



Développement d'un modèle mécanique et numérique de morphogenèse de tissus épithéliaux

Yoann Chélin

► To cite this version:

Yoann Chélin. Développement d'un modèle mécanique et numérique de morphogenèse de tissus épithéliaux. Biomécanique [physics.med-ph]. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2012. Français. NNT: . tel-00799370

HAL Id: tel-00799370

<https://theses.hal.science/tel-00799370>

Submitted on 12 Mar 2013

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

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

UNIVERSITÉ MONTPELLIER II
— SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC —

THÈSE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER II

École Doctorale : INFORMATION, STRUCTURES ET SYSTÈMES
Spécialité : MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVIL

Développement d'un modèle mécanique et
numérique de morphogenèse de tissus
épithéliaux

par

YOANN CHÉLIN

Soutenue publiquement le 13 décembre 2012 devant le jury composé de :

Patrick CHABRAND	Professeur des Universités	ISM	Président
Jean-Marc DI MEGLIO	Professeur des Universités	LMSC	Rapporteur
Daniel ISABEY	Directeur de Recherches	IMRB	Rapporteur
Bernard MIGNOTTE	Professeur des Universités	LGBC	Examineur
Stephen BAGHDIGUIAN	Professeur des Universités	ISEM	Encadrant
Bernard MAURIN	Professeur des Universités	LMGC	Directeur de thèse
Patrick CAÑADAS	Maître de Conférences	LMGC	Codirecteur de thèse

UNIVERSITÉ MONTPELLIER II
— SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC —

THÈSE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER II

École Doctorale : INFORMATION, STRUCTURES ET SYSTÈMES
Spécialité : MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVIL

Développement d'un modèle mécanique et
numérique de morphogenèse de tissus
épithéliaux

par

YOANN CHÉLIN

Soutenue publiquement le 13 décembre 2012 devant le jury composé de :

Patrick CHABRAND	Professeur des Universités	ISM	Président
Jean-Marc DI MEGLIO	Professeur des Universités	LMSC	Rapporteur
Daniel ISABEY	Directeur de Recherches	IMRB	Rapporteur
Bernard MIGNOTTE	Professeur des Universités	LGBC	Examineur
Stephen BAGHDIGUIAN	Professeur des Universités	ISEM	Encadrant
Bernard MAURIN	Professeur des Universités	LMGC	Directeur de thèse
Patrick CAÑADAS	Maître de Conférences	LMGC	Codirecteur de thèse

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Mécanique et Génie Civil de Montpellier, dirigé par monsieur Saïd El Youssoufi, dans le cadre d'une allocation de recherche ministérielle.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont évalué ce travail de thèse :

- monsieur Patrick Chabrand de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury,
- messieurs Daniel Isabey et Jean-Marc Di Meglio d'avoir bien voulu rapporter sur ce travail,
- monsieur Bernard Mignotte d'avoir fait partie de mon jury en tant qu'examineur,
- messieurs Stephen Baghdiguian, Patrick Cañadas et Bernard Maurin pour leurs nombreuses relectures et ce qu'ils m'ont apporté pendant ces années de recherche.

Je tiens à adresser mes remerciements à Bernard Maurin pour m'avoir permis de travailler sur un sujet aussi diversifié et passionnant que la modélisation mécanique en biologie au sein d'un groupe multidisciplinaire réunissant mécaniciens, numériciens et biologistes. La confiance dont il m'a témoignée et la liberté qu'il m'a donnée ont sans aucun doute contribué au bon déroulement de ce travail.

Je remercie également Patrick Cañadas pour son soutien et les nombreux échanges autour de la biomécanique. Son expérience dans ce domaine a contribué à la pertinence de ce travail.

Je tiens à adresser mes remerciements à Julien Averseng pour m'avoir initié à Python ainsi qu'au C++ et de m'avoir enseigné les préceptes de l'iTribu.

Je voudrais aussi remercier les collègues biologistes, Stephen Baghdiguian, François Rousset et Karim Azzag, qui ont répondu avec patience à mes questions de néophyte en biologie. Les échanges réguliers ont permis l'amélioration continue du modèle. Merci à Karim pour son travail en général et pour ses jolies images en particulier, sans lesquels les simulations auraient beaucoup moins d'intérêt. Merci à François de s'être penché sur les résultats numériques pour en extraire plus de sens. Enfin, merci à Stephen pour les discussions régulières autour de la biologie du développement et tes encouragements.

Un grand merci aux membres du laboratoire pour leur accueil et à mes collègues doctorants avec qui j'ai passé de bons moments. Je pense notamment aux « anciens », Jean-Philippe, Baptiste, Edward, Alejandra et en particulier Rafik ainsi qu'aux « nouveaux », Adrien, Patrick, Emna et Sara. Enfin, un grand merci à Reine Causse pour m'avoir guidé dans les tâches administratives.

Pour conclure ces remerciements, je souhaite exprimer ma gratitude pour leur soutien inconditionnel à mes parents ainsi qu'à mes proches et en particulier à Amandine. Elle, accompagnée ensuite d'Elouan, ont su me donner, au quotidien pendant ces années, l'énergie nécessaire à l'aboutissement de ce travail dans les temps.

Table des matières

1. Introduction générale.....	6
2. Contexte et enjeux	10
2.1. La cellule eucaryote animale	10
2.2. Les épithéliums monocouches	12
2.2.1. L'architecture des épithéliums monocouches.....	12
2.2.2. La topologie cellulaire.....	13
2.2.3. La division cellulaire.....	13
2.2.4. L'apoptose	16
2.2.5. Lien entre la division et l'apoptose.....	16
2.3. Les modèles biologiques étudiés.....	16
2.3.1. <i>Ciona intestinalis</i>	17
2.3.2. Les cellules COS.....	19
2.3.3. <i>Drosophila melanogaster</i>	19
2.4. La problématique mécanique	21
2.5. Des modèles biomécaniques de morphogenèse de tissus biologiques.....	22
2.5.1. Des modèles de développement tissulaire.....	22
2.5.2. Des modèles mécaniques de cellules et de tissus.....	24
2.6. Conclusion.....	30
3. Modèle granulaire de morphogenèse tissulaire	31
3.1. Introduction	31
3.2. Modèle numérique de la cellule	32
3.2.1. Représentation d'une cellule.....	32
3.2.2. L'état de contrainte d'une cellule	33
3.2.3. La croissance cellulaire.....	34
3.2.4. La division cellulaire.....	35
3.2.5. L'apoptose	37
3.3. Le modèle numérique de morphogenèse tissulaire	38
3.3.1. Introduction.....	38
3.3.2. L'adhésion cellulaire et les liaisons inter-cellulaires.....	38
3.3.3. Le scénario de morphogenèse d'un épithélium non prolifératif	39
3.3.4. Le scénario de morphogenèse d'épithélium prolifératif.....	40
3.4. Architecture et dynamique du modèle.....	42
3.4.1. Les types de contact considérés	42

3.4.2. L'évolution temporelle du modèle.....	42
3.4.3. Convergence et robustesse des calculs.....	44
3.4.4. Algorithmique : les grandes étapes d'évolution du calcul.....	44
Introduction.....	44
Organisation du calcul.....	45
3.4.5. Organisation des données du calcul.....	47
Décomposition de domaines	47
Parallélisation via OpenMP	48
3.5. Tableau de paramètres.....	49
3.5.1. Paramètres biologiques.....	49
3.5.2. Paramètres mécaniques.....	50
3.5.3. Paramètres numériques.....	52
3.6. Les cas d'études.....	52
3.6.1. Développement d'un épithélium non prolifératif	52
3.6.2. Développement d'un épithélium prolifératif	52
3.7. Les comptages de la forme des cellules	53
3.7.1. Introduction.....	53
3.7.2. Le comptage expérimental.....	54
3.7.3. Le comptage numérique.....	55
Sans condition aux limites	55
Avec conditions aux limites.....	57
3.8. Analyse biostatistique.....	57
4. Résultats expérimentaux et numériques	59
4.1. Expérimentation sur des épithéliums folliculaires de Ciona intestinalis	59
4.1.1. Morphogenèse du système folliculaire	59
4.1.2. Fréquence des polygones et homéostasie	60
4.2. Expérimentation sur des épithéliums prolifératifs de cellules COS.....	61
4.2.1. La morphogenèse des cellules COS.....	61
4.2.2. Fréquence des polygones et homéostasie	62
4.3. Expérimentation sur des épithéliums columnellaires de disques d'aile.....	63
4.3.1. La morphogenèse des épithéliums de disques d'aile	63
4.3.2. Fréquence des polygones et homéostasie	63
4.4. Simulation d'épithéliums non prolifératifs	64
4.4.1. La morphogenèse d'épithéliums non prolifératifs	64
4.4.2. Prise en compte des cadhérines	65
4.4.3. Sans prise en compte des cadhérines.....	66

4.4.4. Synthèse	67
4.5. Simulation d'épithéliums prolifératifs sur une surface sphérique	67
4.5.1. Introduction.....	67
4.5.2. La morphogenèse de l'épithélium prolifératif.....	67
4.5.3. Influence du taux apoptose/division.....	68
4.5.4. Comparaison des deux modes de division et d'apoptose	69
4.5.5. Évaluation de l'effet de la croissance mécanique	70
4.5.6. Évaluation de l'effet de la division selon un axe « mécanique »	71
4.5.7. Synthèse	71
4.6. Simulation d'épithéliums prolifératifs sur surface plane.....	73
4.6.1. Introduction.....	73
4.6.2. Boîte circulaire de surface $S = S_{\text{sphère}}$	74
4.6.3. Boîte carrée de surface $S = S_{\text{sphère}}$	76
4.6.4. Boîte circulaire de surface $S = 1.5 \times S_{\text{sphère}}$	77
4.6.5. Sans condition de bord	78
4.6.6. Synthèse	80
4.7. Synthèse.....	81
4.7.1. Épithéliums non prolifératifs : résultats biologiques et numériques.....	81
4.7.2. Épithéliums prolifératifs : résultats biologiques et numériques sur sphère.....	82
4.7.3. Épithéliums prolifératifs : numériques sphériques et numériques plans.....	83
4.7.4. Accrétion et prolifération	84
5. Analyse et confrontations des modèles expérimentaux et numériques	87
5.1. Morphogenèse des épithéliums non prolifératifs	87
5.2. Morphogenèse des épithéliums prolifératifs.....	89
5.2.1. Étude comparée expérimental - simulation	89
5.2.2. Etude numérique de l'influence de paramètres difficilement accessibles en expérimentations	91
5.3. Comparaison entre épithéliums prolifératifs et non prolifératifs.....	93
5.4. Intérêt du modèle numérique discret	94
5.5. Intérêt de l'approche multidisciplinaire	95
6. Vers de nouveaux travaux	96
6.1. Conservation de la structure folliculaire sur les œufs d'ascidies.....	96
6.2. Les épithéliums hyperprolifératifs.....	99
6.3. Modèle intracellulaire de type « treillis »	101
6.3.1. Introduction.....	101

6.3.2. La description du modèle	102
6.3.3. Quelques résultats préliminaires	106
6.3.4. Bilan	109
6.4. Modèle intracellulaire de type granulaire	109
6.4.1. Introduction : description du modèle	109
6.4.2. L'étalement cellulaire	110
6.4.3. Autres développements du modèle granulaire d'étalement cellulaire.....	111
Les éléments « filopode »	111
La double membrane	112
Synthèse.....	113
6.4.4. La structuration du cytosquelette de la cellule	113
6.4.5. Bilan	114
6.5. Vers un modèle multi-échelles.....	115
7. Conclusion.....	116

« Le plus grand ouvrier de la nature est le temps », Buffon (1707 - 1788).

« Cependant il ne faudrait pas conclure que la science des corps vivants repose sur d'autres bases que celle des corps bruts », Claude Bernard (1813 - 1878).

1. Introduction générale

Ces travaux de thèse, développés au sein d'un laboratoire de mécanique, ont une double spécificité. La première concerne d'abord leur objectif scientifique qui est de nature biologique en s'intéressant à la morphogenèse des tissus. La seconde est liée à leur contexte local et à l'étroit partenariat entre des spécialistes de la simulation numérique en mécanique, de la biologie expérimentale du développement et de la bio-statistique.

La morphogenèse est l'ensemble des processus qui vont donner sa forme à un organisme. L'étude de l'origine des formes a toujours fasciné les scientifiques. Ils s'y intéressent depuis qu'ils essayent de comprendre la nature. La morphogenèse soulève des problèmes aussi bien de fonction que de forme et pousse à comprendre l'organisation et le développement des êtres vivants. Buffon au XVIIIème siècle puis Lamarck s'intéressaient déjà aux formes de la nature. Plus tard, au début du XXème siècle, D'Arcy Thomson a étudié les liens entre formes biologiques et forces physiques. Aujourd'hui encore la morphogenèse est un sujet largement étudié avec de nombreuses approches. Elle intéresse notamment les biologistes, physiciens et mathématiciens (par exemple Kupiec, Fleury, Thom). Les biologistes soulignent son caractère universel et son lien avec des fondamentaux de la biologie tels que la mort cellulaire programmée (Chen et *al.*, 1997), la migration cellulaire (Lecuit et *al.*, 2007) ou encore l'orientation du plan de division pendant la mitose (Gibson et *al.*, 2011). Par ailleurs, des modèles numériques de morphogenèse font l'objet de développements à différentes échelles : du tissu (voir par exemple Jamali et *al.*, 2010) et de l'organe voire de l'individu (voir par exemple Fleury, 2012).

La morphogenèse, de par sa complexité, est encore largement inexploitée (Bissell 2008 : "We know a lot about the language and the alphabet of the genome, but we know very little about the language and alphabet of form."). En outre, l'impact de la morphologie de la cellule sur son métabolisme, et donc le lien entre la forme et la fonction, est largement établi mais mal compris (Cau et Seïte, 2001 ; Chen et *al.*, 1997 ; Chicurel et *al.*, 1998 ; Ingber, 2006 ; Davidson et *al.*, 2009). En 2006, Nelson et Bissell rappellent que « The microenvironment influences gene expression so that the behavior of a cell is largely determined by its interactions with the extracellular matrix, neighboring cells, and soluble local and systemic cues ». Ainsi, si la physique en général et la mécanique en particulier sont pressenties pour jouer un rôle moteur déterminant dans les processus de morphogenèse, pas ou peu d'études

permettent à ce jour de décrire ce rôle potentiel (Galbraith et *al.*, 1998 ; Montell, 2008 ; Jamali et *al.*, 2010).

Afin d'apporter des éléments de réponse sur ce sujet, les travaux présentés dans cette thèse l'abordent via une approche multidisciplinaire croisant études expérimentales (sur des modèles biologiques), simulations numériques et analyses biostatistiques. Cette collaboration est née de la volonté de biologistes de l'Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier (ISEM) d'approfondir leurs recherches en utilisant la modélisation mécanique et les compétences numériques de l'équipe « Conception en Structures » du Laboratoire de Mécanique et Génie Civil. Son expertise dans les systèmes structurels, appliquée depuis peu à l'étude de la génération et la structuration de systèmes vivants à l'échelle cellulaire (Baudriller et *al.*, 2006, Maurin et *al.*, 2008) permettait d'aller dans le sens de cette demande. Les modèles biologiques développés par nos collègues biologistes de l'ISEM ne leur permettaient ainsi pas de tester certains facteurs expérimentaux dont ils souhaitent évaluer l'influence sur la morphologie épithéliale. Le recours à la simulation numérique a pour premier objectif d'y avoir accès et, ainsi, de mieux comprendre certains mécanismes de la morphogenèse épithéliale. Pour ces raisons, nous avons développé un nouveau modèle constituant ainsi une première approche destinée à mettre en valeur le rôle que peut jouer la mécanique dans le processus de formation de tissus.

L'ensemble des travaux de biologie menés dans le cadre de cette thèse (développement de modèles, comptage, imagerie) a été réalisé par l'équipe « Biologie du Développement et Evolution » de l'ISEM lors de la thèse de Karim Azzag, sous la direction de Stephen Baghdigian. Les analyses statistiques sur les modèles biologiques et numériques ont été réalisées par François Rousset de l'ISEM. Il a en particulier développé la notion d'« homéostasie » permettant notamment une comparaison intra et inter tissulaire.

Cette approche pluridisciplinaire a tout d'abord permis d'enrichir et d'ajuster au mieux les modèles numériques développés au LMGC. Nos partenaires biologistes ont ainsi vérifié la pertinence des hypothèses et la cohérence des résultats obtenus au cours de la construction de ces modélisations.

Le principal objectif de ces recherches est d'ordre biologique et consiste à montrer que certains facteurs influencent l'organisation épithéliale (en particulier l'apoptose), puis d'en étudier leurs incidences et de montrer le rôle de la mécanique dans la morphogenèse épithéliale. Les seules études expérimentales ne permettent pas, en effet, de faire varier tous les facteurs expérimentaux influents. La simulation numérique est complémentaire et permet

d'approfondir ces recherches en testant une plus large gamme de paramètres inaccessible biologiquement.

Afin de reproduire une morphogenèse épithéliale proche de celle observée expérimentalement, le modèle du tissu doit cependant être le moins « contraint » possible c'est à dire avoir une grande capacité de libre organisation. L'enjeu est de développer des simulations gouvernées par des lois simples et reproduisant l'organisation des cellules au sein de tissus formés selon différents processus.

La morphogenèse est, par ailleurs, un processus dynamique non linéaire. Son évolution dépend de l'ensemble des constituants mais de manière non additive : le fonctionnement global ne se résume pas à la seule somme des mécanismes individuels. Il a donc paru pertinent de représenter le développement de tissus par un modèle d'épithélium dynamique à partir de la méthode des éléments discrets. Cela autorise ainsi l'auto organisation sous contrainte des cellules et une plasticité de forme de celles-ci, ce qui permet de mettre en valeur notamment le lien entre les forces et les formes au sein d'un tissu ainsi généré. Ce modèle est également à vocation évolutive pour permettre l'intégration progressive de différents scénarios, et ce, afin de mieux comprendre les mécanismes régissant la morphogenèse d'épithéliums.

Ce manuscrit se décompose en cinq parties.

La première présente d'abord les notions de biologie abordées dans cette étude, puis la problématique mécanique et les modèles biologiques étudiés, notamment les épithéliums non prolifératifs et prolifératifs. Ces systèmes constituent les références biologiques des modèles numériques développés au cours de ce travail de thèse. Différentes simulations informatiques existantes de cellules et de tissus sont également présentées.

La deuxième partie détaille ensuite les aspects numériques. Elle décrit les modélisations de la cellule et du tissu réalisées puis l'organisation du code de calcul. Elle présente les différents paramètres du modèle et les scénarios définis pour les diverses simulations effectuées sur les cas d'études d'épithéliums non prolifératifs et prolifératifs. Les méthodes de comptage et l'analyse biostatistique des tissus sont enfin décrites.

La troisième partie détaille les résultats des études sur les tissus biologiques et leurs simulations numériques. Elle explicite les similitudes et les différences entre ces deux approches.

Dans la quatrième partie, les résultats obtenus sont discutés dans leur ensemble. L'apport des simulations, par exemple sur l'étude des vitesses de développement de tissu (VDT) ou sur le rôle de l'apoptose, est mis en évidence.

Les perspectives concernant le modèle numérique développé sont présentées en dernière partie. Un nouveau modèle de type treillis et son implémentation dans les modélisations permettrait par exemple une description plus fine du tissu intégrant la structure du cytosquelette. Ce propos est aussi étendu au cas de l'hyperprolifération cellulaire avec ce modèle.

Une conclusion générale fait la synthèse des travaux réalisés, des résultats obtenus et des développements ultérieurs envisagés.

2. Contexte et enjeux

Afin de pouvoir élaborer un modèle mécanique permettant de simuler la morphogénèse tissulaire, il est nécessaire de bien comprendre comment sont formés les tissus et quelles sont les approches possibles. Dans ce chapitre, nous présentons d'abord l'élément de base (la cellule eucaryote animale) et trois types d'épithéliums monocouches ayant comme différence leur mode de formation et/ou leur géométrie. Puis les méthodes pour caractériser leur topologie ainsi que les processus qui régissent leur formation sont abordées. Ensuite, les modèles biologiques étudiés et la problématique mécanique qu'ils posent sont décrits. Enfin, nous verrons quelques modèles de développement de tissus et des modèles mécaniques cellulaires et tissulaires.

2.1. La cellule eucaryote animale

La cellule est l'unité structurale et fonctionnelle du monde vivant. Elle a été décrite pour la première fois en 1665 par Hooke (Hooke, 1665) en observant du liège au microscope. La cellule eucaryote (Figure 2-1) est composée d'un noyau (1) entouré d'une membrane nucléaire (2), du cytoplasme (lui-même composé de divers organites : mitochondries (9), centrosomes (13), réticulum endoplasmique granuleux (5), etc.) et d'un cytosquelette dont un filament de microtubules est grossièrement représenté ci dessous (7). Ces trois éléments sont encapsulés dans une membrane cytoplasmique (11) formée par une bicouche lipidique (Figure 2-1). La taille d'une cellule eucaryote varie entre 10 et 100 μm .

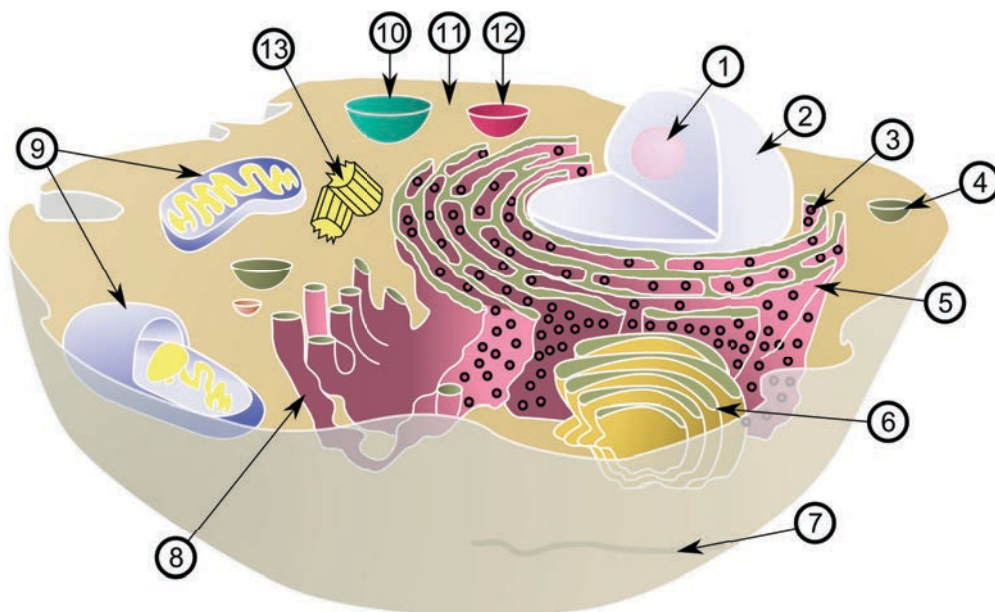


Figure 2-1 : Coupe d'une cellule eucaryote (<http://fr.wikipedia.org/wiki/Cellule>).

Le cytosquelette (Figure 2-2) confère à la cellule ses propriétés mécaniques. C'est un ensemble de polymères protéiques filamenteux entremêlés qui structure le cytoplasme des cellules eucaryotes. Il est constitué de trois polymères :

- les microfilaments sont des polymères d'actine d'un diamètre de 6 à 8 nm qui travaillent essentiellement en traction. Le réseau d'actine particulièrement dense sous la membrane cellulaire se nomme actine corticale. En outre les filaments d'actine peuvent s'associer avec des molécules de myosine pour former des fibres de tension ou fibres de stress.
- les microtubules sont des tubes creux formés de monomères de tubuline d'un diamètre de 25 nm supposés travailler essentiellement en compression. Les microtubules rayonnent à partir du centrosome (élément proche du noyau) vers la membrane.
- les filaments intermédiaires sont des polymères d'un diamètre de 11 nm dont le monomère change en fonction du type cellulaire (vimentine, kératine, etc.). Leur rôle mécanique est moins bien identifié, il empêcherait cependant de trop grandes déformations de la cellule.

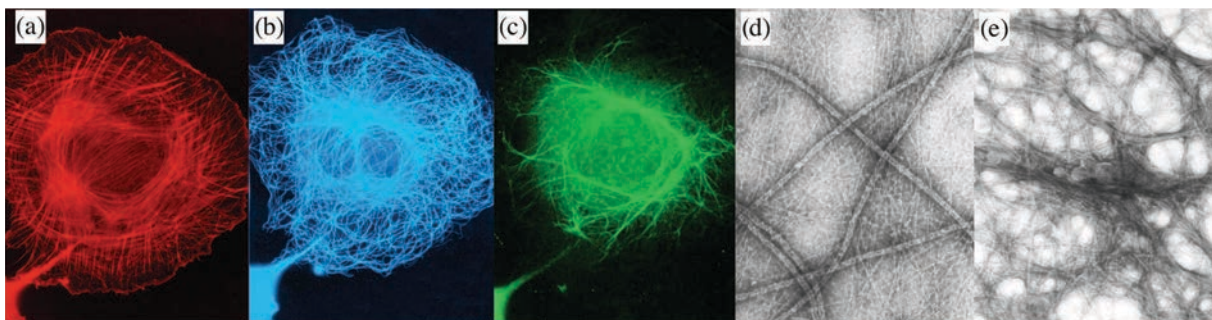


Figure 2-2 : Réseaux des trois filaments composant le cytosquelette : microtubules (a), filaments d'actine (b) et filaments intermédiaires (c). Vue au microscope électronique des microtubules et des filaments d'actine entremêlés (d), ainsi que des filaments intermédiaires (e). (<http://cellix.imba.oeaw.ac.at/1-cytoskeleton>).

Les microfilaments et les microtubules sont dynamiques : ils sont en construction et déconstruction permanente alors que les filaments intermédiaires semblent plus stables. D'autres éléments jouent également un rôle mécanique : les protéines d'adhésion (par exemple les cadhérines et les intégrines). Ces complexes d'adhésion sont liés au cytosquelette

et à l'environnement de la cellule (matrice extracellulaire, cellule, etc.) et représentent de véritables mécano-senseurs pour la cellule.

Ces différents constituants mécaniques permettent à la cellule d'adhérer et de se mouvoir tout en adoptant un grand nombre de formes différentes. *In vitro*, la cellule peut prendre une forme très étalée ou de goutte d'eau en fonction de son état d'adhésion au substrat. *In vivo*, certaines cellules sont très mobiles et peuvent se déplacer à travers les tissus comme les leucocytes par exemple. Cependant, les cellules qui nous intéressent, à savoir les cellules épithéliales, se déplacent peu et sont très adhérentes à leur environnement (matrice extracellulaire, cellules), formant ainsi un tissu épithélial.

2.2. Les épithéliums monocouches

2.2.1. L'architecture des épithéliums monocouches

Les épithéliums sont des tissus de cellules confluentes (i.e. il n'existe pas de « trou », d'espace entre les cellules). Les épithéliums monocouches se classent en trois types en fonction de la forme de leurs cellules : épithélium pavimenteux unistratifié, épithélium cubique unistratifié et épithélium prismatique (ou cylindrique) unistratifié (Figure 2-3).

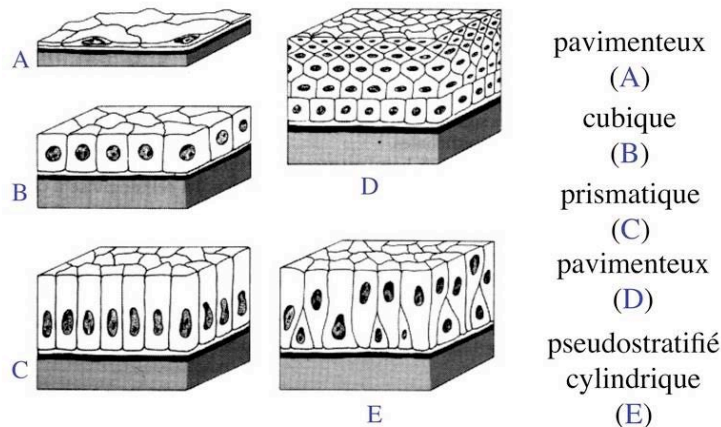


Figure 2-3 : (A), (B) et (C) sont les trois différents types d'épithélium monocouche.

(<http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-epithelial--cours-n-2->)

Les épithéliums se forment notamment par accréation ou par prolifération. Dans le premier cas, les cellules présentes dans le milieu s'agglomèrent et se lient (entre elles et au substrat) pour former un épithélium. Ce dernier se développe par accréation de cellules, sans division. On parle alors d'épithélium non prolifératif. Dans le second cas, des cellules présentes sur une surface se divisent et/ou meurent pour former un épithélium prolifératif qui se développe via la croissance et la division cellulaire.

2.2.2. La topologie cellulaire

La morphogenèse des épithéliums peut s'étudier par la description de la topologie cellulaire, qui constitue une de ses caractéristiques. Cette topologie est déterminée par l'organisation des cellules les unes par rapport aux autres au sein d'un tissu, à un moment donné du développement de cet épithélium. Elle peut être définie en comptant le nombre de cellules voisines de chaque cellule (ce qui correspond au nombre de côtés de la cellule) puis en totalisant ces nombres de voisins pour l'ensemble des cellules de l'épithélium. Ainsi, le total de ces nombres divisé par le nombre de cellules de l'épithélium définit la fréquence de nombre de voisins. La distribution de la fréquence du nombre de voisins (pourcentage de cellules à n côtés) et la moyenne du nombre de voisins sont couramment utilisées en biologie pour décrire la topologie d'épithéliums (Gibson et *al.*, 2006 ; Classen et *al.*, 2005 ; Farhadifar et *al.*, 2007).

Hooke, en 1665, a été le premier à décrire la structure polygonale des épithéliums en observant du liège avec un microscope. La forme polygonale des cellules épithéliales est une caractéristique de la morphogenèse. Elle est observée depuis longtemps et se retrouve aussi bien dans le règne animal (Schawnn, 1847) que végétal (Lewis, 1928). Puis, c'est en 1847 que Schawnn, dans son ouvrage *Microscopical researches into the accordance of structure and growth in animal and plants*, traite de la topologie cellulaire (Schawnn, 1847). Il est le premier à décrire la structure hexagonale des cellules dans les épithéliums simples. Plus tard en 1917, D'Arcy Thompson, connu comme le précurseur des biomathématiques, compare l'organisation de cellules au sein d'un épithélium et la structure alvéolaire des nids d'abeilles qu'il considère comme spatialement optimale (Thompson, 1917).

Il existe actuellement de nombreux modèles biologiques destinés à étudier la topologie cellulaire : cellules columnnaires de disque d'aile, disque d'œil de drosophile, culture cellulaire, etc. La topologie de ces épithéliums est elle même influencée notamment par des processus cellulaires tels que la division cellulaire, l'apoptose, le recyclage des jonctions cellulaires ou l'orientation de l'axe de division. Deux de ces processus ont particulièrement été étudiés ici (la division et l'apoptose) et sont davantage détaillés dans les paragraphes suivants.

2.2.3. La division cellulaire

La division cellulaire est un processus fondamental dans le monde vivant, c'est le mode de multiplication de toute cellule. Elle se déroule en quatre phases (Figure 2-4) :

- la croissance de la cellule,

- la réplication de l'ADN,
- la reprise de la croissance de la cellule jusqu'à environ deux fois sa taille initiale,
- la mitose : la cellule mère donne deux cellules filles.

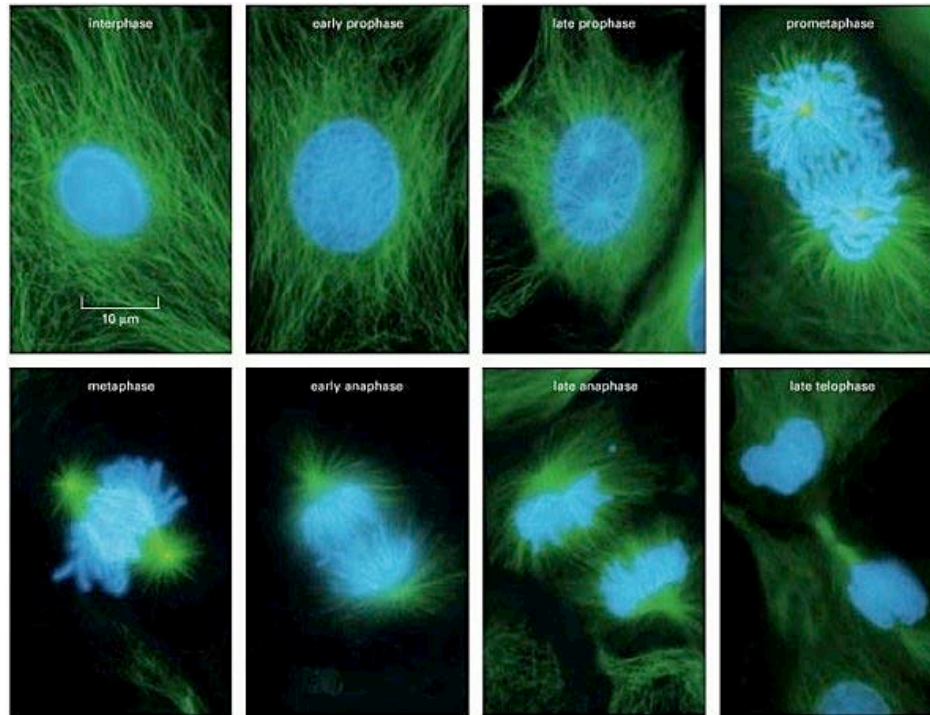


Figure 2-4 : Etapes de la division cellulaire (<http://sjnews.over-blog.com/article-animation-flash-sur-la-mitose-45383247.html>).

Gibson et ses collaborateurs ont montré récemment que la division cellulaire modifie la topologie de l'épithélium (Figure 2-5) et joue un rôle dans sa morphogenèse (Gibson et Gibson, 2009). La division d'une cellule à n côtés engendre deux cellules filles à $n-1$ côtés. Par ailleurs le nombre de côtés des cellules voisines est modifié.

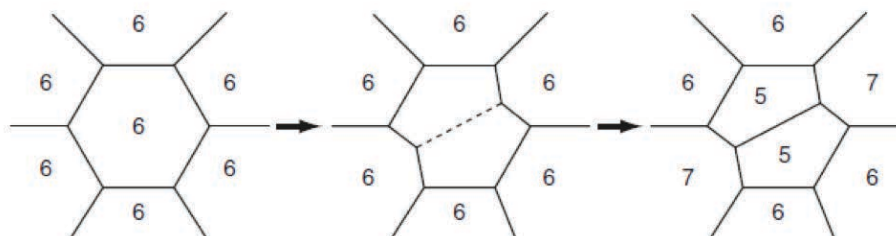


Figure 2-5 : Réorganisation cellulaire suite à une division (Gibson et *al.*, 2009).

En 2006, Gibson et Perrimon ont démontré que, pour un épithélium, le nombre de côtés moyens par cellule diminue quand la fréquence de divisions augmente. Pour un épithélium

hyperprolifératif, les cellules ont moins de voisins que pour un épithélium sauvage (Gibson et *al.*, 2006). La division joue donc un rôle important sur l'organisation de l'épithélium.

Lewis, en 1928, a étudié la stabilité des épithéliums prolifératifs (Lewis, 1928). Il a comparé les résultats sur l'organisation d'épithéliums de concombres avec ceux obtenus auparavant sur les cellules pigmentaires de la rétine et mis ainsi en évidence la conservation de la distribution des polygones. En 2009, Gibson a publié une nouvelle étude sur les épithéliums prolifératifs. Il a comparé les épithéliums prolifératifs monostratifiés de plantes et d'animaux et mis en évidence leur stabilité (Figure 2-6). Ils sont composés d'environ 45% de cellules hexagonales, 30% de pentagonales, 20% d'heptagonales et de quelques cellules à 4, 8 voire 9 et 10 cotés.

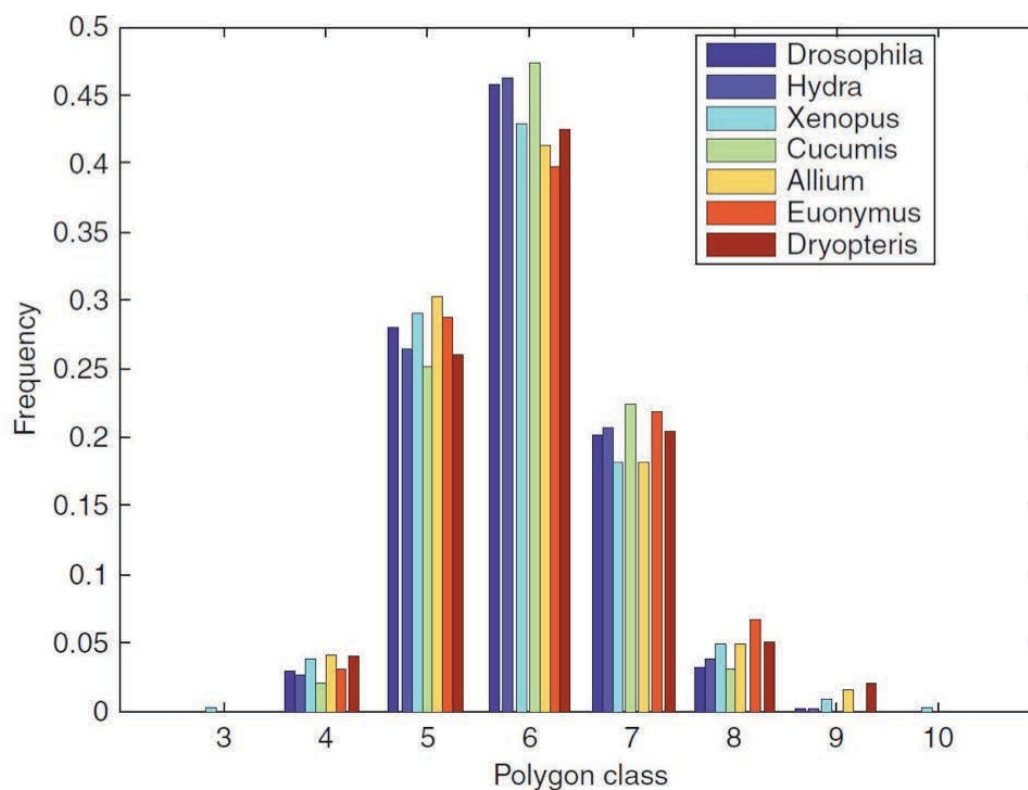


Figure 2-6 : Fréquence du nombre de voisins correspondant à la forme polygonale des cellules pour des épithéliums prolifératifs de plantes et d'animaux (Gibson et *al.*, 2009).

Il est à noter que cette organisation commune des épithéliums prolifératifs se distingue d'autres morphologies telle que la structure en nid d'abeille composée uniquement d'hexagones.

2.2.4. L'apoptose

L'apoptose est la mort cellulaire programmée de la cellule. Cette dernière subit une rétraction du cytoplasme et une condensation du noyau avant d'être reconnue par des phagocytes qui l'endocytent et permettent finalement son élimination.

Tout comme la division, l'apoptose influence fortement la topologie de l'épithélium (Toyama et *al.*, 2008). La mort d'une cellule modifie l'organisation du tissu et permet sa réorganisation. Toyama et ses collaborateurs prennent l'exemple du tube neural chez la drosophile où certaines cellules en mourant permettent la fermeture du tube neural. Si l'apoptose est inhibée ou surexprimée, la fermeture est ralentie ou accélérée. L'apoptose joue donc un rôle dans la morphogenèse des épithéliums mais dépend d'autres paramètres tels que la durée du processus de mort cellulaire ou la quantité de cellules en apoptose.

2.2.5. Lien entre la division et l'apoptose

Prenons un exemple, qui sera développé par la suite : celui des disques d'ailes de *Drosophila melanogaster* (la mouche du vinaigre), c'est à dire une partie de la larve qui donnera les ailes de la mouche. Au cours de sa croissance, des cellules se divisent et d'autres meurent par apoptose. La durée et la quantité de ces processus vont déterminer l'organisation de l'épithélium.

La quantité de mitose est de 1,7% et sa durée est de 1 heure (Milan et *al.*, 1996) alors que la quantité d'apoptose est 1,4% pour une durée du processus de 2 à 4 heures (Milan et *al.*, 1997). Le fait que l'apoptose soit un processus plus long et moins fréquent par rapport à la mitose permet donc à l'épithélium de croître. On imagine aisément que la modification de la durée et/ou de la fréquence de ces processus se répercute sur la vitesse voire la capacité de croissance d'un tel épithélium.

2.3. Les modèles biologiques étudiés

Les épithéliums folliculaires d'ascidies non prolifératifs se forment par accréation de cellules non soumises à l'apoptose, autour d'un œuf, et prennent une configuration sphérique. Les épithéliums de cellules COS prolifératifs se développent par division et apoptose ; l'épithélium est alors plan ou sphérique, suivant si les cellules sont étalées ou en suspension. Les épithéliums de disques de drosophile prolifératifs se forment avec ou sans apoptose et sont plans.

2.3.1. *Ciona intestinalis*

Les ascidies sont des organismes marins hermaphrodites, invertébrés filtreurs et sessiles (fixés sur un support). Ils sont couramment utilisés en biologie du développement. L'organisme modèle choisi est *Ciona intestinalis* (Figure 2-7) : c'est une ascidie mesurant une dizaine de centimètres. Son cycle de reproduction est rapide et bien connu.



Figure 2-7 : *Ciona intestinalis* adulte mesurant une dizaine de centimètres (A.Gittenberger, www.ascidians.com).

Les œufs d'ascidies (de taille finale variant de 150 à 250 μm) ont une structure commune : l'ovocyte mature est pratiquement sphérique. Il est couvert de deux couches de cellules dont la supérieure forme un épithélium monocouche à base polygonale, avec une topologie régulière proche d'une organisation théorique optimale composée uniquement de pentagones et d'hexagones, comme défini par Euler (Poincaré, 1893). Dans le cas de *Ciona intestinalis*, l'ovocyte est recouvert d'une couche d'environ 1200 cellules de la testa, elles-mêmes recouvertes d'une soixantaine de cellules folliculaires en forme de doigt (en moyenne $58,7 \pm 1,85$) (Martinand-Mari et *al.*, 2009). Les cellules de la testa ne présentent pas d'organisation remarquable contrairement à la face basale des cellules folliculaires (Figure 2-8).

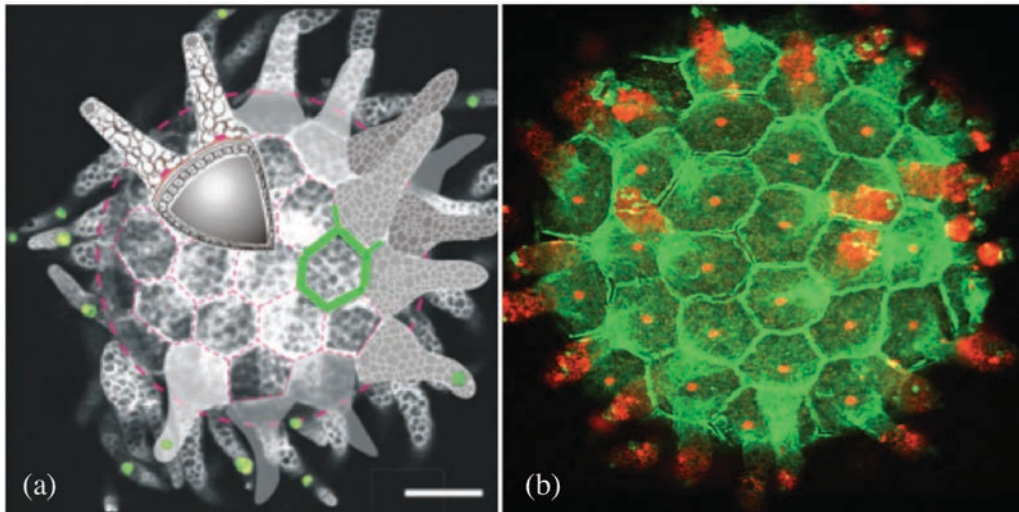


Figure 2-8 : (a) Reconstruction 3D d'un œuf de *Ciona intestinalis* mature marqué avec de la phalloïdine fluorescente (blanc). Les pointillés roses représentent la base des cellules folliculaires. La coupe triangulaire permet de visualiser la couche sous-jacente de cellules de la testa. Le tracé vert souligne les contours de la base d'une cellule folliculaire (a). (b) Image en microscopie par fluorescence des cellules folliculaires, avec marquage des filaments d'actine en vert et des noyaux en rouge. Barre d'échelle : 10 μ m (Martinand-Mari et *al.*, 2009).

La maturation d'un ovocyte débute dans le tissu ovarien et se poursuit dans la région folliculaire. Ensuite l'ovocyte transite jusqu'à la région terminale de l'épithélium germinal et passe dans l'oviducte à partir duquel il sera expulsé dans le milieu environnant.

Au cours de l'ovogenèse, l'ovocyte est progressivement entouré par trois types de cellules folliculaires : les cellules de la testa, les cellules folliculaires internes et les cellules folliculaires externes, l'ensemble de ces cellules étant nommé cellules accessoires.

De nombreuses équipes ont tenté d'expliquer l'origine des cellules folliculaires. Il ressort de toutes ces observations deux théories :

- ce sont des cellules germinales qui se divisent puis se différencient sur l'œuf,
- ce sont d'abord des hémoblastes libres présents dans le tissu ovarien qui s'infiltrèrent dans l'épithélium folliculaire où ils se différencient.

Cependant à l'instar d'Okada et ses collaborateurs (Okada et Yamamoto, 1999), les observations de nos collègues biologistes correspondent au second scénario, c'est la raison pour laquelle le modèle suivra cette hypothèse.

Les fonctions des cellules accessoires diffèrent selon les espèces d'ascidie. Chez *Ciona intestinalis*, les cellules folliculaires permettent la flottaison et d'attirer les spermatozoïdes ou de ralentir le déplacement de l'œuf dans l'eau (ce qui permet ainsi d'augmenter les chances de

rencontre avec les spermatozoïdes). Par ailleurs, les cellules de la testa ont, par exemple, un rôle dans la nutrition de l'ovocyte et synthétisent des enzymes nécessaires à l'éclosion.

Nous étudierons uniquement la monocouche de cellules folliculaires formée sur l'ovocyte par accréation de cellules présentes dans le milieu. Cet épithélium non prolifératif est considéré comme un modèle biologique. Ces cellules ont la spécificité de ne pas se diviser.

2.3.2. Les cellules COS

Selon le mode de culture, certaines lignées de cellules peuvent s'organiser dans l'espace en formant une monocouche qui entoure une lumière analogue à des acini (forme ronde tridimensionnelle). Ces structures permettent d'étudier l'organisation tissulaire, l'adhésion cellulaire et dans certains cas la polarité cellulaire ainsi que l'activité des oncogènes.

Les cellules COS proviennent d'une lignée cellulaire dérivée du singe vert africain. Lors de leur mise en culture dans des boîtes de culture à fond hydrophile (présence de groupement OH libre), elles s'étalent (Figure 2-9 (a) et (b)). Dans des boîtes de culture à fond hydrophobe, les cellules COS adoptent un comportement particulier : elles n'adhèrent pas et se retrouvent en suspension dans le milieu. Après de deux à trois semaines, les cellules COS forment des organoïdes de type acinus (Figure 2-9 (c)).

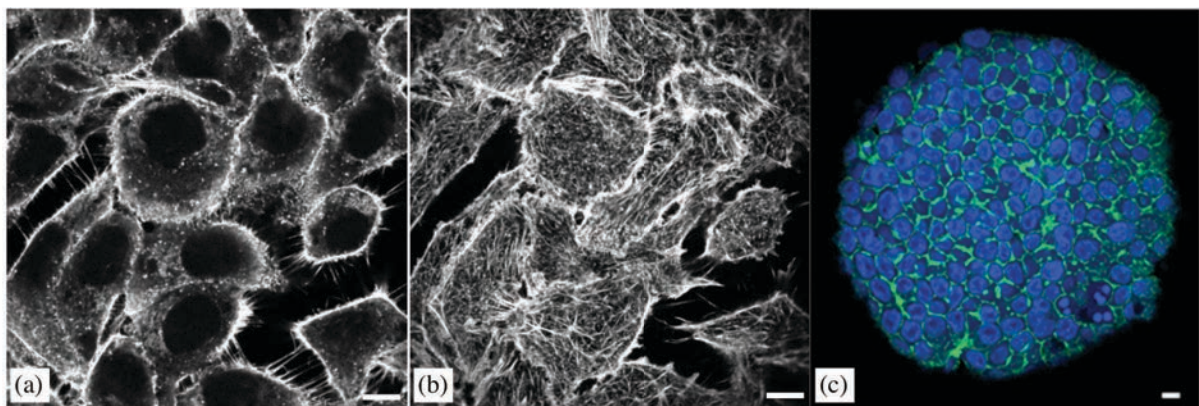


Figure 2-9 : Cellules COS adhérentes étalées dans le plan des noyaux (a) et basal (b). (c) Organoïde de cellules COS d'environ 200 μm . Barre d'échelle : 10 μm

2.3.3. *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster, connue sous le nom commun de mouche du vinaigre, est un insecte de l'ordre des diptères. Il a été parmi les premiers utilisés en génétique et est aujourd'hui un modèle universel. Des transformations génétiques dans cet organisme sont

possibles depuis 1987. De nombreuses expérimentations sont aujourd'hui effectuées sur la drosophile, et ce grâce à la quantité importante de biologistes travaillant sur cet organisme et au perfectionnement des techniques de transformation génétique. *Drosophila Melanogaster* est donc un bon modèle d'étude de la morphogenèse épithéliale.

Lors de son développement, elle passe par une série de stades larvaires et nymphaux avant d'atteindre sa forme adulte (Figure 2-10).

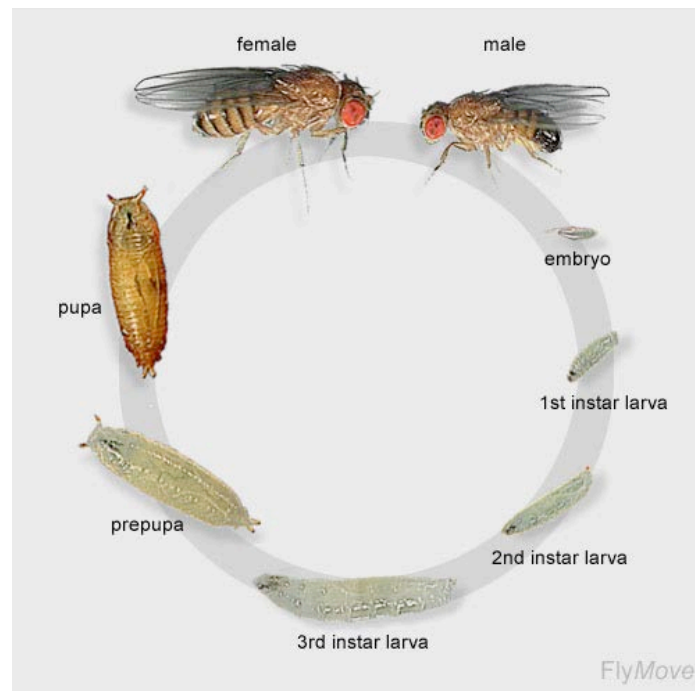


Figure 2-10 : Stades larvaires et nymphaux du développement de la *Drosophila melanogaster*.
(http://www.anatomy.unimelb.edu.au/researchlabs/whittington/img/life_cycle.jpg)

Au début de l'embryogenèse, des structures appelées « disques imaginaux » apparaissent. Ce sont les ébauches des futurs appendices de la mouche. Ils se développent au cours de l'embryogenèse, passant de quelques dizaines de cellules à plusieurs dizaines de milliers pour enfin former les organes de la mouche.

Au troisième stade larvaire, les disques d'aile sont formés de deux épithéliums monocouches composés, pour le premier, de cellules péripodiales (grosses cellules plates) et, pour le second, de cellules columnellaires. Usuellement, seule la monocouche de cellules columnellaires est considérée dans les études portant sur la topologie cellulaire (Classen et *al.*, 2005 ; Gibson et *al.*, 2006). Elle est le modèle d'épithélium monocouche que nous allons utiliser. Ces cellules sont très épaisses (60 μm). Lors de la division, elles migrent vers le pôle

apical et s'arrondissent. Cependant, les jonctions cellulaires ne permettent pas un réarrangement des cellules qui gardent les mêmes voisins.

La fin du développement du disque d'aile se caractérise par un réarrangement des cellules columnellaires qui forment ce disque. L'épithélium columnellaire se compose alors d'environ 45% de cellules hexagonales, 30% de pentagonales, 20% d'heptagonales et de quelques cellules tétragonales et octogonales. Après 25 heures, la réorganisation progressive des cellules columnellaires aboutit à une proportion de 85% de cellules hexagonales, 15% de pentagonales (des heptagonales apparaissent rarement).

La monocouche de cellules columnellaires du disque d'aile de la *Drosophila melanogaster* nous servira, dans cette étude, de modèle de développement d'épithélium prolifératif se développant sur une surface plane.

2.4. La problématique mécanique

Dans les paragraphes précédents, trois types d'épithéliums monocouches ont été décrits :

- l'épithélium de cellules folliculaires de l'œuf de *Ciona intestinalis*, non prolifératif et formé par accréction sur une surface sphérique ;
- l'épithélium de cellules COS prolifératif (division et apoptose) sur une surface sphérique ;
- l'épithélium de cellules columnellaires de *Drosophila melanogaster* prolifératif (division et apoptose) sur une surface plane.

Tous ces modes de développement produisent finalement des tissus confluent de cellules, c'est à dire que les cellules sont toutes jointives et sans espace entre elles. Lors de la formation de ces tissus, il semble que les cellules se repoussent et exercent des efforts les unes sur les autres. Les forces exercées par les cellules voisines confèrent à chaque cellule sa forme et les pressions mises en jeu lors de la formation des tissus semblent ainsi jouer un rôle dans leur organisation et donc dans leur topologie (Montell, 2008, Mammoto et Ingber, 2010). Il nous a donc semblé pertinent d'aborder ce problème de morphogenèse tissulaire d'un point de vue mécanique et d'élaborer un modèle numérique afin de caractériser le lien entre les forces et la forme au sein de tels épithéliums et, plus généralement, d'étudier le rôle de la mécanique dans ce processus biologique. Dans une première approximation, le modèle présent considérera l'aspect incompressible du cytoplasme en équilibre avec l'ensemble tendu membrane – actine corticale.

2.5. Des modèles biomécaniques de morphogenèse de tissus biologiques

2.5.1. Des modèles de développement tissulaire

Lorsque l'on s'intéresse aux travaux menés en morphogenèse de tissus biologiques, on constate que peu de modélisations numériques sont proposées. Les approches sont souvent basées sur des aspects géométriques ou énergétiques (Dubertret et Rivier, 1997 & 2000 ; Lecuit et Lenne, 2007) et plus rarement mécaniques (Nelson et *al.*, 2005 ; Jamali et *al.*, 2010).

Les modèles géométriques présentent l'avantage de reproduire fidèlement les topologies épithéliales. Classiquement, ces approches sont essentiellement basées sur le modèle de Dirichlet (appelé aussi diagramme de Voronoï) qui peut être décrit comme suit : Soit un nuage de points dans le plan, le domaine de Dirichlet d'un point est la partie du plan la plus proche de celui-ci. A partir d'une image 2D d'épithélium, en plaçant un point au centre géométrique de chaque cellule d'un tissu, on obtient un tel nuage de points. En construisant ensuite leurs domaines de Dirichlet, on obtient un maillage qui est une très bonne approximation de la géométrie du tissu (Figure 2-11 ; Honda, 1978).

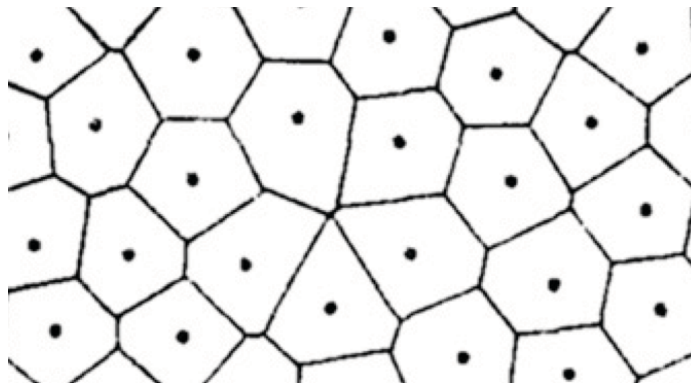


Figure 2-11 : Domaine de Dirichlet représentant une topologie épithéliale (Honda, 1978).

Ensuite, des lois d'évolution peuvent être appliquées à ce maillage représentant l'épithélium. De manière itérative, on peut réduire le périmètre des cellules sans changer leur aire (Honda et Eguchi, 1980) ou déterminer le minimum local d'une fonction géométrique dépendant de la tension membranaire et de la surface de la cellule (Farhadifar et *al.*, 2007). De tels modèles permettent de faire évoluer la topologie épithéliale, issue d'une configuration initiale construite à partir d'images expérimentales. Cependant, la physique du tissu est très succinctement représentée à travers ces approches.

Suivant une approche plus physique, le Cellular Potts Model (CPM) est un modèle cellulaire dynamique utilisé habituellement pour la simulation d'épithéliums prolifératifs. Il s'agit, en fait, d'un automate cellulaire dans lequel peuvent être intégrées des lois biochimiques de diffusion influençant le développement du tissu. La topologie évolue alors en calculant la probabilité de passer d'une configuration à une autre, déterminée à partir d'une fonction énergie. Par exemple, Graner et Glazier ont développé un modèle de différenciation cellulaire à partir de cette approche (Graner et Glazier, 1992 & 1993). Cette méthode permet donc d'obtenir des géométries épithéliales réalistes (Figure 2-12) et s'adapte à de nombreux cas d'études car elle est basée sur une fonction énergie. En revanche, elle ne permet pas de prendre en compte les efforts mécaniques entre cellules en tant que tels.

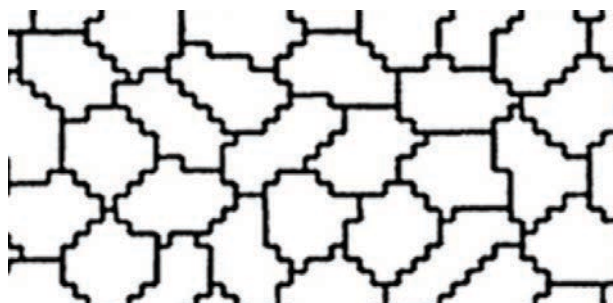


Figure 2-12 : Représentation épithéliale à partir d'un CPM (Glazier et Graner, 1993).

Une première approche intégrant une étude mécanique de tissus en développement a été proposée récemment (Nelson et *al.*, 2005). Les auteurs modélisent le tissu monocouche par un milieu continu isotrope sans considérer individuellement les cellules qui le constituent et s'attachent essentiellement à établir un lien potentiel entre concentration de contraintes dans le tissu et division cellulaire. Ils tentent ainsi de prédire les zones de plus fort renouvellement tissulaire. Néanmoins, le modèle ne reproduit pas le processus de genèse du tissu, lequel est déjà représenté par une monocouche à l'état initial dont l'organisation n'évolue finalement pas au cours des calculs.

Jamali et ses collaborateurs ont depuis peu aussi développé une approche mécanique et construisent des tissus à partir d'un modèle de cellule considérant des membranes tendues liés à des éléments viscoélastiques subcellulaires modélisant le cytosquelette (Jamali et *al.*, 2010). En outre, les cellules peuvent croître, se diviser et mourir. Les tissus monocouches formés à partir de telles cellules permettent notamment l'étude de l'interaction entre les cellules et

l'effet de l'environnement (intensité des forces d'adhésion par exemple). Cependant, les cellules sont toutes identiques et ne permettent donc pas de modéliser une population en tant que telle. De plus, elles sont représentées de façon totalement symétrique à l'état initial. En outre, le contact entre les cellules n'est défini qu'à travers des points de connexion (lien entre les éléments constituant la membrane et les éléments cytosquelettiques) et d'éventuels déplacements cellulaires relatifs s'en trouvent fortement limités. Ces remarques rejoignent celles faites pour les milieux continus qui seront présentées dans la partie suivante.

Notre objectif est de développer un modèle biomécanique de tissu décrivant son évolution et permettant l'étude du nombre de voisins des cellules d'une population. Les approches numériques proposées à ce jour ne décrivent généralement pas les phénomènes mécaniques mis en jeu au cœur des tissus. Les deux dernières méthodes présentées dans cette partie offrent l'avantage d'être basées sur des aspects mécaniques. Or, la première méthode ne considère pas les cellules individuellement et ne simule pas le processus de morphogenèse. Quant à la seconde, bien qu'elle prenne en compte ces cellules et leur évolution, elle néglige leur diversité et limite la réorganisation cellulaire. Nous nous sommes donc intéressés à d'autres approches, généralement non appliquées à la morphogenèse. Dans la partie suivante, certains modèles mécaniques caractéristiques, appliqués à l'étude des cellules et tissus sont ainsi présentés.

2.5.2. Des modèles mécaniques de cellules et de tissus

Différents modèles de cellules ont été développés ces cinquante dernières années, depuis les approches rhéologiques 1D en passant par les milieux continus 2D et 3D jusqu'aux approches structurales comme les systèmes de tenségrité ou plus récemment les milieux granulaires (Se reporter par exemple à Lim et *al.*, 2006 ou Ingber, 2003). Ces méthodes ont montré leur pertinence à décrire le comportement mécanique des cellules et des tissus épithéliaux.

A travers les modèles de milieux continus, la cellule est classiquement considérée comme un matériau auquel on peut conférer diverses lois de comportement : élasticité linéaire, hyper-élasticité, visco-élasticité, etc. (se référer par exemple à Ohayon et *al.*, 2004 ou Mijailovich et *al.*, 2002). Dans ces études, la cellule est le plus souvent représentée dans sa globalité, avec une géométrie simplifiée (un parallélépipède rectangle dans les cas cités), et le corps cellulaire est généralement vu comme un milieu homogène. En utilisant la méthode des

éléments finis, les différents auteurs ont ainsi pu étudier la propagation des contraintes et des déformations au sein du cytoplasme, en simulant des tests mécaniques ressemblant à ceux effectués expérimentalement (magnétocytométrie dans les cas cités). Les résultats obtenus avec ces modèles continus apparaissent utiles lorsque l'on veut, par exemple, se faire une première idée de ce qui peut se passer au sein d'une cellule soumise à un effort extérieur.

Par ailleurs, des modèles similaires ont été développés dans le but d'étudier le comportement mécanique de tissus mous. La cellule y est généralement tantôt négligée (ou vue comme un point matériel) tantôt prise en compte par un élément fini issu de la discrétisation du milieu en fonction du besoin de finesse dans la description de la microstructure (voir par exemple, Famaey et *al.*, 2012, Holzapfel et Kuhl, 2012). Parmi ces approches continues, certaines apparaissent assez originales comme, par exemple, les travaux de Vychitil et collaborateurs (Vychitil et Holecek, 2008 ; Moravec et Holecek, 2010). Dans ce modèle, le point est considéré comme un micro-domaine assorti d'une structure élémentaire, capable de se déformer dans les différentes directions de l'espace et ajoutant des degrés de liberté au milieu continu.

Malgré l'intérêt évident des approches basées sur les milieux continus, en particulier dans l'étude du comportement mécanique global et de la propagation des contraintes dans la cellule ou le tissu, ces modèles semblent toutefois difficiles à adapter au cas de la morphogenèse. En effet, l'hétérogénéité du milieu biologique n'est pas, ou sommairement, prise en compte (à l'échelle des tissus les modèles sont généralement périodiques) et sa dynamique d'évolution est absente. En outre, la méthode des éléments finis ne permet pas de mouvement relatif des composants du maillage les uns par rapport aux autres, ce qui limite les possibilités de réorganisation des cellules et des tissus, et est un frein à son application à la morphogenèse épithéliale.

Une façon de prendre en compte l'hétérogénéité cellulaire, en particulier le cytosquelette, est d'utiliser la mécanique des structures, parmi lesquelles les structures de tensegrité sont des représentantes emblématiques. En 1985, Ingber et Jamieson imaginent la cellule comme une structure de tensegrité dont les extrémités permettent une adhésion discrète au contraire des approches continues (Ingber et Jamieson, 1985). Les filaments du cytosquelette sont représentés par les câbles en tension et les microtubules par les barres en compression de la structure. Les nombreux modèles de tensegrité développés à ce jour ont permis d'étudier, entre autres, le rôle de la tension interne, l'effet de l'état adhésion ou encore de la fréquence de sollicitation, ainsi que de prédire des valeurs d'élasticité ou de viscosité

cellulaire (Wendling et *al.*, 2000 ; Stamenovic et *al.*, 2002 ; Cañadas et *al.*, 2003 ; Sultan et *al.*, 2004). Un modèle original a aussi été proposé par McGarry et Prendergast, considérant une structure de tensegrité représentant le cytosquelette, immergée dans un milieu continu hétérogène représentant la membrane, le cytoplasme et le noyau (McGarry et Prendergast, 2004). Un autre modèle inspiré des systèmes de tensegrité a été développé au LMGC en 2006 (Baudriller et *al.*, 2006). Il propose une méthode de recherche de forme liée à la méthode numérique de relaxation dynamique pour générer une forme de tensegrité non régulière. Le cytosquelette calculé confère à la cellule diverses formes analogues à celles observées expérimentalement (Figure 2-13) et constitue une amélioration par rapport aux modèles de tensegrité réguliers utilisés précédemment.

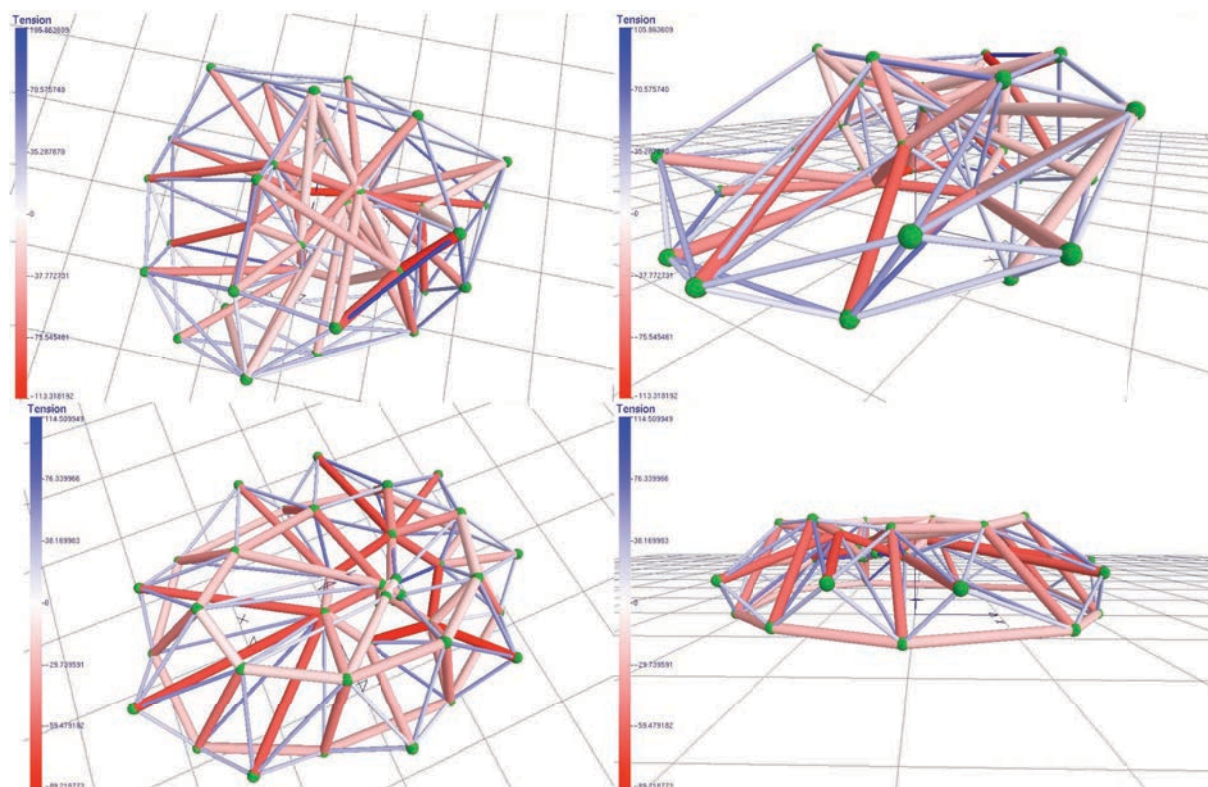


Figure 2-13 : Deux systèmes de tensegrité complexes avec des éléments en compression partant du centre de la cellule et des éléments en traction concentrés à la périphérie de la cellule et diffus à l'intérieur (Baudriller et *al.*, 2006). Plus les éléments sont bleus, plus ils sont tendus et plus ils sont rouges, plus ils sont comprimés.

Au niveau tissulaire, aucune étude ne semble avoir été publiée à ce jour. On peut toutefois signaler les travaux menés, dans l'équipe Conception en Structures du LMGC, sur les grilles de tensegrité dont une application biomécanique possible pourrait concerner l'étude de la propagation des efforts entre cellules jointives au sein d'un tissu (Cañadas et *al.*, 2009).

Néanmoins, ces grilles de tensegrité sont à ce jour construites par répétition périodique d'une structure de tensegrité de base.

Toutefois, ces modèles structuraux, bien que plus descriptifs que les milieux continus, sont eux aussi assez statiques et semblent peu à même de représenter la dynamique biologique des cellules et tissus. Là encore, ils apparaissent difficiles à adapter pour l'étude de la morphogenèse épithéliale.

C'est notamment cet aspect « figé » des approches précédentes qui a conduit certains chercheurs à se baser sur une autre méthode, à savoir l'approche discrète qui consiste à représenter la cellule par un ensemble d'éléments pouvant interagir entre eux (Baudriller et *al.*, 2006 ; Milan et *al.*, 2006 ; Maurin et *al.*, 2008 ; Van Liedekerke et *al.*, 2010). Van Liedekerke propose un modèle particulaire pour étudier la réponse d'une cellule à des sollicitations mécaniques au niveau sub-cellulaire. Ce modèle est composé pour sa partie interne d'un liquide encapsulé dans une membrane viscoélastique, composée de particules solides, le comportement du liquide étant géré par la méthode SPH (Smoothed-particle hydrodynamics) et celui de la partie solide par la méthode des éléments discrets (Figure 2-14).

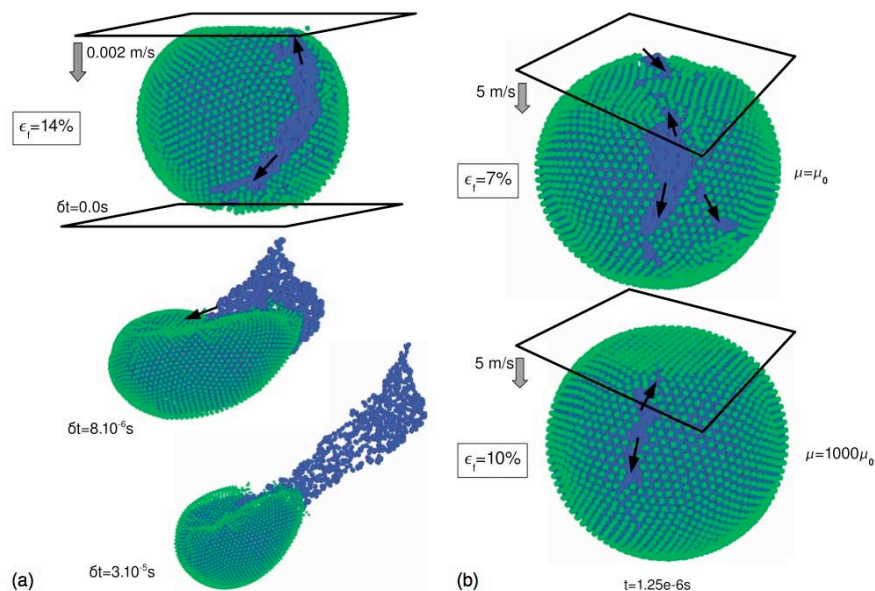


Figure 2-14 : Compression numérique d'une cellule végétale jusqu'à déchirure de la membrane (VanLiedekerke et *al.*, 2010).

Milan et ses collègues (Milan et *al.*, 2006) ont élaboré un modèle granulaire 2D dans lequel un système de câbles et de barres virtuels, reliés par des grains qui peuvent se réorganiser, représente le cytosquelette et ses caractéristiques dynamiques et hétérogènes

(Figure 2-15). Les résultats obtenus ont notamment mis en évidence l'interdépendance des constituants du cytosquelette. Ce modèle permet aussi d'étudier le réarrangement architectural du cytosquelette lors de l'application d'une sollicitation externe.

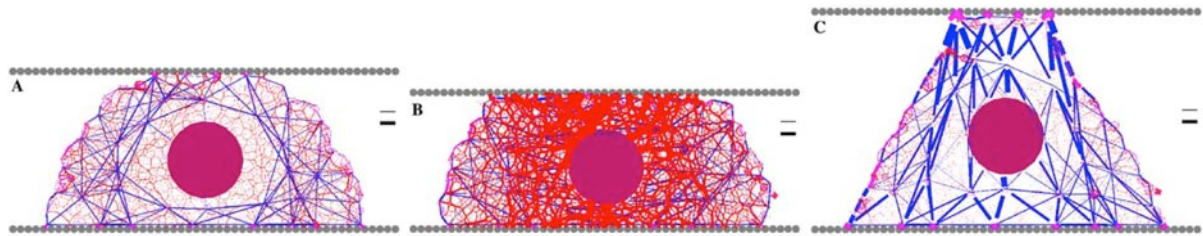


Figure 2-15 : Essai mécanique de compression (b) et traction (c) d'une cellule à partir d'un état initial précontraint (a) (Milan et *al.*, 2006).

Au LMGC, un modèle granulaire d'étalement de cellules a aussi été développé (Maurin et *al.*, 2008). Cette approche a pour objectif la recherche de formes de la structure du cytosquelette lors des processus d'adhésion et d'étalement cellulaire sur un substrat plat (Figure 2-16).

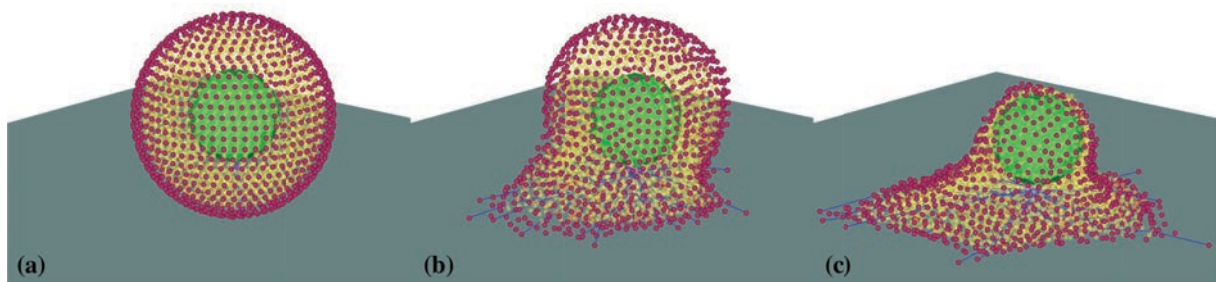


Figure 2-16 : Étapes de l'étalement de la cellule sous l'action de croissance des microtubules (Maurin et *al.*, 2008).

La cellule est représentée par des grains rigides liés par des interactions à distance (comme des ressorts virtuels) qui simulent le cytosquelette. Des microtubules en compression croissent du centrosome vers la membrane, ce qui génère des efforts de tension équilibrant le reste du réseau, l'ensemble conduisant à l'étalement de la cellule. La répartition ainsi obtenue des éléments en tension et en compression présente de fortes analogies avec les observations expérimentales des réseaux de filaments d'actine et de microtubules (Figure 2-17).

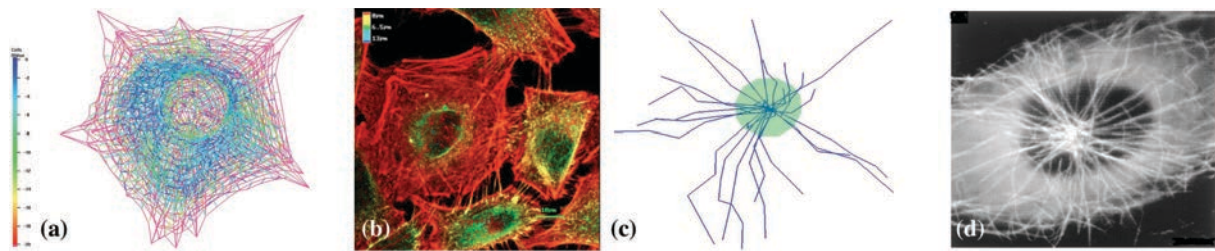


Figure 2-17 : Réseau de filaments d'actine (a) et (b) : réseau de tension (a) et vue en microscopie confocale. Réseau de microtubules d'une cellule étalée (c) et (d): réseau de compression (a) et vue en contraste de phase (b) (Maurin et *al.*, 2008).

Au niveau tissulaire, on peut citer le modèle discret de Newman (Newman, 2005 ; Sandersius et Newman 2008), dans lequel chaque particule appartient à une seule cellule et est en contact élastique amorti avec les autres grains de sa cellule (Figure 2-18). Ce modèle considère ensuite plusieurs de ces cellules qui interagissent entre elles pour former des agrégats. La géométrie du tissu ainsi modélisée est le résultat de l'interaction entre les particules constitutives. Ce modèle mécanique tridimensionnel permet notamment de calculer des contraintes et des déformations locales au sein des cellules tout en représentant l'échelle tissulaire.

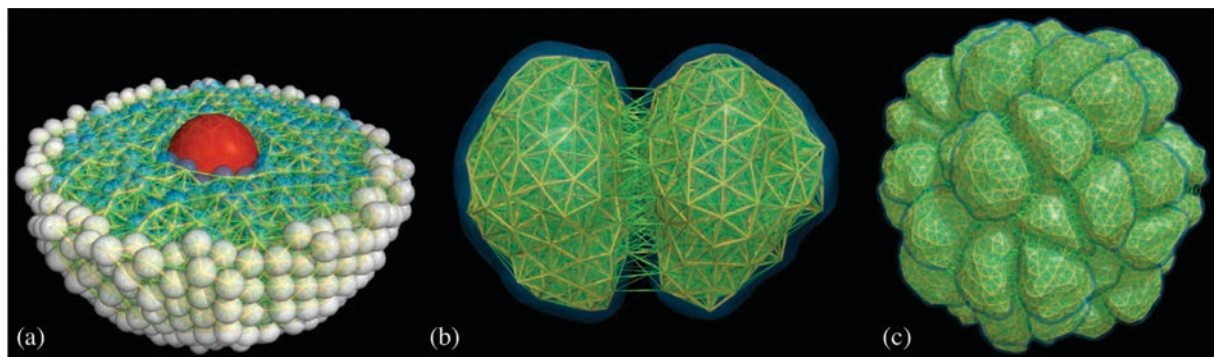


Figure 2-18 : Modèle de cellule avec des éléments subcellulaires. Vue d'une cellule en coupe (a), de deux cellules liées (b) et d'un agrégat (c) (Sandersius et Newman, 2008).

Ces approches discrètes représentent un niveau de description plus fin que celui des modèles structuraux et continus, tout en permettant de représenter dynamiquement un tissu en évolution. En effet, il est possible de représenter une structure cellulaire à travers les interactions entre grains et d'en suivre l'évolution architecturale en cours de sollicitation. De plus, les particules de ces modèles peuvent totalement se mouvoir les unes par rapport aux autres, offrant une plus grande diversité et liberté de configurations que pour les approches citées auparavant. Ainsi, des « cellules granulaires » peuvent aussi interagir entre elles et se

réarranger, réorganisant le tissu qu'elles forment. Il semble donc concevable d'envisager la modélisation de la morphogénèse par une approche discrète. En outre, l'ajout ou la suppression des constituants est assez aisée, ce qui est un atout supplémentaire considérable dans le cas des tissus prolifératifs. Le modèle de morphogénèse épithéliale développé ici sera donc basé sur la mécanique des milieux divisés.

2.6. Conclusion

La morphogénèse d'épithéliums monocouches est étudiée depuis longtemps d'un point de vue biologique. Numériquement, il existe plusieurs modèles de cellules et de tissus mais peu permettent l'étude de la morphogénèse de tissus. Ceux basés sur la mécanique des milieux divisés nous ont semblé être les meilleurs candidats. Pour l'étude de la morphogénèse d'épithéliums monocouches, nous avons donc choisi de créer un modèle numérique d'épithélium dynamique dans lequel le comportement de chaque cellule et les interactions entre cellules sont pilotées par des lois simples et bioréalistes. Cet avatar numérique de bio-ingénierie peut ainsi permettre de reproduire *in silico* des développements d'épithéliums observés *in vivo* et de tester des paramètres inaccessibles par des expérimentations biologiques (taux de mitose, variation de vitesse de développement, etc.). Ces études prospectives mécaniques donnent un éclairage original sur cette problématique de morphogénèse d'épithéliums monocouches et peuvent, peut-être, apporter des clés comportementales et organisationnelles.

3. Modèle granulaire de morphogenèse tissulaire

Dans la partie précédente, les épithéliums ainsi que les mécanismes qui permettent leur formation ont été présentés. En outre, des modèles mécaniques de cellules et de développement de tissus épithéliaux ont été présentés et décrits. L'approche granulaire, bien que peu utilisée pour la modélisation tissulaire possède de nombreux atouts par rapport aux modélisations considérant la cellule comme un milieu continu ou une structure. En effet, cette approche permet de rendre compte de l'état mécanique de la cellule et de sa capacité à se déformer.

Cette partie est dédiée à la présentation d'un modèle basé sur une approche de ce type. La cellule composée de grains et d'éléments peut croître, se diviser et mourir et ainsi former un tissu. Deux types de tissus sont développés : prolifératif et non prolifératif.

Ensuite nous verrons plus en détails le fonctionnement du code régissant l'évolution des tissus, les paramètres utilisés et les cas d'études. Enfin, les méthodologies de comptage et d'analyse statistique sont décrites.

3.1. Introduction

Afin de simuler la morphogenèse de tissus cellulaires monocouches, nous nous sommes d'abord accordés avec nos collègues biologistes sur les grands principes du modèle. L'idée est de créer un modèle mécanique piloté par des règles naturelles, simples, bioréalistes. Il doit également permettre l'étude de différents scénarios : épithélium non-prolifératif formé par accréation avec possibilité de faire varier différentes vitesses (de croissance des cellules, de l'œuf et d'arrivée des nouvelles cellules) ou épithélium prolifératif avec une variation possible de la fréquence d'apoptose et de mitose. Ces tissus doivent aussi pouvoir se développer sur une surface sphérique ou plane de tailles et de conditions aux limites variables.

Au vu des avantages et inconvénients des modèles géométriques et mécaniques existants (voir chapitre précédent), l'approche discrète a semblé la plus adaptée pour répondre aux objectifs de cette étude, en particulier dans sa capacité à conférer aux cellules une certaine plasticité de forme et une grande liberté d'auto-organisation ainsi que de part le faible coût et la relative facilité de mise en œuvre des calculs correspondants. En outre, un modèle biomécanique basé sur la physique des milieux divisés permet de construire facilement des scénarios de morphogenèse autorisant le gain ou la perte de matière via la suppression ou l'ajout de grain.

Ce premier modèle développé au cours de ce travail de thèse est bidimensionnel. Il est composé de cellules discrétisées par des grains de matière contraints de se mouvoir sur une surface (sphérique ou plane selon le cas d'étude). Ils sont repositionnés géométriquement sur cette surface à chaque pas de temps.

L'ensemble des cellules formées de grains se déplaçant sur une surface constitue un tissu numérique qui considère les interactions mécaniques à l'intérieur des cellules et entre elles. Les réactions biochimiques, les aspects énergétiques, etc., ne sont pas directement considérés dans cette étude.

3.2. Modèle numérique de la cellule

3.2.1. Représentation d'une cellule

Le modèle de la cellule doit autoriser une libre réorganisation interne pour adopter la forme la plus adaptée à son environnement. Pour ce, il a été choisi de représenter la cellule par un nuage de grains massiques en interaction. Ils sont de deux types :

- Les grains internes de cinq tailles différentes (représentés en noir sur la Figure 3-1 et de cinq couleurs différentes sur la Figure 3-2 (a)) modélisent le cytoplasme. Ils sont en contact rigide avec amortissement mais sans adhésion ni frottement. Ils travaillent donc en compression. La polydispersité de ces grains internes permet de rendre compte de l'hétérogénéité intracellulaire et d'éviter ainsi une représentation trop cristalline.
- Les grains membranaires, tous de même taille, sont liés par des éléments de câbles viscoélastiques (Figure 3-1 (b) et (c) : les éléments membranaires sont en vert) qui travaillent en traction. Cet ensemble représentant la membrane de la cellule encapsule les grains internes avec lesquels ils sont en contact rigide. Ils jouent aussi le rôle du cortex d'actine, réseau dense d'actine filamenteuse en tension présent sous la membrane et à laquelle il est directement connecté.

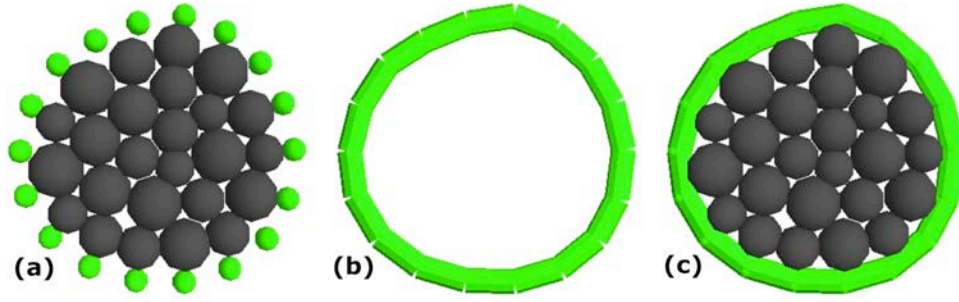


Figure 3-1 : (a) Grains seuls (internes en noir et membranaires en vert) constituant le modèle de cellule ; (b) éléments membranaires seuls (c) ensemble de la cellule. Sur la dernière image, les grains membranaires se distinguent peu des éléments membranaires car leur rayon est le même que celui des câbles membranaires.

Afin de mieux représenter les cellules observées au sein d'un épithélium monocouche, des mécanismes d'évolution fondamentaux ont été intégrés dans le modèle : croissance, apoptose et division.

3.2.2. L'état de contrainte d'une cellule

Afin de déterminer l'état de contrainte d'une cellule du modèle et étant donnée sa constitution en grains, il est nécessaire d'utiliser un tenseur de contraintes spécifique aux milieux granulaires. D'après Moreau (Moreau, 1997), il est ainsi possible de calculer un tel tenseur de contrainte pour chaque grain dans un volume donné, la somme de ces tenseurs tendant vers le tenseur de Cauchy de ce volume. Étant donné que le modèle de cette étude est bidimensionnel et non tridimensionnel, les grains sont considérés sur une surface et non dans un volume, le tenseur étant alors défini comme suit :

Soit un grain i et la contrainte $\sigma_{\alpha\beta}^i$ associée à ce grain.

Soit j l'indice des grains avec lesquels le grain i est en contact dans une surface S .

La contrainte est alors donnée par :

$$\sigma_{\alpha\beta}^j = \frac{1}{S_i} \sum_j f_{\alpha}^{ij} l_{\beta}^{ij}, \text{ (Rothenburg et Selvadurai, 1981)}$$

où l^{ij} représente la longueur entre les grains i et j en contact, et f^{ij} la force appliquée par le grain j sur le grain i .

La contrainte globale de la cellule est alors obtenue en sommant les contraintes de tous les nœuds internes i de la cellule de surface S_i :

$$\sigma_{\alpha\beta} = \frac{1}{S} \sum_i \sigma_{\alpha\beta}^i S_i$$

Le premier invariant de cette matrice de contraintes donne une valeur de l'état de contrainte de la cellule, définissant ainsi un critère mécanique, qui peut être alors comparé à celui d'autres cellules.

La direction des contraintes principales est définie par le vecteur propre correspondant à la plus grande valeur propre.

3.2.3. La croissance cellulaire

Afin de rendre compte de l'augmentation de la taille des cellules observées au cours de leur phase de croissance, il a été décidé d'implémenter des lois simples qui permettent d'augmenter le nombre de grains internes ainsi que d'allonger des éléments membranaires (Figure 3-2). La stratégie choisie est la suivante : tous les n pas de temps, un nouveau grain interne est ajouté au centre de la cellule. Ce nombre entier n est un paramètre qui définit alors la vitesse de croissance de la cellule ($V_{crs_cellule}$) et qui est déterminé empiriquement en fonction de la dynamique globale du système. Si n est trop petit, la vitesse de croissance des cellules est trop grande, les grains internes de la cellule n'ont pas le temps de s'organiser, la cellule n'a donc pas une forme stable. Si n est trop grand, la cellule croît lentement et la durée de la simulation augmente. En outre, la taille du nouveau grain interne ajouté dans la cellule est déterminée en fonction du nombre de grains déjà présents. Ainsi, une cellule a un même nombre de grains internes de chaque taille à un grain près afin de conserver une granulométrie régulière.

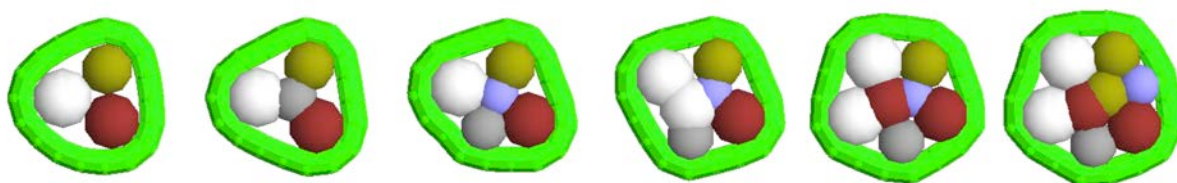


Figure 3-2 : Étapes de la croissance d'une cellule à partir de trois grains internes. Les cinq tailles différentes de grains sont représentées par cinq couleurs différentes. La forme en apparence polygonale de certains grains est due à l'interpénétration autorisée entre eux (cf. 3.4.1).

Laurent et ses collaborateurs ont montré que la tension du cortex d'actine est bornée et que sa rigidité est faiblement impactée par l'action de la cytochalasine D (Laurent et *al.*, 2003). Dans les conditions utilisées lors de cette étude (faible concentration et courte durée d'exposition), cet agent contribue à réduire la tension des assemblages d'actine. On considèrera donc, en première approximation, que la tension de la membrane évolue peu. Toutefois, l'augmentation du nombre de grains internes tend à augmenter la tension des

éléments membranaires. Afin de la limiter et de lui donner une valeur quasi-constante, il a été choisi de régir le comportement de cette membrane avec les règles suivantes (l'ensemble des paramètres mécaniques est synthétisé dans le Tableau 3-3) :

- si la tension d'un élément membranaire est inférieure à une valeur fixée ($T_{\min}$), alors sa longueur libre ℓ_f diminue et est recalculée comme suit :

$$\ell_f = (E_m A_m \ell) / (E_m A_m + T_{\min})$$

- si deux éléments liés ont une longueur inférieure à une valeur donnée ($L_{\min_mb}$) alors ces éléments fusionnent pour n'en former qu'un seul.
- si la tension d'un élément membranaire est supérieure à une valeur choisie ($T_{\max}$) alors sa longueur libre ℓ_f augmente comme suit :

$$\ell_f = (E_m A_m \ell) / (E_m A_m + T_{\max})$$

- si la longueur d'un élément membranaire est supérieure à une valeur définie ($L_{\max_mb}$) alors cet élément est scindé en deux éléments de même tension et de même longueur.

Par conséquent, l'augmentation du nombre de grains internes conduit à un allongement de la membrane dont la tension reste bornée. La croissance de la cellule s'arrête quand le nombre de grains internes atteint une valeur limite ($n_{\max}$ cf. Tableau 3-3). La cellule est donc considérée comme ayant atteint sa taille maximale.

Enfin, nous avons défini deux types de croissance de cellule : une croissance dite « linéaire » et une croissance dite « mécanique ». La première, définie en première approximation, consiste à faire croître la cellule à intervalles de temps réguliers ce qui définit une vitesse de croissance ($V_{\text{crs_cellule}}$). La seconde conditionne la croissance de la cellule par une valeur seuil liée au niveau de contrainte (Chen et *al.*, 1997 ; Basan et *al.*, 2009). Les détails sont développés dans le paragraphe 3.2.2.

3.2.4. La division cellulaire

Sur la base d'observations expérimentales, nous avons développé un modèle de division pour la cellule « granulaire » (Figure 3-3).

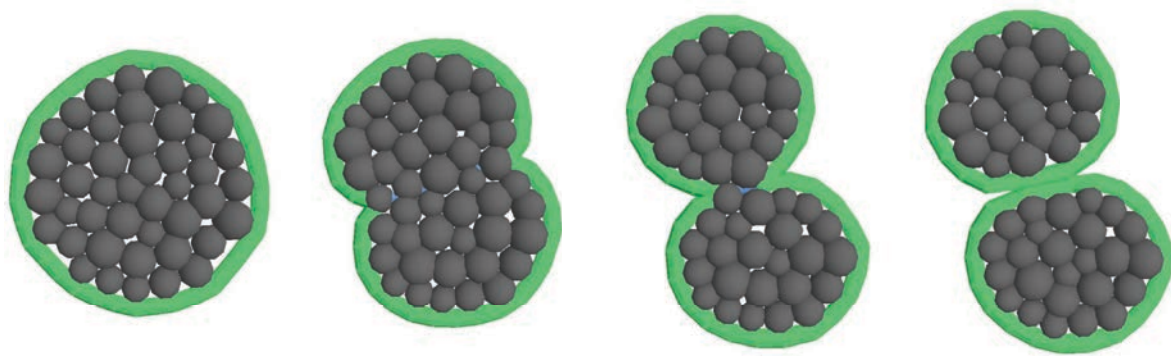


Figure 3-3 : Étapes de la division cellulaire (en bleu le câble d'actine).

Une cellule à diviser étant identifiée (soit aléatoirement, soit selon un critère mécanique), un câble « actine » est créé entre deux grains membranes diamétralement opposés par rapport au centre de masse de la cellule (Figure 3-3). Puis, la longueur de ce câble diminue progressivement jusqu'à une longueur seuil. Les deux grains membranes extrémités et quatre éléments membranaires sont alors supprimés. Pour finaliser la division, deux nouveaux grains membranes et quatre nouveaux éléments membranaires sont créés afin de fermer les deux membranes des deux cellules filles (Figure 3-4).

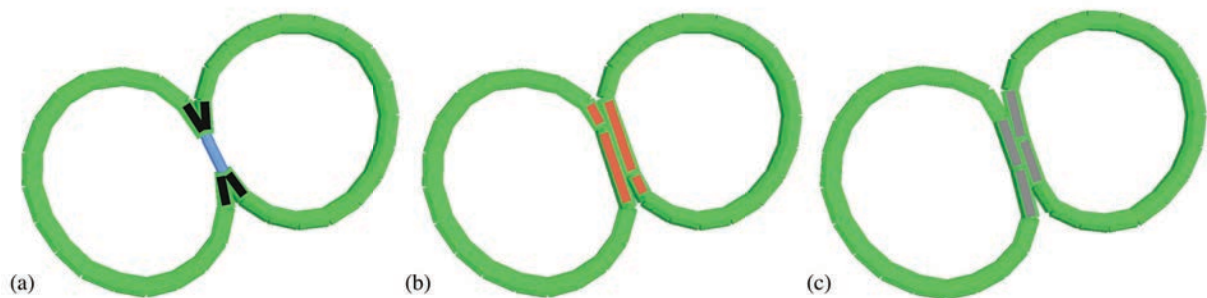


Figure 3-4 : (a) Étape de fin de la division ; (b) et (c) premières étapes de croissance des cellules filles. En bleu, l'élément « actine » représentant l'anneau d'actine. En noir les éléments membranaires qui vont être supprimés (a), en rouge ceux créés (b) et en gris ces derniers divisés suivant les règles de gestion de la membrane.

Ainsi le nombre de grains et de câbles ne varie pas au cours de la division : la somme des nombres de grains et d'éléments des cellules filles est égale à ceux de la cellule mère. Par ailleurs, lors de la division, la cellule ne croît pas et ne peut pas entrer en apoptose.

Deux types de division sont envisagés : selon une approche géométrique (« division géométrique ») ou mécanique (« division mécanique »).

La première consiste à créer le câble d'actine entre les deux grains de membrane les plus proches, opposés par rapport au centre de masse de la cellule. Pour ce faire, on détermine

pour chaque grain membrane son « grain opposé » (en réalité le « plus » opposé), puis on sélectionne parmi ces couples de grains opposés, le couple pour lesquels les grains sont les plus proches. On considère, pour cela, les vecteurs que chaque grain membrane forme avec le centre de masse de la cellule. Le produit scalaire minimum de ces vecteurs normés définit pour chaque grain, le grain « le plus opposé ». Une fois ces couples de grains opposés déterminés, le minimum des produits scalaires des vecteurs, que forment ces couples de grains avec le centre de masse de la cellule, indique le couple des grains les « plus proches » qui seront alors les extrémités du câble d'actine à créer.

Dans la seconde approche dite mécanique (« division mécanique »), on considère le vecteur représentant la direction des contraintes principales de la cellule (cf. paragraphe 3.2.2) et les vecteurs formés par le point centre de masse de la cellule et les grains membranes. Le minimum et le maximum du produit scalaire normé de ces vecteurs déterminent les deux grains membranes qui seront aux extrémités du câble d'actine à créer.

Ces modèles de division ont été discutés avec nos partenaires biologistes qui les ont jugés tous deux pertinents dans le cadre de cette étude. Ils ont donc tous deux été considérés ici.

3.2.5. L'apoptose

Biologiquement, nous avons vu que l'apoptose se caractérise essentiellement par une rétraction du cytoplasme associée à celle de la membrane. Ce processus a donc été intégré dans notre modèle par analogie avec cette observation. Les grains internes sont ainsi régulièrement supprimés par groupe de cinq (ce qui définit la vitesse d'apoptose, Vapop) et, lorsque le nombre de grains dans la cellule est inférieur à cinq, ces derniers ainsi que la membrane sont finalement supprimés.

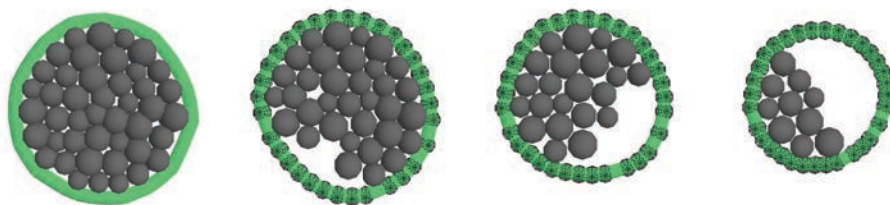


Figure 3-5 : Étales de l'évolution d'une cellule en apoptose. Une cellule en apoptose est caractérisée par le marquage de leur nœud membrane en noir.

3.3. Le modèle numérique de morphogenèse tissulaire

3.3.1. Introduction

Le modèle de tissu est composé des cellules décrites précédemment. Celles-ci se déplacent sans adhésion sur une surface sphérique ou plane et sont soumises aux efforts de contact avec les cellules voisines et les éléments « de bord » (s'il y a des conditions aux limites). Le tissu se développe alors selon le scénario de morphogenèse par accrétion ou par prolifération. Dans le premier cas, de nouvelles cellules venant du milieu extérieur s'agglomèrent à des cellules préexistantes sur la surface. Aucune cellule ne se divise, c'est pourquoi l'épithélium est dit non prolifératif formé par accrétion. Dans le second cas, des cellules présentes sur une surface se divisent et/ou meurent. Le tissu présente finalement, dans les deux cas, une organisation cellulaire qui lui est propre.

3.3.2. L'adhésion cellulaire et les liaisons inter-cellulaires

Pour ce modèle de tissu, l'adhésion entre les cellules et le substrat n'est pas prise en compte directement. En revanche, les cellules sont contraintes de rester au contact du substrat en étant repositionnées géométriquement à chaque pas de temps du calcul sur la surface (sphérique ou plane). C'est une façon de prendre en compte indirectement (en première approximation) l'adhésion des cellules au substrat tout en leur laissant la possibilité de se mouvoir sur la surface.

Par ailleurs, les cellules au sein du tissu sont en interaction, chacune exerçant sur ses voisines des efforts répulsifs via le contact entre ses grains membranaires et les éléments membranaires des cellules voisines (Figure 3-6 (a)).

La seule adhésion proprement dite considérée dans cette étude est celle entre cellules. Elle est représentée par des éléments très courts de câble entre les grains membranaires de deux cellules. Ces éléments seront appelés par la suite éléments « cadhérine » (Figure 3-6 (b)), du nom des liaisons intercellulaires qui existent au sein de ce type de tissu.

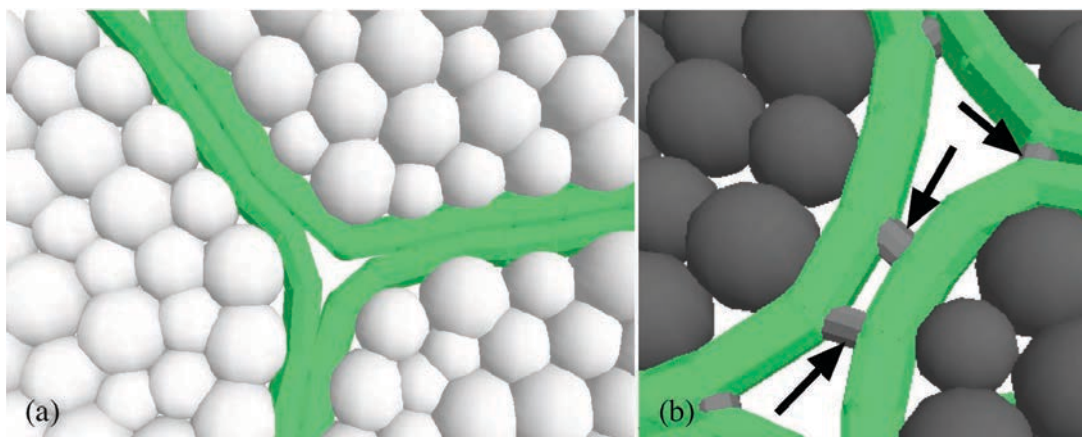


Figure 3-6 : Les interactions entre les cellules sont de deux types : répulsif par contact rigide (a) ou d'adhésion par câble tendu (b).

Afin de permettre une mobilité des cellules au sein du tissu, les éléments « cadhérines » subissent un processus de construction et de déconstruction à l'instar des observations faites par nos collaborateurs biologistes sur l'aspect dynamique des liaisons intercellulaires. Ainsi, lorsque la distance entre les grains membranaires de deux cellules est inférieure à une distance donnée ($L_{\text{max_cad}}$ cf. Tableau 3-3), un câble « cadhérine » est créé entre ceux-ci. Afin d'éviter que deux cellules adhèrent trop entre elles et ne puissent plus se « détacher », seul un grain membrane sur deux peut être lié à une autre cellule par un élément « cadhérine ». Après une période définie arbitrairement (n_{cad} cf. Tableau 3-2), tous les éléments « cadhérine » sont détruits puis d'autres sont recréés en fonction de la nouvelle géométrie du tissu.

3.3.3. Le scénario de morphogenèse d'un épithélium non prolifératif

D'après les observations de Karim Azzag de l'ISEM (Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier), le scénario de morphogenèse d'épithélium non prolifératif formé par accréction propose comme configuration initiale une sphère (représentant l'œuf de *Ciona intestinalis*) de 80 μm de diamètre sur laquelle sont disposées aléatoirement dix cellules de petite taille, représentant les cellules folliculaires, contenant trois grains internes (le nombre de cellules initiales et leur taille sont arbitraires). Ensuite, de nouvelles cellules viennent se poser aléatoirement dans les espaces libres entre celles déjà présentes sur cette sphère. Toutes les cellules ainsi que la sphère croissent simultanément jusqu'à des limites fixées : le diamètre de la sphère est ainsi borné à un maximum de 160 μm et chaque cellule a un nombre maximum de grains internes (c.f. 3.2.3). Chaque simulation est arrêtée quand la surface de la sphère est entièrement couverte de cellules, ce qui correspond approximativement à 60

cellules. Les principales étapes de ce scénario peuvent être aussi visualisées dans la partie 4. *Résultats expérimentaux et numériques* de ce mémoire (Figure 4-5).

Trois paramètres sont prépondérants lors du développement par accrétion :

- la vitesse de croissance des cellules $V_{crs_cellule}$,
- la vitesse d'arrivée des cellules $V_{accrétion}$,
- la vitesse de croissance de la sphère $V_{crs_sphère}$.

L'ensemble de ces trois vitesses définit une vitesse de développement du tissu (VDT) dont nous allons étudier l'influence par la suite. Le caractère aléatoire du positionnement des cellules initiales et de l'arrivée des nouvelles conduit à des organisations au sein des tissus qui sont uniques à chaque fin de simulation.

3.3.4. Le scénario de morphogenèse d'épithélium prolifératif

A la différence du scénario d'accrétion (pour lequel la surface, sur laquelle le tissu se développe, augmente), le modèle d'épithélium prolifératif, formé de cellules qui se divisent et/ou entrent en apoptose, se forme sur une surface constante. Si c'est une sphère, elle ne croît donc pas au cours du calcul et son diamètre reste de 160 μm . Pour une surface plane, deux configurations ont été étudiées : avec et sans condition de bord. Dans le premier de ces deux cas, les conditions limites sont matérialisées par des éléments de bord qui restent fixes. La surface sur laquelle se développe le tissu n'évolue donc pas. Dans la seconde situation, les conditions de bord étant absentes, le tissu se développe librement sur une surface plane infinie.

Pour toutes ces configurations, quinze cellules sont initialement positionnées aléatoirement sur la surface sur laquelle se développera le tissu. Ensuite, ces cellules croissent jusqu'à leur taille maximum (cf. 3.2.3). Puis, une fraction établie à 7% des cellules est déterminée pour entrer en division (correspondant aux observations faites expérimentalement). Elles sont choisies aléatoirement ou en fonction de la valeur du premier invariant de leur tenseur de contraintes selon l'option de calcul choisie (division « aléatoire » ou « mécanique »). Dans le cas d'un calcul avec une division « mécanique », c'est la cellule ayant la plus faible valeur du premier invariant du tenseur de contraintes qui est divisée, c'est à dire la cellule la moins contrainte, ce qui est en accord avec les observations expérimentales (Dike et *al.*, 1999, Basan et *al.*, 2009). A la fin de la division, deux cellules filles sont créées. Elles peuvent à leur tour croître puis se diviser ou mourir une fois leur taille maximale atteinte.

Le nombre de cellules entrant en apoptose est un autre paramètre de calcul qui sera modifié pour en évaluer l'effet. Ces cellules sont choisies comme pour les cellules à diviser, aléatoirement ou en fonction du premier invariant du tenseur des contraintes (respectivement apoptose « aléatoire » ou apoptose « mécanique »). Dans le cas d'un calcul en apoptose « mécanique », la cellule entrant en apoptose est celle qui a la plus grande valeur du premier invariant de contraintes, c'est à dire la cellule la plus contrainte (Dike et *al.*, 1999, Basan et *al.*, 2009). Seules les cellules ayant atteint leur taille maximale peuvent toutefois se diviser ou mourir.

Le taux apoptose/division a été introduit pour tenir compte à la fois du nombre de cellules qui vont se diviser et mourir. Les études ont été réalisées avec trois taux apoptose/division de 0, 1/3 et 1/5, afin d'encadrer le taux réel déterminé à partir de données biologiques qui est proche de 1/4.

Le tissu numérique se développe au gré des divisions et des morts cellulaires qui modifient son organisation. De même que précédemment, le calcul s'arrête lorsque la surface est entièrement couverte de cellules. Les séries de calculs étant effectuées à partir de configurations différentes, les résultats des calculs sont uniques là encore.

Pour le cas particulier des épithéliums se développant avec des conditions aux limites (c'est à dire dans des domaines fermés représentant des « boîtes »), les bords sont matérialisés par des grains (bloqués en déplacement sur les trois directions) reliés par des éléments « boîtes ». Ils forment des carrés ou des cercles de différents rayons. L'épithélium se développe alors contraint par ces conditions de bord.

L'ensemble des paramètres décrivant la morphogenèse d'un épithélium prolifératif est résumé dans le tableau suivant (Tableau 3-1).

surface	condition de bord	croissance	axe de division	critère d'arrêt	taux apoptose/division	division	apoptose
sphérique ou plane	circulaire ou carrée ou sans bord	linéaire ou mécanique	géométrique ou mécanique	4800 nœuds ou $Scell > 0.99 * S$	0 ou 1/3 ou 1/5	aléatoire ou mécanique	aléatoire ou mécanique

Tableau 3-1 : Cas d'études possibles de simulations d'un épithélium prolifératif.

3.4. Architecture et dynamique du modèle

3.4.1. Les types de contact considérés

D'un point de vue mécanique, les grains et les câbles sont seulement soumis à des efforts de contact (Allen and Tildesley, 1987) dont les caractéristiques sont présentées au paragraphe 3.5 (Tableau 3-3). Les calculs se font en l'absence de gravité. Il existe dans ce modèle deux différents types de contact mécanique caractérisés par une rigidité et un amortissement :

- le contact grain-grain (entre grains internes d'une même cellule)
- le contact grain-élément (entre grains internes et éléments membranaires ou entre grains membranaires d'une cellule et éléments membranaires d'une autre cellule).

Le choix a été fait d'autoriser l'interpénétration entre les grains et avec les éléments dont la rigidité et la viscosité de contact, déterminées empiriquement, permettent de définir une force de répulsion :

$$F = Kd - Cv$$

où F est la force de répulsion, d la longueur d'interpénétration (Figure 3-7), v la vitesse, K la rigidité de contact et C la viscosité de contact (ces dernières sont définies au paragraphe 3.5.2).

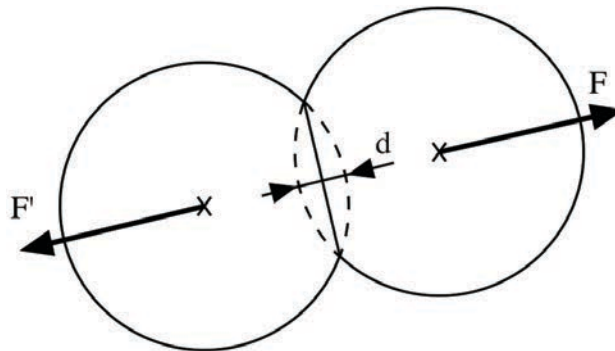


Figure 3-7 : Schématisation de l'interaction entre deux grains interpénétrés. Leurs contours apparaissent donc non circulaires ce qui explique la forme parfois polygonale des grains internes aux cellules (Figure 3-2).

3.4.2. L'évolution temporelle du modèle

Le système est gouverné par les équations de la dynamique du solide. Son évolution temporelle est déterminée via une méthode d'intégration explicite. L'accélération de chaque grain est calculée en faisant le bilan des forces auxquelles il est soumis. Ensuite, la vitesse et

la position sont obtenues par intégrations successives. L'évolution non-linéaire du système à modéliser a imposé logiquement cette approche.

L'ensemble de l'état dynamique du système est représenté par un vecteur X , qui contient la position et la vitesse de tous les grains. A chaque pas de temps, l'état du système est actualisé grâce au calcul de la fonction $f(X,t)$, dérivée première de X en fonction du temps.

La deuxième loi de Newton permet alors d'écrire l'équation suivante :

$$f(X,t) = \frac{dX(t)}{dt} = \begin{bmatrix} \dot{x}_1(t) & \dots & \dot{x}_g(t) \\ \ddot{x}_1(t) & \dots & \ddot{x}_g(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \dot{x}_1(t) & \dots & \dot{x}_g(t) \\ F_1/m_1 & \dots & F_g/m_g \end{bmatrix}$$

où $x_g(t)$, $\dot{x}_g(t)$ et $\ddot{x}_g(t)$ représentent respectivement la position du grain g , sa vitesse et son accélération à l'instant t . Le terme F_g désigne la somme des forces agissant sur ce grain de masse m_g .

Pour un grain interne, les forces résultent :

- des contacts avec les autres grains internes de la cellule,
- du contact avec les éléments membranaires.

Pour un grain membranaire, les forces sont issues :

- du contact avec les éléments membranaires des cellules voisines,
- du contact avec les éléments « bords » (calcul avec des conditions limites),
- des éléments membranaires auxquels ce grain est lié,
- de l'élément « cadhérine » auquel il est éventuellement associé.

Le calcul de la vitesse et de la position à partir, respectivement, de l'accélération et de la vitesse, s'effectue par une intégration temporelle en suivant la méthode d'intégration Runge-Kutta d'ordre 4. Il s'agit d'une méthode classique d'analyse numérique d'approximation d'équations différentielles à conditions initiales (Dautray et Lions, 1988). En considérant un problème scalaire de type $x = f(X,t)$ avec comme condition initiale $x(t_0) = x_0$, l'état du système au temps suivant $(t+dt)$ est :

$$x_{t+dt} = x_t + \left(K_1 + 2K_2 + 2K_3 + K_4 \right) \frac{dt}{6}$$

avec les facteurs K définis comme suit :

- $K_1 = f(x_t, t)$ est la pente à l'instant t ,
- $K_2 = f(x_t + K_1 dt/2, t+dt/2)$ est la pente entre les instants t et $t+dt$,

- $K_3 = f(x_t + K_2 dt/2, t + dt/2)$ est la pente actualisée entre t et $t + dt$,
- $K_4 = f(x_t + K_3 dt, t + dt)$ est la pente à l'instant $t + dt$.

La méthode RK4 permet d'obtenir un bon compromis entre robustesse, temps de calcul et erreur d'approximation.

3.4.3. Convergence et robustesse des calculs

L'intérêt des méthodes explicites est de garantir la convergence vers un état d'équilibre final à condition de choisir un pas de temps suffisamment petit afin d'éviter les instabilités numériques. Cependant, du fait de la non régularité des contacts entre grains, il a été nécessaire de régulariser le problème afin d'assurer la convergence vers un état d'équilibre stationnaire (soit une approche en « quasi-statique »). Pour ce, deux méthodes ont été appliquées. La première consiste à considérer que les grains évoluent dans un milieu faiblement visqueux, une force proportionnelle à la vitesse est ainsi ajoutée à chaque grain. La seconde utilise un amortissement « cinétique » du système (méthode de « relaxation dynamique »), consiste à annuler les vitesses lorsque l'on passe par un pic d'énergie cinétique c'est à dire au voisinage d'un minimum d'énergie potentielle, proche d'un état d'équilibre. Ces méthodes ont l'avantage de diminuer les oscillations dynamiques autour de la position d'équilibre finale.

Le pas de temps est déterminé en première approximation comme suit :

$$dt = 2\pi \sqrt{\frac{m}{k}}, \text{ (Cundall et Strack, 1979)}$$

où k est la rigidité de grain la plus faible et m la masse de grain la plus importante.

Ensuite cette valeur de dt et celle des paramètres de viscosité de contact (Tableau 3-3, page 51) ont été affinées empiriquement par essai-erreur pour assurer la convergence de toutes les simulations et leur répétitivité lors des variations apportées sur certains paramètres de calcul.

3.4.4. Algorithmique : les grandes étapes d'évolution du calcul

Introduction

Il a été développé au sein de l'équipe Conception en Structures du LMGC un code « ToyGL » (<http://www.lmgc.univ-montp2.fr/~averseng/JA/ToyGL.html>) qui permet d'étudier l'évolution dynamique de structures réticulées selon un modèle masse ressort. Les développements qui ont été effectués au cours des travaux présentés ici sont insérés dans ce

code. Il a la particularité d'utiliser l'interface graphique OpenGL, qui permet de visualiser le système au cours des calculs.

Organisation du calcul

Le code s'organise en deux parties (Figure 3-8) : évolution temporelle et interactivité. La première comprend le calcul mécanique, la prise en compte des conditions aux limites et des hypothèses d'évolution dépendant du temps. Il en résulte de nouvelles positions et vitesses pour chaque grain. La seconde partie permet la modification des paramètres de calcul (en cours de calcul, entre deux pas de temps), la visualisation (via une interface OpenGL), l'analyse (post-traitement des résultats du calcul) et la modification du système. Dans cette dernière partie « modification du système » est implémentée l'évolution structurale du système, c'est à dire l'ajout ou la suppression de grains ou d'éléments, en fonction des données issues des calculs mécaniques et en suivant les lois d'évolution qui régissent le modèle (cf. paragraphe 3.3). Nous allons présenter uniquement cet aspect, la partie liée au calcul mécanique ayant été exposée précédemment (cf. 3.4.2).

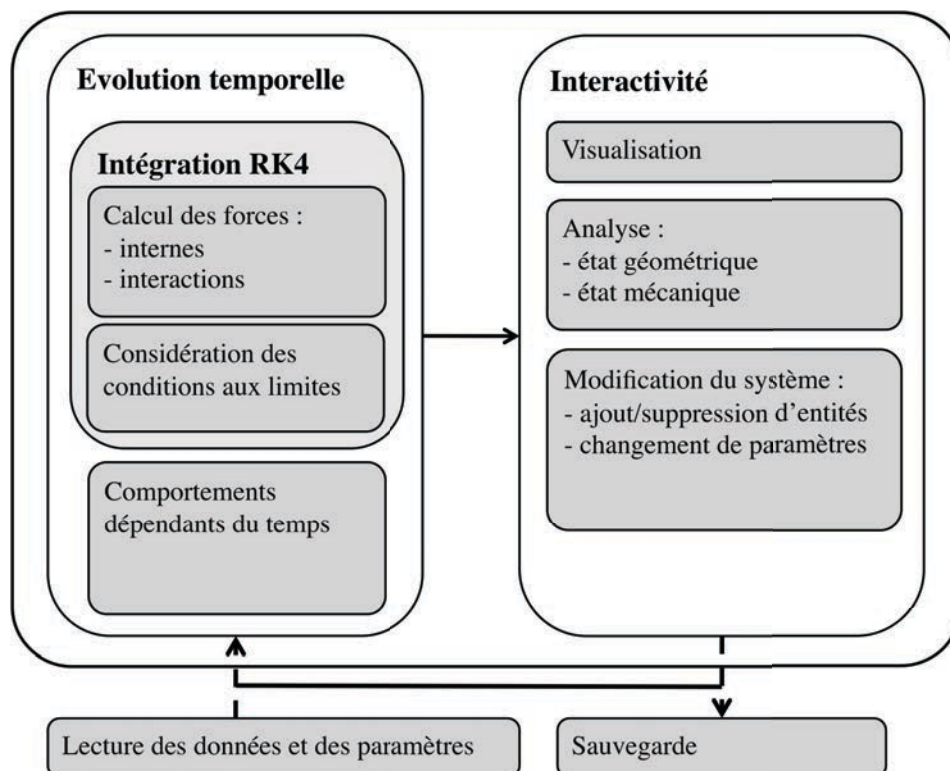


Figure 3-8 : Architecture globale du code.

La Figure 3-9 présente la partie du code spécifique au comportement du modèle de tissu. Au début de chaque simulation, le système est initialisé. Les cellules et le tissu sont

construits en fonction des données lues dans un fichier définissant la configuration initiale (positionnement des grains, caractéristiques des grains et des éléments, etc.) et les paramètres de la morphogenèse numérique : type de scénario (tissu formé par accrétion ou par prolifération), de division, etc. Ensuite, régulièrement au cours de la simulation, les membranes de chaque cellule sont mises à jour (allongement, diminution, suppression et ajout de câbles membranaires conformément aux règles d'évolution de la membrane définies au paragraphe 3.2.1), et ce, quel que soit le type de scénario. Puis, en fonction du choix de développement de tissu initialisé, l'algorithme de « tissu non prolifératif » ou « tissu prolifératif » s'exécute. Les cellules sont ainsi modifiées suivant les lois précédemment définies (type de division, d'apoptose, de croissance, etc.).

Le pas de temps choisi étant faible (0,005 s, cf. Tableau 3-3 ; pour plus de détails se reporter au paragraphe 3.4.3), le tissu évolue entre deux itérations. Par conséquent, il a été décidé de n'actualiser l'évolution du tissu que tous les 100 pas de temps. Ceci permet, en outre, d'établir un bon compromis entre le temps de simulation et une évolution du tissu la plus « bioréaliste » possible.

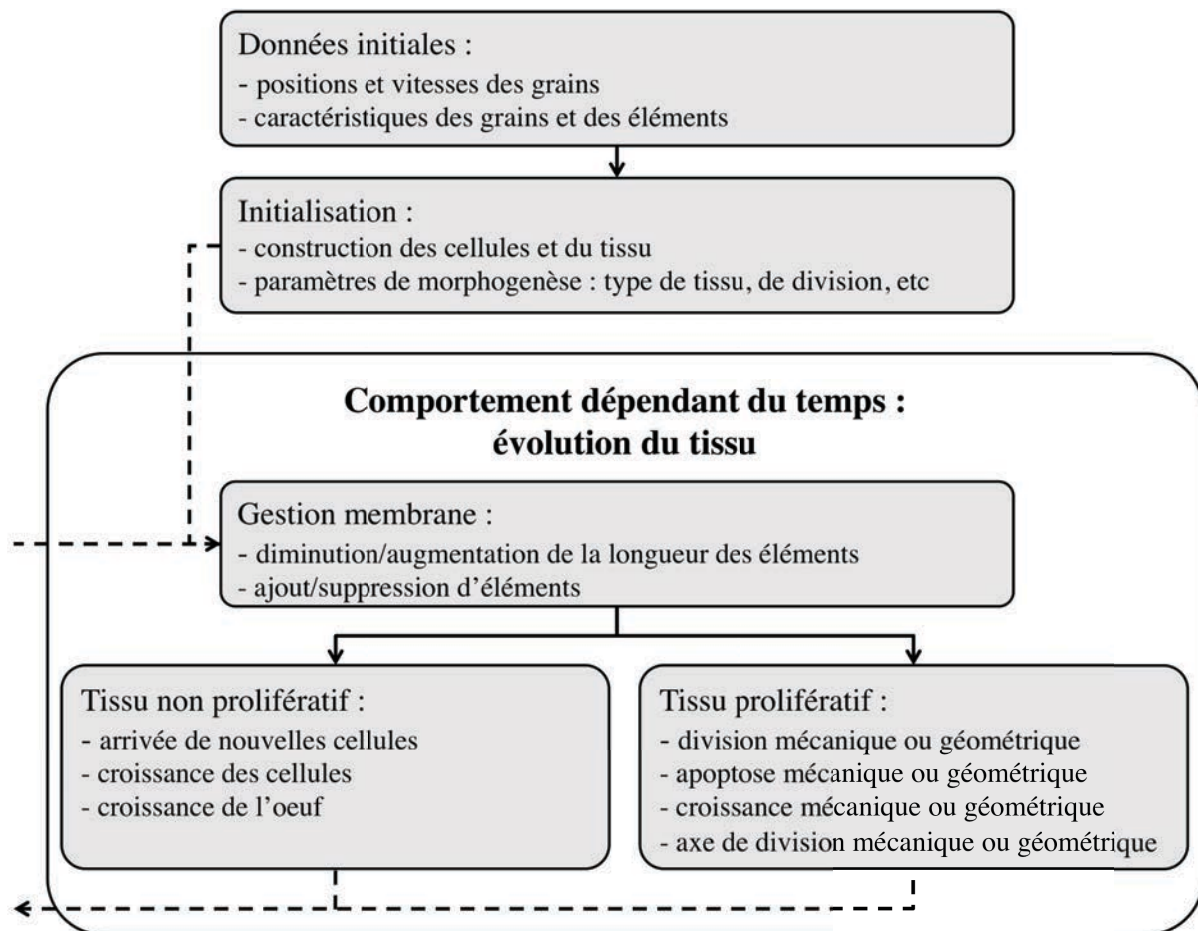


Figure 3-9 : Algorithme simplifié de l'évolution du tissu.

L'algorithme d'évolution du tissu permet donc le développement des deux types de tissu étudiés : non prolifératif (formé par accrétion) ou prolifératif (formé par division et apoptose).

Le scénario de développement par accrétion est automatique : il consiste à placer de nouvelles cellules sur la surface « substrat » en fonction de la vitesse d'accrétion (l'algorithme peut calculer jusqu'à 1000 possibilités de positionnement) et en parallèle faire croître les cellules et la surface en fonction de leur vitesse respective définie initialement.

Le scénario de développement par division est plus complexe. Au début de chaque simulation, les paramètres de morphogenèse sont initialisés. Ils définissent ainsi les options de développement du tissu : division « mécanique » ou « aléatoire », apoptose « mécanique » ou « aléatoire », croissance « mécanique » ou « linéaire » et la division selon un axe « mécanique » ou « géométrique ». Les étapes du développement sont les suivantes :

- détermination des cellules entrant en division,
- début de la division : création des éléments d'actine,
- évolution de la division : réduction des éléments d'actine,
- fin de la division : la cellule mère donne deux cellules filles,
- évolution des éléments « cadhérine »,
- détermination des cellules devant entrer en apoptose,
- évolution de l'apoptose : suppression de grain et/ou de cellule.

A chaque passage dans la boucle « évolution du tissu », toutes les opérations ne sont pas prises en compte pour chaque cellule et seules les fonctions adaptées s'exécutent. Par exemple, une cellule qui n'est pas adulte ne peut pas se diviser ou mourir et une cellule en division ne peut pas entrer en apoptose. Ces règles ont été introduites pour assurer le plus de « bioréalisme » possible au système et ont été validées par nos collègues biologistes.

Dans les deux cas, la simulation s'arrête quand la sphère est entièrement couverte de cellules. Le nombre de voisins de chaque cellule est alors déterminé et la configuration finale du système est enregistrée.

3.4.5. Organisation des données du calcul

Décomposition de domaines

Le code est écrit en langage C++ et autorise une programmation dite « orientée objet ». Ainsi chaque cellule est représentée par un objet, c'est à dire une entité regroupant des

informations comme les références aux grains internes et à la membrane (grains et éléments). Les données sont donc organisées pour optimiser le calcul des contacts notamment. Par exemple, pour le calcul mécanique, chaque grain d'une cellule ne voit que les grains de cette même cellule. Cette organisation des données en décomposition de domaines (chaque cellule étant un « domaine »), présente l'inconvénient de devoir mettre à jour les données dès que nécessaire. Mais il existe plusieurs avantages, dont les principaux sont la réduction du temps pour détecter les contacts entre grains internes et la possibilité de paralléliser les calculs.

De plus, chaque objet cellule comporte une liste de « cellules voisines », c'est à dire celles avec lesquelles elle est potentiellement en contact. Ainsi, la recherche d'interactions entre cellules voisines puis la création d'éléments « cadhérine » sont accélérées.

Parallélisation via OpenMP

La parallélisation des calculs consiste à traiter des données de manière simultanée en exploitant le potentiel des processeurs multi-cœurs afin de réduire le temps d'une simulation. Il existe plusieurs techniques pour paralléliser un code. Les méthodes invasives, telles que l'architecture CUDA développée par NVIDIA utilisent les processeurs graphiques et nécessitent de réécrire une grande partie du code. D'autres méthodes sont moins invasives, comme MPI (norme définissant une bibliothèque de fonctions) ou OpenMP (interface de programmation pour le calcul multi-cœurs) et sont plus simples à mettre en œuvre.

Pour paralléliser, nous avons choisi après plusieurs essais d'utiliser OpenMP pour sa simplicité, sa portabilité et son caractère peu invasif (il est possible d'ajouter une couche OpenMP à un code séquentiel préexistant). Cette interface de programmation est relativement aisée à mettre en œuvre. Dans le code développé pour la morphogenèse de tissus, seules les boucles de calculs mécaniques (détection des contacts entre grains internes d'une cellule, entre grains internes et éléments membranaires et entre les cellules) ont été parallélisées. En effet, tout ne peut être parallélisé dans un code : pour que cela soit bénéfique en terme de temps de calcul, chaque itération de la boucle parallélisée doit être significativement longue par rapport à l'ensemble de la boucle. Si ce n'est pas le cas, le transfert des informations peut prendre plus de temps que le calcul de l'itération lui-même et le gain de temps global devenir nul, voire négatif. Dans ce cas, la parallélisation est inefficace car elle ralentit la simulation.

3.5. Tableau de paramètres

3.5.1. Paramètres biologiques

L'évolution du modèle et les paramètres de calcul associés dépendent du scénario de morphogenèse choisi. Les valeurs de ces paramètres sont réunies dans le Tableau 3-2.

La formation d'un épithélium par accréation est pilotée par trois vitesses de développement (vitesses de croissance et d'arrivée des cellules, et vitesse de croissance de la sphère). L'ensemble de ces trois vitesses caractérise la vitesse de développement du tissu VDT. Si elle est faible, les cellules arrivent, croissent lentement et la sphère grandit doucement. Les cellules ont donc plus de temps pour s'organiser.

Dans le cas du scénario d'épithélium prolifératif, les paramètres de pilotage sont la vitesse de croissance de la cellule et le rapport entre le nombre de cellules en apoptose et celui de cellules en division (c'est à dire « taux apoptose/division »). La vitesse de mort cellulaire (vitesse de disparition des grains internes de la cellule en apoptose) est un paramètre qui est resté constant pour toutes les campagnes de calculs. Elle est plus rapide que la division ce qui est conforme aux données biologiques.

vitesse de croissance de la cellule : Vcrs_cellule	ajout d'un nœud tous les 100 pas de temps
vitesse d'accréation des cellules : Vaccréation	ajout de cellule tous les 50 pas de temps
vitesse de croissance de la sphère : Vcrs_sphère	augmentation de 5% de la surface de la sphère tous les 50 pas de temps
vitesse d'apoptose : Vapop	suppression de 5 grains tous les 100 pas de temps
renouvellement des câbles « cadhérines »	mise à jour tous les n_cad pas de temps : n_cad = 50
distance minimale pour créer un élément cadhérine	distance minimale D_cad entre deux grains : D_cad = 13 μ m
taux cellule en apoptose/division	0, 1/5 ou 1/3
taille d'une cellule	nombre de grain interne n_max = 46

Tableau 3-2 : Valeurs numériques des paramètres biologiques.

3.5.2. Paramètres mécaniques

Les contacts entre les grains ainsi qu'entre les grains et les éléments membranaires sont régis par une loi viscoélastique linéaire avec une rigidité en compression K et une viscosité C . Ces valeurs sont calculées en fonction des caractéristiques mécaniques respectives des deux solides en contact, comme suit. Soient deux solides de rigidité K_1 et K_2 et de viscosité C_1 et C_2 , alors :

$$K = \frac{K_1 K_2}{K_1 + K_2}$$

$$C = \frac{C_1 C_2}{C_1 + C_2}$$

Les éléments « actine » et « cadhérine » n'entrent pas en contact avec les grains, quels qu'ils soient.

Les propriétés mécaniques de chaque type de grains et d'éléments sont détaillées dans le tableau suivant (Tableau 3-3) :

grain interne	rayon : $r = 2.5, 2.8, 3.0, 3.3, 3.5 \mu\text{m}$ masse : $m = 0.003 \text{ Kg}$ rigidité de contact : $K = 10 \text{ (N/m)}$ viscosité de contact : $C = 0.35 \text{ (N/(m.s-1))}$
grain « membrane »	rayon : $r = 1.5 \mu\text{m}$ masse : $m = 0.0015 \text{ kg}$ rigidité de contact : $K = 13 \text{ (N/m)}$ viscosité de contact : $C = 0.5 \text{ (N/(m.s-1))}$
élément « membrane »	rayon : $r = 1.5 \mu\text{m}$ masse volumique : $m_{\text{vol}} = 0.01 \text{ (kg/m}^3\text{)}$ force de rappel de traction : $EA_{\text{trac}} = 8 \text{ (N)}$ force de rappel de compression : $EA_{\text{comp}} = 5 \text{ (N)}$ viscosité axiale : $C = 0.1 \text{ (N/(m.s-1))}$ rigidité de contact : $K = 10 \text{ (N/m)}$ effort de tension : $T_{\text{min}} = 0.4 \text{ N}$; $T_{\text{max}} = 0.8 \text{ N}$ longueur : $L_{\text{min_mb}} = 2 \mu\text{m}$; $L_{\text{max_mb}} = 5.5 \mu\text{m}$
élément « actine »	masse volumique : $m_{\text{vol}} = 0.1 \text{ (kg/m}^3\text{)}$ force de rappel de traction : $EA_{\text{trac}} = 8 \text{ (N)}$ force de rappel de compression : $EA_{\text{comp}} = 5 \text{ (N)}$ viscosité axiale : $C = 0.1 \text{ (N/(m.s-1))}$ longueur : $L_{\text{min_actine}} = 6 \mu\text{m}$
élément « cadhérine »	masse volumique : $m_{\text{vol}} = 0.001 \text{ (kg/m}^3\text{)}$ force de rappel de traction : $EA_{\text{trac}} = 5 \text{ (N)}$ force de rappel de compression : $EA_{\text{comp}} = 5 \text{ (N)}$ viscosité axiale : $C = 0.1 \text{ (N/(m.s-1))}$ longueur : $L_{\text{max_cad}} = 1.3 \mu\text{m}$
élément de « bord »	rayon : $r = 1.8 \text{ (}\mu\text{m)}$ rigidité de contact : $K_{\text{contact}} = 10 \text{ (N/m)}$
pas de temps	0.005 s (cf 3.4.3)

Tableau 3-3 : Valeurs des caractéristiques mécaniques des grains et éléments utilisées dans les simulations.

3.5.3. Paramètres numériques

Le choix de la taille des grains qui constituent le modèle de cellule a résulté d'un compromis entre le niveau de discrétisation et le temps de calcul pour réaliser un épithélium numérique. Pour une taille de grains plus faible, il faut plus de grains pour constituer une cellule de même taille. Le calcul est donc plus précis mais le temps de ce calcul est plus élevé (il augmente selon le carré du nombre de grains). Afin d'effectuer l'ensemble des calculs prévus et de permettre un traitement biostatistique de ces données dans un délai raisonnable, il nous a paru nécessaire de limiter le temps de calcul à dix heures maximum pour les plus longs (c'est à dire le scénario prolifératif avec un taux apoptose/division égale à 1/3), ce qui a permis de déduire le niveau adapté de discrétisation, c'est à dire la taille des grains.

3.6. Les cas d'études

3.6.1. Développement d'un épithélium non prolifératif

Toutes les simulations de morphogenèse d'épithéliums non-prolifératifs formés par accréition ont été réalisées sur une surface sphérique, rappelant le modèle de *Ciona intestinalis*. Plusieurs vitesses de développement de tissu (voir le paragraphe 3.3.3) ont été utilisées pour ces simulations. Par ailleurs, une première campagne de simulations a été réalisée avec des éléments « cadhérine » entre les cellules et avec une vitesse de croissance de cellule fonction de la vitesse de croissance de l'œuf. Deux vitesses de développement de tissu ont été testées pour cette configuration. Une deuxième campagne de simulations, avec des vitesses de croissance indépendantes et sans cadhérine, a permis de tester trois VDT différentes.

3.6.2. Développement d'un épithélium prolifératif

En ce qui concerne la morphogenèse d'épithéliums prolifératifs, de nombreuses options de calcul ont été mises en place mais toutes les combinaisons n'ont pas été testées. Tous les cas étudiés apparaissent dans le tableau suivant (Tableau 3-4). Les cellules qui vont être divisées sont déterminées aléatoirement (division « aléatoire ») ou suivant un critère mécanique (division « mécanique ») (cf 3.3.4). De même, le critère pour déterminer la cellule qui va entrer en apoptose est aléatoire (apoptose « aléatoire ») ou mécanique (apoptose « mécanique ») (cf 3.3.4). Le nombre d'apoptose est défini par le taux « apoptose /division » (sans apoptose, 1 cellule en apoptose pour 5 divisées, 1 pour 3). Les épithéliums se développent sur une surface sphérique ou sur une surface plane avec des conditions de bord

de forme carrée (« carrée ») ou circulaire de taille différente (« cercle de petit rayon » ou « cercle de grand rayon ») ou sans condition de bord (« sans bord »). Le cercle de petit rayon a la même aire que la sphère (de diamètre 160µm) et le cercle de grand rayon a une aire égale à une fois et demie l'aire de la sphère.

Surface	condition de bord	croissance	axe de division	critère d'arrêt	taux apoptose/ division	mode de division-apoptose			
						aléatoire- aléatoire	mécanique- mécanique	aléatoire- mécanique	mécanique- aléatoire
surface sphérique		linéaire	géométrique	4800 noeuds	0	X			
				4800 noeuds	1/3	X			
				4800 noeuds	1/5	X			
		linéaire	géométrique	Scell > 0.99*S	1/3	X	X		
				Scell > 0.99*S	1/5	X	X	X	X
				Scell > 0.99*S	1/3	X	X		
		mécanique	géométrique	Scell > 0.99*S	1/5	X	X		
				Scell > 0.99*S	1/3	X	X		
		linéaire	mécanique	Scell > 0.99*S	1/3	X	X		
				Scell > 0.99*S	1/5	X	X		
surface plane	cercle de petit rayon	linéaire	géométrique	Scell > 0.99*S	1/3	X	X		
				Scell > 0.99*S	1/5	X	X		
	cercle de grand rayon	linéaire	géométrique	Scell > 0.99*S	1/3	X	X		
				Scell > 0.99*S	1/5	X	X		
	carrée	linéaire	géométrique	Scell > 0.99*S	1/3	X	X		
				Scell > 0.99*S	1/5	X	X		
	sans bord	linéaire	géométrique	t>400 s	1/5	X	X		
				t>600 s	1/5	X	X		

Tableau 3-4 : Cas d'études des épithéliums prolifératifs.

Dans le Tableau 3-4, on voit que plusieurs critères d'arrêt du calcul ont été utilisés. Tous correspondent à une couverture complète de la surface. Dans un premier temps, c'est le nombre de grains qui a été limité. Ensuite, afin d'être plus précis, un nouveau critère a été élaboré. Dans celui-ci, la somme des surfaces de chaque cellule est calculée et est comparée à la surface finale (celle de la sphère ou celle délimitée par les conditions de bord). La simulation est arrêtée lorsque la somme des surfaces des cellules est supérieure à 99% de la surface finale.

En ce qui concerne les simulations sans condition de bord, les calculs sont arrêtés après un certain temps (400 à 600 secondes) qui correspond à environ 60 à 90 cellules. Nous reviendrons sur ces nombres de cellules par la suite (cf. paragraphe 3.7.3).

3.7. Les comptages de la forme des cellules

3.7.1. Introduction

La caractérisation de la morphogénèse retenue ici est liée à la détermination de la topologie du tissu, c'est à dire par l'identification de la forme des cellules. L'hypothèse est faite que le nombre de côtés du polygone formé par une cellule correspond au nombre de ses voisins immédiats. Ainsi, une cellule de forme pentagonale, hexagonale ou heptagonale sera

entourée respectivement de cinq, six ou sept voisins. La limite de cette définition apparaît toutefois lorsqu'il y a des vertex (Figure 3-10).

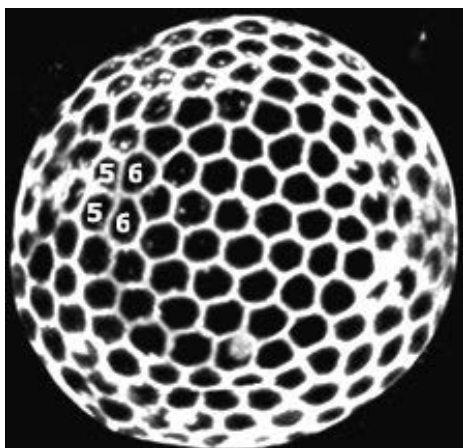


Figure 3-10 : Œuf mature d'ascidie (*Styela clava*) montrant un exemple de vertex à quatre dans une structure où la presque totalité des vertex sont à trois. Le nombre au centre des cellules formant ce vertex correspond au nombre de voisins pris en compte.

Dans le cas d'un vertex à quatre par exemple (ici le vertex formé par les cellules numérotées dans la Figure 3-10), la cellule voisine mais ne formant qu'un contact « ponctuel » à travers ce vertex, ne sera pas comptabilisée.

3.7.2. Le comptage expérimental

Le comptage expérimental consiste à dénombrer le nombre de voisins de chaque cellule d'un tissu, et ce, à partir d'images d'épithéliums. Bien qu'il existe des logiciels permettant de réaliser cette tâche, les comptages des voisins de chaque cellule ont été faits à la main, à partir d'images réalisées au microscope confocal, par Karim Azzag de l'ISEM. Dans le cas particulier des épithéliums se développant sur une sphère, une reconstruction 3D de la demi sphère (Figure 3-11) est effectuée puis un cercle représentant 80% de la surface est tracé. Seules les cellules à l'intérieur de celui-ci sont prises en compte. Cette démarche permet d'éviter les erreurs liées au comptage des cellules dont les voisines ne peuvent être distinguées.

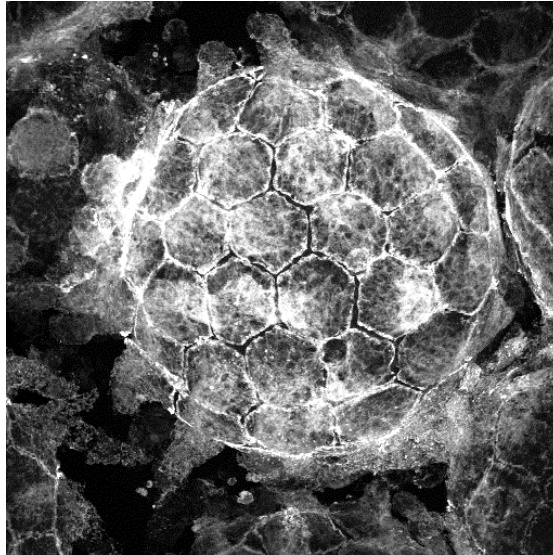


Figure 3-11 : Reconstruction 3D d'un œuf de *Ciona intestinalis* mature. Ce type d'image sert de support aux biologistes pour le comptage des cellules folliculaires.

3.7.3. Le comptage numérique

Sans condition aux limites

Dans le cas de l'épithélium numérique formé sur une sphère, et à la différence des comptages expérimentaux, l'ensemble des cellules est pris en compte (Figure 3-12). Une cellule est considérée comme voisine si l'un de ses éléments membranaires est en contact avec un grain membrane de la cellule étudiée.

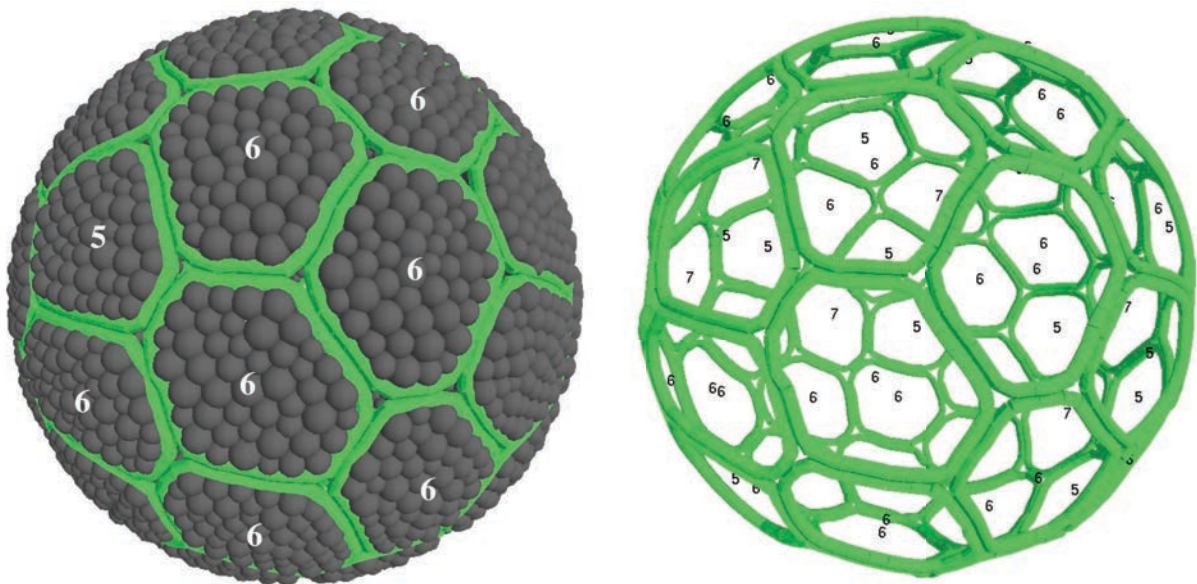


Figure 3-12 : Deux représentations d'un même tissu avec et sans grains internes. Au centre de chaque cellule, est affiché le nombre de ses voisins.

Pour les épithéliums formés sur une surface plane sans conditions de bord, les cellules dont plus de deux grains membranaires consécutifs ne sont pas proches d'éléments membranaires d'une cellule voisine sont exclues du comptage (Figure 3-13). Pour un total de 60 cellules, seules une quarantaine sont ainsi considérées dans le calcul statistique. Pour pouvoir prendre en compte environ 60 cellules dans ce calcul, il est nécessaire d'atteindre un nombre global de l'ordre de 90. Ce procédé sert à identifier les cellules se trouvant sur les bords de l'agrégat, n'étant donc pas complètement entourées par d'autres cellules.

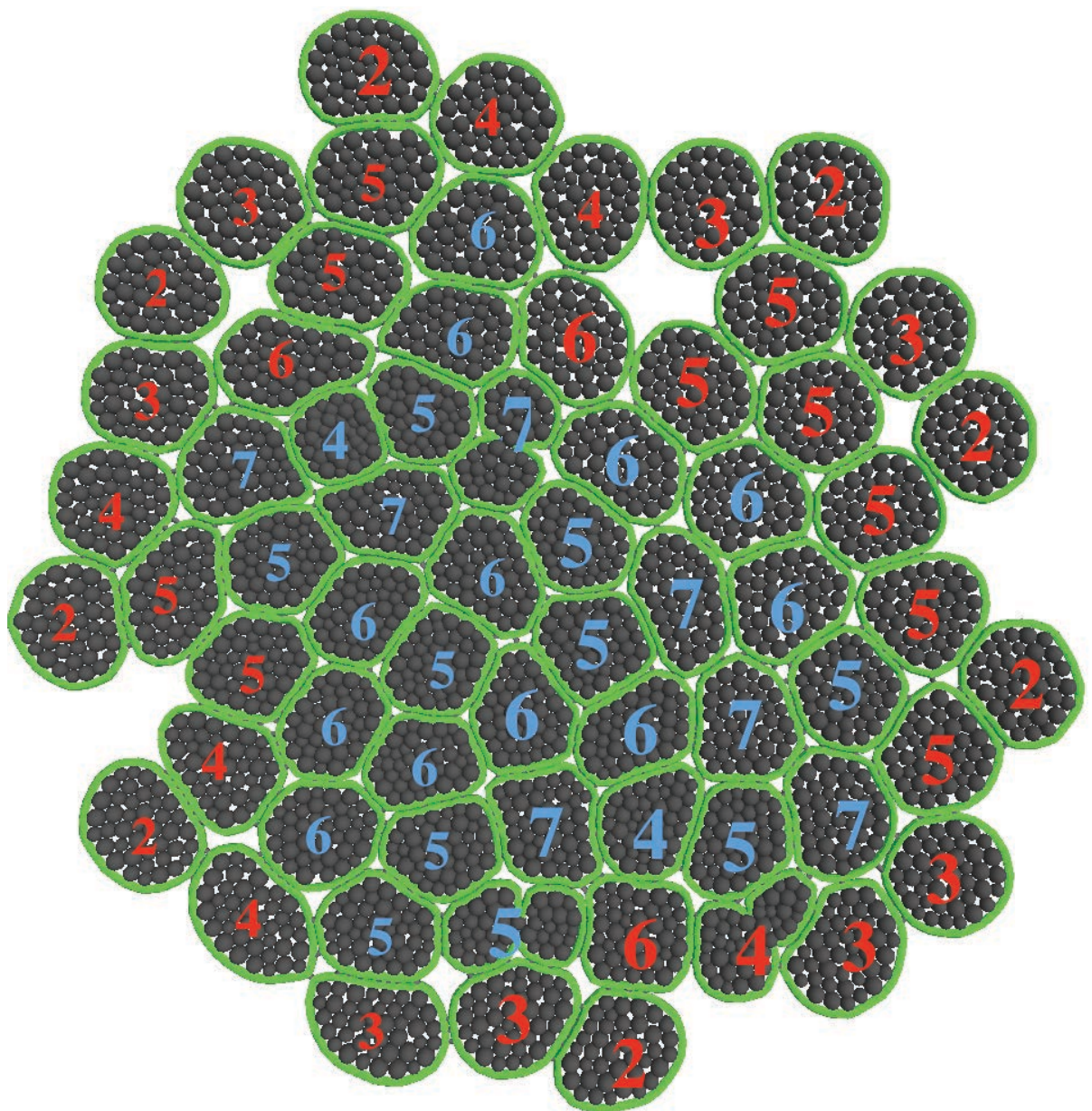


Figure 3-13 : Épithélium formé sans condition de bord. En bleu les cellules prises en compte et en rouge celles exclues du comptage.

Avec conditions aux limites

Pour les épithéliums développés dans des domaines fermés (c'est à dire dans des boîtes rondes ou carrées), les cellules dont au moins un des grains membranaires est en contact avec un bord sont également exclues du comptage.

3.8. Analyse biostatistique

L'analyse statistique est basée sur la notion d'homéostasie, c'est à dire la capacité d'un système à conserver son équilibre. Afin d'améliorer le traitement statistique des données issues des modèles numériques et biologiques, François Rousset, directeur de recherche à l'Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier (ISEM), a développé une nouvelle méthode d'analyse appelée homéostasie tissulaire. Elle permet d'évaluer la sur-dispersion intra et inter individus et de comparer la distribution polygonale des cellules entre différents modèles, qu'ils soient biologiques ou numériques. En outre, elle tient compte de la dépendance entre les formes des cellules dans un même tissu.

Si la forme de chaque cellule est considérée statistiquement comme un tirage indépendant alors il est possible d'utiliser la batterie standard de tests et les modèles linéaires généralisés (GLM). Le modèle avec une erreur distribuée selon une loi multinomiale est classiquement utilisé pour les données de comptage. Ce modèle peut aussi être écrit comme un GLM avec une erreur distribuée comme une loi de Poisson. Cependant, étant donné la dépendance des formes des cellules entre elles au sein d'un tissu, il faut utiliser un GLM quasi-poisson (Venables et Ripley, 2002) pour réaliser les études statistiques des données numériques et biologiques et ainsi pouvoir les comparer.

D'un point de vue statistique, les tissus formés selon un même processus (c'est à dire par accréation ou par division avec ou sans apoptose) sont appelés *réplicats*. Pour un individu, la sur-dispersion, notée d , est la variance de la fréquence d'une forme de cellule entre réplicats ramenée à la valeur attendue dans un modèle multinomial. Elle mesure la déviation par rapport à une forme de cellule complètement indépendante de la forme des autres cellules.

La valeur de l'homéostasie h est $h = 1 - d$. Elle est déterminée pour un ensemble de tissus formés par un même processus. Cette valeur varie entre -1 et 1 et permet d'évaluer la capacité d'un processus de formation de tissus à maintenir une régularité de topologie cellulaire. Si $h = 1$, il n'y a pas de variance entre les tissus de l'échantillon : la probabilité de trouver deux formes de cellule identiques entre deux individus est plus élevée que la probabilité de trouver deux formes de cellule identiques au sein d'un même individu. Le

processus de formation produit des tissus tous identiques. Si $h = -1$, la variance entre individus et entre les formes de cellule d'un individu est maximum. La probabilité de trouver deux cellules d'une même forme entre deux individus est moins élevée que la probabilité de trouver deux cellules identiques dans un même tissu. L'organisation épithéliale est instable et peu reproductible.

4. Résultats expérimentaux et numériques

Dans cette partie, sont présentés les résultats des distributions polygonales des épithéliums étudiés expérimentalement et d'un point de vue numérique, la discussion de ces données étant exposée dans la partie suivante. Pour chaque cas, les résultats issus des études expérimentales et numériques donnent la distribution du nombre de voisins des cellules. Les valeurs d'homéostasie topologique ne sont présentées que pour les résultats expérimentaux et les simulations correspondantes afin de pouvoir les comparer.

Trois types d'épithéliums monocouches ayant comme différence leur mode de formation et/ou leur géométrie sont étudiés expérimentalement. Les simulations d'une part reprennent ces caractéristiques de développement et de géométrie et d'autre part vont plus loin en développant d'autres types de tissu à partir de diverses hypothèses : mécaniques, de géométrie, de condition aux limites.

4.1. Expérimentation sur des épithéliums folliculaires de *Ciona intestinalis*

4.1.1. Morphogenèse du système folliculaire

La topologie d'un tissu est une façon de caractériser sa morphogenèse. Or pour comprendre cette topologie, il est nécessaire d'étudier le mode de formation de l'épithélium. La morphogenèse des épithéliums folliculaires qui recouvrent les ovocytes d'ascidies est peu décrite dans la littérature. Nos partenaires biologistes ont donc disséqué des gonades de *Ciona intestinalis* afin d'observer les œufs à différents stades de maturation et de mieux comprendre la morphogenèse des cellules folliculaires. Il existe deux hypothèses expliquant le recouvrement des ovocytes d'ascidies par les cellules folliculaires. La première suppose que l'ovocyte est couvert de cellules folliculaires primaires qui se divisent ensuite pour former deux couches cellulaires : celle de cellules de la testa sur l'œuf et celle de cellules folliculaires au dessus (Sugino et *al.*, 1987). La seconde hypothèse suggère que l'ovocyte est d'abord recouvert par les cellules de la testa qui se divisent, puis par les cellules folliculaires provenant du milieu extérieur (Mancuso, 1965). Les travaux présentés ici montrent que la surface de l'œuf est progressivement recouverte de cellules folliculaires au cours de l'ovogénèse (Figure 4-1).

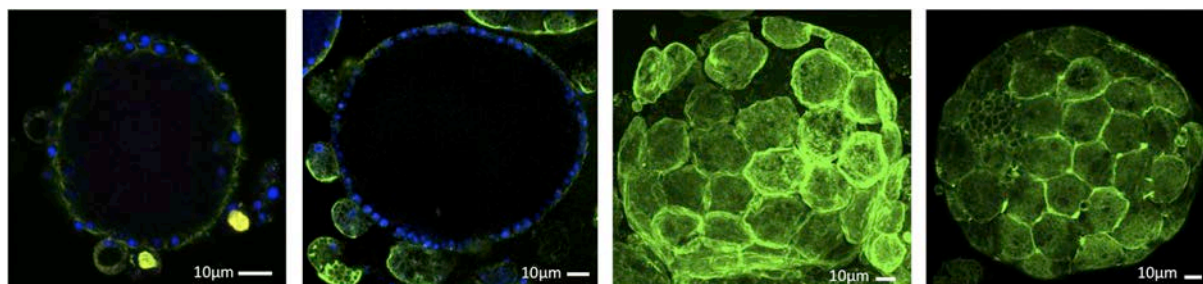


Figure 4-1 : Séquence d'images prises en microscopie fluorescente montrant des ovocytes de *Ciona intestinalis* à différents stades de maturation. Les filaments d'actine des cellules folliculaires sont révélés par marquage avec de la phalloïdine-FITC (vert) et les noyaux des cellules de la testa sont mis en évidence par le DAPI (bleu).

De plus, des expériences de double marquage spécifique de la phase S et de l'apoptose ont permis de mieux comprendre le mode de recouvrement de l'ovocyte par les cellules folliculaires. Les plus petits œufs (de 30 à 80 µm de diamètre) sur lesquels ont été réalisées ces expériences sont très peu recouverts par ces cellules. Des observations analogues ont été faites sur des œufs mesurant jusqu'à 140 µm de diamètre (non complètement couverts) alors qu'en fin de maturation, les cellules folliculaires occupent la totalité de la surface de l'ovocyte qui peut mesurer jusqu'à 190 µm. Au cours de toutes les expérimentations de dissection, aucune image de division cellulaire et d'apoptose n'a été observée. Ces résultats confirment donc les travaux sur l'apoptose des cellules folliculaires de *Ciona intestinalis* (Martinand-Mari et *al.*, 2009) et sont en accord avec ceux de Mancuso (Mancuso, 1965). Le système folliculaire de l'ascidie *Ciona intestinalis* est donc considéré comme constitué d'un épithélium monocouche à base polygonale non prolifératif, formé par un processus d'accrétion au cours de l'ovogenèse.

4.1.2. Fréquence des polygones et homéostasie

Les distributions des polygones de plusieurs épithéliums de *Ciona intestinalis* ont été déterminées pour étudier leur topologie. Les fréquences sont proches de celles obtenues théoriquement, d'après le théorème de Descartes-Euler (ou relation d'Euler) pour un objet sphérique composé de 60 polygones (48 cellules hexagonales et 12 cellules pentagonales). Si on considère un polyèdre où s est le nombre de sommets, a le nombre d'arêtes et f le nombre de faces alors, d'après ce théorème, $s - a + f = 2$. Si la sphère est recouverte uniquement d'hexagones, la relation n'est pas satisfaite. Il faut au minimum 12 pentagones pour qu'elle le soit. Les comptages faits à partir d'œufs de *Ciona intestinalis* ont donné des résultats présentant un ordre topologique dont les proportions sont 63% de cellules hexagonales, 29%

de cellules pentagonales et 7% de cellules heptagonales. Ces résultats sont présentés sous forme d'un histogramme à la fin de cette partie (Figure 4-19).

Les épithéliums qui couvrent l'ovocyte de *Ciona intestinalis* présentent une distribution régulière de polygones. Pour ces tissus non prolifératifs formés par accréction, le calcul de la valeur de l'homéostasie effectué à partir d'autres comptages de la distribution de cellules polygonales sur des œufs de *Ciona intestinalis*, a donné une valeur de 0.73 (Azzag, 2011 ; Azzag et al., 2012). Cette valeur d'homéostasie proche de 1 montre que, pour ces épithéliums non prolifératifs, les formes cellulaires sont interdépendantes. La faible variance entre les fréquences de polygones confirme que l'organisation épithéliale est stable et reproductible entre ovocytes.

Ces travaux ont permis de montrer que les épithéliums folliculaires d'ascidies se forment par accréction et qu'ils sont non prolifératifs. L'organisation de ces tissus en monocouches cellulaires est régulière et les distributions de polygones d'un individu à l'autre sont reproductibles.

4.2. Expérimentation sur des épithéliums prolifératifs de cellules COS

4.2.1. La morphogenèse des cellules COS

Les cellules COS sont classiquement utilisées en culture cellulaire mais rarement dans le cas d'un épithélium sphérique monocouche (Figure 4-2).

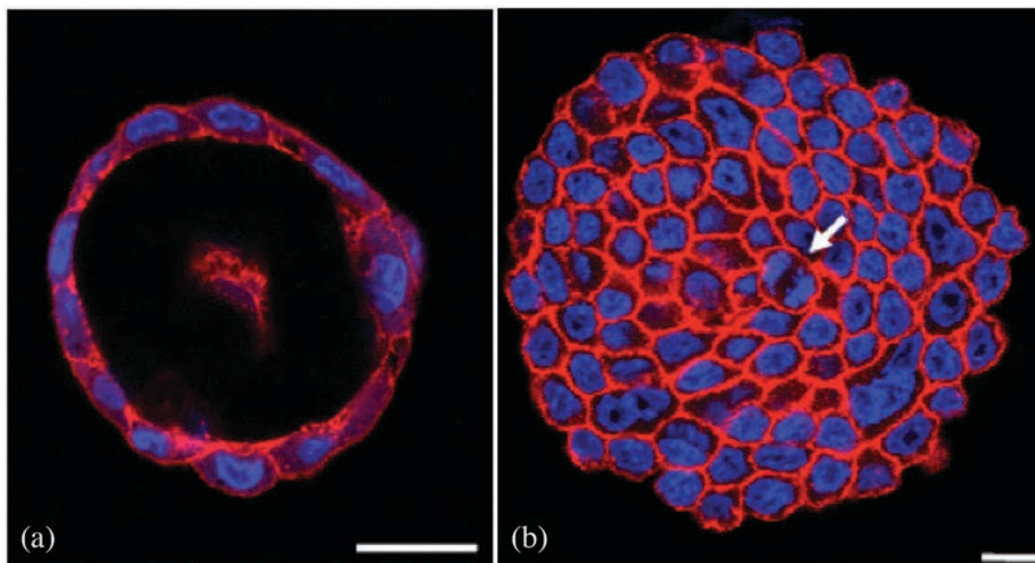


Figure 4-2 : Epithélium monocouche sphérique de cellules COS. Vue en coupe (a) et d'ensemble (b). Sur l'image (b) la flèche montre une division en cours.

La formation sphérique de cet épithélium monocouche est particulièrement intéressante dans le cadre de l'étude de l'influence de la géométrie sur la topologie des tissus prolifératifs. Des épithéliums constitués à partir de la même lignée cellulaire et formés sur une sphère ou sur un plan vont pouvoir être comparés.

Différentes expériences ont été réalisées pour mieux comprendre la cinétique de mise en place de ce type de structure. Lors de la culture de cellules COS en suspension (sur substrat hydrophobe), elles s'associent et ensemble prennent une forme sphérique. Certaines d'entre elles se différencient et servent de support à d'autres cellules en suspension. Initialement, la formation de l'épithélium est caractérisée par l'accrétion de cellules. Ensuite de nouvelles cellules viennent encore se fixer par accrétion tandis que celles déjà présentes se divisent, et ce, jusqu'au recouvrement complet de la sphère. Ensuite l'organoïde continue de croître : son rayon augmente et les cellules se divisent à sa surface. Sa formation fait intervenir l'accrétion de cellules et leur division. L'importance de ces deux processus dépend de la concentration de cellules en suspension dans le milieu de culture (plus la concentration est forte, plus le processus d'accrétion est important). Les expériences menées ont permis de constater que la sphère totalement recouverte de cellules continue de croître grâce aux divisions cellulaires (Figure 4-2 (b)). Le processus d'apoptose est aussi présent dans la formation de cet épithélium. Les organoïdes formés par les cellules COS ressemblent donc à des ascinis présentant à leur surface un épithélium monocouche qui se forme par accrétion, puis prolifération et apoptose.

4.2.2. Fréquence des polygones et homéostasie

Des comptages ont été effectués sur des épithéliums de cellules COS cultivées en suspension et sur des substrats adhérents. Les distributions des polygones sont proches pour les deux conditions de cultures : 4% de tétragones, 30% de pentagones, 40% d'hexagones, 20% d'heptagones, 4% d'octogones (Figure 4-19) et quelques cellules à 9 et 10 côtés. La géométrie sphérique ou plane de la monocouche cellulaire n'influencerait donc pas la topologie du tissu. La distribution de formes cellulaires observée est celle qui est retrouvée dans la majorité des épithéliums prolifératifs du monde vivant (cf. Figure 2-6 issue de Gibson et Gibson, 2009).

La valeur de l'homéostasie pour ces épithéliums est de 0.07 pour les cellules adhérentes et de 0.16 pour les cellules en suspension. Ces valeurs sont proches. La géométrie influence donc peu la topologie épithéliale. Ce résultat laisse donc la possibilité de pouvoir comparer

des épithéliums développés sur une sphère et sur un plan en excluant un effet possible de la géométrie. Par ailleurs, le fait que les valeurs d'homéostasie soient proches de 0 signifie que les formes des cellules sont indépendantes, la structure de l'épithélium n'est pas stable et sa reproductibilité est faible. Ces résultats traduiraient le rôle désorganisateur de la division cellulaire au sein d'un épithélium.

4.3. Expérimentation sur des épithéliums columnnaires de disques d'aile

4.3.1. La morphogenèse des épithéliums de disques d'aile

Les disques imaginaux de *Drosophila melanogaster*, du fait de leur croissance rapide, se prêtent bien à l'étude de la morphogenèse épithéliale. Les techniques développées par nos partenaires biologistes permettent notamment d'inhiber l'apoptose (Figure 4-3) au sein de ces tissus et ainsi d'étudier son influence sur la topologie épithéliale.

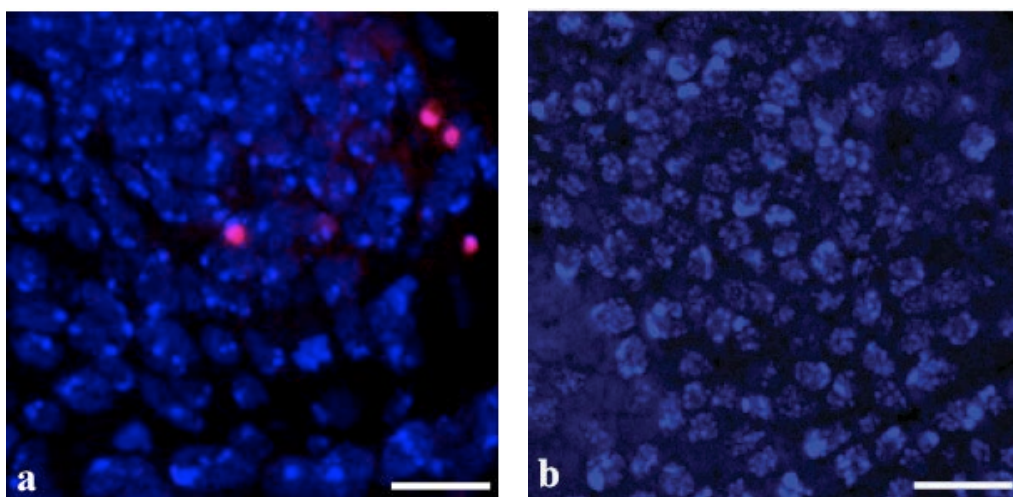


Figure 4-3 : Image au microscope de cellules columnnaires (en bleu) de deux disques d'aile de mouche. Disques avec marquage de l'apoptose (en rouge) : pour un disque d'aile de mouche sauvage (a) et pour un disque pour lequel l'apoptose est inhibée (b). Barres d'échelles : 10 μ m.

4.3.2. Fréquence des polygones et homéostasie

Les épithéliums columnnaires sont prélevés dans la poche de l'aile, plus précisément dans la lame de l'aile sur des disques d'aile au 3^{ème} stade larvaire. Les comptages sont effectués à partir d'images du pôle apical et permettent de déterminer la distribution des formes des cellules columnnaires. Le pôle apical est idéal pour l'analyse topologique parce que les cellules en division remontent vers celui-ci et que l'épithélium est plus organisé par rapport au pôle basal où les liaisons intercellulaires sont absentes (Figure 4-4).

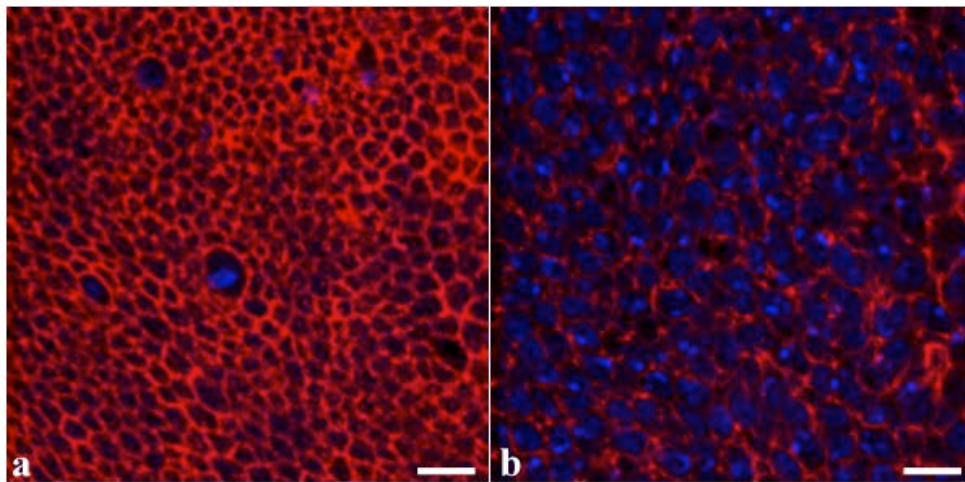


Figure 4-4 : Image réalisée au microscope confocal montrant les pôles apical (a) et basal (b) d'un épithélium columnellaire. Barres d'échelles : 10 μ m.

Les résultats obtenus montrent que ces épithéliums ont des distributions de polygones sensiblement identiques, à savoir quelques tétragones, 22% de pentagones, 50% d'hexagones, 22% d'heptagones et quelques cellules à 8, 9 et 10 côtés.

Les valeurs de l'homéostasie pour les épithéliums formés avec et sans apoptose sont respectivement de + 0.34 et – 0.19. La variance entre les formes de cellules dans le cas des épithéliums pour lesquels l'apoptose est inhibée est plus importante que pour ceux formés avec de l'apoptose. L'inhibition de l'apoptose dans le disque d'aile n'influence toutefois ni la taille finale du disque, ni la distribution moyenne de la forme polygonale des cellules.

Les valeurs d'homéostasie montrent ainsi que l'apoptose stabilise la morphogenèse épithéliale sans modifier la topologie cellulaire c'est à dire la distribution des polygones.

4.4. Simulation d'épithéliums non prolifératifs

4.4.1. La morphogenèse d'épithéliums non prolifératifs

La simulation de formation d'épithéliums non prolifératifs par accréation vise à reproduire les résultats obtenus à partir de systèmes folliculaires d'œufs d'ascidies. Rappelons la morphogenèse du tissu numérique : dix cellules contenant trois grains internes sont positionnées aléatoirement sur la sphère, de nouvelles cellules arrivent s'il est possible de les placer également aléatoirement entre celles déjà présentes. La sphère ainsi que les cellules existantes et arrivantes croissent. Les cellules forment à la fin de la simulation un tissu confluent recouvrant la totalité de la sphère (Figure 4-5). La vitesse de développement du

tissu (VDT) est définie par l'ensemble de trois vitesses : la vitesse d'arrivée des nouvelles cellules, la vitesse de croissance des cellules et la vitesse de croissance de l'œuf.

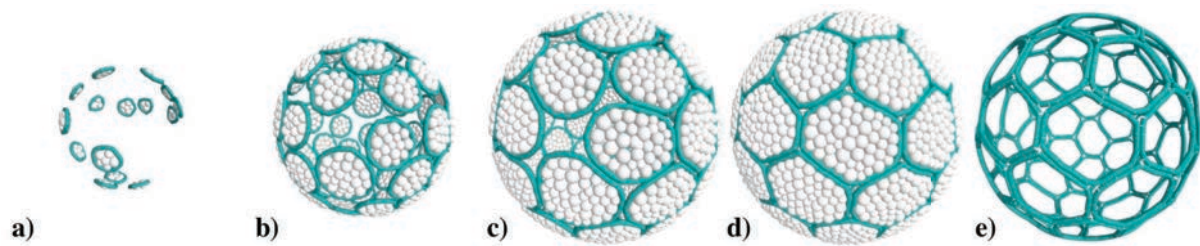


Figure 4-5 : Étapes de développement d'un épithélium formé par accrétion de (a) à (d). La dernière structure (e) est équivalente à l'avant dernière (d), sans représentation des grains internes.

Deux campagnes de calculs ont été réalisées : une avec des éléments « cadhérine » qui lient les cellules et l'autre sans lien. La particularité de la première série de simulations est que la vitesse de croissance des cellules est proportionnelle à celle de la sphère. Pour la seconde série, ces deux vitesses sont indépendantes. Ces deux modèles reposent ainsi sur des hypothèses proches mais non similaires.

Les séries de calculs sont effectuées à partir de configurations initiales différentes (positionnement des cellules) et les cellules qui arrivent sont placées aléatoirement. Ceci confère un aspect non déterministe aux simulations. Chaque calcul fournit donc un résultat original.

4.4.2. Prise en compte des cadhérines

La première campagne de simulations de développement d'épithéliums non prolifératifs avec des éléments « cadhérine » a été réalisée en considérant deux vitesses de développement de tissu (VDT) : l'une lente et l'autre rapide (calibrée par rapport aux résultats expérimentaux). Les résultats obtenus (Tableau 4-1) ont été déterminés à partir de 8 (respectivement 9) simulations pour une VDT lente (respectivement rapide). Le nombre final moyen de cellules par tissu est d'environ 59.

VDT	tétragone		pentagone		hexagone		heptagone		octogone		Nombre de simulations	Nombre moyen de cellules
	%	ET	%	ET	%	ET	%	ET	%	ET		
lent	0,0%	0,0	27,4%	2,8	68,8%	4,7	3,8%	2,7	0,0%	0,0	9	58,0
rapide	0,2%	0,6	29,4%	3,2	62,6%	5,6	7,8%	2,4	0,0%	0,0	8	59,4

Tableau 4-1 : Résultats de la moyenne du nombre de voisins par cellule (%) et de l'écart-type (ET) pour deux séries (lente et rapide) de simulations de formation de tissus par accrétion avec prise en compte des cadhérines.

Les distributions de polygones de ces épithéliums sont assez proches entre elles ainsi que de celles observées pour les épithéliums folliculaires de *Ciona intestinalis* (cf. 4.1.2). On note toutefois une nuance. La distribution de l'épithélium réalisé avec une VDT rapide est la plus proche de celle observée expérimentalement alors que, pour celle issue des résultats de simulations réalisées avec une VDT lente, le nombre d'hexagones est plus important et le nombre de cellules de forme non hexagonale est plus faible.

Les deux valeurs d'homéostasie calculées pour ces résultats sont relativement comparables. Pour la VDT lente, $h=0.72$ et pour la VDT rapide, $h=0.64$. Ces valeurs élevées de h (proches de la valeur expérimentale qui est de 0.73, cf. paragraphe 4.1.2) confirment la stabilité de la topologie épithéliale, à l'image de celle observée pour *Ciona intestinalis*. Enfin, la variation de la VDT paraît peu influencer la topologie épithéliale même si l'on peut trouver une éventuelle tendance à voir cette stabilité de la topologie diminuer avec l'augmentation de la VDT. Ceci reste toutefois à confirmer par des études complémentaires avec d'autres VDT.

4.4.3. Sans prise en compte des cadhérines

Pour cette seconde campagne, à la différence de la première, les tissus se forment sans élément « cadhérine » et les vitesses de croissance des cellules et de l'œuf sont indépendantes. Une VDT de « référence », se rapprochant des résultats expérimentaux (effectués à partir de *Ciona intestinalis*), a été déterminée puis a été multipliée par 2 et respectivement divisée par 2 pour donner deux nouvelles VDT : une « rapide » et une « lente » tel que :

$$VDT_{référence} = 2VDT_{lente} = \frac{VDT_{rapide}}{2}$$

Pour chaque VDT, une dizaine de calculs ont été effectués aboutissant à des tissus d'environ 59 cellules. Les résultats issus de ces simulations sont présentés dans le Tableau 4-2.

VDT	tétragone		pentagone		hexagone		heptagone		octogone		Nombre de simulations	Nombre moyen de cellules
	%	ET	%	ET	%	ET	%	ET	%	ET		
lente	0,0%	0,0	25,5%	2,5	70,0%	4,9	4,5%	2,5	0,0%	0,0	10	58,0
référence	0,2%	0,5	31,7%	4,7	62,2%	6,1	6,0%	2,5	0,0%	0,0	11	58,8
rapide	1,0%	1,3	35,6%	5,8	56,6%	6,6	6,6%	3,2	0,1%	0,5	11	60,7

Tableau 4-2 : Résultats des distributions des formes polygones des cellules issues de simulations pour trois VDT différentes, sans prise en compte des cadhérines.

La distribution de polygones de l'épithélium obtenu avec la VDT de référence est encadrée par les deux autres. Plus la VDT est lente, plus le nombre d'hexagones semble

augmenter alors que le nombre de pentagones et d'heptagones paraît en diminution, les autres formes polygonales restant stables.

4.4.4. Synthèse

La simulation de la morphogenèse d'épithéliums formés par accrétion avec ce modèle a permis de montrer la possible influence du paramètre de VDT et d'évaluer une tendance de sa variation sur topologie épithéliale. Plus la VDT est lente, plus le nombre de cellules hexagonales semble augmenter et le nombre de cellules non hexagonales diminuer. Au-delà, les résultats issus des deux séries de simulations, bien qu'ayant été calculés avec des hypothèses différentes (avec ou sans cadhérines, variation des vitesses de croissance) ont donné des distributions de polygones assez proches.

4.5. Simulation d'épithéliums prolifératifs sur une surface sphérique

4.5.1. Introduction

Les expérimentations biologiques ont montré que les caractéristiques topologiques et organisationnelles de certains épithéliums sont indépendantes de la géométrie (sphérique ou plane) sur laquelle ils se forment. La plupart des simulations d'épithéliums prolifératifs ont donc été réalisées sur des surfaces sphériques afin de s'affranchir du problème des conditions de bord et également de pouvoir prendre en compte le plus grand nombre de cellules dans les comptages (voir le paragraphe 3.7.). Des simulations avec des conditions de bord différentes ont toutefois été réalisées pour évaluer leur possible influence sur la topologie.

4.5.2. La morphogenèse de l'épithélium prolifératif

Les épithéliums prolifératifs se développent uniquement grâce la division cellulaire, avec ou sans apoptose. Ils ont été implémentés pour reproduire les résultats issus des expérimentations biologiques, estimer le rôle des conditions de bord et évaluer l'influence de paramètres inaccessibles à l'expérimentation. Le scénario de prolifération se déroule comme suit : quinze cellules sont positionnées aléatoirement sur une surface (plane ou sphérique), elles croissent puis se divisent et/ou meurent jusqu'à recouvrir complètement la surface. Là encore, les résultats des calculs sont tous originaux car les conditions initiales sont différentes. Ils le sont d'autant plus que la division et l'apoptose peuvent être déterminées aléatoirement dans certains cas d'études. Ces choix donnent un caractère non déterministe à la morphogenèse épithéliale (Figure 4-6).

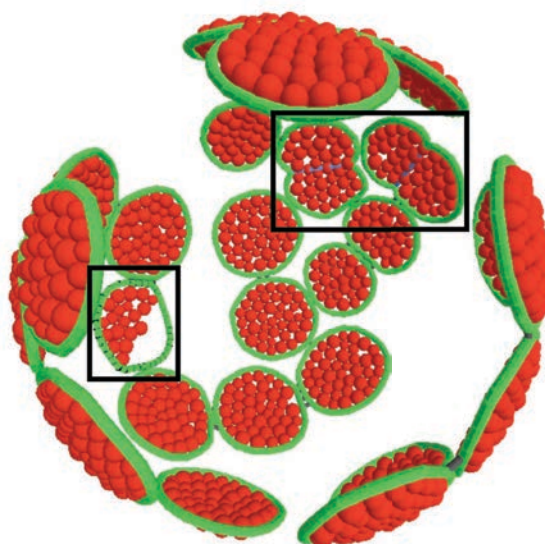


Figure 4-6 : Image au cours du développement d'un épithélium prolifératif. Les cadres indiquent des cellules en division ou en apoptose.

Les résultats présentés ci-après sont issus de simulations avec plusieurs options potentielles : surface de développement du tissu sphérique ou plane, sans condition de bord ou avec (forme circulaire ou carrée), croissance « linéaire » ou « mécanique » des cellules, choix de l'axe de division « géométrique » ou « mécanique », taux d'apoptose/division de 0, 1/5 ou 1/3, mode de division « mécanique » ou « aléatoire » et mode d'apoptose « mécanique » ou « aléatoire » (cf. paragraphe 3.2.4 et 3.2.5).

4.5.3. Influence du taux apoptose/division

Pour estimer l'influence du taux apoptose/division, trois séries de 11, 10 et 9 simulations ont été calculées avec trois taux : 0, 1/5 et 1/3. Lors de ces calculs, l'épithélium se développe sur une surface sphérique, les cellules ont une croissance « linéaire » et se divisent selon un axe de division « géométrique ». Le calcul est arrêté lorsque le modèle contient 4800 grains, ce qui correspond à environ 65 cellules.

mode de division-d'apoptose	taux apoptose/division	tétragone		pentagone		hexagone		heptagone		octogone		Nombre de simulations	Nombre moyen de cellules
		%	ET	%	ET	%	ET	%	ET	%	ET		
aléatoire-aléatoire	0	3,3%	1,8	33,3%	4,6	44,1%	8,7	18,1%	4,8	1,1%	1,2	11	65,7
	1/5	3,4%	1,0	34,3%	4,6	43,3%	6,1	16,9%	2,7	1,9%	1,3	9	65,1
	1/3	2,9%	2,2	31,3%	3,6	50,1%	3,7	14,6%	2,3	1,2%	1,4	10	65,1

Tableau 4-3 : Pourcentage du nombre de voisins des cellules pour un épithélium prolifératif limité à 4800 grains.

Les résultats de ces simulations (Tableau 4-3) montrent que l'épithélium ayant un taux d'apoptose/division de 1/3 est celui qui est constitué de plus de cellules hexagonales et le moins de cellules non hexagonales, ce qui indique que c'est celui qui aboutirait à l'organisation se rapprochant le plus des motifs « parfaits » d'Euler (Poincaré, 1893). Ce résultat est en accord avec les valeurs d'homéostasie. Pour un taux d'apoptose/division de respectivement 1/3, 1/5 et 0, les valeurs d'homéostasie sont de 0,54, 0,47 et 0,26. Ces résultats suivent les mêmes tendances que ceux obtenus chez la drosophile où, plus le taux d'apoptose est important, plus la valeur de l'homéostasie est élevée, c'est à dire que la topologie épithéliale est plus stable et plus reproductible d'un tissu à l'autre.

4.5.4. Comparaison des deux modes de division et d'apoptose

L'intérêt des simulations dont les résultats sont présentés ci-dessous (Tableau 4-4), est de permettre une comparaison de l'influence des modes de division et d'apoptose (« aléatoire » ou « mécanique ») sur l'organisation topologique. Pour ces simulations, les épithéliums se développent sur une surface sphérique, la croissance des cellules est « linéaire » et la division s'effectue selon un axe de division « géométrique ». Le calcul s'arrête lorsque la somme des surfaces des cellules est supérieure à 99% de la surface de la sphère à la différence de ceux présentés dans le paragraphe précédent 4.5.3. Deux taux d'apoptose/division sont testés : 1/3 et 1/5.

mode de division-d'apoptose	taux apoptose/division	tétragone		pentagone		hexagone		heptagone		octogone		Nombre de simulations	Nombre moyen de cellules
		%	ET	%	ET	%	ET	%	ET	%	ET		
aléatoire-aléatoire	1/3	4,4%	3,1	35,4%	3,5	44,7%	5,8	15,1%	3,8	0,4%	0,7	11	62,0
	1/5	4,3%	2,3	35,6%	5,1	45,2%	5,6	13,7%	2,3	1,2%	1,5	10	61,7
mécanique-mécanique	1/3	1,8%	2,1	34,8%	5,2	53,2%	7,8	10,3%	2,3	0,0%	0,0	13	61,6
	1/5	1,0%	1,1	35,1%	3,4	54,0%	5,7	9,9%	3,3	0,1%	0,4	19	60,8
aléatoire-mécanique	1/5	4,0%	2,4	34,7%	5,2	46,9%	9,4	13,5%	5,0	0,9%	1,1	11	61,1
mécanique-aléatoire	1/5	2,4%	1,8	36,3%	3,3	48,6%	7,9	13,6%	6,8	0,1%	0,5	11	61,9

Tableau 4-4 : Résultats issus d'épithéliums formés à partir de cellules qui se divisent et/ou entrent en apoptose (processus "aléatoire" ou "mécanique") avec une croissance « linéaire ».

Pour l'ensemble des simulations, les épithéliums contiennent environ 61 cellules. Les tissus formés à partir d'un mode de division et d'apoptose « aléatoire-aléatoire » ont une distribution de polygones proche de celle observée au paragraphe précédent. Les comptages sur les tissus formés avec un mode de division et d'apoptose « mécanique » présentent toutefois un pourcentage d'hexagones (53,2% et 54%) plus important et d'heptagones moins important (10,3% et 9,9%) par rapport à ceux formés pour un mode de division et d'apoptose « aléatoire-aléatoire » (44,7% et 45,2% d'hexagones ; 15,1% et 13,7% d'heptagones). Les

pourcentages des autres formes cellulaires sont par contre relativement proches. En ce qui concerne les épithéliums formés avec les modes de division et d'apoptose « aléatoire-mécanique » ou « mécanique-aléatoire », les résultats sont encadrés par ceux des deux configurations précédentes.

4.5.5. Évaluation de l'effet de la croissance mécanique

La croissance « mécanique » permet une croissance cellulaire uniquement dans un environnement mécanique favorable, c'est à dire si les cellules sont peu contraintes, sinon les effets dynamiques ne permettent pas d'atteindre un état d'équilibre du système. A l'inverse, la croissance « linéaire » impose une croissance en fonction du temps indépendamment des conditions mécaniques environnantes, c'est à dire une vitesse suffisamment faible pour atteindre un état d'équilibre relatif. La comparaison des résultats suivants (Tableau 4-5) avec ceux du paragraphe 4.5.4, permet d'évaluer l'impact du type de croissance cellulaire sur l'organisation des tissus.

mode de division-d'apoptose	taux apoptose/division	tétragone		pentagone		hexagone		heptagone		octogone		Nombre de simulations	Nombre moyen de cellules
		%	ET	%	ET	%	ET	%	ET	%	ET		
aléatoire-aléatoire	1/3	4,0%	2,5	36,9%	4,9	39,1%	5,1	16,7%	3,1	2,9%	1,6	11	76,4
	1/5	4,4%	2,7	35,5%	4,1	39,7%	5,6	17,5%	2,9	2,8%	1,2	12	71,8
mécanique-mécanique	1/3	0,8%	0,9	33,4%	3,1	48,8%	6,2	16,4%	3,6	0,4%	0,6	9	80,3
	1/5	0,9%	1,3	31,7%	2,9	53,9%	5,5	13,2%	3,6	0,3%	0,8	11	72,1

Tableau 4-5 : Pourcentage moyen du nombre de voisins de chaque cellule pour des épithéliums formés avec une croissance « mécanique ».

Cette comparaison montre que les taux d'hexagones sont plus faibles et corrélativement le nombre d'heptagones plus important dans les épithéliums formés à partir de cellules qui croissent selon un critère « mécanique » par rapport aux tissus dont la croissance est « linéaire ». Les répartitions des autres formes cellulaires sont, par contre, quasiment inchangées.

Au-delà, le nombre moyen de cellules par épithélium est plus important avec une croissance cellulaire « mécanique ». Étant donné que le développement des cellules n'est pas imposé, le nombre de cellules adultes est moins élevé. En effet, un plus grand nombre de cellules conservent une dimension inférieure à la taille adulte car elles ne sont pas dans des conditions mécaniques favorables pour poursuivre leur croissance. Elles sont ainsi trop contraintes par les autres cellules ce qui entraîne un arrêt de leur croissance (phénomène de confinement).

4.5.6. Évaluation de l'effet de la division selon un axe « mécanique »

Pour l'ensemble des simulations précédentes, les cellules sont divisées selon un axe « géométrique ». Un élément actine est créé entre les deux grains membranaires diamétralement opposés et les plus proches (voir paragraphe 3.2.4).

Les résultats suivants (Tableau 4-6) ont été obtenus à partir d'épithéliums formés avec des cellules se divisant selon un axe « mécanique ». La direction de l'élément d'actine est calculée à partir de celle de la direction principale de contrainte de la cellule.

mode de division-d'apoptose	taux apoptose/division	tétragone		pentagone		hexagone		heptagone		octogone		Nombre de simulations	Nombre moyen de cellules
		%	ET	%	ET	%	ET	%	ET	%	ET		
aléatoire-aléatoire	1/5	6,0%	3,2	37,8%	5,5	40,0%	5,5	14,6%	4,0	1,3%	1,1	10	60,3
mécanique-mécanique	1/5	3,0%	1,6	35,5%	5,0	50,7%	8,1	10,5%	3,4	0,1%	0,5	11	60,5

Tableau 4-6 : Pourcentages issus d'épithéliums formés de cellules se divisant selon un axe « mécanique ».

La comparaison de ces résultats (Tableau 4-6) avec ceux du paragraphe 4.5.4 (division selon un axe « géométrique », Tableau 4-4) montre qu'ils sont relativement proches, et ce pour toutes les formes cellulaires à l'exception des hexagones où l'on observe une légère baisse de 45.2% à 40.0% et de 54.0% à 50.7%.

4.5.7. Synthèse

Le modèle numérique permet de reproduire la morphogenèse d'un épithélium prolifératif et de faire varier de nombreux paramètres tels que le taux apoptose/division, le mode de division et d'apoptose, le type de croissance de la cellule et l'orientation de l'axe de division. En considérant d'une part les simulations faites avec un mode de division-apoptose « aléatoire-aléatoire » (Figure 4-7) et, d'autre part, celles avec un mode « mécanique-mécanique » (Figure 4-8), on constate que la variation du taux d'apoptose/division modifie peu la fréquence des polygones. En outre, en comparant ces deux modes de division-apoptose, on remarque que le nombre d'hexagones est plus élevé tandis que celui de tétragones et d'octogones l'est moins pour le mode « mécanique-mécanique » par rapport au mode « aléatoire-aléatoire ».

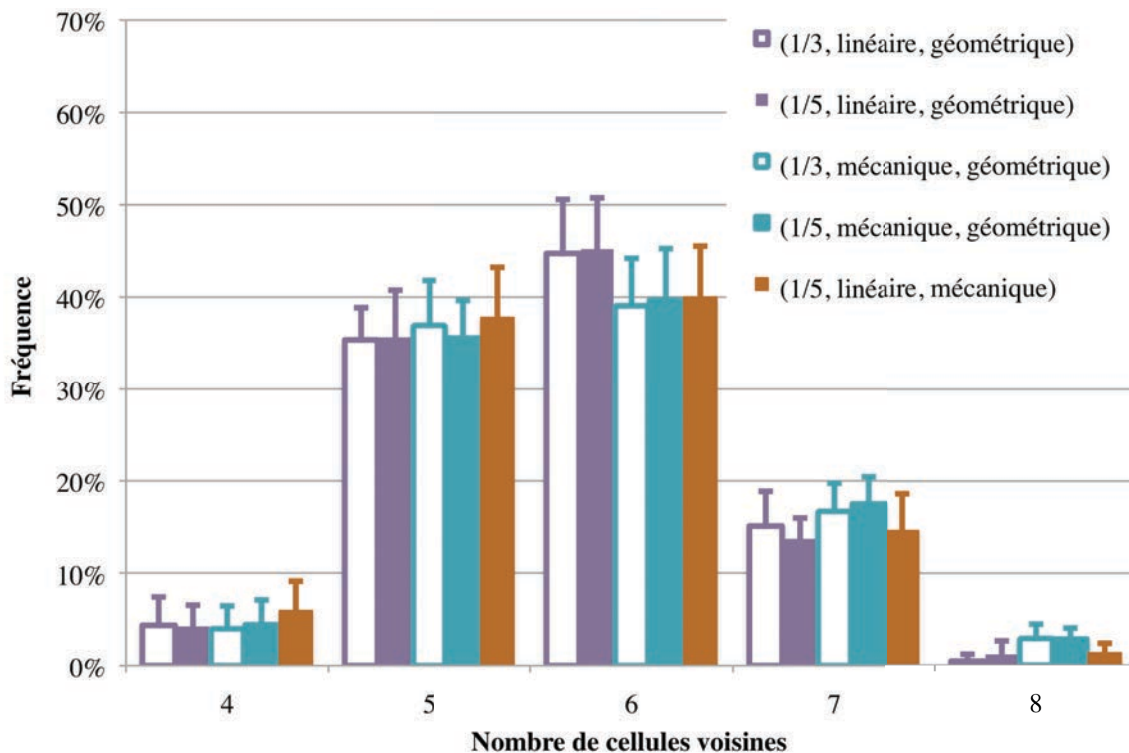


Figure 4-7 : Distribution des polygones des épithéliums prolifératifs formés sur une sphère avec un mode de division-apoptose « aléatoire-aléatoire ». Les informations entre parenthèses indiquent dans l'ordre : le taux d'apoptose/division, le type de croissance, le critère de formation de l'axe de division.

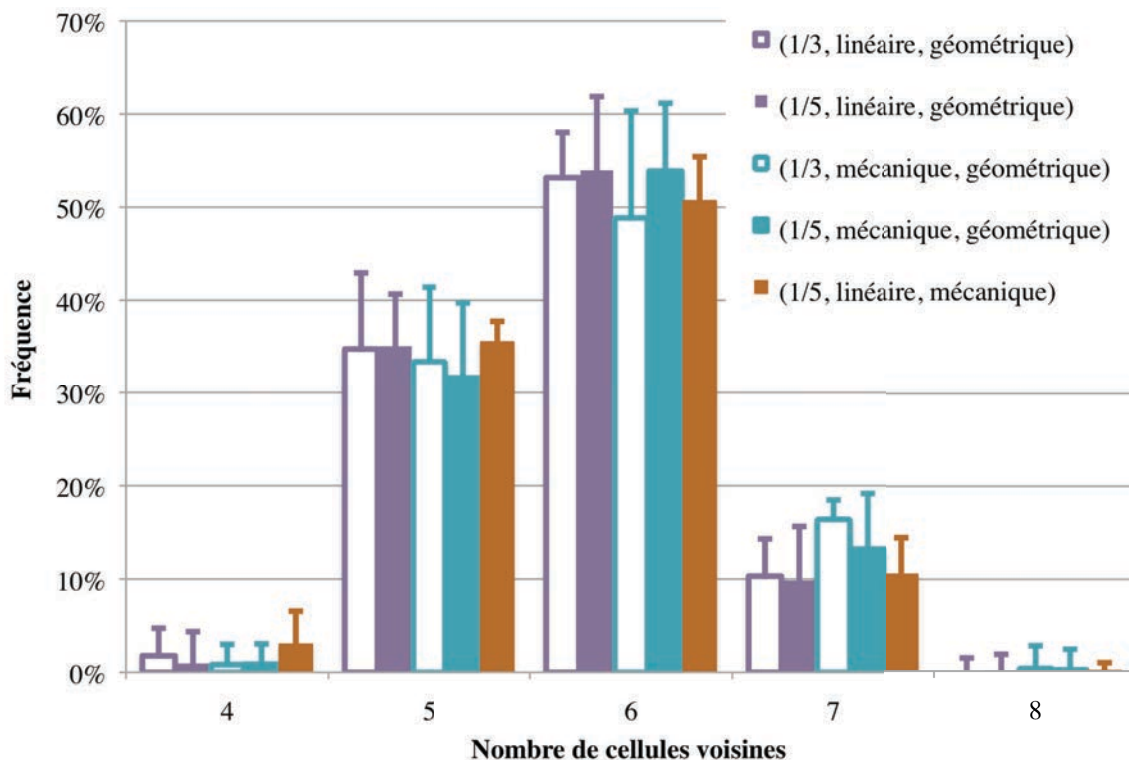


Figure 4-8 : Distribution des polygones pour un épithélium prolifératif formé sur une sphère avec un mode de division-apoptose « mécanique-mécanique ». Les informations entre parenthèses indiquent respectivement : le taux d'apoptose/division, le type de croissance, le critère d'orientation de l'axe de division.

On observe que ces distributions issues des résultats numériques (environ 35% de pentagones, 50% d'hexagones, 10% d'heptagones et quelques tétragones et octogones) suivent celles obtenues expérimentalement (22%-30% de pentagones, 40%-50% d'hexagones et 20%-22% d'heptagones cf. paragraphes 4.2.2 et 4.3.2).

4.6. Simulation d'épithéliums prolifératifs sur surface plane

4.6.1. Introduction

La formation simulée d'épithéliums prolifératifs se développant sur une surface plane se déroule de manière analogue à celle décrite pour les épithéliums se formant sur une surface sphérique. Quinze cellules sont positionnées aléatoirement, puis elles se divisent et/ou meurent jusqu'à ce qu'elles recouvrent l'ensemble de la surface. Les simulations avec des conditions aux limites permettent d'évaluer leur influence sur la topologie épithéliale. Ces conditions sont matérialisées par des grains bloqués en déplacement (dans les directions x, y et z) et liés par des éléments de bords. Ces grains peuvent être disposés en forme de cercle ou de carré pour créer des « boîtes » virtuelles (Figure 4-9). Les triangles liés à chaque grain sur un bord permettent de visualiser les déplacements bloqués.

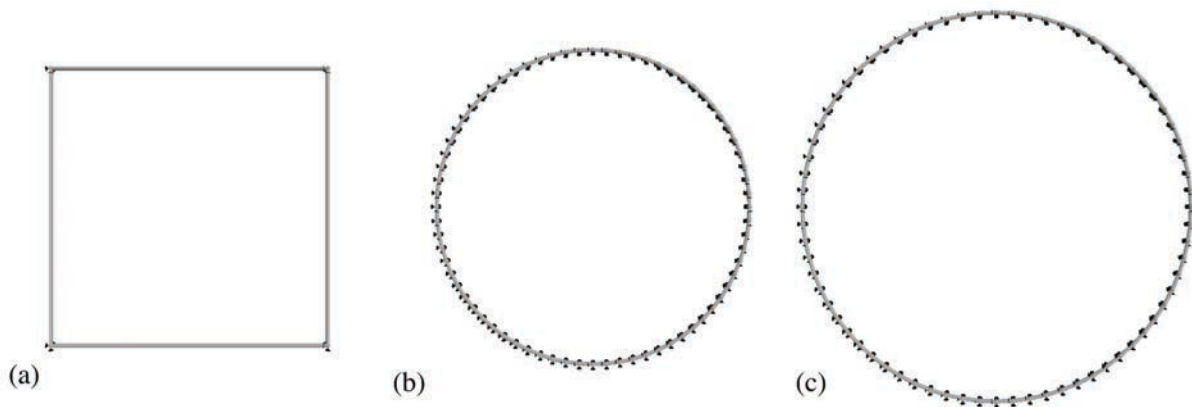


Figure 4-9 : Boîtes de formes et tailles différentes : carrée d'aire S (a), circulaires d'aire S (b) et circulaire d'aire $1,5 \times S$ (c).

Pour les études de développement d'épithéliums sur des surfaces planes, seuls les modes de division-apoptose « aléatoire-aléatoire » ou « mécanique-mécanique » et le taux d'apoptose/division varient. La division est systématiquement effectuée selon un axe de division « géométrique » et la croissance des cellules est « linéaire ». Ces modes ont été

retenus car ils constituent les cas extrêmes du développement d'épithéliums sur une surface sphérique.

Les simulations d'épithéliums prolifératifs avec des conditions aux limites ont un critère d'arrêt équivalent à celui des simulations d'épithéliums formés sur une surface sphérique (le calcul s'arrête quand la somme des surfaces des cellules est supérieure à 99% de la surface délimitée par les bords). En ce qui concerne les calculs sans condition aux limites, le critère d'arrêt est le temps : au delà d'une valeur déterminée arbitrairement, le calcul est stoppé.

Dans un premier temps, deux conditions aux limites de géométries différentes (circulaire et carrée) sont considérées. Les deux espaces (carré et circulaire) délimités par ces conditions ont la même aire, laquelle correspond à la surface de la sphère servant de support au développement d'épithéliums prolifératifs. La dernière série de simulations est effectuée avec des conditions aux limites circulaires dont la surface est égale à une fois et demi celle des surfaces précédentes. Ce dernier cas d'étude permet, en effet, de prendre en compte plus de cellules afin d'améliorer le calcul statistique de la distribution des polygones. En effet, on ne prend pas en compte pour ces calculs les cellules en contact avec les limites des boîtes. Ceci permet de s'affranchir de l'effet de bord bien mis en évidence dans les figures suivantes (Figure 4-10 et Figure 4-11) et de ne considérer ainsi que les cellules entourées uniquement d'autres cellules.

4.6.2. Boîte circulaire de surface $S = S_{\text{sphère}}$

Les résultats présentés dans le tableau suivant (Tableau 4-7) sont ceux issus de simulations de développement d'épithéliums prolifératifs sur une surface plane avec des conditions aux limites circulaires délimitant une surface (S) de la même aire que la surface de la sphère utilisée précédemment comme support de développement (notée $S_{\text{sphère}}$). La figure suivante (Figure 4-10) montre comment le tissu, par son développement, amène les cellules à remplir l'ensemble de la surface délimitée par le bord circulaire périphérique.

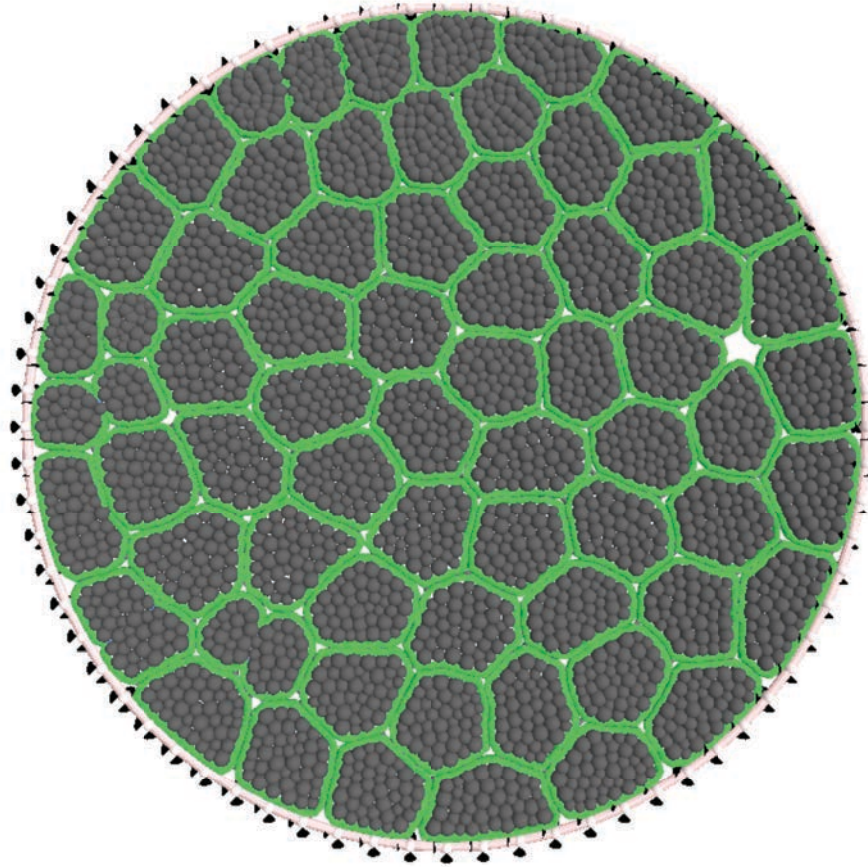


Figure 4-10 : Image de fin de la simulation du développement d'un tissu dans une boîte circulaire d'aire $S_{\text{sphère}}$.

Pour ces simulations, un nombre moindre de cellules est pris en compte dans les statistiques. En effet pour une même aire sur une surface sphérique, environ 60 cellules sont considérées alors que sur une surface plane avec des conditions aux limites seules une quarantaine de cellules sont étudiées (celles non au contact du bord).

mode de division-d'apoptose	taux apoptose/division	tétragone		pentagone		hexagone		heptagone		octogone		Nombre de simulations	Nombre moyen de cellules
		%	ET	%	ET	%	ET	%	ET	%	ET		
aléatoire-aléatoire	1/3	4,5%	3,0	30,5%	8,2	45,1%	4,9	17,9%	4,0	1,9%	1,5	7	44,0
	1/5	4,4%	3,4	31,7%	5,6	41,9%	7,9	19,4%	5,8	2,3%	1,8	11	43,4
mécanique-mécanique	1/3	0,7%	1,1	27,2%	4,3	52,6%	6,2	18,2%	4,1	1,3%	1,7	10	41,5
	1/5	1,0%	1,2	28,2%	3,0	51,3%	7,1	19,5%	4,4	0,0%	0,0	9	42,2

Tableau 4-7 : Résultats des distributions des formes polygonales des cellules pour un épithélium formé sur une surface plane avec des conditions aux limites de forme circulaire ($S=S_{\text{sphère}}$).

Les résultats des distributions obtenus avec un taux d'apoptose/division de 1/3 et de 1/5 sont très semblables. La comparaison des distributions issues des résultats des modes de division-apoptose « aléatoire-aléatoire » et « mécanique-mécanique » montre que le nombre

d'hexagones est moins important dans le premier cas alors que le nombre de tétragones est plus élevé. Les fréquences des autres formes polygonales restent proches.

4.6.3. Boîte carrée de surface $S = S_{\text{sphère}}$

Les simulations de développement d'épithéliums prolifératifs sur une surface plane délimitée par des conditions de bord de forme carrée suivent (Figure 4-11) le même processus de formation que pour une boîte ronde (Figure 4-10). Les résultats correspondants, présentés dans le tableau suivant (Tableau 4-8), ont les mêmes caractéristiques que celles présentées au paragraphe précédent.

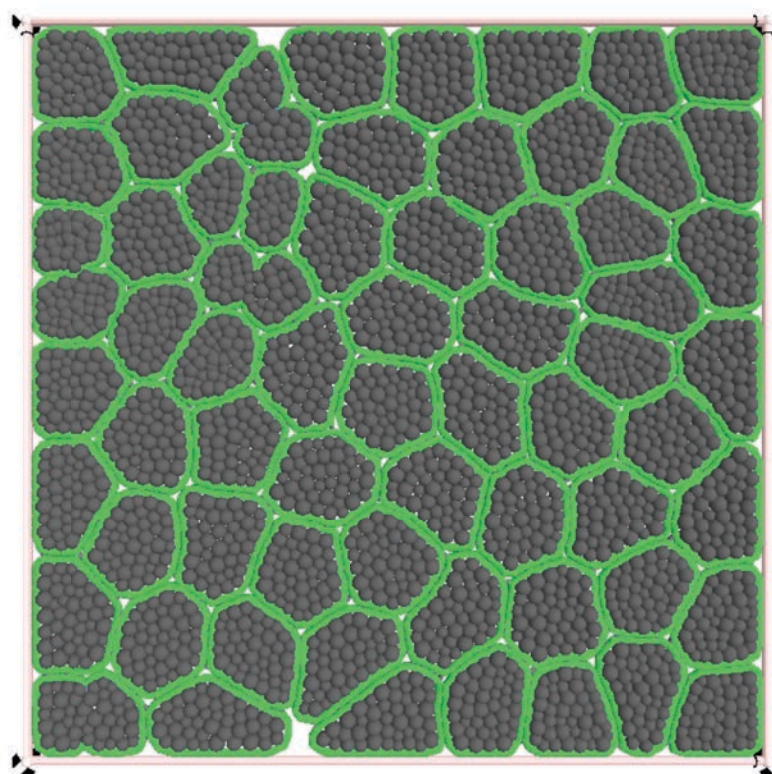


Figure 4-11 : Image de fin d'une simulation d'un épithélium prolifératif avec des conditions aux limites de forme carrée d'aire $S_{\text{sphère}}$.

Le nombre de cellules prises en compte pour les calculs statistiques est légèrement moins élevé pour ce cas d'étude que pour le précédent (boîte ronde) : environ 40 contre 42 précédemment.

mode de division-d'apoptose	taux apoptose/division	tétragone		pentagone		hexagone		heptagone		octogone		Nombre de simulations	Nombre moyen de cellules
		%	ET	%	ET	%	ET	%	ET	%	ET		
aléatoire-aléatoire	1/3	4,5%	2,2	30,7%	8,0	42,5%	11,5	19,8%	2,1	2,5%	2,4	5	40,4
	1/5	2,9%	2,2	39,0%	8,1	38,9%	7,3	18,0%	6,0	1,7%	2,2	4	43,0
mécanique-mécanique	1/3	0,6%	1,2	25,5%	3,9	57,1%	7,1	16,5%	4,3	0,3%	0,8	9	38,3
	1/5	0,6%	1,1	26,5%	3,5	53,9%	5,9	18,5%	4,2	0,6%	1,1	9	39,7

Tableau 4-8 : Résultats des distributions des formes polygonales des cellules pour un épithélium plan formé dans une boîte carrée ($S=S_{\text{sphère}}$).

Comme constaté précédemment, la variation du taux apoptose/division influence faiblement la distribution des polygones. Néanmoins, pour le mode division-apoptose « aléatoire-aléatoire », les pourcentages du nombre de pentagones sont de 30.7% et 39.0%. Cette différence est toutefois à nuancer, à cause du faible nombre de simulations (5 et 4). La comparaison des modes « aléatoire-aléatoire » et « mécanique-mécanique » montre une augmentation du nombre d'hexagones et une diminution du nombre de pentagones et de tétragones.

4.6.4. Boîte circulaire de surface $S = 1.5 \times S_{\text{sphère}}$

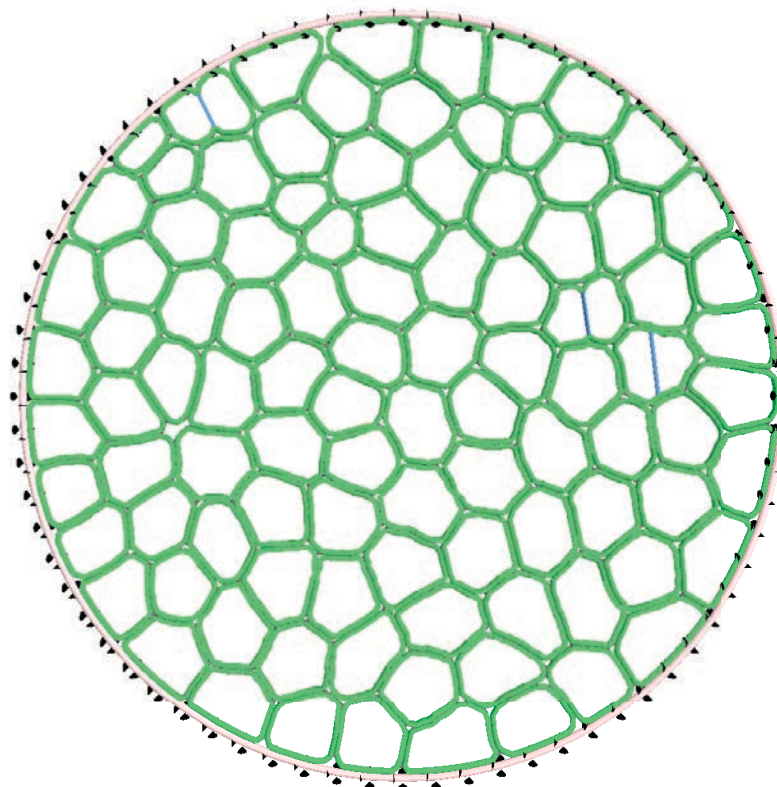


Figure 4-12 : Image de fin de la simulation du développement d'un tissu dans une boîte circulaire d'aire $1,5 \times S_{\text{sphère}}$

Les résultats figurant dans le tableau ci-dessous (Tableau 4-1) sont issus de simulations effectuées dans les mêmes conditions que celles du paragraphe 4.6.2 à l'exception de la taille du cercle. Dans le cas présent, l'aire totale de la surface considérée est $S = 1.5 \times S_{\text{sphère}}$.

mode de division-d'apoptose	taux apoptose/division	tétragone		pentagone		hexagone		heptagone		octogone		Nombre de simulations	Nombre moyen de cellules
		%	ET	%	ET	%	ET	%	ET	%	ET		
aléatoire-aléatoire	1/3	4,2%	2,4	30,7%	3,8	42,6%	7,6	20,1%	3,8	2,4%	2,7	6	71,2
	1/5	3,8%	3,6	27,9%	2,2	46,2%	4,7	19,7%	3,9	2,4%	0,9	3	69,3
mécanique-mécanique	1/3	0,3%	0,6	27,0%	4,7	55,0%	6,2	17,0%	3,3	0,7%	1,0	10	69,5
	1/5	0,5%	0,7	26,8%	3,4	54,3%	5,9	17,9%	2,9	0,5%	0,7	11	68,1

Tableau 4-9 : Résultats des distributions des formes polygonales des cellules pour un épithélium plan avec des conditions aux limites de forme circulaire ($S=1.5 \times S_{\text{sphère}}$).

De même que pour les deux cas d'étude précédents, la variation du taux d'apoptose/division influence peu la distribution de polygones. La comparaison des deux modes de division-apoptose « aléatoire-aléatoire » et « mécanique-mécanique » montre que là encore le nombre d'hexagones augmente alors que le nombre de tétragones diminue. Les pourcentages des autres formes polygonales restent stables.

4.6.5. Sans condition de bord

Pour les épithéliums se développant sur une surface plane sans condition de bord, la simulation est arrêtée après un certain temps ($t > 400$ s ou $t > 600$ s, cf. paragraphe 3.6.2). Les premières séries de simulations ont été arrêtées pour $t > 400$ s. Afin d'avoir plus de cellules prises en compte dans le calcul statistique, les simulations ont ensuite été arrêtées à $t > 600$ s. Au début de la simulation, quinze cellules sont positionnées aléatoirement dans le plan (Figure 4-13 (a)), elles se divisent ensuite et/ou meurent pour finalement former un épithélium (Figure 4-13 (b)).

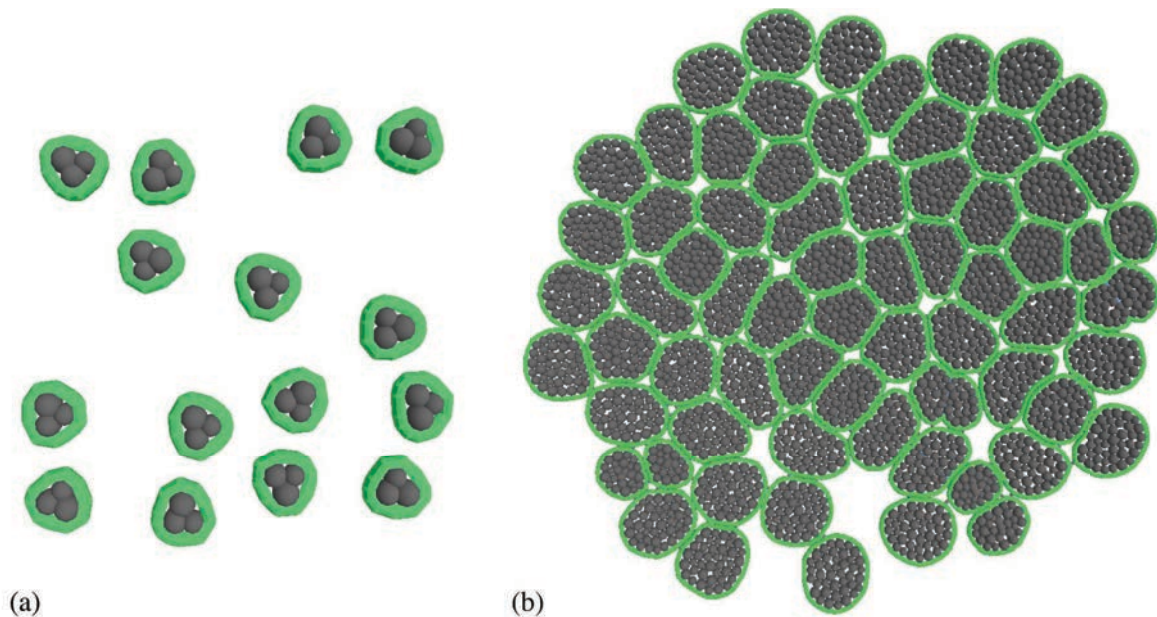


Figure 4-13 : Simulation sans condition aux limites. (a) situation initiale. (b) fin de la simulation.

Les résultats du tableau Tableau 4-10 sont obtenus à partir de quatre séries de onze simulations. Les paramètres variables sont le mode d'apoptose et de division (aléatoire ou mécanique) ainsi que le critère d'arrêt ($t > 400$ s et $t > 600$ s).

mode de division-d'apoptose	critère d'arrêt	tétragone		pentagone		hexagone		heptagone		octogone		Nombre de simulations	Nombre moyen de cellules
		%	ET	%	ET	%	ET	%	ET	%	ET		
aléatoire-aléatoire	$t > 400$ s	8,4%	6,2	38,1%	6,5	42,3%	7,0	10,6%	4,9	0,6%	1,3	11	32,4
	$t > 600$ s	5,2%	3,4	40,5%	8,3	43,3%	7,7	10,3%	5,0	0,7%	1,0	11	48,3
mécanique-mécanique	$t > 400$ s	7,2%	5,3	46,7%	7,1	43,8%	10,7	2,3%	3,2	0,0%	0,0	11	20,2
	$t > 600$ s	3,1%	3,2	45,1%	5,8	48,4%	7,4	3,1%	2,3	0,3%	1,0	11	33,6

Tableau 4-10 : Résultats des distributions des formes polygonales des cellules pour un épithélium formé sur une surface plane sans condition aux limites.

Les distributions des polygones des épithéliums arrêtés pour un temps $t > 400$ s et pour $t > 600$ s, sont proches pour les deux modes division-apoptose (aléatoire-aléatoire et mécanique-mécanique). La comparaison de la distribution des polygones entre ces deux modes montre une augmentation du nombre de pentagones et d'hexagones et une diminution du nombre d'heptagones pour le mode division-apoptose « aléatoire-aléatoire » par rapport à celui « mécanique-mécanique ».

On peut noter qu'en augmentant le temps de développement du tissu de 50% (de 400 s à 600 s), le nombre de cellules augmente également d'environ 50% : le nombre total de cellules dans ces épithéliums est d'environ 65 (respectivement 95) pour les calculs arrêtés à $t > 400$ s (respectivement $t > 600$ s). Le pourcentage de cellules dont le nombre de voisins est compté

(se reporter au paragraphe 3.7.3 pour la description de la méthode utilisée) oscille donc entre un demi et un tiers du nombre total de cellules. Le tissu est donc constitué de nombreuses cellules dont peu sont prises en compte dans la détermination de sa topologie.

4.6.6. Synthèse

La figure ci-dessous montre que les distributions sont proches pour les différents cas de conditions aux limites si l'on considère les modes division-apoptose « aléatoire-aléatoire » (Figure 4-14) et « mécanique-mécanique » (Figure 4-15). Le taux d'apoptose/division influencerait donc peu la distribution épithéliale. Pour chacune des quatre configurations, il apparaît cependant une augmentation des hexagones en comparant le mode division-apoptose « aléatoire-aléatoire » et « mécanique-mécanique ».

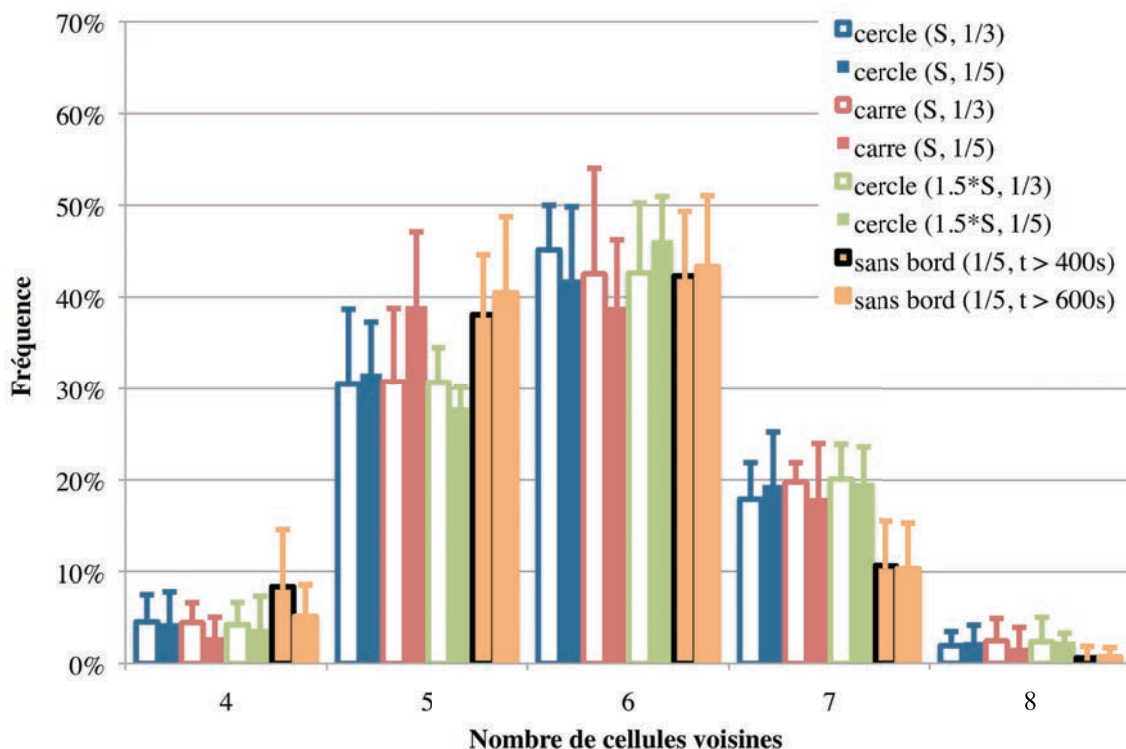


Figure 4-14 : Histogramme des distributions de polygones d'épithéliums prolifératifs formés avec un mode de division-apoptose « aléatoire-aléatoire ».

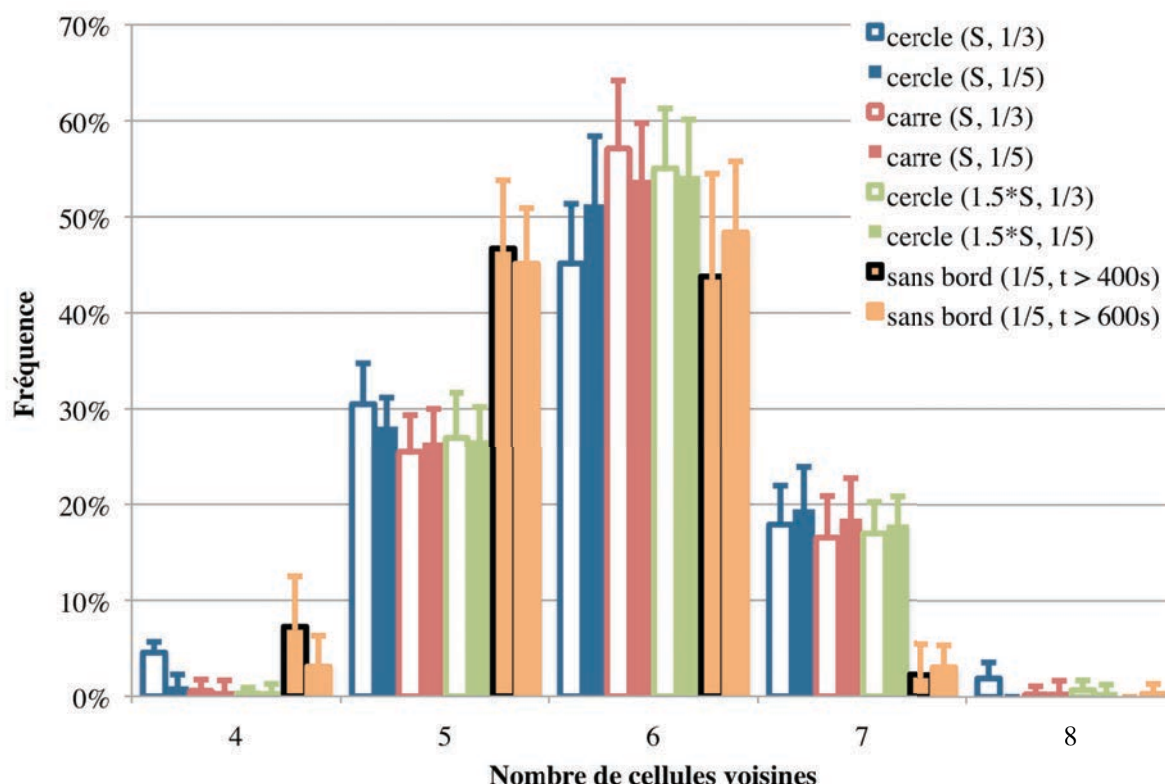


Figure 4-15 : Histogramme des distributions de polygones d'épithéliums prolifératifs formés avec un mode de division-apoptose « mécanique-mécanique ».

Les résultats des simulations avec prise en compte de conditions aux limites sont proches entre eux. En les comparant à ceux des simulations sans considération de condition aux limites, on constate une variation de la distribution : augmentation du nombre de pentagones et diminution du nombre d'hexagones. Un résultats intéressant est donc que la forme des conditions de bord ne semble donc pas influencer la topologie épithéliale alors que leur absence ou leur présence semble la modifier sensiblement.

4.7. Synthèse

4.7.1. Épithéliums non prolifératifs : résultats biologiques et numériques

Les simulations de la morphogenèse d'épithéliums formés par accréction avec le modèle mécanique ont permis de retrouver les résultats expérimentaux, de mettre en évidence le paramètre de vitesse de développement du tissu (VDT) et d'évaluer l'effet de la variation de cette VDT sur la topologie épithéliale. Sur la figure suivante (Figure 4-16), on voit que, quelle que soit la valeur de VDT utilisée, les résultats numériques restent proches des résultats

expérimentaux. Plus précisément, ces derniers sont encadrés par la VDT rapide (borne inférieure) et les VDT lentes (bornes supérieures). Autrement dit, plus la VDT augmente, plus le nombre de cellules hexagonales diminue pendant que celui des non hexagonales croît.

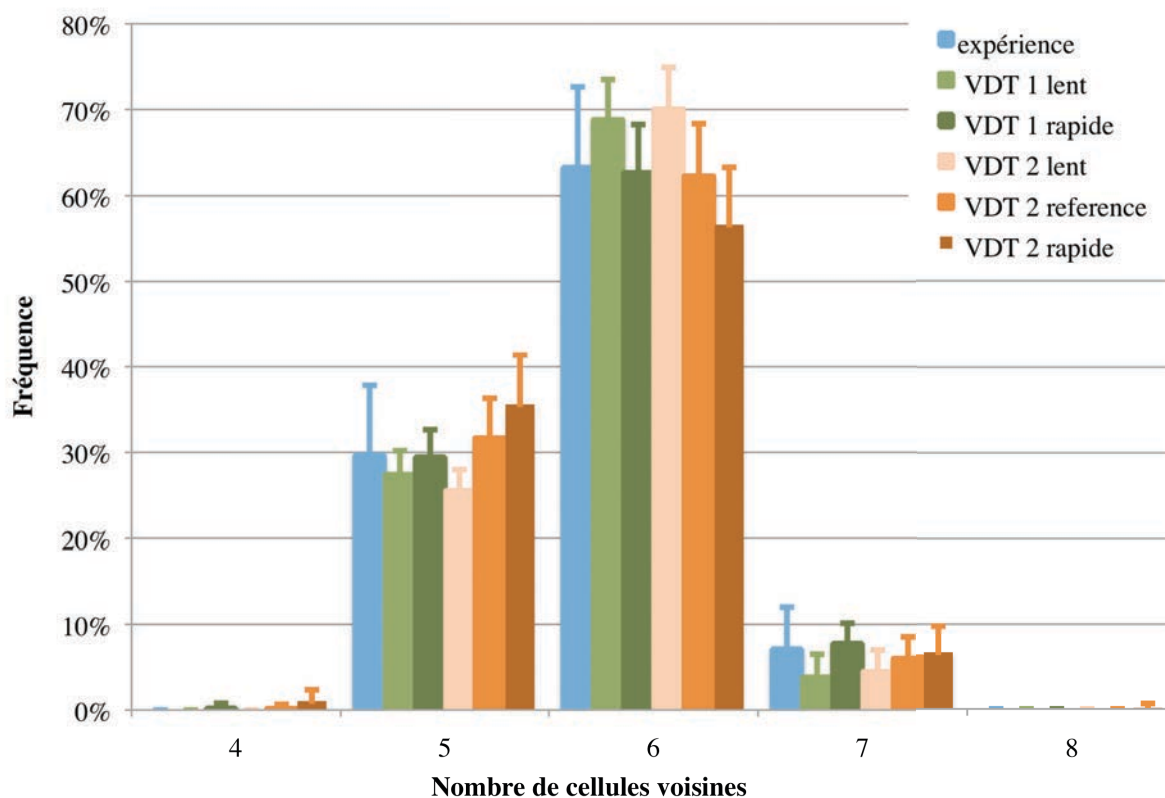


Figure 4-16 : Histogramme des distributions de polygones des épithéliums non prolifératifs expérimentaux et numériques. VDT 1 correspond à la première campagne de calculs et VDT 2 à la seconde (cf. paragraphes 4.4.2 et 4.4.3).

4.7.2. Épithéliums prolifératifs : résultats biologiques et numériques sur sphère

La comparaison des résultats des simulations faisant varier le taux apoptose/division (0, 1/5 et 1/3) et ceux issus d'expériences sur la drosophile (pour lesquelles l'apoptose a été inhibée ou pas) montrent que les tendances sont globalement semblables (Figure 4-17).

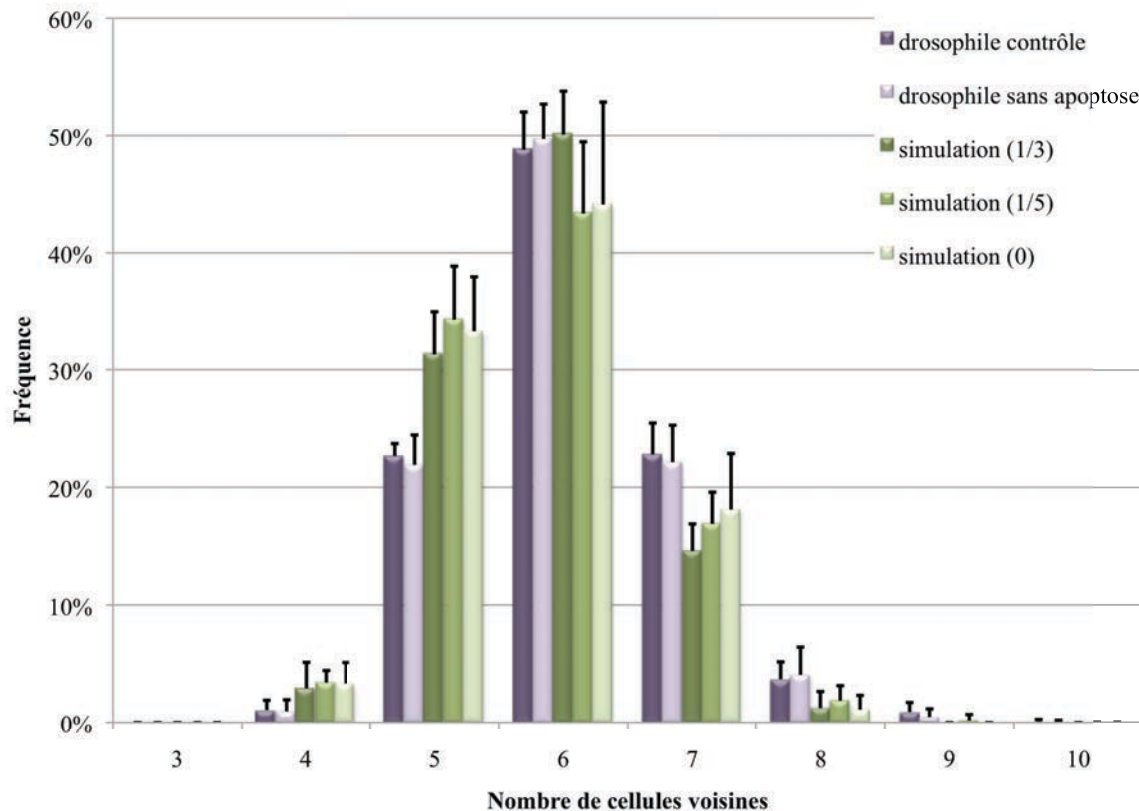


Figure 4-17 : Histogramme des distributions de polygones des épithéliums prolifératifs expérimentaux et numériques.

Les résultats issus des épithéliums de drosophiles avec ceux issus des simulations d'épithéliums prolifératifs sphériques montrent que l'évolution du rapport apoptose/division influence peu la fréquence des formes polygonales des cellules. En outre les valeurs d'homéostasie suivent les mêmes tendances (cf. 4.5.3).

4.7.3. Epithéliums prolifératifs : numériques sphériques et numériques plans

Les résultats précédents ont montré que les nombres de polygones pour des taux d'apoptose/division de 1/3 et de 1/5 sont très proches. Pour les deux modes de division-apoptose « aléatoire-aléatoire » ou « mécanique-mécanique », deux taux d'apoptose/division de 1/3 et 1/5 ont été étudiés. Les données ont été fusionnées (Figure 4-18) pour comparer directement les résultats entre ces deux modes.

La comparaison des distributions de polygones pour les épithéliums prolifératifs formés sur des surfaces sphériques ou planes avec ou sans condition de bord ne fait apparaître que de légères différences pour un même mode de division-apoptose. Néanmoins, on retrouve une même tendance qui est l'augmentation du nombre d'hexagones pour le cas « mécanique-

mécanique » par rapport au mode « aléatoire-aléatoire », et ce dans tous les cas étudiés (Figure 4-18).

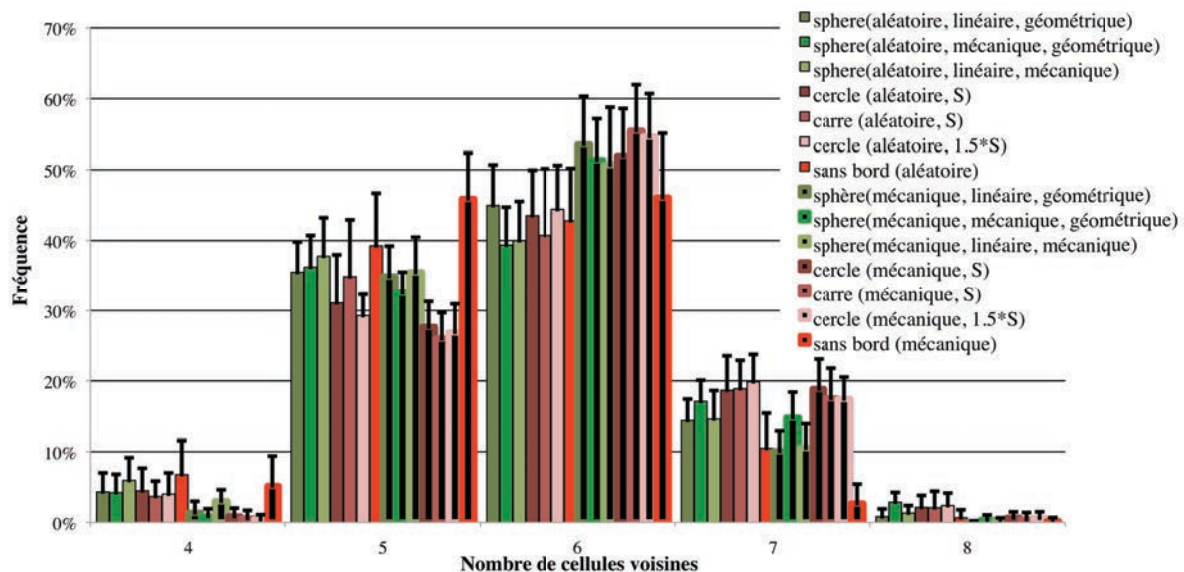


Figure 4-18 : Distribution des polygones issus des simulations d'épithéliums prolifératifs. Ils se développent sur une sphère ou sur un plan. Les informations entre parenthèses indiquent le mode de division-apoptose, le type de croissance et le critère pour l'axe de division. Les termes « aléatoire » ou « mécanique » signifient donc que les modes de division-apoptose adoptés sont « aléatoire-aléatoire » ou « mécanique-mécanique ». Le second terme « linéaire » ou « mécanique » indique le type de croissance des cellules. Le troisième terme donne le critère pour le choix de l'axe de division « mécanique » ou géométrique ». Pour les épithéliums plans, le dernier terme indique la surface délimitée par les conditions de bord.

On remarque qu'un calcul de simulation de morphogenèse proliférative serait plus long sur une surface plane que sur une sphère. En effet, les cellules au bord de l'épithélium ne sont pas prises en compte pour le calcul de la topologie.

4.7.4. Accrétion et prolifération

La distribution des polygones est quasi identique pour les deux types d'épithéliums prolifératifs c'est à dire ceux formés par division avec ou sans apoptose. Les épithéliums non prolifératifs formés par accrétion présentent néanmoins plus d'hexagones (Figure 4-1).

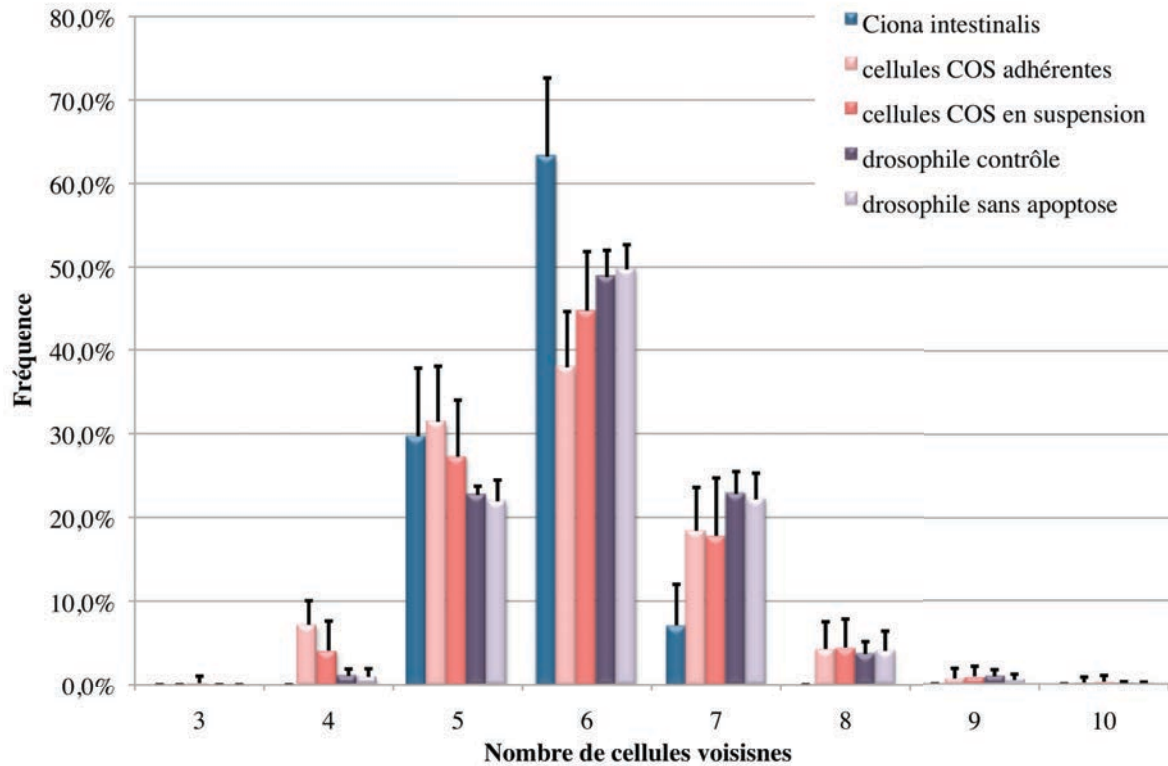


Figure 4-19 : Histogramme des distributions issues des résultats expérimentaux.

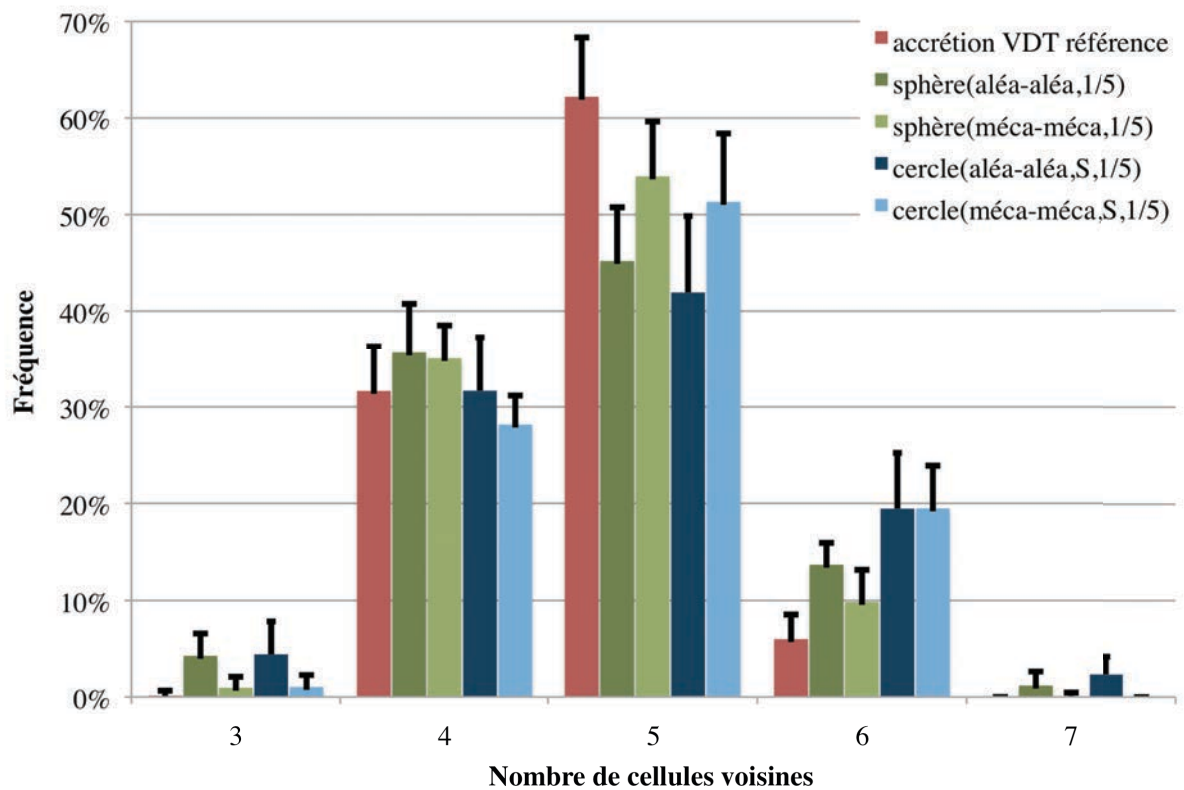


Figure 4-20 : Histogramme des distributions issues de quelques simulations représentatives.

On observe une même tendance pour les distributions issues des résultats expérimentaux et numériques pour les épithéliums prolifératifs, c'est à dire les épithéliums issus des cellules COS adhérentes et en suspension ainsi que pour les épithéliums columnellaires de drosophiles. La distribution des polygones au sein des tissus de *Ciona intestinalis* se distingue par un nombre plus élevé d'hexagones et moindre d'heptagones. Par ailleurs, en ce qui concerne les valeurs d'homéostasie issues des résultats expérimentaux, elles sont plus élevées pour l'épithélium formé par accréction (*Ciona Intestinalis*) que pour les épithéliums prolifératifs (COS et drosophile).

5. Analyse et confrontations des modèles expérimentaux et numériques

Les résultats expérimentaux et numériques ont été exposés dans le chapitre précédent montrant les distributions de polygones dans des tissus prolifératifs et non prolifératifs, de géométrie sphérique et plane. Dans un premier temps, nous analyserons les deux modes de formation de ces épithéliums (non prolifératifs et prolifératifs) puis nous les confronterons afin de mettre en évidence leurs points communs et différences. Enfin, nous verrons l'intérêt du modèle granulaire et en quoi l'approche multidisciplinaire constitue un réel atout dans l'étude de la morphogenèse épithéliale.

5.1. Morphogenèse des épithéliums non prolifératifs

Les dissections effectuées, par nos collègues biologistes, sur les ovocytes de *Ciona intestinalis* montrent que l'épithélium de cellules folliculaires se forme par accrétion autour de l'oeuf en croissance, et ce, sans apoptose ni division. Au cours du développement, les cellules du tissu sont soumises à des contraintes biologiques et physiques. La croissance des cellules et de l'œuf, conjuguée à l'arrivée de nouvelles cellules, semble amener une augmentation de la pression intercellulaire. Ce processus de formation va donner à chaque cellule sa forme et, par conséquent, la topologie du tissu.

D'arcy Thompson a montré que des cellules, si elles sont également contraintes sur une surface, adoptent des formes hexagonales proches d'une structure en nid d'abeille (Thompson, 1917). Les épithéliums de cellules folliculaires de *Ciona intestinalis* tendent vers celle-ci, avec plus de 60% de cellules hexagonales. Ils présentent donc des caractéristiques organisationnelles particulières. La valeur de l'homéostasie proche de 1 traduit une forte reproductibilité entre tissus, donc une forte stabilité du processus de morphogenèse. La formation de ce tissu est un exemple d'auto-organisation sur une surface sphérique.

Les expérimentations biologiques ne permettent toutefois pas de tester certains paramètres, en particulier physiques, considérés comme clefs dans la formation d'épithélium. Le modèle numérique associé au scénario d'accrétion a d'abord permis d'étudier le rôle des contacts intercellulaires. Les simulations d'accrétion sur une sphère reproduisent la morphogenèse de l'épithélium de cellules folliculaires autour l'œuf de *Ciona intestinalis*. Elles représentent fidèlement la physique de ce milieu en considérant les interactions entre

cellules et en autorisant un déplacement des cellules sur la surface. Les résultats issus des simulations sont comparables aux résultats expérimentaux en terme de distribution de polygones et de valeur d'homéostasie, ce qui démontre la pertinence du modèle pour le scénario d'accrétion. Le fait de pouvoir reproduire de telles topologies en considérant uniquement certains aspects physiques du phénomène et en négligeant les réactions bio-chimiques ou moléculaires montre l'importance des interactions physiques entre cellules et leur rôle dans l'organisation finale de l'épithélium.

Une question se pose, toutefois : les liens intercellulaires formés par les cadhérines jouent-ils un rôle prépondérant dans cette organisation tissulaire ou celui-ci pourrait-il être négligeable devant les efforts de contact au niveau des membranes cellulaires ? En effet, les deux séries de simulations faites avec et sans élément « cadhérine » ont présenté des résultats assez proches, pouvant mener à penser à un rôle négligeable dans le processus de morphogenèse. Toutefois, il est à noter que, dans les simulations effectuées avec éléments « cadhérine », la vitesse de croissance des cellules est dépendante de la vitesse de croissance de l'œuf alors qu'elles sont indépendantes pour les calculs sans élément « cadhérine » (cf. paragraphe 4.4.2 et 4.4.3). De plus le critère d'arrêt des simulations n'est pas identique : dans le premier cas le calcul s'arrête quand le système compte 4800 grains, dans le second lorsque 99% de la sphère est recouvert. Ainsi, les modèles présents n'étant pas exactement identiques, des développements complémentaires, associés à des expérimentations en présence d'inhibiteurs ou d'activateurs de ces liaisons, sont nécessaires avant de conclure définitivement.

Les simulations ont aussi permis de mettre en avant la vitesse de développement du tissu (VDT). Elle regroupe trois vitesses : celle d'arrivée des cellules sur l'œuf, celle de croissance des cellules et celle de croissance de l'œuf. Le développement du tissu semblant notamment soumis aux contraintes physiques entre cellules voisines, il est intuitif de supposer que plus l'épithélium est formé lentement, plus les cellules ont le temps de s'organiser sur l'œuf, tendant vers des motifs plus réguliers et plus reproductibles. Ce raisonnement est confirmé par les résultats des simulations. En effet, les tissus formés avec un développement lent sont constitués d'un plus grand nombre de cellules hexagonales et la valeur de l'homéostasie est plus proche de 1, caractérisant ainsi la forte reproductibilité du processus. A l'inverse, dans le cas d'un développement rapide, les tissus comptent moins de cellules de

forme hexagonale et la valeur d'homéostasie est plus faible, ce qui indique une moindre reproductibilité.

En résumé, ce modèle n'a pas été complètement exploité et peut fournir encore des résultats utiles, notamment en ce qui concerne le rôle des cadhérines, et permettre de mieux comprendre la morphogenèse des épithéliums cellulaires monocouches formés par accréation.

5.2. Morphogenèse des épithéliums prolifératifs

5.2.1. Étude comparée expérimental - simulation

Les épithéliums de cellules COS cultivés en suspension ou dans le plan forment une monocouche cellulaire. Ces tissus prolifératifs, qui se forment sur une surface sphérique et plane, présentent une même distribution de polygones et des valeurs d'homéostasie proches, ce qui démontre que la forme sur laquelle se développent les tissus n'influence pas leur topologie. Toutefois, ces valeurs d'homéostasie sont proches de 0 ce qui indique que le processus de formation tissulaire est moins stable et moins reproductible que celui des épithéliums non prolifératifs. La principale différence entre les deux modes de morphogenèse de ces tissus réside dans le fait que la multiplication et la mort de cellules interviennent, en plus de la croissance cellulaire, dans le développement des épithéliums prolifératifs. S'il est assez naturel de penser que la division cellulaire joue un rôle « moteur » dans la morphogenèse tissulaire, se pose la question du rôle de la mort cellulaire programmée sur sa stabilité.

L'apoptose est un processus qui peut être vu comme le pendant de la division cellulaire et remplit probablement une fonction influente dans le renouvellement du tissu. Son inhibition dans les cellules du disque d'aile de drosophile a permis de montrer son rôle dans l'organisation topologique de l'épithélium (cf. paragraphe 4.7.4). En effet, la variation du taux d'apoptose (avec ou sans) ne perturbe pas la distribution de formes polygonales des cellules car les fréquences sont proches. L'analyse statistique a, en revanche, révélé une augmentation de la variance des formes cellulaires pour les épithéliums sans apoptose. Les résultats montrent donc une même distribution de polygones mais des valeurs d'homéostasie différentes. Quand la mort cellulaire programmée est inhibée, la valeur de l'homéostasie diminue, ce qui indique que la forme d'une cellule entre de tels épithéliums est moins dépendante de celle des autres cellules. L'apoptose jouerait ainsi un rôle majeur sur l'interdépendance des formes de cellules. Au-delà, la mort d'une cellule libère des degrés de

liberté au sein du tissu ce qui facilite sa réorganisation (Toyama et *al.*, 2008). Par conséquent, l'inhibition de l'apoptose fait croître les contraintes dans l'épithélium et diminue les possibilités de réorganisation. L'apoptose permettrait donc une plus grande reproductibilité et stabilité de la topologie épithéliale.

Par ailleurs, les simulations numériques réalisées en considérant des épithéliums se développant sur une surface sphérique sont plus rapides que celles d'épithéliums se formant sur des surfaces planes (pour un même nombre de cellules pris en compte dans le calcul statistique). De plus, nous avons vu précédemment que la géométrie adoptée par le tissu n'influait pas sa topologie. Ces raisons ont donc conduit à simuler la morphogenèse d'épithéliums prolifératifs sur une surface sphérique, puis à les comparer aux résultats expérimentaux de tissus se développant dans le plan (épithéliums columnnaires de drosophile), toujours dans le but d'étudier l'effet de l'apoptose. Trois taux division/apoptose (pas d'apoptose, 1 cellule qui meurt pour 5 qui se divisent, 1 cellule qui meurt pour 3 qui se divisent) ont été testés, pour une proportion de cellules en division fixée à 7% du nombre total dans l'épithélium. Les résultats issus de ces simulations confirment l'effet régulateur de l'apoptose sur la stabilité épithéliale observé expérimentalement.

Les valeurs d'homéostasie (h) suivent en effet les mêmes variations numériquement et expérimentalement : plus la proportion de cellules en apoptose est importante (le maximum étant de 1 cellule en apoptose pour 3 cellules en division), plus la valeur de h augmente. De plus pour les trois taux division/apoptose testés, les distributions de polygones sont proches entre elles et de celles observées expérimentalement, ce qui confirme également l'intérêt potentiel du présent modèle pour l'étude de la morphogenèse de tissus prolifératifs.

Par ailleurs, d'après les données de la littérature (Milan et *al.*, 1996 ; Milan et *al.*, 1997), le taux apoptose/division lors du développement du disque d'aile est d'environ $1/3,69$. Les taux utilisés dans le modèle numérique sont de 0, $1/5$ et $1/3$, ce qui encadre cette valeur expérimentale. La détermination de ce taux pour d'autres épithéliums biologiques pourrait toutefois donner de nouvelles pistes de réflexion. Des taux numériques d'apoptose/division plus importants ($1/2$ ou plus) pourraient être testés, mais dans ce cas les calculs dureront plus longtemps. Plus on augmente le renouvellement cellulaire (i.e. augmentation du nombre d'apoptoses), plus le tissu va mettre du temps pour se former. Par exemple, une augmentation de ce ratio entraînerait-elle l'apparition de cellules cancéreuses voire de tumeurs ?

Numériquement, la variation du taux apoptose/division est simple à mettre en œuvre en deux dimensions avec le modèle existant. Les tumeurs observées sur des tissus biologiques sont cependant le plus souvent des épithéliums en trois dimensions. Pour de telles simulations, il serait nécessaire de changer de modèle ou de le faire évoluer vers un modèle 3D. Une telle évolution nécessiterait beaucoup d'adaptations. Dans ce cas, il ne suffit plus de considérer une cellule formée de grains dans un polygone mais dans un polyèdre. Le cas le plus simple serait de considérer un icosaèdre. Il faudrait également, par exemple, non plus considérer un contact entre grain et élément (grain interne – élément membranaire et grain membranaire – élément membranaire) mais entre grain surface ! Le temps de calcul augmenterait exponentiellement. Cependant, il est possible d'imaginer une hyperprolifération 2D en distinguant deux populations de cellules. L'une d'entre elle serait assortie d'une vitesse de croissance et/ou un pourcentage de division plus important que l'autre. Ainsi, les deux populations seraient mélangées mais la population à plus forte croissance serait plus importante.

5.2.2. Etude numérique de l'influence de paramètres difficilement accessibles en expérimentations

Les simulations d'épithéliums prolifératifs sur une surface sphérique permettent, d'un point de vue mécanique de s'affranchir des problèmes de conditions aux limites. En outre, l'intérêt du modèle est d'étudier la variation de paramètres physiques inaccessibles aux expérimentations biologiques. Parmi les simulations numériques réalisées, le choix de l'axe de division selon un critère mécanique (par exemple de même direction que celle de la contrainte principale de la cellule) n'apporte pas de résultat différent par rapport à une division « géométrique » pour laquelle l'axe est défini par les deux grains membranes les plus opposés et les plus proches. Il faut noter que le plus souvent ces deux choix de directions de division, bien que déterminés par des méthodes différentes, donnent des orientations assez proches. Est-ce à dire que ces deux approches sont quasiment équivalentes ? Rappelons qu'en mécanique, il existe un lien fort entre les efforts mécaniques dans un système et sa géométrie. Une étude de la différence angulaire entre ces deux directions et son suivi au cours des simulations permettrait de vérifier ce lien potentiel dans le cas du choix de l'axe de division.

L'étude de la croissance cellulaire s'appuie sur deux campagnes de simulations : celles appliquées à des épithéliums pour lesquels la croissance des cellules est déterminée selon un critère « mécanique » (c'est à dire lorsque l'état de contrainte de la cellule est inférieure à une valeur fixée) et celles pour lesquels la croissance est « linéaire » (c'est à dire que la cellule croît linéairement dans le temps). Les distributions des polygones correspondantes varient peu

entre ces simulations. Toutefois, il est à noter que le nombre de cellules est plus important pour un épithélium à croissance « mécanique ». Les cellules trop contraintes ne croissent pas et restent donc à une taille inférieure à leur taille adulte sans se diviser ni mourir. Leur taille demeure constante jusqu'à ce que leur environnement mécanique soit plus favorable (c'est à dire que la pression des cellules voisines diminue). Dans ce cas, elles croissent à nouveau. Étant donné que beaucoup de cellules sont dans ce cas, un plus grand nombre de cellules est nécessaire pour recouvrir la surface de la sphère, ce qui explique la différence du nombre final de cellules. Par ailleurs, il est plausible de penser que, certes, il existe des gradients de contraintes au sein d'un épithélium, mais que ceux-ci doivent probablement être faibles et contrôlés notamment par la croissance et l'adhésion cellulaire. La croissance « mécanique » permettrait ainsi d'éviter des disparités importantes d'état de contrainte au sein du tissu, de l'homogénéiser d'un point de vue mécanique.

Le modèle permet aussi de déterminer les cellules à diviser et à faire mourir, aléatoirement ou en fonction de leur état de contrainte. Ainsi, dans le cas de la division et de l'apoptose aléatoire, la cellule est désignée au hasard. Pour la division « mécanique » (respectivement l'apoptose « mécanique »), c'est la cellule la moins (la plus) contrainte qui se divise (qui meurt). L'étude comparative des quatre modes de division-apoptose (« aléatoire-aléatoire », « aléatoire-mécanique », « mécanique-aléatoire » et « mécanique-mécanique ») montre que les épithéliums formés par division-apoptose « aléatoire-aléatoire » ont le moins de cellules de forme hexagonale et que ceux formés en « mécanique-mécanique » en ont le plus. Les distributions issues de ces deux modes sont toutefois proches et encadrées par les deux distributions précédentes. Il semble que ce soit la conjugaison des deux processus et leur caractère mécanique qui modifie la distribution polygonale. Le fait que les cellules les plus contraintes entrent en apoptose permet en effet de libérer des espaces libres dans le tissu et de favoriser la réorganisation des cellules. La division des cellules les moins contraintes permet au tissu de croître sans augmenter son état de contrainte. La conjugaison de processus mécaniques aurait-elle plus d'impact sur l'organisation du tissu ? Il est probable qu'un épithélium qui se développe via une croissance mécanique et un mode de division-apoptose « mécanique-mécanique » soit plus homogène en terme de répartition d'états de contrainte et présente plus d'hexagones.

Lors de ces simulations, le tissu se développe sur une surface délimitée par des conditions de bord de forme circulaire ou carrée d'aire égale à la surface de la sphère ou à une fois et demie sa surface, ou sans bord. Toutes les simulations sur une surface plane sont

effectuées avec une croissance « linéaire » et avec des cellules se divisant selon un axe « géométrique ».

Les distributions des polygones entre le cas d'un développement avec une aire égale à la surface de la sphère ou à une fois et demie cette surface, sont proches. En considérant le mode de division-apoptose « aléatoire-aléatoire » ou « mécanique-mécanique », les conditions de bord n'influencent pas la distribution des polygones.

Les simulations d'épithéliums sur une surface plane sans condition de bord font figures d'exception. Ces conditions sont très différentes de celles appliquées précédemment où, sur la surface sphérique comme sur la surface délimitée par des conditions de bord, les cellules de l'épithélium sont contraintes à s'organiser sur une surface finie. En l'absence de condition de bord, les pressions appliquées aux cellules sont moindres. Dans ce cas, le nombre d'hexagones et de pentagones sont les mêmes. Pour le cas de la division-apoptose « mécanique-mécanique », le nombre d'heptagones diminue par rapport au mode « aléatoire-aléatoire ». L'épithélium étant moins contraint du fait de la division et de l'apoptose « mécanique », s'ajoute le fait qu'en l'absence de condition de bord les cellules peuvent se réorganiser plus facilement car l'espace dans lequel le tissu se développe est infini.

L'étude expérimentale d'épithéliums prolifératifs de cellules COS a montré que les distributions des polygones pour les développements dans le plan et sur une sphère sont proches. De même, les distributions issues des résultats des simulations dans le plan et sur une sphère sont globalement très semblables, malgré un nombre d'hexagones légèrement supérieur dans le plan. En outre, les résultats numériques et expérimentaux sont voisins. Là encore le modèle numérique, reproduisant les résultats expérimentaux, quelle que soit la géométrie sur laquelle le tissu se développe, s'avère être un candidat robuste et souple pour l'étude de la morphogenèse d'épithéliums.

5.3. Comparaison entre épithéliums prolifératifs et non prolifératifs

La division cellulaire est connue pour influencer l'organisation des tissus (Gibson et *al.*, 2006). Les valeurs de l'homéostasie topologique montrent que les formes des cellules sont plus indépendantes les unes des autres entre individus dans le cas d'épithéliums prolifératifs ($h \leq 0,34$), notamment sans apoptose ($h = -0,19$), que dans celui d'épithéliums formés par accréction ($h=0,73$). La division cellulaire introduit ainsi un facteur perturbateur dans l'organisation du tissu et sa morphogenèse.

Par ailleurs, les résultats obtenus à partir des modèles de tissus biologiques et numériques indiquent que les épithéliums prolifératifs sont moins organisés et moins stables que les tissus non prolifératifs. Ils présentent moins d'hexagones et leur valeur d'homéostasie est plus faible. La géométrie des cellules constituant un épithélium formé par accréction est ainsi très dépendante de celle de ses voisines, au contraire de ce qui a été observé pour les épithéliums prolifératifs. La morphogenèse des premiers est principalement influencée par le temps de réorganisation des cellules, alors que pour les seconds l'apoptose et la division cellulaire jouent un rôle déterminant dans le réarrangement topologique. En fait, la relative désorganisation de la structure du tissu due à la division cellulaire semble notamment compensée par l'apoptose. Ceci pourrait expliquer la reproductibilité de la distribution des polygones dans les épithéliums prolifératifs. Les fréquences de polygones (environ 30% de pentagones, 50% d'hexagones et 20% d'heptagones) et l'homéostasie de 0,4 apparaissent comme des caractéristiques de la stabilité topologique des épithéliums prolifératifs. Ce processus apparaît ainsi comme « optimisé » pour associer au mieux croissance et stabilité épithéliale.

5.4. Intérêt du modèle numérique discret

La simulation de la morphogenèse épithéliale nécessite, pour rendre compte des observations expérimentales, de modéliser un flux de matière entrant, permettant l'accréction et la croissance, et/ou sortant, autorisant la mort cellulaire. Le système mécanique considéré doit, dès lors, être ouvert comme c'est le cas parfois en mécanique des fluides, mais plus rarement en mécanique des solides (milieux continus, structures, etc.). C'est entre autres pour ces raisons que l'approche développée par Nelson n'a pas été retenue dans le cadre de cette thèse. Les milieux divisés tels que le modèle granulaire développé ici permettent de prendre en compte cet aspect. En effet, l'ajout de nouveaux grains lors de la croissance cellulaire et l'augmentation des longueurs des éléments membranaires d'une part, ainsi que la diminution des éléments membranaires, la suppression de grains et des éléments membranaires lors de l'apoptose d'autre part, sont les entrées et les sorties de ce système mécanique ouvert. Un tel flux de matière permet de renouveler et/ou de le faire croître, selon une quantité de matière entrante par rapport à la quantité de matière sortante.

L'approche granulaire pour un tel système ouvert constitue un réel atout par rapport aux approches classiques en mécanique des milieux continus ou des structures comme les systèmes de tenségrité. En effet, ajouter ou supprimer un grain, allonger ou raccourcir un

élément, permet de faire évoluer la masse et la géométrie du système en le perturbant à minima. Les mouvements de chaque cellule et les formes qu'elle adopte, poursuivent ainsi leurs évolutions spécifiques. Ces mouvements sont absents par exemple dans le modèle développé par Jamali et ses collaborateurs qui considèrent par ailleurs un ensemble de cellules toutes identiques (Jamali et *al.*, 2010).

En outre, la description proposée, de part sa simplicité, permet d'avoir des temps de calcul raisonnables de l'ordre d'une dizaine d'heures en fonction du scénario choisi. De plus, étant donnée la quantité d'information disponible et la discrétisation du système, ce type de modèle apparaît performant bien que restant encore à optimiser.

Par ailleurs, l'approche granulaire n'exclut ni la représentation d'une structure cytosquelettique évolutive ni la possibilité d'une description tridimensionnelle d'un tissu constitué de cellules interconnectées (cf. chapitre suivant).

5.5. Intérêt de l'approche multidisciplinaire

L'analyse combinée des études biologiques, statistiques et mécaniques a permis de mettre en lumière des clefs organisationnelles de la morphogenèse épithéliale. Cette étude pluridisciplinaire s'appuie sur des modèles biologiques variés (*Ciona intestinalis*, épithéliums de cellules COS et épithéliums columnellaires de drosophile), le développement d'outils statistiques spécifiques à l'analyse intra et inter tissulaire ainsi que sur un modèle numérique granulaire permettant de tester une large gamme de paramètres, notamment ceux difficiles à contrôler expérimentalement. Les allers-retours successifs entre observations expérimentales, analyses statistiques et simulations numériques avec une attention particulière portée aux ressemblances entre objets réels et virtuels, ont permis de mieux comprendre certains facteurs importants qui animent la morphogenèse épithéliale (vitesse de développement, taux d'apoptose et de division) et qui peuvent l'influencer (rôle de la surface de développement). Ainsi, il a été possible de montrer que le caractère dynamique de la morphogenèse épithéliale est fondamental (vitesse d'accrétion, renouvellement cellulaire via la division et l'apoptose) pour l'organisation du tissu et qu'il peut être garant de la reproductibilité des tissus entre individus.

6. Vers de nouveaux travaux

Les chapitres précédents ont été consacrés à la description de modèles granulaires de morphogenèse et aux résultats qu'ils ont produits. Rappelons que cette approche constitue une première étape dans l'étude numérique de la morphogenèse. Les travaux présentés dans cette partie du mémoire concernent des ébauches de nouvelles simulations dans de nouveaux contextes et des pistes d'évolution possibles de ces modèles.

Dans un premier temps, d'autres simulations de morphogenèse par accréation ont été testées pour générer des tissus composés d'un nombre plus important de cellules. Nous verrons que de tels épithéliums conservent les propriétés topologiques d'un tissu à 60 cellules, comme observé expérimentalement. Ensuite, un modèle de tissu de type « hyperprolifératif », c'est à dire composé de cellules ayant des durées de cycle différentes est présenté. Puis, une nouvelle modélisation de cellule dite « treillis », destinée à prendre en compte les paramètres liés à sa structure interne, est décrite. La représentation d'un cytosquelette dans ce modèle offre de nouvelles perspectives, mais présente certaines difficultés. Tenant compte de ce constat, un second modèle granulaire de cellules est proposé. Il permet de résoudre une partie des problèmes posés par l'approche treillis tout en conservant ses avantages. Enfin, nous discuterons de l'intérêt de son intégration dans l'approche développée pour la morphogenèse afin de simuler la structuration des réseaux du cytosquelette lors du développement tissulaire.

6.1. Conservation de la structure folliculaire sur les œufs d'ascidies

L'œuf de *Ciona intestinalis* est notre modèle expérimental de référence pour étudier la formation d'épithéliums par accréation cellulaire (paragraphe 2.3.1). *Ciona intestinalis* n'est cependant que l'un des très nombreux représentants de la famille des ascidies (plus de 2300). L'étude de quatre autres espèces (*Ascidella aspersa*, *Molgula citrina*, *Phallusia mammillata*, *Styela clava*) par nos collègues biologistes a montré qu'un même morphotype de la structure folliculaire des œufs est retrouvé chez ces ascidies et qu'il est analogue à celui de *Ciona intestinalis* (Figure 6-1). Seul varie le nombre de cellules folliculaires recouvrant les œufs (entre 60 chez *Ciona intestinalis* et 350 chez *Styela clava*).

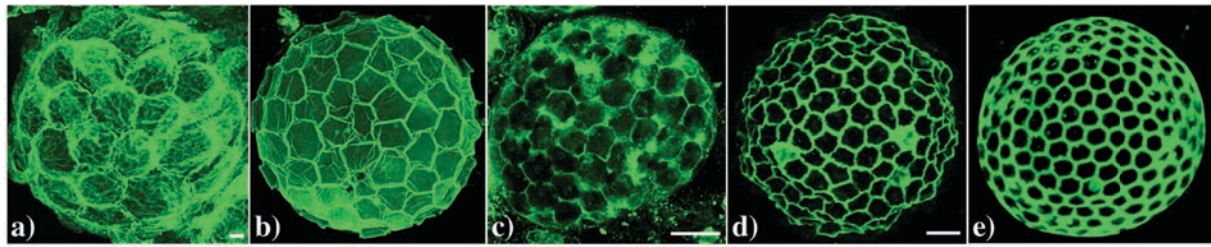


Figure 6-1 : Système folliculaire des œufs d'ascidies. Le nombre de cellules folliculaires pour chaque espèce est donné par n. (a) *Ciona intestinalis* (n=60), (b) *Ascidella aspersa* (n=150), (c) *Molgula citrina* (n=200), (d) *Phallusia mammillata* (n=300), (e) *Styela clava* (n=350).

Après avoir simulé la morphogénèse de l'œuf de *Ciona intestinalis* (paragraphe 3.3.3.), il a paru intéressant de tester le modèle sur des systèmes d'accrétion avec un plus grand nombre de cellules. Les simulations reposent sur le même principe : dix cellules sont placées aléatoirement à la surface d'une sphère, elles croissent en même temps que la sphère tandis que de nouvelles cellules arrivent et se positionnent aléatoirement dans les espaces libres.

L'accrétion d'un nombre de cellules plus élevé a toutefois nécessité de modifier les vitesses de croissance des cellules et de l'œuf ainsi que celle d'accrétion. Des nouvelles valeurs ont été déterminées empiriquement par « essais et erreurs » afin d'obtenir un nombre final de cellules proche de celui observé expérimentalement. Deux morphogénèses d'épithéliums folliculaires d'œuf d'ascidie ont ainsi été simulées ; elles correspondent aux espèces *Ascidella aspersa* et *Molgula citrina*, pour lesquelles le nombre de cellules folliculaires est respectivement de 150 et 200 (Figure 6-2).

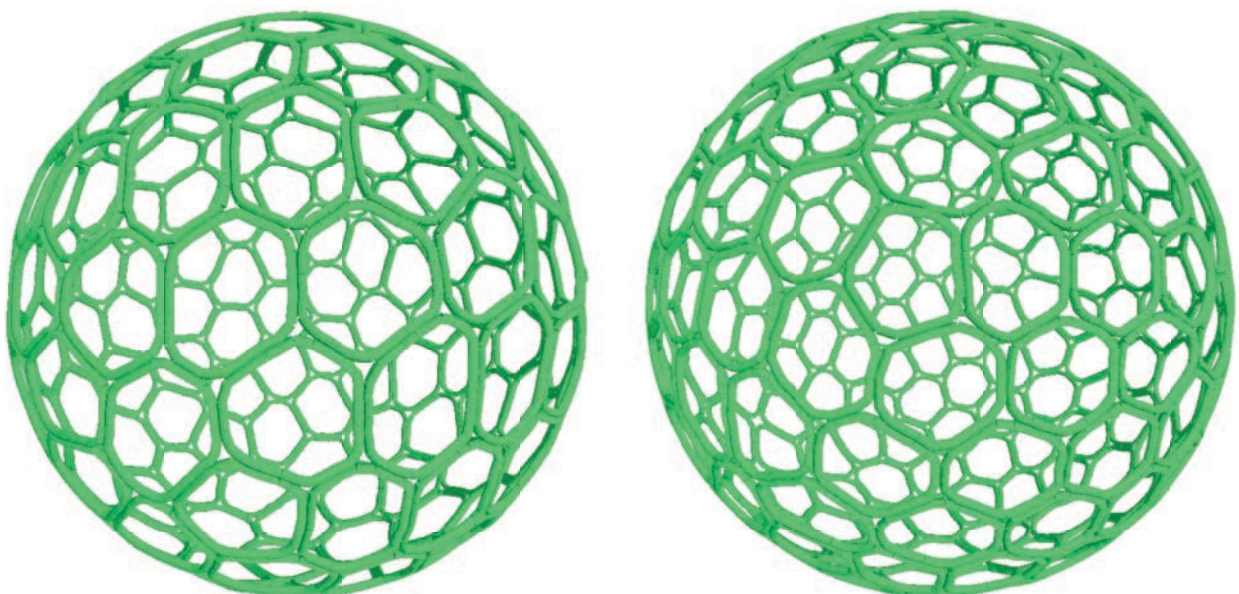


Figure 6-2 : Simulation de morphogénèse folliculaire sur un œuf d'*Ascidella aspersa* (gauche) et *Molgula citrina* (droite). Le nombre de cellules en fin de simulation est respectivement de 145 et 213.

Les distributions de voisins des cellules (Tableau 6-1) pour ces simulations sont comparables entre elles et à celles obtenues pour le modèle d'accrétion de *Ciona intestinalis* (cf. paragraphe 4.4). Ceci tend à confirmer la stabilité topologique des épithéliums issus du mode de formation par accrétion, et ce, quel que soit le nombre de cellules.

Espèce biologique modélisée	tétragone % ET	pentagone % ET	hexagone % ET	heptagone % ET	octogone % ET	Nombre de simulations	Nombre moyen de cellules
<i>Ciona intestinalis</i>	0,2% 0,5	31,7% 4,7	62,2% 6,1	6,0% 2,5	0,0% 0,0	11	58,8
<i>Ascidella aspersa</i>	0,4% 0,5	29,3% 3,8	62,0% 2,9	8,2% 1,7	0,0% 0,0	9	145,7
<i>Molgula citrina</i>	0,9% 0,5	33,0% 1,6	59,9% 2,1	6,1% 1,6	0,0% 0,0	5	213,3

Tableau 6-1 : Résultats des distributions des formes polygonales des cellules pour les simulations de *Ciona intestinalis* (VDT référence), d'*Ascidella aspersa* et de *Molgula citrina*.

Il faut cependant noter que ces tissus comportent plus d'« imperfections » que ceux formés avec 60 cellules. Une fois la simulation arrêtée, c'est à dire quand la somme des surfaces des cellules est égale à 99% de la surface de la sphère, il subsiste plus d'espaces entre les cellules. Ce critère d'arrêt semble ne plus être adapté avec 150 et à fortiori 200 cellules.

L'explication vient de l'approximation faite lors de la somme des surfaces des cellules. Les membranes pouvant s'interpénétrer, plus il y a de membranes et plus cette approximation est grande. C'est pourquoi le critère d'arrêt utilisé pour *Ciona intestinalis* est moins précis pour un nombre plus important de cellules s'organisant sur un œuf de taille supérieure.

En effet, dans toutes les simulations, les cellules sont de même taille alors que la sphère est plus grande. L'aire correspondant à 1% de la surface d'une sphère accueillant 60 cellules est donc plus petite que pour celle avec 150 ou 200 cellules qui présentera un espace libre en fin de la simulation plus grand pour une taille de cellule donnée.

Afin de réduire ces espaces entre les cellules, qui n'ont pas lieu d'être car ne correspondant pas aux observations expérimentales, il faut corriger ce critère. Une solution serait d'augmenter la rigidité des membranes afin de limiter l'interpénétration, (cf. paragraphe 3.4.1) ce qui diminuerait l'erreur mais rendrait le système plus instable (effets dynamiques amplifiés). Une deuxième consisterait à calculer la surface des membranes interpénétrées, cependant cela serait coûteux en temps. Une autre alternative serait d'augmenter la valeur de 99% du critère d'arrêt jusqu'à diminuer suffisamment l'espace libre à la fin du calcul.

En outre, les espaces entre les cellules ont pour conséquence de légèrement biaiser le calcul du nombre de voisins. Les cellules étant moins contraintes du fait des espaces libres,

elles ont parfois moins de voisins et les calculs de leurs distributions s'en trouvent légèrement altérés.

Une amélioration du critère d'arrêt permettrait de réaliser des campagnes de calcul avec des données statistiques plus fiables, c'est à dire sans espace libre entre les cellules et avec un plus grand nombre d'échantillons.

6.2. Les épithéliums hyperprolifératifs

Nous avons ensuite simulé des développements tissulaires en incluant le processus d'hyperprolifération en 2D (paragraphe 5.2.1) sur une surface sphérique, en s'appuyant sur le modèle de tissu prolifératif (cf. paragraphe 3.3.4). L'objectif est de montrer la faisabilité de l'application de cette approche à une nouvelle modélisation numérique, en l'occurrence celle de la prolifération d'une population composée de deux types de cellules ayant des durées de cycle différentes. Les cellules qui se développent plus vite sont dites « hyperprolifératives » et les autres « normales ». Les simulations rendent compte du développement de ces deux types cellulaires et visent, en particulier, à étudier leurs topologies respectives ainsi que celles de l'ensemble de la population.

Nos collègues biologistes de l'ISEM ont observé que les cellules hyperprolifératives sont généralement de plus petite taille que les autres. Un nouveau type de cellule est donc intégré dans le modèle, la différence étant liée au nombre maximum de grains internes (divisé par deux). Leur cycle de division cellulaire est également plus rapide. Le nombre de cellules hyperprolifératives est ainsi plus important dès la fin du premier cycle et la différence entre le nombre de représentants de chaque type augmente régulièrement.

La simulation débute par une disposition aléatoire, sur la sphère, de cellules dont la moitié est choisie comme étant hyperproliférative. Ensuite, ces deux types de cellules se multiplient et meurent jusqu'à recouvrir la surface de la sphère.

Les deux familles se distinguent par la couleur de l'intérieur de la cellule (Figure 6-3) : rouge (clair et foncé, selon l'effet d'ombre) pour les cellules hyperprolifératives et transparent pour les cellules normales.

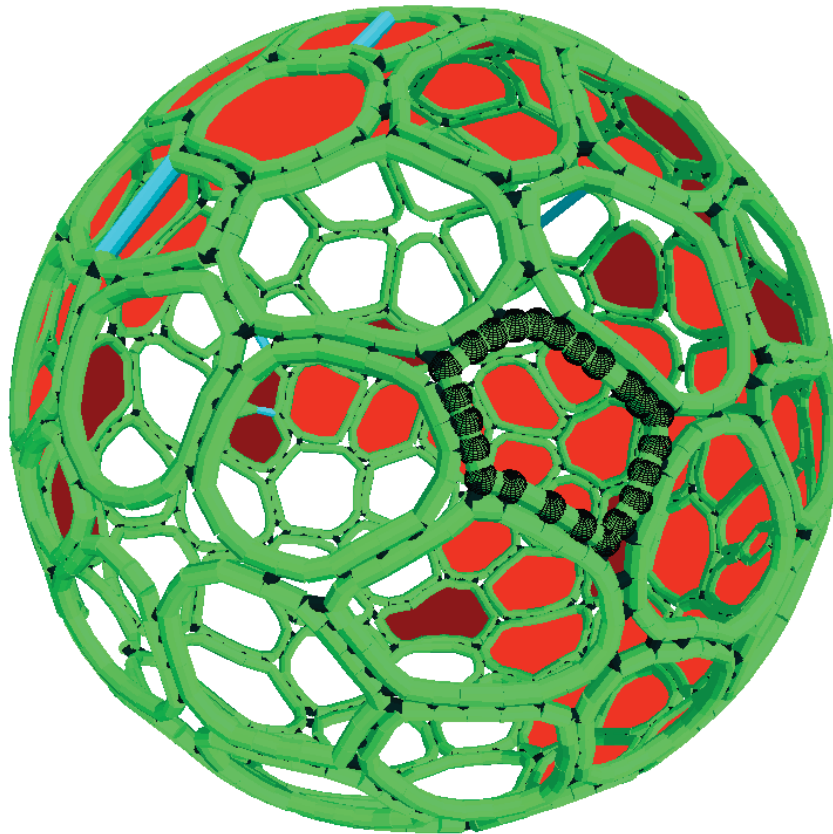


Figure 6-3 : Tissue en formation contenant des cellules hyperprolifératives (en rouge) et normales (transparentes). Les éléments noirs entre les cellules représentent les cadhérines. La cellule ayant ses grains membranaires en noir est une cellule en apoptose. Les éléments en bleu au milieu de certaines cellules représentent l’anneau d’actine lors de la division cellulaire.

Afin d’accroître l’hyperprolifération, on pourrait envisager d’augmenter la vitesse de croissance des cellules concernées ou encore de modifier le taux apoptose/division. Ceci contribue à réduire le temps du cycle cellulaire ou à augmenter le nombre de cellules hyperprolifératives.

Toutefois, sur le plan expérimental l’hyperprolifération en 2D n’est pas maîtrisée. Le plus souvent, des tumeurs apparaissent c’est à dire des « agrégats » de cellules au-dessus de l’épithélium. Dans ce cas, la géométrie du tissu ne peut s’étudier qu’en 3D.

Il est évident qu’avec la modélisation proposée précédemment, ce type de représentation n’est pas possible. Pour y parvenir, il faudrait que les cellules soient modélisées en 3D, ce qui n’est pas sans poser un certain nombre de difficultés. En premier lieu, la structure même de la cellule serait à revoir. La cellule polygone enfermant les grains grâce à des contacts grain-élément devrait devenir un polyèdre contenant des grains grâce à des contacts grain-surface. Par ailleurs, il faudrait également revoir le contact cellule-cellule, la division cellulaire, etc. Toutefois, les travaux sur les milieux granulaires et leur

modélisation numérique effectués au LMGC laissent penser que ces difficultés doivent pouvoir être surmontées.

L'approche hyperproliférative proposée ici permet néanmoins de montrer la faisabilité de la cohabitation de deux types de cellules et jette les bases d'un futur développement 3D. Il faut toutefois noter que le passage à la 3D augmenterait considérablement le temps de calcul. Cependant l'organisation des données en décomposition de domaine, déjà réalisée pour le modèle bidimensionnel, permet de diminuer ce temps de calcul grâce à la parallélisation et l'utilisation des clusters.

6.3. Modèle intracellulaire de type « treillis »

6.3.1. Introduction

Le modèle granulaire de cellule utilisé jusqu'à présent rend compte du comportement mécanique global de la cellule, pour faciliter le passage à l'échelle du tissu. Une description plus fine, c'est à dire intégrant des composants du cytosquelette (réseaux entremêlés de filaments d'actine, de microtubules et de filaments intermédiaires) qui confèrent à la cellule ses propriétés mécaniques, permettrait alors de modéliser son organisation structurale évolutive et son comportement mécanique à l'échelle intracellulaire.

L'approche utilisée pour la morphogenèse épithéliale convient bien pour simuler la croissance, la division, l'apoptose et permet de rendre compte des formes cellulaires au sein d'un tissu. Une modélisation complémentaire du cytosquelette permettrait, par conséquent, de mettre en évidence des « chaînes de forces » dans les cellules et entre les cellules du tissu. Reliés aux liaisons cadhérines (déjà implémentées dans le modèle granulaire), les cytosquelettes des cellules seraient alors interconnectés et pourraient ainsi mettre en évidence des voies privilégiées de mécanotransduction au sein du tissu ainsi que dans les cellules.

Afin d'aller vers une telle description intracellulaire, nous proposons de poser les bases d'un modèle de type « treillis » de la cellule où celle-ci est décrite comme un ensemble de grains massiques liés par un assemblage régulier d'éléments ressorts. L'idée est alors de pouvoir étudier la restructuration dynamique du cytosquelette lors de l'étalement cellulaire (Figure 6-4 ; Galbraith et Sheetz, 1998 ; Stamenovic et Ingber, 2009 ; Loosli et *al.*, 2010).

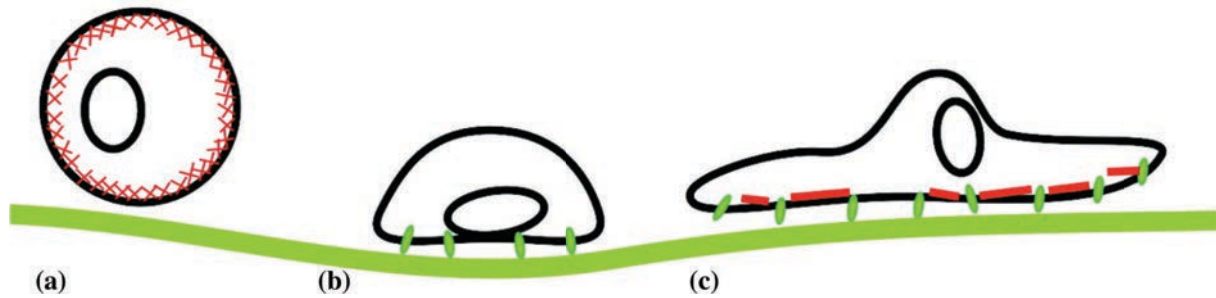


Figure 6-4 : Schéma d'évolution d'étalement d'une cellule. Initialement en suspension (a), elle s'aplatit et crée des points d'adhésion (b) puis s'étale (c) (Loosli et *al.*, 2010).

Pour représenter le cytosquelette et à l'instar de la plupart des approches structurales développées à ce jour, seuls les filaments d'actine et les microtubules sont ici directement considérés, modélisant ainsi des réseaux de compression et de traction. Les filaments intermédiaires, plus stables, ne sont pas pris en compte en tant que tel. On peut cependant considérer que leur rôle mécanique est en partie et indirectement considéré au travers du réseau de tensions. En outre, le type et la fonction de ces filaments est variable selon les catégories cellulaires (vimentine, kératine, neurofilaments, etc.).

Par ailleurs, pour cette modélisation en 2D, la cellule n'est plus vue « de dessus » (comme dans le cas du modèle granulaire de morphogenèse) mais « en coupe verticale ». L'étalement de la cellule doit donner des indications concernant le lien entre sa forme et la distribution des efforts internes ainsi que sur la réorganisation dynamique du cytosquelette. La structuration de la cellule est rendue « dynamique » par la modification des caractéristiques des éléments en fonction des sollicitations mécaniques supportées.

6.3.2. La description du modèle

À la différence du modèle granulaire pour lequel les contacts entre grains sont considérés, cette approche « structure » ne prend en compte que les efforts résultant de la traction et de la compression des éléments. Le bilan de ces forces est alors effectué pour chaque grain, sa position et sa vitesse étant ensuite déterminée à partir de la deuxième loi de Newton suivant un schéma d'intégration RK4. La résolution est analogue à celle qui est présentée au paragraphe 3.4.

Dans sa configuration initiale (Figure 6-5), la cellule est composée des trois types d'éléments suivants :

- les éléments cytoplasmiques (en rouge), représentant un maillage du cytoplasme, peuvent travailler en traction ou en compression : ils servent de support à la structuration du cytosquelette ;
- les éléments membranaires (en vert), modélisant la membrane et l'actine corticale (réseau d'actine sous la membrane), peuvent travailler en traction essentiellement ;
- les éléments « noyaux » (en noir) simulant le noyau et le centrosome (à partir duquel s'organise le réseau de microtubule), sont infiniment rigides par rapport aux deux autres types d'éléments.

En outre, les positions initiales des extrémités de tous ces éléments correspondent à leur longueur à vide respective, les ressorts associés étant ainsi ni tendus ni comprimés.

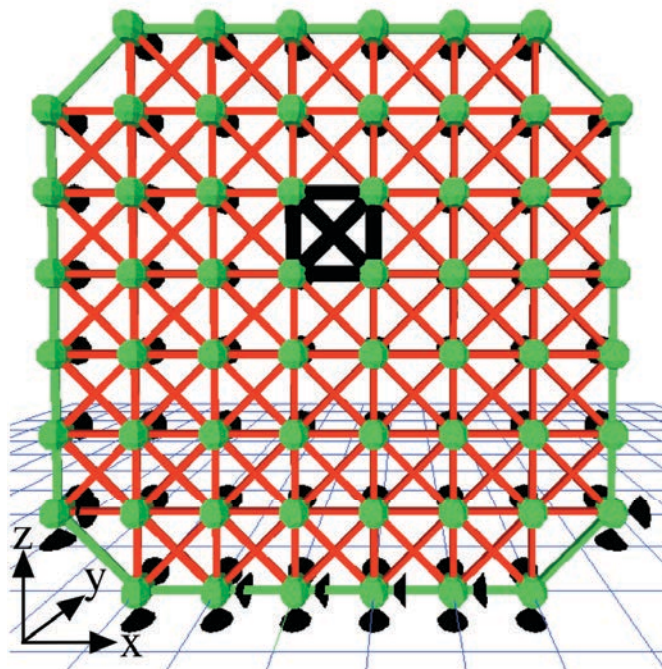


Figure 6-5 : Configuration initiale de la cellule.

Tous ces éléments sont liés par les grains et peuvent se mouvoir uniquement dans le plan vertical (x, z). Ils sont bloqués en déplacement dans la direction y . En outre, les grains à la base de la cellule sont bloqués en z pour deux d'entre eux et en x et z pour les six autres. Ces blocages, représentés par des cônes noirs (Figure 6-5) simulent l'adhésion de la cellule au substrat à l'état initial de la simulation. La « tranche » de cellule modélisée va alors s'étaler sur le substrat tout en restant dans le même plan vertical.

Lors de l'étalement de la cellule sur un substrat, elle va se fixer puis progressivement s'aplatir et finalement peut-être se mouvoir. La structure modélisant la cellule reste inchangée. La simulation de cet étalement nécessite donc d'introduire un processus

« moteur » qui va induire la modification de la structure et, par conséquent, la génération de forces de tension et de compression. Pour ce, le déplacement de deux grains, modélisant le front d'étalement, et la modification des caractéristiques de quatre éléments membranaires liés à ceux-ci sont imposés (Figure 6-6). Les grains sont translatés vers le substrat et les éléments sont transformés en éléments « actomyosine » agissant avec une tension constante (leur longueur libre est modifiée lors des calculs afin qu'ils gardent une même tension).

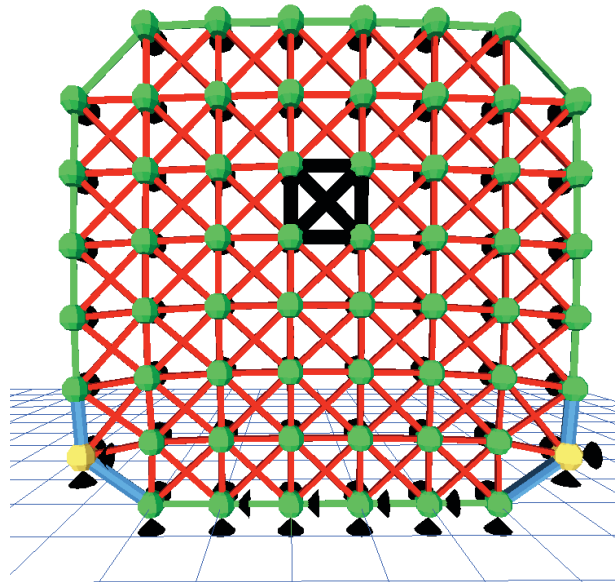


Figure 6-6 : Première étape de modification de la cellule. En bleu les éléments « actomyosine » et en jaune les grains dont le déplacement est imposé.

En réaction à ces modifications imposées, la géométrie de la structure et son état de contrainte évoluent. Les forces dans les éléments cytoplasmiques, initialement nulles, deviennent alors hétérogènes, certains se trouvant en compression et d'autres en traction (Figure 6-7).

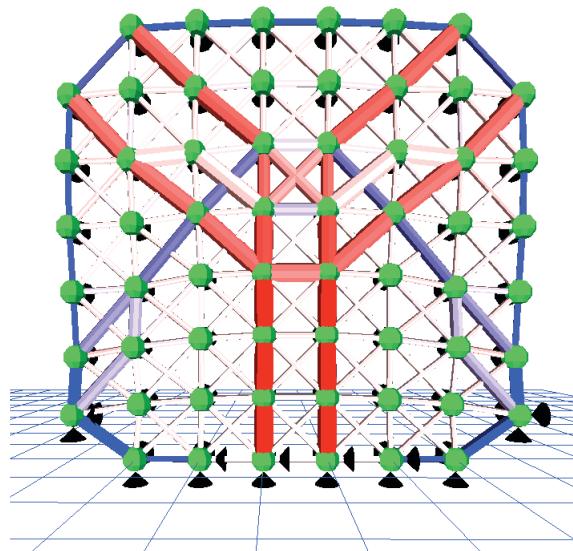


Figure 6-7 : Etat de contrainte dans les éléments de la cellule. Plus un élément est comprimé, plus il est rouge ; plus un élément est tendu, plus il est bleu.

Le cytosquelette est un ensemble de biopolymères en constante évolution. Les réseaux de filaments d'actine et de microtubules qui le composent, suivent en effet des cycles de polymérisation/dépolymérisation. Les monomères d'actine présents dans le cytoplasme s'assemblent (ou se dissocient) pour former des filaments pouvant eux-mêmes constituer des structures diverses en fonction des régions intracellulaires où ils se trouvent (cortex d'actine sous-membranaire, filopodes, fibres de tension basales, etc.). De même, les microtubules se forment à partir de tubulines (monomères) présentes dans le cytoplasme et se dépolymérisent parfois soudainement (phénomène dit de « catastrophe »). Lors de l'adhésion et de l'étalement d'une cellule sur un substrat, des fibres de tension se forment surtout au niveau de la face basale (Stricker et al., 2010) faisant le lien entre les points d'adhésion. Les microtubules, quant à eux, croissent depuis le centrosome (localisé au centre de la cellule) vers les zones d'adhésion qu'ils rejoignent (Goode et al., 2000). Ces processus se déroulent en parallèle jusqu'à l'établissement d'une structure tridimensionnelle constituant la charpente de la cellule alors « totalement » étalée. De plus, il est connu qu'en réaction à des sollicitations mécaniques, le cytosquelette se consolide (Howard et Hyman, 2007 ; Hirata et al., 2008 ; Fletcher et Mullins, 2010). Nous avons donc développé un mécanisme de formation du cytosquelette dépendant de l'état de contrainte intra-cellulaire.

Cette structuration, c'est à dire la création de « câbles d'actine » et de « barres microtubules » (pour reprendre l'analogie avec les systèmes de tensegrité), s'effectue alors en réponse à l'état de contrainte dans les éléments du cytoplasme. Leurs caractéristiques évoluent en fonction de règles simples que nous avons choisies. Les éléments dont l'effort de

compression est inférieur à un seuil minimal deviennent des éléments « microtubule » (augmentation de la rigidité en compression par rapport à celle des éléments cytoplasmiques), et ceux dont l'effort de traction est supérieur à un seuil maximal deviennent des éléments « actine » (augmentation de la rigidité en traction). Lorsque l'effort dans un élément précédemment « actine » ou « microtubule » est compris entre ces deux valeurs, il redevient élément cytoplasmique.

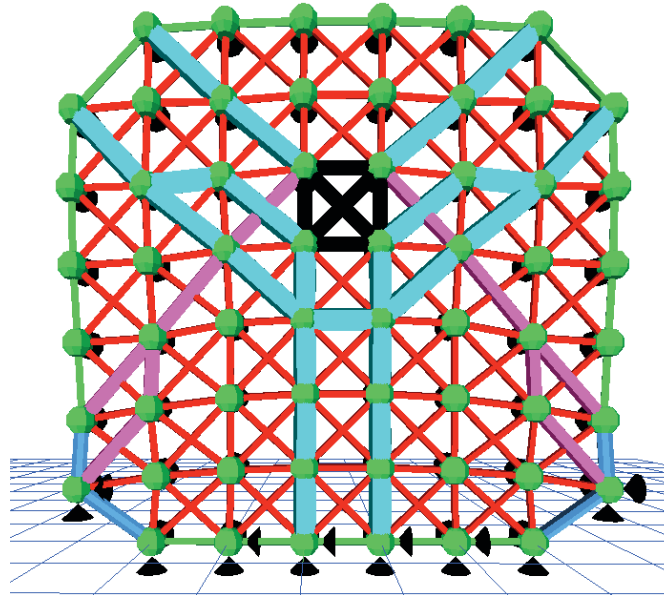


Figure 6-8 : Certains éléments cytoplasmiques sont devenus des éléments « microtubule » (en cyan), d'autres des éléments « actine » (en violet).

De plus, les éléments cytoplasmiques ont les mêmes propriétés en traction et en compression, alors que les éléments « actine » travaillent essentiellement en tension (comme les éléments membranaires) et les éléments « microtubule » en compression. On obtient ainsi une nouvelle structure de la cellule en réaction aux déplacements imposés et aux modifications induites par ces règles ; les éléments cytoplasmiques en rouge doivent alors être perçus comme un maillage du reste du cytoplasme indifférencié (Figure 6-8).

6.3.3. Quelques résultats préliminaires

Lors des simulations, les translations des deux grains membranaires de la cellule sont imposées de façon progressive. Elles entraînent le déplacement de l'ensemble de la structure via les éléments « actomyosine » qui leur sont liés, générant ainsi en son sein des réseaux de forces de traction et de compression (Figure 6-9).

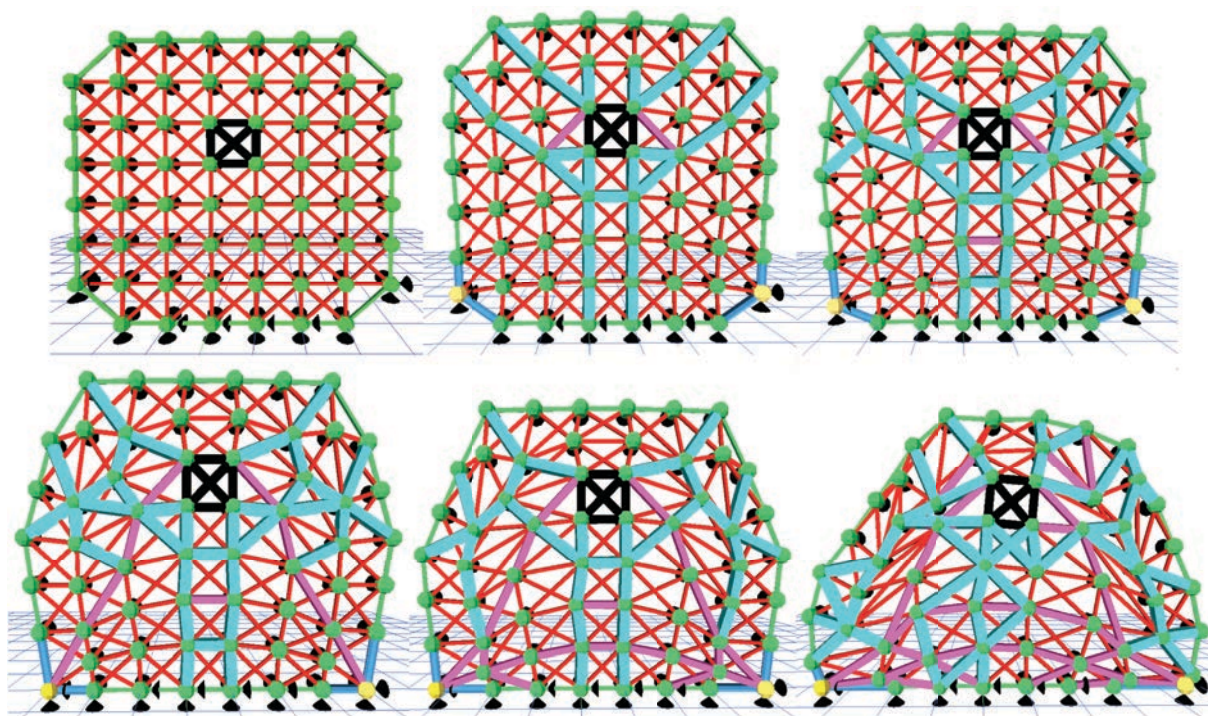


Figure 6-9 : Évolution de la déformation de la cellule lors du déplacement imposé. Les éléments « microtubule » comprimés sont en cyan et les éléments « actine » tendus sont en violet, les éléments cytoplasmiques indifférenciés sont en rouge, les éléments membranaires tendus en vert, les éléments « actomyosine » en bleu et le noyau représenté par des éléments quasi-rigides en noir. Les grains « moteurs » sont représentés en jaune.

Dans un premier temps les deux grains « moteur » sont déplacés vers le substrat puis, une fois qu'ils adhèrent, on leur impose un mouvement d'écartement latéral. Ces conditions ont pour conséquence d'aplatir la cellule, ce qui correspond aux observations expérimentales. En ce qui concerne l'intérieur de la cellule, les caractéristiques des éléments cytoplasmiques se modifient en suivant les règles décrites précédemment : les efforts de compression (respectivement de traction) sont repris par les éléments « microtubule » (respectivement « actine »). On observe le rayonnement des éléments « microtubule » à partir du noyau (auquel le modèle, en première approximation, associe le centrosome) et vers la membrane ainsi que la création d'un réseau d'éléments « actine » entre les grains à déplacements imposés. La connexion entre ces grains est d'abord indirecte, via le noyau, pour devenir par la suite directe, rappelant les fibres de tension basales.

Les résultats qualitatifs obtenus avec ce modèle sont comparables à certains résultats expérimentaux et numériques connus (Milan et *al.*, 2007 ; Maurin et *al.*, 2008). Les éléments « actine » et « microtubule » sont répartis dans l'ensemble de la cellule et forment des réseaux liés. De plus, les éléments « microtubule » rayonnent du noyau vers la membrane tendue,

cette forme particulière s'explique par le fait que la rigidité des éléments du noyau est importante par rapport aux autres éléments (Caille et *al.*, 2002). Ils « concentrent » donc les contraintes et le réseau d'éléments en compression s'organise à partir de cette région. Le réseau d'élément « actine » se crée entre les grains en translation et via le noyau. Ceci s'explique par le fait que la distance entre les grains augmente à cause des déplacements imposés. La structure s'étire alors et des éléments « actine » peuvent alors se former. Par ailleurs, le noyau étant stabilisé au centre de la cellule par les éléments « microtubule », les éléments cytoplasmiques situés entre le noyau et les grains translatés vont être en tension et ainsi se transformer en élément « actine ».

Le choix des valeurs seuils pour générer des filaments d'actine ou des microtubules, a été mené de façon empirique. Elles ont été déterminées afin que tous les éléments cytoplasmiques ne deviennent pas des éléments « actine » ou « microtubule ». Si ces valeurs sont trop faibles (proches de 0), les éléments deviendront facilement élément « actine » ou « microtubule », avec pour conséquence une cellule difficilement déformable par la suite (phénomène dit de « sur-structuration »). Si ces valeurs sont trop élevées, aucun élément ne sera transformé et il n'y a pas ou peu de structuration de cytosquelette.

Les résultats issus de ce modèle rendent bien compte de l'évolution de la cellule mais le cas de trop grandes déformations en montre une limite (Figure 6-10). La structure ne peut plus évoluer, ni retrouver sa forme initiale, si les translations des grains à déplacement imposé sont trop importantes.

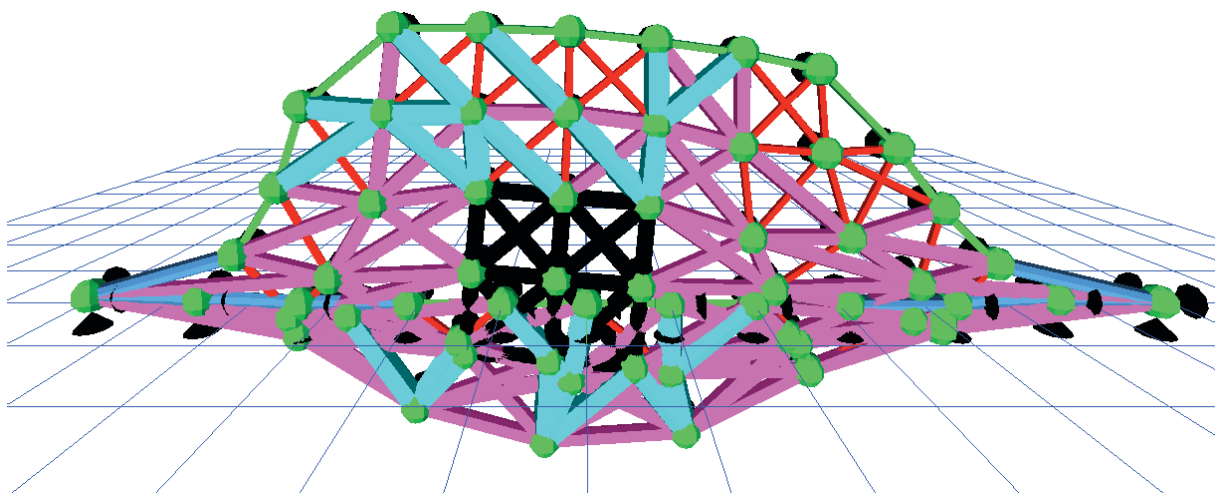


Figure 6-10 : Cellule irréversiblement déformée.

6.3.4. Bilan

Des règles simples, gérant la structuration de la cellule et son caractère dynamique, permettent pour de faibles déformations de suivre l'évolution du cytosquelette et de la forme cellulaire en réponse à des modifications imposées.

Néanmoins, une discrétisation de la cellule par des éléments présente l'intérêt de mieux appréhender son état mécanique à l'échelle sub-cellulaire. Le fait de modifier les caractéristiques mécaniques des éléments permet de faire évoluer les propriétés mécaniques de la cellule ainsi que sa forme. En revanche, ce modèle ne permet pas de grandes déformations du fait de sa structure « treillis ». Cet inconvénient ainsi que le caractère irréversible de la forme cellulaire contraint quelque peu le domaine d'utilisation de cette approche. Pour des études faisant appel à de plus grandes déformations, une autre méthode s'avère nécessaire.

L'idée est alors de proposer un autre modèle qui conserve l'aspect dynamique et évolutif de la structuration du cytosquelette tout en s'affranchissant d'une trop grande rigidité de la structure. Le paragraphe suivant présente un exemple développé au cours de ce travail de thèse.

6.4. Modèle intracellulaire de type granulaire

6.4.1. Introduction : description du modèle

L'objectif de ce modèle, toujours bidimensionnel et dans le plan vertical, est également d'étudier l'étalement d'une cellule sur un substrat, en particulier l'évolution de sa forme ainsi que de son organisation interne. Afin de s'affranchir du problème de rigidité trop importante de la cellule « treillis », le cytoplasme est modélisé ici par des grains massiques (en orange) en interaction et pouvant se déplacer dans le plan (Figure 6-11). Les grains représentant le noyau (en anthracite) sont liés par des éléments très rigides. Les constituants sont entourés par des grains membranaires (en vert) liés par des éléments membranaires (ressorts) qui maintiennent les grains cytoplasmiques à l'intérieur (via des contacts grain-grain). Il faut préciser que les contacts grain-élément ne sont pris en compte. La cellule ainsi formée repose sur un substrat, représenté par un alignement de grains (en blanc) bloqués en déplacement dans les trois directions. Il est à noter que l'espace intracellulaire n'est pas complètement rempli de grains, ceci afin d'accorder au modèle une plus grande capacité de déformation.

Les efforts résultant de traction ou de compression dans les éléments membranaires ainsi que les contacts entre grains sont pris en compte. Le bilan des forces est réalisé pour chaque grain et permet de déterminer ses nouvelles positions et vitesse en utilisant le même schéma d'intégration explicite que précédemment.

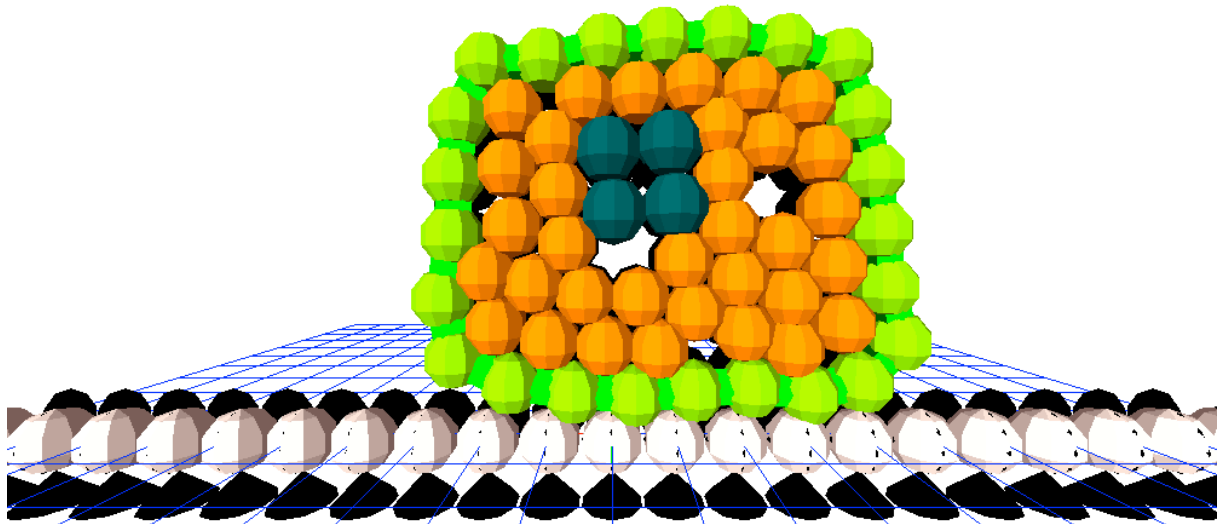


Figure 6-11 : Situation initiale : cellule vue en coupe sur le substrat. En orange, les grains cytoplasmiques, en noir les grains « noyau », en vert les grains membranaires et en blanc les grains « substrat ».

Afin de permettre à la cellule de se déformer le plus « librement » possible et de s'étaler, des lois simples sont implémentées. Concernant la membrane, la longueur de ses éléments augmente si l'effort normal est supérieur à une valeur spécifiée. De plus des éléments « filopode », travaillant à tension constante, sont créés entre la membrane et le substrat afin de simuler de possibles protrusions membranaires (formation de filopodes ou de lamellipodes) qui vont permettre l'étalement de la cellule.

6.4.2. L'étalement cellulaire

Cet étalement s'effectue par étapes en fonction de la création des éléments « filopode » (Figure 6-12). Ils lient des grains membranaires, choisis aléatoirement (en rouge), avec des grains « substrat » si la distance les séparant est inférieure à une valeur seuil (correspondant ici à trois fois le diamètre des grains). En parallèle, la longueur totale de la membrane est augmentée tandis que de nouveaux grains membranaires sont choisis et, par conséquent, de nouveaux éléments « filopode » sont créés. Ainsi, la cellule s'étale progressivement sur le substrat.

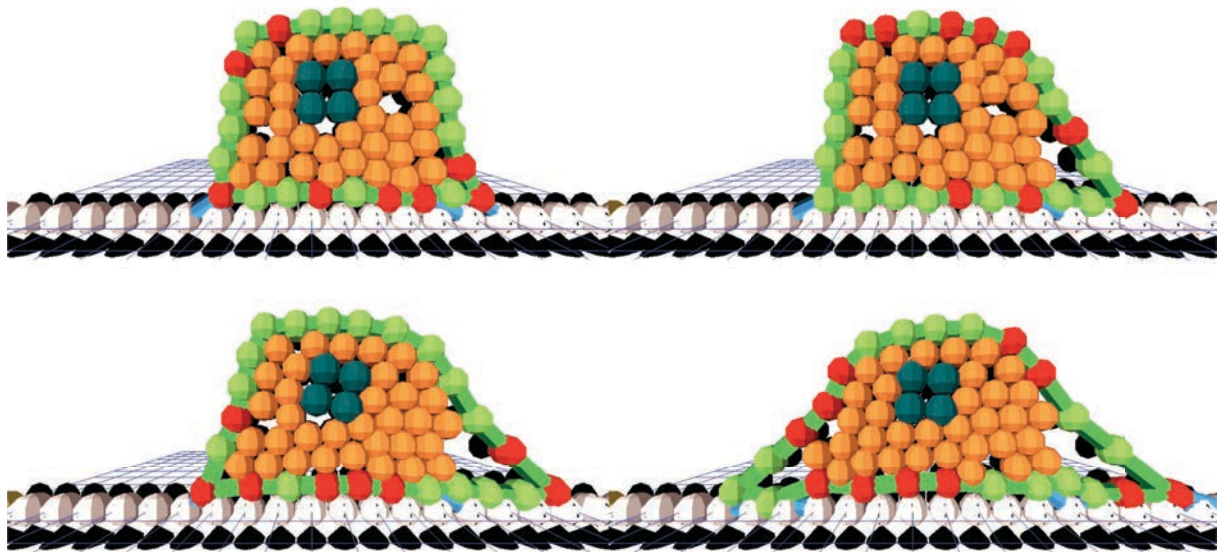


Figure 6-12 : Étapes de l'étalement cellulaire. En bleu les éléments « filopode », en vert la membrane, en anthracite le noyau et en rouge les complexes d'adhésion (de type intégrines).

Un tel modèle (Figure 6-12) est plus à même de représenter un étalement cellulaire sur de larges régions par rapport au modèle précédent de « treillis ». Les éléments filopodes tendent la membrane en l'amenant progressivement vers le substrat et les grains cytoplasmiques se répartissent à l'intérieur en fonction de cette évolution.

Le modèle a été toutefois construit de façon sommaire avec un nombre réduit de grains schématisant la cellule. Les grains cytoplasmiques ne remplissent en effet pas totalement la surface délimitée par la membrane. On remarque aussi que le fait que les grains soient tous de même rayon peut entraîner des blocages qui freinent leur mouvement dans la cellule, et donc son étalement ; il faudrait utiliser un milieu polydisperse pour y remédier. En outre, les réseaux de forces internes ne sont pas contrôlés pour représenter le cytosquelette. Des propositions de développement de sa structuration sont exposées au paragraphe 6.4.4.

6.4.3. Autres développements du modèle granulaire d'étalement cellulaire

Les éléments « filopode »

Afin de rendre plus réaliste l'étalement cellulaire des protrusions membranaires ont aussi été simulées par des éléments qui « sondent » l'espace environnant la cellule (Figure 6-13 ; Koestler et *al.*, 2008). Ils sont dirigés aléatoirement vers l'extérieur de la cellule et si leur extrémité est proche d'un grain du substrat, alors un élément à tension constante se forme entre eux.

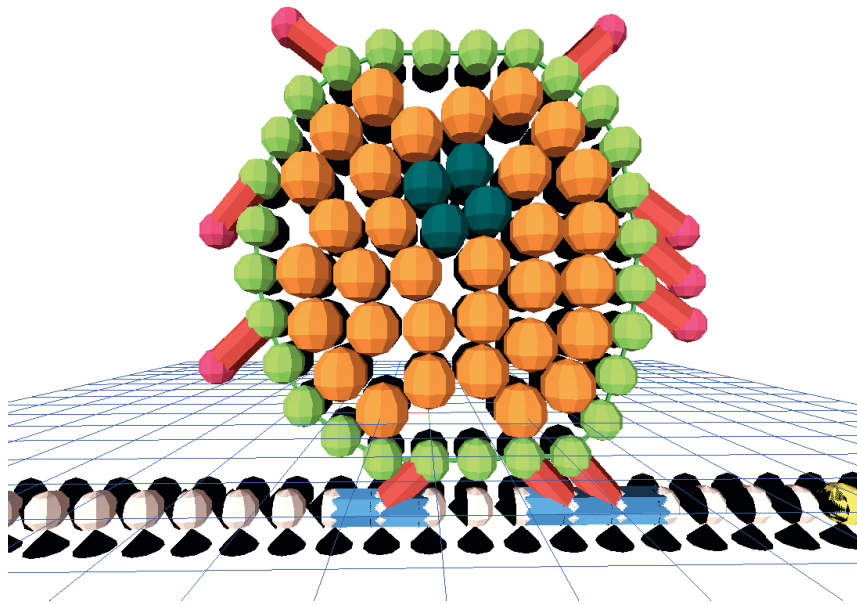


Figure 6-13 : Modèle granulaire de cellule avec des éléments « filopode » en rouge.

Ce modèle avec des extensions de membrane permet un étalement de la cellule semblable à celui présenté au paragraphe précédent (6.4.2). Les éléments « protrusion » permettent toutefois de mieux visualiser les modifications de forme de la membrane mais n'apportent rien de nouveau quant à l'évolution de la forme cellulaire au cours de l'étalement.

La double membrane

Dans le but de modéliser plus finement les protrusions membranaires, le cortex d'actine, jusque là intégré à la membrane, est à présent dissocié de celle-ci (Figure 6-14). Pour cela, une nouvelle membrane (en vert), n'ayant pas de propriétés mécaniques mais pour seul rôle de conserver l'intégrité de la cellule, est ajoutée sur la membrane existante (en violet), représentant l'actine corticale et conservant les propriétés mécaniques précédentes. Des éléments (en rouge) sont alors créés aléatoirement entre ces deux membranes et croissent. Si un grain de cette seconde membrane externe est proche d'un grain substrat, un élément à tension constante se crée alors entre les grains. Cette membrane se déplace ainsi vers le substrat, reproduisant une protrusion membranaire.

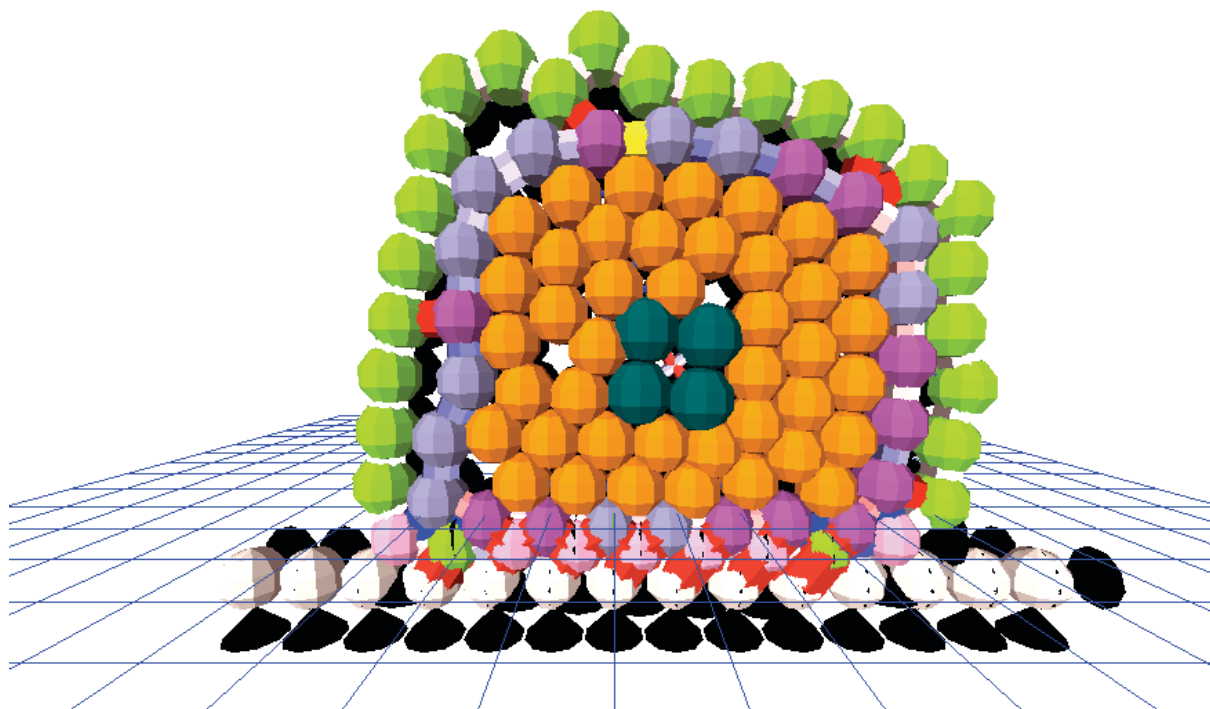


Figure 6-14 : Modèle granulaire de cellule avec une double membrane.

Cette amélioration du modèle va un peu plus loin dans la description de la géométrie de la membrane lors de l'étalement ; elle n'apporte toutefois pas de nouveauté majeure quant à l'évolution de la forme de la cellule par rapport au schéma avec une seule membrane.

Synthèse

L'apport de ces deux améliorations du modèle (ajout d'éléments « filopode » et d'une double membrane) se traduit essentiellement par une meilleure visualisation du processus. Il ne semble pas, à ce stade, opportun de les conserver dans de prochains développements, sachant qu'ils pourront être intégrés de nouveau en cas de besoin.

6.4.4. La structuration du cytosquelette de la cellule

Le modèle treillis représente une tentative de génération d'un cytosquelette à partir d'éléments modélisant le cytoplasme. Cependant, cette méthode ne permet pas d'avoir de grandes déformations. En revanche, le modèle granulaire est compatible avec cette contrainte. L'idée est à présent d'implémenter des nouveaux développements dans le modèle granulaire afin de pouvoir générer un cytosquelette en réponse aux sollicitations mécaniques des grains cytoplasmiques.

Une façon d'y parvenir serait d'utiliser des grains plus petits et donc espacés à l'instant initial puis de considérer leurs déplacements relatifs : lorsque deux grains s'éloignent (respectivement se rapprochent) une interaction de type traction (respectivement, compression) serait alors intégrée, ces réseaux représentant là encore les filaments d'actine et les microtubules.

D'autres pistes, basées sur une analyse des efforts mis en jeu, peuvent être envisagées pour créer un cytosquelette, par exemple, en intégrant de nouvelles lois entre les grains à partir de leurs contacts. En considérant un état de contacts donné, si l'effort entre les grains augmente au-delà (diminue en dessous) d'une valeur spécifiée, un élément « microtubule » (respectivement « actine ») est généré. Par ailleurs, si la valeur de l'effort normal dans ces deux types d'éléments est située entre ces deux seuils, alors l'élément concerné est supprimé. Les réseaux de microtubules et de filaments d'actine ainsi formés suivent un principe de structuration du cytosquelette en réponse à un état mécanique comme observé expérimentalement. Ils font apparaître des « chaines de forces » en compression ou en tension au sein de la cellule.

Une autre façon de décrire un cytosquelette, sur la base des efforts mis en jeu, serait de considérer un milieu cohésif au sein duquel les forces d'attraction (respectivement, de répulsion) représenteraient les filaments d'actine (respectivement, les microtubules).

Ces réseaux sont par ailleurs évolutifs en fonction de l'état de contact entre les grains cytoplasmiques. De plus, la modélisation du cytoplasme par des grains ne limite pas l'évolution de la cellule à de petites déformations. Cependant, pour affiner la description de la structure, il sera nécessaire de diminuer les tailles des grains tout en multipliant leur nombre.

6.4.5. Bilan

Bien qu'utilisant une discrétisation rudimentaire, cette approche permet de mettre en évidence plusieurs mécanismes lors de l'étalement de la cellule : réorganisation du cytosquelette, allongement de la membrane, évolution de forme, etc.

Dans le cas du modèle granulaire, la création d'éléments tendus entre la membrane et le substrat, couplée à un processus d'allongement de la longueur membranaire, suffisent pour rendre compte du changement de forme de la cellule lors de son étalement. De plus, la prise en compte des pressions entre grains cytoplasmiques permet de créer un cytosquelette, tout en conservant les avantages de la modélisation du cytoplasme par des grains. Il en résulte un

modèle de cellule pouvant admettre de grandes déformations tout en représentant l'architecture du cytosquelette.

6.5. Vers un modèle multi-échelles

La description du cytosquelette présente un réel intérêt dans une approche s'intéressant au niveau intracellulaire, à plus forte raison pour une intégration de cellules au sein d'un tissu. Il permet en effet d'aller au-delà de la description unicellulaire et de pouvoir étudier, par exemple, la mécanotransduction au sein d'un tissu en formation ou non (Orr et *al.*, 2006 ; Ingber, 2004 ; Mammoto et *al.*, 2012). Une idée serait donc pour cette approche multi-échelles, d'implémenter la structuration du cytosquelette telle que décrite dans le modèle granulaire de cellule (cf. paragraphe 6.4) au sein des simulations de tissus prolifératifs comme ceux présentés en deuxième partie du mémoire.

Cet ajout de nouveaux développements n'est toutefois pas possible sans formuler une hypothèse forte qui considère que les processus de structuration du cytosquelette lors de l'étalement sont analogues dans une cellule isolée et au sein d'un tissu. Dans ce cas, la modélisation de l'évolution du cytosquelette apparaît comme transposable. Des observations expérimentales restent cependant nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Les lois simples et régissant la structuration du cytosquelette, utilisées pour l'étalement cellulaire, seraient alors applicables à des cellules au sein d'un tissu. Des éléments « filopode » pourraient ainsi être créés entre les cellules. Celles-ci étant en interaction, la membrane de chacune subirait des déformations dues au contact avec les voisines, ce qui perturberait l'état d'équilibre des grains internes. Les pressions de contact seraient alors croissantes (ou décroissantes) et des éléments « microtubule » (respectivement « actine ») seraient générés. Ainsi les cytosquelettes seraient connectés à travers les éléments « cadhérine » ce qui ouvrirait la voie à de nouvelles études dont notamment le phénomène de mécanotransduction, comme déjà identifié expérimentalement à l'échelle cellulaire (Huang et *al.*, 2004) et tissulaire (Ingber 2004 ; Orr et *al.*, 2006 ; Mammoto et *al.*, 2012).

7. Conclusion

La compréhension de la reproductibilité topologique et de la morphogenèse tissulaire est un sujet auquel les biologistes s'intéressent depuis le 17^{ème} siècle. Les travaux menés dans le cadre de cette thèse ont permis de contribuer à une meilleure compréhension de la morphogenèse des épithéliums monocouches. Parmi les nombreux facteurs influençant leur formation, nous avons fait l'hypothèse que les efforts mécaniques jouent un rôle prépondérant et avons donc développé un premier modèle permettant de mettre en évidence certains mécanismes mis en jeu. Cette approche s'inscrit pleinement dans une démarche multidisciplinaire combinant biologie expérimentale, analyse biostatistique et modélisation biomécanique et numérique.

L'étude, par nos collègues biologistes de l'ISEM, de différents modèles biologiques liés à la morphogenèse d'épithéliums monocouches prolifératifs et non prolifératifs a permis de mieux comprendre leur processus de formation et les phénomènes mécaniques lors du développement. Les modélisations connues à ce jour sont essentiellement d'ordre géométrique ou énergétique, elles n'incluent généralement pas les aspects mécaniques et ne distinguent pas les cellules d'un tissu individuellement. Il nous a ainsi semblé pertinent de développer une représentation mécanique de cellules, ayant chacune ses caractéristiques spécifiques, et pouvant s'assembler afin de constituer un tissu pour étudier son processus de formation à travers différents scénarios de morphogenèse.

Pour ce, nous avons donc mis en place un modèle mécanique cellulaire bidimensionnel basé sur la physique des milieux divisés, permettant une plasticité de forme et une capacité de libre auto-organisation des cellules. Cette modélisation reproduisant les principes d'évolution (croissance, division, apoptose), grâce à des lois géométriques et mécaniques simples, permet de simuler la croissance d'épithéliums prolifératifs ou non prolifératifs. Les cellules regroupées au sein d'un tissu forment ainsi un système ouvert, dans lequel des constituants sont ajoutés et/ou supprimés, dont le comportement est régi par la mécanique des solides via les interactions entre composants (grains et éléments liant certains grains). Cette représentation dynamique tissulaire permet de réaliser des simulations puis d'étudier les topologies résultantes. Les tissus expérimentaux et numériques sont caractérisés en considérant la distribution de la forme des cellules (déterminée en comptant le nombre de voisins de chaque cellule) et la valeur de l'homéostasie tissulaire (indiquant la reproductibilité

du processus de formation). La morphogenèse de ces épithéliums est ainsi analysée grâce à ces deux critères.

Les expérimentations biologiques sur les œufs de *Ciona intestinalis* ont montré que l'épithélium des cellules folliculaires présentes à la surface de l'ovocyte se forme par accréation. Il se caractérise aussi par un nombre élevé de cellules hexagonales et par une grande stabilité du processus de développement (valeur d'homéostasie tissulaire élevée). Ces résultats ont été confirmés par les modélisations de ce mode de formation qui ont aussi permis d'aller plus loin en faisant varier la vitesse de développement et de conclure que le niveau d'organisation du tissu décroît quand sa vitesse de formation augmente. En effet, plus cette vitesse est élevée, plus les degrés de liberté du système se figent rapidement.

L'étude de cellules prolifératives de types COS, adhérentes ou en suspension, a par ailleurs montré que la géométrie de ces épithéliums ne semblait influencer ni son organisation ni sa stabilité de formation. Les résultats des expérimentations biologiques sur les disques d'aile de *Drosophila melanogaster* ont été confirmés par ceux issus des simulations, mettant en évidence le fait que des variations, portant uniquement sur le taux d'apoptose, ne changent pas la distribution des polygones. En revanche, la stabilité épithéliale se dégrade lorsque ce taux diminue. L'apoptose semble donc être un régulateur de la morphogenèse épithéliale ; en sciences de l'évolution, on dit que l'apoptose « canalise » la morphogenèse.

Des simulations ont également été réalisées en faisant varier des paramètres difficilement accessibles expérimentalement, par exemple les hypothèses régissant l'évolution des cellules ou les conditions aux limites. Les tissus paraissent ainsi plus organisés avec une division et une apoptose contrôlées par des critères mécaniques, plutôt que lorsque le système prolifère suivant un schéma aléatoire. De plus, les simulations de développement d'épithéliums prolifératifs sur des surfaces planes, avec ou sans conditions de bords, montrent que les topologies ne semblent pas être modifiées par rapport à celles issues de tissus formés sur une surface sphérique.

La comparaison des distributions des polygones a aussi permis de différencier les épithéliums non prolifératifs et prolifératifs. Ceux formés par accréation sont en effet plus structurés ; ils présentent un plus grand nombre de cellules hexagonales, se rapprochant alors d'un système énergétiquement de bas niveau et composé uniquement de cellules à six cotés (tel que décrit par D'Arcy Thompson). Une telle architecture se caractérise également par une plus grande stabilité morphogénétique.

Ce travail a donc permis de reproduire la topologie épithéliale et la stabilité inter tissulaire puis de vérifier qu'elles sont influencées par le mode de formation (accréation ou

prolifération) et, dans le cas d'un épithélium prolifératif, par le taux relatif entre mitose et apoptose.

Des calculs complémentaires sur des tissus formés par accréation, mais composés d'un nombre plus élevé de cellules, permettent de retrouver des distributions proches de celles issues d'expérimentations sur d'autres espèces d'Ascidies présentant cette caractéristique. Par ailleurs, l'intégration de différents comportements de cellules, avec des durées de cycle cellulaire distinctes, au sein d'un même épithélium confirme la possibilité d'étudier l'hyperprolifération, bien que ces développements soient pour l'instant limités à deux dimensions. En outre, une description intracellulaire représentant la structuration sous contrainte du cytosquelette et son intégration dans un modèle tissulaire permettrait d'identifier des modes de transmission d'efforts au sein du tissu, ouvrant ainsi la voie à l'étude des processus de mécanotransduction multi-échelles.

Les règles géométriques et mécaniques imposées aux cellules et aux tissus dans ce travail sont cependant relativement simples. Il est néanmoins surprenant de voir combien elles permettent de reproduire assez fidèlement des processus aussi complexes que la morphogenèse des épithéliums monocouches, dans laquelle une pluralité de facteurs (génétique, hormonale, chimique, etc.) interviennent aussi dans la réalité.

Par ailleurs, les complexes de jonctions cellulaires (cadhérines par exemple) étant impliquées dans diverses pathologies épithéliales, notamment cancéreuses, il serait intéressant d'étudier l'impact d'une variation de la fréquence de construction/déconstruction de ces jonctions, c'est à dire de leur stabilité intrinsèque, sur l'organisation finale des tissus. Ceci permettrait peut être d'apporter certaines clefs sur la compréhension du développement et de l'organisation des tissus prolifératifs mais aussi hyperprolifératifs. Cependant, au vu des observations biologiques, l'étude d'épithéliums hyperprolifératifs, notamment de type tumoral, ne semble avoir de sens qu'en trois dimensions. Une telle modélisation nécessiterait des développements plus complexes des outils de calcul (notamment en ce qui concerne la gestion des contacts) et un accroissement des ressources informatiques. La parallélisation des algorithmes (détection des contacts essentiellement) et la décomposition de domaine implémentées dans ce travail de thèse, apparaissent d'autant plus pertinents pour diminuer le temps de calcul dans un tel cas de figure.

Par ailleurs, les modélisations et outils développés dans ce travail seraient utiles pour suivre l'évolution d'un tissu en continu sur une surface finie, c'est à dire poursuivre l'étude après le recouvrement de la surface, en lui imposant une croissance, une division et une

apoptose faisant appel à des critères mécaniques. Cela permettrait d'étudier non plus la seule croissance de l'épithélium mais aussi son renouvellement et son éventuelle réorganisation. La stabilité épithéliale résultante tendrait-elle à croître avec le temps ou serait-elle conservée ou influencée uniquement par le taux entre mitose et apoptose ? Faudrait-il utiliser des cellules avec une durée de vie évoluant en fonction de leur nombre de division et de leur environnement mécanique ? Ceci constitue autant de questions dont les réponses permettraient de mieux comprendre la morphogenèse des épithéliums monocouches.

Table des figures

Figure 2-1 : Coupe d'une cellule eucaryote (http://fr.wikipedia.org/wiki/Cellule).	10
Figure 2-2 : Réseaux des trois filaments composant le cytosquelette : microtubules (a), filaments d'actine (b) et filaments intermédiaires (c). Vue au microscope électronique des microtubules et des filaments d'actine entremêlés (d), ainsi que des filaments intermédiaires (e). (http://cellix.imba.oeaw.ac.at/1-cytoskeleton).	11
Figure 2-3 : (A), (B) et (C) sont les trois différents types d'épithélium monocouche.	12
Figure 2-4 : Etapes de la division cellulaire (http://sjnews.over-blog.com/article-animation-flash-sur-la-mitose-45383247.html).	14
Figure 2-5 : Réorganisation cellulaire suite à une division (Gibson et <i>al.</i> , 2009).	14
Figure 2-6 : Fréquence du nombre de voisins correspondant à la forme polygonale des cellules pour des épithéliums prolifératifs de plantes et d'animaux (Gibson et <i>al.</i> , 2009).	15
Figure 2-7 : <i>Ciona intestinalis</i> adulte mesurant une dizaine de centimètres (A.Gittenberger, www.ascidians.com).	17
Figure 2-8 : (a) Reconstruction 3D d'un œuf de <i>Ciona intestinalis</i> mature marqué avec de la phalloïdine fluorescente (blanc). Les pointillés roses représentent la base des cellules folliculaires. La coupe triangulaire permet de visualiser la couche sous-jacente de cellules de la testa. Le tracé vert souligne les contours de la base d'une cellule folliculaire (a). (b) Image en microscopie par fluorescence des cellules folliculaires, avec marquage des filaments d'actine en vert et des noyaux en rouge. Barre d'échelle : 10 μ m (Martinand-Mari et <i>al.</i> , 2009).	18
Figure 2-9 : Cellules COS adhérentes étalées dans le plan des noyaux (a) et basal (b). (c) Organoïde de cellules COS d'environ 200 μ m. Barre d'échelle : 10 μ m	19
Figure 2-10 : Stades larvaires et nymphaux du développement de la <i>Drosophila melanogaster</i>	20
Figure 2-11 : Domaine de Dirichlet représentant une topologie épithéliale (Honda, 1978). ...	22
Figure 2-12 : Représentation épithéliale à partir d'un CPM (Glazier et Graner, 1993).	23
Figure 2-13 : Deux systèmes de tenségrité complexes avec des éléments en compression partant du centre de la cellule et des éléments en traction concentrés à la périphérie de la cellule et diffus à l'intérieur (Baudrillet et <i>al.</i> , 2006). Plus les éléments sont bleus, plus ils sont tendus et plus ils sont rouges, plus ils sont comprimés.	26

Figure 2-14 : Compression numérique d'une cellule végétale jusqu'à déchirure de la membrane (VanLiedekerke et <i>al.</i> , 2010).....	27
Figure 2-15 : Essai mécanique de compression (b) et traction (c) d'une cellule à partir d'un état initial précontraint (a) (Milan et <i>al.</i> , 2006).....	28
Figure 2-16 : Étapes de l'étalement de la cellule sous l'action de croissance des microtubules (Maurin et <i>al.</i> , 2008).	28
Figure 2-17 : Réseau de filaments d'actine (a) et (b) : réseau de tension (a) et vue en microscopie confocale. Réseau de microtubules d'une cellule étalée (c) et (d): réseau de compression (a) et vue en contraste de phase (b) (Maurin et <i>al.</i> , 2008).	29
Figure 2-18 : Modèle de cellule avec des éléments subcellulaires. Vue d'une cellule en coupe (a), de deux cellules liées (b) et d'un agrégat (c) (Sandersius et Newman, 2008).	29
Figure 3-1 : (a) Grains seuls (internes en noir et membranaires en vert) constituant le modèle de cellule ; (b) éléments membranaires seuls (c) ensemble de la cellule. Sur la dernière image, les grains membranaires se distinguent peu des éléments membranaires car leur rayon est le même que celui des câbles membranaires.	33
Figure 3-2 : Étapes de la croissance d'une cellule à partir de trois grains internes. Les cinq tailles différentes de grains sont représentées par cinq couleurs différentes. La forme en apparence polygonale de certains grains est due à l'interpénétration autorisée entre eux (cf. 3.4.1).	34
Figure 3-3 : Étapes de la division cellulaire (en bleu le câble d'actine).	36
Figure 3-4 : (a) Étape de fin de la division ; (b) et (c) premières étapes de croissance des cellules filles. En bleu, l'élément « actine » représentant l'anneau d'actine. En noir les éléments membranes qui vont être supprimés (a), en rouge ceux créés (b) et en gris ces derniers divisés suivant les règles de gestion de la membrane.	36
Figure 3-5 : Étapes de l'évolution d'une cellule en apoptose. Une cellule en apoptose est caractérisée par le marquage de leur nœud membrane en noir.	37
Figure 3-6 : Les interactions entre les cellules sont de deux types : répulsif par contact rigide (a) ou d'adhésion par câble tendu (b).	39
Figure 3-7 : Schématisation de l'interaction entre deux grains interpénétrés. Leurs contours apparaissent donc non circulaires ce qui explique la forme parfois polygonale des grains internes aux cellules (Figure 3-2).	42
Figure 3-8 : Architecture globale du code.	45
Figure 3-9 : Algorithme simplifié de l'évolution du tissu.	46

Figure 3-10 : Œuf mature d'ascidie (<i>Styela clava</i>) montrant un exemple de vertex à quatre dans une structure où la presque totalité des vertex sont à trois. Le nombre au centre des cellules formant ce vertex correspond au nombre de voisins pris en compte.	54
Figure 3-11 : Reconstruction 3D d'un œuf de <i>Ciona intestinalis</i> mature. Ce type d'image sert de support aux biologistes pour le comptage des cellules folliculaires.....	55
Figure 3-12 : Deux représentations d'un même tissu avec et sans grains internes. Au centre de chaque cellule, est affiché le nombre de ses voisins.	55
Figure 3-13 : Épithélium formé sans condition de bord. En bleu les cellules prises en compte et en rouge celles exclues du comptage.	56
Figure 4-1 : Séquence d'images prises en microscopie fluorescente montrant des ovocytes de <i>Ciona intestinalis</i> à différents stades de maturation. Les filaments d'actine des cellules folliculaires sont révélés par marquage avec de la phalloïdine-FITC (vert) et les noyaux des cellules de la testa sont mis en évidence par le DAPI (bleu).	60
Figure 4-2 : Épithélium monocouche sphérique de cellules COS. Vue en coupe (a) et d'ensemble (b). Sur l'image (b) la flèche montre une division en cours.	61
Figure 4-3 : Image au microscope de cellules columnnaires (en bleu) de deux disques d'aile de mouche. Disques avec marquage de l'apoptose (en rouge) : pour un disque d'aile de mouche sauvage (a) et pour un disque pour lequel l'apoptose est inhibée (b). Barres d'échelles : 10 μm	63
Figure 4-4 : Image réalisée au microscope confocal montrant les pôles apical (a) et basal (b) d'un épithélium columnnaire. Barres d'échelles : 10 μm	64
Figure 4-5 : Étapes de développement d'un épithélium formé par accrétion de (a) à (d). La dernière structure (e) est équivalente à l'avant dernière (d), sans représentation des grains internes.	65
Figure 4-6 : Image au cours du développement d'un épithélium prolifératif. Les cadres indiquent des cellules en division ou en apoptose.....	68
Figure 4-7 : Distribution des polygones des épithéliums prolifératifs formés sur une sphère avec un mode de division-apoptose « aléatoire-aléatoire ». Les informations entre parenthèses indiquent dans l'ordre : le taux d'apoptose/division, le type de croissance, le critère de formation de l'axe de division.....	72
Figure 4-8 : Distribution des polygones pour un épithélium prolifératif formé sur une sphère avec un mode de division-apoptose « mécanique-mécanique ». Les informations entre	72
Figure 4-9 : Boîtes de formes et tailles différentes : carrée d'aire S (a), circulaires d'aire S (b) et circulaire d'aire $1,5 \times S$ (c).....	73

Figure 4-10 : Image de fin de la simulation du développement d'un tissu dans une boîte circulaire d'aire $S_{\text{sphère}}$	75
Figure 4-11 : Image de fin d'une simulation d'un épithélium prolifératif avec des conditions aux limites de forme carrée d'aire $S_{\text{sphère}}$	76
Figure 4-12 : Image de fin de la simulation du développement d'un tissu dans une boîte circulaire d'aire $1,5 \times S_{\text{sphère}}$	77
Figure 4-13 : Simulation sans condition aux limites. (a) situation initiale. (b) fin de la simulation.	79
Figure 4-14 : Histogramme des distributions de polygones d'épithéliums prolifératifs formés avec un mode de division-apoptose « aléatoire-aléatoire ».....	80
Figure 4-15 : Histogramme des distributions de polygones d'épithéliums prolifératifs formés avec un mode de division-apoptose « mécanique-mécanique ».	81
Figure 4-16 : Histogramme des distributions de polygones des épithéliums non prolifératifs expérimentaux et numériques. VDT 1 correspond à la première campagne de calculs et VDT 2 à la seconde (cf. paragraphes 4.4.2 et 4.4.3).	82
Figure 4-17 : Histogramme des distributions de polygones des épithéliums prolifératifs expérimentaux et numériques.....	83
Figure 4-18 : Distribution des polygones issus des simulations d'épithéliums prolifératifs. Ils se développent sur une sphère ou sur un plan. Les informations entre parenthèses indiquent le mode de division-apoptose, le type de croissance et le critère pour l'axe de division. Les termes « aléatoire » ou « mécanique » signifient donc que les modes de division-apoptose adoptés sont « aléatoire-aléatoire » ou « mécanique-mécanique ». Le second terme « linéaire » ou « mécanique » indique le type de croissance des cellules. Le troisième terme donne le critère pour le choix de l'axe de division « mécanique » ou géométrique ». Pour les épithéliums plans, le dernier terme indique la surface délimitée par les conditions de bord.....	84
Figure 4-19 : Histogramme des distributions issues des résultats expérimentaux.....	85
Figure 4-20 : Histogramme des distributions issues de quelques simulations représentatives.....	85
Figure 6-1 : Système folliculaire des œufs d'ascidies. Le nombre de cellules folliculaires pour chaque espèce est donné par n. (a) <i>Ciona intestinalis</i> (n=60), (b) <i>Ascidella aspersa</i> (n=150), (c) <i>Molgula citrina</i> (n=200), (d) <i>Phallusia mammillata</i> (n=300), (e) <i>Styela clava</i> (n=350).	97

Figure 6-2 : Simulation de morphogenèse folliculaire sur un œuf d' <i>Ascidella aspersa</i> (gauche) et <i>Molgula citrina</i> (droite). Le nombre de cellules en fin de simulation est respectivement de 145 et 213.	97
Figure 6-3 : Tissu en formation contenant des cellules hyperprolifératives (en rouge) et normales (transparentes). Les éléments noirs entre les cellules représentent les cadhérines. La cellule ayant ses grains membranaires en noir est une cellule en apoptose. Les éléments en bleu au milieu de certaines cellules représentent l'anneau d'actine lors de la division cellulaire.	100
Figure 6-4 : Schéma d'évolution d'étalement d'une cellule. Initialement en suspension (a), elle s'aplatit et crée des points d'adhésion (b) puis s'étale (c) (Loosli et <i>al.</i> , 2010).	102
Figure 6-5 : Configuration initiale de la cellule.	103
Figure 6-6 : Première étape de modification de la cellule. En bleu les éléments « actomyosine » et en jaune les grains dont le déplacement est imposé.	104
Figure 6-7 : Etat de contrainte dans les éléments de la cellule. Plus un élément est comprimé, plus il est rouge ; plus un élément est tendu, plus il est bleu.	105
Figure 6-8 : Certains éléments cytoplasmiques sont devenus des éléments « microtubule » (en cyan), d'autres des éléments « actine » (en violet).....	106
Figure 6-9 : Évolution de la déformation de la cellule lors du déplacement imposé. Les éléments « microtubule » comprimés sont en cyan et les éléments « actine » tendus sont en violet, les éléments cytoplasmiques indifférenciés sont en rouge, les éléments membranaires tendus en vert, les éléments « actomyosine » en bleu et le noyau représenté par des éléments quasi-rigides en noir. Les grains « moteurs » sont représentés en jaune.	107
Figure 6-10 : Cellule irréversiblement déformée.	108
Figure 6-11 : Situation initiale : cellule vue en coupe sur le substrat. En orange, les grains cytoplasmiques, en noir les grains « noyau », en vert les grains membranaires et en blanc les grains « substrat ».	110
Figure 6-12 : Étapes de l'étalement cellulaire. En bleu les éléments « filopode », en vert la membrane, en anthracite le noyau et en rouge les complexes d'adhésion (de type intégrines).....	111
Figure 6-13 : Modèle granulaire de cellule avec des éléments « filopode » en rouge.	112
Figure 6-14 : Modèle granulaire de cellule avec une double membrane.	113

Bibliographie

Allen, M. P. et Tildesley, D. J., 1987. Computer Simulation of Liquids. Oxford University Press, Oxford.

Azzag, K., 2011. Origine de la stabilité morphogénétique dans les épithéliums de métazoaires, thèse de doctorat, Université Montpellier 2.

Azzag, K., Chelin, Y., Rousset, F., Martinez, A.-M., Maurin, B., Daujat-Chavanieu, M., Averseng, J., Mangeat, P., et Baghdiguian, S., 2012. Quantification of topological homeostasis in metazoan epithelia reveals apoptosis as a canalization factor of morphogenesis. *Soumis*.

Basan, M., Risler, T., Joanny, J.-F., Sastre-Garau, X. et Prost, J., 2009. Homeostatic competition drives tumor growth and metastasis nucleation. *HFSP Journal*, 3, 265-272.

Baudriller, H., Maurin, B., Cañadas, P., Montcourrier, P., Parmeggiani, A. et Bettache, N., 2006. Form-finding of complex tensegrity structures: application to cell cytoskeleton modelling *Comptes Rendus Mécanique*, 334, 662 - 668.

Caille, N., Thoumine, O., Tardy, Y. et Meister, J.-J., 2002. Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells. *Journal of Biomechanics* 35, 177-187.

Cañadas, P., Laurent, V.M., Chabrand, P., Isabey, D. ET Wendling-Mansuy, S., 2003. Mechanisms governing the visco-elastic responses of living cells assessed by foam and tensegrity models. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 41, 733-739.

Cañadas, P., Wendling-Mansuy, S. et Isabey, D., 2006. Frequency response of a viscoelastic tensegrity model: Structural rearrangement contribution to cell dynamics. *Journal of Biomechanical Engineering* 128, 487-495.

Cañadas, P., Maurin, B., et Motro, R., 2009. Mécanique des systèmes précontraints appliquée à la structure du cytosquelette. *Mécanique & Industries* 10, 285–290.

Cau, P. et Seïte, R., 2007. Cours de biologie cellulaire, 4eme Edition, éditions Ellipses.

Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G.M. et Ingber, D.E., 1997. Geometric control of cell life and death. *Science* 276, 1425-1428.

Chicurel, M.E., Chen, C.S. et Ingber, D.E., 1998. Cellular control lies in the balance of forces. *Current Opinion in Cell Biology* 10, 232-239.

Classen, A.-K., Anderson, K.I., Marois, E. et Eaton, S., 2005. Hexagonal packing of *Drosophila* wing epithelial cells by the planar cell polarity pathway. *Developmental Cell* 9, 805-817.

Cundall, P.A. et O.D.L. Strack, 1979. A discrete numerical model for granular assemblies. *Géotechnique*, 29(1): 47–65.

D'Arcy Thompson, W., 1917. On growth and form, Cambridge University Press.

Dautray R. et Lions J.-L., 1988. Analyse mathématique et calcul numérique pour les sciences et les techniques 3, Masson, ISBN 2225813248.

Davidson, L., von Dassow, M. et Zhou, J., 2009. Multi-scale mechanics from molecules to morphogenesis. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 2147-2162.

Dike, L.E., Chen, C.S., Mrksich, M., Tien, J., Whitesides, G.M. et Ingber, D.E., 1999. Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 35, 441-448.

Dubertret, B. et Rivier, N., 2000. Geometrical models of the renewal of the epidermis. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie* 323, 49-56.

Dubertret, B. et Rivier, N., 1997. The renewal of the epidermis: a topological mechanism. *Biophysical Journal* 73, 38-44.

Famaey, N., Sommer, G., Vander Sloten, J. et Holzapfel, G.A., 2012. Arterial clamping: finite element simulation and in vivo validation. *Journal of the Mechanical behaviour of Biomedical Materials* 12, 107-118.

Farhadifar, R., Röper, J.-C., Aigouy, B., Eaton, S. et Jülicher, F., 2007. The influence of cell mechanics, cell-cell interactions, and proliferation on epithelial packing. *Current Biology* 17, 2095-2104.

Fletcher, D.A. et Mullins, R.D., 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463, 485-492.

Fleury, V., 2012. Clarifying tetrapod embryogenesis by a dorso ventral analysis of the tissue flows during early stages of chicken development. *Biosystems*, in press.

Galbraith, C.G. et Sheetz, M.P., 1998. Forces on adhesive contacts affect cell function. *Current Opinion in Cell Biology* 10, 566-571.

Gibson, M.C., Patel, A.B., Nagpal, R. et Perrimon, N., 2006. The emergence of geometric order in proliferating metazoan epithelia. *Nature* 442, 1038-1041.

Gibson, W.T. et Gibson, M.C., 2009. Cell topology, geometry, and morphogenesis in proliferating epithelia. *Current Topics in Developmental Biology* 89, 87-114.

Goode, B.L., Drubin, D.G. et Barnes, G., 2000. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 63-71.

Graner et Glazier, 1992. Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended Potts model. *Physical Review Letters* 69, 2170-2173.

Graner et Glazier, 1993. Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells. *Phys. Rev. E Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscip. Topics* 47, 2128-2154.

Hirata, H., Tatsumi, H. et Sokabe, M., 2008. Mechanical forces facilitate actin polymerization at focal adhesions in a zyxin-dependent manner. *Journal of Cell Science* 121, 2795-2804.

Holzapfel, G. et Kuhl, E., 2012. *Computer Models in Biomechanics. From Nano to Macro.* Springer.

Honda, H., 1978. Description of cellular patterns by Dirichlet domains: the two-dimensional case. *Journal of Theoretical Biology* 72, 523-543.

Honda H. et Eguchi, G., 1980. How much does the cell boundary contract in a monolayered cell sheet? *Journal of Theoretical Biology* 84, 575-588.

Hooke, R., 1665. *Micrographia ; Observation XVIII : Of the schematisme or texture of cork, and of the cells and pores of some other such frothy bodies,* Martyn and Allestry, London.

Howard, J. et Hyman, A.A., 2007. Microtubule polymerases and depolymerases. *Current Opinion in Cell Biology* 19, 31-35.

Huang, H., Kamm, R.D. et Lee, R.T., 2004. Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 287, C1-11.

Ingber, D.E. et Jamieson, J.D., 1985. Cells as tensegrity structures: architectural regulation of histodifferentiation by physical forces transduced over basement membrane. In *Gene Expression During Normal and Malignant Differentiation*, pp 13-32, Academic Press, Orlando.

Ingber, D.E., 2003. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *Journal of Cell Science* 116, 1157-1173.

Ingber, D.E., 2004. The mechanochemical basis of cell and tissue regulation. *Mechanics & Chemistry Biosystems* 1, 53-68.

Ingber, D.E., 2006. Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development. *International Journal of Developmental Biology* 50, 255-266.

Jamali, Y., Azimi, M. et Mofrad, M.R.K., 2010. A sub-cellular viscoelastic model for cell population mechanics. *PLoS One* 5.

Koestler, S.A., Auinger, S., Vinzenz, M., Rottner, K. et Small, J.V., 2008. Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front. *Nature Cell Biology* 10, 306-313.

Laurent, V.M., Fodil, R., Cañadas, P., Féréol, S., Louis, B., Planus, E. et Isabey, D., 2003. Partitioning of cortical and deep cytoskeleton responses from transient magnetic bead twisting. *Annals of Biomedical Engineering* 31, 1263-1278.

Lecuit, T. et Lenne, P.-F., 2007. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 633-644.

Lewis, F.T., 1928. The correlation between cell division and the shapes and sizes of prismatic cells in the epidermis of cucumis. *The Anatomical Record*, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 38, 341-376.

Lim, C.T., Zhou, E.H. et Quek, S.T., 2006. Mechanical models for living cells—a review. *Journal of Biomechanics* 39, 195-216.

Loosli, Y., Luginbuehl, R. et Snedeker, J.G., 2010. Cytoskeleton reorganization of spreading cells on micro-patterned islands: a functional model. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 368, 2629-2652.

Mammoto, A., Mammoto, T. et Ingber, D.E., 2012. Mechanosensitive mechanisms in transcriptional regulation. *Journal of Cell Science* 125, 3061-3073.

Mammoto, T. et Ingber, D.E., 2010. Mechanical control of tissue and organ development. *Development* 137, 1407-1420.

Mancuso, V., 1965. An electron microscope study of the test cells and follicle cells of *Ciona intestinalis* during oogenesis. *Acta Embryol Morphol Exp* 8, 239-266.

Martinand-Mari, C., Maury, B., Rousset, F., Sahuquet, A., Mennessier, G., Rochal, S., Lorman, V., Mangeat, P. et Baghdiguian, S., 2009. Topological control of life and death in non-proliferative epithelia. *PLoS One* 4, e4202.

Maurin, B., Cañadas, P., Baudriller, H., Montcourrier, P. et Bettache, N., 2008. Mechanical model of cytoskeleton structuration during cell adhesion and spreading. *Journal of Biomechanics* 41, 2036-2041.

McGarry, J.G. et Prendergast, P.J., 2004. A three-dimensional finite element model of an adherent eukaryotic cell. *European Cells and Materials* 7, 27-33; discussion 33-4.

Mijailovich, S.M., Kojic, M., Zivkovic, M., Fabry, B. et Fredberg, J.J., 2002. A finite element model of cell deformation during magnetic bead twisting. *Journal of Applied Physiology* 93, 1429-1436.

Milan, J.L., Wendling-Mansuy, S., Jean, M. et Chabrand, P., 2007. Divided medium-based model for analyzing the dynamic reorganization of the cytoskeleton during cell deformation. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 6, 373-390.

Milán, M., Campuzano, S. et García-Bellido, A., 1997. Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94, 5691-5696.

Milán, M., Campuzano, S. et García-Bellido, A., 1996. Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93, 640-645.

Montell, D.J., 2008. Morphogenetic cell movements: diversity from modular mechanical properties. *Science* 322, 1502-1505.

Moravec, F. et Holoccek, M., 2010. Microstructure-dependent nonlinear viscoelasticity due to extracellular flow within cellular structures. *International Journal of Solids and Structures* 47, 1876-1887.

Moreau, J.-J., 1997. Numerical investigation of shear zones in granular materials. In D. E. Wolf and P. Grassberger, editors, *Friction, Arching, Contact Dynamics*, pages 233–247, Singapore. World Scientific.

Nelson, C.M., Jean, R.P., Tan, J.L., Liu, W.F., Sniadecki, N.J., Spector, A.A. et Chen, C.S., 2005. Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102, 11594-11599.

Newman, T.J., 2005. Modeling multi-cellular systems using sub-cellular éléments. Department of Physics & Astronomy and School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ 85287 .

Ohayon, J., Tracqui, P., Fodil, R., Féréol, S., Laurent, V.M., Planus, E. et Isabey, D., 2004. Analysis of nonlinear responses of adherent epithelial cells probed by magnetic bead twisting: A finite element model based on a homogenization approach. *Journal of Biomechanical Engineering* 126, 685-698.

Okada, T. et Yamamoto, M., 1999. Differentiation of the gonad rudiment into ovary and testis in the solitary ascidian, *Ciona intestinalis*. *Development Growth and Differentiation* 41, 759-768.

Orr, A.W., Helmke, B.P., Blackman, B.R. et Schwartz, M.A., 2006. Mechanisms of mechanotransduction. *Developmental Cell* 10, 11-20.

Poincaré, H., 1893. Sur la généralisation d'un théorème d'Euler relatif aux polyèdres. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 117, 144-145.

Rothenburg, L. et Selvadurai, A. P. S. A micromechanical definition of the Cauchy stress tensor for particulate media. In A. P. S. Selvadurai, editor, *Mechanics of Structured Media*, pages 469–486. Elsevier, Amsterdam, 1981.

Sandersius Sebastian A. et Newman, T.J., 2008. Modeling cell rheology with the Subcellular Element Model. *Physical Biology* 5, 015002.

Schawnn, T., 1847. Microscopical Researches into the Accordance of Structure and Growth in Animal and Plants. Sydenham Society, London., Sydenham Society, London.

Stamenovic, D. et Ingber, D.E., 2009. Tensegrity-guided self assembly: from molecules to living cells. *Soft Matter* 5, Number 6, 1137-1145.

Stamenovic, D., Mijailovich, S.M., Tolic-Nørrelykke, I.M., Chen, J. et Wang, N., 2002. Cell prestress. II. Contribution of microtubules. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 282, C617-C624.

Stricker, J., Falzone, T. et Gardel, M.L., 2010. Mechanics of the F-actin cytoskeleton. *Journal of Biomechanics* 43, 9-14.

Sugino, Y. M., Tominaga, A. et Takashima, Y., 1987. Differentiation of the accessory cells and structural regionalization of the oocyte in the ascidian *Ciona savignyi* during early oogenesis. *Journal of Experimental Zoology*, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 242, 205-214.

Sultan, C., Stamenovic, D. et Ingber, D.E., 2004. A computational tensegrity model predicts dynamic rheological behaviors in living cells. *Annals of Biomedical Engineering* 32, 520-530.

Toyama, Y., Peralta, X.G., Wells, A.R., Kiehart, D.P. et Edwards, G.S., 2008. Apoptotic force and tissue dynamics during *Drosophila* embryogenesis. *Science* 321, 1683-1686.

Van Liedekerke, P., Tijskens, E., Ramon, H., Ghysels, P., Samaey, G. et Roose, D., 2010. Particle-based model to simulate the micromechanics of biological cells. *Physical Review E* 81, 061906.

Venables, W.N. et Ripley, B.D., 2002. Modern applied statistics with S., Springer-Verlag, New York, 4th edn.

Vychytil J. et Holoccek, M., Two-scale hyperelastic model of a material with prestress at cellular level.

Wendling, S., E. Planus V.M. Laurent, L.B.A.M., Oddou, C. et Isabey, D., 2000. Role of cellular tone and microenvironmental conditions on cytoskeleton stiffness assessed by tensegrity model. *The European Physical Journal Applied Physics*, 9, 51-62.

Développement d'un modèle mécanique et numérique de morphogenèse de tissus épithéliaux.

Résumé : L'étude des formes de la nature, de leur diversité, de leur reproductibilité ainsi que de leurs origines a toujours suscité un vif intérêt et, en particulier, la forme polygonale des cellules au sein des épithéliums monocouches, depuis leur observation par Hooke en 1665. Le travail de thèse exposé à travers ce mémoire vise une meilleure compréhension de la morphogenèse de ces tissus. Pour y parvenir, trois approches ont été combinées : la biologie expérimentale du développement, l'analyse biostatistique et, principalement ici, la modélisation biomécanique et numérique. L'hypothèse d'une influence des efforts mécaniques dans l'organisation des épithéliums monocouches en formation a conduit au développement d'un modèle bidimensionnel de cellules, basé sur la physique des milieux divisés et permettant une plasticité de forme ainsi qu'une capacité de libre auto-organisation. Les simulations de morphogenèse de tissus constitués de ces cellules ont alors, d'une part, été confrontées aux observations et, d'autre part, permis de faire varier des paramètres difficilement accessibles expérimentalement, principalement ceux régissant l'évolution cellulaire ainsi que les conditions aux limites. Les résultats issus de ces simulations ont ainsi permis de corroborer ceux provenant des expérimentations : les tissus non prolifératifs sont plus organisés que les prolifératifs et l'apoptose semble jouer un rôle stabilisateur de la morphogenèse des épithéliums prolifératifs. En outre, les études numériques montrent que l'organisation des tissus non prolifératifs semble décroître quand leur vitesse de développement augmente. Par ailleurs, les tissus paraissent plus organisés avec une division et une apoptose contrôlées par des critères mécaniques plutôt que lorsque le système prolifère suivant des critères aléatoires. En conclusion, ce travail de thèse montre l'importance des interactions mécaniques dans le processus de morphogenèse épithéliale et représente une première base prometteuse pour des études futures en ce domaine (étude tridimensionnelle, structuration du cytosquelette, tissus hyperprolifératifs, etc.).

Mots-clés : Biomécanique, morphogenèse épithéliale, modélisation numérique, milieux granulaire, homéostasie.

Numerical and mechanical modeling development of epithelial tissues morphogenesis.

Abstract : The study of natural forms, their diversity, their reproducibility and their origin has always fascinated the scientists, and particularly the polygonal form of cells in monolayer epithelia, since their observation by Hooke in 1665. The present PhD work aims to better understand tissue morphogenesis. To do so, three approaches have been combined : experimental biology, biostatistical analysis and, mainly here, biomechanical and numerical modeling. The hypothesis of the influence of mechanical efforts on the organization of forming monolayer epithelia leads to the development of a 2D cell model based on the physics of divided media, that enables form plasticity and the ability of free auto-organization. The simulations of tissue morphogenesis composed by these cells have been compared to biological observations. Besides, this approach enables the variation of parameters hardly accessible by experiments, mainly those governing the cell evolution as well as boundary conditions. Thus, the results issued from these simulations corroborate experimental data : non-proliferative tissues appear more organized than proliferative ones and apoptosis seems to be a positive regulator in morphogenetic stability. Furthermore, numerical studies show that the organization of non-proliferative tissues seems to decrease as their development speeds increase. In addition, the tissues appear more organized if the proliferation is mechanically controlled than if it is randomly governed. To conclude, this PhD work shows the importance of mechanical interactions in epithelial morphogenesis and constitutes a first promising basis for further studies in this field (3D study, cytoskeleton structuration, hyperproliferative tissue, etc.).

Key words : Biomechanics, epithelial morphogenesis, numerical modeling, granular media, homeostasis.