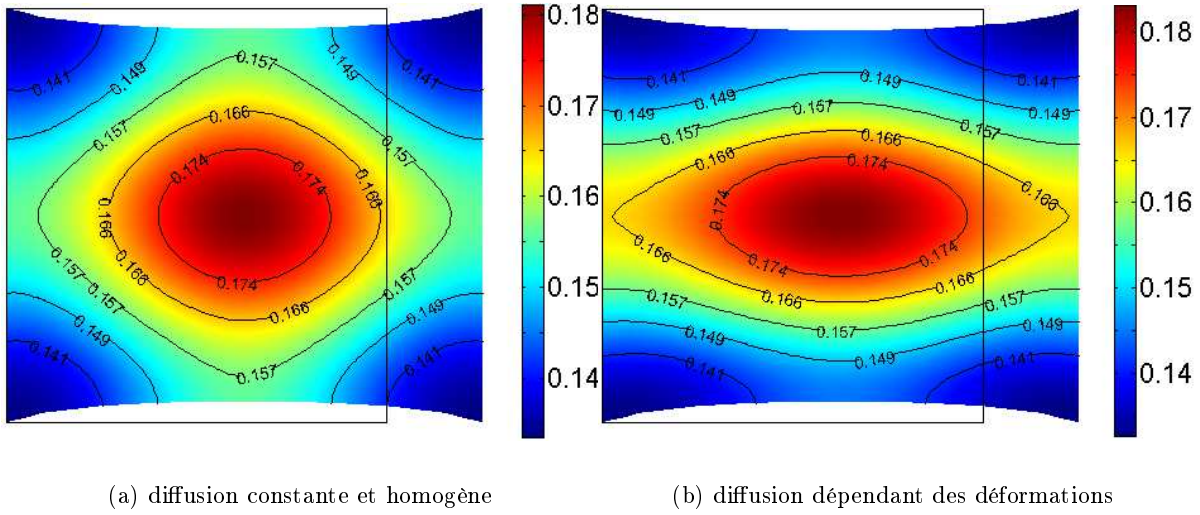


FIG. 5.2.: *Influence des déformations sur la migration cellulaire*

La diffusion des cellules sur le milieu élastique précontraint obéit soit à la loi de Fick, avec un coefficient de diffusion homogène et constant (a), soit est contrôlée par le tenseur de diffusion dépendant des déformations locales $\mathbf{D}(\epsilon)$ (b) défini précédemment dans le texte (formulation 3.33). Le champ des contraintes mécaniques subies par le milieu est généré par un étirement uniaxial. Il est cartographié sur la figure (5.3). L'échelle de couleurs correspond à la concentration normalisée de cellules.

5. Simulations du modèle de réorganisation matricielle et cellulaire

L'influence de la mécanique sur la migration cellulaire est clairement visible, dans ce contexte, en comparant les figures (5.2, a) et (5.2, b).

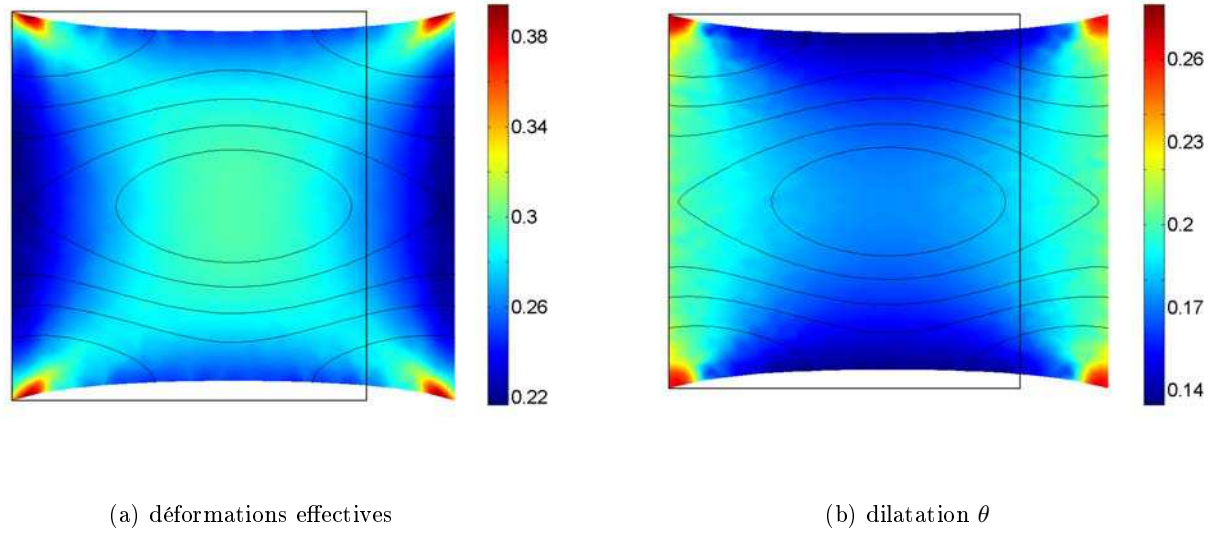


FIG. 5.3.: *Champs de déformations dans un gel précontraint.*

L'étirement uniaxial du milieu élastique génère un champ de déformations (a) et une dilatation hétérogène du milieu (b). Dans ces deux figures, les iso-contours de la concentration cellulaire de diffusion anisotrope ont été superposés à la carte des déformations effectives (a) ou à la valeur de la dilatation θ (b). Les déformations effectives sont calculées par la formule (7.13)

Le comportement simulé de cette population cellulaire peut être comparé aux résultats expérimentaux obtenus par Korff et Augustin (1999) lors d'analyse de la migration cellulaire sur des gels précontraints. Pour cela, nous avons calculé l'indice directionnel des cellules, défini comme le rapport grand axe/petit axe de l'ellipsoïde défini par l'iso-niveau de concentration cellulaire 0.174 cell/cm^3 (cf Fig. 5.2). Cette figure montre un très bon accord avec l'indice mesuré expérimentalement.

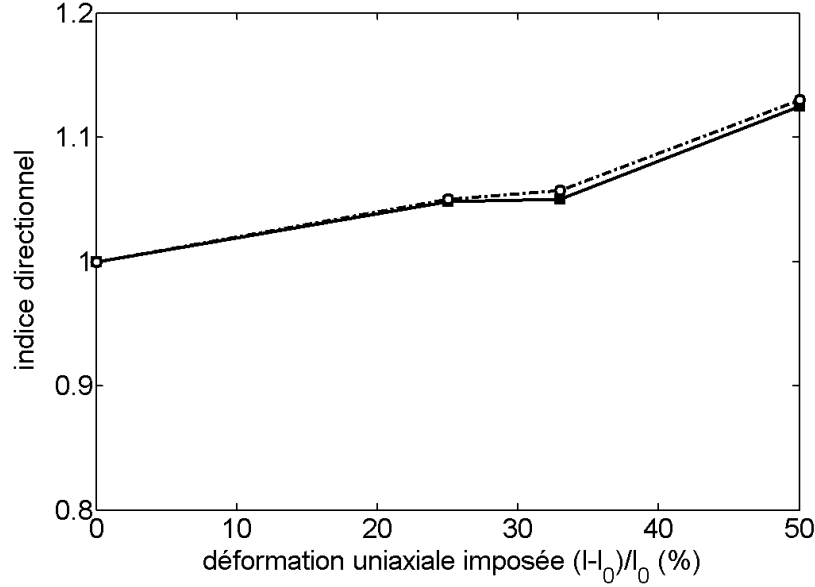


FIG. 5.4.: Comparaison de l'indice directionnel.

Comparaison entre l'indice expérimental (courbe en pointillés, d'après Korff et Augustin (1999)) et théorique (trait plein, obtenu par la mesure des iso-contours de la figure 5.2) dans le cas d'une diffusion cellulaire dépendant des déformations locales d'un milieu élastique précontraint. l_0 et l sont, respectivement, les longueurs initiale et déformée de l'échantillon de tissu.

Cependant, nous pouvons nous demander si cette dépendance de la diffusion vis-à-vis des déformations locales reste significative lorsqu'elle est replacée dans le contexte global de migration cellulaire définie par notre modèle (§ 3.2.3). Nous avons alors simulé le modèle complet (eq. 3.35) avec une diffusion homogène et constante (Fig. 5.5, a) ou dépendante des effets mécaniques (Fig. 5.5, b).

D'après la figure (5.5), il apparaît clairement que, sous des conditions conduisant à la réorganisation de la MEC, l'influence du champ de déformation dans la modélisation de la diffusion cellulaire ne modifie pas qualitativement le processus de réorganisation cellulaire. Cela peut s'expliquer en mesurant le rapport moyen entre les coefficients de diffusion, défini précédemment, qui est ici de l'ordre de 1.01. Le champ des déformations locales de la MEC apparaît donc trop faible pour influencer quantitativement la diffusion cellulaire. Toutefois, la géométrie des lacunes semblent être plus précise dans le cas où la diffusion dépend des déformations, avec

5. Simulations du modèle de réorganisation matricielle et cellulaire

des valeurs de concentrations cellulaires plus importantes le long des cordons formés par les CE. Des conclusions similaires ont été obtenues avec des modèles d'angiogenèse *in vitro* où la diffusion cellulaire n'était pas compensée par une migration haptotactique (Manoussaki *et al.* (1996); Murray *et al.* (1998)).

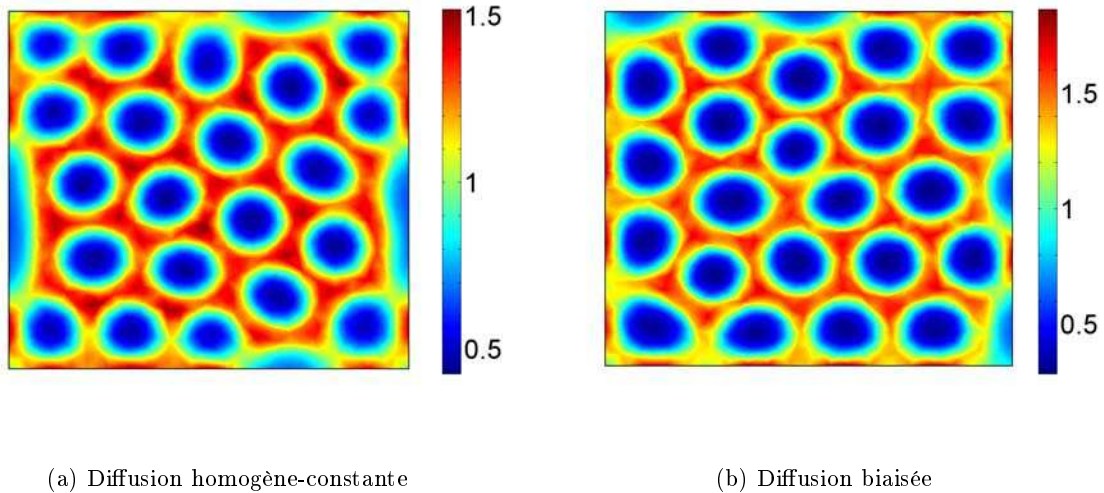


FIG. 5.5.: *Comparaison de l'influence de la diffusion sur les motifs spatiaux à l'état stationnaire, avec une diffusion constante et homogène (a), ou dépendante des déformations (b). Les paramètres normalisés utilisés dans ces simulations sont ceux de la figure (5.1). L'échelle de couleur correspond à la concentration normalisée de CE.*

Pour ces raisons, faire dépendre la diffusion cellulaire des déformations mécaniques locales du milieu ne nous apparaît pas être un facteur clef pour le processus d'angiogenèse *in vitro*.

5.4.2. Comparaison avec les expériences *in vitro*

5.4.2.1. Dynamique de formation des lacunes

Selon la lignée cellulaire et la concentration de fibrine utilisées, de grands écarts dans les échelles temporelles ont été rapportés dans la littérature pour la formation *in vitro* de réseaux de pseudo-capillaires (Vernon *et al.* (1992); Vailhé *et al.* (1998, 2001)). Pour des cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humain (HUVEC), mises en culture sur des gels de fibrine, les lacunes apparaissent en moins de 2 heures, et la formation du réseau vasculaire est terminée en 24 heures avec des tailles de lacune variant de 0.2 mm à 1.5 mm. Pour des cellules endothéliales de rétine de bœuf (BRECE), 46 heures sont nécessaires pour observer la formation d'un réseau de pseudo-capillaires.

Grâce à notre analyse théorique, nous avons réussi à isoler des jeux de paramètres, biologiquement réalistes, qui conduisent à des simulations numériques dont les échelles temporelles et spatiales sont en accord avec celles trouvées expérimentalement. Les lacunes simulées apparaissent en moins de 12 heures avec une morphologie et une organisation semblable à celles observées expérimentalement (Fig. 5.6).

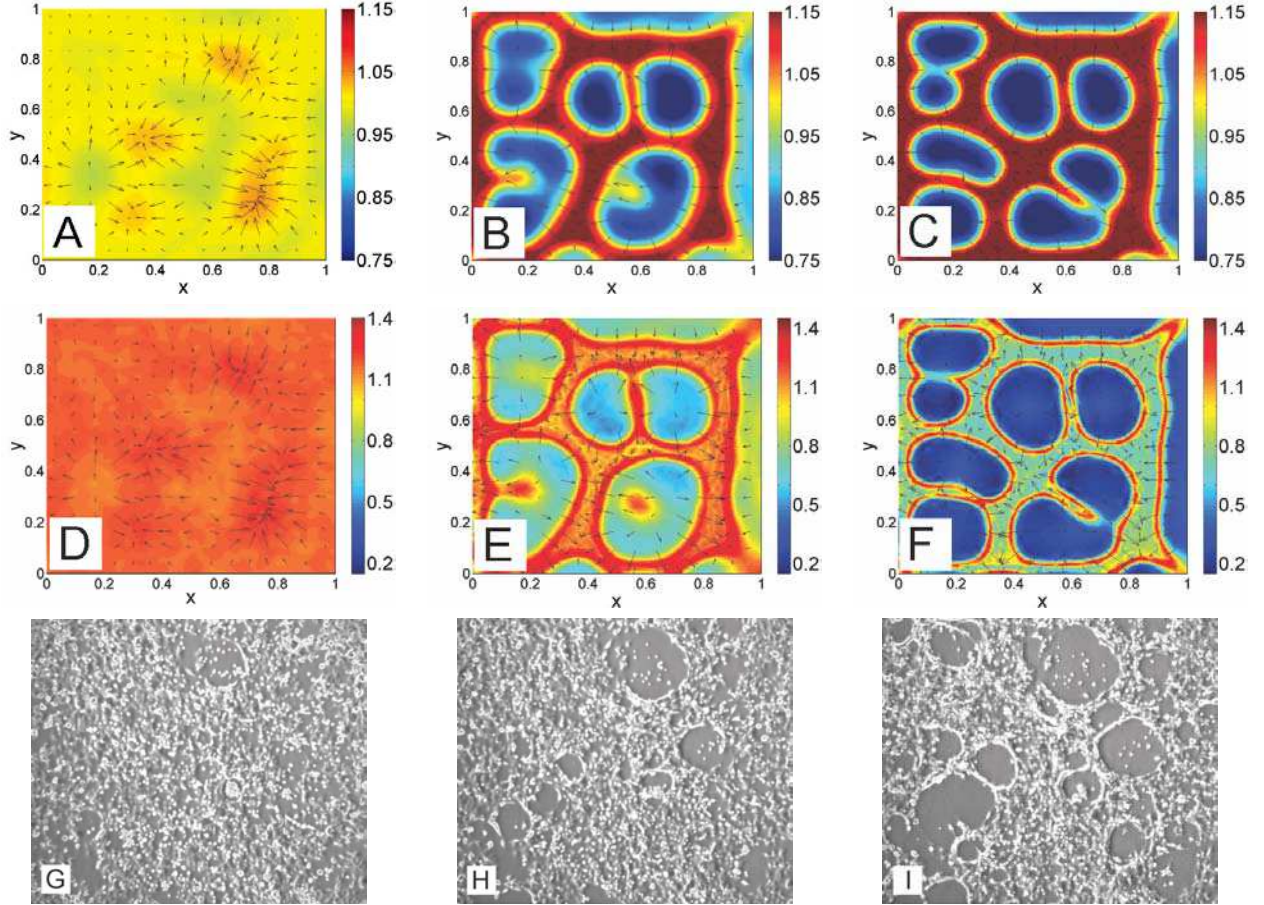


FIG. 5.6.: *Dynamique de formation des lacunes.*

Comparaison entre les morphologies de la MEC simulées numériquement (A, B, C) et celles observées expérimentalement (G, H, I), respectivement aux temps 11 heures, 26 heures et 35 heures. A chacun de ces temps, la carte des contraintes de von Mises σ_{vm} (formule 7.12) dans la MEC est représentée (D, E, F). Les flèches superposées indiquent la direction et l'amplitude du vecteur déplacement local. Les paramètres (normalisés) utilisés pour cette simulation sont : $\tau = 1.35$, $\lambda = 0.15$, $\mu = 0.49$, $\mu_1 = \mu_2 = 0.03$, $\beta_1 = \beta_2 = 0.003$, $D_0 = 4 \times 10^{-5}$, $h = 4 \times 10^{-4}$, $N_2 = 2.5$, $s = 200$. Les échelles des figures (A, B, C) correspondent à la densité normalisée de MEC, et celles des figures (D, E, F) aux contraintes de von Mises.

Nous constatons que, dans un premier temps, les cellules se regroupent (Fig. 5.6, A). Ensuite,

5. Simulations du modèle de réorganisation matricielle et cellulaire

des lacunes apparaissent (zones bleues de la figure 5.6, B) pour finalement avoir un contour plus précisément défini (figure 5.6, C). Les flèches montrent que la MEC s'accumule sur le bord des lacunes, aux endroits où les contraintes dans la MEC sont les plus importantes (figure 5.6, F).

Grâce à la relation entre l'épaisseur du gel et la densité matricielle (eq. 3.29), nous pouvons déduire des simulations précédentes l'évolution dynamique de la formation de lacunes (Fig. 5.7).

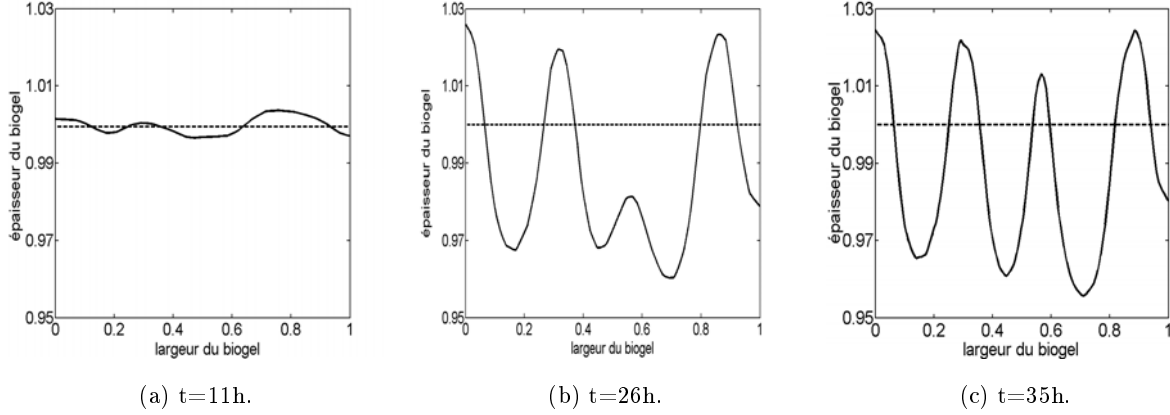


FIG. 5.7.: *Dynamique de l'épaisseur de la MEC.*

Au cours du temps, les lacunes deviennent de plus en plus profondes. Les variations de l'épaisseur de la MEC ont été calculées par la formule (3.29), le long d'une coupe $y = 0.7$ des simulations présentées figure (5.6, A, B, C), aux temps 11 heures, 26 heures et 35 heures.

Nous constatons, après une courte période de transition, l'apparition de lacunes et leur augmentation en nombre dans la MEC.

Après ces premières étapes de validation qualitative de la formulation de notre modèle, où nous avons montré que le comportement des simulations était en accord avec celui observé expérimentalement, nous allons maintenant comparer quantitativement les propriétés du modèle avec un plus large panel de résultats expérimentaux. Pour cela, nous allons considérer plusieurs paramètres de bifurcation pouvant être la cause de l'instabilité mécanique conduisant à la formation du réseaux de pseudo-capillaires.

5.4.2.2. Seuil critique de la concentration des CE

Grâce à l'analyse de stabilité linéaire (chapitre 4), nous pouvons prédire, pour des caractéristiques rhéologiques du biogel données, la concentration de CE nécessaire pour pouvoir observer la formation de lacunes. La valeur critique τ_{turing} , pour le paramètre de bifurcation τ , s'écrit en fonction de n_0 :

$$\tau_{turing} = \frac{\lambda + 2\mu + 2\sqrt{s(2\mu\beta_1 + \lambda\beta_2)}}{\left(\frac{3\widehat{N}_2}{2n_0} - 2\right) + \frac{h}{D_0} \left(\frac{\widehat{N}_2}{n_0} - 2\right)}$$

où $\widehat{N}_2$ est la valeur "redimensionnée" du paramètre d'inhibition de contact (eq. 3.34).

Nous comprenons bien intuitivement comment la quantité globale de CE peut réguler le processus : pour de faibles valeurs de concentration de CE, la traction cellulaire est trop faible pour initier le processus de réorganisation, tandis que le phénomène d'inhibition de contact (§3.2.2.1) empêche l'amplification des contraintes mécaniques locales due aux forces de traction cellulaire pour des concentrations de cellules élevées.

Pour quantifier l'extension du réseau cellulaire et la réorganisation associée de la MEC, nous définissons un indice de formation des lacunes, ind_{lac} , par :

$$ind_{lac} = \int_{\Omega} \delta(\rho(x, y) > 1) ds \quad (5.1)$$

où $\delta(.) = 1$ si la condition sur la densité locale de MEC est satisfaite, zéro sinon. Physiquement, cet indice mesure l'aire des régions où la MEC s'est accumulée depuis le début de la simulation. Il fournit donc une estimation quantitative de la taille du réseau de pseudo-capillaires, conformément à l'indice expérimental utilisé par Vailhé *et al.* (1997).

Nous avons alors mesuré cet indice lors de simulation avec différentes valeurs de quantité globale de CE. La figure (5.8) montre que les résultats de notre modélisation sont en bon accord, à la fois avec les prédictions théoriques, et avec les résultats expérimentaux : les forces mécaniques déclenchant le processus de réorganisation ne peuvent pas se développer si le nombre des CE déposées est trop faible ou trop élevé (*cf* Table 5.3).

5. Simulations du modèle de réorganisation matricielle et cellulaire

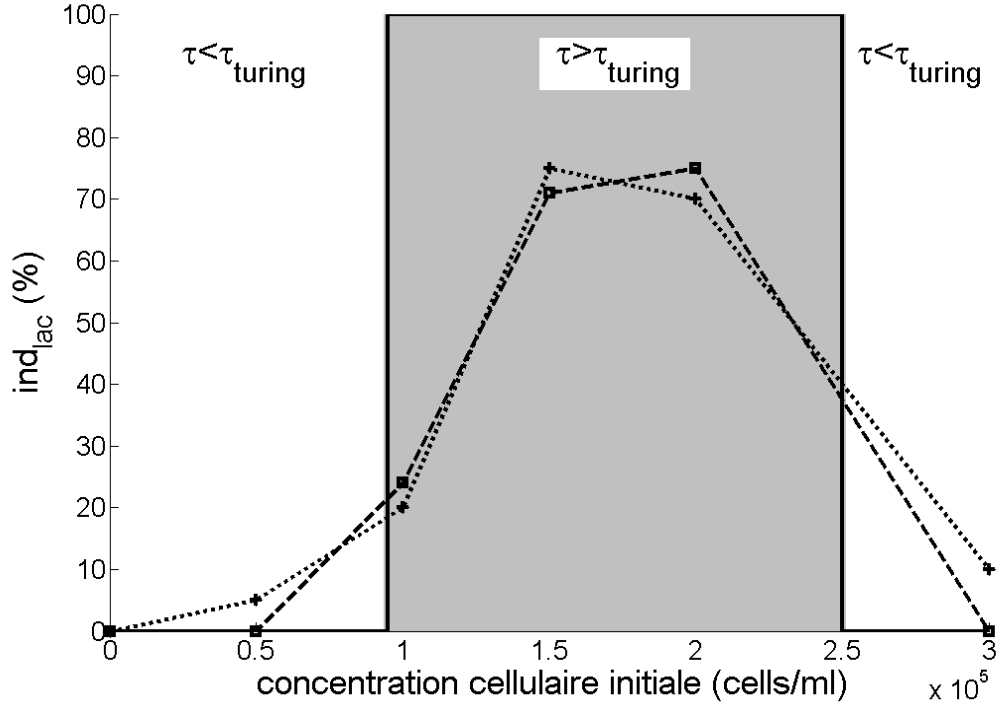


FIG. 5.8.: Influence de la concentration initiale de CE.

Le domaine grisé représente la fenêtre d'instabilité prévue par l'analyse linéaire (condition 4.14), la courbe en pointillé (...) est l'indice expérimental mesuré par Vailhé et al. (1997), la courbe en trait discontinu (---) est l'indice de formation des lacunes, calculé à partir des simulations numériques selon la formule (5.1). Les paramètres normalisés utilisés sont $\tau = 1.53 \times 10^{-11} n_0^2$, $\lambda = 1.54$, $\mu = 2.31$, $\mu_1 = \mu_2 = 0.308$, $\beta_1 = \beta_2 = 0.0001$, $N_2 = 6.58 \times 10^5 / n_0$, $D_0 = 4 \times 10^{-7}$, $h = 4 \times 10^{-6}$, $s = 800$.

Un très bon accord est obtenu entre les résultats de l'analyse de bifurcation, les simulations numériques et les mesures expérimentales.

De plus, il est intéressant de constater que les variations de concentration initiale de CE peuvent donner lieu à de nombreux motifs spatiaux de réseaux cellulaires : sur la figure (5.9, a), les CE ne se réorganisent pas en pseudo-capillaires. Les cordons de CE sont isolés sur la figure (5.9, b), tandis que la figure (5.9, c) pourrait s'interpréter comme la formation d'anastomoses fréquemment observées lors de l'angiogenèse. Dans les quatre figures (Fig. 5.9) proposées, seule la figure (5.9, d) présente un réseau cellulaire supérieur au seuil de percolation (Gamba *et al.* (2003)). Cette organisation spatiale correspondrait à un réseau fonctionnel de pseudo-capillaires, où les échanges de fluides (sanguin par exemple) serait possible d'une frontière du domaine à son opposée.

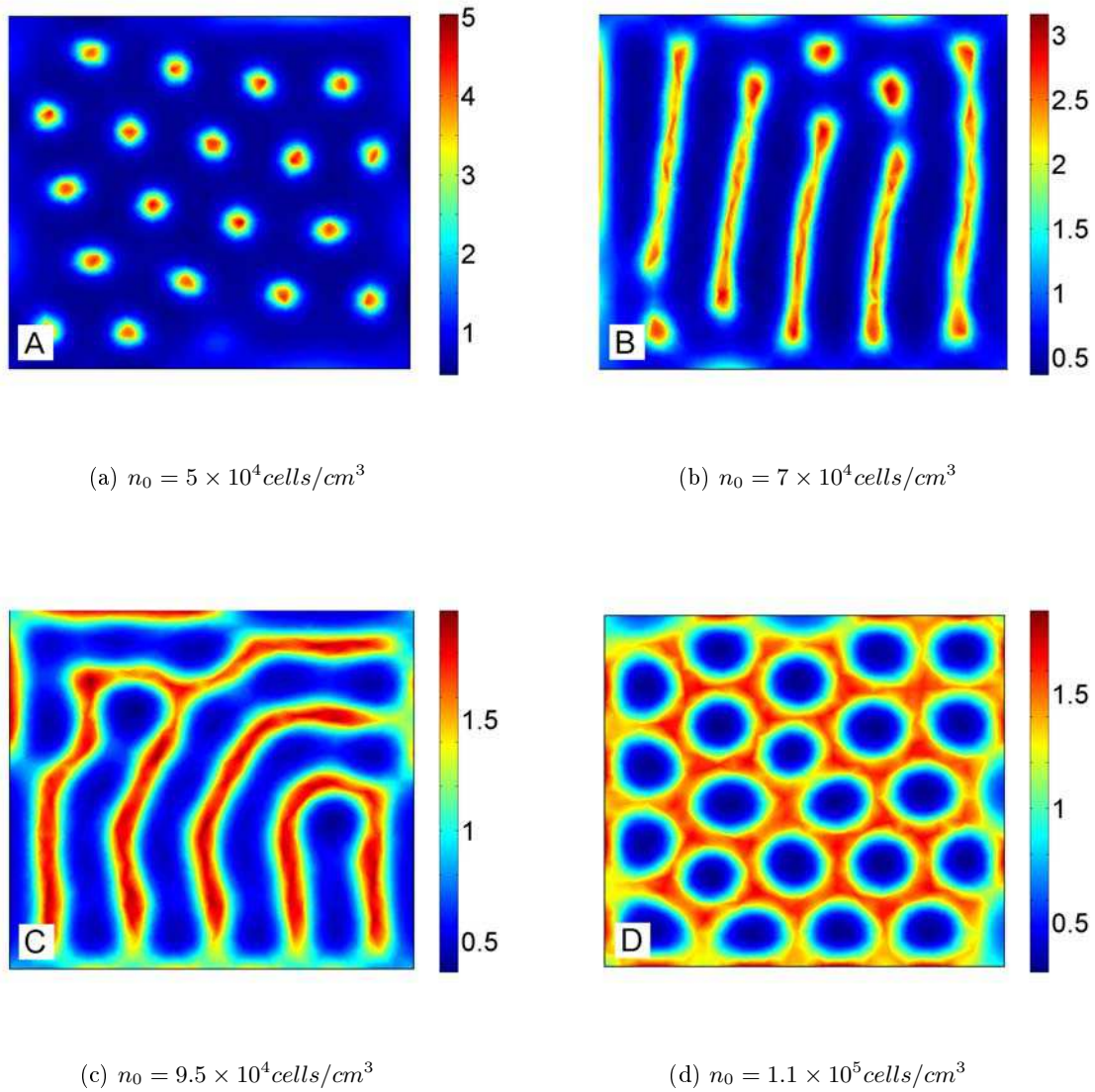


FIG. 5.9.: Différents motifs spatiaux à l'état stationnaire en fonction de la concentration initiale de CE.

Ces réseaux de CE ont été obtenus à partir de différentes quantités initiales de cellules, précisée sous les figures. L'échelle de couleur représente la concentration normalisée de CE. Les paramètres utilisés pour ces simulations sont ceux de la figure (5.1), exceptés ceux qui dépendent de n_0 . Nous pouvons constater que le motif de la figure (D) correspond au mode (9,5)

Plus généralement, ces simulations nous donnent des pistes théoriques pour comprendre comment, par la suite, la prolifération cellulaire peut contrôler la fonctionnalité du réseau cellulaire en augmentant la quantité globale de CE.

5.4.2.3. Seuil critique de la densité de fibrine

Nous utilisons une approche de même type que celle développée précédemment pour analyser l'influence de la quantité globale de MEC initialement présente sur le processus de réorganisation. En effet, Vailhé *et al.* (1997, 1998) ont montré que la densité de fibrine était un paramètre critique des expériences d'angiogenèse *in vitro* (cf § 2.3.4.2) car cela influait sur la rigidité du biogel. Des résultats similaires ont été obtenus par Deroanne *et al.* (2001) en modifiant la rigidité d'autres types de MEC, tels le MatrigelTM ou le collagène de type I. Nous avons alors pris en compte les résultats de ces expériences et les travaux de modélisation de la rhéologie des gels de fibrine par Benkherourou *et al.* (2000) pour obtenir une estimation du module de Young E des biogels en fonction de la densité de fibrine. Nous faisons varier la densité de fibrine dans l'intervalle des mesures expérimentales effectuées par Vailhé *et al.* (1997).

Comme dans la partie (5.4.2.2), nous mesurons l'indice de formation du réseau (formule 5.1) associé à la réorganisation de la MEC. La comparaison entre la théorie, les valeurs calculées numériquement et celles expérimentales rapportées dans Vailhé *et al.* (1997) est présentée figure (5.10).

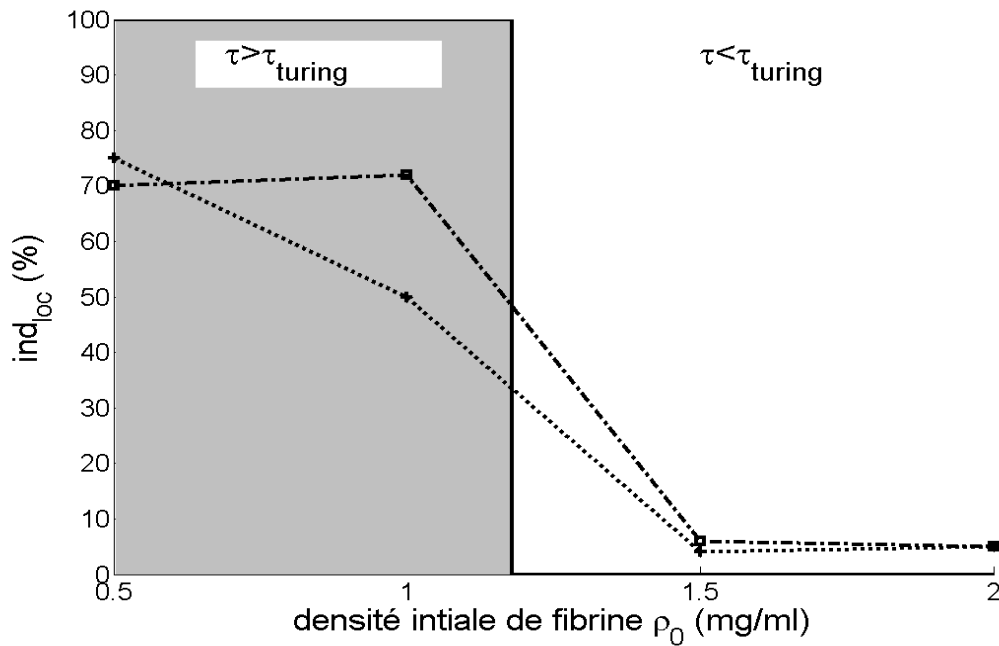


FIG. 5.10.: Influence de la densité initiale de MEC, et donc de la rigidité de la MEC, sur la formation du réseau.

Le domaine grisé représente la fenêtre d'instabilité prévue par l'analyse linéaire (condition 4.14), la courbe en pointillés (...) est l'indice expérimental mesuré par Vailhé *et al.* (1997), la courbe en trait discontinu (---) est l'indice calculé à partir des simulations numériques selon la formule (5.1). Les paramètres normalisés utilisés sont : $\tau = 1.3$, $\lambda = 115740 \rho_0^2$, $\mu = 231480 \rho_0^2$, $\mu_1 = \mu_2 = 154 \rho_0$, $h = 0.04 \rho_0$, $\beta_1 = \beta_2 = 0.003$, $D_0 = 8 \times 10^{-6}$, $N_2 = 2.5$, $s = 8800$.

Comme lors de la figure (5.8), un bon accord est obtenu entre les simulations numériques et les résultats expérimentaux.

La prédiction des domaines de densité de fibrine pour lesquels la formation de pseudo-capillaires a lieu est précise et correspond aux valeurs expérimentales. Nous résumons ces comparaisons entre les résultats théoriques/numériques et expérimentaux dans le tableau (5.3).

Paramètre critique	Unités	Valeur théorique	Valeur exp.	Fig.
n_0 (apparition de lacune)	$cells/cm^3$	0.95×10^5	$0.5 \times 10^5 < .. < 10^5$	(5.8)
n_0 (absence de lacune)	$cells/cm^3$	2.5×10^5	$2 \times 10^5 < .. < 3 \times 10^5$	(5.8)
ρ_0 (absence de lacune)	mg/cm^3	1.35	$1 < .. < 1.5$	(5.10)

TAB. 5.3.: Comparaisons quantitatives, entre l'expérience et le modèle, des valeurs des paramètres critiques.

Cette table montre que l'instabilité de Turing, observée dans les expériences, peut être prédite par le modèle avec des paramètres biologiquement réalistes.

5.4.2.4. Influence de la variation d'épaisseur du gel

Dans les parties précédentes, nous avons étudié l'influence des paramètres intrinsèques du modèle, qu'ils définissent les interactions mécaniques entre les CE et la MEC ou qu'ils caractérisent le comportement migratoire cellulaire. Nous analysons, à présent, l'influence de paramètres externes comme ceux définis par les conditions aux limites sur le biogel. Il est bien connu que les conditions aux limites peuvent changer radicalement le comportement mécanique des cellules, comme l'a montré, par exemple, Shreiber *et al.* (2001) lors de la contraction d'un gel de collagène par des cellules : un étalement cellulaire significatif est observé, ainsi que des forces de traction cellulaires, lorsque le bord de la MEC est fixé, ce qui n'est pas le cas lorsque le bord est libre de bouger.

Nous allons donc étudier si l'effet d'attachement du gel à la boîte de Petri, sur sa face inférieure, peut influencer sur la dynamique et sur la morphologie de la réorganisation de la MEC. Cela pourrait être un moyen de contrôler, pour des valeurs intrinsèques données du module d'élasticité, la réponse mécanique de la MEC aux contraintes mécaniques cellulaires.

Dans la formulation de notre modèle, une force volumique de rappel élastique, dont l'amplitude est décroissante selon l'épaisseur du gel, est utilisée pour décrire la contrainte supplémentaire de cisaillement induite par cette condition aux limites (§ 3.2.5). Nous allons valider cette formulation en faisant référence aux travaux expérimentaux de Vernon *et al.* (1992), décrits au chapitre (2), qui ont montré l'influence d'un gradient d'épaisseur de la MEC sur la formation du réseau cellulaire. Comme lors de ces travaux, nous considérons deux types de gradients d'épaisseur de la MEC : le premier avec une pente de 8% sur un domaine rectangulaire de taille $3.75\text{ mm} \times 1.5\text{ mm}$, le deuxième avec une pente de 2% sur un domaine rectangulaire de taille $15\text{ mm} \times 1.5\text{ mm}$.

L'organisation spatiale simulée des réseaux cellulaires correspondant à ces deux gradients d'épaisseur est montrée figure (5.11, a, b). Nous avons également rappelé les résultats expérimentaux obtenus par Vernon *et al.* (1992) avec les cellules d'aorte de bœuf, cultivées sur un gel

5. Simulations du modèle de réorganisation matricielle et cellulaire

d'un gradient d'épaisseur de 2.8% (Fig. 5.11, c).

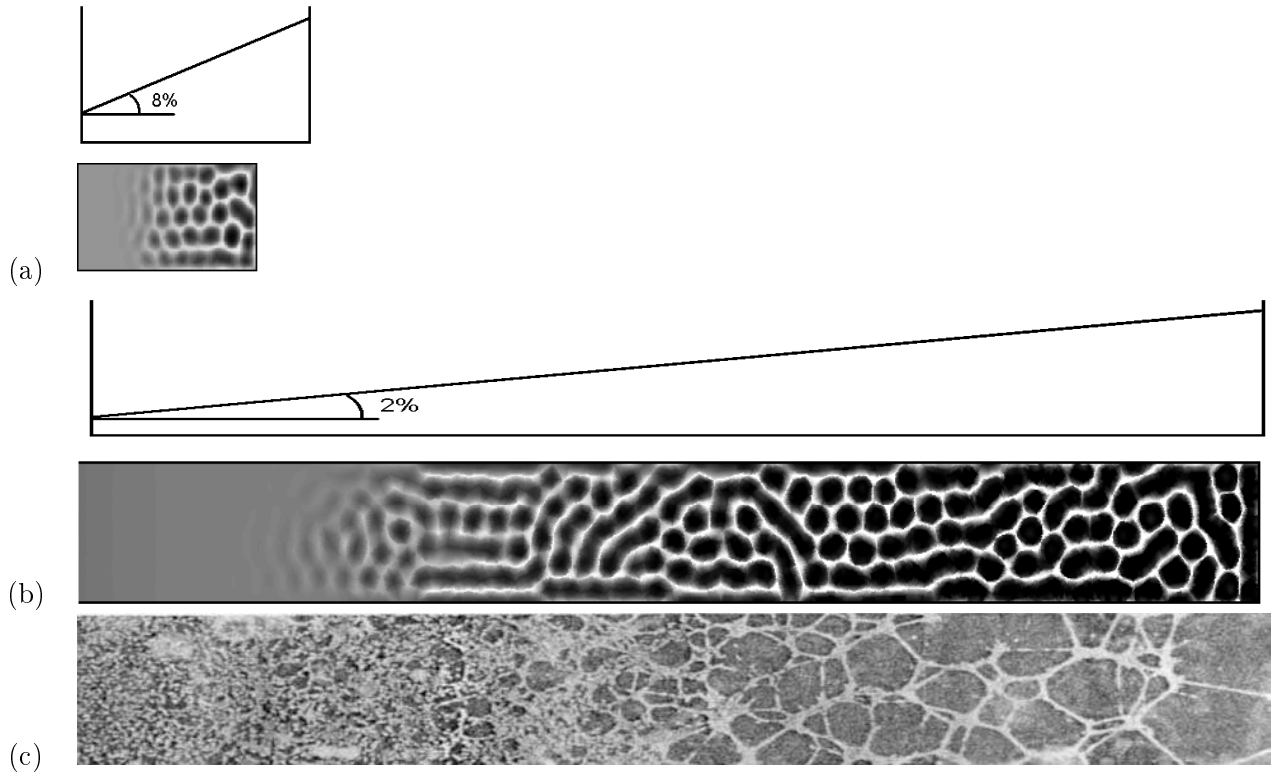


FIG. 5.11.: Influence d'un gradient d'épaisseur de la MEC sur le réseau de CE. Comparaison de l'influence d'un gradient de 8% (a) et celle d'un gradient plus faible (2%, Fig. b) avec les résultats expérimentaux obtenus par Vernon et al. (1992) avec un gradient d'épaisseur (2.8%, Fig. c). Les zones claires correspondent aux grandes densités de la MEC, tandis que les zones sombres représentent les densités les plus faibles. Les paramètres normalisés utilisés pour les simulations sont : $\tau = 2.82$, $\lambda = 0.15$, $\mu = 0.23$, $\mu_1 = \mu_2 = 0.3$, $\beta_1 = \beta_2 = 0.01$, $D_0 = 8 \times 10^{-6}$, $h = 4 \times 10^{-4}$, $N_2 = 3$, $s = 8800$.

Ces réorganisations cellulaires simulées reproduisent assez fidèlement les observations expérimentales de Vernon *et al.* (1992), rappelée figure (5.11, c) :

- les lacunes sont plus nombreuses et plus grandes en surface, là où la MEC est la plus épaisse.
- la transition entre une distribution quasi-homogène de cellulaire à la surface du biogel (Fig. 5.11, a, b, à gauche) et les réseaux de cellules (Fig. 5.11, a, b, à droite) se fait plus brutalement lorsque le gradient d'épaisseur est le plus important.

Ces résultats s'expliquent par la diminution, à la surface du gel, de l'influence de la condition d'attachement à la face inférieure de la boîte de Petri lorsque l'épaisseur du biogel augmente.

5.5. Conclusion

Nous avons présenté, dans ce chapitre, les résultats des simulations numériques, obtenues par la MEF, de notre modélisation biomécanique de l'angiogenèse *in vitro*. L'objectif est de comprendre comment les forces de traction cellulaire peuvent engendrer une instabilité mécanique pour initier le processus d'angiogenèse *in vitro*. Cette analyse a été menée en lien étroit avec les résultats expérimentaux obtenus avec des gels de fibrine et différentes lignées cellulaires (HUVEC, EAhy926) (Vailhé *et al.* (1997, 1998)).

Les diagrammes de bifurcations, construits au chapitre (4), nous ont permis de prédire les seuils (et donc les domaines de valeurs) des paramètres expérimentaux pour lesquels des lacunes et des réseaux de pseudo-capillaires peuvent apparaître. Considérant les domaines d'instabilité ainsi définies, nous avons simulé, pour des valeurs de paramètres biologiquement réalistes (Tableaux 5.1 et 5.2), l'apparition de lacunes une dizaine heures après avoirensemencées les cellules, et une réorganisation des cellules en réseaux organisés (Fig. 5.6).

Une conséquence immédiate de la traction des CE sur le biogel est la création, au sein de la MEC, de lignes de tension. Nous pourrions penser que ces voies, correspondantes à une réorganisation de la structure de la MEC, pourraient permettre la propagation de stimuli migratoire pour les autres CE. Les simulations d'une telle diffusion, influencée par les déformations mécaniques locales, ont montré que l'amplitude des contraintes exercées était trop faible pour influencer qualitativement la formation des lacunes et du réseau de pseudo-capillaires. Des conclusions semblables ont été trouvées par Manoussaki *et al.* (1996); Murray *et al.* (1998) et Murray (2003c) en absence d'une migration cellulaire haptotactique.

Nous avons montré que l'haptotaxie pouvait conduire à la création de réseaux capillaires pour des valeurs de rigidité du gel plus importantes que celles considérée par Manoussaki *et al.* (1996) et Murray (2003c). Ainsi, cette composante de la migration cellulaire active apparaît comme un moyen d'augmenter la "réactivité" du système CE-MEC pour le processus de formation des pseudo-capillaires. Réciproquement, une diminution de l'haptotaxie, en diminuant par exemple l'affinité des récepteurs cellulaires avec les protéines de la MEC, nécessiterait une augmentation de la contractilité cellulaire, et donc un cytosquelette plus efficace mécaniquement, pour compenser cette migration réduite et continuer à observer le processus de réorganisation.

Notre modèle montre comment la réorganisation de la MEC est contrôlée à la fois par la concentration de CE déposées (Fig. 5.8) et par la rigidité de la fibrine (Fig. 5.10). En effet, une concentration cellulaire initiale trop faible ou trop forte peut empêcher la formation de réseaux cellulaires et nous retrouvons les résultats expérimentaux (Vailhé *et al.* (1997); Deroanne *et al.* (2001)) : moins la matrice est rigide, plus le réseau de pseudo-capillaires est développé.

Les simulations du modèle permettent également de reproduire les résultats des expériences de Vernon *et al.* (1992), effectuées sur des biogels d'épaisseur croissante. En effet, nous avons simulé une formation de réseau cellulaire plus importante aux endroits où le biogel était le plus épais (Fig. 5.11). Notre analyse de l'influence de l'épaisseur sur les réseaux cellulaires a des similitudes avec celle de Painter (2000), qui a étudié l'influence d'un paramètre biologique, dépendant de l'épaisseur, sur la formation de motifs. Toutefois, dans notre cas, l'influence de l'épaisseur du milieu se traduit par une condition aux limites, les autres paramètres restant inchangés.

L'approche expérimentale et théorique présentée ici détaille donc le rôle des différents pa-

5. Simulations du modèle de réorganisation matricielle et cellulaire

ramètres, dans le cadre des interactions mécaniques CE-MEC et explique, avec succès, les premières étapes de la formation des lacunes dans le biogel. Cependant, il reste certaines limitations à ce modèle : la relation contraintes-déformations (§3.2), bien que relativement complète (prise en compte de la viscosité, paramètres d'élasticité longue-portée), n'est en théorie valable que dans les domaines des petites déformations (§ 7.3). De plus, la réduction de notre analyse à un domaine 2D ne prend pas en compte les contraintes verticales telles les forces verticales de cisaillement.

Cependant, nous pensons que l'approche mécanique continue développée précédemment est appropriée pour l'incorporation de nouveaux facteurs expérimentaux. Elle a permis une analyse affinée des différents signaux de transduction lors de la protéolyse matricielle, influencée par le contexte biomécanique, que nous présenterons au chapitre suivant.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans "Journal of Theoretical Biology" (Namy *et al.* (2004)).

6. Modélisation du remodelage matriciel. Étude de la régulation mécanique de la protéolyse

6.1. Introduction

Dans l'étude menée précédemment, nous avons négligé le phénomène de dégradation du bio-gel afin de nous focaliser sur l'équilibre mécanique entre les forces actives de traction cellulaire et la résistance passive viscoélastique de la MEC. Nous avons vu que cette simplification pouvait se justifier lors de la phase d'initiation, *in vitro*, de l'angiogenèse. Au cours des étapes suivantes (multiplication des lacunes et formation de pseudo-capillaires), les CE remodelent leur environnement, la MEC, qui est capable de s'adapter mécaniquement et structurellement selon la demande fonctionnelle. Ce remodelage matriciel, défini comme un changement significatif dans l'organisation de la MEC, est lié à une synthèse et/ou à une dégradation de la matrice. Sachant que, dans le contexte expérimental défini au chapitre (2), les quantités de gel biosynthétisées sont relativement faibles par rapport à celle initialement présentes (Vernon *et al.* (1995)), nous allons porter notre attention sur la protéolyse matricielle, *i. e.* la dégradation des protéines de la MEC, au cours du processus d'angiogenèse *in vitro*. L'importance de la dégradation dans le remodelage de la structure matricielle conduit à s'intéresser aux enzymes protéolytiques, dont les métalloprotéinases matricielles (MMP) et les protéases à sérine constituent les classes majeures (Vailhé (1997)). Elles sont sécrétées sous forme latente ou active, et ont un rôle prépondérant lors de la phase de formation des pseudo-capillaires au cours de l'expérience d'angiogenèse *in vitro* (Aimes *et al.* (2003)).

Dans cette seconde partie de la thèse, nous allons présenter une approche biomécanique et biochimique originale de l'angiogenèse *in vitro*. Cette théorie a été élaborée grâce aux nombreux travaux expérimentaux corrélant le niveau des contraintes mécaniques d'un milieu contenant des cellules et l'augmentation de la protéolyse de la MEC. Nous avons couplé le modèle biomécanique, développé précédemment, avec des mécanismes de type Michaelis-Menten pour modéliser la protéolyse de la matrice lors des expériences d'angiogenèse *in vitro*. Au niveau macroscopique, nous avons utilisé les résultats des travaux expérimentaux et théoriques de Benkherourou *et al.* (2000) pour modéliser la perte de rigidité du gel due à la dégradation. L'influence des effet mécaniques sur le processus de dégradation a été prise en compte en supposant que les champs des déformations, au sein de la MEC, favorisaient l'accès aux sites de dégradation pour les enzymes afin de remodeler le milieu. La protéolyse matricielle est alors vue comme le déclencheur de l'instabilité dynamique provoquant la formation des lacunes et des pseudo-capillaires.

Nous avons également envisagé une autre voie de régulation mécanique de la protéolyse matricielle : elle suppose que les effets mécaniques pourraient favoriser la sécrétion, par les CE, d'enzymes protéolytiques. Cette seconde voie de régulation de la protéolyse nous permettra

d'appréhender à quels niveaux les effets mécaniques interviennent durant la dégradation du gel. Cette analyse a été menée en lien étroit avec les résultats expérimentaux de Vaillhé *et al.* (1998).

L'originalité de notre approche est d'incorporer l'influence des effets mécaniques sur la dégradation, et donc sur le remodelage de la MEC, qui, en se réorganisant spatialement et structurellement, modifie à son tour les distributions des champs de contraintes et de déformations dans le milieu. La régulation réciproque des effets mécaniques et des effets biochimiques donne lieu à un déséquilibre dynamique potentiellement important dans le phénomène de formation des pseudo-capillaires.

6.2. La dégradation de la matrice extracellulaire

6.2.1. Contexte biologique

Les enzymes impliquées dans le remodelage vasculaire, lors de l'angiogenèse *in vitro*, appartiennent principalement à deux familles de protéases (Pepper (2001); Aimes *et al.* (2003)) :

- les protéases à sérine,
- les métalloprotéinases matricielles.

In vivo, nous avons vu que le phénomène de bourgeonnement est dû à un signal angiogène, provoquant la migration des cellules dans la matrice environnante. Cette migration cellulaire nécessite une régulation fine de la protéolyse pour permettre à la fois l'adhésion des cellules au substrat et leur détachement (Friedl et Brocker (2000)). Une dégradation excessive empêcherait alors toute adhésion, et donc toute migration. L'activité enzymatique résulte d'une cascade d'équilibres entre les protéases elles-mêmes (par exemple, le système activateur du plasminogène/plasmine (PA/plasmine), l'une des principales protéases à sérine, peut activer les MMP latentes), leurs activateurs et leurs inhibiteurs, ainsi que les activateurs/inhibiteurs de ces activateurs/inhibiteurs. Cette activité hautement régulée de la dégradation a été mise en évidence par de nombreux travaux (par ex. Taraboletti *et al.* (2002)).

Au cours du processus d'angiogenèse, Pepper (2001) a montré que la dégradation jouait un rôle majeur pour la formation des nouveaux vaisseaux sanguins. Expérimentalement, nous avons vu que la dégradation du biogel pouvait être contrôlée par l'utilisation d'aprotinine (§ 2.3.2.1). Cette dégradation doit être telle qu'elle permette la multiplication des lacunes et la formation des pseudo-capillaires, sans qu'il y ait une dégradation excessive (Vaillhé *et al.* (1998)). Lors des premières phases de l'angiogenèse *in vitro*, les enzymes agissent comme un catalyseur du processus permettant la multiplication des lacunes et la formation des structures de pseudo-capillaires. En fin de processus, si l'activité protéolytique n'est pas contrôlée, la dégradation du gel va conduire au détachement des cellules. Expérimentalement, la dégradation apparaît donc comme un facteur clé du remodelage de la MEC par les CE.

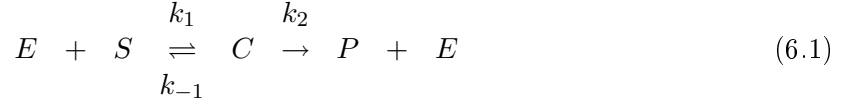
6.2.2. Modélisation de la dégradation

6.2.2.1. Processus de Michaelis-Menten

Au cours d'expériences *in vitro* sur des gels de collagène, Tzafiriri *et al.* (2002) ont montré que leur dégradation, par des collagénases ou des enzymes non-spécifiques, suivait des cinétiques

6.2. La dégradation de la matrice extracellulaire

classiques de type Michaelis-Menten. Une protéase (E), sécrétée par la cellule, catalyse la protéolyse d'une protéine (S) de la matrice extracellulaire, en formant un complexe intermédiaire C . Les interactions biochimiques, représentées par les réactions chimiques suivantes, donnent finalement lieu à un produit de dégradation (P) soluble :



où E représente l'enzyme protéolytique, S le substrat, C un complexe intermédiaire, P le produit de dégradation, et les k_i , $i = -1, 1, 2$, représentent les coefficients cinétiques (cf Tab. 6.1).

quantité	unité	valeur	référence
k_1	$mol^{-1}s^{-1}cm^3$	4.3×10^6 10^{11} 15.5×10^6	Levine <i>et al.</i> (2000) Berry et Larreta-Garde (1999) Tzafriri <i>et al.</i> (2002)
k_{-1}	s^{-1}	13..96 1.4×10^4	Kolev <i>et al.</i> (1997) Berry et Larreta-Garde (1999)
k_2	s^{-1}	0.0058..0.16 110 0.007..0.01 0.005	Kolev <i>et al.</i> (1997) Berry et Larreta-Garde (1999) Tzafriri <i>et al.</i> (2002) Levine <i>et al.</i> (2000) citant Fields <i>et al.</i> (1990)

TAB. 6.1.: Valeur des paramètres cinétiques du processus de dégradation.

Il est important de noter que la protéolyse matricielle implique un passage en solution des produits de dégradation (PD). Le niveau de dégradation de la MEC peut donc être quantifié expérimentalement en mesurant la concentration en PD.

Nous déduisons des réactions chimiques (6.1) les équations traduisant la cinétique de ces différents facteurs :

$$\begin{cases} \frac{d[S]}{dt} = -k_1 [S] [E] + k_{-1} [C] \\ \frac{d[C]}{dt} = k_1 [S] [E] - (k_{-1} + k_2) [C] \\ \frac{d[E]}{dt} = -k_1 [S] [E] + (k_{-1} + k_2) [C] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2 [C] \end{cases} \quad (6.2)$$

où $[X]$ représente la concentration de l'espèce X (unité : mol/mL).

Sous l'hypothèse traditionnelle de quasi-stationnarité de Michaelis-Menten, $\frac{d[C]}{dt} \approx 0$ (Mazat (2003)), nous déduisons l'évolution temporelle de la concentration en substrat :

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{k_1 k_2}{k_2 + k_{-1}} [E] [S] \quad (6.3)$$

6.2.2.2. Équation d'évolution des protéases

Dans ce modèle minimal, nous décrivons l'évolution de la concentration en protéase, c , par une équation de réaction-diffusion, dans laquelle la protéase est synthétisée par les CE, de concentration n (Perumpanani et Byrne (1999)). Les conditions aux limites pour les enzymes sont les mêmes que pour les CE ou la MEC, à savoir des conditions de flux nuls, et initialement, nous supposons qu'il n'y a pas d'enzyme dans le milieu.

L'évolution dynamique de la concentration en enzyme s'écrit alors :

$$\begin{cases} \frac{\partial c}{\partial t} - D_c \nabla^2 c = F_m n \\ \nabla c \cdot \boldsymbol{\eta} = 0 \\ c(\mathbf{x}, 0) = 0 \end{cases} \quad (6.4)$$

où D_c est le coefficient de diffusion, F_m est le coefficient cinétique de synthèse de l'enzyme par les CE, et $\boldsymbol{\eta}$ est le vecteur normal à la frontière.

Cette équation peut être renormalisée en fonction du temps caractéristique T (heures), de la taille caractéristique L du domaine Ω (diamètre de la boîte de Petri), de la concentration initiale en CE n_0 et la concentration initiale en protéase c_0 .

Nous obtenons alors l'équation d'évolution dynamique normalisée des protéases :

$$\frac{\partial c^*}{\partial t^*} - D_c^* \nabla^{*2} c^* = F_m^* n^*$$

où $D_c^* = \frac{D_c T}{L^2}$, $F_m^* = \frac{F_m n_0 T}{c_0}$, $c^* = \frac{c}{c_0}$, $t^* = \frac{t}{T}$, $\nabla^* = \frac{\nabla}{L}$ et $n^* = \frac{n}{n_0}$. Pour alléger les notations, les astérisques seront omis dans la suite du texte.

6.2.2.3. Lien entre la dégradation de la MEC et sa rigidité

La dégradation est un événement moléculaire, correspondant à l'hydrolyse des protéines extracellulaires (Zhao *et al.* (2003)). Ces ruptures moléculaires ont pour conséquence, au niveau macroscopique, de rendre le gel plus malléable : en effet, Phillips *et al.* (2003) ont montré que les MMP dégradent lentement les fibres de collagènes, rendant la MEC moins rigide en affaiblissant sa structure. Cette perte de rigidité locale du matériau se traduit par une diminution du module d'élasticité (Seliktar *et al.* (2003)).

Comme nous l'avons vu précédemment, la rigidité de la matrice est fondamentale pour la transmission des champs de contraintes dans le milieu (Gray *et al.* (2003)). Pour obtenir une estimation du module de Young E des biogels en fonction de la densité de fibrine restante, nous avons pris en compte les résultats expérimentaux et théoriques de Benkherourou *et al.* (2000) sur la modélisation de la rhéologie des gels de fibrine. Ces chercheurs ont montré que, pour les valeurs des densités de la MEC expérimentalement utilisées, le module de Young E est une fonction en puissance de la densité du biogel :

$$E \approx E_0 \rho_0^\delta \rho^\delta \quad (6.5)$$

où ρ_0 est la densité initiale du gel (mg/mL), E_0 une constante valant environ $2kPa \cdot (mL/mg)^\delta$, ρ est la densité normalisée du gel de fibrine et $\delta = 0.97 \pm 0.14$. Soit $\widetilde{E}_0 \equiv E_0 \rho_0^\delta$

Ainsi, les coefficients adimensionnalisés de Lamé (système 3.34), dépendant de la densité de MEC, s'écrivent :

$$\left\{ \begin{array}{l} \lambda(\rho) = \underbrace{\frac{\widetilde{E}_0 \nu \rho_0}{L^2(1+\nu)(1-2\nu)}}_{\widetilde{\lambda}} \rho^\delta \\ \mu(\rho) = \underbrace{\frac{\widetilde{E}_0 \rho_0}{2(1+\nu)L^2}}_{\widetilde{\mu}} \rho^\delta \end{array} \right.$$

où $\widetilde{E}_0$ est le module de Young initial du biogel, ν le coefficient de Poisson, ρ_0 la densité initiale de MEC, L la taille caractéristique du domaine, ρ est la densité normalisée de MEC, et δ est le coefficient défini précédemment.

6.2.2.4. Intégration de ces données au modèle

Pour intégrer le terme de dégradation (eq. 6.3) dans le modèle biomécanique développé précédemment (eq. 3.35), il suffit de constater que :

$$M_M [S] = \rho \quad (6.6)$$

où M_M la masse molaire du gel, $[S]$ sa concentration et ρ la densité de MEC.

Nous obtenons alors comme variation temporelle de la densité de la MEC :

$$\frac{d\rho}{dt} = -V_m c \rho \quad (6.7)$$

où c est la concentration en protéase et $V_m \equiv \frac{k_1 k_2}{k_2 + k_{-1}}$.

En normalisant et en intégrant ce terme de dégradation (eq. 6.7) à l'équation (3.26), nous obtenons alors l'équation d'évolution normalisée de la densité matricielle avec une écriture explicite du terme de dégradation :

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot \left[\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} \right] = -V_m^* c \rho \quad (6.8)$$

où $V_m = V_m c_0 T$, c_0 est la concentration initiale en protéase et T est le temps caractéristique.

D'après les équations (3.35), (6.4) et (6.5), nous obtenons le système d'EDP suivant :

$$\left\{ \begin{array}{l} \nabla \cdot [2\mu(\rho) (\boldsymbol{\epsilon} - \beta_1 \nabla^2 \boldsymbol{\epsilon}) + \lambda(\rho) (\theta - \beta_2 \nabla^2 \theta) \mathbf{Id} + \mu_1 \frac{\partial \boldsymbol{\epsilon}}{\partial t} \\ \quad + \mu_2 \frac{\partial \theta}{\partial t} \mathbf{Id} + \tau \rho n (N_2 - n) \mathbf{Id}] = s \frac{\mathbf{u}}{\rho} \\ \frac{\partial n}{\partial t} + \nabla \cdot [-\nabla \cdot (\mathbf{D}(\boldsymbol{\epsilon}) n) + h n \nabla \rho + n \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t}] = 0 \\ \frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot [\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t}] = -V_m c \rho \\ \frac{\partial c}{\partial t} - D_c \nabla^2 c = F_m n \end{array} \right. \quad (6.9)$$

où V_m et F_m restent à déterminer.

6.2.3. Formulation d'une hypothèse sur la régulation mécanique de la dégradation

L'activité des protéases peut être régulée par des stimuli chimiques (activation des MMP latentes par la plasmine, augmentation de l'expression des protéases à sérine par le VEGF (Vailhé (1997))), mais également par des stimuli mécaniques, comme l'ont montré de récents travaux expérimentaux (O'Callaghan et Williams (2000); Boerboom *et al.* (2003)). Une méthode pour mesurer l'influence de ces effets mécaniques sur la protéolyse est d'étudier le temps de rupture d'échantillons de gels, soumis à une contrainte mécanique, en présence d'enzymes. En effet, il est établi que le temps de rupture est directement lié au niveau de protéolyse du gel (Ellsmere *et al.* (1999); Saldivar *et al.* (2002); Altieri *et al.* (2003)). Ellsmere *et al.* (1999) ont montré que ce temps décroissait fortement quand la contrainte mécanique augmentait, et qu'il ne s'agissait pas d'un phénomène purement physique car l'inhibition de l'activité des protéases ne conduisait pas à une rupture mécanique du biogel. Des résultats similaires ont été obtenus par Margueratt et Lee (2002), qui ont montré expérimentalement que la dégradation d'un gel de collagène, pour une quantité donnée d'enzyme, est plus rapide lorsque le biogel est soumis à une contrainte mécanique. Il est également intéressant de noter que l'activité des MMP-2 et MMP-3 augmente lorsque des contraintes mécaniques sont appliquées au milieu (Nabeshima *et al.* (1996)), et qu'elle retourne rapidement à son niveau normal lorsque la contrainte mécanique est relaxée (WuDunn (2001)). L'activité des MMP serait donc réversible en fonction des effets mécaniques. Ces résultats expérimentaux suggèrent donc que les contraintes et les déformations mécaniques peuvent modifier les cinétiques d'interactions entre les enzymes et la MEC.

Plusieurs mécanismes peuvent alors être pris en compte pour expliquer l'accélération de la dégradation d'un gel quand il est soumis à des contraintes mécaniques. Une explication serait que les effets mécaniques provoquent un alignement des fibres du gel, rendant alors la pénétration d'une enzyme dans un tissu plus rapide et plus profonde (Ellsmere *et al.* (1999)). Le changement de configuration spatiale des protéines du biogel, permettrait alors de rendre disponibles de nouveaux sites de liaisons pour les enzymes.

Au niveau macroscopique, nous supposons que cette influence des effets mécaniques est :

- proportionnelle aux déformations mécaniques (Ellsmere *et al.* (1999)).
- limitée pour des fortes concentrations en produit de dégradation P .

Nous modélisons alors l'influence des effets mécaniques sur l'accessibilité aux sites de dégradation par la formulation suivante du paramètre V_m (eq. 6.9) :

$$V_m = \widehat{V}_m (\wp : |\epsilon|) (Q - [P]) \quad (6.10)$$

où $\widehat{V}_m$ est une constante positive, l'opérateur bilinéaire $\wp$: est le produit scalaire associé à la norme de Schur. Si $\mathbf{X}$ et $\mathbf{Y}$ sont des tenseurs d'ordre 2, alors l'opérateur est défini par :

$$(\mathbf{X}, \mathbf{Y}) \rightarrow \mathbf{X} : \mathbf{Y} \equiv \text{Trace}({}^t \mathbf{X} \mathbf{Y})$$

, $\wp$ est un tenseur théorique, unitaire pour cette norme, ϵ est le tenseur des déformations, et la constante positive Q ($Q > [P]$) traduit l'inhibition de la dégradation lorsque la densité des produits de dégradation augmente.

D'après le système (6.2) et l'hypothèse de quasi-stationnarité, nous avons :

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{d[P]}{dt} \quad (6.11)$$

6.3. Étude théorique sur la condition de bifurcation

En intégrant la relation (6.11) et en insérant le résultat dans la formulation (6.10), nous obtenons :

$$V_m = \widehat{V}_m(\wp : |\epsilon|) \left(\widehat{Q} + [S] \right)$$

où $\widehat{Q} = Q - [S]_{t=0}$

Finalement, la relation (6.6) nous permet d'écrire le terme de dégradation avec les notations habituelles :

$$V_m = \widetilde{V}_m(\wp : |\epsilon|) \left(\widetilde{Q} + \rho \right)$$

où $\widetilde{V}_m = \frac{\widehat{V}_m}{M_M}$, $\widetilde{Q} = M_M \widehat{Q}$, M_M est la masse molaire du gel et ρ est la densité normalisée de MEC.

Le système adimensionnalisé (6.9) s'écrit alors :

$$\left\{ \begin{array}{l} \nabla \cdot [2\mu(\rho) (\epsilon - \beta_1 \nabla^2 \epsilon) + \lambda(\rho) (\theta - \beta_2 \nabla^2 \theta) \mathbf{Id} + \mu_1 \frac{\partial \epsilon}{\partial t} \\ \quad + \mu_2 \frac{\partial \theta}{\partial t} \mathbf{Id} + \tau \rho n (N_2 - n) \mathbf{Id}] = s \frac{\mathbf{u}}{\rho} \\ \frac{\partial n}{\partial t} + \nabla \cdot [-\nabla \cdot (\mathbf{D}(\epsilon) n) + h n \nabla \rho + n \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t}] = 0 \\ \frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot [\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t}] = -V_m(\wp : |\epsilon|) (Q + \rho) c \rho \\ \frac{\partial c}{\partial t} - D_c \nabla^2 c = F_m n \end{array} \right. \quad (6.12)$$

où F_m et V_m sont des constantes strictement positives. Les astérisques et les tildes ont été omis pour alléger les notations.

6.3. Étude théorique sur la condition de bifurcation

Dans le chapitre (4), nous avons déterminé une condition nécessaire et suffisante, portant sur les valeurs des paramètres, pour que le processus de réorganisation cellulaire et matricielle puisse avoir lieu. Cette analyse de bifurcation était fondée sur une analyse de stabilité linéaire de l'état d'équilibre homogène, dans le cas où la dégradation du biogel était négligée.

Lorsque le processus de dégradation de la MEC est considéré, la quantité globale de biogel diminue avec le temps. Notre analyse de stabilité linéaire, effectuée au voisinage de $(n, \rho, \mathbf{u}) = (1, 1, \mathbf{0})$, n'est donc plus valable. Cette méthode était un outil simple et puissant de prédiction des jeux de paramètres conduisant à une réorganisation matricielle. Nous allons alors modifier formellement le système d'EDP (6.12) pour pouvoir mener une analyse de ce type.

Soient la famille de fonctions à valeurs réelles suivantes :

$$\begin{array}{lll} \forall i \in \mathbb{R}^+, & D_i : \mathbb{R}^+ & \rightarrow \mathbb{R}^+ \\ & t & \rightarrow \text{dégradation } H(i - t) \end{array}$$

où *dégradation* correspond au terme de dégradation de l'équation d'évolution de la densité matricielle du système (6.12), et H est la fonction de heaviside ($H(x) = 1$ si $x > 0$, 0 sinon). En

substituant le terme de dégradation dans le système (6.12) par les fonctions D_i , nous obtenons un ensemble de systèmes d'EDP $(\Sigma_i)_{i \in \mathbb{R}^+}$ tel que :

$$\forall i \in \mathbb{R}^+, \Sigma_i \equiv \begin{cases} \nabla \cdot [2\mu(\rho)(\epsilon - \beta_1 \nabla^2 \epsilon) + \lambda(\rho)(\theta - \beta_2 \nabla^2 \theta) \mathbf{Id} + \mu_1 \frac{\partial \epsilon}{\partial t} \\ \quad + \mu_2 \frac{\partial \theta}{\partial t} \mathbf{Id} + \tau \rho n (N_2 - n) \mathbf{Id} \\ \frac{\partial n}{\partial t} + \nabla \cdot [-\nabla \cdot (\mathbf{D}(\epsilon) n) + hn \nabla \rho + n \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t}] = 0 \\ \frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot [\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t}] = -V_m(\wp : |\epsilon|)(Q + \rho) c(x, t) \rho H(i - t) \end{cases}$$

Nous avons alors :

$$\forall i \in \mathbb{R}^+, (n, \rho, \mathbf{u}) = (1, A(i), \mathbf{0}) \text{ est un état stationnaire homogène de } \Sigma_i$$

où $A(t)$ est la quantité normalisée de gel restant dans le domaine ($A(t) = \frac{\int_{\Omega} \rho(\mathbf{x}, t) d\mathbf{x}}{\int_{\Omega} 1 d\mathbf{x}}$). Dans la suite du texte, $A(i)$ sera noté A_i .

En supposant que, pour tout i réel positif, lorsque les inconnues $(n, \rho, \mathbf{u})$ se trouvent dans un voisinage de $(1, A_i, \mathbf{0})$, nous pouvons alors déterminer la condition de bifurcation, pour le système Σ_i , par une méthode de linéarisation analogue à celle développée au chapitre (4). Nous écrivons alors les inconnues du système Σ_i de la façon suivante :

$$\forall t \geq i, \begin{cases} n(\mathbf{x}, t) = \underbrace{1 + \Delta n(\mathbf{x}, i)}_{n(\mathbf{x}, i)} + \delta n(\mathbf{x}, t) \\ \rho(\mathbf{x}, t) = \underbrace{A_i + \Delta \rho(\mathbf{x}, i)}_{\rho(\mathbf{x}, i)} + \delta \rho(\mathbf{x}, t) \\ \mathbf{u}(\mathbf{x}, t) = \underbrace{\Delta \mathbf{u}(\mathbf{x}, i)}_{\mathbf{u}(\mathbf{x}, i)} + \delta \mathbf{u}(\mathbf{x}, t) \end{cases} \quad (6.13)$$

où $\Delta n(\mathbf{x}, i)$, $\Delta \rho(\mathbf{x}, i)$ et $\Delta \mathbf{u}(\mathbf{x}, i)$ sont les écarts (spatiaux) par rapport à l'état d'équilibre $(1, A_i, \mathbf{0})$, et $(\delta n(\mathbf{x}, t), \delta \rho(\mathbf{x}, t), \delta \mathbf{u}(\mathbf{x}, t))$ représente la perturbation. L'hypothèse de "quasi-homogénéité" se traduit par :

$$\begin{cases} \Delta n(\mathbf{x}, i) \approx 0 \\ \Delta \rho(\mathbf{x}, i) \approx 0 \\ \Delta \mathbf{u}(\mathbf{x}, i) \approx \mathbf{0} \end{cases}$$

Nous définissons alors l'indice d'homogénéité de la MEC, d_h , par la formule suivante :

$$d_h(t) = \frac{\max_{\mathbf{x} \in \Omega} \rho(\mathbf{x}, t) - \min_{\mathbf{x} \in \Omega} \rho(\mathbf{x}, t)}{\int_{\Omega} \rho(\mathbf{x}, t) d\mathbf{x}} \int_{\Omega} 1 d\mathbf{x}$$

Cet indice nous permettra de vérifier si la densité de MEC est quasi-homogène.

En faisant l'hypothèse supplémentaire que le processus de dégradation est suffisamment lent par rapport au temps de formation des pseudo-capillaires, nous pouvons alors déduire des

conditions de bifurcation de Σ_i des informations sur le potentiel du système Σ à former des motifs hétérogènes de concentration cellulaire et en densité matricielle. Cette hypothèse de “quasi-stationnarité” signifierait que, à $t = i$, les distributions spatiales de CE et de MEC sont quasiment les mêmes que celles de l’état stationnaire du système Σ_i . Nous pourrions alors déterminer des sous-ensembles de l’espace des paramètres conduisant à la formation de pseudo-capillaires.

6.3.1. Calculs algébriques

Pour chaque $i \in \mathbb{R}^+$, nous linéarisons le système Σ_i , au voisinage de $(n, \rho, \mathbf{u}) = (1, A_i, \mathbf{0})$. Comme précédemment, les relations de dispersions sont obtenues en calculant les déterminants des matrices de Jacobi des systèmes linéarisés.

$$\begin{vmatrix} \xi + D_0 r & -hr & ik\xi & il\xi \\ 0 & \xi & ik\xi A_i & il\xi A_i \\ ik\tau A_i (N_2 - 2) & ik\tau (N_2 - 1) & -\tilde{\mu}\beta_1 A_i^\delta (2k^4 + 3k^2 l^2 + l^4) - \xi k^2 (\mu_1 + \mu_2) + \dots & -kl A_i^\delta (\tilde{\mu}(\beta_1 r + 1) + \tilde{\lambda}(\beta_2 r + 1)) + \dots \\ il\tau A_i (N_2 - 2) & il\tau (N_2 - 1) & -\tilde{\lambda} A_i^\delta k^2 \beta_2 r - \frac{1}{2} \xi l^2 \mu_1 - \tilde{\mu} A_i^\delta (2k^2 + l^2) - \tilde{\lambda} A_i^\delta k^2 - \frac{s}{A_i} & -\frac{1}{2} kl \xi (\mu_1 + 2\mu_2) \end{vmatrix} = 0$$

Nous obtenons alors comme relations de dispersion des fonctions polynomiales du quatrième degré en ξ :

$$\forall i \in \mathbb{R}^+, \xi \left(\xi - \xi_{i,1}^d \right) (\alpha_i(r) \xi^2 + \beta_i(r) \xi + \gamma_i(r)) = 0$$

où la valeur propre $\xi_{i,1}^d$ est égale à :

$$\xi_{i,1}^d = -2 \frac{A_i^{\delta+1} \tilde{\mu} r (1 + \beta_1 r) + s}{A_i \mu_1 r}$$

Par conséquent, pour tout i réel positif, la partie réelle de $\xi_{i,1}^d$ est toujours négative. Les coefficients $\alpha_i(r)$, $\beta_i(r)$ et $\gamma_i(r)$ utilisés dans ces relations de dispersion valent :

$$\begin{cases} \alpha_i(r) &= r(\mu_1 + \mu_2) \\ \beta_i(r) &= \left(D_0(\mu_1 + \mu_2) + 2A_i^\delta \tilde{\mu} \beta_1 + \tilde{\lambda} A_i^\delta \beta_2 \right) r^2 \\ &\quad + \left(2A_i^\delta \tilde{\mu} + \tilde{\lambda} A_i^\delta + \tau A_i (3 - 2N_2) \right) r + \frac{s}{A_i} \\ \gamma_i(r) &= D_0 A_i^\delta \left(2\tilde{\mu} \beta_1 + \tilde{\lambda} \beta_2 \right) r^3 + \left(D_0 A_i^\delta (2\tilde{\mu} + \tilde{\lambda}) \right. \\ &\quad \left. + \tau (h A_i^2 (2 - N_2) + D_0 A_i (2 - \frac{3N_2}{2})) \right) r^2 + \frac{D_0 s r}{A_i} \end{cases}$$

Nous vérifions que, à $t = 0$, les coefficients $a(r)$, $b(r)$ et $c(r)$ (eq. 4.3) sont respectivement égaux à $\alpha_0(r)$, $\beta_0(r)$ et $\gamma_0(r)$.

Posons alors :

$$\forall i \in \mathbb{R}^+, \forall r \in \mathbb{R}^{*+}, \tilde{\gamma}_i(r) = \frac{A_i \gamma_i(r)}{r}$$

6. Modélisation du remodelage matriciel. Étude de la régulation mécanique de la protéolyse

Nous trouvons que le minimum de la fonction $\tilde{\gamma}_i$, atteint en $r = r_{min}^{\gamma_i}$, vaut :

$$r_{min}^{\gamma_i} = \frac{-2A_i^\delta (\tilde{\lambda} + 2\tilde{\mu}) + 2\tau A_i \left(\frac{hA_i}{D_0} (N_2 - 2) + \left(\frac{3N_2}{2} - 2 \right) \right)}{4A_i^\delta (2\tilde{\mu}\beta_1 + \beta_2\tilde{\lambda})}$$

$$\tilde{\gamma}(r_{min}^{\gamma_i}) = \frac{\frac{(-4A_i D_0 \tau - 4A_i^2 \tau h + 2A_i^2 \tau N_2 h - 4A_i^\alpha \tilde{\mu} D_0 - 2A_i^\alpha \tilde{\lambda} D_0 + 3A_i D_0 \tau N_2)^2}{16A_i^\alpha D_0 (\beta_2 \tilde{\lambda} + 2\beta_1 \tilde{\mu})} + sD_0 + \dots}{\frac{(-3/2 A_i D_0 \tau N_2 + 2A_i D_0 \tau - A_i^2 \tau N_2 h + 2A_i^2 \tau h + A_i^\alpha (2\tilde{\mu} D_0 + \tilde{\lambda} D_0)) A_i^2 (-4D_0 \tau - A_i \tau h (4 - 2N_2) - 2A_i^{\alpha-1} D_0 (2\tilde{\mu} + \tilde{\lambda}) + 3D_0 \tau N_2)}{4A_i^\alpha D_0 (\beta_2 \tilde{\lambda} + 2\beta_1 \tilde{\mu})}} \quad (6.14)$$

Nous déduisons de cette formule une condition sur τ pour que ce minimum soit négatif. Le seuil critique de bifurcation, pour le système Σ_i , τ_{A_i} , vaut :

$$\tau_{A_i} = \frac{A_i^{1+\delta} (\tilde{\lambda} + 2\tilde{\mu}) + 2\sqrt{sA_i^{1+\delta} (2\tilde{\mu}\beta_1 + \tilde{\lambda}\beta_2)}}{A_i^2 \left(\frac{3N_2}{2} - 2 \right) + \frac{h}{D_0} A_i (N_2 - 2)} \quad (6.15)$$

Nous remarquons que, à $t = 0$, $A_0 = 1$, et donc, nous avons $\tau_{A_0} = \tau_{turing}$ (τ_{turing} a été défini au chapitre 4)

Nous définissons alors la fonction suivante (notée abusivement τ_{turing}^d) :

$$\begin{aligned} \tau_{turing}^d : \quad \mathbb{R}^+ &\rightarrow \mathbb{R}^+ \\ t &\rightarrow \tau_{A_t} \end{aligned}$$

Nous allons illustrer, par un exemple, comment cette méthode pourrait nous donner des pistes théoriques du potentiel de formation de motifs hétérogènes avec notre modèle.

6.3.2. Potentiel du modèle de formation de motifs

Supposons que, pour un jeu de paramètre $J \equiv (\tilde{\lambda}, \tilde{\mu}, s, \beta_1, \beta_2, N_2, h, D_0)$ donné, la fonction τ_{turing}^d soit décroissante et que J soit tel que, à $t = 0$, $\tau < \tau_{turing}^d(0)$. Le système composé des inconnues $(n, \rho, \mathbf{u})$ serait alors initialement dans un état que nous appelons “pseudo-stable”, à savoir que l’état homogène $(1, 1, \mathbf{0})$ serait stationnaire pour le système Σ_0 . Dans le diagramme paramétré $(A_t, \tau_{turing}^d(t))$ en fonction du temps t , l’état du système est donc initialement représenté par un point de la région grisée (Fig. 6.1)

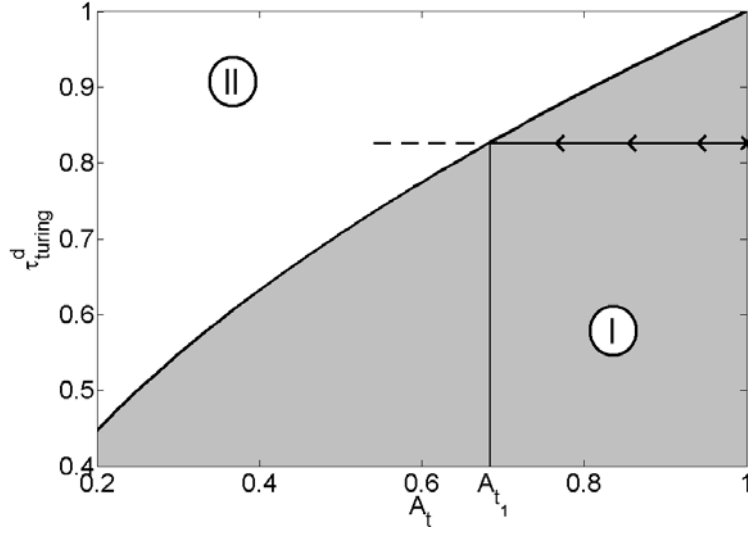


FIG. 6.1.: Courbe paramétrée $\tau_{turing}^d(t)$ en fonction de A_t .

Le symbole '×' représente l'état initial du système Σ . Les flèches montrent l'évolution de cet état au cours du temps. La région I correspond aux états "pseudo-stables", et la région II correspond aux états "pseudo-instables".

Comme la dégradation n'est pas négligée, la quantité globale de MEC diminue au cours du temps. En supposant que la linéarisation traduise correctement le système (hypothèse de "quasi-homogénéité"), le point caractérisant l'état du système au temps t décrit un segment horizontal, à partir de son état d'origine marqué par le symbole '×'. Dans ce cas, plus la quantité globale de gel est faible, plus l'amplitude nécessaire à la déstabilisation est faible.

Pour $t = t_1$, nous avons $\tau = \tau_{turing}^d(t_1)$, et $\forall t > t_1$, nous avons $\tau > \tau_{turing}^d(t)$. Le système se trouve alors dans des états "pseudo-instables", c'est-à-dire que, pour tous t supérieur à t_1 , l'état d'équilibre homogène du système Σ_t , $(n, \rho, \mathbf{u}) = (1, A_t, \mathbf{0})$, est instable.

6.4. Résultats

6.4.1. Résultats théoriques : La protéolyse matricielle contrôle le phénomène d'angiogenèse *in vitro*

Au cours d'expérience d'angiogenèse *in vitro*, Vailhé *et al.* (1998) ont constaté qu'une protéolyse limitée était nécessaire à la formation des structures capillaires. Nous allons analyser ces résultats expérimentaux dans le cadre de l'analyse mathématique que nous avons développée précédemment. Ceux ci inciteraient à penser que, initialement, le système se trouve dans un état "pseudo-stable", et que la dégradation induise son passage dans un état "pseudo-instable". Comme illustré par la figure (6.1), cela signifie qu'il existe un intervalle non vide, $O \subseteq \mathbb{R}^+$ tel que, $\forall t \in O$, la fonction $t \rightarrow \tau_{turing}^d(t)$ soit strictement décroissante.

Pour simplifier l'étude, nous avons cherché des paramètres tels que la fonction τ_{turing}^d soit

décroissante sur $\mathbb{R}^+$. D'après la formule (6.15), nous constatons qu'une condition nécessaire est $\delta \geq 3$. En effet, si $\delta < 3$, alors $\lim_{A_t \rightarrow 0} \tau_{A_t} = +\infty$. Ce premier résultat semble en contradiction avec les résultats de Benkherourou *et al.* (2000), où $\delta \approx 1$. Cette contradiction peut être expliquée par le fait que nous cherchons une fonction τ_{turing}^d décroissante sur $\mathbb{R}^+$, alors qu'une fonction décroissante sur un segment contenant 0 aurait suffi.

La figure (6.2) présente une corrélation entre l'état du système, représenté dans le diagramme paramétré $(A_t, \tau_{turing}^d(t))$, et la distribution de CE dans le domaine. Cette figure illustre également, pour trois temps différents t_a, t_b, t_c , les solutions stationnaires des systèmes $\Sigma_{t_a}, \Sigma_{t_b}$ et Σ_{t_c} .

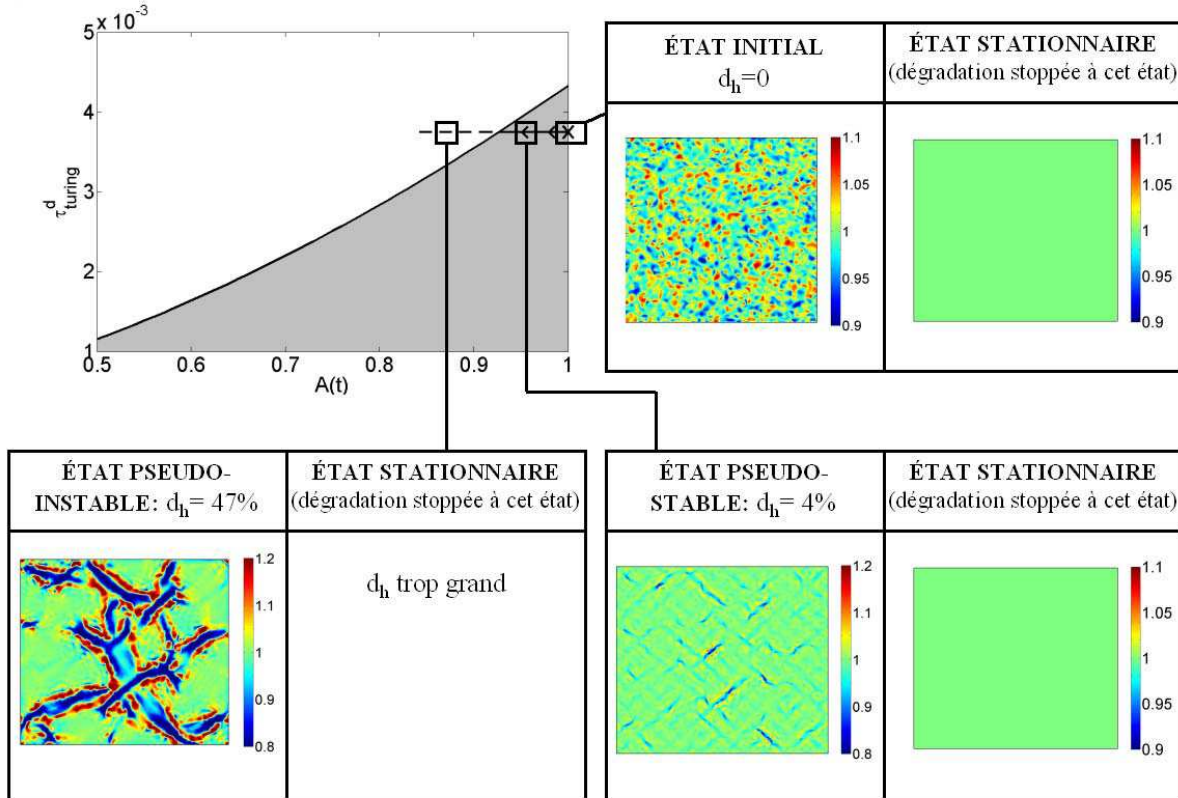


FIG. 6.2.: Corrélation entre les pseudo-états du système et la morphologie du réseau. Les paramètres (normalisés) utilisés pour cette simulation sont : $\tau = 0.003$, $\delta = 3$, $\tilde{\lambda} = 75.5\rho^3$, $\tilde{\mu} = 176.3\rho^3$, $\mu_1 = \mu_2 = 1.5$, $\beta_1 = \beta_2 = 10^{-7}$, $D_0 = 4 \times 10^{-5}$, $h = 0.00032$, $N_2 = 2.015$, $s = 0.1$, $F_m = 1.62$, $D_c = 0.0296$, $\varphi = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 1 & 1 \end{bmatrix}$, $Q = -0.55$, $V_m = 7.2$. L'échelle de couleurs correspond à la concentration normalisée de cellules.

Nous constatons que :

- initialement, à $t_a = 0$, le système est bien dans un état “pseudo-stable”. En effet, les inconnues $(n, \rho, \mathbf{u})$ du système Σ_0 tendent vers l’état homogène $(1, 1, \mathbf{0})$ (Fig. 6.2, état initial). D’après les conditions initiales de la densité de MEC, nous avons évidemment $d_h(0) = 0$.
- Soit t_1 le temps critique défini à la figure (6.1) : $t_1 \in \mathbb{R}^{*+}/\tau = \tau_{turing}^d(t_1)$. Pour tout t inférieur à t_1 , le système est dans un état “pseudo-stable” (Fig. 6.2, état $t < t_1$). Soit t_b le temps correspondant à cette figure ($t_b = 4h$). Nous avons $A(t_b) = 0.9996$ et $d_h(t_b) = 4\%$. Nous pouvons alors supposer que l’hypothèse de quasi-homogénéité est encore valable. La densité matricielle à l’état d’équilibre du système Σ_{t_b} est quasiment homogène et vaut $0.9996 \pm 0.1\%$.
- pour tout t supérieur à t_1 , le système se trouve dans un état “pseudo-instable”, comme le montre la figure (6.2, état $t > t_1$), tracée au temps $t_c = 12h$. Nous avons $A(t_c) = 0.79$ et $d_h(t_c) = 47\%$. L’hypothèse de quasi-homogénéité n’est plus donc valable.

Les hypothèses effectuées au cours de l’analyse (hypothèses de “quasi-homogénéité” et de “quasi-stationnarité”) ne sont pas satisfaites lors des simulations numériques que nous avons menées. Nous savions déjà, d’après le chapitre (5), que l’hypothèse de “quasi-stationnarité” était discutable. En effet, nous avons vu que le temps de formation des lacunes était relativement long (plusieurs heures) et que nous ne pouvions pas assimiler les motifs obtenus au temps t avec ceux obtenus à l’état d’équilibre. Nous déduisons de l’exemple précédent que, même si cette méthode aurait pu fournir des pistes théoriques pour déterminer des valeurs de paramètres conduisant à la formation de pseudo-capillaires, elle ne peut pas être appliquée à notre modèle.

6.4.2. Comparaisons avec les expériences *in vitro*

6.4.2.1. Dynamique de formation des lacunes et des réseaux vasculaires

Comme nous l’avons déjà rapporté précédemment, de grandes variations dans les échelles temporelles, la formation *in vitro* de réseaux de pseudo-capillaires, ont été observées expérimentalement en fonction de la lignée cellulaire et la concentration de fibrine utilisées (Vernon *et al.* (1992); Vailhé *et al.* (1998, 2001)).

Nous avons réussi à isoler des jeux de paramètres biologiquement réalistes, pour lesquels la formation simulée des lacunes et des pseudo-capillaires était conforme aux observations expérimentales (Fig. 6.3).

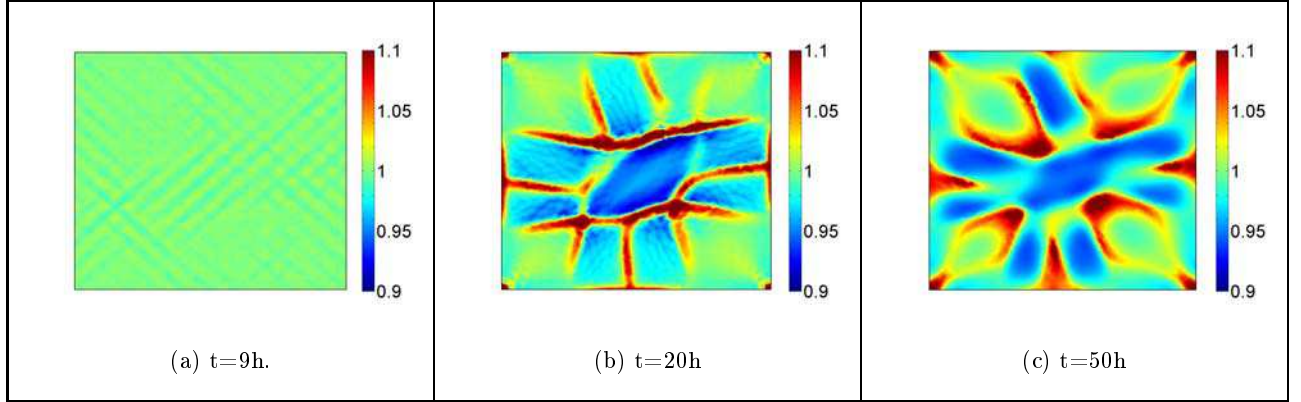


FIG. 6.3.: *Dynamique de formation des pseudo-capillaires.*

Évolution dynamique de la morphologie de la MEC simulées numériquement (A, B, C), respectivement aux temps 9 heures, 20 heures et 50 heures. Les paramètres (normalisés) utilisés pour cette simulation sont : $\tau = 1.25$, $\tilde{\lambda} = 7.55\rho$, $\tilde{\mu} = 17.63\rho$, $\mu_1 = \mu_2 = 1500$, $\beta_1 = \beta_2 = 0.04$, $D_0 = 4 \times 10^{-5}$, $h = 0.00032$, $N_2 = 10.6$, $s = 2000$, $F_m = 1.62$, $D_c = 0.0296$, $\wp = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 1 & 1 \end{bmatrix}$, $Q = -0.55$, $V_m = 7.2$. Les échelles des figures (A, B, C) correspondent à la densité normalisée de CE.

Nous constatons que les premières lacunes apparaissent après une dizaine d'heures, elles augmentent en nombre et en surface rapidement, et des pseudo-capillaires se forment à leur jonction. En fin de processus, une partie importante du biogel est dégradée (45%, Fig. 6.4).

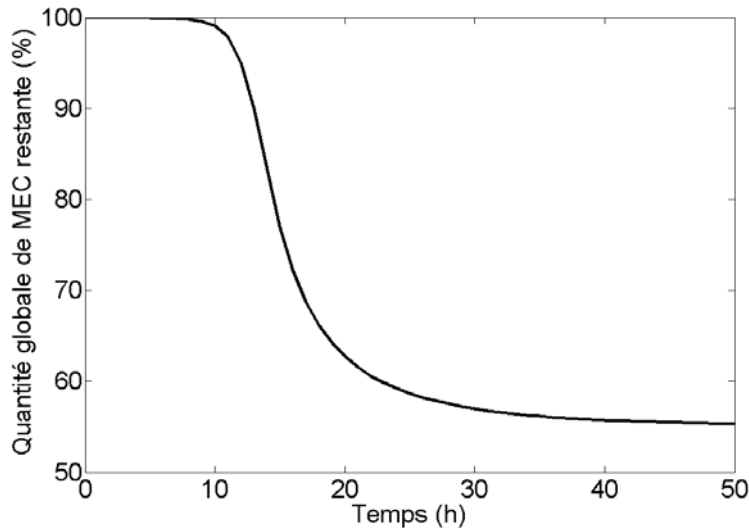


FIG. 6.4.: *Évolution dynamique de la quantité globale (normalisée) de MEC.*

Les paramètres (normalisés) utilisés pour cette figure sont ceux de la figure (6.3).

Il est intéressant d'étudier l'évolution des déformations effectives, au cours de la simulation précédente, en fonction du temps (Fig. 6.5). Pour cela, nous définissons :

$$d_{eff}^{max}(t) = \max_{\mathbf{x} \in \Omega} e_{ff}(\mathbf{x}, t)$$

où $e_{ff}(\mathbf{x}, t)$ représente les déformations effectives en un point $\mathbf{x}$ du domaine à l'instant t (Formule 7.13).

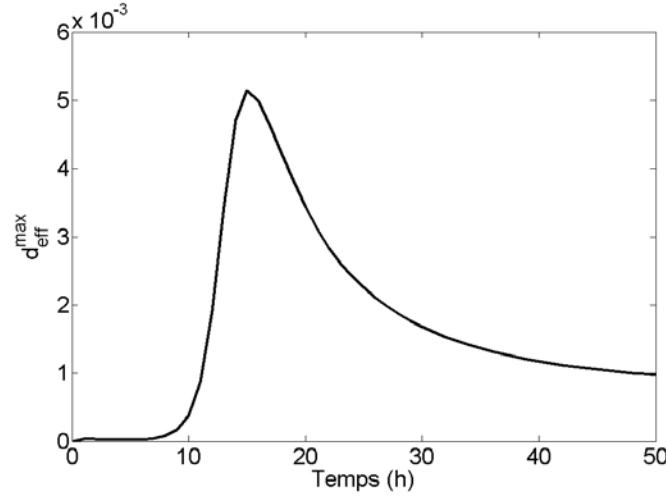


FIG. 6.5.: Évolution de la déformation effective maximale.

D'après les courbes (6.4) et (6.5), nous constatons que :

- dans une première phase ($t < 9h$), il n'y a formation ni de lacunes, ni de pseudo-capillaires. Le système est dans un état "pseudo-stable". La traction cellulaire n'est pas suffisamment forte pour induire une réorganisation matricielle et cellulaire.
- dans une seconde phase ($9h < t < 15h$), la protéolyse a rendu le biogel moins rigide, les lacunes et les pseudo-capillaires se créent et se multiplient. Il y a alors une augmentation rapide du champ des déformations effectives. Le processus est auto-catalytique, provoquant une accélération de la dégradation du gel, associée à la création de PD.
- finalement, la dégradation du biogel est trop importante : les PD inhibent le phénomène de dégradation. Une relaxation mécanique des déformations du milieu a alors lieu.

6.4.2.2. Comparaison quantitative avec l'évolution temporelle des PD de la fibrine

Comme nous l'avons précisé précédemment, la dégradation du gel peut être quantifiée par la mesure des produits de dégradation de la fibrine (PDF) présents dans la MEC. Vailhé *et al.* (1998) ont ainsi mesuré l'activité protéolytique de deux lignées cellulaires, de même concentration 150000 cell/cm^3 , sur des gels de fibrine de densité différente :

- les HUVEC sont ensemencées sur des gels de 0.5 mg/cm^3
- les BREC sont ensemencées sur des gels de 8 mg/cm^3

Ces chercheurs constatent qu'il y a une forte augmentation de la dégradation entre 10h et 18h pour les HUVEC et entre 22h et 32h pour les BREC, au moment où les lacunes se multiplient et s'étirent. En fin de processus, la courbe de la mesure des PDF pour les HUVEC semble atteindre un palier.

La caractérisation protéolytique de ces lignées cellulaires se traduit sans doute, au niveau macroscopique, par des paramètres de dégradation différents entre les HUVEC et les BREC. Nous avons alors cherché si notre modèle pouvait reproduire ces profils dynamiques de dégradation.

Les figures (6.6) et (6.7) représentent respectivement, pour des HUVEC et des BREC, le profil de la quantité de PDF présents dans le milieu en fonction du temps.

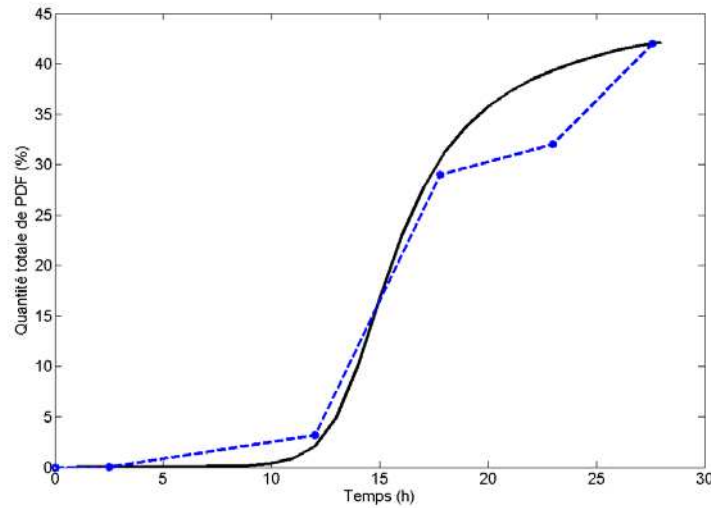


FIG. 6.6.: Profil dynamique des PDF pour des HUVEC.

Les paramètres normalisés sont ceux de la figure (6.3). La courbe en trait discontinu (—) correspond aux mesures expérimentales, tirées de Vailhé et al. (1998), la courbe en trait plein correspond aux résultats obtenus par simulation numérique. Conformément à l'expérience, la densité initiale du biogel est de 0.5 mg/cm^3 . Les mesures expérimentales sont reproduites avec l'aimable autorisation de B. Vailhé.

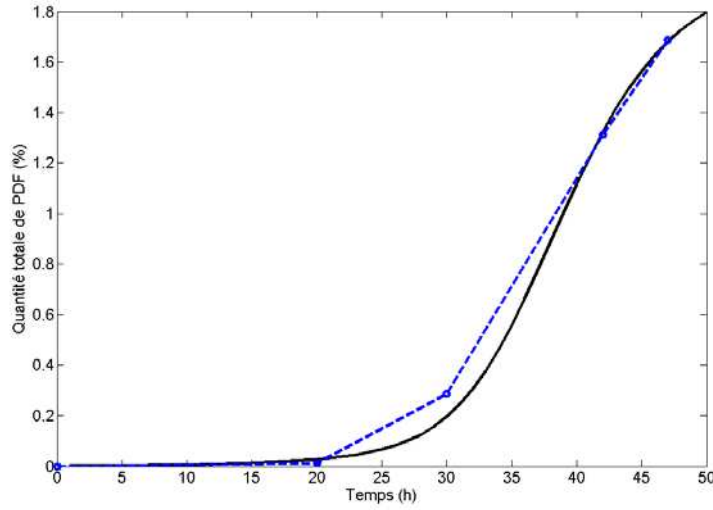


FIG. 6.7.: Profil dynamique des PDF pour des BREC.

Les paramètres (dimensionnalisés) sont ceux de la figure (6.3), excepté $V_m = 7.36$. Conformément à l'expérience, la densité initiale du biogel est de 8mg/cm^3 . La courbe en trait discontinu (---) correspond aux mesures expérimentales, tirées de Vailhé et al. (1998), la courbe en trait plein correspond aux résultats obtenus par simulation numérique. Les mesures expérimentales sont reproduites avec l'aimable autorisation de B. Vailhé.

La corrélation entre la mesure expérimentale de l'évolution de la concentration des PDF en fonction du temps et celle simulée numériquement montre également une très bonne concordance (Fig. 6.7).

Notre modèle est donc capable de reproduire les résultats expérimentaux obtenus pour deux lignées cellulaires différentes. Nous avons modélisé la différence entre les BREC et les HUVEC par un coefficient V_m caractéristique de chaque lignée. Il serait intéressant de développer un protocole pour pouvoir mesurer expérimentalement ce coefficient, afin d'infirmier ou de confirmer ces résultats.

6.4.2.3. Corrélation entre la morphologie du réseau et le profil de dégradation

A partir de ces bonnes corrélations avec les résultats expérimentaux, nous avons voulu également corréler l'organisation des CE avec l'évolution temporelle des PDF (Fig. 6.8).

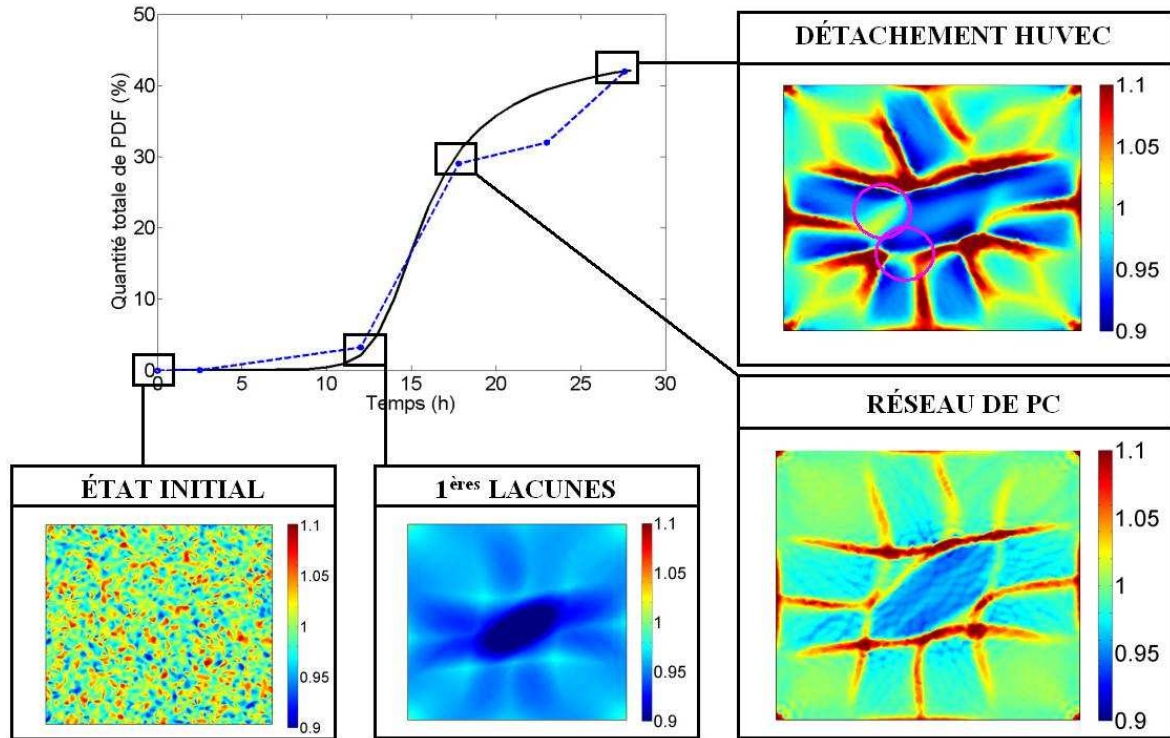


FIG. 6.8.: *Corrélation entre la mesure des PDF et la morphologie du réseau.* La courbe en trait discontinu (---) correspond aux mesures expérimentales, tirées de *Vailhé et al. (1998)*, la courbe en trait plein correspond aux résultats obtenus par simulation numérique. Les paramètres normalisés sont ceux de la figure (6.3). Les échelles de couleurs correspondent à la densité normalisée de CE. Les mesures expérimentales sont reproduites avec l'aimable autorisation de *B. Vailhé*.

Nous constatons, d'après la figure (6.8) :

- à $t = 0h$, les CE sont distribuées dans un état quasi-homogène, conformément à la condition initiale (§ 3.2.6).
- à $t < 10h$, la faible concentration des PDF montre que la protéolyse matricielle est très faible. Morphologiquement, ni les lacunes ni les pseudo-capillaires ne se sont créés.
- pour $10h < t < 18h$, il y a une augmentation rapide de la quantité de PDF, et donc de la dégradation. Cette augmentation est associée à la formation de lacunes et de pseudo-capillaires.
- à $t = 18h$, le réseau de pseudo-capillaires est formé, tandis que la création de PDF semble atteindre un palier.
- à $t = 28h$, la dégradation est trop forte. Les pseudo-capillaires se rompent par endroit (marqués par des cercles, Fig. “Détachement HUVEC”). Nous assistons à une inhibition de la dégradation par des PDF.

6.4.3. Autre voie de régulation mécanique de la protéolyse

Une autre voie de régulation de la protéolyse par les effets mécaniques serait la régulation mécanique de la sécrétion des enzymes par les CE. Sous cette hypothèse, nous examinons le lien entre la production de protéases par les CE et les contraintes mécaniques au sein du biogel.

Des travaux expérimentaux ont montré que l'expression et l'activation des MMP étaient augmentées dans les vaisseaux sanguins subissant un remodelage (Jackson *et al.* (2002)). Prajapati *et al.* (2000); Seliktar *et al.* (2001) et Rivilis *et al.* (2002) ont également mesuré une augmentation significative de l'expression des MMP- 2 et de leur activation dans le cas où le milieu, composé d'un biogel et des cellules, est soumis à un étirement.

Ces travaux expérimentaux mettent en évidence l'influence des effets mécaniques sur la sécrétion des enzymes par les cellules. Au niveau macroscopique, nous supposons que cette influence des effets mécaniques sur la sécrétion des enzymes par les CE est :

- proportionnelle aux déformations mécaniques du milieu.
- limitée, pour les fortes déformations, par un phénomène de saturation de la sécrétion cellulaire.

Nous modélisons donc l'influence des effets mécaniques sur la sécrétion des enzymes par les CE par la formulation suivante du paramètre F_m (eq. 6.9) :

$$F_m = \widetilde{F}_m \frac{(\varphi : |\epsilon|)}{K_m + (\varphi : |\epsilon|)}$$

où $\widetilde{F}_m$ et K_m sont des constantes positives, l'opérateur bilinéaire $:$ est le produit scalaire associé à la norme de Schur (voir précédemment) et φ est un tenseur théorique, unitaire pour cette norme.

Le système adimensionnalisé (3.35) s'écrit alors :

$$\left\{ \begin{array}{l} \nabla \cdot [2\mu(\rho) (\epsilon - \beta_1 \nabla^2 \epsilon) + \lambda(\rho) (\theta - \beta_2 \nabla^2 \theta) \mathbf{Id} + \mu_1 \frac{\partial \epsilon}{\partial t} \\ \quad + \mu_2 \frac{\partial \theta}{\partial t} \mathbf{Id} + \tau \rho n (N_2 - n) \mathbf{Id}] = s \frac{\mathbf{u}}{\rho} \\ \frac{\partial n}{\partial t} + \nabla \cdot [-\nabla \cdot (\mathbf{D}(\epsilon) n) + h n \nabla \rho + n \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t}] = 0 \\ \frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot [\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t}] = -V_m c \rho \\ \frac{\partial c}{\partial t} - D_c \nabla^2 c = F_m \frac{(\varphi : |\epsilon|)}{K_m + (\varphi : |\epsilon|)} n \end{array} \right. \quad (6.16)$$

où F_m , K_m et V_m sont des constantes strictement positives. Les astérisques et les tildes ont été omis pour alléger les notations.

D'après les résultats expérimentaux, il est probable que la régulation par les effets mécaniques se fassent à la fois par un changement de configuration spatiale des protéines de la MEC (hypothèse H_d) et par une augmentation de la sécrétion, par les CE, de protéases (hypothèse H_i). Pour déterminer si l'une de ces deux voies de régulation de la protéolyse matricielle par les effets mécaniques est prédominante, nous allons nous intéresser à l'influence de la diffusion des protéases dans ces deux formulations.

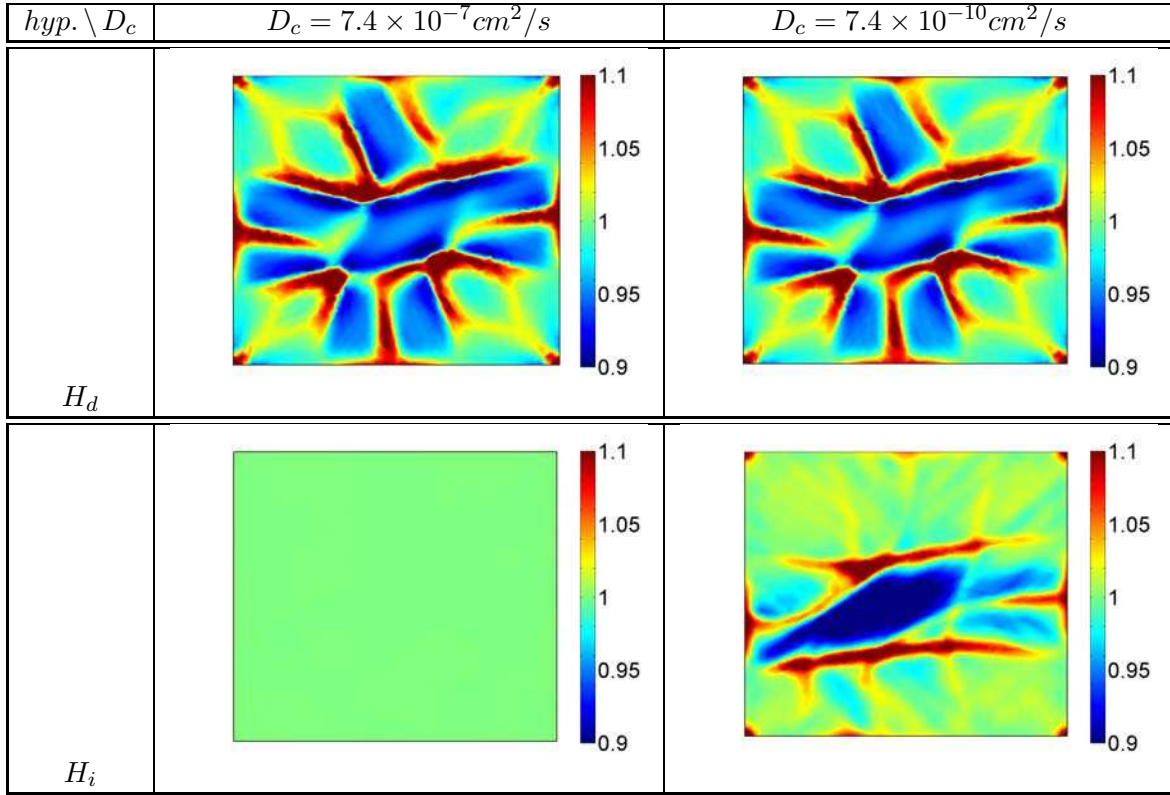


FIG. 6.9.: Influence du coefficient de diffusion enzymatique, D_c , sur la formation de pseudo-capillaires.
L'échelle de couleur représente la densité (normalisée) de CE, au temps $t = 30h$.

La figure (6.9) montre que, dans le cas d'une influence "directe" de la mécanique sur la dégradation (hypothèse H_d), la formation des pseudo-capillaires est faiblement dépendante de la diffusion des protéases. A l'inverse, dans le cas où les effets mécaniques influeraient "indirectement" la dégradation en favorisant la sécrétion des enzymes par les CE (hypothèse H_i), la diffusion des protéases semble être un paramètre clé du processus de formation des pseudo-capillaires. Ces prédictions théoriques peuvent s'expliquer au regard de la distribution d'enzyme dans le milieu :

- sous l'hypothèse H_d , nous constatons que la formation des pseudo-capillaires ne semble pas être modifiée par la distribution spatiale des enzymes. En effet, la dégradation, conduisant à la formation de pseudo-capillaires, est directement liée au champ des déformations mécaniques hétérogènes au sein de la MEC. Elle provoque ainsi l'hétérogénéité de la densité de MEC, et donc de la concentration de CE.
- sous l'hypothèse H_i , pour $D_c = 7.4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, nous constatons que les enzymes sont quasiment réparties de façon homogène. Ainsi, même si elles sont sécrétées localement

en fonction du champ des déformations mécaniques au sein du milieu, la diffusion est telle qu'elles vont se répartir trop rapidement pour permettre à des motifs hétérogènes d'apparaître. La diminution de la diffusion des protéases ($D_c = 7.4 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$) a pour effet de permettre la création de pseudo-capillaires, comme le montre la figure (6.9).

La figure (6.10) montre le profil d'évolution de la concentration en PDF pour des HUVEC, sous l'hypothèse H_i .

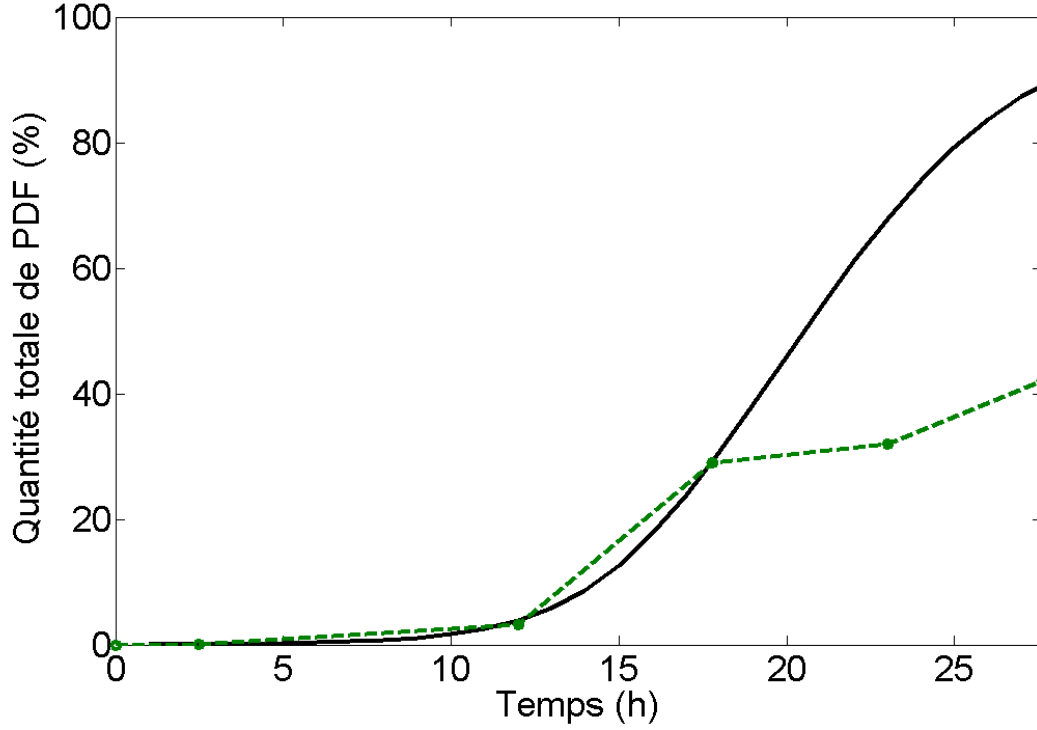


FIG. 6.10.: Profil dynamique des PDF pour des HUVEC sous l'hypothèse H_i .

Les paramètres normalisés sont ceux de la figure (6.3). La courbe en trait discontinu (—) correspond aux mesures expérimentales, tirées de Vailhé et al. (1998), la courbe en trait plein correspond aux résultats obtenus par simulation numérique. Conformément à l'expérience, la densité initiale du biogel est de $0.5 \text{mg}/\text{cm}^3$. $\tau = 1.2875$, $\tilde{\lambda} = 7.55\rho$, $\tilde{\mu} = 17.63\rho$, $\mu_1 = \mu_2 = 1500$, $\beta_1 = \beta_2 = 0.03$, $D_0 = 4 \times 10^{-5}$, $h = 0.00032$, $N_2 = 10.6$, $s = 2000$, $F_m = 1.62$, $D_c = 2.96 \times 10^{-5}$, $\wp = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 1 & 1 \end{bmatrix}$, $V_m = 9$, $F_m = 0.00324$, $K_m = 0.002$. Les mesures expérimentales sont reproduites avec l'aimable autorisation de B. Vailhé.

D'après la figure (6.10), nous constatons que les concentrations en PDF simulées numériquement ne concordent pas, à partir de $t = 18\text{h}$, avec celles mesurées expérimentalement. Il serait alors envisageable de modifier le terme de dégradation du système (6.16) en y intégrant un phénomène d'inhibition de la dégradation par les PDF pour obtenir l'effet de saturation que nous avons montré avec l'hypothèse H_d .

6.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons appréhendé une nouvelle régulation du processus d'angiogenèse *in vitro* par les effets mécaniques : le contrôle de la protéolyse matricielle par le champ des déformations mécaniques.

Cette théorie a été développée à partir des nombreux travaux expérimentaux montrant que les contraintes et les déformations mécaniques peuvent modifier les cinétiques d'interactions entre les enzymes protéolytiques et les protéines matricielles (Jackson *et al.* (2002); Margueratt et Lee (2002)). Au cours d'expériences *in vitro*, Tzafriri *et al.* (2002) ont montré que le processus de dégradation suivait une cinétique classique de type Michaelis-Menten. Nous avons alors incorporé, au modèle biomécanique développé au chapitre précédent, ces aspects biochimiques afin de considérer la protéolyse comme le facteur initiant l'instabilité dynamique provoquant la formation des lacunes et des pseudo-capillaires. Comme l'a proposé Ellsmere *et al.* (1999), nous avons supposé que les contraintes mécaniques au sein de la MEC créent un changement de la configuration spatiale des protéines de la matrice, rendant plus accessibles les sites de dégradation aux enzymes. En pratique, nous avons fait l'hypothèse que ce changement de géométrie modifiait la valeur des paramètres cinétiques des réactions chimiques associées à la dégradation en fonction du champ des déformations locales au sein de la MEC.

Une conséquence immédiate de la prise en compte de la dégradation matricielle est que l'état d'équilibre homogène $(n, \rho, \mathbf{u}) = (1, 1, \mathbf{0})$ n'existe plus. Nous avons alors cherché des pistes théoriques pour déterminer des jeux de paramètres conduisant à la formation de motifs hétérogènes en densité cellulaire et matricielle en faisant des hypothèses de "quasi-homogénéité" et de "quasi-stationnarité" de l'état du système. Nous avons vu que cette méthode ne permettait pas de déterminer des sous-ensembles de l'espace des paramètres particulièrement intéressants. Plusieurs raisons peuvent expliquer cet échec : d'une part, il aurait fallu qu'à chaque instant, les distributions spatiales de CE et de MEC soient quasi-homogènes et que le vecteur déplacement $\mathbf{u}$ soit uniformément quasiment nul pour que le système linéarisé traduise correctement le système non simplifié, d'autre part que les temps de création des motifs soient très courts. Nous avons constaté, en bloquant artificiellement la dégradation à partir d'un certain temps T , permettant ainsi au système d'évoluer vers un état stationnaire, que les distributions spatiales de cellules et de matrice à l'instant T ne laissaient pas présager de leurs valeurs à l'état stationnaire. Nous n'avons donc pas pu déterminer théoriquement de sous-ensembles de l'espace des paramètres conduisant à un remodelage de la MEC. Nous aurions pu envisager, dans l'étude mathématique, de paramétrer explicitement la quantité de gel restant dans le milieu, en définissant le terme de dégradation comme une fonction du temps, et de négliger la convection du biogel. L'état de la densité de MEC aurait été alors homogène à chaque instant, et nous aurions pu étudier, comme montré dans Tranqui et Tracqui (2000) avec un terme de dégradation différent, si les lacunes n'apparaissaient qu'à partir d'un certain niveau de protéolyse matricielle.

Cependant, nous avons quand même réussi à isoler des valeurs de jeux de paramètres qui conduisent à des organisations intéressantes de CE. En menant une analyse en lien étroit avec les résultats expérimentaux obtenus avec des gels de fibrine et différentes lignées cellulaires (HUVEC, BREC) (Vailhé *et al.* (1998)), nous avons montré que :

- notre modélisation conduit à la création et à la multiplication de lacunes, ainsi qu'à la formation de pseudo-capillaires selon des dynamiques et des morphologies observées expé-

rimentalement. Nous avons réussi à simuler des pseudo-capillaires dont l'ordre de grandeur du diamètre est comparable à celui observé expérimentalement (quelques dizaines de micromètres (Secomb (1995))).

- le profil dynamique de la dégradation reproduit avec succès les mesures expérimentales. Expérimentalement, le niveau de dégradation est mesuré par une quantification des PDF. Sachant que la dégradation du gel suit une cinétique de type Michaelis-Menten, nous pouvons alors déduire des mesures des PDF la quantité de biogel dégradée. La corrélation entre le niveau de dégradation du biogel ainsi calculé et les morphologies de l'organisation des CE reproduit avec succès les résultats expérimentaux : la dégradation du biogel est quasiment négligeable jusqu'à l'apparition des premières lacunes, le gel se dégrade alors rapidement pendant la phase de multiplication des lacunes conduisant à la formation de pseudo-capillaires. Enfin, la protéolyse devient excessive et provoque la destruction du réseau de pseudo-capillaires (Fig. 6.8).
- notre modèle peut expliquer les différents profils de dégradation mesurés expérimentalement en fonction de la lignée cellulaire considérée. En modifiant uniquement le coefficient de dégradation, nous avons déterminés des valeurs théoriques caractérisant la dégradation des biogel par les HUVEC et les BREC, conduisant à des profils de dégradation en très bon accord avec ceux mesurés expérimentalement. Il apparaît maintenant nécessaire de développer des expériences *in vitro* pour pouvoir mesurer directement ces coefficients, afin de confirmer ou d'infirmer cette théorie.
- la régulation de la protéolyse par les effets mécaniques peut avoir lieu via plusieurs mécanismes. Nous avons étudié deux voies de régulation possibles de la dégradation par les effets mécaniques : soit de façon "directe" par une modification de la configuration spatiale des protéines matricielles, soit de façon "indirecte" en favorisant la sécrétion de protéases par les CE. D'après les résultats expérimentaux, il est probable que ces deux voies de régulation interviennent simultanément. Pour appréhender à quels niveaux interviennent principalement les effets mécaniques, nous avons étudié l'influence de la diffusion des protéases sur la formation des pseudo-capillaires. Nous avons montré que, dans le cas où la régulation était "directe", la formation des pseudo-capillaires est faiblement dépendante de la diffusion des protéases, tandis que, dans le cas d'une régulation de la sécrétion des enzymes par les CE, la diffusion des protéases semble être un paramètre clé du processus de formation des pseudo-capillaires. Il serait donc très intéressant de développer un protocole expérimental permettant de bloquer la diffusion enzymatique pour déterminer si l'une de ces deux voies de régulation est prédominante.

Ce chapitre illustre bien l'intérêt de la modélisation mathématique : elle permet de transformer nos connaissances des phénomènes aux niveaux moléculaire et cellulaire pour appréhender l'équilibre macroscopique complexe résultant de la balance entre les forces de traction cellulaire qui engendrent un champ de déformation au sein de la MEC et favorisent ainsi localement la protéolyse matricielle, et la résistance passive viscoélastique de la MEC, dont la structure s'affaiblit par dégradation.

Troisième partie .

Méthodologie

7. Méthodes de modélisation du comportement mécanique du biogel

7.1. Introduction et Objectifs

Un gel de collagène ou de fibrine a des propriétés mécaniques complexes, qui ont fait l'objet de nombreuses études (nature biphasique, alignement des fibres, propriétés viscoélastiques) (Cook (1995); Barocas et Tranquillo (1997); Deroanne *et al.* (2001)). En accord avec notre philosophie de modélisation (§ 1.3), nous choisissons de décrire le biogel comme un milieu continu viscoélastique, dont nous présenterons, dans ce chapitre, différentes méthodes pour modéliser le comportement mécanique.

Dans une première approche, nous décrivons la rhéologie du biogel par un modèle minimal viscoélastique linéaire. Historiquement, cette formulation a été appliquée aux tissus biologiques, pour la première fois, par Murray et Oster (1984) et est désormais fréquemment utilisée dans les modèles biomécaniques, souvent même au delà de son domaine de validité défini par l'hypothèse des petites déformations (§ 7.3). Nous avons vu en effet, au chapitre (2), que ce matériau subissait des déformations importantes engendrées par la traction des CE; l'hypothèse des petites déformations n'est donc plus valide. La mise en oeuvre d'autres lois de comportement mécanique, ne faisant plus d'hypothèse sur le niveau des déformations, est donc souhaitable. En référence à l'hypothèse des petites déformations, il s'agira alors d'une modélisation du comportement mécanique en "grandes déformations".

Dans ce chapitre de méthodologie, nous présentons donc comment modéliser le comportement mécanique d'un milieu continu, que ce soit en élasticité linéaire ou en mécanique des grandes déformations. Nous rappellerons brièvement les notions fondamentales de l'élasticité linéaire (définitions et formules utiles), ainsi que la loi de comportement (loi de Hooke). Il s'agit d'un domaine classique, très illustré dans la littérature (par exemple Dartus et Bellet (1995)). Nous insisterons d'avantage sur la modélisation de la rhéologie du biogel en mécanique des grandes déformations. Une description précise de cette théorie est présentée en partie (7.2), dans laquelle nous sommes restés le plus général possible en ne postulant aucune loi de comportement cinématique. Cette approche généralisée est rendue nécessaire par l'absence de toute symétrie dans les expériences d'angiogenèse *in vitro* en trois dimensions (symétrie de la géométrie, mais dissymétrie des conditions aux limites sur les faces horizontales et de la condition initiale de CE). Son implémentation et sa résolution numérique, l'une des premières à notre connaissance, n'est possible que par l'augmentation de la puissance de calcul des ordinateurs et l'amélioration des algorithmes de résolution numérique. Cependant, les conditions de résolution numérique restent encore un facteur limitant.

Dans cette modélisation en mécanique des grandes déformations, nous verrons que le choix de la fonction d'énergie caractérisant le matériaux est délicat. Nous présenterons alors un état de l'art des fonctions d'énergie élastique et visqueuse, domaine encore peu exploré, utilisées

dans la littérature (§ 7.4.2) pour nous permettre de choisir la plus adaptée à notre modélisation générale. Enfin, nous étudierons en détail une fonction d'énergie particulière pour déterminer si elle permet la caractérisation des gels utilisés lors des expériences d'angiogenèse *in vitro*.

7.2. Formulation théorique

Cette partie détaille le formalisme mathématique (Fung (1993); Cai (1998)), que ce soit en élasticité linéaire ou en mécanique des grandes déformations, pour pouvoir modéliser les déformations mécaniques d'un milieu soumis à une contrainte en coordonnées curvilignes généralisées.

7.2.1. Les différents états du système

Tout au long de ce chapitre, nous allons considérer deux états :

- l'état initial I représente une configuration de référence telle que les contraintes soient nulles. Par définition du vecteur déplacement, de composantes (u_1, u_2, u_3) , nous avons, dans cet état, $(u_1, u_2, u_3) = (0, 0, 0)$.
- l'état A(t) représente la configuration déformée du gel au temps t

l'état final F est l'état stationnaire du système.

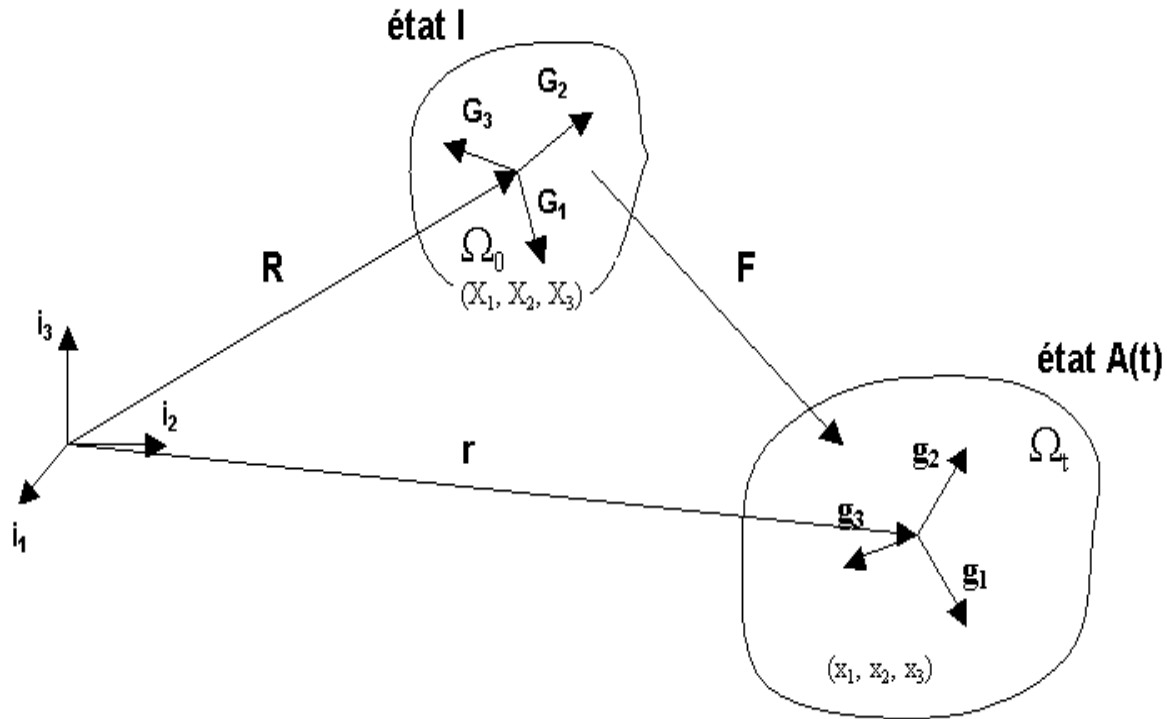


FIG. 7.1.: Déformation d'un biogel : schématisation du passage de la configuration à contraintes nulles du matériau (I) à la configuration déformée au temps t (A(t)).

La convention classique d'Einstein sur les sommations d'indices répétés est utilisée dans toute la suite du texte, sauf mention contraire explicite.

les vecteurs positions liés aux états I et A(t) ont respectivement pour expressions dans la base cartésienne orthonormée ($\mathbf{i}_1, \mathbf{i}_2, \mathbf{i}_3$) :

$$\mathbf{R} = X_k \mathbf{i}_k$$

et

$$\mathbf{r}(t) = x_k(t) \mathbf{i}_k$$

Le milieu subit une déformation sous l'effet des contraintes externes (traction des CE lors de l'expérience d'angiogenèse *in vitro*, expérience de relaxation). Ainsi, en ne faisant aucune hypothèse sur la cinématique du matériau, nous avons (cas général) :

$$\begin{cases} x_1(t) &= f(X_1, X_2, X_3, t) \\ x_2(t) &= g(X_1, X_2, X_3, t) \\ x_3(t) &= h(X_1, X_2, X_3, t) \end{cases} \quad (7.1)$$

7.2.2. Expressions des différentes grandeurs

7.2.2.1. Choix des coordonnées curvilignes $(\theta^1, \theta^2, \theta^3)$

Nous choisissons (X_1, X_2, X_3) comme système de coordonnées curvilignes généralisées $(\theta^1, \theta^2, \theta^3)$.

7.2.2.2. Vecteurs covariants $\mathbf{G}_k$ et $\mathbf{g}_k(t)$

Les vecteurs de base covariants dans les états I et A(t) sont définis respectivement par $\mathbf{G}_k = \mathbf{R}_{,k} = X_{j,k} \mathbf{i}_j$ et $\mathbf{g}_k(t) = \mathbf{r}(t)_{,k} = x_j(t)_{,k} \mathbf{i}_j$, où $A_{,i} = \partial A / \partial \theta^i$.

Nous en déduisons donc que

$$\begin{cases} \mathbf{G}_k &= \mathbf{i}_k \\ \mathbf{g}_k(t) &= \frac{\partial f}{\partial X_k}(X_1, X_2, X_3, t) \mathbf{i}_1 + \frac{\partial g}{\partial X_k}(X_1, X_2, X_3, t) \mathbf{i}_2 + \frac{\partial h}{\partial X_k}(X_1, X_2, X_3, t) \mathbf{i}_3, \quad k = 1..3 \end{cases}$$

Pour alléger les formules, nous noterons :

$$\frac{\partial f}{\partial x_k}(X_1, X_2, X_3, t) = f_k \quad , \quad \frac{\partial g}{\partial x_k}(X_1, X_2, X_3, t) = g_k \quad , \quad \frac{\partial h}{\partial x_k}(X_1, X_2, X_3, t) = h_k$$

7.2.2.3. Vecteurs contravariants $\mathbf{G}^k$ et $\mathbf{g}^k$

Les vecteurs de base contravariants dans les états I et A(t) sont respectivement $\mathbf{G}^k$ et $\mathbf{g}^k$. Ils sont définis par les relations $\langle \mathbf{G}_k, \mathbf{G}^i \rangle = \delta_{ik}$ et $\langle \mathbf{g}_k, \mathbf{g}^i \rangle = \delta_{ik}$, où δ_{ik} est le symbole de Kronecker et $\langle ., . \rangle$ est le produit scalaire usuel sur $\mathbb{R}^3$.

Nous en déduisons donc que $\mathbf{G}^k = \mathbf{i}_k$. Les vecteurs $\mathbf{g}^k$ sont de la forme :

$$\begin{aligned} \mathbf{g}^1 &= a_1(t) \mathbf{i}_1 + b_1(t) \mathbf{i}_2 + c_1(t) \mathbf{i}_3 \\ \mathbf{g}^2 &= a_2(t) \mathbf{i}_1 + b_2(t) \mathbf{i}_2 + c_2(t) \mathbf{i}_3 \\ \mathbf{g}^3 &= a_3(t) \mathbf{i}_1 + b_3(t) \mathbf{i}_2 + c_3(t) \mathbf{i}_3 \end{aligned} \quad (7.2)$$

7. Méthodes de modélisation du comportement mécanique du biogel

où $\{a_i(t), b_i(t), c_i(t), i = 1..3\}$ sont des fonctions du temps à déterminer. Ces coefficients peuvent être explicités, en fonction de $\{f_1, f_2, f_3, g_1, g_2, g_3, h_1, h_2, h_3\}$, en reportant (7.2) dans la définition des vecteurs contravariants de l'état $A(t)$. Les calculs sont détaillés dans l'appendice de ce chapitre. Dans la suite du texte, les coefficients $\{a_i(t), b_i(t), c_i(t), i = 1..3\}$ seront notés $\{a_i, b_i, c_i, i = 1..3\}$.

7.2.2.4. Tenseur gradient de la transformation $\mathbf{F}$

Le tenseur gradient de la transformation entre l'état I et l'état $A(t)$ est noté $\mathbf{F}$. Un vecteur $d\mathbf{R}$ de l'état I devient, après déformation, un vecteur $d\mathbf{r}$ de l'état $A(t)$ tel que $d\mathbf{r} = \mathbf{F}d\mathbf{R}$.

$\mathbf{F}$ vaut :

$$\mathbf{F} = (grad(\mathbf{r}))^T = \mathbf{g}_i \otimes \mathbf{G}^i \quad (7.3)$$

où l'exposant ^{T} est l'opérateur transposé du tenseur, le symbole $\otimes$ représente le produit tensoriel, et l'opérateur gradient est tel que $grad(\mathbf{r}) = \mathbf{G}^i \otimes \partial \mathbf{r} / \partial \theta^i$.

La transformation est supposée être réversible, donc bijective :

$$\forall t, \forall \mathbf{x}, \quad det(\mathbf{F}(\mathbf{x}, t)) \neq 0$$

A $t = 0$, nous avons

$$\forall \mathbf{x}, \quad det(\mathbf{F}(\mathbf{x}, 0)) = 1$$

Nous déduisons des deux relations précédentes, d'après la continuité de l'application multilinéaire $\cdot \rightarrow det(\cdot)$, que :

$$\forall t, \forall \mathbf{x}, \quad det(\mathbf{F}(\mathbf{x}, 0)) > 0$$

7.2.2.5. Tenseur des dilatations $\mathbf{C}$

Nous appelons le tenseur des dilatations, $\mathbf{C}$, le tenseur défini par :

$$\mathbf{C} = {}^T \mathbf{F} \mathbf{F} = g_{ij} \mathbf{G}^i \otimes \mathbf{G}^j$$

où $g_{ij} = \langle \mathbf{g}_i, \mathbf{g}_j \rangle$.

$\mathbf{C}$ est symétrique, défini positif. Ce tenseur est donc diagonalisable dans une base de vecteurs propres orthogonaux appelée base principale de déformation. Les trois valeurs propres de $\mathbf{C}$ (non nécessairement distinctes) sont strictement positives. Elles sont les carrés des dilatations principales de déformation. Les trois vecteurs propres associés sont appelés les directions principales de déformation.

7.2.2.6. Tenseur des déformations de Green-Lagrange $\mathbf{E}$

Le tenseur des déformations de Green-Lagrange $\mathbf{E}$ a pour expression :

$$\mathbf{E} = \frac{1}{2}(\mathbf{C} - \mathbf{Id}) = E_{ij} \mathbf{G}^i \otimes \mathbf{G}^j \quad (7.4)$$

où $\mathbf{Id}$ est le tenseur identité. On peut montrer que $\mathbf{Id} = G_{ij} \mathbf{G}^i \otimes \mathbf{G}^j$.

Nous pouvons donc en déduire les expressions des composantes covariantes du tenseur de déformation de Green-Lagrange dans la base $\mathbf{G}^i$, $i = 1..3$:

$$E_{ij} = \langle \mathbf{G}_i, \mathbf{E}\mathbf{G}_j \rangle = \frac{1}{2}(g_{ij} - G_{ij}) \quad (7.5)$$

où $G_{ij} = \langle \mathbf{G}_i, \mathbf{G}_j \rangle$ et $g_{ij} = \langle \mathbf{g}_i, \mathbf{g}_j \rangle$ sont respectivement les composantes covariantes des tenseurs métriques dans les configurations initiale et déformée.

La matrice $\mathbf{G}_{..}$ est donc égale à l'identité, et $\mathbf{g}_{..}$ vaut :

$$\mathbf{g}_{..} = \begin{bmatrix} f_1^2 + g_1^2 + h_1^2 & f_1f_2 + g_1g_2 + h_1h_2 & f_1f_3 + g_1g_3 + h_1h_3 \\ \text{symétrique} & f_2^2 + g_2^2 + h_2^2 & f_2f_3 + g_2g_3 + h_2h_3 \\ \text{symétrique} & \text{symétrique} & f_3^2 + g_3^2 + h_3^2 \end{bmatrix} \quad (7.6)$$

7.2.2.7. Tenseur des contraintes de Cauchy $\boldsymbol{\tau}$

En l'absence de forces volumiques, l'équation d'équilibre local du milieu a pour expression générale :

$$\text{div}(\boldsymbol{\tau}) = \mathbf{0} \quad (7.7)$$

où $\boldsymbol{\tau} = \tau^{ij}\mathbf{g}_i \otimes \mathbf{g}_j$ représente le tenseur des contraintes de Cauchy (force par unité de surface de l'état A(t)) et l'opérateur divergence est tel que $\text{div}(\boldsymbol{\tau}) = \mathbf{g}^i \partial \boldsymbol{\tau} / \partial \theta^i$. L'équation (7.7) devient ainsi :

$$\tau_{,i}^{ij} + \tau^{ij}\Gamma_{ik}^k + \tau^{ik}\Gamma_{ik}^j = 0$$

où $\Gamma_{ij}^k = \langle \mathbf{g}^k, \mathbf{g}_{i,j} \rangle = \frac{1}{2}g^{km}(g_{mi,j} + g_{mj,i} - g_{ij,m})$ sont les symboles de Christoffel et $\mathbf{g}^{..}$ est le tenseur dont les composantes valent $g^{ij} = \langle \mathbf{g}^i, \mathbf{g}^j \rangle$:

$$\mathbf{g}^{..} = \begin{bmatrix} a_1^2 + b_1^2 + c_1^2 & a_1a_2 + b_1b_2 + c_1c_2 & a_1a_3 + b_1b_3 + c_1c_3 \\ \text{symétrique} & a_2^2 + b_2^2 + c_2^2 & a_2a_3 + b_2b_3 + c_2c_3 \\ \text{symétrique} & \text{symétrique} & a_3^2 + b_3^2 + c_3^2 \end{bmatrix} \quad (7.8)$$

Les composantes du tenseur des contraintes de Cauchy, τ^{ij} , ne sont pas écrites forcément dans une base unitaire et leur amplitude n'a donc pas de sens physique. Ainsi, les résultats sur les contraintes de Cauchy présentés dans la littérature donnent toujours les composantes physiques de ce tenseur, c'est-à-dire rapportées à une base unitaire, notées $\boldsymbol{\sigma}_{<ij>}$. Le tenseur $\boldsymbol{\sigma}$ se déduit du tenseur des contraintes de Cauchy par la relation :

$$\boldsymbol{\sigma}_{<ij>} = \tau^{ij} \sqrt{g_{ii}g_{jj}} \quad (\text{indices muets non utilisés}) \quad (7.9)$$

La formulation du tenseur des contraintes de Cauchy, $\boldsymbol{\tau}$, dépend du cadre théorique dans lequel nous travaillons. La loi de Hooke permet de déterminer ses composantes en élasticité linéaire, (§ 7.3), tandis qu'en mécanique des grandes déformations, son expression est obtenue à partir d'une formulation énergétique caractérisant le milieu (§ 7.4).

7.3. Élasticité linéaire

7.3.1. Principes

L'élasticité linéaire est un cadre d'étude classique du comportement mécanique des matériaux. Nous rappellerons, dans cette partie, uniquement les principales définitions, ainsi que l'expression des différents coefficients.

Un matériau est dit élastique s'il existe un état de référence sans contrainte (état naturel), et si après déformation, le tenseur des contraintes de Cauchy, $\boldsymbol{\tau}$, ne dépend que du tenseur des déformations de Green-Lagrange, $\mathbf{E}$:

$$\boldsymbol{\tau} = f(\mathbf{E}) \quad (7.10)$$

Les matériaux élastiques sont donc des matériaux à mémoire de leur état de repos.

Un matériau est dit élastique linéaire si on a effectué une linéarisation de la loi contraintes-déformations précédente au voisinage de l'état naturel. Cette linéarisation est valable sous l'hypothèse des "petites déformations", à savoir que $|\mathbf{E}| \ll 1$, où $|\cdot|$ représente une norme matricielle. En pratique, nous considérons qu'elle reste valable tant que les déformations ne dépassent pas 10%. L'objectif de cette hypothèse est de pouvoir affirmer que le domaine déformé Ω_t est peu différent du domaine initial Ω_0 . Sous ces hypothèses, nous avons alors :

$$\begin{cases} \boldsymbol{\sigma} &= \boldsymbol{\tau} \\ \mathbf{E} &\equiv \boldsymbol{\epsilon} = \frac{1}{2} (\nabla \mathbf{u} + \nabla \mathbf{u}^T) \end{cases}$$

La loi de comportement mécanique en élasticité linéaire est la loi de Hooke. Elle s'écrit :

$$\boldsymbol{\sigma} = 2\mu\boldsymbol{\epsilon} + \lambda\theta\mathbf{Id} \quad (7.11)$$

où θ est la dilatation ($\theta = \text{Trace}(\boldsymbol{\epsilon})$), $\mathbf{Id}$ est le tenseur identité, μ et λ sont les coefficients de Lamé.

Les coefficients de Lamé sont des notations pratiques, mais ont des significations mécaniques peu intuitives. Pour avoir une meilleure perception des phénomènes mécaniques, nous considérons le coefficient de Poisson ν et le module d'Young E par les relations suivantes :

$$\begin{cases} \lambda &= \frac{E\nu}{(1+\nu)(1-2\nu)} \\ \mu &= \frac{E}{2(1+\nu)} \end{cases}$$

Le coefficient de Poisson traduit la compressibilité du matériau. Il varie de 0 à 0.5. Plus le matériau est compressible, plus son coefficient de Poisson est proche de 0. Il est sans dimension. Le module de Young traduit la malléabilité du matériau. Plus le matériau est rigide, plus son module de Young est élevé. Son unité est le Pascal (Pa).

Il est important de noter que, sous l'hypothèse des petites déformations, les descriptions eulérienne et lagrangienne sont équivalentes (Germain (1973); Duvaut (1990); Fung (1993)). Nous noterons donc indifféremment x ou X .

7.3.2. Formules des contraintes de von Mises σ_{vm} et des déformations effectives e_{ff}

Durant nos travaux, nous nous sommes servi des deux estimateurs suivants pour mener une analyse mécanique des contraintes et des déformations dans le milieu.

Les contraintes de von Mises σ_{vm} sont définies par :

$$\sigma_{vm} = \sqrt{\frac{3}{2} \sum_{i,j} S_{ij}^2} \quad (7.12)$$

où les coefficients S_{ij} sont les composantes du tenseur déviateur des contraintes. Elles sont définies par la formule suivante :

$$S_{ij} = \sigma_{ij} - \frac{1}{3} \text{Trace}(\boldsymbol{\sigma}) \delta_{ij}$$

où $\boldsymbol{\sigma}$ est le tenseur des contraintes de Cauchy.

De même, les déformations effectives e_{ff} sont définies par :

$$e_{ff} = \sqrt{\frac{2}{3} \sum_{i,j} e_{ij}^2} \quad (7.13)$$

où les coefficients e_{ij} sont les composantes du tenseur déviateur des déformations. Elles sont définies par la relation :

$$e_{ij} = \epsilon_{ij} - \frac{1}{3} \text{Trace}(\boldsymbol{\epsilon}) \delta_{ij}$$

où $\boldsymbol{\epsilon}$ est le tenseur des déformations linéarisées.

7.4. Modélisation du comportement hyperélastique du biogel en mécanique des grandes déformations

7.4.1. Expression du tenseur des contraintes de Cauchy en grandes déformations

En mécanique des grandes déformations, l'expression du tenseur de Cauchy, $\boldsymbol{\tau}$, peut se déduire d'une formulation énergétique. Si l'énergie de déformation est exprimée selon une fonction d'énergie élastique (W_e), dépendante du tenseur des déformations de Green-Lagrange ($W_e = W_e(\mathbf{E})$), et une fonction d'énergie visqueuse (W_v), dépendante du tenseur des déformations de Green-Lagrange et de sa dérivée temporelle ($W_v = W_v(\mathbf{E}, \dot{\mathbf{E}})$), alors la loi de comportement, pour un matériau compressible, se déduit de l'expression intrinsèque suivante (Pioletti *et al.* (1998); Fernandes-Morin (2000)) :

$$\boldsymbol{\tau} = J^{-1} \mathbf{F} \left(\frac{\partial W_e}{\partial \mathbf{E}} + \frac{\partial W_v}{\partial \dot{\mathbf{E}}} \right)^T \mathbf{F} \quad (7.14)$$

où $\mathbf{F}$ est le tenseur gradient de la transformation et $J \equiv \det(\mathbf{F})$ ($J \neq 1$).

La détermination de ces fonctions d'énergie, qui doivent traduire de façon réaliste la rhéologie (élasticité/viscosité) du biogel, est souvent délicate. Il nous est alors paru important de passer en revue les différentes fonctions d'énergie proposées dans la littérature et susceptibles de décrire la rhéologie d'un tissu mou ou d'un biogel.

7.4.2. Revue bibliographique des fonctions d'énergie élastique

7.4.2.1. Cas des matériaux incompressibles

Beaucoup de matériaux caoutchouteux ont été décrits, en première approximation, comme des matériaux incompressibles. Cette remarque est justifiée par le fait qu'il est beaucoup plus facile de changer la forme d'une pièce en caoutchouc que d'en changer son volume. Cette approximation a souvent été faite pour des raisons de simplifications de calculs numériques.

Modèle de Ogden. Ce modèle est utilisé pour décrire l'évolution de matériaux, soumis à des contraintes finies, relativement à un état d'équilibre. De tels matériaux sont les biomatériaux tels que les tissus biologiques mous et les polymères solides comme les matériaux de type caoutchouc.

La fonction d'énergie élastique est :

$$\Psi = \Psi(\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3) = \sum_{p=1}^N \frac{\mu_p}{\alpha_p} (\lambda_1^{\alpha_p} + \lambda_2^{\alpha_p} + \lambda_3^{\alpha_p} - 3)$$

où les λ_i , ($i = 1..3$) sont les étirements principaux, μ_p sont les modules de cisaillements, α_p des constantes sans dimension, et N est un entier naturel qui détermine le nombre de terme dans la fonction d'énergie. Il résulte que seulement 3 termes suffisent ($N = 3$) pour avoir une bonne corrélation avec les résultats expérimentaux (Holzapfel (2001)).

Les trois modèles suivants sont des cas particuliers du modèle de Ogden.

Modèle de Mooney-Rivlin. Dans ce cas là, $N = 2$ et $\alpha_1 = 2$ et $\alpha_2 = -2$. En écrivant la fonction d'énergie en fonction des invariants I_1 et I_2 , sachant que $I_3 = 1$ par incompressibilité du milieu, nous obtenons :

$$\Psi = c_1(I_1 - 3) + c_2(I_2 - 3)$$

où $c_1 = \mu_1/2$ et $c_2 = -\mu_2/2$, I_1 et I_2 sont respectivement les premier et deuxième invariants ($I_1 = \text{Trace}(\mathbf{C})$ et $I_2 = \frac{1}{2} \left((\text{Trace}(\mathbf{C}))^2 - \text{Trace}(\mathbf{C}^2) \right)$).

Cette fonction de Mooney-Rivlin est souvent utilisée pour décrire le comportement de matériaux isotropes de type caoutchouc.

Modèle de Miller-Young. Miller-Young *et al.* (2002) mettent en évidence, par des tests de compression, le comportement non-linéaire viscoélastique de l'aponévrose plantaire humaine (membrane fibreuse épaisse, située au niveau du talon, de même type que les tendons et les ligaments). Ils utilisent un modèle qu'ils qualifient de Mooney-Rivlin pour déterminer les caractéristiques rhéologiques de ce tissu. Il s'agit, en fait, d'un modèle de Ogden particulier :

$$\Psi(I_1, I_2) = \sum_{i+j=1}^N C_{ij} (I_1 - 3)^i (I_2 - 3)^j$$

En pratique, ils utilisent $N = 7$ ou $N = 10$.

Modèle néo-hookéen. Dans ce cas là, $N = 1$ et $\alpha_1 = 2$. La fonction d'énergie s'écrit alors uniquement en fonction du premier invariant I_1 :

$$\Psi = c_1(I_1 - 3)$$

avec $c_1 = \mu_1/2$.

Cette formulation est intéressante car elle n'implique qu'un seul paramètre. Elle conduit à une modélisation mathématique simple et réaliste du comportement non linéaire des matériaux de type caoutchouc. Kauer *et al.* (2002) s'en servent pour caractériser les matériaux synthétiques quasi-incompressibles.

Modèle de Fung. Fung (1993) effectue des tests de tractions biaxiales sur des aortes canines pour caractériser les paramètres rhéologiques des vaisseaux sanguins. Il propose une nouvelle fonction d'énergie de la forme :

$$\Psi(\mathbf{E}) = f(Q) + \frac{c}{2}[e^Q - Q - 1] \quad (7.15)$$

où Q une fonction polynomiale des composantes du tenseur de Green-Lagrange, $\mathbf{E}$, et des caractéristiques du matériau. Zhou et Fung (1997) se sont servi de cette fonction d'énergie pour définir le degré de non-linéarité comme la part de l'énergie de déformation non-linéaire dans l'énergie de déformation totale. Ils trouvent que ce degré de non-linéarité varie de 5% à 30% en fonction de l'amplitude de la déformation, celle-ci variant dans l'échelle des valeurs physiologiques.

Blondel *et al.* (2001) ont repris cette formulation de la loi de comportement élastique. En développant un nouveau dispositif pour réaliser des mesures statiques et dynamiques, en trois dimensions, ils caractérisent les propriétés mécaniques des vaisseaux sanguins en se servant de la fonction d'énergie élastique suivante :

$$\Psi(\mathbf{E}) = \frac{c}{2}[e^Q - 1]$$

où Q est une fonction du tenseur $\mathbf{E}$ et des caractéristiques du matériau.

Ce modèle a été également repris par Billiar et Sacks (2000) et Sun *et al.* (2003), qui l'ont utilisé pour modéliser des biomatériaux servant dans les prothèses cardiaques.

Gardiner et Weiss (2001) utilisent ce modèle pour caractériser le comportement de tissus biologiques mous lors d'une expérience de cisaillement. Ils arrivent à faire une cartographie, avec une approche de type éléments finis en deux dimensions, de la contrainte exercée dans un échantillon de tissus mou. Weiss *et al.* (2002) réutilisent ce dispositif et caractérisent le comportement dynamique des ligaments soumis à une charge.

Modèle de Fernandes-Morin. Fernandes-Morin (2000) réutilise la loi proposée par Suh *et al.* (1989), pour décrire le comportement des tissus biologiques :

$$\Psi(I_1, I_2) = \gamma e^{\alpha_1(I_1-3) - \frac{\alpha_1}{2}(I_2-3)}$$

Les paramètres γ et α_1 sont identifiés pour des dermes équivalents. Leur caractérisation donne $\alpha_1 = 6.4$ et $\gamma = -4.2 Pa$.

Modèle de Ramtani. Ramtani (2003) reprend le modèle de Fung (7.15) et cherche à caractériser les propriétés rhéologiques des gels de collagène par la fonction d'énergie suivante :

$$\Psi(I_1, I_2) = ae^{b(I_1-3)} - \frac{ab}{2}(I_2-3)$$

où a et b sont des caractéristiques du milieu.

Les valeurs des coefficients a et b sont mesurées dans Ramtani (2003) pour les dermes équivalents, et sont déterminées expérimentalement, par Pioletti *et al.* (1998), via des tests de traction avec des déformations de 50% pour les ligaments et tendons humains.

7.4.2.2. Cas des matériaux compressibles

La compressibilité d'un matériau est prise en compte par l'addition, dans la formulation de la fonction d'énergie, d'un terme décrivant la réponse élastique purement liée à la variation de volume Ψ_{vol} (Fernandes-Morin (2000)). Pour notre formulation énergétique élastique, nous prenons donc comme fonction d'énergie Ψ la somme d'une fonction d'énergie à isovolume Ψ_{iso} (décrite précédemment) et Ψ_{vol} , fonction d'énergie liée à la variation de volume. Nous parlerons dans ce cas de formulation découplée :

$$\Psi(\overline{\lambda}_1, \overline{\lambda}_2, \overline{\lambda}_3, J) = \Psi_{vol}(J) + \Psi_{iso}(\overline{\lambda}_1, \overline{\lambda}_2, \overline{\lambda}_3)$$

où J est le rapport entre le volume initial et le volume déformé, les $\lambda_i (i = 1..3)$ sont les étirements principaux, et $\overline{\lambda}_i = J^{-1/3}\lambda_i$.

Souvent, les formulations énergétiques sont présentées sous forme couplée. Cela signifie que la fonction d'énergie est présentée sous la forme :

$$\Psi(\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, J) = \Psi_{vol}(J) + \Psi_{iso}(\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3)$$

Modèle d'Ogden. Les matériaux caoutchouteux sont en général compressibles. Ogden (Holzapfel (2001)) propose donc comme fonction d'énergie liée à la variation du volume :

$$\Psi_{vol}(J) = \kappa \beta^{-2} \left(\beta \log(J) + J^{-\beta} - 1 \right)$$

où κ et β sont des constantes positives.

Modèle de Mooney-Rivlin. La prise en compte de la compressibilité du matériau dans le modèle de Mooney-Rivlin se fait par l'ajout de la fonction d'énergie liée à la variation de volume suivante :

$$\Psi_{vol}(J) = c(J - 1)^2 - d \log(J)$$

La forme couplée de la fonction d'énergie du modèle de Mooney-Rivlin s'écrit donc :

$$\Psi(I_1, I_2, J) = c_1(I_1 - 3) + c_2(I_2 - 3) + c(J - 1)^2 - d \log(J)$$

où c est une constante du matériau et d est un paramètre (dépendant) avec certaines restrictions : comme l'état de référence est non contraint, on peut déduire que $d = 2(c_1 + 2c_2)$.

Modèle néo-hookéen (forme couplée). Le modèle néo-hookéen s'écrit, dans le cas d'un matériau compressible :

$$\Psi(I_1, J) = c_1(I_1 - 3) + \frac{c_1}{\beta} (J^{-2\beta} - 1)$$

où les coefficients élastiques c_1 et β peuvent être interprétés en fonction du module de Young et du coefficient de Poisson (§ 7.6.2).

Modèle de Fernandes-Morin. Dans cette modélisation, il n'y a plus le découplage entre une fonction d'énergie à volume constant et une fonction d'énergie traduisant la variation de volume. Fernandes-Morin (2000) propose pour modéliser les tissus biologiques mous compressibles d'utiliser la loi introduite par Suh *et al.* (1989) :

$$\Psi(I_1, I_2, I_3) = \frac{a}{I_3^n} e^{\alpha_1(I_1-3) + \alpha_2(I_2-3)}, \quad n = \alpha_1 + 2\alpha_2$$

où a , α_1 et α_2 sont les paramètres élastiques du matériau. Cependant, les valeurs expérimentales de ces paramètres n'y sont pas données.

Baer *et al.* (2003) ont repris une formulation de ce type pour modéliser le comportement mécanique de matrices biologiques isotropes. Ils proposent une formulation du type :

$$\Psi(I_1, I_2, I_3) = \alpha_0 \left[\frac{1}{I_3^\beta} e^{\alpha_1(I_1-3) + \alpha_2(I_2-3)} - 1 \right]$$

Cependant, ils utilisent une hypothèse de petites déformations, qui permet de simplifier les équations et de ne préciser que les valeurs de $4\alpha_0(\alpha_1 + 2\alpha_2)$, $2\alpha_0(\alpha_1 + \alpha_2)$ et β .

7.4.3. Revue bibliographique des différentes fonctions d'énergie visqueuses

L'étude des potentiels visqueux est un domaine encore peu exploré : seules quelques fonctions d'énergie visqueuse ont été développées. Nous avons noté principalement deux modèles.

7.4.3.1. Modèle de Pioletti

Afin de prendre en compte les effet de mémoire à court terme, Pioletti *et al.* (1998) ont proposé un potentiel visqueux de la forme :

$$W_v = \frac{\eta}{4} J_2 (I_1 - 3)$$

où J_2 est le deuxième invariant scalaire de $\dot{\mathbf{C}}$: $J_2 = Tr(\dot{\mathbf{C}}^2)$.

Cette fonction d'énergie a également été reprise par Fernandes-Morin (2000) pour modéliser le comportement visqueux de derme équivalent.

7.4.3.2. Modèle de Ramtani

Le potentiel visqueux, proposé par Ramtani (2003) est une amélioration de celui de Fernandes-Morin (2000). Il s'écrit :

$$W_v(I_1, I_2) = \frac{\eta_1}{4} J_2 (I_1 - 3)^n e^{\eta_2(I_1 - 3)} + \frac{\eta_1 \eta_2}{2} J_7 (I_2 - 3)$$

où η_1 et η_2 sont les paramètres visqueux caractéristiques du matériau, n est un paramètre sans dimension, fixé à 0.5, J_2 et J_7 sont respectivement le deuxième et le septième invariant scalaire de $\dot{\mathbf{C}}$: $J_7 = Tr(\mathbf{C}^2 \dot{\mathbf{C}}^2)$ et J_2 a été donné précédemment. Les différents paramètres sont caractérisés par des tests de compressions (jusqu'à 25 % de déformations), réalisés à différentes vitesses de déplacement.

7.5. Choix des fonctions d'énergie

La détermination d'une loi de comportement commence par le choix du potentiel élastique et du potentiel visqueux. Dans le cas de déformations non-linéaires, nous avons vu qu'il n'existait pas de forme standard de potentiel énergétique. Par contre, certaines restrictions (physiques ou thermodynamiques) limitent le choix. Selon notre philosophie de modélisation, la fonction d'énergie ne doit comporter qu'un nombre minimal adéquat pour modéliser le comportement mécanique du milieu.

Conditions thermodynamiques d'admissibilité. La loi de comportement élastique doit satisfaire les conditions d'admissibilité suivantes (Holzapfel (2001)) :

- dans l'état de référence, la contrainte doit être nulle : $\boldsymbol{\sigma}(\mathbf{Id}) = \mathbf{0}$.
- la modélisation doit approcher correctement les données expérimentales.
- le potentiel élastique doit être convexe.

Lorsque la viscosité est prise en compte, une contrainte thermodynamique supplémentaire apparaît : il faut vérifier la non-négativité de la dissipation visqueuse (inégalité de Clausius-Duheim) :

$$\frac{\partial W_v}{\partial \dot{\mathbf{E}}} : \dot{\mathbf{E}} \geq 0, \quad \forall \dot{\mathbf{E}} \quad (7.16)$$

Nous pouvons montrer que, si $W_v(\dot{\mathbf{E}} = \mathbf{0}) = 0$, et si la fonction d'énergie W_v est continue, positive (ou nulle) et convexe, alors l'inégalité (7.16) est systématiquement vérifiée (Fernandes-Morin (2000)).

7.6. Étude de fonctions d'énergie particulière

7.6.1. Fonctions d'énergie retenues

Pour un matériau, la fonction d'énergie doit respecter le principe d'objectivité ou d'indifférence matérielle, c'est-à-dire qu'elle doit être invariante dans tout changement de référentiel (Boehler (1987)). C'est pour cette raison qu'il est préférable d'exprimer la fonction d'énergie W en fonction des invariants scalaires de $\mathbf{C}$ et $\dot{\mathbf{C}}$. Fung (1993) suggère que la fonction d'énergie ne doit comporter qu'un nombre minimal adéquat de paramètres permettant de décrire le comportement mécanique du matériau.

Nous choisissons alors comme fonction d'énergie élastique W_e un modèle néo-hookéen compressible :

$$W_e = \frac{c_1}{\beta}(J^{-2\beta} - 1) + c_1(I_1 - 3) \quad (7.17)$$

où I_1 est le premier invariant, et J est le déterminant du tenseur $\mathbf{F}$. En effet, nous cherchons à trouver une loi physiquement et biologiquement réaliste, mais suffisamment simple pour résoudre numériquement le système d'EDP couplées non-linéaire où aucune loi cinématique n'est postulée. Dans la même optique, nous choisissons comme fonction d'énergie visqueuse celle utilisée par Pioletti *et al.* (1998) et Fernandes-Morin (2000) :

$$W_v = \frac{\eta}{4}J_2(I_1 - 3) \quad (7.18)$$

où I_1 est le premier invariant de $\mathbf{C}$ et J_2 le deuxième invariant de $\dot{\mathbf{C}}$.

7.6.2. Études théorique de la loi de comportement par linéarisation

7.6.2.1. Intérêt de la linéarisation de la loi de comportement

Nous linéarisons la loi de comportement élastique du matériau (7.14), au voisinage de l'état initial, pour trouver une relation entre les coefficients de la fonction d'énergie W_e , et les paramètres d'élasticité linéaire du matériau (module de Young E et coefficient de Poisson ν). Cette linéarisation a deux objectifs : elle permet d'interpréter physiquement les coefficients de la fonction d'énergie W_e , et, sachant que le module de Young et le coefficient de Poisson sont des quantités mesurées et connues dans la littérature (Scherer *et al.* (1991); Benkherrou *et al.* (2000); Shreiber *et al.* (2003)), il sera possible de déterminer les gammes de valeurs biologiquement réalistes de ces paramètres.

7.6.2.2. Comparaison avec les résultats obtenus par petites déformations

Les détails de la linéarisation, au voisinage de l'état I, sont précisés en appendice. Après calculs, nous trouvons que :

$$\begin{cases} c_1 &= \frac{E}{4(1+\nu)} \\ \beta &= \frac{\nu}{1-2\nu} \end{cases} \quad (7.19)$$

Nous en déduisons donc que, pour un coefficient de Poisson valant 0.2, le coefficient β vaut $1/3$.

De même, le module de Young E , pour des gels de fibrine de concentration comprise entre 0.5 mg/mL et 5 mg/mL , a été mesuré par dans Benkherourou *et al.* (2000) entre 10^3 et 10^4 Pa. Les valeurs biologiquement réaliste de c_1 sont donc comprises entre 208 et 2080 Pa.

7.6.3. Étude de la loi de comportement élastique

Afin d'étudier le comportement mécanique régi par la loi néo-hookéenne, il est nécessaire de simuler les expériences de traction uniaxiale (Cai (1998)) en grandes déformations.

7.6.3.1. Formulation de l'expérience de traction uniaxiale

Par souci de clarté, nous allons présenter la formulation mathématique d'une expérience de traction/compression multiaxiale, pour l'appliquer ensuite au cas particulier d'une compression uniaxiale.

Formulation d'une expérience de traction multiaxiale. Au cours d'une expérience de traction/compression multiaxiale, un échantillon initialement cylindrique ne subit aucune distorsion. Cela permet de simplifier la loi de comportement cinématique de la façon suivante :

$$x_k = \lambda_k(t) X_k \quad (k = 1, 2, 3) \quad (\text{indices muets non utilisés}) \quad (7.20)$$

où, comme précédemment, X_k et x_k ($k = 1, 2, 3$) sont respectivement les coordonnées cartésiennes d'un point de la configuration initiale I et de la même particule dans la configuration déformée A(t), et $\lambda_k(t)$ ($k = 1, 2, 3$) sont les rapports d'élongation dans les trois directions de base.

La loi (7.20) est donc un cas particulier de la loi de cinématique générale (7.1), avec :

$$\begin{cases} f(X_1, X_2, X_3, t) &= \lambda_1(t) X_1 \\ g(X_1, X_2, X_3, t) &= \lambda_2(t) X_2 \\ h(X_1, X_2, X_3, t) &= \lambda_3(t) X_3 \end{cases} \quad (7.21)$$

Nous pouvons donc appliquer les formules précédemment calculées (relations 7.6, 7.7 et 7.8) à ce cas particulier. Pour alléger les notations, $(\lambda_1(t), \lambda_2(t), \lambda_3(t))$ seront notés $(\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3)$. Les détails des calculs sont précisés dans l'appendice associée à ce chapitre. Nous obtenons alors le système d'équations suivant :

$$\begin{cases} \sigma_{<11>} &= \frac{2\lambda_1}{\lambda_2\lambda_3} \left[c_1 \left(1 - \lambda_1^{-2\beta-2} (\lambda_2\lambda_3)^{-2\beta} \right) + \eta\lambda_1 \frac{d\lambda_1}{dt} (\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2 - 3) \right] \\ \sigma_{<22>} &= \frac{2\lambda_2}{\lambda_1\lambda_3} \left[c_1 \left(1 - \lambda_2^{-2\beta-2} (\lambda_1\lambda_3)^{-2\beta} \right) + \eta\lambda_2 \frac{d\lambda_2}{dt} (\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2 - 3) \right] \\ \sigma_{<33>} &= \frac{2\lambda_3}{\lambda_1\lambda_2} \left[c_1 \left(1 - \lambda_3^{-2\beta-2} (\lambda_1\lambda_2)^{-2\beta} \right) + \eta\lambda_3 \frac{d\lambda_3}{dt} (\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2 - 3) \right] \end{cases} \quad (7.22)$$

Application à l'expérience de traction uniaxiale. Dans le cas particulier d'une traction uniaxiale dans la direction des abscisses, nous imposons une déformation selon les abscisses ($\lambda_1(t)$ est connu) sur une face du gel, la face opposée ne pouvant bouger qu'en y et qu'en z , les faces latérales étant libres.

Nous avons alors $\sigma_{<22>} = \sigma_{<33>} = 0$ et $\lambda_2 = \lambda_3$. Le système (7.22) s'écrit donc :

$$\begin{cases} \sigma_{<11>} &= \frac{2\lambda_1}{\lambda_2^2} \left[c_1 \left(1 - \lambda_1^{-2\beta-2} \lambda_2^{-4\beta} \right) + \eta \lambda_1 \frac{d\lambda_1}{dt} (\lambda_1^2 + 2\lambda_2^2 - 3) \right] \\ 0 &= \frac{2}{\lambda_1} \left[c_1 \left(1 - \lambda_2^{-4\beta-2} \lambda_1^{-2\beta} \right) + \eta \lambda_2 \frac{d\lambda_2}{dt} (\lambda_1^2 + 2\lambda_2^2 - 3) \right] \end{cases} \quad (7.23)$$

où $\sigma_{<11>}$ et λ_2 sont les inconnues.

7.6.3.2. Étude de l'influence des paramètres élastiques lors d'une expérience de traction uniaxiale

Variation du paramètre c_1 . Nous avons étudié qualitativement comment évoluait la contrainte sur le bord fixé, à l'état d'équilibre, en fonction du coefficient d'élasticité du milieu c_1 lors de deux expériences de traction uniaxiale de 5% et 25% de déformation.

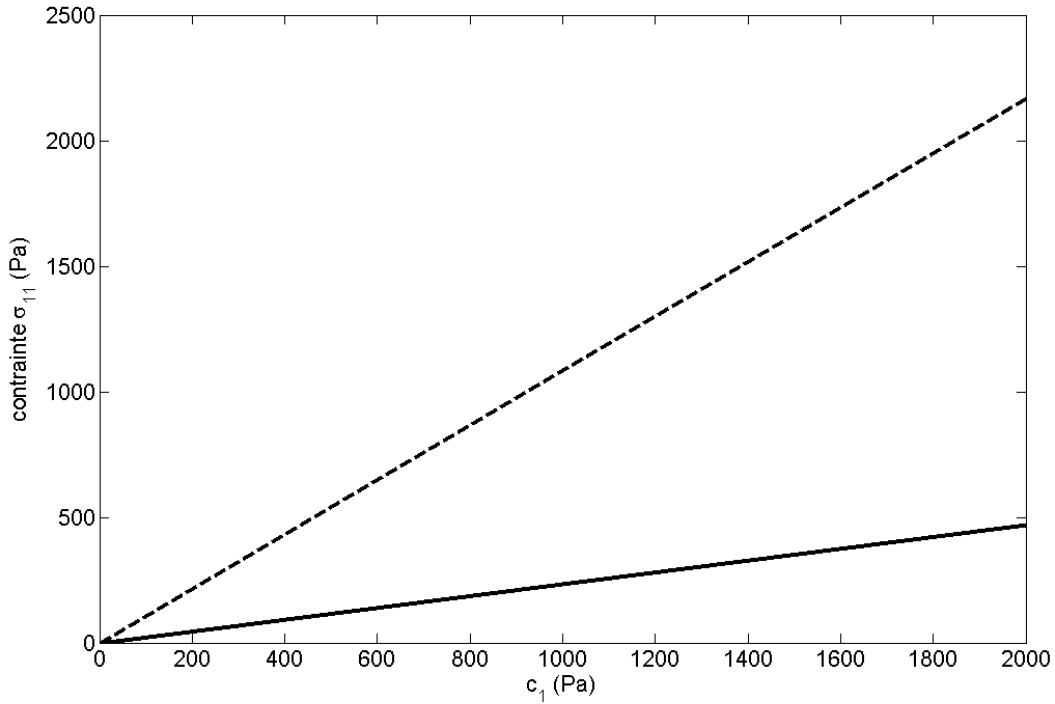


FIG. 7.2.: Mesure de la contrainte sur le bord fixe en fonction du coefficient élastique c_1 . La courbe en trait plein correspond à une déformation de 5% ; celle en pointillés à une déformation de 25%.

7. Méthodes de modélisation du comportement mécanique du biogel

Nous constatons que l'évolution simulée de la contrainte est linéaire en fonction du coefficient c_1 . Ce résultat sera expliqué théoriquement par la suite.

Variation du paramètre β . Nous avons réalisé, en deux dimensions sous l'hypothèse des déformations planes, une compression uniaxiale d'un milieu carré de 25%, selon l'axe des abscisses, pour différentes valeurs du paramètre β .

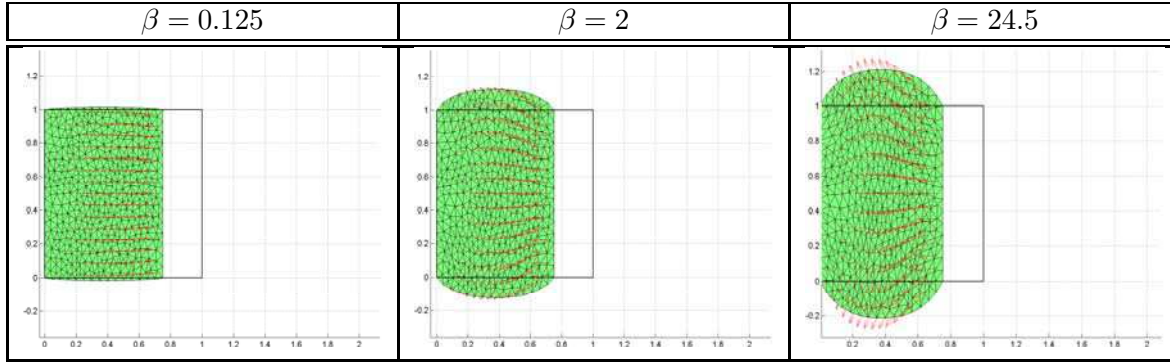


FIG. 7.3.: Influence de coefficient de Poisson sur la réponse mécanique du milieu lors d'une compression uniaxiale.

L'état final d'un milieu élastique, soumis à une compression uniaxiale de 25% selon l'axe des abscisses est représenté pour trois valeur du paramètre β . Le carré (trait plein) correspond à la position de repos, tandis que la figure déformée correspond à l'état final du milieu. Les flèches représentent le vecteur déplacement.

Nous constatons que plus β est grand, moins le milieu est compressible. Grâce à la formule (7.19), nous pouvons relier les valeurs de β aux valeurs du coefficient de Poisson ν . Pour $\beta = 0.125$, $\nu = 0.1$ (gauche), le milieu est donc relativement compressible : la compression selon l'axe des abscisses n'a alors que peu d'effets sur les frontières libres horizontales. Plus le paramètre β augmente, plus le déplacement vertical du gel situé près des frontières horizontales sera important (milieu). Dans le cas où $\beta = 24.5$, correspondant à $\nu = 0.49$, nous constatons que le milieu est quasi-incompressible : il s'étale sur les cotés horizontaux pour compenser la perte de volume due à la compression.

Ces résultats montrent que le comportement qualitatif des simulations numériques est en accord avec la théorie : plus le milieu est incompressible (c'est-à-dire plus le coefficient de Poisson est proche de 0.5), plus le volume tend à se conserver. Ils fournissent donc qualitativement une validation de l'implémentation numérique du comportement mécanique en grandes déformations.

7.6.3.3. Étude de la loi contraintes-déformations

Nous nous intéressons à la loi contrainte-déformations lors de l'expérience de compression uniaxiale précédemment décrite. Nous mesurons, à l'état stationnaire, la contrainte sur la face opposée à celle où la déformation est appliquée pour différentes valeurs imposées de déformations. D'après le système (7.23), la valeur de la contrainte $\sigma_{<11>}$, à l'état d'équilibre, est indé-

pendante de la viscosité. Nous pouvons alors déterminer analytiquement la relation contrainte-déformation dans cet état. Nous obtenons alors :

$$\begin{cases} \lambda_2 &= \lambda_1^{-\frac{\beta}{2\beta+1}} \\ \sigma_{<11>} &= 2c_1 \lambda_1^{\frac{4\beta+1}{2\beta+1}} \left(1 - \lambda_1^{\frac{-6\beta-2}{2\beta+1}} \right) \end{cases} \quad (7.24)$$

Les formules (7.24) permettent de retrouver le résultat qualitatif énoncé précédemment, lors de l'étude de l'influence des paramètres élastiques sur la mesure de la contrainte : la contrainte $\sigma_{<11>}$, à l'état d'équilibre, est linéaire en c_1 dans le cas d'une expérience de traction uniaxiale.

La figure suivante illustre la relation contraintes-déformations obtenue avec une loi néo-hookéenne. Les résultats théoriques précédents sont comparés aux résultats numériques obtenus, en 3D, sans aucune simplification cinématique (cas général).

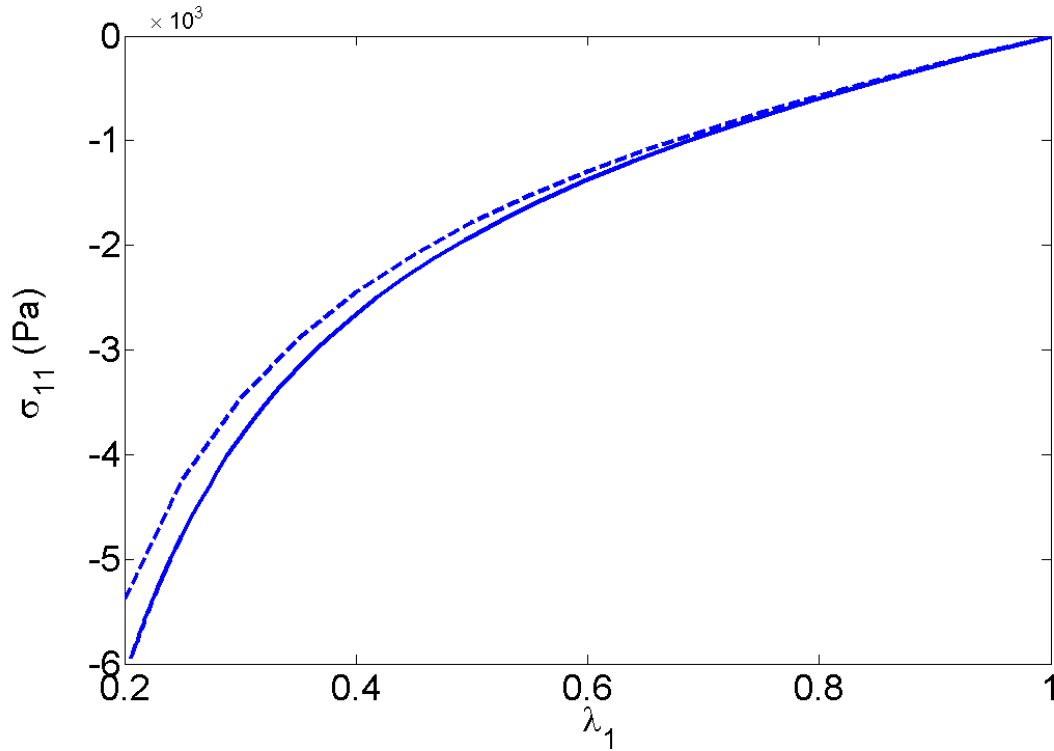


FIG. 7.4.: *Relation contraintes-déformations en mécanique des grandes déformations.* Variation de la contrainte simulée lors d'une expérience de compression uniaxiale en x , sur la face du biogel fixée en abscisse. Les résultats numériques (courbe en trait plein), obtenus dans le cas général (3D, sans hypothèse cinématique) sont confrontés aux résultats analytiques théoriques (trait discontinu (—)). Ces courbes sont obtenues avec $c_1 = 550 \text{ Pa}$ et $\beta = 1/3$.

7. Méthodes de modélisation du comportement mécanique du biogel

Nous déduisons de la figure (7.4) que :

- une bonne concordance entre les approches numériques et théoriques : nous mesurons seulement une différence entre ces deux approches de 9.3% dans le cas extrême où la déformation vaut 80% ($\lambda_1 = 0.2$). Pour une déformation de 50% ($\lambda_1 = 0.5$), l'erreur numérique est de 4.3%. Ces résultats valident quantitativement notre implémentation numérique du comportement élastique en mécanique des grandes déformations.
- que la loi néo-hookéenne utilisée pour le comportement mécanique du biogel est quasi-linéaire en déformations jusqu'à des niveaux des déformations élevés : à 30% de déformations ($\lambda_1 = 0.7$), nous avons seulement une différence de 13 % entre l'approche linéaire et l'approche "grandes déformations".

7.7. Caractérisation des paramètres biomécaniques. Validation du choix de la fonction d'énergie

7.7.1. Expérience de relaxation : résultats expérimentaux

Benkherourou *et al.* (1999, 2000) ont développé un dispositif expérimental, schématisé à la figure (7.5), pour mesurer la contrainte dans le cas d'une expérience de relaxation et en déduire les caractéristiques de la rhéologie du biogel.

Un gel de fibrine subit un échelon de déformation sur une de ses faces, tandis que la contrainte mécanique sur la face opposée, fixée, est mesurée.

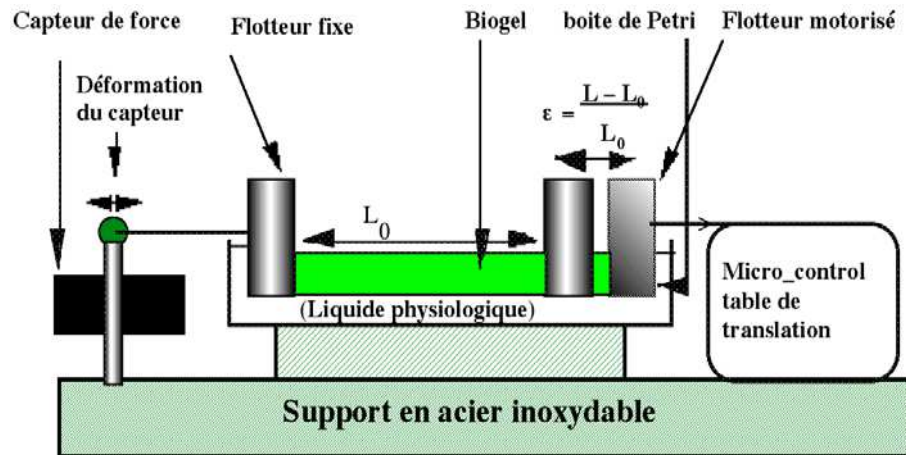


FIG. 7.5.: Schéma du dispositif expérimental de Benkherourou (1999).

Le déplacement d'une frontière mobile du biogel est imposé par le micro-manipulateur (droite), créant ainsi un champ de contraintes dans le biogel. Ces contraintes sont mesurées, sur la face fixée du biogel (gauche), par un capteur de force.

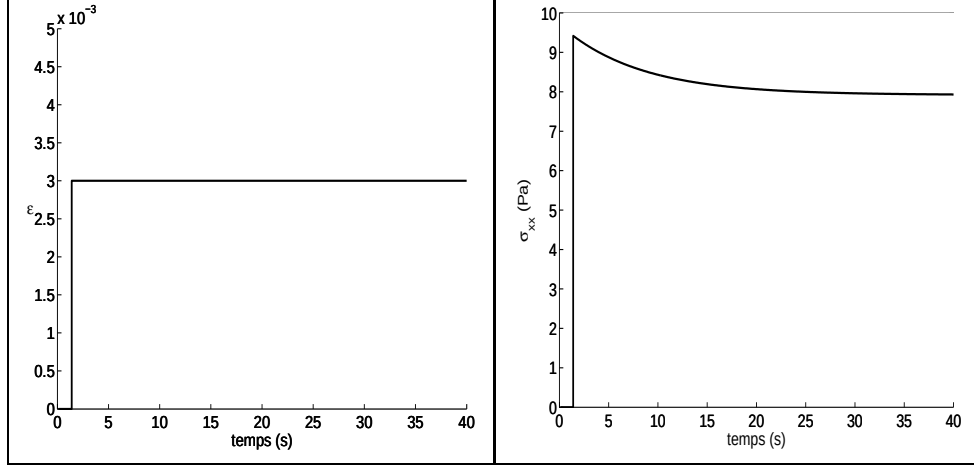


FIG. 7.6.: Résultats expérimentaux de la réponse mécanique d'un biogel lors d'une expérience de relaxation.

Un échelon de déformation (gauche) est appliqué sur un bord libre d'un gel flottant. La contrainte exercée sur la face opposée, fixée en abscisse, est mesurée (droite). Ces résultats sont obtenus pour des concentrations de gel de 1 mg/mL, et sont extraits de Benkherourou et al. (2000).

7.7.2. Détermination de c_1

Pour déterminer la valeur du coefficient d'élasticité c_1 , nous avons vu qu'il n'était pas nécessaire de prendre en compte la viscosité du biogel. En effet, pour un $\lambda_1(t)$ admettant une limite finie quand t tend vers l'infini, la limite de $\sigma_{<11>}$ est indépendante de la viscosité. Physiquement, cela signifie que la viscosité influence le temps de réponse du biogel à une déformation donnée, mais n'influence pas le niveau de contrainte à l'état final.

En fixant $\eta = 0$, nous pouvons résoudre analytiquement le système (7.23). Le système obtenu est le système (7.24).

Soit l et s respectivement les limites, quand t tend vers l'infini, de $\lambda_1(t)$ et $\sigma_{<11>}(t)$. Nous avons alors, d'après (eq. 7.24) :

$$c_1 = \frac{sl^{\frac{-4\beta-1}{2\beta+1}}}{\left(1 - l^{\frac{-6\beta-2}{2\beta+1}}\right)}$$

D'après les résultats expérimentaux (Fig. (7.6)), pour $l = 1.003$, s vaut 7.92 Pa. Nous obtenons alors, avec $\beta = 1/3$, $c_1 = 550.5$ Pa.

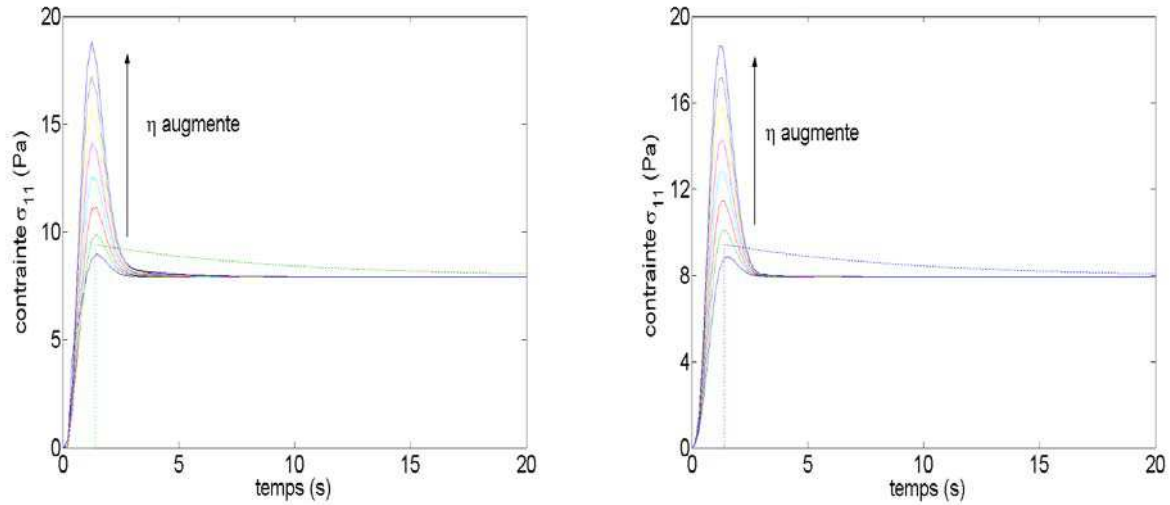
Cette valeur biologiquement admissible (cf partie (7.6.2)) correspondrait, dans une théorie linéarisée, à un module de Young de 2650 Pa.

7.7.3. Détermination de η

Pour déterminer la valeur du coefficient de viscosité η , nous comparons les résultats expérimentaux à ceux obtenus numériquement pour différentes valeurs de ce paramètre. Les résultats numériques seront obtenus avec deux méthodes différentes pour valider l'implémentation numérique du comportement visqueux en mécanique des grandes déformations. Les résultats obtenus par la MEF, dans le cas général (3D, aucune hypothèse sur la cinématique) sont comparés à ceux obtenus, par un schéma de différences finies, à partir du système simplifié (7.23) (1D, traction uniaxiale).

Cette résolution se fera pour 8 valeurs du coefficient de viscosité η , de 200000 à 900000 $Pa.s$ pour étudier comment évolue la réponse en contrainte en fonction de ce paramètre. Une minimisation de l'erreur (définie ci-dessous), par rapport à la courbe expérimentale (7.7.1), sera ensuite effectuée pour trouver le coefficient de viscosité le plus réaliste biologiquement.

7.7.3.1. Solution numérique



(a) Résolution numérique en différences finies. (modèle simplifié)

(b) Résolution numérique en éléments finis. (modèle complet)

FIG. 7.7.: Réponse en contrainte du matériau à l'échelon de déformation pour différentes valeurs de viscosité η .

Les résultats présentés (traits pleins) sont obtenus soit par l'analyse théorique ci-dessus en différences finies (gauche), soit par la modélisation dans le cas général avec une résolution M E F (droite). Nous constatons une bonne concordance entre les deux méthodes. Plus le milieu est visqueux, plus le maximum de la contrainte, au cours du temps, sera grand et plus le milieu mettra du temps à revenir à un état d'équilibre. Les résultats expérimentaux de Benkherourou et al. (2000) sont rappelés (courbe en pointillés).

7.7.3.2. Recherche du coefficient de viscosité le plus réaliste

En comparant la courbe expérimentale (courbe en pointillés, Fig. 7.7) et la courbe obtenue par les simulations numériques (courbes en traits pleins, Fig. 7.7), nous constatons que l'amortissement est trop rapide avec la fonction d'énergie visqueuse que nous avons choisie. En étudiant alors la réponse visqueuse en contrainte, grâce aux équations (7.23), nous constatons qu'il n'est pas possible d'obtenir, avec les fonctions d'énergie considérées, une contrainte finie pour un déplacement infiniment rapide, comme cela tend à être le cas expérimentalement : si $d\lambda_1/dt$ tend vers l'infini, alors $\sigma_{<11>}$ tend également vers l'infini.

Nous en déduisons que ce potentiel visqueux ne peut pas modéliser correctement les expériences de relaxations où les déformations sont imposées avec une grande vitesse.

7.8. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté deux formulations pour modéliser le comportement mécanique des biogels, utilisés lors des expériences d'angiogenèse *in vitro*, dans le cadre de l'élasticité linéaire et en mécanique des grandes déformations. Nous avons décrit mathématiquement les lois viscoélastiques en mécanique des grandes déformations sans postuler aucune hypothèse sur le comportement cinématique du milieu en trois dimensions. Elle est rendue nécessaire par l'absence de symétrie des conditions aux limites et des conditions initiales pour les CE.

Le choix d'une loi constitutive adéquate est essentielle pour décrire correctement le comportement mécanique du biogel. Le modèle proposé, dans ce chapitre, pour traduire le comportement élastique du milieu est le modèle néo-hookéen compressible. L'implémentation numérique de cette formulation a été validée qualitativement en étudiant l'influence des coefficients d'élasticité, c_1 et β , sur le comportement mécanique, et quantitativement par comparaison avec les résultats analytiques dans le cas simplifié d'expériences de traction uniaxiale. Nous avons caractérisé ces coefficients élastiques par comparaison avec les mesures expérimentales (Benkherrourou *et al.* (2000)) ; les valeurs obtenues se situent dans une gamme biologiquement réaliste ($c_1 = 550 \text{ Pa}$ et $\beta = 1/3$).

Nous avons modélisé le comportement visqueux du biogel en utilisant la fonction d'énergie visqueuse développée par Fernandes-Morin (2000). Cette fonction d'énergie visqueuse a été utilisée avec succès lors d'expérience de traction uniaxiale à vitesse lente ($v = 20 \mu\text{m/s}$), mais nous avons montré qu'elle ne traduisait pas correctement le comportement visqueux du biogel avec des vitesses de déformations plus élevée. En effet, une comparaison quantitative avec les résultats expérimentaux a montré que la fonction d'énergie visqueuse ne pouvait pas reproduire les résultats expérimentaux de Benkherrourou *et al.* (2000). Pour caractériser les effets visqueux du biogel à partir de ces résultats expérimentaux, il est donc nécessaire d'utiliser de nouvelles fonctions d'énergie visqueuse, telles celles développées par Ramtani (2003).

8. Validation mathématique des méthodes de résolution numérique

8.1. Introduction : de la nécessité de vérifier les résultats numériques

La modélisation de l'angiogenèse *in vitro* effectuée précédemment a conduit au système d'équations aux dérivées partielles couplées non-linéaires (3.35), constitué de termes paraboliques (diffusion) et hyperboliques (convection). Il n'existe pas, à ce jour, de solutions explicites à ce système, sauf si de nombreuses hypothèses réductrices sont faites ; une méthode de résolution numérique est donc nécessaire pour en déterminer des solutions approchées. La méthode numérique utilisée est la méthode des éléments finis (MEF) dont nous présenterons le principe au paragraphe (§ 8.2).

Malgré la robustesse de cette méthode, il nous est apparu nécessaire de vérifier, au moins dans des cas simples, l'exactitude des solutions calculées. En effet, vue la complexité du système d'équations aux dérivées partielles (EDP), il est probable qu'une méthode de résolution non adaptée conduisent à des résultats erronés, dus à des instabilités numériques. L'analyse de stabilité linéaire, effectuée lors du chapitre (4), a permis de déterminer des jeux de paramètres pour lesquels une instabilité mécanique avait lieu et d'isoler alors les modes propres instables. Elle fournit donc un moyen de valider qualitativement les méthodes de résolutions numériques : la réorganisation ne doit avoir lieu que pour certaines valeurs de paramètres. Cependant, cette analyse n'est valable qu'au voisinage de l'état stationnaire, c'est-à-dire tant que les effets non-linéaires n'interviennent pas. Ce problème peut être en partie résolu en utilisant des techniques de développements asymptotiques, comme celle utilisée par Cruywagen *et al.* (1997) dans un modèle mécanique similaire mais plus simple, ou encore celle utilisée par Piechor et Kazmierczak (2002) pour analyser les solutions dues à la propagation d'ondes. Nous allons développer une analyse non-linéaire de perturbation, au voisinage d'un point de bifurcation pour prédire le comportement asymptotique de la solution et valider ainsi quantitativement, par comparaison avec les simulations, notre résolution numérique.

Nous validerons donc le modèle qualitativement (§ 8.3.1) et quantitativement (§ 8.3.2), montrant ainsi que les résultats obtenus sont valables et qu'ils peuvent expliquer le processus de réorganisation cellulaire et matricielle.

8.2. La méthode des éléments finis

Dans cette partie, nous donnons au lecteur non-spécialiste des méthodes de résolution numérique une première approche de la MEF et des raisons de son efficacité. Il est difficile de rester généraliste sans être imprécis ; pour cela, les mots nécessitant plus de précisions mathématiques

seront utilisés entre guillemets. Le lecteur pourra alors se reporter à Lucquin (1996); Nicaise (2000) pour avoir plus détails.

8.2.1. Principe de la méthode

La MEF est une méthode de calcul numérique pour résoudre des systèmes d'EDP. Les solutions de ce système appartiennent à l'espace mathématique de dimension infinie des "fonctions variant en espace (2D ou 3D) et en temps", que nous appelons $\mathbb{H}$. L'idée fondatrice de la MEF est d'approcher l'espace $\mathbb{H}$ par des espaces plus simples $\mathbb{H}_n$, de dimension finie n , où il sera possible d'exprimer les solutions recherchées comme combinaisons linéaires d'éléments de la base de $\mathbb{H}_n$. Pour présenter un intérêt, il faut que ces espaces $\mathbb{H}_n$ ne "diffèrent pas trop" de $\mathbb{H}$: lorsque la dimension de $\mathbb{H}_n$ augmente, la suite d'espace $(\mathbb{H}_n)_{n \in \mathbb{N}}$ doit "converger" vers $\mathbb{H}$. La solution calculée correspond à une projection (au sens d'un produit scalaire adapté) sur $\mathbb{H}_n$ de la solution dans $\mathbb{H}$. En pratique, ces espaces sont construits grâce à une discrétisation, en éléments, adaptée du milieu constitué de la MEC et des CE. Ces éléments sont connectés entre eux par des noeuds. La discrétisation (noeuds et éléments) se nomme maillage.

En chaque noeud du maillage, nous allons calculer la valeur exacte des solutions de notre formulation faible (voir § 8.2.2), et, sur chaque élément, les solutions sont approchées par des fonctions polynomiales, dont le degré est appelé l'ordre de l'élément. Ces fonctions locales ont l'avantage d'être plus simple que celles que l'on pourrait éventuellement utiliser pour représenter la totalité de l'objet.

Ensuite, les matrices de rigidité élémentaires et des vecteurs de chargement sont construites par la résultante de l'interaction de chaque élément avec les autres. Ces matrices élémentaires sont alors assemblées pour former la matrice de rigidité globale. Les valeurs de la solution aux noeuds du maillage se déduisent donc de la résolution linéaire de cette relation reliant les déplacements nodaux aux chargements nodaux pour l'intégralité de l'objet (la structure).

8.2.2. Formulation variationnelle

Pour pouvoir calculer la solution dans l'espace de dimension finie, il est nécessaire reformuler le problème initial. Cette nouvelle formulation sera appelée formulation faible. Grossièrement, nous reformulons le problème "trouver $\{u \in \mathbb{H} / \frac{\partial u}{\partial t} + \nabla \cdot \mathbf{J} = F\}$ " sous la forme "trouver $\{u \in \mathbb{H} / \forall v \in \mathbb{H}, a(u, v) = l(v)\}$ " où $a(., .)$ est une forme bilinéaire symétrique définie positive, $l(.)$ est une forme linéaire. En pratique, nous cherchons les solutions au problème faible dans le sous espace $\mathbb{H}_n \subset \mathbb{H}$.

L'emploi de l'adjectif faible se justifie par le fait que toute solution du problème initial (formulation forte) est nécessairement solution du problème avec la formulation faible, la réciproque n'étant pas automatique. Ainsi, une solution de la formulation faible est plus faible (dans le sens moins général) qu'une solution de la formulation forte. La formulation faible, dans notre cas, n'a d'intérêt que si elle est équivalente à la formulation forte, c'est à dire qu'une solution faible est également solution de la formulation forte. Des théorèmes permettent de justifier, sous certaines conditions, l'équivalence des deux formulations (théorème de Lax-Milgram (Lucquin (1996); Nicaise (2000)) ou, plus généralement, théorème de Stampacchia (Brezis (1999))). Sous ces conditions, la solution de la formulation faible sera une bonne approximation de la solution du problème initial.

Le lecteur intéressé par plus de détails (conditions d'application du théorème, unicité des solutions, etc...) pourra se reporter à Lucquin (1996) et Nicaise (2000).

8.2.3. Implémentation

Nous avons résolu le système d'EDP en 2D (eq. 3.35) par la MEF, avec le logiciel Femlab[©] (Comsol, France) sur un ordinateur personnel (PC) Pentium IV. Les calculs 3D, nécessitant plus de mémoire, ont été réalisés sur la grappe de calcul intensif BioImage (projet CIMENT : 20 PC biprocesseurs avec 3Go de RAM chacun).

Le domaine spatial, 2D ou 3D, a été maillé selon l'algorithme de Delaunay (voir par exemple George (1997)). Nous avons fait varier les caractéristiques de ce maillage pour s'assurer que les solutions calculées n'en n'étaient pas dépendantes. Les résultats 2D ont été obtenus avec un maillage constitué de 1000 noeuds et de 2500 éléments, et ceux 3D avec un maillage de 500 noeuds et de 2500 éléments. Les éléments sont triangulaires d'ordre 4 pour l'équation de mécanique et d'ordre 2 pour les autres équations. L'intégration numérique de la formulation dépendante du temps a été obtenues par les algorithmes de résolutions numériques à plusieurs pas *ode15s* de Matlab[©] et *fdaspk* de Femlab[©].

8.3. Validation de la méthode

8.3.1. Validation qualitative (AL)

Sous l'hypothèse H1 (§ 3.1), l'analyse de stabilité linéaire (chapitre 4) permet de déterminer, en choisissant comme paramètre de bifurcation la traction cellulaire τ , une valeur critique $\tau_{turing} = \frac{\lambda+2\mu+2\sqrt{s(2\mu\beta_1+\lambda\beta_2)}}{\left(\frac{3N_2}{2}-2\right)+\frac{h}{D_0}(N_2-2)}$ au dessus de laquelle une instabilité dynamique apparaît, pouvant engendrer une réorganisation de la MEC et des CE. Cette analyse linéaire mathématique nous fournit donc un moyen de valider qualitativement le comportement simulé de la MEC et de la population de CE : la réorganisation ne doit avoir lieu que pour des valeurs précises des paramètres.

Nous avons simulé le modèle dans les cas théoriquement stable (retour à l'état homogène) et instable (création de lacunes) de l'état d'équilibre homogène, en ne changeant que la valeur de l'amplitude de la traction cellulaire. Cette comparaison a permis de valider notre analyse de stabilité linéaire en observant le changement de comportement lorsque l'amplitude de la traction cellulaire devenait plus grande que la valeur critique τ_{turing} , et de valider l'algorithme de résolution numérique.

8.3.1.1. Cas stable : retour à l'état homogène

Dans ce paragraphe, nous simulons le modèle pour un jeu de paramètre tel que la condition de bifurcation ne soit pas satisfaite ($\tau < \tau_{turing}$).

8. Validation mathématique des méthodes de résolution numérique

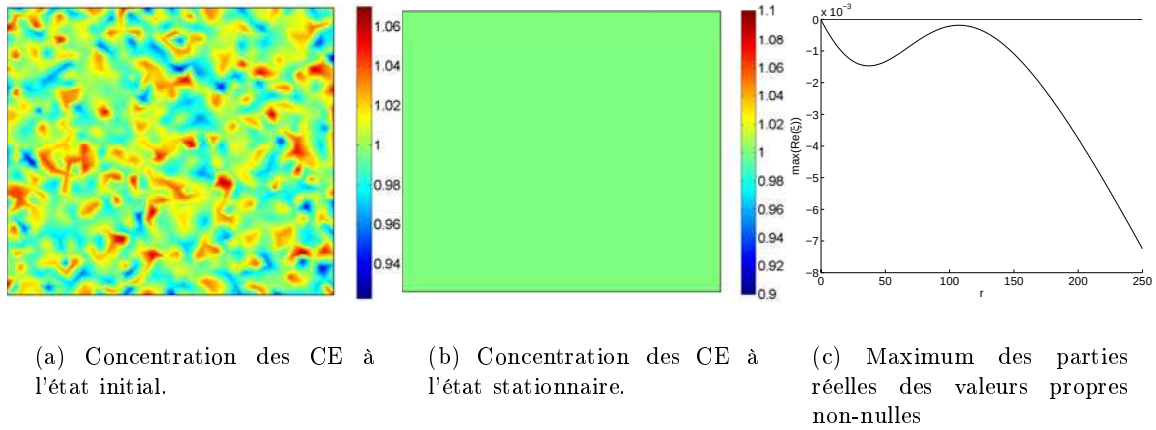


FIG. 8.1.: *Validation qualitative du comportement du système dans le cas stable. Simulation du modèle d'angiogenèse in vitro avec un jeu de paramètres théoriquement choisis tels que l'état homogène soit stable. Les paramètres normalisés utilisés pour cette simulation sont : $\tau = 0.67$, $\lambda = 0.1543$, $\mu = 0.2314$, $\mu_1 = \mu_2 = 0.0003$, $\beta_1 = \beta_2 = 0.012333$, $D_0 = 8 \cdot 10^{-6}$, $h = 4 \cdot 10^{-5}$, $N_2 = 6$, $s = 8800$. La formule (4.9) nous permet de calculer $\tau_{turing} = 0.679$.*

Pour ce jeu de paramètres, les valeurs propres sont toujours à parties réelles négatives (Fig. 8.1, c). La théorie nous apprend que, dans ce cas, les perturbations vont décroître exponentiellement vers 0 ; ainsi, la solution tendra vers un état d'équilibre homogène. Nous constatons, conformément à la théorie, que la solution stationnaire est homogène (Fig. 8.1, b).

8.3.1.2. Cas instable : création de lacunes

Nous avons également simulé le modèle pour des jeux de paramètres satisfaisant la condition de bifurcation, $\tau > \tau_{turing}$.

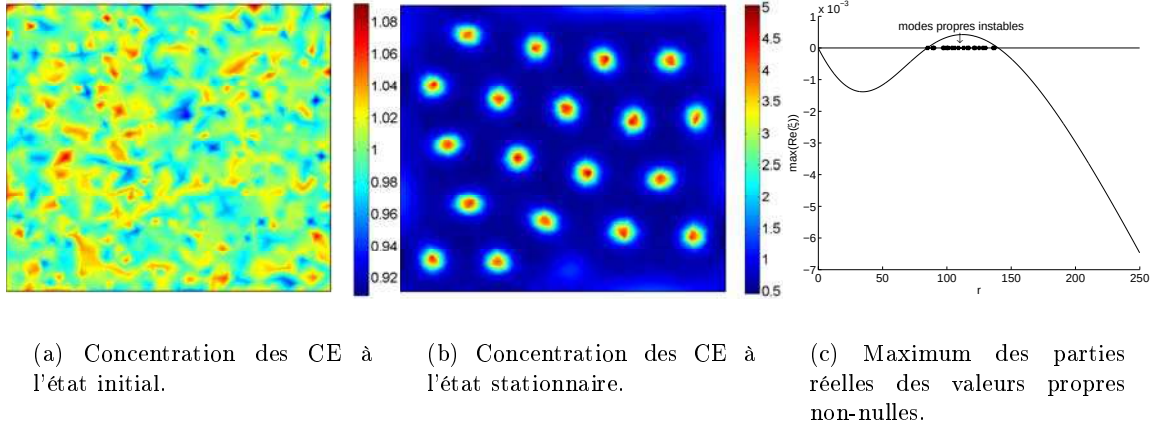


FIG. 8.2.: *Validation qualitative du comportement du système dans le cas instable. Simulation du modèle d'angiogenèse in vitro avec un jeu de paramètre théoriquement choisis tels que l'état homogène soit instable. Les paramètres normalisés utilisés pour cette simulation sont les mêmes que lors de la figure (8.1), sauf $\tau = 0.7$. τ_{turing} est donc inchangé par rapport à la figure (8.1).*

Pour ce jeu de paramètres, il existe des modes propres instables (Fig. 8.2, c). Ainsi, une réorganisation morphologique des CE peut avoir lieu. Nous constatons, en effet, que les CE, distribuées initialement de façon quasi-homogène (Fig. 8.2, a), mais légèrement bruitée, se réorganisent en “pic” (Fig. 8.2, b).

Le changement qualitatif de comportement morphologiques des CE, pour une petite modification du paramètre de bifurcation (4.3 %), nous montre d'abord que l'analyse de stabilité est capable de prédire le seuil au dessus duquel une instabilité mécanique a lieu, et également que la méthode de résolution numérique est capable de simuler avec succès ces deux comportements morphologiquement différents.

8.3.2. Validation quantitative : Analyse non-linéaire de perturbation

8.3.2.1. Principe de l'analyse de perturbation

Les limitations de l'analyse de stabilité linéaire, évoquées précédemment, peuvent être en partie dépassées grâce à une analyse non-linéaire de perturbation, en écrivant le terme de bifurcation au voisinage de la valeur critique par un développement asymptotique en puissances entières d'une perturbation à trois échelles de temps. Ces trois échelles de temps correspondent aux instants temporels où différents phénomènes se produisent : la première échelle de temps est le développement de la perturbation à partir de son état initial. Durant cette phase, nous nous attendons à ce que l'analyse de stabilité linéaire soit vérifiée. La seconde correspond au moment où les effets des phénomènes non-linéaires deviennent importants, la solution continuant d'évoluer temporellement en s'approchant de l'état stationnaire qui est la troisième phase, atteinte à la limite quand le temps tend vers l'infini.

Le système complet est extrêmement complexe et, évidemment, ce développement asymp-

totique va engendrer des calculs algébriques pénibles. Une phase de simplification du modèle est souhaitable. Nous effectuons donc quelques hypothèses raisonnables biologiquement, tout en gardant l'essentiel des caractéristiques biologiques du modèle complet.

8.3.2.2. Simplification du modèle

Simplification de la force de rappel élastique. En deux dimensions, l'attachement du gel à la boîte de Petri sur sa face inférieure est modélisée par une force de rappel élastique $R = s\mathbf{u}/\rho$. En appliquant également l'hypothèse des petites déformations à cette formule, conduisant à la linéarisation au voisinage de l'état d'équilibre, ce terme devient $R = s\mathbf{u}$.

Réduction du nombre d'équations. Le nombre d'équation du système est de quatre en deux dimensions (une pour la dynamique des CE, une pour celle de la MEC, et deux pour les composantes du vecteur déplacement) et de cinq en trois dimensions (trois équations pour le déplacement). Nous réduisons le nombre d'équations du système en ne prenant plus comme inconnue les composantes du vecteurs déplacement $\mathbf{u}$, mais dilatation θ définie comme la divergence de ce vecteur ($\theta = \nabla \cdot \mathbf{u}$). La divergence de l'équation de mécanique s'écrit alors :

$$(2\mu + \lambda)\nabla^2\theta + (\mu_1 + \mu_2)\frac{\partial}{\partial t}\nabla^2\theta - (2\mu\beta_1 + \lambda\beta_2)\nabla^4\theta + \nabla^2(\tau\rho n(N_2 - n)) = s\theta$$

Dans le cadre de l'hypothèse (H1) (§ 3.1) où l'instabilité mécanique est engendrée uniquement par l'équilibre entre les forces de traction cellulaire et la résistance passive de la MEC, nous obtenons comme relation entre la densité de MEC et la dilatation, par linéarisation au voisinage de l'état d'équilibre $\rho = 1$, $\rho = 1 - \theta$. Nous obtenons ainsi un système non-linéaire à deux équations (§ 8.3.2.3).

Simplification de la résolution. Nous nous intéressons au cas simple où il n'y a qu'un seul mode propre instable k_c . Soit ϕ le nombre d'onde correspondant à ce mode propre instable ($\phi = k_c\pi/L$ où L est la taille du domaine).

De plus, nous allons considérer une version simplifiée de notre système en 1D. Le fait de réduire la dimension de l'espace d'étude n'apporte pas de simplification conceptuelle, mais simplifie grandement les calculs lors de la recherche d'une solution particulière du paragraphe (8.3.2.6). Une résolution dans des espaces de dimensions supérieurs est envisageable, mais ajoute des difficultés calculatoires.

8.3.2.3. Équations résultantes

D'après les simplifications précédentes, l'équation de conservation des cellules endothéliales, à l'état stationnaire, s'écrit :

$$\nabla \cdot [-D_0 \nabla n - hn \nabla \theta] = 0 \quad (8.1)$$

et la divergence de l'équation de mécanique s'écrit :

$$(2\mu + \lambda)\nabla^2\theta - (2\mu\beta_1 + \lambda\beta_2)\nabla^4\theta + \nabla^2(\tau\rho n(N_2 - n)) = s\theta$$

Nous renormalisons cette équation avec les paramètres suivants :

$$\beta^* = \frac{2\mu\beta_1 + \lambda\beta_2}{2\mu + \lambda}, \quad \tau^* = \frac{\tau}{2\mu + \lambda}, \quad s^* = \frac{s}{2\mu + \lambda}$$

Nous obtenons alors :

$$\nabla^2\theta - \beta^*\nabla^4\theta + \nabla^2(\tau^*(1-\theta)n(N_2 - n)) = s^*\theta \quad (8.2)$$

Par la suite, les astérisques seront omis par souci de lisibilité.

8.3.2.4. Conditions aux limites

Les conditions aux limites restent inchangées, à savoir des conditions de flux nul pour les CE et pour la MEC. Comme $\theta = 1 - \rho$, nous avons :

$$\begin{cases} \nabla n \cdot \boldsymbol{\eta} = 0 \\ \nabla \theta \cdot \boldsymbol{\eta} = 0 \end{cases} \quad (8.3)$$

8.3.2.5. Développement en puissance entière du paramètre de bifurcation τ et du temps t

Conformément aux principes de l'analyse de perturbation rappelés ci-dessus, nous allons développer le paramètre de bifurcation τ et le temps selon deux échelles de temps T_1 et T_2 . La troisième échelle de temps sera obtenue par passage à la limite ($\lim_{T_2 \rightarrow \infty}$). Pour alléger les notations, τ_{turing} est noté τ_c .

$$\tau = \tau_c + \epsilon\tau_1 + \epsilon^2\tau_2 \quad (8.4)$$

$$t = \frac{T_1}{\epsilon} + \frac{T_2}{\epsilon^2}$$

Le paramètre ϵ , décrivant la perturbation, étant petit.

8.3.2.6. Calculs algébriques

Développement en puissance entière du terme de traction. Nous développons le terme de traction cellulaire, selon la formalisation algébrique suivante, en utilisant $\tilde{n} = n - 1$:

$$(1 - \theta)n(N_2 - n) = P_1\tilde{n} + P_2\theta + P_3\tilde{n}^2 + P_4\tilde{n}\theta + P_5\tilde{n}^2\theta + c^{st} \quad (8.5)$$

où les coefficients $\{P_i, i = 1..5\}$ valent :

$$P_1 = N_2 - 2, \quad P_2 = 1 - N_2, \quad P_3 = -1, \quad P_4 = 2 - N_2, \quad P_5 = 1$$

En intégrant les relations (8.4), (8.5) et en utilisant $\tilde{n} = n - 1$ dans les équations (8.1) et (8.2), nous obtenons alors :

$$(1 + \tau_c P_2)\nabla^2\theta - \beta\nabla^4\theta + \tau_c P_1\nabla^2\tilde{n} - s\theta = -\epsilon(\tau_1 + \epsilon\tau_2)\nabla^2(P_1\tilde{n} + P_2\theta) - (\tau_c + \epsilon\tau_1)\nabla^2(P_3\tilde{n}^2 + P_4\tilde{n}\theta + P_5\tilde{n}^2\theta) \quad (8.6)$$

$$D_0 \nabla^2 \tilde{n} + h \nabla^2 \theta = -h \nabla \cdot [\tilde{n} \nabla \theta] \quad (8.7)$$

Développement en puissances entières de $\tilde{n}$ et θ . Nous effectuons un développement en puissance entière des inconnues $\tilde{n}$ et θ :

$$\tilde{n}(x, \epsilon, T_j) = \epsilon n_1(x, \epsilon, T_j) + \epsilon^2 n_2(x, \epsilon, T_j) + \epsilon^3 n_3(x, \epsilon, T_j) \quad (8.8)$$

$$\theta(x, \epsilon, T_j) = \epsilon \theta_1(x, \epsilon, T_j) + \epsilon^2 \theta_2(x, \epsilon, T_j) + \epsilon^3 \theta_3(x, \epsilon, T_j) \quad (8.9)$$

où les inconnues $\tilde{n}_i$ et θ_i , $i = 1..3$, sont fonctions de x , ϵ et T_j , $j = 1, 2$.

En insérant les développements en puissance entière (8.8) et (8.9) dans les équations (8.6) et (8.7), nous obtenons :

$$\epsilon \mathbf{L} \begin{bmatrix} \theta_1 \\ n_1 \end{bmatrix} + \epsilon^2 \mathbf{L} \begin{bmatrix} \theta_2 \\ n_2 \end{bmatrix} + \epsilon^3 \mathbf{L} \begin{bmatrix} \theta_3 \\ n_3 \end{bmatrix} = \mathbf{G} \quad (8.10)$$

où $\mathbf{L}$ est l'opérateur linéaire suivant :

$$\mathbf{L} \equiv \begin{bmatrix} -\beta \nabla^4 + (1 + \tau_c P_2) \nabla^2 - s & \tau_c P_1 \nabla^2 \\ h \nabla^2 & D_0 \nabla^2 \end{bmatrix}$$

et $\mathbf{G}$ est le vecteur des termes non-linéaires dépendants de ϵ .

$$\mathbf{G} \equiv \begin{bmatrix} -\epsilon(\tau_1 + \epsilon \tau_2) \nabla^2 (P_1 \tilde{n} + P_2 \theta) - (\tau_c + \epsilon \tau_1) \nabla^2 (P_3 \tilde{n}^2 + P_4 \tilde{n} \theta + P_5 \tilde{n}^2 \theta) \\ -h \nabla \cdot [\tilde{n} \nabla \theta] \end{bmatrix}$$

En identifiant les termes en ϵ , nous réduisons alors notre système d'équations non-linéaires à une succession de systèmes linéaires.

Il sera pratique d'utiliser la matrice déduite de l'action de l'opérateur $\mathbf{L}$ sur les termes de la forme $e^{i\phi x}$:

$$\mathbf{L}_\phi \equiv \begin{bmatrix} -\beta \phi^4 + (1 + \tau_c P_2) \phi^2 - s & \tau_c P_1 \phi^2 \\ h \phi^2 & D_0 \phi^2 \end{bmatrix}$$

Identification des termes à $O(\epsilon)$. En identifiant les termes de l'équation (8.10) en $O(\epsilon)$, nous obtenons l'équation suivante :

$$\mathbf{L} \begin{bmatrix} \theta_1 \\ n_1 \end{bmatrix} = 0 \quad (8.11)$$

Cela n'est pas surprenant : par construction de $\mathbf{G}$, il n'y a pas de terme linéaire en ϵ .

En supposant que ϕ est le nombre d'ondes correspondant au mode propre instable, nous obtenons, en résolvant l'équation (8.11), avec les conditions aux limites (8.3) :

$$\begin{bmatrix} \theta_1 \\ n_1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ M \end{bmatrix} A(T_1, T_2) \cos(\phi x) \quad (8.12)$$

Nous obtenons, de l'équation $\mathbf{L}_\phi \begin{bmatrix} 1 \\ M \end{bmatrix} = 0$, $M = -\frac{h}{D_0}$.

Il reste à déterminer $A(T_1, T_2)$.

Identification des termes à $O(\epsilon^2)$. L'identification des termes à $O(\epsilon^2)$ conduit à l'équation suivante :

$$L \begin{bmatrix} \theta_2 \\ n_2 \end{bmatrix} = \mathbf{S} \quad (8.13)$$

où les composantes $S^{(1)}$ et $S^{(2)}$ du vecteur $\mathbf{S}$ valent :

$$\begin{aligned} S^{(1)} &= -\tau_1 \nabla^2 (P_1 n_1 + P_2 \theta_1) - \tau_c \nabla^2 (P_3 n_1^2 + P_4 n_1 \theta_1) \\ S^{(2)} &= -h \nabla \cdot [n_1 \nabla \theta_1] \end{aligned} \quad (8.14)$$

L'expression explicite du vecteur $\mathbf{S}$ est obtenue en remplaçant θ_1 et n_1 par les expressions précédemment trouvées. Cette expression sera précisée par la suite.

L'équation homogène (8.11) admet des solutions non triviales (*cf* eq. (8.12)). Nous pouvons alors nous poser la question de l'existence de solution pour l'équation (8.13). En effet, l'équation (8.11) est le cas homogène de l'équation (8.13).

Alternative de Fredholm. L'alternative de Fredholm est un moyen de déterminer des conditions d'existence de solutions de systèmes linéaires non homogènes, quand le noyau de ce système linéaire n'est pas réduit au singleton vecteur nul, c'est-à-dire quand l'équation homogène admet des solutions non triviales (Brezis (1999)).

Une solution de l'équation (8.13) $\mathbf{w} \equiv \begin{bmatrix} \theta_2 \\ n_2 \end{bmatrix}$ existe si et seulement si l'alternative de Fredholm est satisfaite, à savoir si et seulement si nous avons :

$$\langle \mathbf{w}^*, \mathbf{S} \rangle = 0$$

où $\mathbf{w}^*$ est la solution du problème homogène adjoint de (8.11), et $\langle, \rangle$ est le produit scalaire défini comme suit :

$$\langle \mathbf{v}, \mathbf{w} \rangle = \int_0^{\frac{2\pi}{\phi}} (v^{(1)} \overline{w^{(1)}} + v^{(2)} \overline{w^{(2)}}) dx$$

où la barre correspond au complexe conjugué.

Dans notre cas, l'opérateur adjoint de $\mathbf{L}$, $\mathbf{L}^*$ est $\mathbf{L}^T$. $\mathbf{w}^*$ s'écrit donc :

$$\mathbf{w}^* = \begin{bmatrix} 1 \\ M^* \end{bmatrix} A^* \cos(\phi x)$$

où A^* est réel et M^* est obtenu en résolvant le système $\mathbf{L}_\phi^T \begin{bmatrix} 1 \\ M^* \end{bmatrix} = 0$, d'où $M^* = -\frac{\tau_c P_1}{D_0}$.

En appliquant ces formules, à $O(\epsilon^2)$, nous obtenons l'équation suivante :

$$A(T_1, T_2) \left(\frac{P_1 \tau_c h \frac{\partial A(T_1, T_2)}{\partial T_1}}{D_0} - A(T_1, T_2) \tau_1 \phi^2 (P_1 h - P_2 D_0) \right) = 0 \quad (8.15)$$

8. Validation mathématique des méthodes de résolution numérique

Pour que l'équation (8.15) soit satisfaite pour des valeurs non triviales de la fonction $A(T_1, T_2)$, assurant ainsi l'existence d'une solution à l'équation (8.13), nous fixons $\tau_1 = 0$ et nous supposons que l'amplitude de $A(T_1, T_2)$ ne dépend plus maintenant que de T_2 dans nos développements en puissances entières.

Résolution à $O(\epsilon^2)$. Classiquement, la solution de l'équation (8.13) est la somme de la solution de l'équation homogène, et d'une solution particulière.

$$\begin{bmatrix} \theta_2 \\ n_2 \end{bmatrix} = \underbrace{\begin{bmatrix} \theta_2^h \\ n_2^h \end{bmatrix}}_{\text{solution homogène}} + \underbrace{\begin{bmatrix} \theta_2^p \\ n_2^p \end{bmatrix}}_{\text{solution particulière}}$$

Calcul de la solution homogène. L'équation (8.11) est le cas homogène de l'équation (8.13). Une solution homogène de l'équation (8.13) est donc, à une constante multiplicative près α , $\begin{bmatrix} \theta_1 \\ n_1 \end{bmatrix}$:

$$\begin{bmatrix} \theta_2^h \\ n_2^h \end{bmatrix} = \alpha \begin{bmatrix} \theta_1 \\ n_1 \end{bmatrix}$$

Calcul de la solution particulière l'équation. En remplaçant θ_1 et n_1 dans l'équation (8.14), avec $\tau_1 = 0$ et $T_1 = 0$, nous obtenons l'expression des composantes du vecteur $\mathbf{S}$. Ces expressions nous permettent de déterminer une solution particulière $\begin{bmatrix} \theta_2^p \\ n_2^p \end{bmatrix}$.

En remplaçant θ_1 et n_1 dans l'équation (8.14), avec $\tau_1 = 0$ et $\partial A / \partial T_1 = 0$, nous obtenons :

$$\begin{aligned} S^{(1)} &= 2MA(T_2)^2\phi^2\tau_c\cos(2\phi x)(P_3M + P_4) \\ S^{(2)} &= hM\phi^2A(T_2)^2\cos(2\phi x) \end{aligned}$$

La forme des composantes du vecteur $\mathbf{S}$ nous incite à rechercher une solution particulière de la forme :

$$\begin{bmatrix} \theta_2^p \\ n_2^p \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha_\theta A(T_2)^2\cos(2\phi x) \\ \alpha_n A(T_2)^2\cos(2\phi x) \end{bmatrix} \quad (8.16)$$

En reportant dans l'équation (8.13) et en identifiant les termes, nous pouvons déterminer α_θ et α_n :

$$\begin{aligned} \alpha_\theta &= \frac{\phi^2\tau_ch(-2P_3h+2P_4D_0-P_1h)}{4D_0\phi^2(4\beta\phi^2D_0+D_0-P_1\tau_ch+\tau_cP_2D_0)+sD_0^2} \\ \alpha_n &= \frac{h^2(8\phi^2\tau_cP_3h-8\phi^2\tau_cP_4D_0+16\beta\phi^4D_0+4\phi^2D_0+sD_0+4\phi^2\tau_cP_2D_0)}{D_0^2(16\beta\phi^4D_0+4\phi^2D_0-4P_1\tau_ch\phi^2+sD_0+4\phi^2\tau_cP_2D_0)} \end{aligned}$$

Identification des termes à $O(\epsilon^3)$. À $O(\epsilon^3)$, nous avons :

$$\mathbf{L} \begin{bmatrix} \theta_3 \\ n_3 \end{bmatrix} = \mathbf{R} \quad (8.17)$$

où les composantes $R^{(1)}$ et $R^{(2)}$ du vecteur $\mathbf{R}$ valent :

$$\begin{aligned} R^{(1)} &= -\tau_1 \nabla^2 [P_1 n_2 + P_2 \theta_2] - \tau_2 \nabla^2 [P_1 n_1 + P_2 \theta_1] - \tau_c \nabla^2 [2P_3 n_1 n_2 + P_4 (n_1 \theta_2 + n_2 \theta_1) \\ &\quad + P_5 n_1^2 \theta_1] - \tau_1 \nabla^2 [P_3 n_1^2 + P_4 n_1 \theta_1] \\ R^{(2)} &= \delta \frac{\partial n_1}{\partial T_2} - h \nabla \cdot [n_2 \nabla \theta_1 + n_1 \nabla \theta_2] \end{aligned}$$

L'expression explicite des composante du vecteur R peut se trouver en remplaçant n_1, n_2, θ_1 et θ_2 par leur expressions ci-dessus.

Comme précédemment, nous nous servons de l'alternative de Fredholm pour déterminer les conditions d'existence des solutions de l'équation (8.17).

Alternative de Fredholm à $O(\epsilon^3)$. Par l'utilisation de l'alternative de Fredholm à $O(\epsilon^3)$, nous trouvons que la fonction $A(T_2)$ doit satisfaire l'équation de Landau dans le cas stationnaire :

$$0 = K A(T_2) + \Gamma A(T_2)^3 \quad (8.18)$$

Les expressions de K et Γ sont détaillées dans l'appendice "Analyse de stabilité non-linéaire".

L'équation (8.18) n'admet comme état d'équilibre fini non nul uniquement la solution $\sqrt{\frac{-K}{\Gamma}}$.

Dans ce cas d'existence de l'état stationnaire, nous obtenons donc comme valeur de A selon la troisième échelle de temps :

$$\lim_{T_2 \rightarrow \infty} A(T_2) = \sqrt{\frac{-K}{\Gamma}}$$

Solution asymptotique du modèle simplifié. Nous avons pu déterminer quantitativement les solutions de notre modèle (simplifié en une dimension) au delà du voisinage du point de bifurcation par une analyse de stabilité non-linéaire de l'état d'équilibre homogène. Elles valent :

$$\begin{aligned} n(x, \epsilon, T_1, \dots) &= 1 - \epsilon n_1(x, T_1, T_2) + O(\epsilon^2) \\ &= 1 - \epsilon A(T_2) \cos(\phi x) + O(\epsilon^2) \\ &= 1 - \epsilon \frac{h}{D_0} \sqrt{\frac{-K}{\Gamma}} \cos(\phi x) + O(\epsilon^2) \end{aligned} \quad (8.19)$$

et

$$\begin{aligned} \theta(x, \epsilon, T_1, \dots) &= \epsilon \theta_1(x, T_1, T_2) + O(\epsilon^2) \\ &= \epsilon A(T_2) \cos(\phi x) + O(\epsilon^2) \\ &= \epsilon \sqrt{\frac{-K}{\Gamma}} \cos(\phi x) + O(\epsilon^2) \end{aligned} \quad (8.20)$$

où les expressions de K et Γ sont détaillées dans l'appendice "Analyse de stabilité non-linéaire".

8.3.2.7. Comparaison résultats théoriques - simulations numériques

Nous comparons les résultats théoriques précédemment trouvés à ceux obtenus en résolvant numériquement le système d'EDP pour deux valeurs différentes du mode propre instable. Nous présentons, dans cette partie, les résultats obtenus avec le mode instable 20. Ils permettent de tirer des conclusions sur la validation des méthodes numériques. Une analyse similaire, avec le mode instable 5, a été effectuée dans l'appendice "Analyse de Stabilité non-linéaire".

Mode instable 20. Nous décidons d'isoler comme mode instable le mode 20, correspondant au nombre d'ondes $20\pi/L$ (L étant la longueur du domaine). Pour cela, nous choisissons les paramètres décrits dans le paragraphe suivant.

Valeurs numériques des paramètres normalisés :

$$\begin{aligned} h &= 2 \\ N_2 &= 3 \\ D_0 &= 0.65 \\ s &= 2000 \\ \beta &= 0.000128324 \\ \epsilon &= 0.1 \end{aligned}$$

Nous avons donc comme valeur critique de bifurcation, τ_c ,

$$\tau_c \equiv \frac{1+2\sqrt{(s\beta)}}{N_2-1+\frac{h}{D_0}(N_2-2)} = 0.3965417$$

Nous choisissons alors comme valeur pour $\tau_2 = 0.04583$ (voir eq. 8.4), ainsi $\tau = 0.397$.

Dans ces conditions, nous avons bien isolé un seul mode propre instable : le mode 20 comme le montre les figures suivantes :

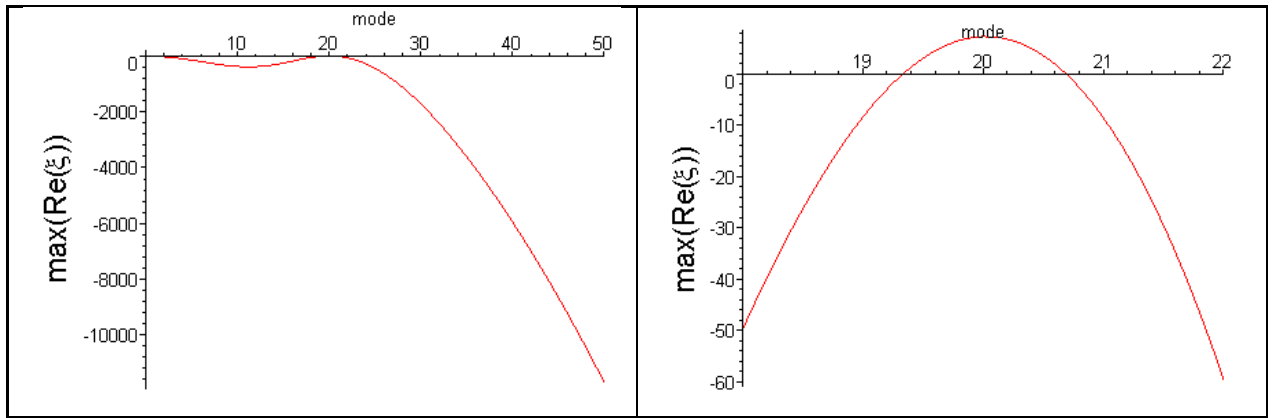


FIG. 8.3.: Tracé du maximum des parties réelles (non-nulles) des valeurs propres en fonction des modes propres.

Nous constatons que seul le mode 20 est instable (gauche). En effet, pour ce mode, il existe une valeur propre à partie réelle positive (droite).

Prédiction de l'analyse non-linéaire. Avec ce jeu de paramètre, l'analyse non-linéaire de stabilité ((8.19) et (8.20)) nous prédit une solution (θ, n) valant :

$$\begin{aligned}\theta &= 0.018935 \cos(20\pi x) + O(\epsilon^2) \\ n &= 1 - 0.0582 \cos(20\pi x) + O(\epsilon^2)\end{aligned}$$

avec

$$\lim_{T_2 \rightarrow \infty} A(T_2) = 0.1893$$

Comparaison avec la simulation numérique.

Comparaison qualitative. Les figures ci-dessous (8.4 et 8.5) permettent de comparer la prédiction théorique non-linéaire (gauche) avec la simulation numérique obtenue par la méthode des éléments finis (droite).

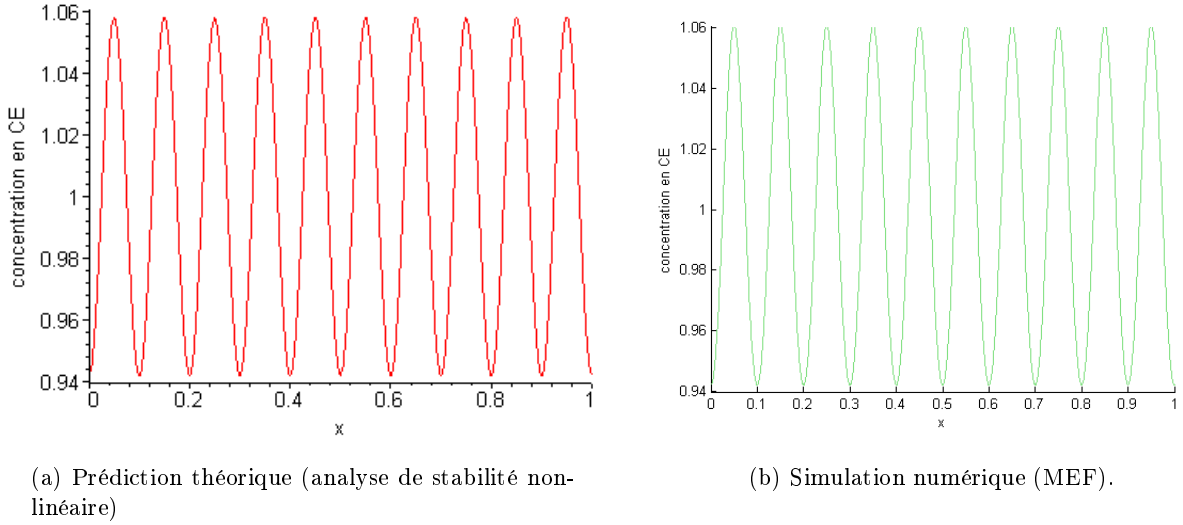


FIG. 8.4.: *Comparaison entre la prédiction de l'analyse de stabilité non-linéaire et la simulation numérique de la distribution de la densité de CE (n) à l'état stationnaire.*

Les solutions théorique (gauche) et numérique (droite), représentant les CE, sont qualitativement proches. Elles présentent un comportement oscillatoire de période et d'amplitude voisines.

8. Validation mathématique des méthodes de résolution numérique

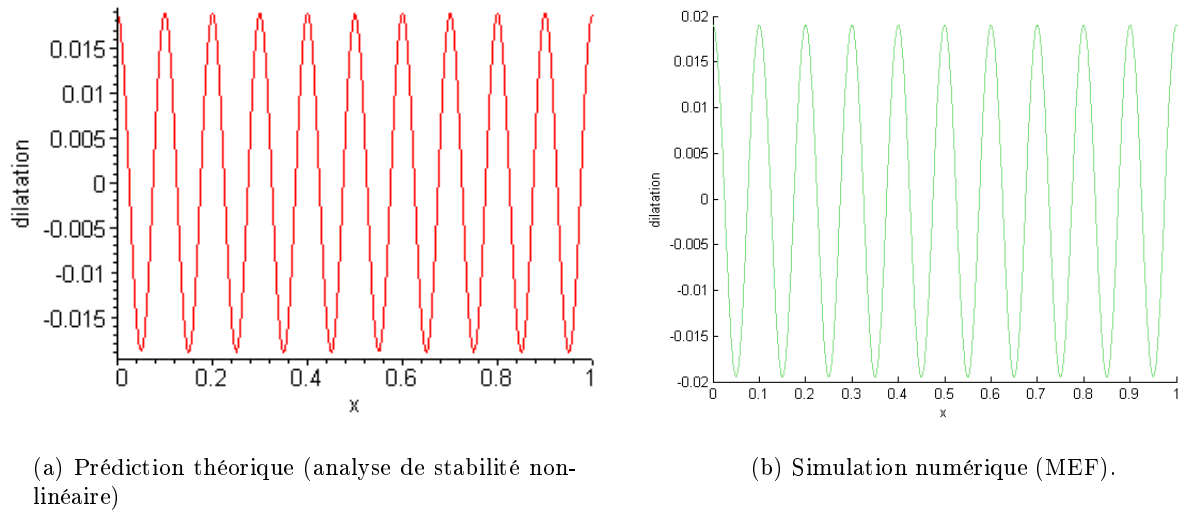


FIG. 8.5.: *Comparaison entre la prédiction de l'analyse de stabilité non-linéaire et la simulation numérique de la dilatation (θ) à l'état stationnaire.*

Pour la valeur de la dilatation θ , nous trouvons également une bonne concordance entre les deux approches.

Comparaison quantitative. Nous allons comparer quantitativement les résultats obtenus par la résolution numérique avec ceux déduits de l'analyse de stabilité non-linéaire.

Cette comparaison est résumée dans le tableau (8.1).

variables	valeur analyse non-linéaire	valeur simulation numérique	différence
$\lim_{T_2 \rightarrow \infty} A(T_2)$	0.189	0.19	0.4%
amplitude (pour n)	0.0582	0.0607	4.2%
période (pour n)	0.1	≈ 0.1	-
amplitude (pour θ)	0.018935	0.019022	0.4%
période (pour θ)	0.1	≈ 0.1	-

TAB. 8.1.: *Comparaison quantitative entre la prédiction théorique et la simulation numérique.*

La valeur de $\lim_{T_2 \rightarrow \infty} A(T_2)$ est déduite de l'amplitude de la dilatation θ .

Les petites différences entre ces approches (au maximum 4.2 %) peuvent s'expliquer, entre autre, par le fait que nous avons calculé la solution théorique en $O(\epsilon^2)$. Les solutions trouvées par ces deux approches restent toutefois proches. Nous pouvons donc confirmer qualitativement ce que l'aspect qualitatif laissait présager : il y a une bonne concordance entre les résultats obtenus

numériquement et la théorie. Des résultats similaires sont obtenus en isolant le mode propre instable 5 (voir appendice).

8.4. Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons détaillé la méthode numérique utilisée pour résoudre le système (3.35). Vu la complexité de ce système, une vérification des résultats numériques est indispensable pour s'assurer que les résultats obtenus traduisent bien les propriétés d'auto-organisation du modèle et ne sont pas dûs à des erreurs numériques. Nous avons prouvé, dans des cas simples, que le comportement qualitatifs des solutions calculées numériquement étaient en accord avec les prévisions théoriques obtenues par une analyse de stabilité linéaire de l'état d'équilibre homogène : nous observons une réorganisation cellulaire seulement pour des jeux de paramètres instables prévus par cette analyse. Cette validation qualitative du comportement a été complétée par une validation quantitative : nous avons réussi à calculer théoriquement les solutions à l'état stationnaire non-homogène par une analyse non-linéaire de perturbation, au voisinage d'un point de bifurcation. Cette analyse, faisant intervenir l'alternative de Fredholm pour déterminer les conditions d'existence des solutions de systèmes non homogènes et l'équation de Landau dans le cas stationnaire, permet de comparer les solutions théoriques avec les solutions numériques. Nous observons une bonne concordance entre celles-ci. Les méthodes numériques que nous avons utilisées nous semblent donc adaptées pour la résolution d'un système aussi complexe que le système (3.35) et nous permettent donc d'obtenir des résultats significatifs sur la réorganisation cellulaire et matricielle.

8. *Validation mathématique des méthodes de résolution numérique*

Quatrième partie .

Conclusion générale-Discussion

9. Discussion générale et perspectives

Le développement de réseaux vasculaires est d'une importance fondamentale dans certains processus physiopathologiques, tels la cicatrisation des tissus ou l'irrigation d'une tumeur solide (Kirsch *et al.* (2004); Gupta et Qin (2003)). Les modèles expérimentaux d'angiogenèse *in vitro*, présentés dans cette thèse, fournissent un cadre simplifié mais contrôlable dans lequel les interactions cellules endothéliales-matrice extracellulaire peuvent être analysées (Folkman et Haudenschild (1980); Ingber (2002)). Ces modèles expérimentaux mettent en évidence les propriétés d'auto-organisation des CE, quand elles sont déposées sur des gels épais, en réseaux de pseudo-capillaires (Vernon *et al.* (1992); Vailhé *et al.* (2001)). Cette réorganisation cellulaire est fortement dépendante des propriétés rhéologiques de la MEC.

En considérant les différents régulateurs de l'angiogenèse *in vitro*, nous avons vu que les interactions mécaniques CE-MEC sont au cœur du processus d'instabilité mécanique de formation des réseaux de pseudo-capillaires, lorsque les CE sont cultivées *in vitro* sur des gels épais en l'absence de source exogène de chimioattractants. Comprendre la formation et la régulation de telles structures spatiales, dans le contexte expérimental présenté ici, implique nécessairement la prise en compte à la fois des caractéristiques de migration et de traction cellulaire et des propriétés rhéologiques (élasticité/viscosité) de la MEC.

Dans ce contexte expérimental, le scénario fondé sur une migration active due à la chimiotaxie ne peut donc pas expliquer, à lui seul, le processus de morphogenèse. Il est nécessaire de développer de nouveaux modèles, différents de ceux proposés récemment expliquant l'angiogenèse *in vitro* par une approche chimiotactique (Gamba *et al.* (2003); Serini *et al.* (2003)). Nous avons ainsi développé un modèle biomécanique dans le cadre théorique défini par Murray et Oster (1984). Plus précisément, notre modèle est une extension de travaux précédents Manoussaki *et al.* (1996); Murray *et al.* (1998). Il s'en distingue par :

- la prise en compte d'une composante active haptotactique de la migration cellulaire pour permettre d'étudier comment la formation des réseaux cellulaires est influencée par le couplage entre la migration haptotactique des cellules le long des gradients de MEC et les forces de traction cellulaire, induisant des champs de contraintes dans la MEC.
- la considération de la nature fibreuse de la MEC, permettant la transmission de contraintes entre deux points éloignés.
- l'existence d'un rappel élastique du à l'attachement du biogel à la face inférieure de la boîte de Petri, induisant une force de cisaillement.

Ce modèle biomécanique est décrit par un système d'équations aux dérivées partielles (EDP) couplées non-linéaires. Ce système est complexe et n'admet pas, dans l'état actuel de nos connaissances, de solutions analytiques. Nous avons alors déterminé ses solutions par une résolution numérique, fondée sur la méthode des éléments finis, qui a été validée par une analyse non-linéaire de stabilité.

9. Discussion générale et perspectives

Nous avons formulé deux hypothèses théoriques pour expliquer le processus de réorganisation par les interactions mécaniques. Dans la première partie de la thèse, nous avons supposé (hypothèse H1) que la dégradation du biogel était négligeable dans la phase initiale de formation des lacunes. Nous considérons donc l'angiogenèse *in vitro* comme un processus initié par une instabilité mécanique générée par un déséquilibre entre les forces de traction cellulaire et la résistance passive viscoélastique de la MEC, sans remodelage de celle-ci. En effet, dans le contexte des expériences que nous avons présentées, il semble maintenant établi que les effets mécaniques peuvent réguler et contrôler le processus d'angiogenèse *in vitro* (Ingber (2002)).

Nous nous sommes intéressés à plusieurs contrôles possibles des effets mécaniques sur les caractéristiques fonctionnelles cellulaires et le processus de réorganisation. Une analyse mathématique de stabilité linéaire de l'état d'équilibre homogène nous a permis de déterminer une condition nécessaire et suffisante sur les paramètres pour qu'une réorganisation cellulaire et matricielle puisse avoir lieu. En traçant les diagrammes de bifurcation associés, nous avons alors pu étudier l'influence des différents paramètres expérimentaux sur le processus d'angiogenèse *in vitro*. Ces résultats théoriques, complétés par les simulations numériques, montrent que :

- la densité de MEC est un paramètre clé du processus d'angiogenèse. Sachant que la rigidité du gel est proportionnelle à sa densité (Benkherourou *et al.* (1999)), nous en déduisons que plus le milieu est rigide, plus une traction cellulaire importante est requise pour qu'il y ait réorganisation en pseudo-capillaires. Les résultats de nos simulations numériques sont en accord avec les résultats expérimentaux de Vailhé *et al.* (1997) et Vernon *et al.* (1992). Nous avons montré théoriquement et numériquement qu'aucune réorganisation cellulaire n'était possible sur des gels trop rigides.
- la quantité initiale de CE est également un paramètre clé du processus. Vailhé *et al.* (1997) avaient déjà observé expérimentalement que, pour de trop faibles ou de trop fortes densités cellulaires, aucune réorganisation n'avait lieu. Grâce à l'analyse de stabilité linéaire, nous avons pu quantifier précisément les concentrations cellulaires critiques pour lesquelles les CE se réorganisaient. Cette densité critique est directement liée à l'existence du terme d'inhibition de contact : si les cellules sont trop peu nombreuses, la force de traction résultant de l'intégration de chaque traction cellulaire individuelle est trop faible pour réorganiser le milieu. De même, pour de trop fortes densités de CE, les liaisons cellules-cellules inhibent la force de traction résultante exercée par la population de cellule sur la MEC.

Dans le cadre d'expérimentations "guidées par le modèle", ces résultats sont très intéressants pour le biologiste. Ils lui permettent de connaître, a priori, les valeurs expérimentales nécessaires pour pouvoir observer une angiogenèse *in vitro*. Notre modélisation est donc une approche prédictive permettant de guider et d'optimiser l'expérimentation.

Nous avons également montré que :

- la prise en compte d'une diffusion cellulaire anisotrope, induite par les déformations mécaniques, n'est pas nécessaire à une modélisation réaliste de l'angiogenèse *in vitro*. En effet, la dépendance de la diffusion cellulaire vis-à-vis des déformations locales est négligeable lorsqu'elle est replacée dans le contexte global de migration cellulaire définie par notre modèle. Des conclusions similaires ont été trouvées par Manoussaki *et al.* (1996); Murray *et al.* (1998) et Murray (2003c) en absence d'une migration cellulaire haptotactique.
- l'influence de l'attachement du gel à la face inférieure de la boîte de Petri est importante

dans ce processus de réorganisation. Nous avons réussi à reproduire assez fidèlement les morphologies observées expérimentalement par Vernon *et al.* (1992) au cours d'expériences sur des gels d'épaisseur variables : les lacunes sont plus nombreuses et plus grandes en surface là où la MEC est la plus épaisse, et la transition entre une distribution quasi-homogène de cellules à la surface du biogel et des réseaux structurés est d'autant plus brutale que le gradient d'épaisseur est important. Il pourrait être intéressant, pour confirmer l'importance de ces conditions aux limites (Sieminski *et al.* (2004)), d'effectuer des expériences d'angiogenèse sur des gels "flottants" à bords fixes. Nous nous attendons, dans cette expérience, à ce que l'absence d'attachement du gel inhibe la réorganisation des cellules en pseudo-capillaires, ou en tout cas diminue considérablement la surface du réseau de pseudo-capillaires. De même, des expériences d'angiogenèse sur des gels flottants à bords libres devrait montrer une contraction du biogel semblable à celle décrite lors d'expériences de contraction de biogel par des fibroblastes (Tranquillo *et al.* (1992)), et, dans le cas peu probable où il y aurait une réorganisation matricielle et cellulaire, nous devrions constater principalement des lacunes à l'endroit où l'influence des conditions aux limites est la plus faible, c'est-à-dire au centre du gel.

- la prise en compte de l'élasticité à longue-portée est nécessaire pour bien traduire la physique du phénomène. L'élasticité à longue-portée se traduit, dans le modèle, par l'ajout des laplaciens du tenseur des déformations $\epsilon(\mathbf{x})$ et de la dilatation $\theta(\mathbf{x})$ pour moyenner ces grandeurs sur un voisinage du point courant, prenant ainsi en compte la nature fibreuse de la MEC. Ces effets longue-portée sont facteurs de stabilité, dans le sens où une plus grande traction cellulaire est nécessaire pour déstabiliser l'état d'équilibre homogène. Ces termes permettent également l'incorporation dans la condition de bifurcation du terme de rappel élastique. En effet, si les effets d'élasticité longue-portée sont négligés, alors le coefficient de rappel élastique n'intervient plus dans la détermination de ce seuil critique. Cela signifierait physiquement que, dans ce cas, la réorganisation est indépendante de l'épaisseur du biogel. Ceci semble en contradiction avec les résultats des expériences menées par Vernon *et al.* (1992) sur des gels d'épaisseur variable.
- l'influence de l'haptotaxie, et plus particulièrement du rapport entre l'haptotaxie et la diffusion, est un facteur clé du processus de formation de lacunes. En effet, la migration cellulaire peut se faire dans deux directions opposées : soit en remontant un gradient d'adhésion si l'haptotaxie est plus importante que la diffusion, soit en le descendant si la diffusion prédomine. Si l'haptotaxie est assez grande par rapport à la diffusion, cela favorise localement la concentration de CE, d'où une augmentation locale de la traction cellulaire pouvant induire un processus auto-catalytique assez important pour dépasser la résistance viscoélastique de la MEC. La prise en compte de cette composante active de migration cellulaire permet de simuler des réorganisations matricielle et cellulaire pour des valeurs du module de Young plus réalistes (*cf* Tab. 5.2) que celle utilisée par Manoussaki (2002) (2 Pa).

Dans la deuxième partie de la thèse, nous avons développé un modèle dans lequel les effets mécaniques peuvent réguler la protéolyse matricielle. Cette théorie a été élaborée en s'appuyant sur les différents travaux expérimentaux (chapitre 6) corrélant le niveau des contraintes mécaniques d'un milieu contenant des cellules et l'augmentation de la protéolyse de la MEC. Sous cette hypothèse, la protéolyse matricielle est vue comme le déclencheur de l'instabilité dynamique

9. Discussion générale et perspectives

provoquant la formation des lacunes et des pseudo-capillaires. Nous pouvons alors appréhender à quels niveaux les effets mécaniques peuvent influencer la protéolyse :

- soit en favorisant l'accès aux sites de dégradation de la MEC, pour ces enzymes, afin de remodeler le milieu (hypothèse H_d).
- soit en favorisant la sécrétion de protéases par les CE (hypothèse H_i),

Nos travaux ont montré :

- que l'analyse de stabilité linéaire effectuée précédemment n'était plus valable. Nous avons alors transformé le système d'EDP Σ en une famille de systèmes Σ_i où il était envisageable de mener une telle étude mathématique. Nous voulions déduire, des propriétés des systèmes Σ_i , des jeux de paramètres conduisant à la formation de pseudo-capillaires pour le système Σ , en faisant une hypothèse de quasi-stationnarité. Nous avons alors montré que l'hypothèse de quasi-homogénéité n'était pas valable, et que l'hypothèse de quasi-stationnarité était discutable. La prise en compte de la dégradation ne nous permet donc plus de prédire les paramètres conduisant à la formation de motifs hétérogènes en concentration cellulaire et en densité matricielle.
- que les simulations numériques reproduisent avec succès les morphologies de formation des lacunes et des pseudo-capillaires. Les pseudo-capillaires simulés ont un diamètre proche de celui mesuré expérimentalement et la corrélation entre le niveau de dégradation et la morphologie du réseau est en accord avec les observations expérimentales de Vailhé *et al.* (1998).
- que la dynamique simulée de dégradation de la fibrine est semblable à celle mesurée expérimentalement par Vailhé *et al.* (1998) pour deux lignées cellulaires (HUVEC et BREC). Ces chercheurs ont rapporté que, même si les caractéristiques fonctionnelles de ces lignées cellulaires étaient qualitativement semblables (migration, traction, dégradation), il pouvait exister de grandes différences quantitatives dans leur activité protéolytique. Nous avons alors déterminé numériquement des valeurs du paramètre caractéristique de la dégradation cellulaire, V_m pour ces deux lignées cellulaires. Avec ces valeurs numériques, notre modèle a pu reproduire, sous l'hypothèse H_d , les profils de dégradation observés expérimentalement. Toutefois, il apparaît maintenant nécessaire de valider cette formulation par une mesure expérimentale directe de ces coefficients.
- que la formation du réseau de pseudo-capillaires n'est que peu dépendante de la diffusion des protéases, sous l'hypothèse où les effets mécaniques favoriseraient l'accessibilité aux sites de dégradation des enzymes. A l'inverse, en supposant que les effets mécaniques favorisent la sécrétion de protéases, notre modèle prédit que la diffusion de ces enzymes est un paramètre clé de l'apparition de pseudo-capillaires. Il serait alors très intéressant de réussir à limiter, lors d'expériences d'angiogenèse *in vitro*, la diffusion des protéases pour en observer les conséquences sur le développement des pseudo-capillaires, afin de déterminer si l'une de ces deux voies est prédominante.

Dans tout notre travail, nous avons cherché à développer un modèle minimal pour permettre d'isoler les paramètres critiques du processus d'angiogenèse *in vitro* des expériences présentées au chapitre (2). Cela nous a donc conduit à effectuer des simplifications que nous avons justifiées dans le contexte de notre étude :

- nous n’avons pas considéré de composante chimiotactique dans la migration cellulaire. Nous avons vu que cette simplification pouvait être réalisée dans ce contexte expérimental. Par contre, dans de nombreux autres contextes expérimentaux, cette composante est fondamentale pour modéliser la migration cellulaire, en particulier dans le cadre de l’angiogenèse induite par une tumeur (Garfinkel *et al.* (2004)).
- en faisant l’hypothèse que la protéolyse génère l’instabilité dynamique conduisant au processus de réorganisation, nous n’avons pas considéré, dans notre première approche, les régulations des métalloprotéases (MMP) par les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP) (Kuzuya et Iguchi (2003)). Or, Il est établi que l’activité des protéases résulte de l’intégration de plusieurs équilibres entre leurs activateurs et leurs inhibiteurs (Chang et Werb (2001)), qui eux mêmes dépendent d’une cascade de régulations (Hall *et al.* (2003)). Dans cette première approche, nous n’avons pas modélisé ces interactions complexes.

Durant nos travaux de recherche, nous avons développé le plus possible les aspects théoriques pour pouvoir, entre autre, déterminer des sous-ensembles de l’espace des paramètres conduisant à la formation de lacunes et de pseudo-capillaires. Par exemple, l’analyse de stabilité linéaire, même si elle fournit une condition nécessaire et suffisante pour permettre une réorganisation matricielle et cellulaire, n’est valable que dans un voisinage de l’état stationnaire homogène et ne fournit aucun renseignement quantitatif sur les solutions asymptotiques dans le cas d’une réorganisation. Nous avons alors développé une analyse de stabilité non-linéaire de cet état stationnaire qui nous a permis de considérer l’apport des termes non-linéaires, et donc d’augmenter la taille du voisinage dans lequel notre analyse mathématique est valable. De plus, cette analyse mathématique nous a permis de prédire quantitativement, dans des cas simples (modèle 1D élastique), les solutions du système d’EDP à l’ordre 1, et donc de vérifier la validité de nos résultats numériques. Théoriquement, il serait alors envisageable de prolonger une telle étude :

- en déterminant les solutions à l’ordre 2, 3... en procédant de la même façon.
- en menant une résolution dans des espaces de dimensions supérieures (2D, 3D)
- ou encore en considérant la superposition de plusieurs modes propres instables.

Cependant, la mise en oeuvre de ces considérations engendrerait des calculs algébriques excessivement pénibles, tout en ayant un intérêt limité.

Une limite importante de notre modèle est la formulation, dans le cadre de la viscoélasticité linéaire, de la relation contraintes-déformations. En effet, cette relation, bien que relativement complète (prise en compte de la viscosité, paramètres d’élasticité à longue-portée), n’est en théorie valable que dans les domaines des petites déformations, alors que nous avons vu que les contraintes et les déformations subies par le milieu pouvaient être considérables. Nous avons alors cherché à développer une approche permettant de modéliser le comportement du biogel en mécanique des grandes déformations en 3D, sans formuler d’hypothèse simplificatrice sur la loi de comportement cinématique. Nous avons réussi à caractériser les paramètres de la fonction d’énergie élastique grâce aux expériences de Benkherourou *et al.* (1999). Par contre, notre étude théorique et numérique a montré que notre choix du potentiel visqueux ne permettait pas une modélisation réaliste des expériences de relaxation où les déformations sont imposées à une vitesse élevée. Il apparaît donc nécessaire d’utiliser de nouvelles fonctions d’énergie visqueuse pour caractériser les biogels.

Une autre limite est l’absence de descripteurs permettant de caractériser les réseaux vascu-

9. Discussion générale et perspectives

lares expérimentaux et simulés. Nous nous sommes seulement servis d'un indice de formation des lacunes, semblable à celui développé expérimentalement par Vailhé *et al.* (1998), pour caractériser quantitativement chaque réseau. Il apparaît en effet important de pouvoir classer les réseaux vasculaires en catégories plus précises que celles répondant à la question de création ou non de pseudo-capillaires. Un tel moyen quantitatif, caractérisant les réseaux vasculaires, permettrait :

- une étude plus fine de l'influence de chaque paramètre sur chaque type de réseau. Nous avons, à ce sujet, évoqué le seuil de percolation, défini par Gamba *et al.* (2003), pour permettre d'étudier l'échange de fluide au sein d'un réseau. Récemment, Stéphanou *et al.* (2004) ont défini un indice caractérisant, en un point du réseau vasculaire, le nombre de branchement du réseau. Nous pourrions imaginer intégrer ces indices sur tout le réseau vasculaire pour en déduire une classification de celui-ci.
- d'automatiser la classification des images de réseaux vasculaires, obtenues par IRM ou par ultrasons. Cela constituerait une aide précieuse au diagnostic pour le radiologue en lui fournissant, par exemple, des mesures objectives de l'évolution d'une pathologie (Kretowski *et al.* (2003)).

Malgré ces limites, l'approche expérimentale et théorique présentée dans cette thèse a permis de détailler le rôle des différents paramètres, dans le cadre des interactions mécaniques CE-MEC et explique, avec succès, les premières étapes de la formations des lacunes dans le biogel. Ces travaux ont été menés dans le cadre d'un dialogue permanent entre l'expérimentation et la modélisation. En pratique, nous avons vu que ces travaux de biologie théorique nous ont permis de suggérer de nouvelles expériences pour confirmer ou infirmer notre modélisation (expérience de gel flottant à bords libres ou fixes, expérience sur la diffusion des protéases,...).

Comme nous l'avons vu précédemment, les travaux que nous avons menés permettent d'intégrer les connaissances que nous avons au niveau cellulaire pour en déduire les équilibres déterminant le comportement caractéristique d'une population de cellules. Ils permettent de transformer nos connaissances des phénomènes à l'échelle de la cellule en une approche macroscopique prédictive, tout en proposant des pistes de réflexion. Ces travaux pourraient, par exemple, avoir des retombées cliniques importantes : nous avons vu, en effet, que la densité de gel, en influant sur sa rigidité, était un facteur clé du phénomène de développement des vaisseaux sanguins. *In vivo*, nous pourrions alors chercher à favoriser la greffe d'un biomatériau au sein de l'organisme en optimisant sa rigidité afin de permettre une vascularisation maximale du greffon.

De même, nous pourrions envisager de nouveaux moyens contre-intuitifs pour lutter, *in vivo*, contre le développement d'une tumeur solide. Des expériences (Harris *et al.* (1981)) ont montré que les cellules tumorales étaient capables d'exercer des forces de traction supérieures à celles de cellules saines. D'après les résultats de la deuxième partie de la thèse, nous pouvons supposer que, en favorisant localement la protéolyse du milieu au niveau de la tumeur, cela provoquerait un effet auto-catalytique par l'affaiblissement locale de la rigidité du milieu, incitant l'amas de cellules tumorales à ne pas diffuser. Les cellules tumorales seraient alors très localisées, et une intervention chirurgicale serait, dans ce cas, de la plus grande efficacité.

Le modèle, développé dans cette thèse, fournit donc un moyen puissant pour l'étude de l'initiation du processus d'angiogenèse *in vitro*. Nous pensons également qu'il peut servir de base pour l'incorporation de nouveaux aspects. Pour cela, des extensions pourraient lui être apportés :

- Il nous apparaît nécessaire d'incorporer la composante chimiotactique de la migration cellulaire pour pouvoir prendre en compte une grande gamme de résultats expérimentaux où les facteurs solubles jouent un rôle fondamental. Ainsi, l'intégration des conditions du milieu (hypoxie, pH) et des effets des cytokines (VEGF par exemple) permettrait d'appliquer notre modèle au développement de l'angiogenèse induite par une tumeur. Ces considérations sont d'autant plus intéressantes que des études récentes corrélient les effets mécaniques (contrainte/déformation) exercés sur une cellule avec son niveau de sécrétion de VEGF (Smith *et al.* (2001); Yoshino *et al.* (2003)). L'unification de ces deux domaines, déjà initiée par notre modèle, nous semble particulièrement pertinente et excitante.
- Il nous semble indispensable de développer des modèles théoriques d'angiogenèse en trois dimensions. Ce changement de dimension constitue à la fois un défi numérique pour la résolution, théorique pour modéliser la migration complexe des cellules (Friedl *et al.* (1998)) et expérimental pour développer une méthode contrôlable et simple, permettant l'étude de la formation des vaisseaux sanguins. Cependant Vaillhé *et al.* (2001) ont souligné l'importance de la modélisation en trois dimensions, en rappelant que ces modèles expérimentaux sont plus proches que les modèles en deux dimensions du phénomène d'angiogenèse *in vivo*, car ils permettent une prise en compte d'un plus grand nombre d'étapes du phénomène de bourgeonnement. Ces modèles en trois dimensions permettraient également d'étudier des conditions de distributions réalistes des facteurs angiogènes (Helmlinger *et al.* (2000)), et théoriquement, intégrerait naturellement la force de cisaillement due à l'attachement du gel à la face inférieure de la boîte de Petri. Dans ces travaux, le dialogue expérimentation-théorie devra être encore très important. Ce défi nous semble également très excitant.
- Dans le futur modèle en trois dimensions, il pourrait être important de considérer l'influence des contraintes de cisaillement exercées par l'écoulement du flux sanguin sur les parois des capillaires, lors du développement de l'arbre vasculaire. L'influence de ces forces hémodynamiques sur la croissance des capillaires a fait l'objet d'études récentes (McDougall *et al.* (2002); Stéphanou *et al.* (2004)), qui ont montré que ces forces pouvaient induire d'importants changements de topologie du réseau.
- Enfin, nous avons commencé à développer une approche multi-échelle du processus d'angiogenèse *in vitro*, dans laquelle la rhéologie du biogel résulte de l'intégration de la rhéologie de chacune des fibres qui le compose : lorsqu'une fibre casse au sein du biogel, la contrainte qu'elle supportait se redistribue alors sur les fibres restantes. Nos résultats préliminaires ont permis de constater un effet auto-catalytique du processus d'étirement d'un biogel soumis à une même contrainte constante statique, conduisant à une rupture du biomatériau. Sachant que cette rupture est directement dépendante de son degré de protéolyse (Saldívar *et al.* (2002); Altieri *et al.* (2003)), notre théorie liant la dégradation du gel aux effets mécaniques (contraintes/déformations), au sein de la MEC, nous semble particulièrement bien adaptée pour obtenir des profils dynamiques d'étirement et de rupture de biomatériaux soumis à une contrainte cyclique semblables (Ellsmere *et al.* (1999)). Ces résultats préliminaires semblent très prometteurs pour modéliser la nature fibreuse de la MEC.

9. *Discussion générale et perspectives*

Cinquième partie .

Appendices

10. Appendice de l'analyse de stabilité non-linéaire

Nous donnons, dans ce chapitre, les résultats de plusieurs étapes calculatoires effectuées dans le chapitre (8). Nous appliquons également l'analyse de stabilité non-linéaire pour un jeu de paramètre où seul le mode 5 est un mode propre instable.

10.1. Valeur des coefficients K et Γ dans l'équation de Landau

Les expressions des paramètres K et Γ , utilisés dans l'équation de Landau à l'état stationnaire (8.18), valent :

$$K = \frac{(P_2 D_0 - P_1 h) \phi^2 \tau_2 D_0}{\tau_c P_1 h}$$

$$\begin{aligned} \Gamma = & -1/8(P_1 h s D_0 + 16\phi^4 P_1 h \beta D_0 + 4\phi^2 \tau_c P_4 P_2 D_0^2 + 32\phi^2 \tau_c P_4 h P_3 D_0 + 12\phi^2 \tau_c P_4 h P_1 D_0 - 8\phi^2 h P_3 D_0 - \\ & 8\phi^2 \tau_c P_3 h P_2 D_0 - 2P_3 h s D_0 + 16\phi^4 P_4 \beta D_0^2 + 24\phi^2 \tau_c P_5 P_2 D_0^2 - 16\phi^2 \tau_c P_4^2 D_0^2 + 4\phi^2 P_4 D_0^2 - 8\phi^2 \tau_c P_1^2 h^2 + \\ & 4\phi^2 \tau_c P_1 h P_2 D_0 - 8\phi^2 \tau_c P_1 h^2 P_3 - 16\phi^2 \tau_c P_3^2 h^2 + 6P_5 s D_0^2 + 4\phi^2 h P_1 D_0 - 24\phi^2 \tau_c P_5 h P_1 D_0 + 24\phi^2 P_5 D_0^2 + \\ & P_4 s D_0^2 - 32\phi^4 P_3 h \beta D_0 + 96\phi^4 P_5 \beta D_0^2) h \phi^2 / P_1 / D_0 / (16\beta \phi^4 D_0 + 4\phi^2 D_0 - 4P_1 \tau_c h \phi^2 + s D_0 + 4\phi^2 \tau_c P_2 D_0) \end{aligned}$$

10.2. Un autre exemple : mode instable 5

Pour nous assurer que les résultats obtenus avec le mode instable 20 pouvait se généraliser aux autres modes instables, nous avons décidé d'isoler un autre mode instable : le mode 5. Les paramètres numériques sont alors ceux présentés ci-dessous :

10.2.1. valeurs numériques des paramètres

$$\begin{aligned} h &= 2 \\ N_2 &= 3 \\ D_0 &= 0.65 \\ s &= 11 \\ \beta &= 0.00018068 \\ \epsilon &= 0.1 \end{aligned}$$

Nous avons donc comme valeur critique de bifurcation, τ_c ,

$$\tau_c \equiv \frac{1+2\sqrt{(s\beta)}}{N_2-1+\frac{h}{D_0}(N_2-2)} = 0.21453$$

Nous choisissons alors comme valeur pour $\tau_2 = 0.114$, donc $\tau = 0.21567$

10. Appendice de l'analyse de stabilité non-linéaire

Dans ces conditions, nous avons bien isolé un seul mode propre instable : le mode 5 comme le montre les figures suivantes :

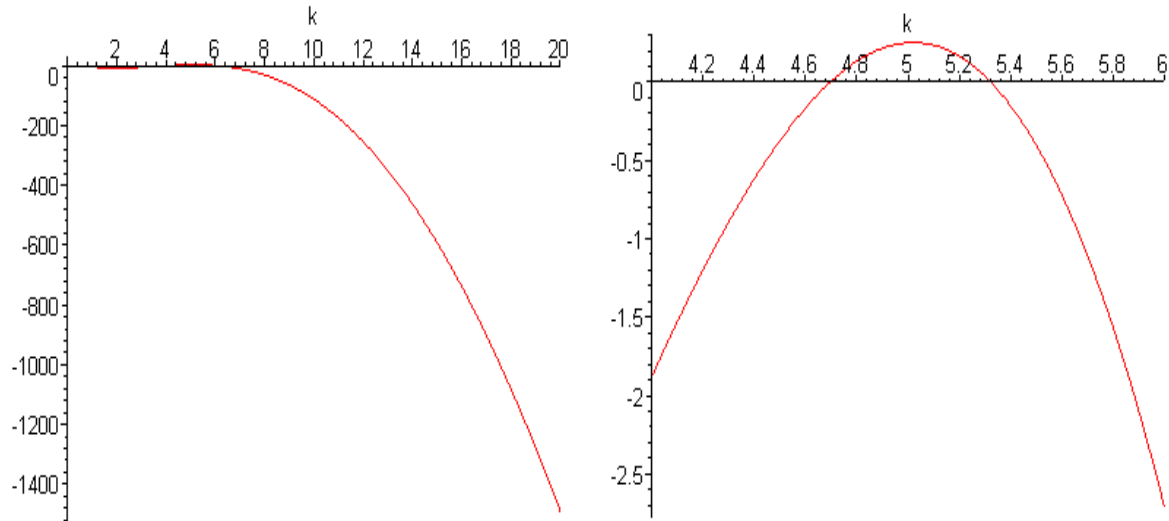


FIG. 10.1.: *Tracé de la plus grande partie réelle des valeurs propres en fonction des modes propres.*

Nous constatons que seul le mode 5 est instable (gauche). (Droite) Zoom sur la partie près de ce mode.

10.2.2. Prédiction de l'analyse non-linéaire

Avec ce jeu de paramètre, l'analyse non-linéaire de stabilité nous prédit une solution (θ, n) valant :

$$\begin{aligned}\theta &= 0.015\cos(5\pi x) \\ n &= 1 - 0.047\cos(5\pi x)\end{aligned}$$

avec

$$\lim_{T_2 \rightarrow \infty} A(T_2) = 0.15$$

et

$$M = -3.0769$$

10.2.3. Comparaison qualitative et quantitative avec la simulation numérique

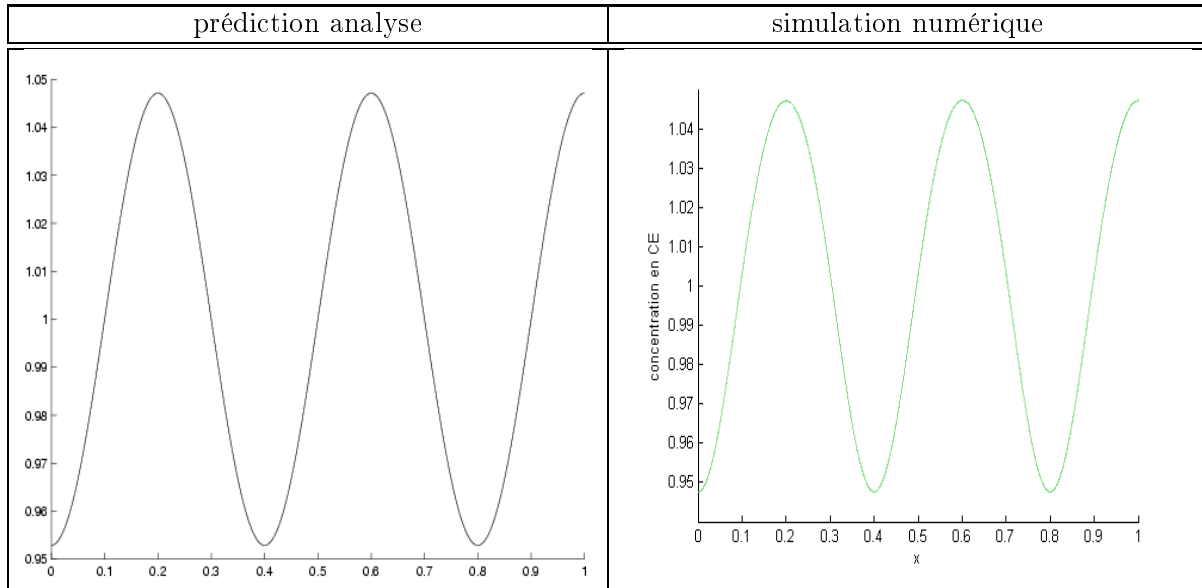


FIG. 10.2.: Comparaison entre la prédiction de l'analyse de stabilité non-linéaire et la simulation numérique pour la densité de CE (n).

Le résultat est quantitativement et qualitativement semblable.

11. Appendice de la mécanique en grandes déformations

11.1. Calcul des vecteurs contravariants $\mathbf{g}^k$

Les vecteurs $\mathbf{g}^k$ sont de la forme :

$$\begin{aligned}\mathbf{g}^1 &= a_1 \mathbf{i}_1 + b_1 \mathbf{i}_2 + c_1 \mathbf{i}_3 \\ \mathbf{g}^2 &= a_2 \mathbf{i}_1 + b_2 \mathbf{i}_2 + c_2 \mathbf{i}_3 \\ \mathbf{g}^3 &= a_3 \mathbf{i}_1 + b_3 \mathbf{i}_2 + c_3 \mathbf{i}_3\end{aligned}$$

En insérant ces formules dans la définition du vecteur contravariant $\mathbf{g}^1$, les inconnues (a_1, b_1, c_1) peuvent être calculées comme solution du système linéaire suivant :

$$\begin{bmatrix} f_1 & g_1 & h_1 \\ f_2 & g_2 & h_2 \\ f_3 & g_3 & h_3 \end{bmatrix} \begin{pmatrix} a_1 \\ b_1 \\ c_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

Soit

$$\mathbf{M} \equiv \begin{bmatrix} f_1 & g_1 & h_1 \\ f_2 & g_2 & h_2 \\ f_3 & g_3 & h_3 \end{bmatrix}$$

Nous avons alors

$$\begin{cases} a_1 &= \frac{g_2 h_3 - h_2 g_3}{\det(\mathbf{M})} \\ b_1 &= \frac{h_2 f_3 - f_2 h_3}{\det(\mathbf{M})} \\ c_1 &= \frac{f_2 g_3 - g_2 f_3}{\det(\mathbf{M})} \end{cases}$$

où $\det(\mathbf{M})$ est le déterminant de la matrice $\mathbf{M}$.

De même, nous obtenons (a_2, b_2, c_2) et (a_3, b_3, c_3) :

$$\begin{cases} a_2 &= \frac{h_1 g_3 - g_1 h_3}{\det(\mathbf{M})} \\ b_2 &= \frac{f_1 h_3 - h_1 f_3}{\det(\mathbf{M})} \\ c_2 &= \frac{g_1 f_3 - f_1 g_3}{\det(\mathbf{M})} \end{cases}$$
$$\begin{cases} a_3 &= \frac{g_1 h_2 - h_1 g_2}{\det(\mathbf{M})} \\ b_3 &= \frac{h_1 f_2 - f_1 h_2}{\det(\mathbf{M})} \\ c_3 &= \frac{f_1 g_2 - g_1 f_2}{\det(\mathbf{M})} \end{cases}$$

11.2. Expression de la base locale déformée $\mathbf{g}_i \otimes \mathbf{g}_j$

La base locale déformée $\mathbf{g}_i \otimes \mathbf{g}_j$, dans l'état A(t), vaut donc :

$g_1 \otimes g_1 =$	$\begin{bmatrix} f_1^2 & f_1 g_1 & f_1 h_1 \\ f_1 g_1 & g_1^2 & g_1 h_1 \\ f_1 h_1 & g_1 h_1 & h_1^2 \end{bmatrix}$	$g_1 \otimes g_2 =$	$\begin{bmatrix} f_1 f_2 & f_1 g_2 & f_1 h_2 \\ g_1 f_2 & g_1 g_2 & g_1 h_2 \\ h_1 f_2 & h_1 g_2 & h_1 h_2 \end{bmatrix}$	$g_1 \otimes g_3 =$	$\begin{bmatrix} f_1 f_3 & f_1 g_3 & f_1 h_3 \\ g_1 f_3 & g_1 g_3 & g_1 h_3 \\ h_1 f_3 & h_1 g_3 & h_1 h_3 \end{bmatrix}$
$g_2 \otimes g_1 =$	$\begin{bmatrix} f_1 f_2 & g_1 f_2 & f_2 h_1 \\ f_1 g_2 & g_1 g_2 & g_2 h_1 \\ h_2 f_1 & h_2 g_1 & h_2 h_1 \end{bmatrix}$	$g_2 \otimes g_2 =$	$\begin{bmatrix} f_2^2 & f_2 g_2 & f_2 h_2 \\ f_2 g_2 & g_2^2 & g_2 h_2 \\ h_2 f_2 & h_2 g_2 & h_2^2 \end{bmatrix}$	$g_2 \otimes g_3 =$	$\begin{bmatrix} f_2 f_3 & f_2 g_3 & f_2 h_3 \\ g_2 f_3 & g_2 g_3 & g_2 h_3 \\ h_2 f_3 & h_2 g_3 & h_2 h_3 \end{bmatrix}$
$g_3 \otimes g_1 =$	$\begin{bmatrix} f_1 f_3 & g_1 f_3 & f_3 h_1 \\ g_3 f_1 & g_3 g_1 & g_3 h_1 \\ h_3 f_1 & h_3 g_1 & h_3 h_1 \end{bmatrix}$	$g_3 \otimes g_2 =$	$\begin{bmatrix} f_2 f_3 & f_3 g_2 & f_3 h_2 \\ g_3 f_2 & g_3 g_2 & g_3 h_2 \\ h_3 f_2 & h_3 g_2 & h_3 h_2 \end{bmatrix}$	$g_3 \otimes g_3 =$	$\begin{bmatrix} f_3^2 & f_3 g_3 & f_3 h_3 \\ g_3 f_3 & g_3^2 & g_3 h_3 \\ h_3 f_3 & h_3 g_3 & h_3^2 \end{bmatrix}$

11.3. Calcul des composantes du tenseur des contraintes de Cauchy

D'après la formule (7.14), nous avons :

$$\boldsymbol{\tau} = J^{-1} \mathbf{F} \left(\frac{\partial W_e}{\partial \mathbf{E}} + \frac{\partial W_v}{\partial \dot{\mathbf{E}}} \right)^T \mathbf{F}$$

D'après les définitions de ces différents tenseurs (§ 7.2.2), nous avons :

$$\boldsymbol{\tau} = J^{-1} (\mathbf{g}_i \otimes \mathbf{G}^i) \left(\frac{\partial W_e}{\partial \mathbf{E}} + \frac{\partial W_v}{\partial \dot{\mathbf{E}}} \right)^T (\mathbf{g}_j \otimes \mathbf{G}^j)$$

$\Leftrightarrow$

$$\boldsymbol{\tau} = J^{-1} (\mathbf{g}_i \otimes \mathbf{G}^i) \left(\frac{\partial W_e}{\partial \mathbf{E}} + \frac{\partial W_v}{\partial \dot{\mathbf{E}}} \right) (\mathbf{G}^j \otimes \mathbf{g}_j)$$

$\Leftrightarrow$

$$\boldsymbol{\tau} = J^{-1} \mathbf{G}^i \cdot \left(\frac{\partial W_e}{\partial \mathbf{E}} + \frac{\partial W_v}{\partial \dot{\mathbf{E}}} \right) \mathbf{G}^j \mathbf{g}_i \otimes \mathbf{g}_j$$

où le symbole $\cdot$ désigne le produit scalaire canonique de $\mathbb{R}^3$.

Les composantes du tenseur des contraintes de Cauchy, τ^{ij} , valent donc dans la base locale déformée $\mathbf{g}_i \otimes \mathbf{g}_j$ (Pioletti *et al.* (1998); Ramtani (2003)) :

$$\tau^{ij} = J^{-1} \left(\frac{\partial W_e}{\partial I_1} \frac{\partial I_1}{\partial E_{ij}} + \frac{\partial W_e}{\partial I_3} \frac{\partial I_3}{\partial E_{ij}} + \frac{\partial W_v}{\partial J_2} \frac{\partial J_2}{\partial \dot{E}_{ij}} \right)$$

11.3.1. Expression explicite de la composante élastique

Le troisième invariant du tenseur des dilatations $\mathbf{C}$ vaut :

$$I_3 = \det(\mathbf{C}) = \det({}^T \mathbf{F} \mathbf{F}) = \det(\mathbf{F})^2 = J^2 \quad (11.1)$$

11.3. Calcul des composantes du tenseur des contraintes de Cauchy

En utilisant ce résultat dans la formulation de la fonction d'énergie élastique (7.17), nous avons :

$$W_e = \frac{c_1}{\beta}(I_3^{-\beta} - 1) + c_1(I_1 - 3) \quad (11.2)$$

11.3.1.1. Expression des dérivées de W_e en fonction des invariants

D'après (11.2), nous déduisons aisément que

$$\begin{aligned} \frac{\partial W_e}{\partial I_1} &= c_1 \\ \frac{\partial W_e}{\partial I_3} &= -c_1 I_3^{-\beta-1} \end{aligned}$$

11.3.1.2. Expression des invariants I_1 et I_3 en fonction des composantes E_{ij}

Par définition du premier invariant I_1 , nous avons :

$$I_1 = \sum_{i,j} G^{ij}(2E_{ij} + G_{ij}) \quad (11.3)$$

il est donc immédiat que

$$\frac{\partial I_1}{\partial E_{ij}} = 2G^{ij}$$

Par définition du troisième invariant I_3 , nous avons $I_3 = \det(\mathbf{C})$. Comme $\mathbf{C} = 2\mathbf{E} + \mathbf{Id}$, nous pouvons alors exprimer les composantes du tenseur des dilatations C^{ij} en fonction des composantes du tenseur des déformations de Green -Lagrange E_{ij} :

$$\begin{aligned} I_3 = & 8E_{11}E_{22}E_{33} + 4E_{11}E_{22} + 4E_{11}E_{33} + 2E_{11} - 8E_{11}E_{23}E_{32} + \\ & 4E_{22}E_{33} + 2E_{22} + 2E_{33} + 1 - 4E_{23}E_{32} - 8E_{21}E_{12}E_{33} - 4E_{21}E_{12} + \\ & 8E_{21}E_{13}E_{32} + 8E_{31}E_{12}E_{23} - 8E_{31}E_{13}E_{22} - 4E_{31}E_{13} \end{aligned} \quad (11.4)$$

Ainsi :

$$\begin{aligned} \frac{\partial I_3}{\partial E_{11}} &= 8E_{22}E_{33} + 4E_{33} + 4E_{22} - 8E_{23}E_{32} + 2 & \frac{\partial I_3}{\partial E_{12}} &= -8E_{21}E_{33} - 4E_{21} + 8E_{31}E_{23} \\ \frac{\partial I_3}{\partial E_{13}} &= 8E_{21}E_{32} - 8E_{31}E_{22} - 4E_{31} & \frac{\partial I_3}{\partial E_{21}} &= -8E_{12}E_{33} - 4E_{12} + 8E_{13}E_{32} \\ \frac{\partial I_3}{\partial E_{22}} &= 8E_{11}E_{33} + 4E_{11} + 4E_{33} + 2 - 8E_{31}E_{13} & \frac{\partial I_3}{\partial E_{23}} &= -8E_{11}E_{32} - 4E_{32} + 8E_{31}E_{12} \\ \frac{\partial I_3}{\partial E_{31}} &= 8E_{12}E_{23} - 8E_{13}E_{22} - 4E_{13} & \frac{\partial I_3}{\partial E_{32}} &= -8E_{11}E_{23} - 4E_{23} + 8E_{21}E_{13} \\ \frac{\partial I_3}{\partial E_{33}} &= 8E_{11}E_{22} + 4E_{11} + 4E_{22} + 2 - 8E_{21}E_{12} \end{aligned}$$

11.3.2. Expression explicite de la composante visqueuse

Nous avons choisi de décrire le comportement visqueux du biogel par le potentiel visqueux utilisé par Pioletti *et al.* (1998) et Fernandes-Morin (2000) :

$$W_v = \frac{\eta}{4}J_2(I_1 - 3)$$

où I_1 est le premier invariant de $\mathbf{C}$ (voir précédemment) et J_2 le deuxième invariant de $\dot{\mathbf{C}}$: $J_2 = Tr(\dot{\mathbf{C}}^2)$.

11. Appendice de la mécanique en grandes déformations

11.3.2.1. Expression des dérivées de W_v en fonction des invariants

Trivialement, nous obtenons :

$$\frac{\partial W_v}{\partial J_2} = \frac{\eta}{4}(I_1 - 3)$$

11.3.2.2. Expression de J_2 en fonction de $\dot{E}_{ij}$

D'après la définition de J_2 , nous avons

$$J_2 = Tr(\dot{\mathbf{C}}^2)$$

Comme

$$\dot{\mathbf{C}} = 2\dot{\mathbf{E}}$$

nous pouvons alors exprimer explicitement le deuxième invariant du tenseur $\dot{\mathbf{C}}$ en fonction des composantes du tenseur $\dot{\mathbf{E}}$:

$$J_2 = 4Tr(\dot{\mathbf{E}}^2)$$

d'où

$$J_2 = 4 \left(\dot{E}_{11}^2 + \dot{E}_{22}^2 + \dot{E}_{33}^2 + 2\dot{E}_{12}\dot{E}_{21} + 2\dot{E}_{32}\dot{E}_{23} + 2\dot{E}_{13}\dot{E}_{31} \right) \quad (11.5)$$

11.4. Comparaison avec les valeurs des paramètres en petites déformations

Sous l'hypothèse des petites déformations, le milieu élastique est régi par la loi de Hooke :

$$\tau = \frac{E}{1+\nu} \left(\begin{bmatrix} u_{1x} & \frac{1}{2}(u_{1y} + u_{2x}) & \frac{1}{2}(u_{1z} + u_{3x}) \\ sym & u_{2y} & \frac{1}{2}(u_{2z} + u_{3y}) \\ sym & sym & u_{3z} \end{bmatrix} + \frac{\nu}{1-2\nu} (u_{1x} + u_{2y} + u_{3z}) \mathbf{Id} \right) \quad (11.6)$$

où $\frac{\partial u_i}{\partial x} = u_{ix}$, $\frac{\partial u_i}{\partial y} = u_{iy}$, $\frac{\partial u_i}{\partial z} = u_{iz}$, $i = 1..3$ et $\mathbf{Id}$ est le tenseur identité d'ordre 2.

En prenant en compte les grandes déformations, les composantes τ^{ij} du tenseur symétrique des contraintes de Cauchy se déduisent, dans le cas purement élastique, de $\tau^{ij} = J^{-1} \left(\frac{\partial W_e}{\partial I_1} \frac{\partial I_1}{\partial E_{ij}} + \frac{\partial W_e}{\partial I_3} \frac{\partial I_3}{\partial E_{ij}} \right)$ (formule 7.14). Sachant que la loi de comportement sous l'hypothèse des petites déformations est la linéarisation de la loi de comportement "grandes déformations", il nous suffit d'identifier les termes d'une des composantes du tenseur des contraintes de Cauchy. Nous choisissons la composante (1,1).

11.4.1. Composante (1,1) en petites déformations

En petites déformations, nous avons d'après (11.6) :

$$\tau^{11} = \frac{E}{(1+\nu)(1-2\nu)} ((1-\nu)u_{1x} + \nu(u_{2y} + u_{3z})) \quad (11.7)$$

11.4.2. Composante (1,1) en grandes déformations

Nous avons vu que $\tau^{11} = J^{-1}(\frac{\partial W}{\partial I_1} \frac{\partial I_1}{\partial E_{11}} + \frac{\partial W}{\partial I_3} \frac{\partial I_3}{\partial E_{11}})$. Dans toute la suite, nous supposons que les composantes du vecteurs déplacements (u_1, u_2, u_3) ainsi que toutes leurs dérivées sont en $O(\epsilon)$.

11.4.2.1. Linéarisation de J

J est le déterminant du tenseur gradient de transformation : $J \equiv \det(\mathbf{F})$. En linéarisant cette loi, nous trouvons que

$$J = 1 + u_{1x} + u_{2y} + u_{3z} + o(\epsilon) \quad (11.8)$$

11.4.2.2. Linéarisation de $\frac{\partial W}{\partial I_3}$

Nous avons $W = \frac{c_1}{\beta}(I_3^{-\beta} - 1) + c_1(I_1 - 3)$, d'où $\frac{\partial W}{\partial I_3} = -c_1(I_3^{-\beta-1})$. Avec $I_3 = J^2$, nous obtenons la linéarisation de ce terme :

$$\frac{\partial W}{\partial I_3} = -c_1 + 2c_1(\beta + 1)(u_{1x} + u_{2y} + u_{3z}) + o(\epsilon) \quad (11.9)$$

11.4.2.3. Linéarisation de τ^{11}

En reportant $\frac{\partial I_1}{\partial E_{11}} = 2$, $\frac{\partial W}{\partial I_1} = c_1$, et les équations (11.8) et (11.9) dans la loi donnant la composante du tenseur de contrainte de Cauchy, nous obtenons :

$$\tau^{11} = 4c_1((\beta + 1)u_{1x} + \beta(u_{2y} + u_{3z})) + o(\epsilon) \quad (11.10)$$

11.4.3. Identification des termes de (11.7) et (11.10)

En identifiant les termes en u_{1x} , u_{2y} et u_{3z} , entre les équations (11.7) et (11.10), nous trouvons le résultat énoncé dans le chapitre "Grandes Déformations" :

$$\begin{cases} c_1 &= \frac{E}{4(1+\nu)} \\ \beta &= \frac{\nu}{1-2\nu} \end{cases}$$

11.5. Application au cas de traction/compression multiaxiales

Lors d'une traction/compression multiaxiale, des simplifications sur la loi cinématique peuvent être effectuées. Ces simplifications, appliquées aux cas général nous donnent alors les grandeurs suivantes :

11. Appendice de la mécanique en grandes déformations

état I	état A(t)
$\mathbf{G}_k = \mathbf{i}_k$	$\mathbf{g}_k = \lambda_k \mathbf{i}_k$
$G_{..} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$	$g_{..} = \begin{bmatrix} \lambda_1^2 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2^2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3^2 \end{bmatrix}$
$\mathbf{G}^k = \mathbf{i}_k$	$\mathbf{g}^k = 1/\lambda_k \mathbf{i}_k$
$G^{..} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$	$g^{..} = \begin{bmatrix} \frac{1}{\lambda_1^2} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{\lambda_2^2} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{\lambda_3^2} \end{bmatrix}$

TAB. 11.1.: Expressions des vecteurs et des tenseurs dans le cas d'une traction multiaxiale.

Nous en déduisons, grâce à ces calculs, les résultats suivants :

Tenseur	Expression	Utilisation des formules
Tenseur de déformation de Green Lagrange	$\mathbf{E} = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} \lambda_1^2 - 1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2^2 - 1 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3^2 - 1 \end{bmatrix}$	(7.5)
Tenseur gradient de transformation	$\mathbf{F} = \begin{bmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3 \end{bmatrix}$	(7.3)
1 ^{er} invariant de $\mathbf{C}$	$I_1 = \lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2$	(11.3), (7.5)
3 ^{ème} invariant de $\mathbf{C}$	$I_3 = (\lambda_1 \lambda_2 \lambda_3)^2$	(11.4), (7.5)
2 ^{ème} invariant de $\dot{\mathbf{C}}$	$J_2 = \lambda_1^4 + \lambda_2^4 + \lambda_3^4 - 2\lambda_1^2 - 2\lambda_2^2 - 2\lambda_3^2 + 3$	(11.5)

TAB. 11.2.: Expressions des tenseurs et des invariants.

Index

- Analyse de pseudo-stabilité linéaire, 89–93
Analyse de stabilité linéaire, 50–55, 133–135
Analyse de stabilité non-linéaire, 135–141, 159
Angiogenèse, 18, 21, 26–33
Anisotropie diffusive, 41–43, 46, 48, 68–72

Bifurcation, 49–63, 74, 89–92, 135

Cellules endothéliales, 13, 18, 24–28, 31–33
Chimiotaxie, 31, 37
Cinétique chimique, 84, 85
Contraintes (tenseur des), 39, 40, 113–115
Convection, 43

Déformations (tenseur des), 39, 112–114
Déformations effectives, 70, 97, 115
Dégradation, 44, 48, 83–89
Diffusion, 41, 60, 66, 101, 102
Dilatation, 39, 114

Éléments, 66, 132, 133
Elasticité, 39, 45, 114
Elasticité (force de rappel), 46, 59
Elasticité longue-portée, 39, 40, 57, 58

Femlab, 66, 133
Fonction d'énergie, 109, 110, 115, 116, 120, 121, 126
Fonction d'énergie élastique, 115–119, 121, 127, 164, 165
Fonction d'énergie visqueuse, 115, 119–121, 128, 129, 164–166

Grandes déformations, 109, 115, 122–124, 126–129, 163–168

Haptotaxie, 41, 60, 61, 66
Hooke (loi de), 39, 45, 114, 166

Inhibition de contact, 39, 61, 66
Invariants, 116–121, 164–166

Jacobi (matrice de), 51, 91

Méthode des éléments finis, 66, 131–133
Matrice extracellulaire, 13, 22–31
Michaelis-Menten (processus de), 84, 85
Mode(s) propre(s), 55, 77, 136, 142, 160
Morphogènes, 17, 49

Noeuds, 66, 132, 133
Nombres d'ondes, 50, 54, 136

Percolation, 76
Petites déformations (hypothèse des), 109, 114, 121, 166
Poisson (coefficient de), 39, 46, 66, 114, 124
Produits de dégradation, 13, 85, 97
Protéases, 84–86, 101, 102
Pseudo-instabilité, 93
Pseudo-stabilité, 92, 93

Réaction-diffusion (système de), 17, 49
Réorganisation, 22, 65
Relation de dispersion, 51, 91
Remodelage, 22, 65

Traction cellulaire, 24–26, 38, 39, 53, 66
Tumeur, 18, 21, 31
Turing (instabilité de), 20, 49, 51, 79

Vasculogenèse, 18
Viscosité, 40, 119, 120

Index

Viscosité de cisaillement, 66

Viscosité de dilatation volumique, 66

von Mises (contraintes de), 73, 115

Young (module de), 39, 46, 56, 66, 78, 86,
114, 122, 127

Bibliographie

- AIMES, R. T., ZIJLSTRA, A., HOOPER, J. D., OGBOURNE, S. M., SIT, M. L., FUCHS, S., GOTLEY, D. C., QUIGLEY, J. P. et ANTALIS, T. M. (2003). Endothelial cell serine proteases expressed during vascular morphogenesis and angiogenesis. *Thromb Haemost*, 89(3):561–572.
- ALENGHAT, F. J. et INGBER, D. E. (2002). Mechanotransduction : all signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins. *Sci STKE*. 2002 Feb 12;2002(119) :PE6.
- ALTIERI, P., BRUNELLI, C., GARIBALDI, S., NICOLINO, A., UBALDI, S., SPALLAROSSA, P., OLIVOTTI, L., ROSSETTIN, P., BARSOTTI, A. et GHIGLIOTTI, G. (2003). Metalloproteinases 2 and 9 are increased in plasma of patients with heart failure. *Eur J Clin Invest*, 33(8):648–656.
- ANDERSON, A. R. et CHAPLAIN, M. A. (1998). Continuous and discrete mathematical models of tumor-induced angiogenesis. *Bull Math Biol*, 60(5):857–899.
- BAER, A. E., LAURSEN, T. A., GUILAK, F. et SETTON, L. A. (2003). The micromechanical environment of intervertebral disc cells determined by a finite deformation, anisotropic, and biphasic finite element model. *J Biomech Eng*, 125(1):1–11.
- BALABAN, N. Q., SCHWARZ, U. S., RIVELINE, D., GOICHBERG, P., TZUR, G., SABANAY, I., MAHALU, D., SAFRAN, S., BERSHADSKY, A., ADDADI, L. et GEIGER, B. (2001). Force and focal adhesion assembly : a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*, 3(5):466–472.
- BAROCAS, V. H., MOON, A. G. et TRANQUILLO, R. T. (1995). The fibroblast-populated collagen microsphere assay of cell traction force—part 2 : Measurement of the cell traction parameter. *J Biomech Eng*, 117(2):161–170.
- BAROCAS, V. H. et TRANQUILLO, R. T. (1997). An anisotropic biphasic theory of tissue-equivalent mechanics : the interplay among cell traction, fibrillar network deformation, fibril alignment, and cell contact guidance. *J Biomech Eng*, 119(2):137–145.
- BELLOWS, C. G., MELCHER, A. H. et AUBIN, J. E. (1982). Association between tension and orientation of periodontal ligament fibroblasts and exogenous collagen fibres in collagen gels in vitro. *J Cell Sci*, 58:125–138.
- BENKHEROUROU, M. (1999). *Caractérisation Mécanique et Modélisation de Gels de Fibrine Soumis à des Contraintes Cellulaires*. Thèse de doctorat, Université J. Fourier.

- BENKHEROUROU, M., GUMERY, P. Y., TRANQUI, L. et TRACQUI, P. (2000). Quantification and macroscopic modeling of the nonlinear viscoelastic behavior of strained gels with varying fibrin concentrations. *IEEE Trans Biomed Eng*, 47(11):1465–1475.
- BENKHEROUROU, M., ROCHAS, C., TRACQUI, P., TRANQUI, L. et GUMERY, P. Y. (1999). Standardization of a method for characterizing low-concentration biogels : elastic properties of low-concentration agarose gels. *J Biomech Eng*, 121(2):184–187.
- BERRY, H. et LARRETA-GARDE, V. (1999). Oscillatory behavior of a simple kinetic model for proteolysis during cell invasion. *Biophys J*, 77(2):655–665.
- BILLIAR, K. L. et SACKS, M. S. (2000). Biaxial mechanical properties of the native and glutaraldehyde-treated aortic valve cusp : Part ii—a structural constitutive model. *J Biomech Eng*, 122(4):327–335.
- BLONDEL, W. C., DIDELON, J., MAURICE, G., CARTEAUX, J. P., WANG, X. et STOLTZ, J. F. (2001). Investigation of 3-d mechanical properties of blood vessels using a new in vitro tests system : results on sheep common carotid arteries. *IEEE Trans Biomed Eng*, 48(4):442–451.
- BOEHLER (1987). *Applications to tensor functions in solid mechanics*.
- BOERBOOM, R. A., DRIESSEN, N. J., BOUTEN, C. V., HUYGHE, J. M. et BAAIJENS, F. P. (2003). Finite element model of mechanically induced collagen fiber synthesis and degradation in the aortic valve. *Ann Biomed Eng*, 31(9):1040–1053.
- BREZIS, H. (1999). *Analyse fonctionnelle : théorie et applications*. Paris : Dunod.
- BRITTON, N. F. (2003). *Essential Mathematical Biology*. Springer.
- BYRNE, H. M. et CHAPLAIN, M. A. (1995). Mathematical models for tumour angiogenesis : numerical simulations and nonlinear wave solutions. *Bull Math Biol*, 57(3):461–486.
- CAI, H. (1998). *Loi de comportement en grandes déformations du muscle à fibres actives*. Thèse de doctorat, Doctorat de Mécanique, Université de Savoie.
- CARMELIET, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9(6):653–660.
- CHANG, C. et WERB, Z. (2001). The many faces of metalloproteases : cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*, 11(11):S37–43.
- CHAVAKIS, T., CINES, D. B., RHEE, J. S., LIANG, O. D., SCHUBERT, U., HAMMES, H. P., HIGAZI, A. A., NAWROTH, P. P., PREISSNER, K. T. et BDEIR, K. (2004). Regulation of neo-vascularization by human neutrophil peptides (alpha-defensins) : a link between inflammation and angiogenesis. *FASEB J*.
- CHEN, J., FABRY, B., SCHIFFRIN, E. L. et WANG, N. (2001). Twisting integrin receptors increases endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280(6): C1475–1484.

- CINES, D. B., POLLAK, E. S., BUCK, C. A., LOSCALZO, J., ZIMMERMAN, G. A., MCEVER, R. P., POBER, J. S., WICK, T. M., KONKLE, B. A., SCHWARTZ, B. S., BARNATHAN, E. S., MCCRAE, K. R., HUG, B. A., SCHMIDT, A. M. et STERN, D. M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91(10):3527–3561.
- COOK, J. (1995). *Mathematical models for dermal wound healing : wound contraction and scar formation*. Thèse de doctorat, University of Washington, Seattle. pp 98-133.
- CRUYWAGEN, G. C., MAINI, P. K. et MURRAY, J. D. (1997). Biological pattern formation on two-dimensional spatial domains : a nonlinear bifurcation analysis. *SIAM J. Appl. Math.*, 57:1485–1509.
- DALLON, J. C., SHERRATT, J. A. et MAINI, P. K. (1999). Mathematical modelling of extracellular matrix dynamics using discrete cells : fiber orientation and tissue regeneration. *J Theor Biol*, 199(4):449–471.
- D'ANDRÉA-NOVEL, B. et Cohen de LARA, M. (1994). *Commande linéaire des système dynamiques*. Edition : MASSON.
- DANIEL, T. O. et ABRAHAMSON, D. (2000). Endothelial signal integration in vascular assembly. *Annu Rev Physiol*, 62:649–671.
- DARTUS, D. et BELLET, D. (1995). *Elasticité linéaire*. Toulouse (France) : Cépaduès-Editions ; c1995. ISBN : 2-85428-360-0.
- DELVOYE, P., WILQUET, P., LEVEQUE, J. L., NUSGENS, B. V. et LAPIERE, C. M. (1991). Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensional collagen gel. *J Invest Dermatol*, 97(5):898–902.
- DEROANNE, C. F., LAPIERE, C. M. et NUSGENS, B. V. (2001). In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix-cytoskeleton. *Cardiovasc Res*, 49(3):647–658.
- DICKINSON, R. B. et TRANQUILLO, R. T. (1993). A stochastic model for adhesion-mediated cell random motility and haptotaxis. *J Math Biol*, 31(6):563–600.
- DiMILLA, P. A., QUINN, J. A., ALBERTA, S. M. et LAUFFENBURGER, D. A. (1992). Measurement of individual cell migration parameters for human tissue cells. *AIChE J.*, 38:1092–1104.
- DUVAUT, G. (1990). *Mécanique des milieux continus*. Edition : Masson.
- EGGINTON, S. (2002). Temperature and angiogenesis : the possible role of mechanical factors in capillary growth. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 132(4):773–787.
- EGGINTON, S., ZHOU, A. L., BROWN, M. D. et HUDLICKA, O. (2001). Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovasc Res*, 49(3):634–646.
- ELLSMERE, J. C., KHANNA, R. A. et LEE, J. M. (1999). Mechanical loading of bovine pericardium accelerates enzymatic degradation. *Biomaterials*, 20(12):1143–1150.

Bibliographie

- ENEVER, P. A., SHREIBER, D. I. et TRANQUILLO, R. T. (2002). A novel implantable collagen gel assay for fibroblast traction and proliferation during wound healing. *J Surg Res*, 105(2):160–172.
- FERNANDES-MORIN, E. (2000). *Experiences et Modélisations en Biomécanique Appliquées au Génie Tissulaire*. Thèse de doctorat, Université Paris XII.
- FERRENQ, I., TRANQUI, L., VAILHE, B., GUMERY, P. Y. et TRACQUI, P. (1997). Modelling biological gel contraction by cells : mechanocellular formulation and cell traction force quantification. *Acta Biotheor*, 45(3–4):267–293.
- FIELDS, G. B., NETZEL-ARNETT, S. J., WINDSOR, L. J., ENGLER, J. A., BIRKEDAL-HANSEN, H. et VAN WART, H. E. (1990). Proteolytic activities of human fibroblast collagenase : hydrolysis of a broad range of substrates at a single active site. *Biochemistry*, 29(28):6670–6677.
- FOLKMAN, J. (1971). Tumor angiogenesis : therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285(21):1182–1186.
- FOLKMAN, J. et HAUDENSCHILD, C. (1980). Angiogenesis in vitro. *Nature*, 288(5791):551–556.
- FOLKMAN, J. et KLAGSBRUN, M. (1987). Vascular physiology. a family of angiogenic peptides. *Nature*, 329(6141):671–672.
- FOLKMAN, J. et SHING, Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267(16):10931–10934.
- FRIEDL, P. et BROCKER, E. B. (2000). The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*, 57(1):41–64.
- FRIEDL, P., ZANKER, K. S. et BROCKER, E. B. (1998). Cell migration strategies in 3-d extracellular matrix : differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech*, 43(5):369–378.
- FUNG, F. C. (1993). *Biomechanics. Mechanical properties of living tissues. 2nd edition. pp 50-52*. New York : Springer-Verlag.
- GAMBA, A., AMBROSI, D., CONIGLIO, A., de CANDIA, A., DI TALIA, S., GIRAUDO, E., SERINI, G., PREZIOSI, L. et BUSSOLINO, F. (2003). Percolation, morphogenesis, and burgers dynamics in blood vessels formation. *Phys Rev Lett*, 90(11):118101–118104.
- GARDINER, J. C. et WEISS, J. A. (2001). Simple shear testing of parallel-fibered planar soft tissues. *J Biomech Eng*, 123(2):170–175.
- GARFINKEL, A., TINTUT, Y., PETRASEK, D., BOSTROM, K. et DEMER, L. L. (2004). Pattern formation by vascular mesenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(25):9247–9250.
- GEORGE, P. L. et Borouchaki, H. (1997). *Triangulation de Delaunay et maillage : applications aux éléments finis*. Paris : Hermès. ISBN : 2-86601-625-4.

- GERHARDT, H., GOLDING, M., FRUTTIGER, M., RUHRBERG, C., LUNDKVIST, A., ABRAMSSON, A., JELTSCH, M., MITCHELL, C., ALITALO, K., SHIMA, D. et BETSHOLTZ, C. (2003). Vegf guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*, 161(6):1163–1177.
- GERMAIN, P. (1973). *Cours de mécanique des milieux continus*. Edition : Masson.
- GILLIES, R. J., SCHORNACK, P. A., SECOMB, T. W. et RAGHUNAND, N. (1999). Causes and effects of heterogeneous perfusion in tumors. *Neoplasia*, 1(3):197–207.
- GIRTON, T. S., BAROCAS, V. H. et TRANQUILLO, R. T. (2002). Confined compression of a tissue-equivalent : collagen fibril and cell alignment in response to anisotropic strain. *J Biomech Eng*, 124(5):568–575.
- GRASSL, E. D., OEGEMA, T. R. et TRANQUILLO, R. T. (2002). Fibrin as an alternative biopolymer to type-i collagen for the fabrication of a media equivalent. *J Biomed Mater Res*, 60(4):607–612.
- GRAY, D. S., TIEN, J. et CHEN, C. S. (2003). Repositioning of cells by mechanotaxis on surfaces with micropatterned young's modulus. *J Biomed Mater Res*, 66A(3):605–614.
- GUPTA, M. K. et QIN, R. Y. (2003). Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol*, 9(6):1144–1155.
- HAGEDORN, H. G., BACHMEIER, B. E. et NERLICH, A. G. (2001). Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by tgf-beta in invasive carcinomas (review). *Int J Oncol*, 18(4):669–681.
- HALL, M. C., YOUNG, D. A., WATERS, J. G., ROWAN, A. D., CHANTRY, A., EDWARDS, D. R. et CLARK, I. M. (2003). The comparative role of activator protein 1 and smad factors in the regulation of timp-1 and mmp-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem*, 278(12):10304–10313.
- HARRIS, A. K., STOPAK, D. et WILD, P. (1981). Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature*, 290(5803):249–251.
- HAYEN, W., GOEBELER, M., KUMAR, S., RIESSEN, R. et NEHLS, V. (1999). Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. *J Cell Sci*, 112(13):2241–2251.
- HEMLINGER, G., ENDO, M., FERRARA, N., HLATKY, L. et JAIN, R. K. (2000). Formation of endothelial cell networks. *Nature*, 405(6783):139–141.
- HOLMES, M. J. et SLEEMAN, B. D. (2000). A mathematical model of tumour angiogenesis incorporating cellular traction and viscoelastic effects. *J Theor Biol*, 202(2):95–112.
- HOLZAPFEL (2001). *Nonlinear solid mechanics, a continuum approach for engineering*. John Wiley and Sons, LTD.

Bibliographie

- HUANG, S. et INGBER, D. E. (1999). The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol*, 1(5):E131–138.
- HUBBELL, J. A. (2003). Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 14(5):551–558.
- INGBER, D. E. (2002). Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ Res*, 91(10):877–887.
- JACKSON, Z. S., GOTLIEB, A. I. et LANGILLE, B. L. (2002). Wall tissue remodeling regulates longitudinal tension in arteries. *Circ Res*, 90(8):918–925.
- KAUER, M., VUSKOVIC, V., DUAL, J., SZEKELY, G. et BAJKA, M. (2002). Inverse finite element characterization of soft tissues. *Med Image Anal*, 6(3):275–287.
- KIRSCH, M., SCHACKERT, G. et BLACK, P. M. (2004). Metastasis and angiogenesis. *Cancer Treat Res*, 117:285–304.
- KNAPP, D. M., HELOU, E. F. et TRANQUILLO, R. T. (1999). A fibrin or collagen gel assay for tissue cell chemotaxis : assessment of fibroblast chemotaxis to grgdsp. *Exp Cell Res*, 247(2):543–553.
- KOLEV, K., TENEKEDJIEV, K., KOMOROWICZ, E. et MACHOVICH, R. (1997). Functional evaluation of the structural features of proteases and their substrate in fibrin surface degradation. *J Biol Chem*, 272(21):13666–13675.
- KORFF, T. et AUGUSTIN, H. G. (1999). Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J Cell Sci*, 112(19):3249–3258.
- KRETOWSKI, M., ROLLAND, Y., BEZY-WENDLING, J. et COATRIEUX, J. L. (2003). Physiologically based modeling of 3-d vascular networks and ct scan angiography. *IEEE Trans Med Imaging*, 22(2):248–257.
- KUBOTA, Y., KLEINMAN, H. K., MARTIN, G. R. et LAWLEY, T. J. (1988). Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol*, 107(4):1589–1598.
- KUZUYA, M. et IGUCHI, A. (2003). Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb*, 10(5):275–282.
- LE POURHIET, A. (1988). *Résolution numérique des équations aux dérivées partielles*. Edition : CEPADUES. ISBN : 2854281756.
- LEVINE, H. A., SLEEMAN, B. D. et NILSEN-HAMILTON, M. (2000). A mathematical model for the roles of pericytes and macrophages in the initiation of angiogenesis. i. the role of protease inhibitors in preventing angiogenesis. *Math Biosci*, 168(1):77–115.
- LEVINE, H. A., SLEEMAN, B. D. et NILSEN-HAMILTON, M. (2001). Mathematical modeling of the onset of capillary formation initiating angiogenesis. *J Math Biol*, 42(3):195–238.

- LOCKHART, A. C., BRAUN, R. D., YU, D., ROSS, J. R., DEWHIRST, M. W., KLITZMAN, B., YUAN, F., GRICHNIK, J. M., PROIA, A. D., CONWAY, D. A., MANN, G. et HURWITZ, H. I. (2003). A clinical model of dermal wound angiogenesis. *Wound Repair Regen*, 11(4):306–313.
- LUCQUIN, B et PIRONNEAU, O. (1996). *Introduction au calcul scientifique*. Masson. ISBN : 2-225-85017-8.
- MAHESHWARI, G. et LAUFFENBURGER, D. A. (1998). Deconstructing (and reconstructing) cell migration. *Microsc Res Tech*, 43(5):358–368.
- MANOUSSAKI, D. (2002). Modeling and simulation of the formation of vascular networks. *ESAIM : Proceedings, Vol. 12 : MS4CMS 2002 - Modelling and Simulation for Computer-aided Medicine and Surgery*. Téléchargeable à l'URL suivante : <http://www.tem.uoc.gr/daphne/papers/>.
- MANOUSSAKI, D., LUBKIN, S. R., VERNON, R. B. et MURRAY, J. D. (1996). A mechanical model for the formation of vascular networks in vitro. *Acta Biotheor*, 44(3–4):271–282.
- MARGUERATT, S. D. et LEE, J. M. (2002). Stress state during fixation determines susceptibility to fatigue-linked biodegradation in bioprosthetic heart valve materials. *Biomed Sci Instrum*, 38:145–150.
- MAZAT, J. P. (2003). *Chapitre "Cinétique enzymatique et contrôle des flux" dans "Eléments de biologie à l'usage d'autres disciplines" de Tracqui, P. et Demongeot, J.*, pages 175–206.
- MCDUGALL, S. R., ANDERSON, A. R., CHAPLAIN, M. A. et SHERRATT, J. A. (2002). Mathematical modelling of flow through vascular networks : implications for tumour-induced angiogenesis and chemotherapy strategies. *Bull Math Biol*, 64(4):673–702.
- MEDINA, J., ARROYO, A. G., SANCHEZ-MADRID, F. et MORENO-OTERO, R. (2004). Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology*, 39(5):1185–1195.
- MEINHARDT, H. (2003). Complex pattern formation by a self-destabilization of established patterns : chemotactic orientation and phyllotaxis as examples. *C R Biol*, 326(2):223–237.
- MILLER-YOUNG, J. E., DUNCAN, N. A. et BAROUD, G. (2002). Material properties of the human calcaneal fat pad in compression : experiment and theory. *J Biomech*, 35(12):1523–1531.
- MOON, A. G. et TRANQUILLO, R. T. (1993). Fibroblast-populated collagen microsphere assay of cell traction force. part 1. continuum model. *AIChE J.*, 39:163–175.
- MURRAY, J. D. (1983). *On a mechanical model for morphogenesis : Mesenchymal patterns*. Lecture note in Biomathematics series, 55 : 279–291, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- MURRAY, J. D. (2003a). *Mechanical theory for generating pattern and form*. In : *Mathematical Biology I : An introduction, 3rd edition*. pp 410. New York Springer.

Bibliographie

- MURRAY, J. D. (2003b). *Mechanical theory for generating pattern and form. In : Mathematical Biology II : Spatial Models and Biomedical Applications, 3rd edition. pp 311-334.*
- MURRAY, J. D. (2003c). *Mechanical theory for generating pattern and form. In : Mathematical Biology II : Spatial Models and Biomedical Applications, 3rd edition. pp 416-440. New York : Springer.*
- MURRAY, J. D. (2003d). On the mechanochemical theory of biological pattern formation with application to vasculogenesis. *C R Biol*, 326(2):239–252.
- MURRAY, J. D., MANOUSSAKI, D., LUBKIN, S. R. et VERNON, R. (1998). A mechanical theory of in vitro vascular network formation, in : *Vascular morphogenesis : in vivo, in vitro, in mente.* 173-188.
- MURRAY, J. D. et OSTER, G. F. (1984). Cell traction models for generating pattern and form in morphogenesis. *J Math Biol*, 19(3):265–279.
- NABESHIMA, Y., GROOM, E. S., SAKURAI, A. et HERMAN, J. H. (1996). Uniaxial tension inhibits tendon collagen degradation by collagenase in vitro. *J Orthop Res*, 14(1):123–130.
- NAMY, P., OHAYON, J. et TRACQUI, P. (2004). Critical conditions for pattern formation and in vitro tubulogenesis driven by cellular traction fields. *J Theor Biol*, 227(1):103–120.
- NEHLS, V. et DRENCKHAHN, D. (1995). A microcarrier-based cocultivation system for the investigation of factors and cells involved in angiogenesis in three-dimensional fibrin matrices in vitro. *Histochem Cell Biol*, 104(6):459–466.
- NICAISE, S. (2000). *Analyse numérique et équations aux dérivées partielles.* Dunod. ISBN : 2-10-004941-0.
- NUMMELA, A. et RUSKO, H. (2000). Acclimatization to altitude and normoxic training improve 400-m running performance at sea level. *J Sports Sci*, 18(6):411–419.
- O'CALLAGHAN, C. J. et WILLIAMS, B. (2000). Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells : role of tgf-beta(1). *Hypertension*, 36(3):319–324.
- OLSEN, L., MAINI, P. K. et SHERRATT, J. A. (1998). Spatially varying equilibria of mechanical models : application to dermal wound contraction. *Math Biosci*, 147(1):113–129.
- OSTER, G. F., MURRAY, J. D. et HARRIS, A. K. (1983). Mechanical aspects of mesenchymal morphogenesis. *J Embryol Exp Morphol*, 78:83–125.
- OTHMER, H. G. et STEVENS, A. (1997). Aggregation, blowup and collapse : the abc's of taxis in reinforced random walk. *SIAM J. Appl. Math.*, 57:537–540.
- OWEN, M. R., BYRNE, H. M. et LEWIS, C. E. (2004). Mathematical modelling of the use of macrophages as vehicles for drug delivery to hypoxic tumour sites. *J Theor Biol*, 226(4):377–391.

- PAINTER, K. J. (2000). *Mathematical Models for Biological Pattern Formation*. pp59-82. Berlin : Springer-Verlag.
- PAINTER, K. J., MAINI, P. K. et OTHMER, H. G. (1999). Stripe formation in juvenile pomacanthus explained by a generalized turing mechanism with chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10):5549–5554.
- PEPPER, M. S. (2001). Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21:1104–1117.
- PEPPER, M. S., FERRARA, N., ORCI, L. et MONTESANO, R. (1995). Leukemia inhibitory factor (lif) inhibits angiogenesis in vitro. *J Cell Sci*, 108:73–83.
- PERUMPANANI, A. J. et BYRNE, H. M. (1999). Extracellular matrix concentration exerts selection pressure on invasive cells. *Eur J Cancer*, 35(8):1274–1280.
- PHILLIPS, J. A., VACANTI, C. A. et BONASSAR, L. J. (2003). Fibroblasts regulate contractile force independent of mmp activity in 3d-collagen. *Biochem Biophys Res Commun*, 312(3):725–732.
- PIECHOR, K. et KAZMIERCZAK, B. (2002). Heteroclinic solutions for a model of skin morphogenesis. In : *Mathematical Modelling and Computing in Biology and Medicine. 5th ESMTB conference 2002 (Capasso, V ed)*. Milan, pages pp 545–551.
- PIOLETTI, D. P., RAKOTOMANANA, L. R., BENVENUTI, J. F. et LEYVRAZ, P. F. (1998). Viscoelastic constitutive law in large deformations : application to human knee ligaments and tendons. *J Biomech*, 31(8):753–757.
- POPOVICI, R. M., IRWIN, J. C., GIACCIA, A. J. et GIUDICE, L. C. (1999). Hypoxia and camp stimulate vascular endothelial growth factor (vegf) in human endometrial stromal cells : potential relevance to menstruation and endometrial regeneration. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(6):2245–2248.
- POURLASCIENCE (2004). *Les formes de la vie*, volume 44. Dossier de la revue "Pour la Science".
- PRAJAPATI, R. T., CHAVALLY-MIS, B., HERBAGE, D., EASTWOOD, M. et BROWN, R. A. (2000). Mechanical loading regulates protease production by fibroblasts in three-dimensional collagen substrates. *Wound Repair Regen*, 8(3):226–237.
- RAKUSAN, K. (1995). Coronary angiogenesis. from morphometry to molecular biology and back. *Ann N Y Acad Sci*, 752:257–266.
- RAMTANI, S. (2003). Biomécanique, mécanobiologie des systèmes complexes. mémoire d'habilitation à diriger des recherches. Université Paris XII.
- RAMTANI, S., FERNANDES-MORIN, E. et GEIGER, D. (2002). Remodeled-matrix contraction by fibroblasts : numerical investigations. *Comput Biol Med*, 32(4):283–296.
- RICHARDSON, M. K., HORNBRUCH, A. et WOLPERT, L. (1991). Pigment patterns in neural crest chimeras constructed from quail and guinea fowl embryos. *Dev Biol*, 143(2):309–319.

- RIVILIS, I., MILKIEWICZ, M., BOYD, P., GOLDSTEIN, J., BROWN, M. D., EGGINTON, S., HANSEN, F. M., HUDLICKA, O. et HAAS, T. L. (2002). Differential involvement of mmp-2 and vegf during muscle stretch- versus shear stress-induced angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283(4):H1430–1438.
- SALDIVAR, E., ORJE, J. N. et RUGGERI, Z. M. (2002). Tensile destruction test as an estimation of partial proteolysis in fibrin clots. *Am J Hematol*, 71(2):119–127.
- SCHERER, G. W., HDACH, H. et PHALIPPOU, J. (1991). Thermal expansion of gels : a novel method for measuring permeability. *J. Non-cryst. Solid*, 130:157–170.
- SECOMB, T. W. (1995). Mechanics of blood flow in the microcirculation. *Symp Soc Exp Biol*, 49:305–321.
- SEKIMURA, T., MADZVAMUSE, A., WATHEN, A. J. et MAINI, P. K. (2000). A model for colour pattern formation in the butterfly wing of papilio dardanus. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 267(1446):851–859.
- SELIKTAR, D., NEREM, R. M. et GALIS, Z. S. (2001). The role of matrix metalloproteinase-2 in the remodeling of cell-seeded vascular constructs subjected to cyclic strain. *Ann Biomed Eng*, 29(11):923–934.
- SELIKTAR, D., NEREM, R. M. et GALIS, Z. S. (2003). Mechanical strain-stimulated remodeling of tissue-engineered blood vessel constructs. *Tissue Eng*, 9(4):657–666.
- SERINI, G., AMBROSI, D., GIRAUDO, E., GAMBA, A., PREZIOSI, L. et BUSSOLINO, F. (2003). Modeling the early stages of vascular network assembly. *EMBO J*, 22(8):1771–1779.
- SHERRATT, J. A. et CHAPLAIN, M. A. (2001). A new mathematical model for avascular tumour growth. *J Math Biol*, 43(4):291–312.
- SHERRATT, J. A., SAGE, E. H. et MURRAY, J. D. (1993). Chemical control of eukaryotic cell movement : a new model. *J Theor Biol*, 162(1):23–40.
- SHREIBER, D. I., BAROCAS, V. H. et TRANQUILLO, R. T. (2003). Temporal variations in cell migration and traction during fibroblast-mediated gel compaction. *Biophys J*, 84(6):4102–4114.
- SHREIBER, D. I., ENEVER, P. A. et TRANQUILLO, R. T. (2001). Effects of pdgf-bb on rat dermal fibroblast behavior in mechanically stressed and unstressed collagen and fibrin gels. *Exp Cell Res*, 266(1):155–166.
- SIEMINSKI, A. L., HEBBEL, R. P. et GOOCH, K. J. (2004). The relative magnitudes of endothelial force generation and matrix stiffness modulate capillary morphogenesis in vitro. *Exp Cell Res*, 297(2):574–584.
- SMITH, J. D., DAVIES, N., WILLIS, A. I., SUMPIO, B. E. et ZILLA, P. (2001). Cyclic stretch induces the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. *Endothelium*, 8(1):41–48.

- STOPAK, D. et HARRIS, A. K. (1982). Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. i. tissue culture observations. *Dev Biol*, 90(2):383–398.
- STUPACK, D. G. et CHERESH, D. A. (2003). Apoptotic cues from the extracellular matrix : regulators of angiogenesis. *Oncogene*, 22(56):9022–9029.
- STÉPHANOU, A., MCDUGALL, S. R., ANDERSON, A. R. A. et CHAPLAIN, M. A. J. (2004). Mathematical modelling of the influence of blood rheological properties upon adaptative tumour-induced angiogenesis. *Mathematical and Computer Modelling*. accepté, sous presse.
- SUBARSKY, P. et HILL, R. P. (2003). The hypoxic tumour microenvironment and metastatic progression. *Clin Exp Metastasis*, 20(3):237–250.
- SUH, J. K., SPILKER, R. L., HOLMES, M. H. et MOW, V. C. (1989). A nonlinear biphasic finite element for soft hydrated tissues under finite deformation. *Advances in Bioengineering, ASME Winter annual Meeting, Boston*, pages 99–100.
- SUN, W., SACKS, M. S., SELLARO, T. L., SLAUGHTER, W. S. et SCOTT, M. J. (2003). Biaxial mechanical response of bioprosthetic heart valve biomaterials to high in-plane shear. *J Biomech Eng*, 125(3):372–380.
- TARABOLETTI, G., D’ASCENZO, S., BORSOTTI, P., GIAVAZZI, R., PAVAN, A. et DOLO, V. (2002). Shedding of the matrix metalloproteinases mmp-2, mmp-9, and mt1-mmp as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol*, 160(2):673–680.
- TILLE, J. C., WANG, X., LIPSON, K. E., MCMAHON, G., FERRARA, N., ZHU, Z., HICKLIN, D. J., SLEEMAN, J. P., ERIKSSON, U., ALITALO, K. et PEPPER, M. S. (2003). Vascular endothelial growth factor (vegf) receptor-2 signaling mediates vegf-c(deltandeltac)- and vegf-a-induced angiogenesis in vitro. *Exp Cell Res*, 285(2):286–298.
- TRACQUI, P., WOODWARD, D. E., CRUYWAGEN, G. C., COOK, J. et MURRAY, J. D. (1995). *Journal of Biological Systems*, volume 3, chapitre A mechanical model for fibroblast-driven wound healing, pages 1075–1084.
- TRANQUI, L. et TRACQUI, P. (2000). Mechanical signalling and angiogenesis. the integration of cell-extracellular matrix couplings. *C R Acad Sci III*, 323(1):31–47.
- TRANQUILLO, R. T., DURRANI, M. A. et MOON, A. G. (1992). Tissue engineering science : consequences of cell traction force. *Cytotechnology*, 10:225–250.
- TURING, A. M. (1952). The chemical basis of morphogenesis. *Phil. Trans. R. Soc*, B237:37–72.
- TZAFRIRI, A. R., BERCOVIER, M. et PARNAS, H. (2002). Reaction diffusion model of the enzymatic erosion of insoluble fibrillar matrices. *Biophys J*, 83(2):776–793.
- VAILHÉ, B. (1997). *Réorganisation in vitro des cellules endothéliales sur matrice de fibrine en un réseau de pseudo-capillaires*. Thèse de doctorat, Université J. Fourier.

Bibliographie

- VAILHÉ, B., LECOMTE, M., WIERNSPERGER, N. et TRANQUI, L. (1998). The formation of tubular structures by endothelial cells is under the control of fibrinolysis and mechanical factors. *Angiogenesis*, 2(4):331–344.
- VAILHÉ, B., RONOT, X., TRACQUI, P., USSON, Y. et TRANQUI, L. (1997). In vitro angiogenesis is modulated by the mechanical properties of fibrin gels and is related to alphavbeta3 integrin localization. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 33(10):763–773.
- VAILHÉ, B., VITTET, D. et FEIGE, J. J. (2001). In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest*, 81(4):439–452.
- van HINSBERGH, V. W., COLLEN, A. et KOOLWIJK, P. (2001). Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 936:426–437.
- VARNER, J. A. (1997). The role of vascular cell integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in angiogenesis. *EXS*, 79:361–390.
- VELEGOL, D. et LANNI, F. (2001). Cell traction forces on soft biomaterials. i. microrheology of type i collagen gels. *Biophys J*, 81(3):1786–1792.
- VERNON, R. B., ANGELLO, J. C., IRUELA-ARISPE, M. L., LANE, T. F. et SAGE, E. H. (1992). Reorganization of basement membrane matrices by cellular traction promotes the formation of cellular networks in vitro. *Lab Invest*, 66(5):536–547.
- VERNON, R. B. et GOODEN, M. D. (2002). New technologies in vitro for analysis of cell movement on or within collagen gels. *Matrix Biol*, 21(8):661–669.
- VERNON, R. B., LARA, S. L., DRAKE, C. J., IRUELA-ARISPE, M. L., ANGELLO, J. C., LITTLE, C. D., WIGHT, T. N. et SAGE, E. H. (1995). Organized type i collagen influences endothelial patterns during "spontaneous angiogenesis in vitro" : planar cultures as models of vascular development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 31(2):120–131.
- WARNER, T. D. et MITCHELL, J. A. (2003). Hif, stretching to get control of vegf. *Clin Sci*, 105(4):393–394.
- WEBB, S. D., SHERRATT, J. A. et FISH, R. G. (2001). Modelling tumour acidity and invasion. *Novartis Found Symp*, 240:169–181.
- WEISS, J. A., GARDINER, J. C. et BONIFASI-LISTA, C. (2002). Ligament material behavior is nonlinear, viscoelastic and rate-independent under shear loading. *J Biomech*, 35(7):943–950.
- WOLPERT, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol*, 25(1):1–47.
- WUDUNN, D. (2001). The effect of mechanical strain on matrix metalloproteinase production by bovine trabecular meshwork cells. *Curr Eye Res*, 22(5):394–397.
- YOSHINO, H., MORITA, I., MUROTA, S. I. et ISHIKAWA, I. (2003). Mechanical stress induces production of angiogenic regulators in cultured human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res*, 38(4):405–410.

- ZHAO, M., LIN, N., WANG, C. et PENG, S. (2003). Synthesis and thrombolytic activity of fibrinogen fragment related cyclopeptides. *Bioorg Med Chem Lett*, 13(5):961–964.
- ZHOU, J. et FUNG, Y. C. (1997). The degree of nonlinearity and anisotropy of blood vessel elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26):14255–14260.

Sixième partie .

Publication

Critical conditions for pattern formation and in vitro tubulogenesis driven by cellular traction fields

Patrick Namy, Jacques Ohayon, Philippe Tracqui*

*Equipe Dynacell, Laboratoire TIMC-IMAG, CNRS UMR 5525, Institut de l'Ingénierie et de l'Information de Santé (In³s),
F-38706 La Tronche cedex, France*

Received 27 March 2003; received in revised form 19 September 2003; accepted 7 October 2003

Abstract

In vitro angiogenesis assays have shown that tubulogenesis of endothelial cells within biogels, like collagen or fibrin gels, only appears for a critical range of experimental parameter values. These experiments have enabled us to develop and validate a theoretical model in which mechanical interactions of endothelial cells with extracellular matrix influence both active cell migration—haptotaxis—and cellular traction forces. Depending on the number of cells, cell motility and biogel rheological properties, various 2D endothelial patterns can be generated, from non-connected stripe patterns to fully connected networks, which mimic the spatial organization of capillary structures. The model quantitatively and qualitatively reproduces the range of critical values of cell densities and fibrin concentrations for which these cell networks are experimentally observed. We illustrate how cell motility is associated to the self-enhancement of the local traction fields exerted within the biogel in order to produce a pre-patterning of this matrix and subsequent formation of tubular structures, above critical thresholds corresponding to bifurcation points of the mathematical model. The dynamics of this morphogenetic process is discussed in the light of videomicroscopy time lapse sequences of endothelial cells (EAhy926 line) in fibrin gels. Our modeling approach also explains how the progressive appearance and morphology of the cellular networks are modified by gradients of extracellular matrix thickness.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Angiogenesis modeling; Endothelial cell network; Cellular traction; Biogel; Biomechanical instabilities; Bifurcation; Finite element method

1. Introduction

In many physiological and pathological processes, including wound healing, placental development, solid tumor growth or inflammation, formation of new capillaries from pre-existing vasculature plays a crucial role. It is largely recognized that this morphogenetic branching process, globally defined as angiogenesis, is in fact a rather complicated and highly regulated multifactorial process (Vailhe et al., 1997; Cines et al., 1998; Ingber, 2002). It begins in vivo with the degradation of the extracellular matrix (ECM) and subsequent dispersion of endothelial cells (EC) which also acquire the ability to migrate toward angiogenic stimuli. Cell proliferation and their subsequent association in tube-

like structures (tubulogenesis) give rise to the lumen of new capillaries, while tube interconnections and anastomoses define the building topology of the new capillary network (Folkman and Haudenschild, 1980). EC cultured on biogel can mimic this morphogenetic process, and thus provide experimental models allowing progressive investigations of both the large number of biological factors involved in the different phases, and, more importantly, of the different ways these factors interplay (Ingber, 2002).

Angiogenic factors can be roughly divided into soluble (mainly cytokines and a large number of peptides) and insoluble substances (Sage and Vernon, 1994). Stimulation of cell motility by growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) is well documented (Roman and Weinstein, 2000), with recent emphasis on possible agonistic effects on the cell response depending on VEGF spatial distribution (Gerhardt et al., 2003). Chemotactic cell response

*Corresponding author. Tel.: +33-476-549-486; fax: +33-476-549-549.

E-mail address: philippe.tracqui@imag.fr (P. Tracqui).

induced by such diffusible growth factors is still largely considered as a fundamental mechanism for vascular network formation. However, the increasing recognition of mechanical forces as key regulators of cell function has significantly enlarged the chemotactic paradigm by taking into account the determinant role of mechanical coupling between endothelial cells and ECM in tubulogenesis. Indeed, many cell functions such as migration, proliferation and adhesion are influenced by the biomechanical context (Lambert et al., 2001) and an increasing amount of data has established that bidirectional cell–ECM signaling depends on the balance between the traction exerted by the cells and the passive mechanical resistance of the ECM to these cellular forces (Ingber, 2002; Jamora and Fuchs, 2002). In the context of *in vitro* angiogenesis, videomicroscopy imaging has provided a clear and direct evidence of the mechanical stresses undergone by the ECM: spatial reorganization of EC, seeded on a fibrin matrix, is correlated to an increasing dilatation of ECM areas progressively depleted of fibrin, the lacunae (Vailhe et al., 1997). These lacunae both increase in size and number, leading to a complete remodeling of the matrix into a scaffold which would define the underlying architecture of the capillary network (Fig. 1).

In recent years, different mathematical models have been developed to describe *in vitro* angiogenesis experiments with direct consideration of insoluble angiogenic factors (Sherratt et al., 1993; Anderson and Chaplain, 1998; Sherratt and Chaplain, 2001; Levine et al., 2001). Anderson and Chaplain (1998) have modeled tumor-induced angiogenesis when cells respond to the haptotactic signal given by the fibronectin they secreted. More recently, Levine et al. (2001) have considered detailed biochemical interactions between EC and extracellular substances, and have simulated the creation of one pseudocapillary structure, but without considering the overall formation of a capillary network. However, even if these models can simulate EC network formation on

rigid substrate coated with ECM proteins, they cannot explain morphogenesis of cellular network observed on thick biogels. To overcome these limitations, continuum models have been developed in the conceptual framework defined by Murray and Oster (1984): they explicit the mechanical interactions between cells and a viscoelastic ECM, with special emphasis on the morphogenetic role played by cellular traction forces (Manoussaki et al., 1996; Olsen et al., 1998; Murray et al., 1998; Holmes and Sleeman, 2000; Tranqui and Tracqui, 2000). Considering that such mechanical interactions are of primary importance during *in vitro* angiogenesis, Manoussaki et al. (1996) and Murray et al. (1998) proposed a 2D model, essentially mechanical, which successfully reproduces the heterogeneous spatial distribution of cell density observed during *in vitro* angiogenesis. Our paper extends this approach by considering how the formation of cell networks is influenced by the coupling between haptotactic cell migration along ECM gradients, and the spatial distribution of the cell traction, which induces strain fields within the matrix. Indeed, we expect that the relationship between active cell migration and cell traction forces could initiate or prevent the development of the angiogenesis process. Recently, Shreiber et al. (2003) demonstrated that different migration–traction relationships can be exhibited during the compaction of biogel by fibroblasts, with either positive or negative correlation of cell migration to traction. In our paper, we investigate the importance of the balance between the rigidity of the extracellular adhesive support, the contractility tone of endothelial cell cytoskeleton and active cell migration as a critical step for capillary tube formation *in vitro*. We consider three possible controls of the ECM on the migration–traction relationships. The first one is a modulation of the cell migration by the ECM thickness. The second one is based on the possible long-range mechanical effects due to the fibrous nature of the ECM and the third one assumes that random cell

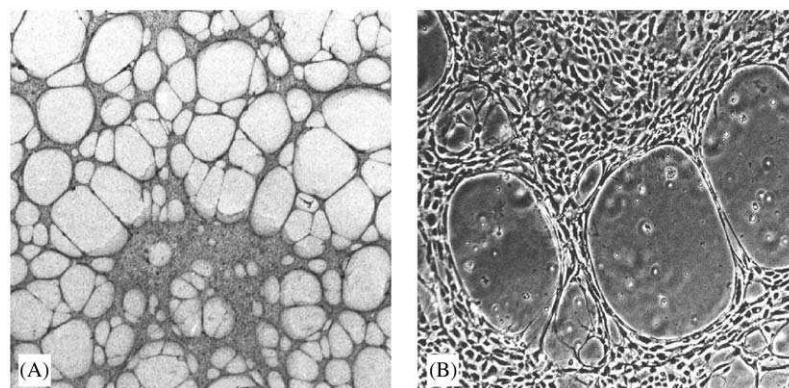


Fig. 1. Morphology of the free upper surface of the fibrin gels remodeled by HUVEC seeded 20 h before. (A) The formation of the capillary-like cellular network (grey areas) surrounding gel lacunae (white areas) is clearly visible (image size: 10 mm × 10 mm). (B) Enlargement of the cell–ECM composite scaffold around areas devoided of fibrin, the lacunae (phase-contrast microscopy, image size: 1 mm × 1 mm).

migration can be biased by the time varying strain field within the ECM.

Our aim is to demonstrate that this theoretical model can explain, for biophysically admissible parameter values, a whole set of experimental results conducted on fibrin biogels, and which have established that networks of tube-like cellular structures only appear for a precise range of controlled experimental parameters. Thus, model validation will be qualitatively and quantitatively discussed with regard to the tubulogenesis inhibition observed when the density of seeded cells increases, or when the stiffness of the ECM is increased. The less rigid the extracellular support, the more EC switched to a tubular network distribution (Vailhe et al., 1997; Tranqui and Tracqui, 2000; Deroanne et al., 2001).

In the first part of the paper, we derive theoretical bifurcation conditions that can be related to the critical experimental threshold beyond which a spatial pre-patterning of the fibrin gel can be generated. From this theoretical analysis, a finite element approach has been used to simulate the nonlinear dynamical behavior of the biomechanical model. We then investigated how EC spatial organization is controlled dynamically within the fibrin gel, the biogel patterning appearing as a pre-requisite scaffold for the formation of subsequent endothelial tube networks. Special attention has been paid to the model parameter values, derived from the quantification of cell traction forces (Tranquillo et al., 1992; Ferrenq et al., 1997) and the rheological analysis of fibrin gels with different fibrin concentrations and stiffness (Benkherourou et al., 2000). We finally discuss the length and time-scales of the biogel pre-patterning process, as well as the influence of geometrical features such as the ECM thickness on the tubulogenesis morphogenetic process.

2. Experimental approach

Experiments conducted with fibrin gels are of specific interest, since fibrin is a constitutive element of ECM, which is involved in wound healing, tumor invasion (Hayen et al., 1999; Van Hinsbergh et al., 2001), and in the elaboration of biomaterials (Grassl et al., 2002). Experimental results reported here are obtained with fibrin gels with 1 mm thickness, following the experimental protocol described in Vailhe et al. (1998). Briefly, 1 ml of fibrinogen solutions at concentrations varying between 0.5 and 4 mg/ml were mixed in sterile 35 mm diameter Petri dishes with $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free PBS 1X, thrombin (0.4 U/ml) and aprotinin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), an inhibitor of proteases, which is used to control the fibrin gel degradation. Fibrin gels were allowed to polymerize overnight at 37°C in a humidified atmosphere and were used during the following day. In vitro

assays were performed with a permanent EC line, EAhy926, derived from the fusion of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with a carcinoma cell line. Varying cell densities, typically 1.5×10^5 cells suspended in 1 ml of medium containing antibiotics, were then seeded on the fibrin gels.

Lacunae and cell network formation were observed under phase contrast with an Axiovert 135M inverted light microscope (Zeiss AchroStigmat 5×0.12) equipped with a temperature-controlled stage and an incubation chamber (37°C, 5% CO_2 , 90% hygrometry) (Carl Zeiss, Germany). The spatio-temporal dynamics of cell networks was recorded using a cooled CCD camera CoolSNAP (Photometrics®/Roper Scientific), allowing low light level detection and short exposure times.

3. Biomechanical modeling of in vitro angiogenesis

We model the fibrin gel as a linear viscoelastic continuous medium, submitted to the coupling between (i) an active cell migration against the ECM gradient induced by EC traction forces on one hand, (ii) the increasing level of cellular stresses with increasing ECM density on the other hand. The interplay of both phenomena generates a mechanical autocatalytic-like process, which is analysed by considering a minimal three-variable differential system: $n(\mathbf{x}, t)$ denotes the EC density at spatial position $\mathbf{x}$ at time t , $\rho(\mathbf{x}, t)$ is the ECM density at spatial position $\mathbf{x}$ at time t , and $\mathbf{u}(\mathbf{x}, t)$ is the displacement vector of the ECM from its original to its deformed position. If $\mathbf{x}_0$ and $\mathbf{x}_1$ are the original and displaced position of a point on the ECM, respectively, the corresponding displacement vector at time t is $\mathbf{u}(\mathbf{x}_0, t) = \mathbf{x}_1 - \mathbf{x}_0$.

3.1. Active and passive stresses within the ECM

The mechanical interactions between EC and ECM mainly result from the balance between the active traction stress generated by EC, and the passive resisting viscoelastic stresses developed by the ECM in response to this mechanical stimulation.

3.1.1. Cell traction stress

Adherent cells can exert substantial traction forces upon the surrounding tissue or matrix thanks to specific adhesion sites (Balaban et al., 2001). At the macroscopic level, cell traction forces are assumed to be (i) proportional to the gel density (Delvoye et al., 1991; Barocas et al., 1995) and (ii) bounded at high cell density due to inhibition contact phenomenon and competition for ECM binding sites (Moon and Tranquillo, 1993; Ferrenq et al., 1997). Thus, we consider that cell traction stresses can be modeled by the following stress

tensor:

$$\sigma_{cell} = \tau \rho n (N_2 - n) \mathbf{Id}, \quad (1)$$

where the parameter τ monitors the individual cellular traction amplitude, related to the cell contractility tone. The real positive constant N_2 ($N_2 > n$) controls the cell traction inhibition when cell density increases, and $\mathbf{Id}$ is the identity tensor.

3.1.2. Constitutive relationships describing the ECM rheology

We assume that the constitutive stress–strain relationship describing the viscoelasticity of the ECM is given by adding elastic stresses, $\sigma_{ecm}^{elastic}$, proportional to strains, and viscous stresses, $\sigma_{ecm}^{viscous}$, proportional to strain rates (Fung, 1993; Murray, 2003a).

$$\sigma_{ecm} = \sigma_{ecm}^{viscous} + \sigma_{ecm}^{elastic}.$$

The formulation of the $\sigma_{ecm}^{elastic}$ stress tensor is based on linear elasticity. Moreover, we have considered that the fibrous nature of the ECM may induce non-local mechanical effects since fibers can transmit elastic stress between points in the ECM that are quite far apart.

The first component of the elastic stress tensor is given by the Hooke's law

$$\sigma_{linear\ elasticity} = \frac{E}{1+\nu} \left[\varepsilon + \frac{\nu}{1-2\nu} \theta \mathbf{Id} \right].$$

Long-range elastic effects have been modeled by considering second-order terms in the elastic stress tensor (Cruywagen et al., 1997; Murray, 2003a):

$$\sigma_{long-range\ elasticity} = \frac{E}{1+\nu} \left[-\beta_1 \nabla^2 \varepsilon - \frac{\nu}{1-2\nu} \beta_2 \nabla^2 \theta \mathbf{Id} \right].$$

In these formulae, ε is the strain tensor ($\varepsilon = \frac{1}{2}(\nabla \mathbf{u} + \nabla \mathbf{u}^T)$), E is the Young's modulus, ν the Poisson ratio, β_1 and β_2 are the long-range elastic coefficients (β_1 and β_2 nonnegative constants, in m^2 unit), θ is the dilatation ($\theta = \nabla \cdot \mathbf{u}$) and $\mathbf{Id}$ is the identity tensor. As it will be shown in the model theoretical analysis, such long-range effects can stabilize the ECM spatial inhomogeneous patterns which can be observed beyond some bifurcation thresholds.

Combining linear and long-range elasticity, we obtain the following expression of the elastic stress tensor:

$$\sigma_{ecm}^{elastic} = \sigma_{linear\ elasticity} + \sigma_{long-range\ elasticity}. \quad (2)$$

The viscous component of the ECM stress tensor is also defined in a linear framework, with viscous stress being proportional to the rate of change of the ECM strain tensor ε .

$$\sigma_{ecm}^{viscous} = \mu_1 \frac{\partial \varepsilon}{\partial t} + \mu_2 \frac{\partial \theta}{\partial t} \mathbf{Id},$$

where μ_1 and μ_2 are the shear and bulk viscosities, respectively.

3.2. Endothelial cell migration equation

Cell migration is a multifactorial process, which is exceedingly difficult to model. Indeed, we have to deal with both molecular-level cell properties and population-level cell function, where individual cell parameters (translocation speed, adhesion strength) are reflected in cell population parameters (random motility or diffusion coefficient, chemotaxis/chemokinesis coefficients, haptotaxis/haptokinesis coefficients) (Maheshwari and Lauffenburger, 1998). However, our working hypothesis is that the modeling of cell population migration behavior by macroscopic fluxes should shed light on how cell migration operate, in conjunction with cellular traction, to drive the tubulogenesis process. As stated in the ‘‘Introduction’’ section, we will focus here on mechanically driven cell migration (mechanotaxis) rather than on a more involved chemotactic scenario. This is justified by our experimental model (obvious mechanical forces, no source of chemoattractant if compared to in vitro angiogenesis induced by tumor-released growth factors) and our wish to explain the tubulogenesis process by a minimal three-variable model (i.e. without considering chemoattractant concentration as a fourth variable). Focusing on mechanical control of cell migration is even reinforced by considering that the expression and secretion of chemoattractant, such as VEGF, can be increased by mechanical factors such as cell stretch (Warner and Mitchell, 2003; Yoshino et al., 2003).

In our modeling of cell migration, the random dispersal of cells down a cell density gradient, i.e. cell diffusion, is counterbalanced by cell migration up an adhesive extracellular gradients (haptotaxis), assumed proportional to the gradient of matrix density generated by cell traction forces. The haptotactic flux J_h is thus given by

$$\mathbf{J}_h = h n \nabla \rho,$$

where h is the haptotactic coefficient. Indeed, cells can get a stronger grip on ECM regions with higher number of adhesion sites, resulting in a bimodal variation of the migration speed when binding site density is increased (Palecek et al., 1997).

Another well-documented component of cell mechanotaxis is the migration by contact guidance, where the extracellular substrate defines preferred directions for cell locomotion (Barocas and Tranquillo, 1997; Girton et al., 2002). In particular, Korff and Augustin (1999) performed angiogenesis experiments on a pre-stressed ECM and quantified the extent of anisotropic cell migration in vitro. These results will be used here as the experimental counterpart of our analysis of strain-dependent diffusion based on the theoretical approach developed by Cook (1995) to account for ECM fiber orientation. He proposed to modify the usual expression

of isotropic cell diffusion by considering a strain-biased random walk of cells described by the following diffusive flux:

$$\mathbf{J}_d = -\nabla \cdot (\mathbf{D}(\boldsymbol{\varepsilon})n),$$

where $\mathbf{D}(\boldsymbol{\varepsilon})$ is a strain-biased diffusion tensor.

Expansion of this strain-dependent diffusive flux gives: $\mathbf{J}_d = -\mathbf{D}(\boldsymbol{\varepsilon})\nabla n - n\nabla \cdot [\mathbf{D}(\boldsymbol{\varepsilon})]$ which provides an additional term, compared to the usual expression $\mathbf{J}_d = -\mathbf{D}\nabla n$. This relationship can be compared to the particular flux expression derived from the master equation, based on the principles of the reinforced random walk, of Othmer and Stevens (1997): they called it a “chemotactic sensitivity” in the case of a chemical-biased diffusion. In our case, this term indicates a mechano-sensitivity. The influence of this additional term on ECM remodeling will be analysed below. Considering all these components of cell migration, cell density variation with time is given by the equation:

$$\begin{aligned} \text{rate of change of cell density} \\ = \text{cell convection} + \text{cell diffusion} + \text{cell haptotaxis} \\ + \text{cell proliferation} - \text{cell death}. \end{aligned}$$

Typical cell proliferation doubling time is in the order of 30 h for EAhy926 cells, and thus cell proliferation can be neglected in the first stage of the tubulogenesis process. Observations of the fibrin gel–EC medium also indicate that cell detachment and apoptosis is limited in the experimental time-scale. Thus, the above balance equation reduces to the following conservation equation:

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \nabla \cdot [\mathbf{J}_c + \mathbf{J}_d + \mathbf{J}_h] = 0, \quad (3)$$

where $\mathbf{J}_c = n\partial\mathbf{u}/\partial t$ is the passive cell convective flux.

3.3. ECM conservation equation

In addition to the mechanical remodeling, ECM structure and composition can be affected by the matrix proteolysis and the localized secretion of new ECM by the cells. This latter phenomenon is quite difficult to quantify experimentally and requires a specific approach based, for instance, on ECM labeling with fluorescent probes. If ECM biosynthesis can have significant effect on rigid substrate, the amount of newly secreted matrix will remain quite negligible with regard to the existing initial fibrin matrix in our experiments. Furthermore, Vernon et al. (1995) reported that even EC which do not synthesized type-I collagen, were able to reorganize, on a longer time-scale, the ECM and to create a cellular network.

On the other hand, ECM proteolysis, induced by specific proteases, can significantly affect biochemical ECM remodeling. Under these conditions, the spatio-temporal evolution of the ECM density is given by the

mass balance equation:

$$\begin{aligned} \text{rate of change of ECM density} \\ = \text{convection} - \text{degradation}. \end{aligned}$$

In order to investigate a minimal possible scenario for the tubulogenesis process, we will however neglect, in our following analysis, the degradation term. This simplification is supported by both experimental and theoretical considerations. Experimentally, ECM degradation can be modulated and prevented by using aprotinin (see “Experimental approach” section), an inhibitor of matrix proteases (Vailhe et al., 1998). Vailhe and his coworkers also measured the time evolution of the concentration of fibrin degradation products during the tubulogenesis process. They showed that fibrin degradation remains very limited when the first lacunae are formed in the biogel. We therefore consider that ECM proteolysis will mostly act as a modulator and as an amplifier of the tubulogenesis process. Theoretically, ECM proteolysis could be taken into account, in a first approximation, by considering a decrease of ECM elastic moduli in a successive quasi-state based approach.

According to the above arguments, we thus consider that the spatio-temporal variation of the ECM density is given by the conservation equation:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -\nabla \cdot \left[\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} \right]. \quad (4)$$

3.4. Reduction of the analysis to a 2D domain

In order to simplify the finite element simulation of our model, we restricted our analysis in a 2D domain by considering first that the fibrin gel geometry in our experiments is a thin plane (1 mm thickness), second that, since cells are seeded on the biogel (and not dispersed during gel polymerization), principal stress component in the vertical direction, σ_{33} , remains negligible. In order to keep a track of the gel thickness variation everywhere in the 2D domain, we then deduce from Hooke’s law the following relationship between the gel thickness $e(x, y, t)$ and the local ECM density $\rho(x, y, t)$ (see Appendix A):

$$e(x, y, t) = e_0(x, y) \left(\frac{1 - 3\nu}{1 - 2\nu} + \frac{\nu}{1 - 2\nu} \frac{\rho(x, y, t)}{\rho_0} \right), \quad (5)$$

where $e_0(x, y)$ and $e(x, y, t)$ denote the ECM thickness at time t_0 and t , respectively.

An additional approximation is necessary to take into account the effect of the boundary condition at the bottom of the Petri dish, where the biogel is attached. This boundary condition induces shear stresses which decrease with the matrix thickness. This effect is modeled by introducing, in the force balance equation, an external restoring body force, $\mathbf{R}_{ext}$, which is derived

by evaluating the pure shear stress, σ_{i3} , at $z = e(x, y, t)$. From linear elasticity theory, we get

$$\sigma_{i3}(x, y, t) = \frac{Eu_i(x, y, t)}{(1 + \nu)e(x, y, t)} \quad i = 1, 2. \quad (6)$$

where u_i is the i th component of the displacement vector $\mathbf{u}$.

Therefore, combining Eqs. (5) and (6), we can model the attachment force to the Petri dish by $\mathbf{R}_{ext} = s\mathbf{u}/\rho$, where s is the restoring elastic parameter depending on the elastic modulus E and the Poisson ratio.

Since, in these experiments, we can ignore all inertial effects compared to viscous effects, we obtain as the final the mechanical balance equation:

$$\nabla \cdot [\boldsymbol{\sigma}_{cell} + \boldsymbol{\sigma}_{ecm}] = \mathbf{R}_{ext}. \quad (7)$$

Combining Eqs. (1), (2) and (7), the force balance equation reads explicitly:

$$\nabla \cdot \left[\frac{E}{1 + \nu} \left(\boldsymbol{\varepsilon} - \beta_1 \nabla^2 \boldsymbol{\varepsilon} + \frac{\nu}{1 - 2\nu} (\theta - \beta_2 \nabla^2 \theta) \mathbf{Id} \right) + \mu_1 \frac{\partial \boldsymbol{\varepsilon}}{\partial t} + \mu_2 \frac{\partial \theta}{\partial t} \mathbf{Id} + \tau \rho n (N_2 - n) \mathbf{Id} \right] = s \frac{\mathbf{u}}{\rho}. \quad (8)$$

Finally, we have to specify the analytical expression of the 2D-strain dependent diffusion tensor $\mathbf{D}(\boldsymbol{\varepsilon})$, already given in Cook (1995) or in Manoussaki et al. (1996):

$$\mathbf{D}(\boldsymbol{\varepsilon}) = D_0 \begin{bmatrix} 1 + \frac{\varepsilon_{11} - \varepsilon_{22}}{2} & \frac{\varepsilon_{12} + \varepsilon_{21}}{2} \\ \frac{\varepsilon_{12} + \varepsilon_{21}}{2} & 1 - \frac{\varepsilon_{11} - \varepsilon_{22}}{2} \end{bmatrix},$$

where D_0 is a scalar parameter and ε_{ij} are the strain tensor components.

3.5. Initial and boundary conditions

In vitro angiogenesis experiments are conducted in a Petri dish, assimilated for simplicity to a squared $L \times L$ region Ω with boundary $\partial\Omega$, which is impermeable to cells and ECM. Therefore, boundary conditions are zero-flux ones for the model variables:

$$\mathbf{J}_d^n \cdot \boldsymbol{\eta} = \mathbf{J}_h^n \cdot \boldsymbol{\eta} = \mathbf{J}_c^n \cdot \boldsymbol{\eta} = 0,$$

where $\boldsymbol{\eta}$ is the normal vector of the boundary.

Moreover, since the biogel is stuck to the border of the Petri dish, we prescribe zero displacement on the boundaries ($\mathbf{u}|_{\partial\Omega} = 0$) and no propagation of strains through them ($(\nabla \cdot \boldsymbol{\varepsilon}) \cdot \boldsymbol{\eta} = 0$ on $\partial\Omega$). This implies a zero-flux boundary condition for ECM density (see Eq. (4)).

As initial conditions for EC density, we considered is a slightly and randomly perturbed ($\pm 10\%$) spatial distribution around the steady-state value n_0 . Additional initial cell distribution profiles will also be considered in the “Results” section. We furthermore assume an homogeneous initial distribution of the ECM density $\rho(\mathbf{x}, 0) = \rho_0$, the biogel being in an undeformed state $\mathbf{u} = 0$.

4. Mechanical instability conditions

We first determine relevant grouping of model parameters by introducing non-dimensionalized variables ($n, \rho, \mathbf{u}$) with associated normalized parameters (see Appendix B). In order to get indications on the critical role played by the leading model parameters, such as cell traction amplitude on the ECM remodeling, a linear stability analysis has been carried out, in a standard way, in a neighborhood of the normalized homogeneous steady state $n = 1, \rho = 1, \mathbf{u} = 0$. This analysis checks the pattern forming potential of our model and helps to predict parameter ranges for which spatial patterns could emerge from small spatial perturbations. However, as known from the nonlinear dynamical system theory, this analysis is no longer valid when nonlinear terms become dominant and the model solution grows. This approach will thus be completed by a numerical integration of the model equations using a finite element approach. The linearized equations are detailed in Appendix C.

Spatial perturbations are chosen of the particular form $\exp(i(kx + ly) + \xi(k, l)t)$, where k, l are the spatial wavenumbers in the x and y directions, respectively, and $\xi(k, l)$ is an eigenvalue of the Jacobian matrix of the linearized system. $\xi(k, l)$ determine the growth rate of the corresponding perturbation. The homogeneous steady state is linearly stable if all eigenvalues have a non-positive real part, with perturbations decreasing to zero as t tends to infinity. On the contrary, all spatial perturbations associated with eigenvalue $\xi(k, l)$, with a positive real part, grow exponentially.

Let $r = k^2 + l^2$. After some algebraic manipulations, the dispersion relation can be expressed as a fourth degree polynomial equation of the form

$$\xi(\xi - \xi_1)(a(r)\xi^2 + b(r)\xi + c(r)) = 0, \quad (9)$$

where ξ_1 is an eigenvalue with a negative real part. The dispersion coefficients $a(r)$, $b(r)$ and $c(r)$ are detailed in Appendix C.

Since we are focusing on the mechanical interaction between EC and the ECM, we choose the cell traction amplitude τ as the main bifurcation parameter. In the parameter space, we then derive from the expression of $c(r)$ a necessary and sufficient condition for a saddle-node bifurcation corresponding to a Turing instability (Murray, 2003a). This critical value τ_{turing} of the cell traction amplitude τ is given by

$$\tau_{turing} = \frac{\lambda + 2\mu + 2\sqrt{s(2\mu\beta_1 + \lambda\beta_2)}}{(3N_2/2 - 2) + h/D_0(N_2 - 2)}, \quad (10)$$

where parameter expressions are given in Appendix B.

However, the wavenumbers are of the form of $k = \pi k^*/L$, $l = \pi l^*/L$, where k^* and l^* are integers. Thus, the eigenvalues associated to $r = \pi^2 N/L^2$, $N = k^{*2} + l^{*2}$, are discrete. So, unless the dispersion relation

includes in its range of unstable modes at least one of these discrete values, no structure can develop (Fig. 2).

Let us discuss, from the instability condition (10), the respective influence of cell traction, cell migration and ECM mechanical properties on the onset of lacunae formation within the matrix. The importance of ECM mechanical properties on the ECM homogeneity (no lacunae) or ECM remodeling (creation of lacunae) appears explicitly through this relationship. For supercritical value of τ ($\tau > \tau_{\text{turing}}$), a non-uniform steady state of the matrix density can appear, which, according to Eq. (5), corresponds to local changes of the matrix thickness, i.e. to the first stages of the lacunae formation. This is in agreement with the intuition: the more rigid the ECM (increasing value of E , and thus of λ and μ (see Eq. (B.1) in Appendix B)), the larger the cellular traction must be to destabilize the system. Moreover, cell haptotaxis lowers the critical threshold for instability since, in absence of cell haptotactic migration ($h = 0$), a larger cell traction amplitude is required to induce the lacunae formation within the biogel. More globally, condition (10) highlights that the ratio h/D_0 is a key factor for lacunae formation: net cell migration can indeed occur in opposite directions, depending on the balance between haptotaxis and diffusion. Starting from a randomly perturbed but almost homogeneous distribution of cells, one can intuitively imagine how instabilities may be generated: if haptotaxis is large enough compared to diffusion, combination of active cell movement together with

mechanical local increase of cell traction forces may initiate an autocatalytic process which is strong enough to overcome the viscoelastic resistance of the ECM. The influence of the other model parameters can be discussed along the same lines. Restoring force coefficient s and material long-range parameters β_1 and β_2 tend to prevent the ECM mechanical remodeling. As expected, ECM remodeling is also controlled by inhibition of cell traction: for a given value of τ corresponding to lacunae formation, decreasing the limiting cell density value will prevent the appearance of a mechanical instability within the matrix.

However, we already quoted above that the linear stability analysis is no longer valid out of the steady-state neighborhood, i.e. when nonlinear effects intervene. This limitation can be partly overcome by using asymptotic expansion techniques, as developed for a similar but simpler two-variable cell–ECM mechanical model by Cruywagen et al. (1994) and more recently by Piechor and Kazmierczak (2002) for the analysis of traveling wave solutions. The analysis of the model nonlinear dynamical properties presented in the next sections relies on finite element simulations of the ECM remodeling. However, the analytical results obtained by Cruywagen et al. (1997) have been used to validate our numerical approach (see next paragraph).

5. Numerical simulations of the biogel patterning

5.1. Finite element simulations

A finite element method, developed with the Femlab[®] software, has been used to solve the partial differential equation system (Eq. (B.2) in Appendix B). The 2D square domain is meshed by 1000 nodes and 2500 triangle elements. Numerical integration of the time-dependent problem has been performed with the multi-step Matlab[®] solver *ode15*. Total conservation of the ECM density and EC concentration were monitored, and different mesh options (number of nodes, number of elements, degree of elements) were used to ensure stability and accuracy of our numerical computations. The validity of numerical approach has been especially checked by simulating the model of Cruywagen et al. (1997), which shares several mathematical similarities with the one presented here. We thus compared successfully our numerical results to the approximated analytical solutions derived from nonlinear bifurcation analysis, in the case of a non-symmetrical mixed mode steady state (Fig. 5 in Cruywagen et al., 1997).

5.2. Mechanical and cell parameter values

Ranges of values of the mechanical parameters of our model are both derived from previous experiments and

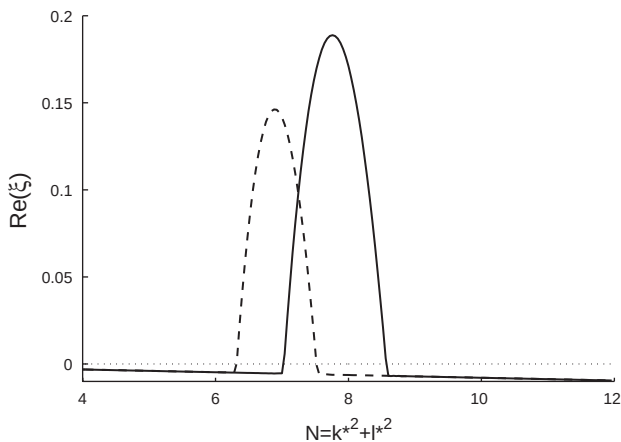


Fig. 2. Stability diagram derived from the model dispersion Eq. (9). The largest real part of eigenvalues is plotted as a function of the sum N of the squared values of the modes k^* , l^* in x and y directions, respectively ($N = k^{*2} + l^{*2}$ with k^* , l^* integers). Unstable modes will appear for N values taken inside the interval defined, on the $\Re(\xi(k, l)) = 0$ axis, by the inner region of the dotted and solid line curves. However, the above equality on N is only satisfied for the solid line curve, with $k^* = l^* = 2$, which corresponds to the mode (2, 2). The solid line curve is obtained with normalized parameters. Normalized parameters used, for the solid line curve, are: $\tau = 2.39$, $\lambda = 1.2$, $\mu = 1.8$, $\mu_1 = \mu_2 = 0.03$, $\beta_1 = \beta_2 = 0.0031$, $D_0 = 8 \times 10^{-5}$, $h = 4 \times 10^{-5}$, $N_2 = 3$, $s = 90$.

Table 1

Range of mechanical parameter values, extracted from literature and considered for the simulations of the mechanocellular model dynamics

Parameter	Numerical range	Units	Reference
Young's modulus E	10^3 – 10^4	Pa	Benkherourou et al. (2000)
Poisson ratio ν	0.15–0.25	—	Scherer et al. (1991)
Shear viscosity μ_1	10^5 – 10^8	Pa s	Shreiber et al. (2003)
Bulk viscosity μ_2	10^5 – 10^8	Pa s	Barocas and Tranquillo (1997)
Traction force coefficient τ	10^{-9} – 10^{-5}	Pa cm ⁹ /(g cell ²)	Murray et al. (1998)
			Holmes and Sleeman (2000)
			Tranquillo et al. (1992)
			($\tau = 0.001$ dyn cm ⁴ /(mg cell))
			Ferrenq et al. (1997)
			Shreiber et al. (2003)
			($\tau = 0.015$ dyn cm/cell)

Table 2

Range of cell parameter values

Biological features	Numerical range	Units	Reference
Cell diffusion D_0	10^{-9} – 10^{-6}	cm ² /s	DiMilla et al. (1992)
Cell haptotaxis h	10^{-8} – 10^{-5}	cm ² /(s g)	Barocas et al. (1995)
Initial cell concentration n_0	0.5×10^5 – 5×10^5	cell/cm ³	Dickinson and Tranquillo (1993)
Initial gel density ρ_0	0.5–8	mg/cm ³	Perumpanani and Byrne (1999)
Cell traction inhibition N_2	2×10^5 – 2×10^6	cell/cm ³	Delvoye et al. (1991); Vailhe et al. (1997)
			Murray et al. (1998)
			Delvoye et al. (1991); Vernon et al. (1992)
			Vailhe et al. (1997)
			Ferrenq et al. (1997)
			Tranqui and Tracqui (2000)

extracted from other publications (Table 1). In addition, Table 2 indicates the estimated range of values for the cell parameters used in the model simulation, with corresponding references.

6. Results

6.1. Qualitative aspects and dynamics of lacunae formation

Simulations of the model dynamical behavior have been performed for different parameter sets taken in the instability domain defined by the linear stability analysis. Preliminary simulations (Fig. 3) illustrate the robustness of the ECM remodeling with regard to different sets of shape of EC initial conditions. Indeed, linear stability analysis cannot predict which spatial patterns will emerge, from unstable mode selections, for different initial conditions on the model variables. In Fig. 3, similar steady-state patterns are obtained, starting from different initial distribution of cells, the initial ECM density being spatially homogeneous ($\rho_0(x, y) = 1$). Thus, ECM remodeling does not result from amplification of initial conditions but really from self-organizing properties of the cell–ECM composite medium.

As a first step in the analysis of the simulation results, we also quantify independently the influence of the strain-biased cell random motility by simulating anisotropic cell diffusion over an elastic medium pre-stressed by uniaxial stretching. Fig. 4 shows that there is a significant directional bias of cell random migration: cell motion increases in the direction of the largest dilatation of the medium, while the mean ratio between the diffusion coefficients in the x and y directions ($D_{11}(\varepsilon)/D_{22}(\varepsilon)$) is in the order of 1.4.

This simulated cell population behavior can be compared to experimental results obtained by Korff and Augustin (1999), who performed cell migration assay on a pre-stained biogel. We computed the same directionality (or shape) index of the cell distribution, defined as the ratio long axis/short axis of the ellipsoid defining iso-levels of cell concentrations (Fig. 5). This figure shows a very good agreement with the experimental index values.

However, we can wonder if this strain-dependent diffusion still remains significant when it is replaced in the global cell migration context defined by our model. We thus we carried out simulations of the complete model without (Fig. 6A) or with (Fig. 6B) a strain-biased diffusion. We found that, for conditions leading to ECM mechanical remodeling, the amplitude of the strain field within the ECM is too weak to influence

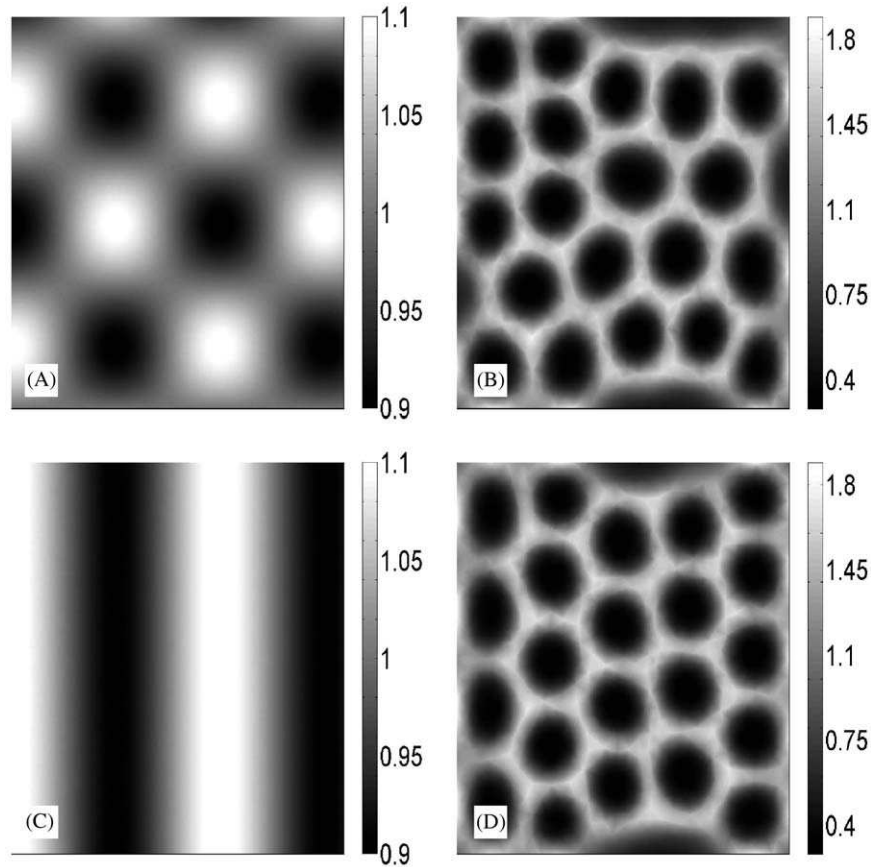


Fig. 3. Steady-state ECM patterns obtained, starting from the same initial total amount of cells but which are distributed according to different spatial profiles (A, C). After a transient phase, both cell distributions give nearly the same ECM remodeling pattern (B, D). Normalized parameters used were: $\tau = 3.41$, $\lambda = 0.15$, $\mu = 0.23$, $\mu_1 = \mu_2 = 0.003$, $\beta_1 = \beta_2 = 0.01$, $D_0 = 8 \times 10^{-6}$, $h = 4 \times 10^{-5}$, $N_2 = 2.72$, $s = 8800$. Scales indicate the normalized EC density.

qualitatively the tubulogenesis process (the mean ratio between the diffusion coefficients, defined above, is in this case in the order of 1.01). However, lacunae geometry seems to be more precisely defined in the strain-dependent diffusion case, with larger values of cell densities occurring along the ECM cords. Similar conclusions were obtained with the model of Manousaki et al. (1996) and Murray et al. (1998), i.e. without counterbalancing cell diffusion by haptotactic cell migration. Thus, strain-dependent cell diffusion does not appear essential for the tubulogenesis process.

6.2. Comparison with *in vitro* experiments

According to EC type and fibrin concentration, significant differences in time-scales have been reported for the development of *in vitro* tubulogenesis (Vernon et al., 1992; Vailhe et al., 1998, 2001). For HUVEC cultured on fibrin gel, lacunae appear typically in less than 2 h while cellular network formation is achieved after 24 h. Sizes of lacunae range from 0.2 to 1.5 mm. For Bovine Retinal Endothelial Cell (BREC), 46 h are

needed to observe the formation of capillary-like networks. Thanks to our theoretical analysis, we succeed in finding experimentally based parameter values which lead to simulations of lacunae formation with time and spatial scales in agreement with experimental ones. Simulated lacunae appear within 12 h with morphology and network organization very similar to the experimental observations (Fig. 7).

Fig. 8 shows the associated progressive formation of lacunae along a cross-section of the ECM, the matrix thickness being computed from Eq. (5).

Starting from this first level of model validation, we carried on a refined confrontation of the model properties with a larger body of experimental data, considering different bifurcation parameters for the onset of the mechanically induced instability leading to capillary-like structure formation.

6.2.1. Critical threshold of seeded endothelial cells concentration

Thanks to the stability analysis, we can predict, for given rheological properties of the fibrin gel, the EC

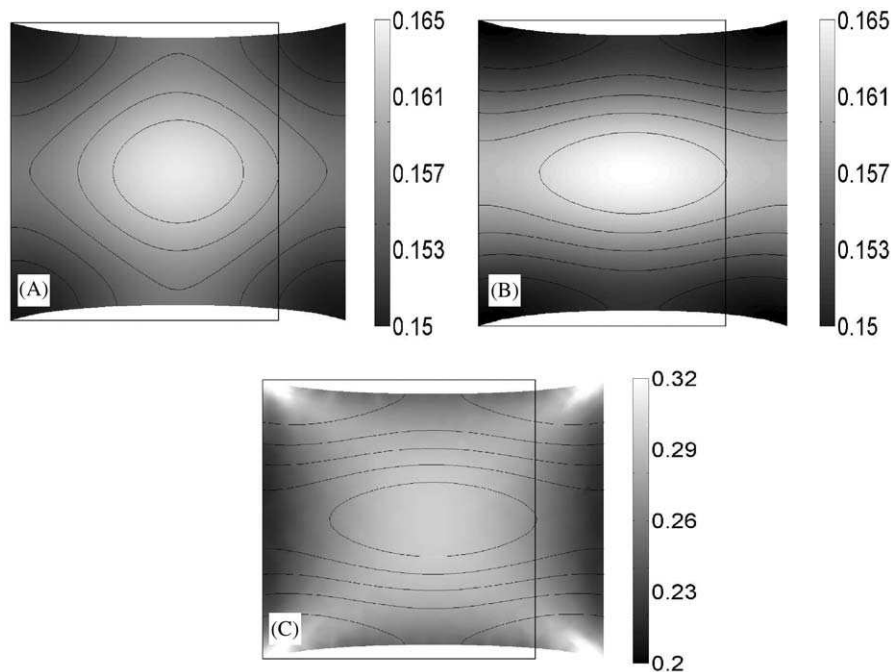


Fig. 4. Influence of ECM mechanical strains on cell random migration. Cell diffusion on a stretched elastic medium obeys either to the classical Fick's law with constant diffusion coefficient (A) or is controlled by a strain-dependant diffusion tensor $\mathbf{D}(\epsilon)$ (B) defined in the text. The uniaxial stretching of the elastic ECM generated the effective strains map shown in (C). Mechanically biased random cell motion is clearly observed in (B). In (C), the iso-levels of cell density have been superimposed to the effective strains map (see Appendix D). In (A) and (B), scales correspond to normalized cell density.

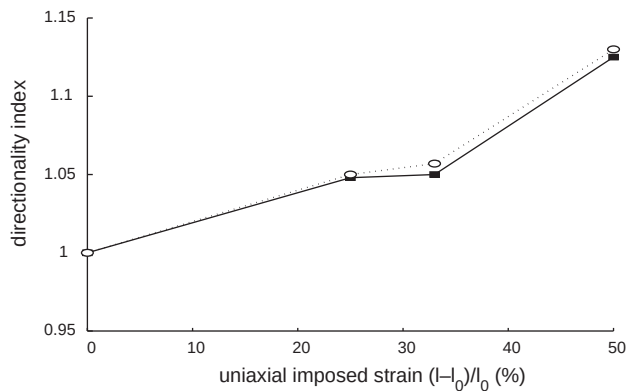


Fig. 5. Comparison between experimental and theoretical directionality indexes in mechanically biased cell migration for increasing uniaxial stretching of the ECM. Solid squares: experimental index reported by Korff and Augustin (1999) from cell migration experiments on pre-stained fibrin gels. Open circles: theoretical index derived from closed iso-contour curves (Fig. 4C). l_0 and l are the initial and deformed length of the sample, respectively.

concentration which has to be seeded initially in order to observe lacunae formation: for low EC density, the cellular traction is too weak to initiate tubulogenesis. Conversely, for high cell density, the inhibition contact phenomenon prevents the amplification of local mechanical stresses induced by cell traction forces. In order to get a measurement of the cell network extension and associated ECM remodeling, we simulated our model

with increasing values of the amount of EC seeded onto the ECM. These values were taken in the experimental range analysed in Vailhe et al. (1997). We then computed from our simulations the integral $\int_{\Omega} \delta(\rho(x,y) > 1) ds$, where $\delta(\cdot) = 1$ if the condition on the local ECM density is satisfied, zero otherwise. This estimator gives an indication of the percentage of lacunae network, similarly to the experimental network one used in Vailhe et al. (1997). Fig. 9 shows that our numerical simulations of the ECM remodeling are in good agreement with the theoretical instability predictions and experimental results: the mechanical forces triggering the tubulogenesis process cannot develop if the number of seeded EC is either too small or too large (Table 3).

Interestingly, we also show in Fig. 10 that the variation of initial EC concentration for different values of the total amount of seeded cells, initially distributed in a quasi-homogeneous (slightly randomly perturbed) manner in space, give rise to many different cell network patterns (Fig. 10). (B) exhibits isolated cords of cells, while (C) mimics the formation of anastomoses recurrently observed during angiogenesis. However, it is only in (D) that a cell network above a percolation threshold (Gamba et al., 2003) is observed: this latter spatial organization would correspond to a functional capillary-like network, where fluid exchange would be possible from one domain boundary to the opposite one. Globally, these simulations provide some

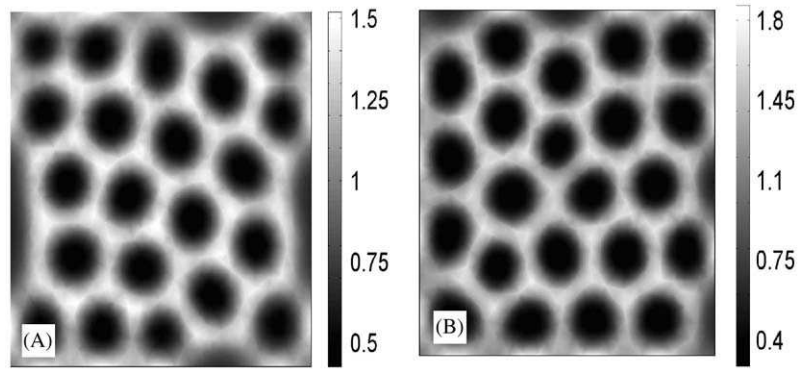


Fig. 6. EC networks simulated, with our model, in the case of isotropic diffusion with coefficient D_0 (A) or when considering strain-dependent cell diffusion (B). At the steady state, cell network patterns are almost the same. Parameters are those used in Fig. 3. Scales correspond to the normalized EC density.

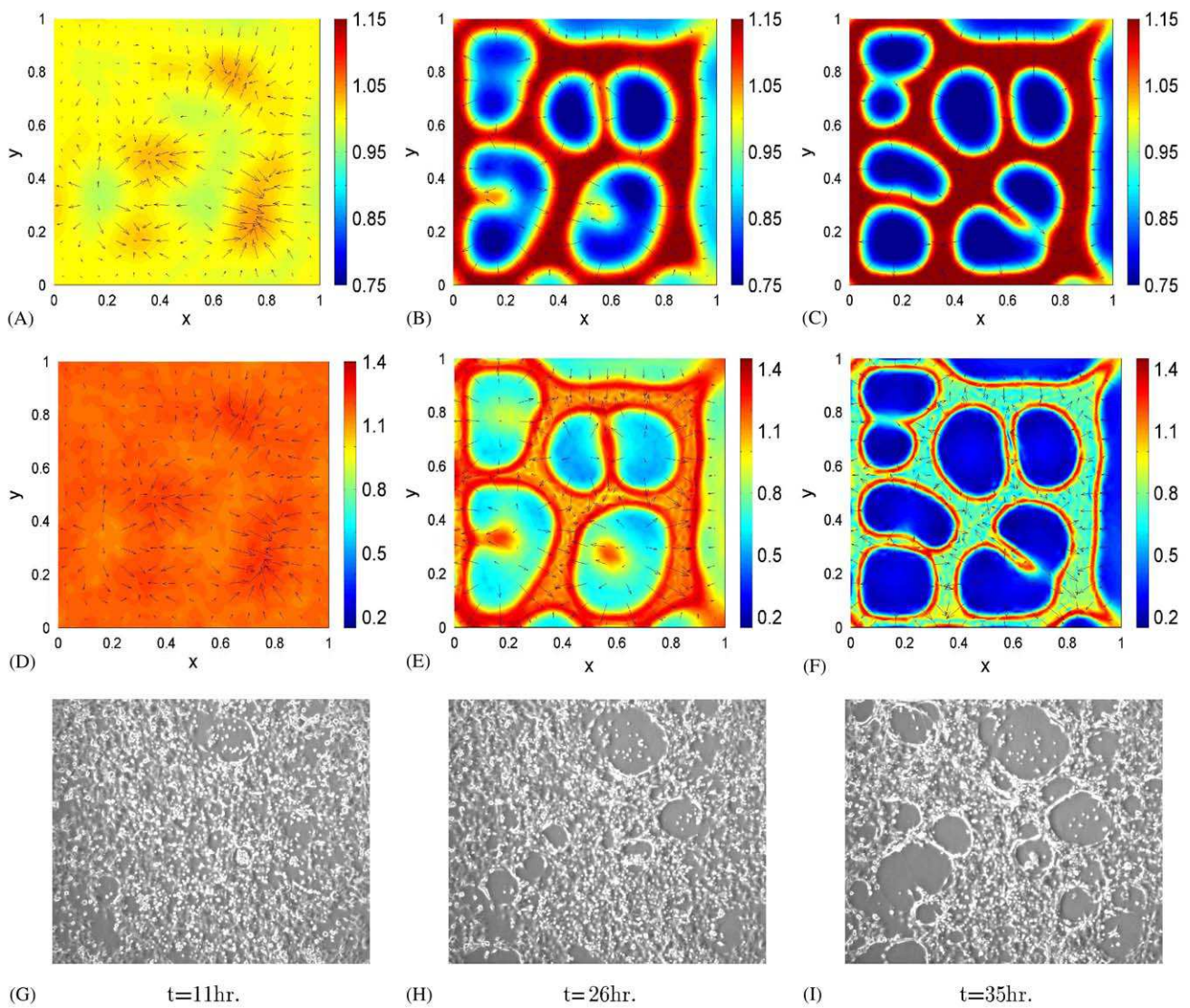


Fig. 7. Comparison between simulated (A–C) and observed (G–I) morphologies of the EC–ECM composite medium at successive times ($t_1 = 11$ h, $t_2 = 26$ h, $t_3 = 35$ h) of the tubulogenesis process. At each time, the map of the corresponding von Mises stresses σ_{vm} (see Appendix D) in the ECM is presented (D–F). The superimposed arrows indicate direction and amplitude of the local displacement vector, the arrow length being proportional to the vector norm. First, cells aggregate (A), then lacunae appear (B). Finally, lacunae network becomes well defined (C). Arrows exhibit the ECM displacement and accumulation towards the borders of the lacunae, in pace with increasing values of the ECM stresses. Normalized parameters for this simulation are: $\tau = 1.35$, $\lambda = 0.15$, $\mu = 0.49$, $\mu_1 = \mu_2 = 0.03$, $\beta_1 = \beta_2 = 0.003$, $D_0 = 4 \times 10^{-5}$, $h = 4 \times 10^{-4}$, $N_2 = 2.5$, $s = 200$. (A–C) scales correspond to normalized ECM density, (D–F) scales to the von Mises stresses distribution.

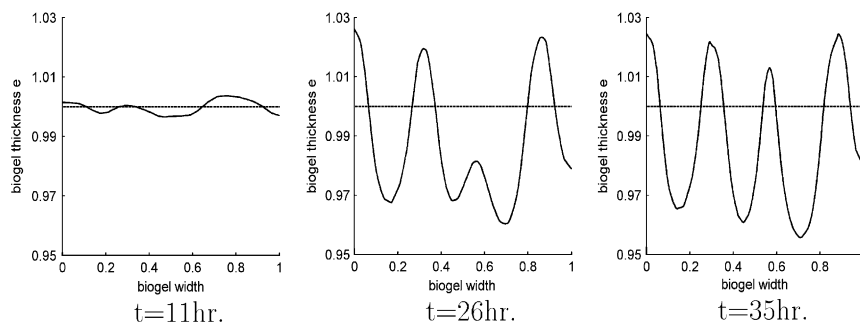


Fig. 8. Progressive amplification of the lacunae depth simulated with the mechanical model. Variations of the thickness of an ECM cross-section taken along the line $y = 0.7$ (Fig. 7) are presented at successive times $t = 11, 26$ and 35 h. As time goes on, lacunae become deeper and irregularly distributed.

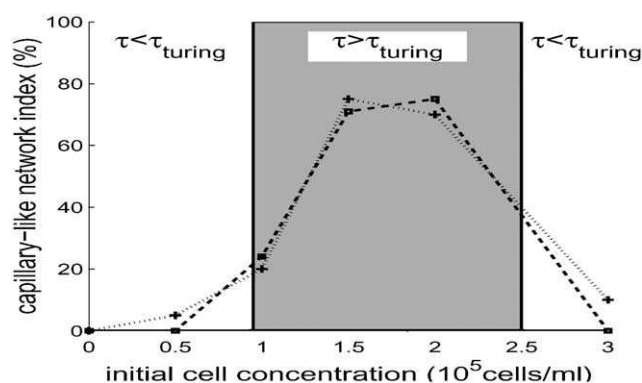


Fig. 9. Influence of the EC seeded concentration on the cell network formation. Grey area: theoretical instability window derived from linear stability analysis, dotted line: experimental cellular network index reported by Vailhe et al. (1997), dashed line: cellular network index computed from the model simulations. A very good agreement is obtained between experimental results, bifurcation analysis and model simulations. Normalized parameters used were: $\tau = 1.53 \times 10^{-11} n_0^2$, $\lambda = 1.54$, $\mu = 2.31$, $\mu_1 = \mu_2 = 0.308$, $\beta_1 = \beta_2 = 0.0001$, $N_2 = 6.58 \times 10^5 / n_0$, $D_0 = 4 \times 10^{-7}$, $h = 4 \times 10^{-6}$, $s = 800$.

theoretical guidelines for understanding how further control of cell proliferation, leading to increased values of the net amount of endothelial cells, could modify the functionality of the cell network arising from the tubulogenesis process.

6.2.2. Critical threshold for fibrin concentrations

A numerical approach, similar to the one described in the previous paragraph, has been used to analyse the influence of initial ECM density on tubulogenesis. Indeed, fibrin concentration is a critical parameter in in vitro angiogenesis experiments (Vailhe et al., 1997, 1998), since it affects the biogel stiffness. Similar results are obtained when the stiffness of other extracellular matrices such as type-I collagen or Matrigel (Deroanne et al., 2001) is modified. We took benefit of previous experiments and modeling of fibrin gels rheology (Benkherourou et al., 2000) to get estimated values of the fibrin gels Young's modulus E , for the experimental

range of fibrin concentrations considered in our simulations. Accordingly, we can compute the bifurcation curve corresponding to the critical cellular traction amplitude τ_{turing} when ECM density varies. As in the previous paragraph, we measure the network index, associated with each ECM remodeling pattern, thanks to the quantity $\int_{\Omega} \delta(\rho > 1) ds$. Comparison between theoretical values and experimental index values reported in Vailhe et al. (1997) are summarized in Fig. 11. The prediction of the range of fibrin concentrations, for which tubulogenesis occurs, is quite accurate and correspond to experimental values (Table 3).

6.2.3. Influence of increasing matrix thickness

In the previous sections, we investigated the influence of intrinsic model parameters, defining either EC–ECM mechanical interactions or cell migratory behavior. We analyse here the influence of external parameters such as those defined by the boundary conditions imposed on the ECM. It is known that these boundary conditions can dramatically modify the cell mechanical behavior, as exemplified for instance in the compaction of collagen gels by cells: significant cell spreading and cell traction forces are observed when the matrix boundaries are fixed, contrary to the situation where ECM boundaries are free to move (Shreiber et al., 2001). We study here if the attachment the ECM to the bottom of the Petri dish can significantly change the dynamics and the morphology of ECM remodeling. This is indeed a way for controlling the ECM mechanical response to cell traction stresses, intrinsic values of the ECM elasticity moduli being given. According to our model formulation, the additional shear stresses induced by this boundary effect are taken into account by an elastic restoring body force, whose amplitude decreases with increasing ECM thickness. The validation of this formulation is carried out with reference to the experimental work of Vernon et al. (1992), which reported the influence of gradients of ECM thickness on the formation of cellular networks.

Table 3

Quantitative comparison of critical parameters between experimental data (Vailhe et al., 1997) and theoretical results

Critical parameter	Units	Theoretical value	Exp. value	Fig.
n_0 (appearance of lacunae)	cell/cm ³	0.95×10^5	$0.5 \times 10^5 < \dots < 10^5$	9
n_0 (disappearance of lacunae)	cell/cm ³	2.5×10^5	$2 \times 10^5 < \dots < 3 \times 10^5$	9
ρ_0 (disappearance of lacunae)	mg/cm ³	1.35	$1 < \dots < 1.5$	11

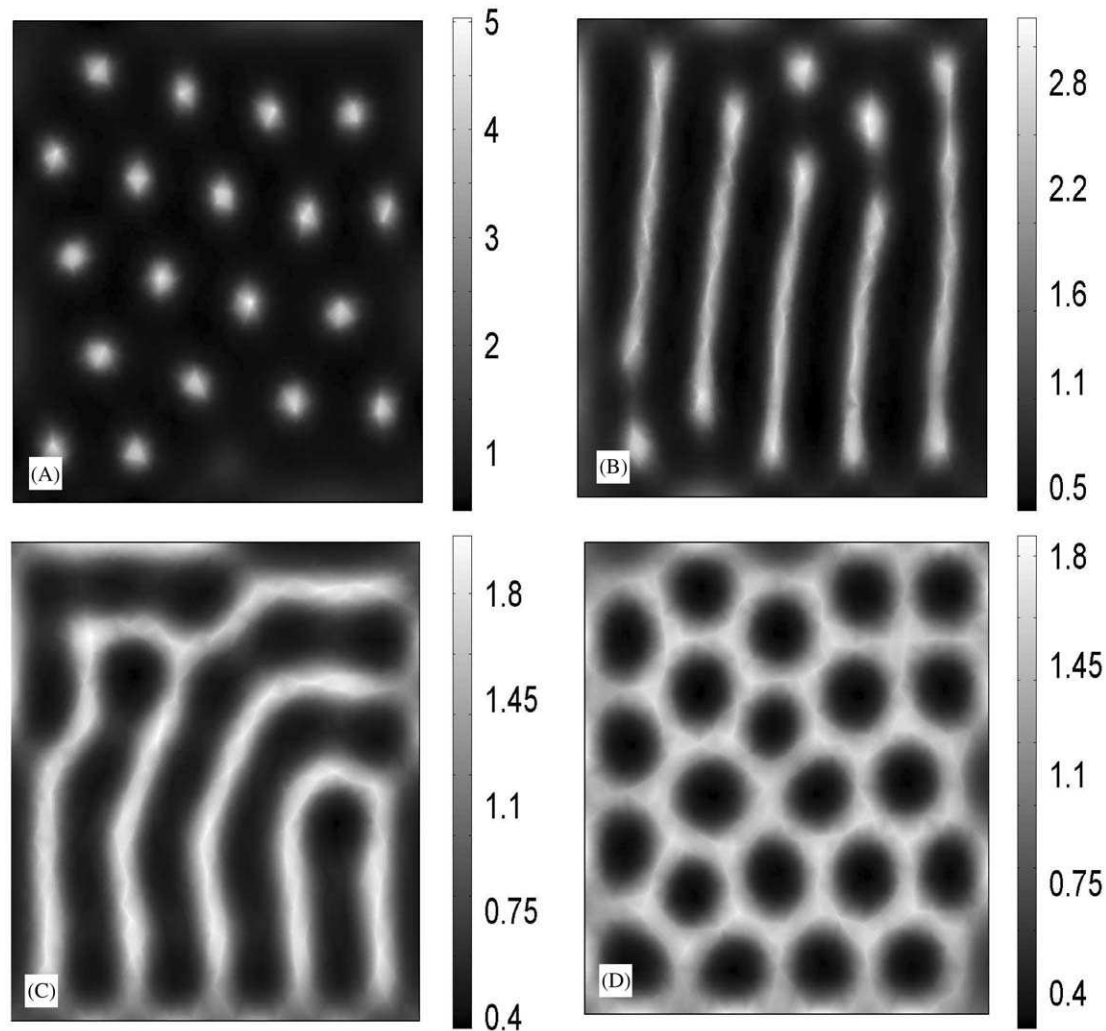


Fig. 10. Steady-state EC cellular networks obtained for different values of the initial cell concentration: (A) $n_0 = 5 \times 10^4$ cell/cm³; (B) $n_0 = 7 \times 10^4$ cell/cm³; (C) $n_0 = 9.5 \times 10^4$ cell/cm³ and (D) $n_0 = 1.1 \times 10^5$ cell/cm³. White areas denote areas of high cell densities, according to the indicated grey level chart. Parameters are those used in Fig. 3, except of those depending on n_0 . (D) The EC pattern corresponds to the mode (9,5). Scales correspond to normalized EC density.

As in Vernon et al. (1992), we have considered two gradients of ECM thickness: the first one with a 8% slope over a rectangular 3.75 mm $\times$ 1.5 mm domain, the second one with a 2% slope on a longer 15 mm $\times$ 1.5 mm rectangle. The simulated spatial organization of the cellular networks corresponding to both thickness gradients are shown in (Fig. 12A and B) together with the experimental cellular networks obtained by Vernon

et al. (1992) for bovine aortic cells cultured on basement membrane matrix with a thickness gradient of 2.8% (Fig. 12C). These simulated cellular spatial organization reproduced quite well the experimental observations of Vernon et al. (1992): (i) lacunae are more numerous and larger in area where the ECM is thicker, (ii) the transition from quasi-homogeneous distribution of cells at the ECM surface (left) to cellular networks (right)

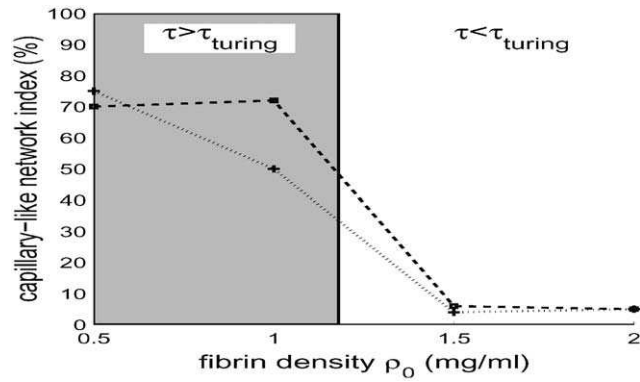


Fig. 11. Influence of the fibrin gel concentration, and thus of the gel stiffness, on the EC network formation. Grey area: theoretical instability window derived from linear stability analysis, dotted line: experimental cellular network index reported by Vailhe et al. (1997), dashed line: cellular network index computed from the model simulations. As in Fig. 9, a very good agreement between numerical simulations and experimental results is obtained. Normalized parameters are: $\tau = 1.3$, $\lambda = 115,740\rho_0^2$, $\mu = 231,480\rho_0^2$, $\mu_1 = \mu_2 = 154\rho_0$, $h = 0.04\rho_0$, $\beta_1 = \beta_2 = 0.003$, $D_0 = 8 \times 10^{-6}$, $N_2 = 2.5$, $s = 8800$.

occurs more abruptly when EC are seeded on a stiffer ECM gradient (Fig. 12A).

7. Discussion

The development of vascular structures is of fundamental importance in physio-pathological developmental processes. In vitro angiogenesis assays provide a simplified but controlled experimental framework within which the complexity of the cell–extracellular matrix interactions can be analysed (Folkman and Haudenschild, 1980; Ingber, 2002). They predominantly reveal the self-organizing properties of EC which can rearrange in tubular structures when they are seeded on ECM with appropriated mechanical properties (Vernon et al., 1992; Vailhe et al., 2001). However, understanding the appearance and regulation of such cellular spatial structures in the experimental framework presented here necessarily implies to consider both cell migration and cellular mechanical stresses. They are the core of the instability driven process of the cell network formation

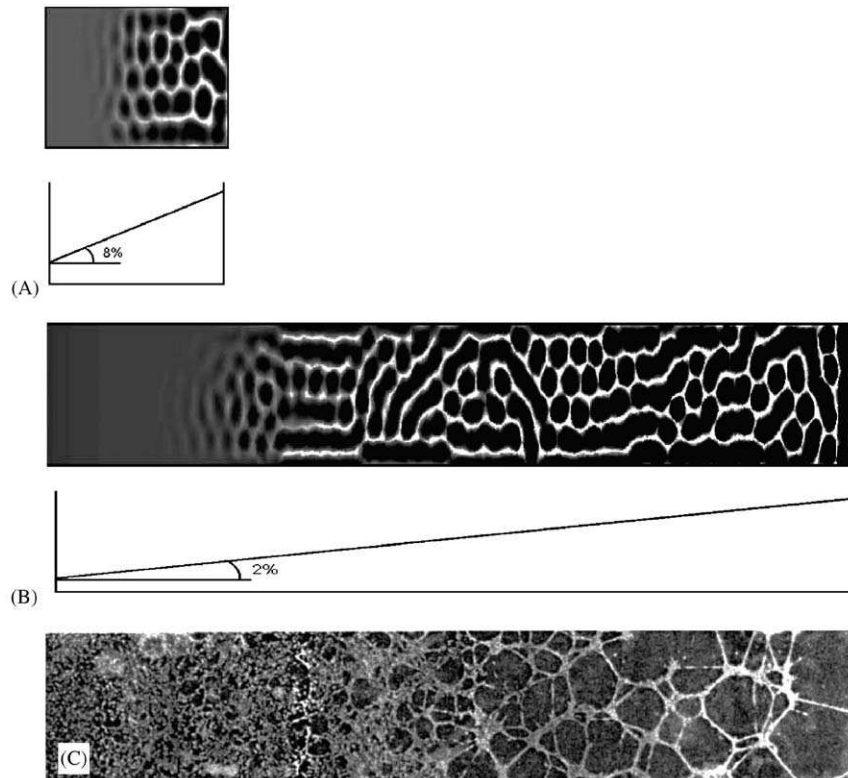


Fig. 12. Influence of gradients of ECM thickness on the observed morphologies of the cellular network and lacunae spatial distribution. Both a weak (2%) and a stiffer (8%) gradients have been considered to compare with the experimental results obtained by Vernon et al. (1992). The ECM is thinner on the left side than on the right side. (A, B) The formation of lacunae in the thickest regions of the ECM is enhanced. White areas correspond to high ECM (or EC) density, while ECM (or EC) densities are low in black areas. Transition from flattened shape to well-defined networks (corresponding to deeper lacunae) is more abrupt for stiffer gradients (A). Both simulations compared quite well with the experimental planar matrix morphologies reported in Vernon et al. (1992) for the same gradients of matrix thickness. For comparison, the experimental morphology obtained for the lowest gradient is shown (C), adapted from (Vernon et al., 1992). Normalized parameters for these simulations are: $\tau = 2.82$, $\lambda = 0.15$, $\mu = 0.23$, $\mu_1 = \mu_2 = 0.3$, $\beta_1 = \beta_2 = 0.01$, $D_0 = 8 \times 10^{-6}$, $h = 4 \times 10^{-4}$, $N_2 = 3$, $s = 8800$.

observed when EC are cultured in vitro on various extracellular matrices with given thickness and in absence of exogenous source of chemoattractants. Thus, the chemotactic scenario alone cannot explain this morphogenetic process and theoretical models, different from those recently proposed (Gamba et al., 2003; Serini et al., 2003), are required.

In close connection with experiments performed on fibrin gels with different endothelial cells (HUVEC, EAhy926 cells) (Vailhe et al., 1997, 1998), we analysed in this paper the fine tuning that exists between cell traction forces and the mechanical resistance of the ECM. Indeed, the bifurcation diagrams, derived from our model, are known to be valuable tools for predicting the threshold values and range of experimental variables within which lacunae and theoretical tubulogenesis can take place. Considering both these so defined instability domains and parameter values derived from previous experiments (Ferrenq et al., 1997; Benkherourou et al., 2000), we simulated the emergence of lacunae 10 h after EC seeding, with a clearly visible rearrangement of cells into tube-like structures (Fig. 7). We have shown that haptotaxis enabled the creation of endothelial tube networks for larger values of the Young's modulus than those considered in Manoussaki et al. (1996) and in Murray (2003b). Thus, active cell migration appears as a way to increase the “reactivity” of the EC–ECM composite medium to the tubulogenesis process. Conversely, a decrease of haptotactic cell motion, for example through a decreasing affinity of cell receptors to ECM adhesive proteins, would require an increasing active cell contractility and mechanical efficiency of the cytoskeleton to overcome reduced migration.

The model also explains nicely how ECM remodeling is controlled both by the seeded EC concentration (Fig. 9), where too low or too high cell density strongly hampers cell network formation, and by fibrin gel concentration (Fig. 11). The model simulations also account for the original experiments of Vernon et al. (1992), conducted on ECM with increasing thickness. Indeed, we simulated increased cell network formation when going from the thinner to the thicker part of the matrix (Fig. 12). Let us remark that, formally, our theoretical approach shares some similarities with the work of Painter (2000), which analysed the influence on pattern formation of a biochemical parameter whose value changes with the domain thickness. However, in our case, the influence of medium thickness corresponds to a boundary condition effect, all model parameters being unchanged.

A fundamental implication of cell traction forces is that EC can remodel the surrounding ECM through the reorganization of its structure by creating tension lines and structural pathways which can provide migration cues for other cells. Simulation of such strain-induced anisotropic cell diffusion was investigated in this paper,

but the strain amplitude appears to be too weak to influence qualitatively the lacunae network pattern formation. Similar conclusions were found by Manoussaki et al. (1996) and by Murray et al. (1998), Murray (2003b) even in absence of haptotactic cell migration.

As a whole, the combined experimental–theoretical approach presented here details the role of different experimental parameters within an integrated description of cell–ECM interactions, and successfully explains the first stages of the lacunae formation within the biogel. Different limitations of the model can be however noticed: the constitutive stress–strain relationships are formulated in the limit of the small strain formulation, and our reduced analysis of the tubulogenesis in a 2D domain do not take into account the vertical cellular stresses which will occur as soon as cells migrate within the ECM. However, we think that the continuous mechanical approach developed here is quite appropriated for an extended incorporation of new experimental factors, and refined analysis of the different signal transduction pathways involved in cell proliferation, matrix proteolysis and growth factor secretion, which are influenced by the biomechanical context.

Acknowledgements

We thank Caroline Rosello and Jocelyne Clément-Lacroix for their contributions to the in vitro experiments. This work was supported by a grant ACI Télémedecine from French Ministère de la Recherche, de la Science et de la Technologie.

Appendix A. Relationship between ECM thickness and ECM density

Thanks to the Hooke's law, and assuming that all strain tensor component are only spatially dependent on x and y , we can deduce that all stress tensor components are only dependent on x and y . Moreover, we have

$$\sigma_{33}^{hooke}(x, y, t) = \frac{E}{1 + \nu} \varepsilon_{33}(x, y, t) + \frac{E\nu}{(1 + \nu)(1 - 2\nu)} \theta_{3D}(x, y, t),$$

where $\theta_{3D}(x, y, t) = \frac{\partial u_1(x, y, z, t)}{\partial x} + \frac{\partial u_2(x, y, z, t)}{\partial y} + \frac{\partial u_3(x, y, z, t)}{\partial z}$ and $u_i(x, y, z, t)$ are the components of the displacement vector $\mathbf{u}(x, y, z, t)$. Assuming furthermore that the vertical stress component is negligible ($\sigma_{33}^{hooke}(x, y, t) = 0$), we obtain

$$\varepsilon_{33}(x, y, t) = -\frac{\nu}{1 - 2\nu} \theta_{3D}(x, y, t). \quad (\text{A.1})$$

Thanks to the local mass conservation of ECM, we can write that $\rho dV = \rho_0 dV_0$, where dV_0 and dV , ρ_0 and ρ , are the elementary volumes, densities at the initial and deformed state, respectively. Knowing that $dV = dX^1 dX^2 dX^3$, $dV_0 = dX_0^1 dX_0^2 dX_0^3$, where dX_0^1 , dX_0^2 ,

dX_0^3 and dX^1, dX^2, dX^3 are dimensions of volumes dV_0 and dV , respectively, and by writing that $dX^i = (1 + \varepsilon_{ii})dX_0^i$ for each $i = 1 \dots 3$, we obtain, under the small strain hypothesis

$$\rho(x, y, t) = \rho_0(1 - \theta_{3D}(x, y, t)). \quad (\text{A.2})$$

The thickness is calculated by using $e(x, y, t) = e_0(x, y)(1 + \varepsilon_{33})$, where $e_0(x, y)$ is the initial ECM thickness. Combining this expression of $e(x, y, t)$ with Eqs. (A.1) and (A.2), we get formula (5).

Appendix B. Non-dimensionalization of the model variables

The mechanocellular model equations can be non-dimensionalized by re-scaling time with the characteristic time-scale T (hours), the typical size L (diameter of the Petri dish) of the domain Ω , the initial EC concentration n_0 and the initial fibrin density ρ_0 . We set

$$\rho^* = \frac{\rho}{\rho_0}, \quad n^* = \frac{n}{n_0}, \quad u_1^* = \frac{u_1}{L}, \quad u_2^* = \frac{u_2}{L}, \quad x^* = \frac{x}{L},$$

$$y^* = \frac{y}{L}, \quad t^* = \frac{t}{T}$$

with the normalized parameters:

$$D_0^* = \frac{D_0 T}{L^2}, \quad \mu_1^* = \frac{\mu_1 \rho_0}{L^2 T}, \quad \mu_2^* = \frac{\mu_2 \rho_0}{L^2 T}, \quad N_2 = \frac{N_2}{n_0},$$

$$h^* = \frac{h T \rho_0}{L^2}, \quad \beta_1^* = \frac{\beta_1}{L^2}, \quad \beta_2^* = \frac{\beta_2}{L^2}$$

$$\lambda^* = \frac{E v \rho_0}{L^2 (1 + v)(1 - 2v)}, \quad \mu^* = \frac{E \rho_0}{2(1 + v)L^2},$$

$$\tau^* = \frac{\tau \rho_0^2 n_0^2}{L^2}. \quad (\text{B.1})$$

In the following text, asterisks have been dropped for convenience. The non-dimensionalized model is then

$$\nabla \cdot [2\mu(\varepsilon - \beta_1 \nabla^2 \varepsilon) + \lambda(\theta - \beta_2 \nabla^2 \theta) \mathbf{Id} + \mu_1 \frac{\partial \varepsilon}{\partial t}$$

$$+ \mu_2 \frac{\partial \theta}{\partial t} \mathbf{Id} + \tau \rho n (N_2 - n) \mathbf{Id}] = s \frac{\mathbf{u}}{\rho},$$

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \nabla \cdot \left[-\nabla \cdot (\mathbf{D}(\varepsilon) n) + h n \nabla \rho + n \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} \right] = 0,$$

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot \left[\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} \right] = 0. \quad (\text{B.2})$$

Appendix C. Linear stability analysis

The linearized system associated to the nonlinear partial differential system (B.2) is

$$\nabla \cdot \left[2\mu(\varepsilon - \beta_1 \nabla^2 \varepsilon) + \lambda(\theta - \beta_2 \nabla^2 \theta) \mathbf{Id} + \mu_1 \frac{\partial \varepsilon}{\partial t} \right.$$

$$\left. + \mu_2 \frac{\partial \theta}{\partial t} \mathbf{Id} + \tau n (N_2 - 2) \mathbf{Id} + \tau \rho (N_2 - 1) \mathbf{Id} \right] - s \mathbf{u} = 0,$$

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \nabla \cdot \left[-D_0 \nabla n - \frac{D_0}{2} \nabla^2 \mathbf{u} + h \nabla \rho + \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} \right] = 0,$$

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot \left[\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} \right] = 0.$$

The eigenvalue ξ_1 , used in the dispersion relationship (9), is equal to $-2(\mu\beta_1 r^2 + s + \mu r)/\mu_1 r$. Therefore, the real part of ξ_1 is always negative. The coefficients $a(r)$, $b(r)$ and $c(r)$, used in the dispersion relationship (9), are

$$a(r) = r(\mu_1 + \mu_2),$$

$$b(r) = (D_0(\mu_1 + \mu_2) + 2\mu\beta_1 + \lambda\beta_2)r^2$$

$$+ (2\mu + \lambda + \tau(3 - 2N_2))r + s,$$

$$c(r) = D_0(2\mu\beta_1 + \lambda\beta_2)r^3 + \left(D_0(2\mu + \lambda) \right.$$

$$\left. + \tau \left(h \left(2 - N_2 \right) + D_0 \left(2 - \frac{3N_2}{2} \right) \right) \right) r^2 + D_0 s r.$$

Appendix D. Formulae for the von Mises stress σ_{vm} and for the effective strain e_{ff}

The von Mises stress σ_{vm} is defined by

$$\sigma_{vm} = \sqrt{\frac{3}{2} \sum_{i,j} S_{ij}^2},$$

where S_{ij} are the components of the deviatoric stress tensor. They are defined as follows:

$$S_{ij} = \sigma_{ij} - \frac{1}{3} \text{Tr}(\boldsymbol{\sigma}) \delta_{ij},$$

where $\boldsymbol{\sigma} = \boldsymbol{\sigma}_{cell} + \boldsymbol{\sigma}_{ecm}$, Tr is the trace operator and δ_{ij} is the Kronecker symbol ($\delta_{ij} = 1$ if $i = j$, 0 otherwise).

In a similar way, the effective strain e_{ff} is defined by

$$e_{ff} = \sqrt{\frac{2}{3} \sum_{i,j} e_{ij}^2},$$

where e_{ij} are the components of the deviatoric strain tensor. They are defined as follows:

$$e_{ij} = \varepsilon_{ij} - \frac{1}{3} \text{Tr}(\boldsymbol{\varepsilon}) \delta_{ij},$$

where $\boldsymbol{\varepsilon}$ is the strain tensor.

References

- Anderson, A.R.A., Chaplain, M.A.J., 1998. Continuous and discrete mathematical models of tumor-induced angiogenesis. *Bull. Math. Biol.* 60, 857–900 doi: 10.1006/bulm.1998.0042.
- Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., Geiger, B., 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell Biol.* 3, 466–472.
- Barocas, V.H., Tranquillo, R.T., 1997. An anisotropic biphasic theory of tissue-equivalent mechanics: the interplay among cell traction,

- fibrillar network deformation, fibril alignment, and cell contact guidance. *J. Biomech. Eng.* 119, 137–145.
- Barocas, V.H., Moon, A.G., Tranquillo, R.T., 1995. The fibroblast-populated collagen microsphere assay of cell traction force—Part 2: measurement of the cell traction parameter. *J. Biomech. Eng.* 117, 161–170.
- Benkherourou, M., Gumery, P.Y., Tranqui, L., Tracqui, P., 2000. Quantification and macroscopic modeling of the nonlinear viscoelastic behavior of strained gels with varying fibrin concentrations. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 47, 1465–1475.
- Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., Barnathan, E.S., McCrae, K.R., Hug, B.A., Schmidt, A.M., Stern, D.M., 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91, 3527–3561.
- Cook, J., 1995. Mathematical models for dermal wound healing: wound contraction and scar formation. Ph.D. Thesis, University of Washington, Seattle, pp. 98–133.
- Cruywagen, G.C., Maini, P.K., Murray, J.D., 1994. Travelling waves in a tissue interaction model for skin pattern formation. *J. Math. Biol.* 33, 193–210.
- Cruywagen, G.C., Maini, P.K., Murray, J.D., 1997. Biological pattern formation on two-dimensional spatial domains: a nonlinear bifurcation analysis. *SIAM J. Appl. Math.* 57, 1485–1509.
- Delvoye, P., Wiliquet, P., Leveque, J.L., Nusgens, B.V., Lapiere, C.M., 1991. Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensional collagen gel. *J. Invest. Dermatol.* 97, 898–902.
- Deroanne, C.F., Lapiere, C.M., Nusgens, B.V., 2001. In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix-cytoskeleton. *Cardiovasc. Res.* 49, 647–658.
- Dickinson, R.B., Tranquillo, R.T., 1993. A stochastic model for adhesion-mediated cell random motility and haptotaxis. *J. Math. Biol.* 31, 563–600.
- DiMilla, P.A., Quinn, J.A., Albelda, S.M., Lauffenburger, D.A., 1992. Measurement of individual cell migration parameters for human tissue cells. *AIChE J.* 38, 1092–1104.
- Ferrenq, I., Tranqui, L., Vailhe, B., Gumery, P.Y., Tracqui, P., 1997. Modelling biological gel contraction by cells: mechanocellular formulation and cell traction force quantification. *Acta Biotheor.* 45, 267–293.
- Folkman, J., Haudenschild, C., 1980. Angiogenesis in vitro. *Nature (London)* 288, 551–556.
- Fung, Y.C., 1993. *Biomechanics. Mechanical Properties of Living Tissues*, 2nd Edition. Springer: New York, pp. 50–52.
- Gamba, A., Ambrosi, D., Coniglio, A., de Candia, A., Di Talia, S., Giraudo, E., Serini, G., Preziosi, L., Bussolino, F., 2003. Percolation, morphogenesis and burgers dynamics in blood vessels formation. *Phys. Rev. Lett.* 90, 118101–1–118101–4.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., Betsholtz, C., 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* 161, 1163–1177.
- Girton, T.S., Barocas, V.H., Tranquillo, R.T., 2002. Confined compression of a tissue-equivalent: collagen fibril and cell alignment in response to anisotropic strain. *J. Biomech. Eng.* 124, 568–575.
- Grassl, E.D., Oegema, T.R., Tranquillo, R.T., 2002. Fibrin as an alternative biopolymer to type-I collagen for the fabrication of a media equivalent. *J. Biomed. Mater. Res.* 60, 607–612 doi: 10.1002/jbm.10107.
- Hayen, W., Goebeler, M., Kumar, S., Riessen, R., Nehls, V., 1999. Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. *J. Cell Sci.* 112, 2241–2251.
- Holmes, M.J., Sleeman, B.D., 2000. A mathematical model of tumour angiogenesis incorporating cellular traction and viscoelastic effects. *J. Theor. Biol.* 202, 95–112 doi: 10.1006/jtbi.1999.1038.
- Ingber, D.E., 2002. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ. Res.* 91, 877–887.
- Jamora, C., Fuchs, E., 2002. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nature Cell Biol.* 4, E101–108 doi: 10.1038/ncb0402-e101.
- Korff, T., Augustin, H.G., 1999. Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J. Cell Sci.* 112, 3249–3258.
- Lambert, C.A., Colige, A.C., Lapiere, C.M., Nusgens, B.V., 2001. Coordinated regulation of procollagens I and III and their post-translational enzymes by dissipation of mechanical tension in human dermal fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 80, 479–485.
- Levine, H.A., Sleeman, B.D., Nilsen-Hamilton, M., 2001. Mathematical modeling of the onset of capillary formation initiating angiogenesis. *J. Math. Biol.* 42, 195–238 doi: 10.1007/s002850000037.
- Maheshwari, G., Lauffenburger, D.A., 1998. Deconstructing (and reconstructing) cell migration. *Microsc. Res. Tech.* 43, 358–368.
- Manoussaki, D., Lubkin, S.R., Vernon, R., Murray, J.D., 1996. A mechanical model for the formation of vascular networks in vitro. *Acta Biotheor.* 44, 271–282.
- Moon, A.G., Tranquillo, R.T., 1993. Fibroblast-populated collagen microsphere assay of cell traction force: Part 1. continuum model. *AIChE J.* 39, 163–175.
- Murray, J.D., 2003a. Mechanical theory for generating pattern and form. In: Murray, J.D. (Ed.), *Mathematical Biology II: Spatial Models and Biomedical Applications*, 3rd Edition. Springer, New York, pp. 311–334.
- Murray, J.D., 2003b. A mechanical theory for vascular network formation. In: Murray, J.D. (Ed.), *Mathematical Biology II: Spatial Models and Biomedical Applications*, 3rd Edition. Springer, New York, pp. 416–440.
- Murray, J.D., Oster, G.F., 1984. Cell traction models for generating pattern and form in morphogenesis. *J. Math. Biol.* 19, 265–279.
- Murray, J.D., Manoussaki, D., Lubkin, S.R., Vernon, R., 1998. A mechanical theory of in vitro vascular network formation. In: Little, C.D., Mironov, V., Sage, E.H. (Eds.), *Vascular Morphogenesis: In Vivo, In Vitro, In Mente*. Birkhäuser, Boston, Basel, Berlin, pp. 173–188.
- Olsen, L., Maini, P.K., Sherratt, J.A., 1998. Spatially varying equilibria of mechanical models: application to dermal wound contraction. *Math. Biosci.* 147, 113–129 doi: 10.1016/S0025-5564(97)00075-8.
- Othmer, H.G., Stevens, A., 1997. Aggregation, blowup and collapse: the abc's of taxis in reinforced random walks. *SIAM J. Appl. Math.* 57, 1044–1081.
- Painter, K.J., 2000. Modelling of pigment pattern formation in the skin of fishes. In: Maini, P.K., Othmer, H.G. (Eds.), *Mathematical Models for Biological Pattern Formation*. Springer, Berlin/Heidelberg, pp. 59–82.
- Palecek, S.P., Loftus, J.C., Ginsberg, M.H., Lauffenburger, D.A., Horwitz, A.F., 1997. Integrin–ligand binding properties govern cell migration speed through cell–substratum adhesiveness. *Nature (London)* 385, 537–540.
- Perumpanani, A.J., Byrne, H.M., 1999. Extracellular matrix concentration exerts selection pressure on invasive cells. *Eur. J. Cancer* 35, 1274–1280.
- Piechor, K., Kazmierczak, B., 2002. Heteroclinic solutions for a model of skin morphogenesis. In: Capasso, V. (Ed.), *Mathematical Modelling & Computing in Biology and Medicine. Fifth ESMTB Conference 2002*, Esculapio, Milan, pp. 545–551.

- Roman, B.L., Weinstein, B.M., 2000. Building the vertebrate vasculature: research is going swimmingly. *Bioessays* 22, 882–893.
- Sage, E.H., Vernon, R.B., 1994. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix: the growth and the glue. *J. Hypertens. Suppl.* 12, S145–S152.
- Scherer, G.W., Hdach, H., Phalippou, J., 1991. Thermal expansion of gels: a novel method for measuring permeability. *J. Non-cryst. Solid* 130, 157–170.
- Serini, G., Ambrosi, D., Giraudo, E., Gamba, A., Preziosi, L., Bussolino, F., 2003. Modeling the early stages of vascular network assembly. *EMBO J.* 22, 1771–1779.
- Sherratt, J.A., Chaplain, M.A.J., 2001. A new mathematical model for a vascular tumour growth. *J. Math. Biol.* 43, 291–312.
- Sherratt, J.A., Sage, E.H., Murray, J.D., 1993. Chemical control of eukaryotic cell movement: a new model. *J. Theor. Biol.* 162, 23–40 doi: 10.1006/jtbi.1993.1074.
- Shreiber, D.I., Enever, P.A.J., Tranquillo, R.T., 2001. Effects of PDGFBB on rat dermal fibroblast behavior in mechanically stressed and unstressed collagen and fibrin gels. *Exp. Cell Res.* 266, 155–166.
- Shreiber, D.I., Barocas, V.H., Tranquillo, R.T., 2003. Temporal variations in cell migration and traction during fibroblast-mediated gel compaction. *Biophys. J.* 84, 4102–4114.
- Tranqui, L., Tracqui, P., 2000. Mechanical signalling and angiogenesis. The integration of cell–extracellular matrix couplings. *C. R. Acad. Sci.* 323, 31–47 doi: 10.1016/S0764-4469(00)00110-4.
- Tranquillo, R.T., Durrani, M.A., Moon, A.G., 1992. Tissue engineering science: consequences of cell traction force. *Cytotechnology* 10, 225–250.
- Vailhe, B., Ronot, X., Tracqui, P., Usson, Y., Tranqui, L., 1997. In vitro angiogenesis is modulated by the mechanical properties of fibrin gels and is related to $\alpha_v\beta_3$ integrin localization. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 33, 763–773.
- Vailhe, B., Lecomte, M., Wiernsperger, N., Tranqui, L., 1998. The formation of tubular structures by endothelial cells is under the control of fibrinolysis and mechanical factors. *Angiogenesis* 2, 331–344.
- Vailhe, B., Vittet, D., Feige, J.-J., 2001. In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab. Invest.* 81, 439–452.
- Van Hinsbergh, V.W., Collen, A., Koolwijk, P., 2001. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936, 426–437.
- Vernon, R.B., Angello, J.C., Iruela-Arispe, M.L., Lane, T.F., Sage, E.H., 1992. Reorganization of basement membrane matrices by cellular traction promotes the formation of cellular networks in vitro. *Lab. Invest.* 66, 536–547.
- Vernon, R.B., Lara, S.L., Drake, C.J., Iruela-Arispe, M.L., Angello, J.C., Little, C.D., Wight, T.N., Sage, E.H., 1995. Organized type I collagen influences endothelial patterns during “spontaneous angiogenesis in vitro”: planar cultures as models of vascular development. *In vitro Cell Dev. Biol.* 31, 120–131.
- Warner, T.D., Mitchell, J.A., 2003. HIF, stretching to get control of VEGF. *Clin. Sci.* 105, 393–394 doi:10.1042/CS20030208.
- Yoshino, H., Morita, I., Murota, S.I., Ishikawa, I., 2003. Mechanical stress induces production of angiogenic regulators in cultured human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J. Periodontal Res.* 38, 405–410.