



Vers une modélisation des grands plans d'organisation de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana*

Élise Raphaëlle Laruelle

► To cite this version:

Élise Raphaëlle Laruelle. Vers une modélisation des grands plans d'organisation de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana*. Biologie du développement. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS074 . tel-01782397v2

HAL Id: tel-01782397

<https://theses.hal.science/tel-01782397v2>

Submitted on 14 May 2018

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.

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N° 567
Sciences du Végétal : du Gène à l'Ecosystème
Spécialité de doctorat : Biologie

Par

Madame Élise Laruelle

Vers une modélisation des grands plans d'organisation
de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana*

Thèse présentée et soutenue à Versailles, le 24 mars 2017 :

Composition du Jury :

Mr Godin Christophe	DR, INRIA Montpellier	Président du jury
Mme Monéger Françoise	DR, RDP ENS Lyon	Rapporteur
Mr Boudaoud Arezki	Pr, RDP ENS Lyon	Rapporteur
Mr Blein Thomas	CR, IPS2 Paris-Saclay	Examineur
Mr Lemaire Patrick	DR, CRBM Montpellier	Examineur
Mr Palauqui Jean-Christophe	CR, IJPB INRA Versailles	Directeur de thèse
Mr Trubuil Alain	IR, MaIAGE INRA Jouy-en-josas	Invité
Mr Andrey Philippe	DR, IJPB INRA Versailles	Invité



Remerciements

Cette thèse est le fruit de multiples émergences à partir de paramètres indépendants. Parmi ces paramètres, l'interaction des âmes est la plus fascinante et enrichissante pour la construction de soi et ainsi des réalisations de l'individu. Ainsi, je souhaite exprimer toute ma gratitude à toutes les âmes bienveillantes qui ont entouré de très près, mais également de très loin, cette thèse, en interagissant avec moi. Le propre de l'humain tend à catégoriser mais l'indépendance, l'exclusivité et l'exhaustivité me rendent donc ici la tâche compliquée, mais c'est avec plaisir et reconnaissance que je remercie.

Merci, à Arezki Boudaoud, Christophe Godin, Françoise Monèger, Patrick Lemaire et Thomas Blein qui ont accepté de faire partie du jury de ma soutenance.

Merci à Alain Trubuil, Jean-Christophe Palauqui et Philippe Andrey qui m'ont permis de prendre ce projet en mains, en misant sur moi, me laissant choisir les directions que je pensais devoir prendre, tout en m'apportant leurs expériences. Leur encadrement m'a permis de voir mon potentiel et mes limites et de relativiser le monde de la recherche.

Merci aux personnes qui ont fait avancer le projet volontairement ou involontairement : Katia Belcram, très volontairement je pense, en apportant beaucoup de données, mais également en me transmettant ses connaissances expérimentales et surtout, peut-être plus involontairement, son réalisme, son optimisme et sa persistance à toute épreuve. Ignacio Arganda-Carreras et David Legland, que j'ai très souvent sollicités et qui ont permis des pas de géant, dans des zones de non-confort.

Merci aux personnes qui ont été impliquées dans l'avancée critique, qui ont pris le temps de se pencher sur ce projet pour y mettre de l'ordre et de la signification ; je pense notamment aux rapporteurs des présentations de début et mi-thèse : Bertrand Dubreucq et Patrick Laufs, aux membres de mon comité de thèse : Christophe Godin, Olivier Hamant et Olivier Martin. Grâce à vous mes idées ont été bien mieux ordonnées, les choses ont été plus claires.

Merci aux membres des trois équipes qui m'ont accueilli : DIPOL, MaIAGE-BioSys et MIN. Pour m'avoir écouté, conseillé et transmis à la fois des connaissances, des méthodologies mais également des raisonnements scientifiques dans la convivialité.

Un grand merci à mes collègues directes. Ceux qui m'ont supportée, heureusement pour eux de manière intermittente, pendant ces trois ans : Eric Biot, Jasmine Burguet, Mohamed Said Oughou, Fayçal Faïçal Selka, Javier Arpón, Eric Monvert, ...

Merci aux habitants passés et présents du sous-sol du bâtiment 2 pour cette bonne ambiance.

Merci aux doctorants et doctorantes, compagnons de mes infortunes et de bonnes aventures, rencontré à l'école doctorale, aux formations, à l'IJPB, ou encore à MaIAGE pour leur échanges d'expériences et la transmission de flambeaux.

Merci aux filles de la danse Africaine, et à Lato pour son non-jugement des guerrières que nous sommes.

Merci aux personnes rencontrées au cours de mes études, dont Hervé qui m'a fait découvrir Inkscape, sans qui cette thèse aurait sûrement été différente.

Merci aux personnes qui ont participé à me changer les idées, chacun à leur manière : Pierre et ses elisenlebkuchen, Ioanna et son envie de découvertes contagieuse et attachante, Huyen Tcham et sa détermination, Cyril et sa motivation pour me reconduire à 1h du matin, Quentin et sa zénitude face à mes discours nocturnes, Roxanne et ses poires au sirop, Guillaume et sa positivité, Alexis et son village de paysans vagabonds, Alison, Claude et leur réussite, Thomas et sa bienveillance, Estelle et sa framboise-addiction, Antoine et son 3310 que je tiens toujours en otage, Alexis et ses voitures bizarres, Gabriel, Vincent, Vuty Victor, François, Adrien, Gautier et je suis sûre que j'en oublie, merci à vous.

Enfin, je remercie ma famille pour m'avoir supportée, encouragée, débridée, conseillée, aidée... Papa et maman pour leur patience et leur impatience. Frédéric, Maxime, Émeline et leur moitié (pour certains) et leur petite famille (pour d'autres), Chris, Papy, Mémère, aux tontons, aux tatas, aux cousins, aux cousines pour leur présence. Merci aussi à Mamie et Pépère pour l'inspiration qu'ils sont.

Table des matières

1	Introduction	7
1.1	L'embryon d' <i>Arabidopsis thaliana</i> pour étudier la morphogenèse	9
1.1.1	Choix du modèle d'étude de la morphogenèse végétale : l'embryon	9
1.1.2	Contexte de l'embryogenèse : la graine	11
1.1.3	Le développement embryonnaire : description générale	12
1.1.4	Un développement stéréotypé jusqu'à 16 cellules	12
1.1.5	Le développement de l'embryon de 16 cellules jusqu'au stade cœur tardif .	14
1.1.6	Facteurs génétiques impliqués dans la mise en place des grands plans d'organisation de l'embryon	17
1.2	La division cellulaire chez les plantes	18
1.2.1	Les mécanismes moléculaire de la division	18
	Structures moléculaires impliquées	18
	Régulation du cytosquelette	19
	Division asymétrique pour l'identité cellulaire	20
	Division symétrique	21
1.2.2	Règles géométriques de division symétrique	22
	Règles déterministes géométriques	22
	Règles stochastiques géométriques	24
	Règles déterministes mécaniques	24
1.2.3	Règle géométrique de division asymétrique	26
1.2.4	Études et validations des règles de division	26
1.2.5	Influence de la position du noyau sur l'orientation du plan de division . .	28
1.3	Croissance cellulaire	30
1.3.1	Les mécanismes de croissance chez les plantes	30
1.3.2	Les modèles de croissance cellulaire	31
1.4	Intégration des mécanismes au sein des tissus	32
1.4.1	Mécanismes endogènes	32
	Croissance cellulaire	32
	Signalisation hormonale : l'auxine	33
1.4.2	Facteurs exogènes : Contraintes Mécaniques	37
1.5	Modélisation de la morphogenèse : état de l'art	37
1.5.1	<i>Coleochaete</i>	39
1.5.2	Morphogenèse de l'épithélium du poisson zèbre	39
1.5.3	Les modèles sur l'embryon d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
1.6	Les objectifs et stratégies de cette thèse	40
1.6.1	Contexte	40
1.6.2	Questions et stratégies	42

2	Établissement de la collection d'embryons	44
2.1	Matériel	44
2.2	Segmentation	45
2.2.1	Choix de la méthode	46
2.2.2	LPE	46
2.2.3	Procédure de segmentation initiale	47
2.2.4	L'outil de segmentation proposé	47
2.2.5	Application	50
2.3	Filiation	51
2.3.1	Outil	51
2.3.2	Application	51
2.4	La collection	55
2.4.1	Vérification et validation	55
2.4.2	Données	55
3	Descriptif multi-échelle du développement jusqu'au stade cœur	58
3.1	Échelle embryonnaire	58
3.1.1	Volume embryonnaire	59
3.1.2	Forme globale de l'embryon (Sphéricité)	59
3.1.3	Courbures de l'embryon	60
	Courbures globales	60
	Courbures locales	64
	Conclusion	69
3.1.4	Ce qu'on peut retenir à l'échelle de l'embryon	69
3.2	Échelle sous-embryonnaire : les domaines AE, AI, BE, BI	72
3.2.1	Division	72
	Divisions cellulaires dans les tissus (protoderme vs tissus internes)	73
	Divisions cellulaires dans la partie apicale versus dans la partie basale	73
	Conclusion	74
3.2.2	Croissance	74
	Volumes	74
	Asymétrie de croissance radiale	76
	Hauteurs des domaines le long de l'axe apico-basal de l'embryon	80
3.2.3	Ce qu'on peut retenir à l'échelle des domaines	81
3.3	Échelle cellulaire	81
3.3.1	Volumes cellulaires	81
3.3.2	Formes cellulaires	83
3.3.3	Description des événements de divisions	84
3.3.4	Partage volumique lors de la division (volume ratio)	85
3.3.5	Ce qu'on peut retenir à l'échelle cellulaire	88
3.4	Conclusion	89
4	Modélisation des patterns de division	90
4.1	Introduction : l'étude précédente du laboratoire et fondatrice de ce projet	90
4.2	Règle de division dans l'embryon de plus de 16c	92
5	Discussion et perspectives	117
5.1	Conclusion	117
5.2	Discussion	118
5.2.1	Limites	118
5.2.2	Interprétations	119
5.3	Perspectives	121

Abréviations

LPE Ligne de Partage des Eaux

MAC Méristème Apical Caulinaire

POI Points Of Interest

PPB Bande de Pré-Prophase

Vr Volume ratio : volume de la plus petite cellule fille sur la somme des volumes des deux cellules filles

Chapitre 1

Introduction

En Biologie, la morphogenèse est un processus qui regroupe l'ensemble des transformations qui permet d'acquérir une forme spécifique. Le modèle que nous avons choisi d'étudier est l'embryon d'*Arabidopsis thaliana* (une plante de la famille des crucifères, eudicotyledones). Il s'agit d'un modèle qui permet à partir du zygote unicellulaire (issu de la fécondation), dans la graine, de recréer un individu entier possédant les différents plans d'organisation d'une plante adulte. Par ailleurs, et à la différence de l'embryogenèse chez les animaux, les cellules végétales ne sont pas capables de migrer, car elles sont enchâssées dans une paroi pecto-cellulosique semi-rigide. La mise en place des grands plans d'organisation et, par voie de conséquence, l'évolution de la forme de l'embryon, met en jeu plusieurs mécanismes cellulaires non exclusifs : la division, la croissance et la mort cellulaire. Dans les tissus formés à partir du zygote d'*Arabidopsis*, la mort cellulaire est un processus qui permet uniquement la perte du suspenseur et n'intervient pas dans la morphogenèse *sensu stricto* de l'embryon. C'est donc l'interaction des deux autres phénomènes cellulaires qui permet l'émergence de changements de forme.

La mise en place du plan d'organisation au cours de l'embryogenèse est un phénomène très étudié. On appellera « plan d'organisation » le positionnement relatif des principaux organes avec les tissus les composant et leurs symétries respectives. Son étude permet d'appréhender les différentes échelles de l'organisation du vivant avec la formation de la plupart des tissus et des différents organes qui constituent la plante. Dans cette étude, pour lier les différentes échelles, un suivi des territoires cellulaires (lignage cellulaire), depuis les premières étapes jusqu'à la mise en place d'organes ou de tissus fonctionnels et d'une forme, a été réalisé. Ce lignage est grandement facilité chez les végétaux par la présence de la paroi pecto-cellulosique qui maintient la cellule dans une position donnée.

Chez les végétaux, l'organisation cellulaire, et plus particulièrement la division cellulaire, ont fait l'objet de nombreuses études. À la fin du XIX siècle, plusieurs d'entre elles visent à montrer que l'orientation du plan de division semble suivre des règles mathématiques, et laissent entendre qu'elle pourrait être prédite à partir de la géométrie cellulaire. Ces études ont été peu considérées jusqu'à récemment où quelques chercheurs ont revisité ces règles [Besson and Dumais, 2011, Louveaux et al., 2016]. Ces règles pourraient être comprises au travers d'interprétations liées à des facteurs génétiques, moléculaires ou encore physiques.

Dans un tissu, les cellules s'organisent en patterns caractérisés par l'orientation des parois, la taille des cellules, la géométrie des cellules et les contacts entre cellules voisines. Les propriétés d'un pattern donné sont déterminées par la combinaison, entre les différentes caractéristiques des divisions cellulaires, qui l'ont généré.

La symétrie ou l'asymétrie d'une division est une de ces caractéristiques. Classiquement, on qualifie une division d'asymétrique lorsque les deux cellules filles n'ont pas les mêmes identités. On

alors fait référence à une asymétrie développementale [Dubrovsky et al., 2001, Rasmussen et al., 2011]. L'utilisation de données d'imagerie 3D [Yoshida et al., 2014] a permis de mettre en relation l'asymétrie fonctionnelle d'une division avec son asymétrie volumique. Dans le cadre du présent travail, les facteurs génétiques n'ont pas été pris en compte. Une division symétrique sera donc une division qui donne lieu à deux cellules filles de volume similaire, contrairement à une division asymétrique. La limite entre symétrie et asymétrie volumique est en théorie claire, mais la variabilité biologique nous montrera que qualifier la symétrie d'une division n'est pas simple. Par la suite, les divisions seront qualifiées par rapport à leur volume ratio (V_r) et celui-ci sera exprimé par le volume de la plus petite cellule fille sur la somme du volume des deux cellules filles.

$$V_r = \frac{\min(V_{f1}, V_{f2})}{V_{f1} + V_{f2}}$$

L'orientation du plan de division peut également être une manière de caractériser la division. Comme la plante est sans cesse en croissance, les biologistes n'utilisent pas un référentiel fixe mais plutôt la surface de la plante pour caractériser l'orientation du plan de division. Ainsi une division péricline est une division dont le plan de division est parallèle à la surface de la plante. Cette orientation permet de former de nouvelles couches cellulaires. Par opposition, une division anticline est une division dont le plan de division est perpendiculaire à la surface de la plante. On parle de division oblique pour tout autre division qui n'entre pas dans ces catégories. D'autre part, historiquement, l'interface qui divise la cellule mère a été nommée « plan de division », bien qu'elle puisse parfois être courbe (exemple des méristemoïdes dans les feuilles, ou de la division qui donne le stade dermatogène du développement embryonnaire).

De plus, la croissance cellulaire peut avoir différentes caractéristiques : être isotrope, c.à.d. homogène dans toutes les directions de l'espace, ou être anisotrope, c.à.d. orientée selon une direction de l'espace. La croissance observée est la croissance cellulaire intrinsèque contrainte par son environnement, ainsi, par exemple, même si elle semble orientée ce peut être uniquement dû à la présence de contraintes externes venant des cellules environnantes, comme l'ont montré Bassel et al. par modélisation de la croissance des racines [Bassel et al., 2014].

L'interaction entre la croissance et la division cellulaire confère aux tissus des propriétés émergentes, que l'on ne peut pas observer dans des systèmes où les processus sont isolés. Les conséquences peuvent être visibles à plusieurs échelles, c'est pourquoi nous avons été analyser l'embryon à différents niveaux d'organisation : tout d'abord à l'échelle de l'organisme entier, puis à l'échelle de domaine et enfin à l'échelle cellulaire.

Les domaines sont des ensembles de cellules et ils peuvent avoir des réalités biologiques variables. Pour considérer l'aspect fonctionnel, des domaines fonctionnels ont été isolés, ce sont des ensembles de cellules précurseurs de tissus avec une même fonction. Il est également possible de définir des domaines spatiaux, composés de cellules localisées au même endroit et non liées par leur fonction.

Dans cette étude, le temps est inféré à partir d'images fixées à différents moments du développement embryonnaire. La notion de synchronisation des divisions est donc tout à fait relative. On qualifiera de synchrones les divisions formant la même génération cellulaire et qui sont fréquemment observées dans le même embryon, et asynchrones, les autres. Pour se repérer dans le temps, la génération cellulaire à partir de la cellule apicale zygotique (notée ac sur la figure 1.3 A) ou le nombre de cellules de l'embryon propre (c.à.d descendantes de cette cellule apicale zygotique) seront utilisés. On appellera « stade canonique », un embryon théorique où toutes les cellules sont à la même génération cellulaire ($G, 2^G c$, pour $G = 0, 1, 2, \dots$).

1.1 L'embryon d'*Arabidopsis thaliana* pour étudier la morphogénèse

1.1.1 Choix du modèle d'étude de la morphogénèse végétale : l'embryon

Chez les végétaux, la présence d'une paroi autour des cellules empêche leur migration. Dans les tissus non apoptotiques, les mécanismes cellulaires impactant la morphogénèse sont donc uniquement la division et la croissance. La morphologie résulte de l'interaction entre ces deux processus cellulaires. En outre, la morphogénèse nécessite d'appréhender le système en 3D pour estimer la forme, la position des cellules ou encore l'orientation de la croissance, mais il nécessite également le suivi temporel pour suivre la succession de divisions et l'évolution de la croissance. Plusieurs systèmes modèles biologiques sont utilisés dans ce règne pour étudier la morphogénèse, ou, indépendamment, la division cellulaire et la croissance cellulaire. Plusieurs paramètres viennent influencer le choix du modèle d'étude.

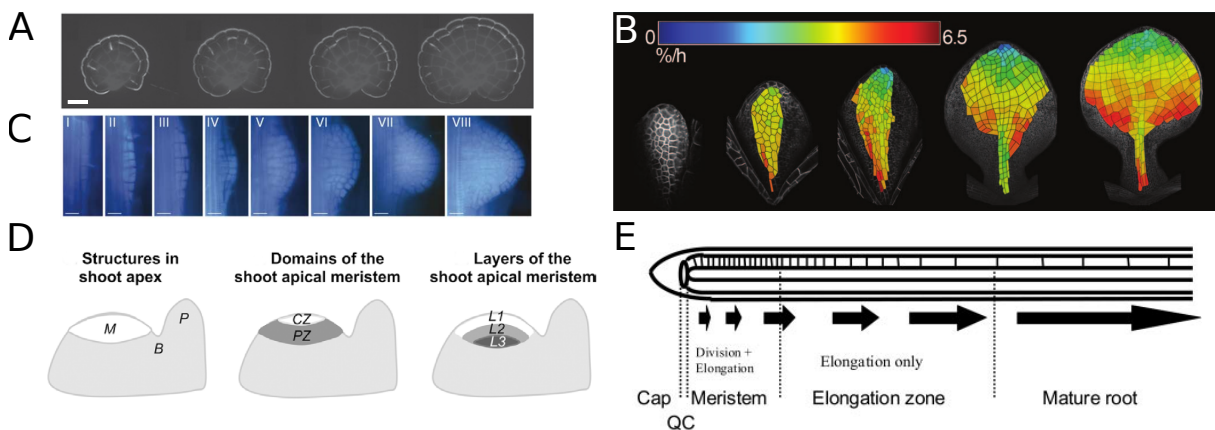


FIGURE 1.1 – Différents systèmes d'étude de la morphogénèse. (A) Suivi de *Coleochaete* en fonction du temps, barre d'échelle : 50 μm (images de [Dupuy et al., 2010]). (B) Suivi de feuille d'*Arabidopsis thaliana* superposé à une segmentation (figure de [Kuchen et al., 2012]). (C) Suivi d'une racine latérale d'*Arabidopsis thaliana*, barre d'échelle : 20 μm (figure de [Péret et al., 2009]). (D) Schéma de coupes longitudinales de l'apex d'*Arabidopsis thaliana* avec la localisation des différentes régions : *M* : méristème, *P* : primordia, *B* : zone frontière (figure de [Robinson et al., 2013]). (E) Schéma simplifié d'une coupe longitudinale de racine d'*Arabidopsis thaliana*, *QC* : centre quiescent (figure de [Beemster et al., 2002]).

Pour diminuer les paramètres à prendre en compte, certaines études se concentrent sur des systèmes cellulaires composés d'une couche cellulaire plus ou moins isolée, comme *Coleochaete*, une algue [Wang et al., 2015, Dupuy et al., 2010], ou encore l'épiderme des feuilles [Bilsborough et al., 2011] [Kuchen et al., 2012]. Ces systèmes permettent une simplification en termes de dimensions spatiales et une approximation par une surface 2D de cellules lors de modélisations. Leur suivi temporel est facilité et permet la reconstruction de la dynamique cellulaire (figure 1.1 A et B).

Bien qu'il ne soit pas un système isolé, le méristème apical caulinaire (MAC) est aussi un modèle très utilisé. C'est une structure accessible, car il est à l'apex de la plante et il est donc facile à imager pour analyser sa cinétique. Il a également l'avantage de contenir plusieurs types cellulaires : des cellules souches et des cellules différenciées avec plusieurs niveaux de différenciations possibles (figure 1.1 D). Dans plusieurs études de la morphogénèse du MAC [Alim et al., 2012, Sahlin and Jönsson, 2010, Boudon et al., 2015, Shapiro et al., 2015, Louveaux et al., 2016], seule la première couche de cellules est prise en compte. Elle est modélisée par une surface plane 2D. Cependant, comme confirmé dans [Shapiro et al., 2015], la forme en dôme du MAC (figure 1.1 D) peut induire des erreurs dans la retranscription des positions géométriques des cellules éloi-

gnées du centre, quand ces dernières sont projetées sur un plan. La morphogenèse du MAC a également été étudiée avec des méthodes de modélisation en 3D de la structure pour reproduire l'émergence des organes [Boudon et al., 2015].

Un autre organe modèle utilisé est la racine et notamment le méristème racinaire [Bassel et al., 2014]. Bien qu'il n'y ait pas de changement de forme, ce système a pour avantage d'être très stéréotypé et d'avoir une organisation radiale qui permet de bien distinguer les types cellulaires (figure 1.1 E), ce qui facilite l'étude de la croissance. D'autre part, au sein d'une même racine, on peut suivre l'évolution des types cellulaires, en regardant une file cellulaire. En effet, l'absence de migration cellulaire et l'organisation en files cellulaires, alimentées par des cellules souches (initiales) à l'extrémité de la racine, permettent de superposer un axe temporel le long de la file cellulaire d'une racine : plus on s'éloigne du méristème, plus la cellule est âgée.

Enfin, d'autres modèles, comme l'émergence des racines latérales [von Wangenheim et al., 2016] (figure 1.1 B), permettent d'étudier des changements de forme avec un faible effectif cellulaire.

L'embryon est également utilisé pour étudier la morphogenèse [Yoshida et al., 2014]. Chez *Arabidopsis thaliana*, l'embryon présente un développement très stéréotypé dans les premiers stades. Au cours du développement embryonnaire, on observe un changement de forme également stéréotypé (peu variable d'un individu à l'autre) et visuellement très marqué. Ceci est un avantage pour repérer à l'œil nu où cibler les analyses fines et identifier les changements de forme. Ces changements progressifs suivent une évolution qui reflète les événements cellulaires se déroulant à l'intérieur de l'embryon. Les événements cellulaires (division ou croissance) sont peu contraints au cours de l'embryogenèse d'*Arabidopsis thaliana* car l'embryon a un certain degré de liberté dans la graine, l'endosperme n'étant pas encore cellularisé (figure 1.2), il y a peu de contraintes physiques, on peut donc presque l'assimiler à un système isolé.

D'autre part, *Arabidopsis thaliana* est un modèle très étudié, pour lequel une grande collection de mutants est disponible. Pour analyser le déterminisme génétique des programmes effectués durant le développement embryonnaire (patterning, morphogenèse, organogenèse), des mutants affectés dans le développement embryonnaire, le pattern cellulaire ou encore de la morphologie embryonnaire ont été considérés [Mayer et al., 1991, Barton and Poethig, 1993a, Jürgens et al., 1991]. Ainsi plusieurs voies de signalisation actives (et interagissant entre elles) pendant le développement ont été identifiées (revue dans [Lau et al., 2012]).

D'autres équipes ont également adopté ce modèle, ce qui a permis de valider certaines des méthodologies utilisées sur l'embryon [Yoshida et al., 2014], et surtout d'avoir déjà une bonne connaissance du système.

Étudier l'embryon comporte cependant certaines limitations, en particulier la présence de l'enveloppe de la graine et la taille de l'embryon qui rendent compliqué le suivi du développement au cours du temps [Gooh et al., 2015]. Les études à l'échelle cellulaire de la morphogenèse de l'embryon sont donc réalisées sur des embryons fixés. Les comportements de division et de croissance cellulaires de chaque embryon ne peuvent donc pas être suivis. En contrepartie, fixer les tissus nous permet d'appliquer des traitements plus pénétrants pour améliorer les marquages, notamment ceux des parois ce qui facilitera la segmentation 3D des cellules. En 2014, Yoshida et al. [Yoshida et al., 2014] montrent que la morphologie des cellules de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana* n'est pas altérée par le protocole permettant une coloration des contours cellulaires (traitement à base d'iodure de propidium). Pour quantifier les paramètres cellulaires de croissance et division ou encore les paramètres de forme, la faible variabilité des premières étapes du développement embryonnaire permet d'inférer la dynamique. Pour cela, des méthodes d'analyses intégrant des populations d'embryons doivent être employées.

L'embryon est

- stéréotypé au début de son développement, ce qui facilite la reconstruction du lignage cellulaire
- très étudié, la connaissance du système est développée et notamment concernant les facteurs génétiques impliqués dans l'embryogenèse.
- difficilement isolable, on ne peut pas suivre l'embryogenèse d'un embryon en continu avec une bonne résolution.

1.1.2 Contexte de l'embryogenèse : la graine

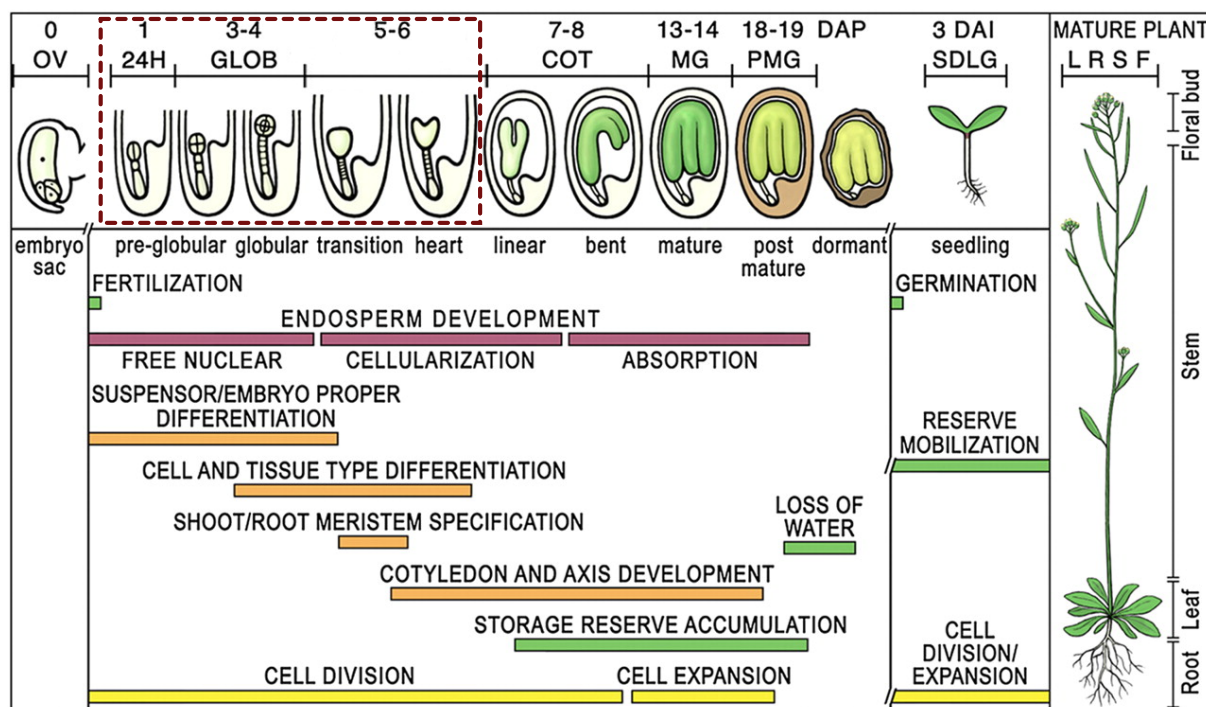


FIGURE 1.2 – Développement de la graine. Les stades entourés en pointillés rouges correspondent au développement embryonnaire précoce. Les processus violets concernent l'endosperme, les processus orange concernent la mise en place du plan d'organisation, les processus en vert concernent les réserves, les processus en jaune concernent le niveau cellulaire. DAP : jours après la pollinisation, DAI : jours après imbibition, OV : ovule (non fécondé), GLOB : étapes globulaires, COT : étapes cotylédons, MG : étape graine mature (verte), PMG : étape graine post-maturation, SDLG : jeune plantule, L : feuilles, R : racine, S : tige, F : bourgeons floraux. (modifiée de [Le et al., 2010])

L'embryogenèse se déroule dans la graine juste après la fécondation dans l'ovule (figure 1.2). La mise en place des plans d'organisation de l'embryon, appelée développement embryonnaire précoce, se fait au cours de la première semaine (voir sur la figure 1.2) [Mayer et al., 1991]. C'est à cette plage du développement que l'on s'intéressera.

Après la morphogenèse de l'embryon, l'embryogenèse se poursuit avec une phase de maturation où il y a un stockage de réserve puis une dessiccation des tissus pour que la graine puisse entrer en dormance. Tous les organes nécessaires à la croissance végétative de l'organisme sont présents.

L'embryon se développe dans la graine. Les stades embryonnaires étudiés ici sont ceux se déroulant juste après la fécondation durant lesquels se mettent en place tous les plans d'organisation.

1.1.3 Le développement embryonnaire : description générale

En 1991, Mansfield et Briarty [Mansfield and Briarty, 1991] ont décrit l'organisation cellulaire de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana* au cours de son développement précoce. Cette description était basée sur des coupes 2D en microscopie optique et électronique d'embryon et se référait à des observations faites sur d'autres organismes végétaux modèles, dont *Capsella bursa-pastoris* [Schulz and Jensen, 1968]. La Capselle était à ce moment là une référence pour le développement embryonnaire, car celui-ci est simple et très stéréotypé.

Par analogie, des stades canoniques successifs par lesquels passe l'embryon d'*Arabidopsis* ont été répertoriés [Mayer et al., 1991, Jürgens et al., 1991]. Les premiers stades sont désignés par leur nombre de cellules (2c, 4c, 8c, 16c, 32c) puis, lorsqu'il devient trop important, par les morphologies embryonnaires : globulaire, triangulaire (ou transitoire), cœur, torpille.

Toutes les descriptions de patterns cellulaires faites dans l'embryon d'*Arabidopsis thaliana*, jusqu'à récemment, avaient été faites à partir de coupes optiques d'embryons fixés à différents stades du développement. Elles restent donc succinctes lorsque le pattern n'est pas stéréotypé et que l'organisation spatiale est plus complexe avec de la variabilité. Depuis 2013, des études 3D de l'organisation cellulaire ont été réalisées comme [Rybel et al., 2013], ou encore [Yoshida et al., 2014]. Depuis 2015, des protocoles permettent le suivi de l'embryon au cours du temps [Gooh et al., 2015] mais n'offrent pas la même résolution cellulaire en 3D que celle obtenue sur des embryons fixés.

Peu de liens entre le changement de forme de l'embryon au cours du développement et le pattern cellulaire ont été établis jusqu'à présent. On peut se demander comment le patterning cellulaire impacte la forme développée. Pour répondre à cette question, une description fine du pattern cellulaire et des changements morphologiques au cours du développement doit être effectuée.

Historiquement, les descriptions de l'embryogenèse précoce ont été faites sur des images 2D, elles sont plus ou moins fines. À l'échelle embryonnaire on observe un changement de forme, par quels mécanismes émerge-t-il ?

1.1.4 Un développement stéréotypé jusqu'à 16 cellules

À partir du zygote unicellulaire (figure 1.3 A) une première division asymétrique et transverse donne d'une part une grande cellule basale (bc sur le stade 1-cell de la figure 1.3 A) qui est à l'origine du suspenseur, de la coiffe et du méristème racinaire de la plantule, et d'autre part une petite cellule apicale (ac sur la figure 1.3 A) qui donnera tout le reste de l'embryon, sauf le méristème racinaire (2 cotylédons, le méristème apical caulinaire, l'hypocotyle et une partie de la racine). Cette division conduit à la mise en place de l'axe apico-basal de l'embryon qui sera représenté dans la plantule par la succession, de haut en bas, du méristème apical caulinaire, de l'hypocotyle, et du méristème racinaire (figure 1.3 A).

La cellule apicale se divise symétriquement le long de l'axe apico-basal (figure 1.3 B G1). Cette cellule ayant une symétrie radiale, plusieurs questions se posent quant au choix de l'orientation dans l'espace de cette division : y a-t-il un facteur qui détermine l'orientation ? Quels seraient les repères spatiaux de référence par rapport à cette première division s'ils en existent ? ...

Ainsi, Yoshida et al. ont montré que l'orientation du premier plan de division de la cellule apicale est corrélée avec le positionnement relatif de l'embryon et des tissus de la graine, bien que cela ne soit pas systématique [Yoshida et al., 2014]. Le devenir de ce premier plan de division, par rapport à l'organisation de la plante, a aussi fait l'objet de quelques analyses [Saulsberry et al., 2002].

Ensuite, les deux cellules filles subissent une division symétrique longitudinale (figure 1.3 B G2) formant le stade embryonnaire 4c. Chacune des 4 cellules se divisera ensuite de façon trans-

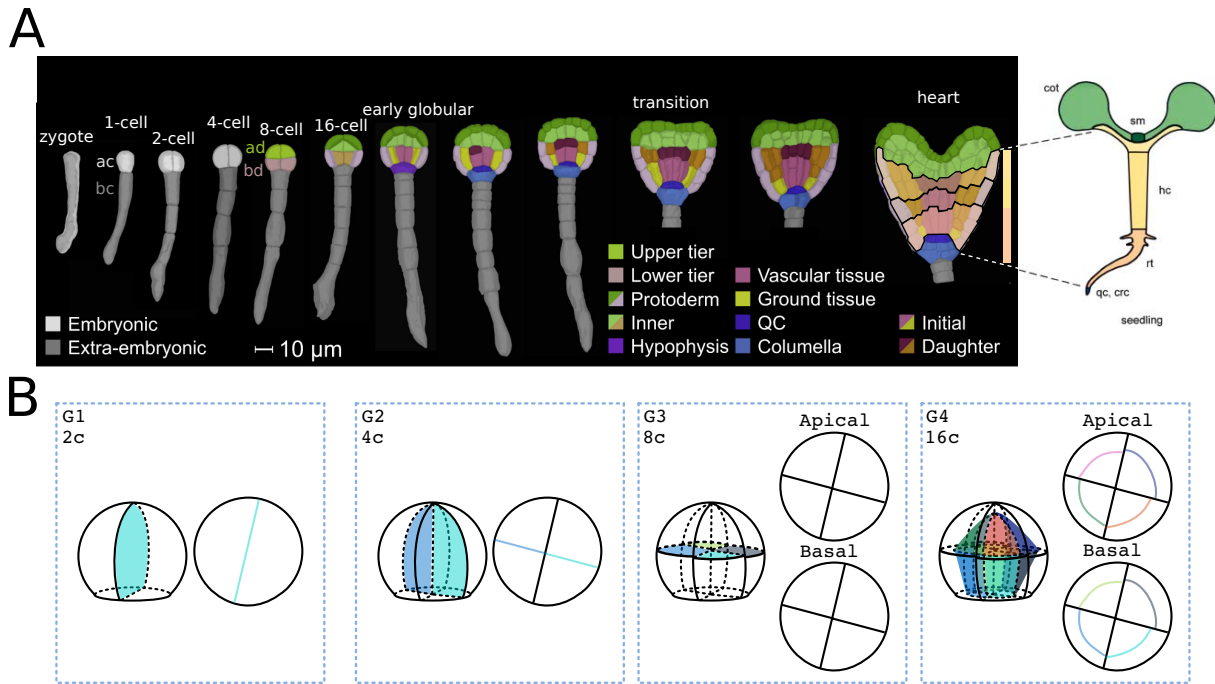


FIGURE 1.3 – Organisation cellulaire de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana*. (A) Développement embryonnaire d'*Arabidopsis thaliana*, *ac* : cellule apicale, *bc* : cellule basale, *ad* : domaine apical, *bd* : domaine basal, *cot* : cotylédon, *sm* : méristème apical caulinaire (MAC), *hc* : hypocotyle, *rt* : racine, *qc* : centre quiescent, *crc* : coiffe, (modifiée de [Yoshida et al., 2014] et [Laux et al., 2004]). (B) Stades canoniques du développement précoce vue de face et vue(s) transverse(s).

verse, non symétrique (figure 1.3 B G3). Ainsi apparaîtront deux parties distinctes de l'embryon : une partie apicale plus petite (*ad* sur la figure 1.3 A) qui donnera les 2 cotylédons et le méristème apical caulinaire, et une partie basale (*cd* sur la figure 1.3 A) [Aida et al., 1999] qui donnera l'hypocotyle ainsi qu'une partie de la racine. Depuis l'utilisation de la 3D pour étudier l'embryon, les asymétries volumiques qui caractérisent certaines divisions peuvent être quantifiées avec la mesure du volume ratio de la division, pour la transition 4c à 8c, elle est d'en moyenne 0.45 ($V_{apical} = 0.45 * (V_{apical} + V_{basal})$) [Yoshida et al., 2014, Moukhtar et al., 2016].

Pour passer du stade 8 cellules au stade 16 cellules (parfois appelé stade dermatogène), chaque cellule se divise asymétriquement de façon péricline (figure 1.3 B G4). Les cellules filles externes, deux fois plus volumineuses que les internes, donneront le protoderme. La mise en place d'un protoderme (futur épiderme) entourant un domaine interne se fait donc avec une asymétrie de volume ratio 1/3 [Yoshida et al., 2014, Moukhtar et al., 2016]. À ce stade, les tissus de l'embryon sont organisés de façon radiale (figure 1.3 B G4 coupes transversales). Cette symétrie radiale restera présente dans la partie hypocotyle et racinaire de la jeune plantule avec la succession concentrique des tissus vasculaires, du parenchyme et du protoderme (figure 1.6 d).

Durant tous ces stades, la croissance de l'embryon est assez faible, avec un volume embryonnaire qui quadruple en moyenne alors que le nombre de cellules est multiplié par 16 [Yoshida et al., 2014] (figure 1.4). Les cellules sont de plus en plus petites et passent de $1.5 * 10^3 \mu m^3$ à moins de $500 \mu m^3$ au stade 16 cellules [Yoshida et al., 2014]. La forme de l'embryon semble rester proche d'une sphère tronquée (hémisphérique).

Dans ces premières étapes du développement d'*Arabidopsis thaliana*, aucune organisation cellulaire différente, ou remettant en cause le modèle stéréotypé décrit, n'a été observée. De plus, cette invariance dans la séquence de divisions est accompagnée d'une assez bonne synchronisa-

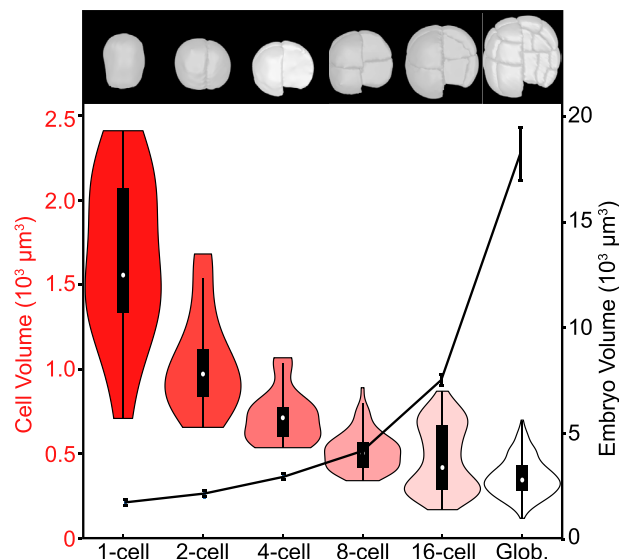


FIGURE 1.4 – Évolution du volume cellulaire et du volume embryonnaire d'*Arabidopsis thaliana* jusqu'à 32c. (extrait de [Yoshida et al., 2014])

tion des divisions, ce qui augmente la probabilité d'observer l'embryon aux stades canoniques : 2 cellules, 4 cellules, 8 cellules, 16 cellules. Les rares observations de stades intermédiaires entre les stades canoniques montrent que la synchronisation n'est pas parfaite : il y a une légère variabilité [Yoshida et al., 2014]. Au fur et à mesure du développement, les divisions sont de moins en moins synchrones et on observe proportionnellement de plus en plus les stades intermédiaires. De plus, une proposition non démontrée mais souvent utilisée (notamment dans les modèles numériques) lie le volume cellulaire et le moment de division, il semble que les cellules se divisent quand elles atteignent un certain volume cellulaire. On peut donc supposer que l'asymétrie volumique de la division séparant le protoderme et les tissus internes, où le protoderme a un volume plus important, va favoriser l'asynchronisation des cellules. En imagerie en temps continu, on observe que le protoderme se divise avant les tissus internes [Gooh et al., 2015] : l'asynchronisation est d'autant plus présente après 16 cellules. Le temps moyen de division pour les cellules embryonnaires d'*Arabidopsis thaliana* est d'environ 10h [Jenik et al., 2005, Gooh et al., 2015].

Jusqu'au stade 16 cellules, l'embryon est stéréotypé dans le patterning cellulaire : une succession de division symétrique ou asymétrique dont l'ordre est toujours inchangé. L'axe apico-basal et la symétrie radiale sont mis en place.

La morphologie embryonnaire est visuellement inchangée : elle reste quasi-sphérique.

1.1.5 Le développement de l'embryon de 16 cellules jusqu'au stade cœur tardif

Les stades de développement suivants sont nommés en fonction de la forme de l'embryon : l'embryon va passer d'une forme globulaire (forme qui est apparemment présente au moins jusqu'à 32 cellules) à une forme de cœur (le stade cœur) en passant par une forme triangulaire (le stade transitoire) (figure 1.3). Avec ce changement de forme, la symétrie radiale à l'échelle de l'embryon global est perdue pour ne garder que deux plans de symétrie bilatérale. Le premier plan passe longitudinalement entre les deux cotylédons qui forment l'axe gauche-droite (sans distinction entre les cotylédons), et un deuxième est perpendiculaire au premier. Une des premières interrogations, sur les relations entre la morphologie bilatérale et le patterning cellulaire, est la présence d'un lien entre le premier plan de division et le premier plan de symétrie bilatérale observé au stade cœur : est-ce que le plan de division donnant les deux cellules de G1 prédispose le

plan de division bilatérale entre les deux cotylédons ? Dans une étude avec des suivis de devenir cellulaire par activation d'un gène rapporteur dans une ou l'autre des cellules G1, Saulsberry et al. montrent que ce n'est toutefois pas toujours le cas [Saulsberry et al., 2002].

Au niveau cellulaire, les parties apicale et basale de l'embryon vont se comporter différemment après le stade 16c. De la variabilité va apparaître entre les embryons, ce n'est plus aussi stéréotypé.

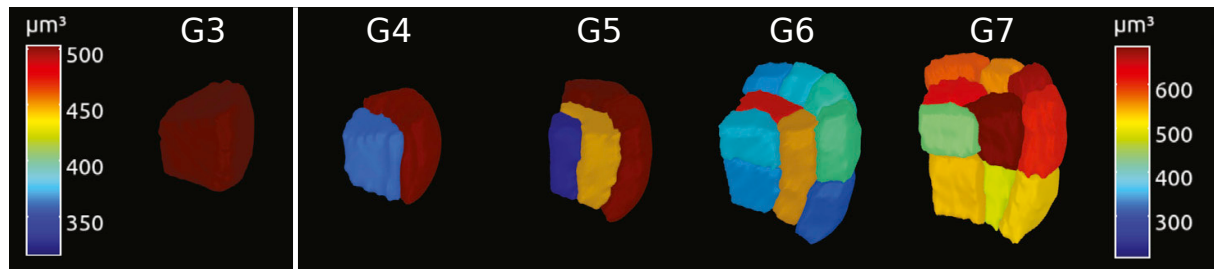


FIGURE 1.5 – Évolution d'un huitième basal de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana* à partir d'un embryon 8 cellules (à gauche). Les couleurs des cellules correspondent aux volumes cellulaires (μm^3) en suivant la table d'équivalence indiquée (figure adaptée de [Yoshida et al., 2014]).

Partie Basale :

Tout au long du développement, dans la partie basale de l'embryon, le nombre de couches concentriques dans les parties internes augmente [Scheres et al., 1995], en alternant divisions périclines et anticlines. Lorsque la couche formée a des déterminants d'identité cellulaire différents, elle forme un nouveau tissu. La symétrie radiale le long de l'axe apico-basal est donc conservée à l'échelle cellulaire, dans la partie basale de l'embryon (figure 1.6). En 2013, [Rybel et al., 2013] commence à caractériser l'organisation 3D des tissus vasculaires et, en 2014, Yoshida et al. apportent une description 3D détaillée, génération par génération, des événements de division de la partie basale de l'embryon, à partir du stade 16-cellules et sur 2 (dans les tissus les plus internes) à 3 générations cellulaires (figure 1.5). Les auteurs détaillent les orientations des plans de division rencontrés et construisent des cartes 3D des volumes cellulaires des cellules filles, ce qui leur permet d'en déduire le type de divisions rencontrés (symétriques ou asymétriques en terme de volume), et de mettre en évidence une corrélation entre la symétrie des divisions et la présence de facteurs de différenciation cellulaire. Ainsi la cellule basale interne de la cinquième génération cellulaire se divise asymétriquement pour donner une petite cellule interne (figure 1.5) qui est à l'origine des tissus vasculaires. La deuxième cellule fille donnera les tissus du cortex. Par la suite, l'endoderme de la racine sera formé à partir d'une cellule descendante de cette dernière. Une division péricline et asymétrique, par l'identité cellulaire acquise par ses deux cellules filles, donnera une cellule interne endodermique et une cellule externe avec l'identité d'une cellule du cortex [van den Berg et al., 1995, Laurenzio et al., 1996].

Partie apicale :

Les tissus apicaux vont se diviser de manière moins stéréotypée avec des patterns cellulaires variables entre les individus et la symétrie radiale va être perdue à l'échelle cellulaire. Avec les méthodes de visualisation 2D, les descriptions des patterns cellulaires n'ont pas permis de dégager des constantes comme pour la partie basale. En 1993, Barton et Poethig les décrivent comme un mélange d'orientations des divisions [Barton and Poethig, 1993a]. En 1996, Jürgens décrit les divisions comme aléatoires [Jürgens, 1996]. En 2004, Willemsen et Scheres parlent d'un pattern composé d'un mélange de divisions transverses [Willemsen and Scheres, 2004]. Dans l'étude 3D de l'embryon [Yoshida et al., 2014], un début de caractérisation plus précise du pattern cellulaire est proposé. Leurs mesures, sur les patterns observés, montrent que, dans la partie protodermique

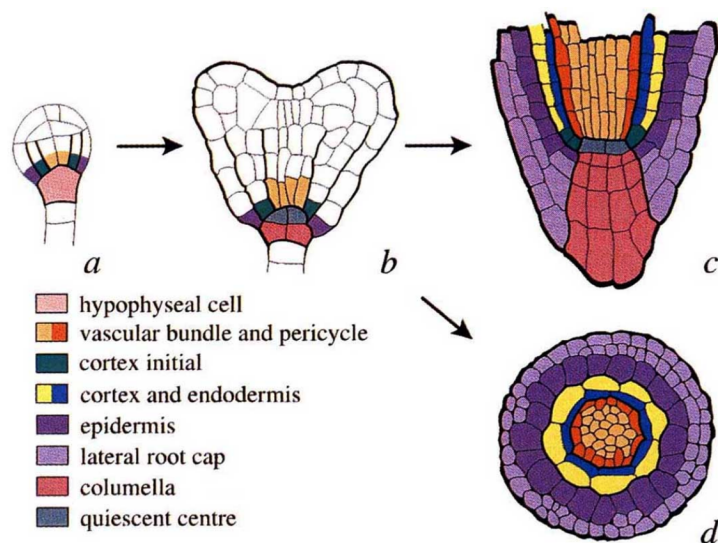


FIGURE 1.6 – Origine et organisation des tissus de la racine. (a) coupe longitudinale d'embryon globulaire, (b) coupe longitudinale d'embryon au stade coeur, (c) racine vue en coupe longitudinale, (d) racine vue en coupe transversale, (d'après [van den Berg et al., 1995]).

apicale à G4, la première division, qui est une division non stéréotypée, est perpendiculaire à l'axe gauche-droite de l'embryon dans 86% des cas [Yoshida et al., 2014](figure 1.7). Dans la partie apicale interne, la division est également perpendiculaire à l'axe gauche-droite de l'embryon dans 74% des cas [Yoshida et al., 2014](figure 1.7). Dans ces deux tissus, le reste des cas observés montre une division avec une orientation radiale.

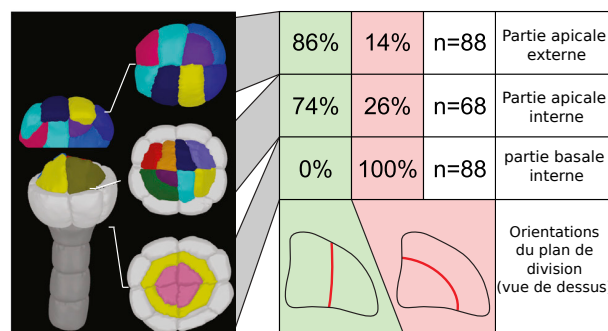


FIGURE 1.7 – Fréquences observées des différentes orientations des parois nouvellement formées à la 5^e génération cellulaire. (figure adaptée de [Yoshida et al., 2014])

Dans les autres études, la partie apicale est séparée en régions cellulaires correspondant à des futurs domaines fonctionnels (figure 1.8 droite). La partie apicale va se différencier en 3 domaines (figure 1.3 A pour une vue longitudinale) le MAC (méristème apical caulinaire), une partie de l'hypocotyle et les cotylédons de part et d'autre du MAC. Le MAC est composé de 3 couches de cellules superposées : L1, L2 et L3. Dans les cotylédons, la couche protodermique protège les cellules internes agencées anticlinalement.

Après le stade 16 cellules, la morphologie embryonnaire évolue vers une forme de cœur avec une symétrie bilatérale.

Dans la partie basale de l'embryon les patterns cellulaires restent stéréotypés et une symétrie radiale s'installe. Mais dans la partie apicale de l'embryon, les patterns ne sont plus aussi stéréotypés et donc les descriptions sont beaucoup moins précises.

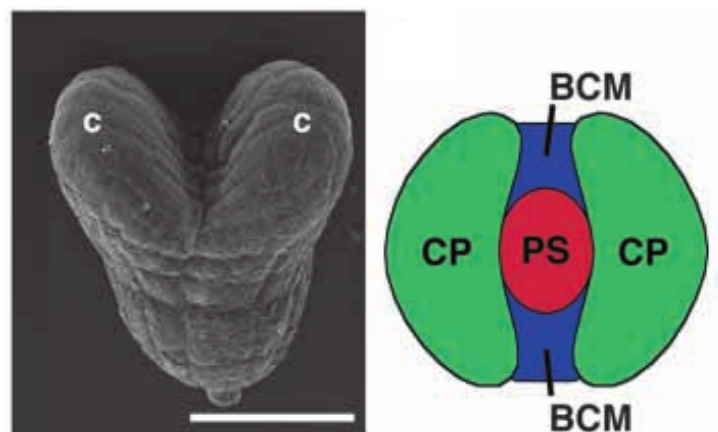


FIGURE 1.8 – Plan d'organisation de la partie apicale. À gauche : image de microscopie électronique d'un embryon au stade cœur tardif, *c* : cotylédon, (bar d'échelle : 40 μm). À droite : Schéma d'un embryon au stade cœur vue de dessus et les régions fonctionnelles, *CP* : primordia de cotylédons, *BCM* : région frontière des marges des cotylédons, *PS* : MAC présomptif, (adaptée de [Aida et al., 1999]).

1.1.6 Facteurs génétiques impliqués dans la mise en place des grands plans d'organisation de l'embryon

Des mutants affectés dans les grands plans d'organisation [Jürgens et al., 1991, Mayer et al., 1991], et présentant généralement des modifications de la forme de l'embryon, ont permis de mettre en évidence les acteurs génétiques de ces processus. La forme de l'embryon reflète la mise en place de structures indispensables au bon développement de l'embryon puis de la plantule. Elle dépend de facteurs génétiques (revue dans [Abid et al., 2010], voir figure 1.22). Certains de ces mutants ne sont pas viables ou fertiles, ce qui complique leur étude. Pour savoir quels facteurs modulent quelles parties de la forme, l'étude de ces mutants permet de retracer l'action de ces facteurs. Les défauts peuvent impacter toutes les échelles (cellule, organe, embryon) et apparaître à différents moments au cours du développement. D'autre part, les voies génétiques impliquées dans la mise en forme de l'embryon interagissent entre elles (figure 1.26) et il est souvent difficile d'affecter des facteurs à des propriétés morphologique bien précises, même si certains acteurs de ces voies ont été reliés à la mise en place de l'axe apico-basal, de la symétrie radiale, de certains organes ou d'événements cellulaires. Les effets peuvent être variés et plus ou moins localisés dans l'espace et/ou dans le temps.

Une morphologie embryonnaire observée chez certains mutants est la perte de la forme de cœur. Les mutants des gènes *CUC*, impliqués dans la délimitation des organes et la formation du MAC, donnent des cotylédons fusionnés qui forment une coupe (voir embryon B sur la figure 1.22) car les limites des organes n'ont pas été marquées. L'étude des doubles mutants *cuc* a permis de construire des cartes d'expression génique qui expliquent la formation de la partie apicale de l'embryon [Aida et al., 2002]. Un autre acteur génétique est la protéine SHOOT MERISTEMLESS (STM) impliquée dans la mise en place de l'identité méristématique du MAC et qui est activée par *CUC1* et *CUC2*. Le mutant *stm* n'a pas de méristème apical caulinaire mais tous les autres organes sont parfaitement développés [Barton and Poethig, 1993b]. Bien que le MAC semble apparaître assez tard relativement aux autres organes, ce facteur est exprimé assez tôt dans le développement. Dans la partie basale de l'embryon, les défauts morphologiques sont moins visibles. La mutation de gènes peut induire la perte d'un tissu. Un exemple est le cas du mutant *src* (gène encodant la protéine SCARECROW). Dans ce mutant, le changement d'orientation d'un plan de division dans la partie basale de l'embryon, induit l'absence d'une couche

cellulaire dans la racine de la plantule (figure 1.12) [Laurenzio et al., 1996].

L'organisme a des programmes génétiques plus ou moins ciblés qui induisent des bouleversements dans la mise en place de l'ensemble des tissus. La structure 3D va résulter d'un équilibre entre ces différents programmes. En perturbant cet équilibre dans les mutants, on apporte des informations sur les facteurs génétiques importants dans les patterns cellulaires, la mise en place des organes ou encore la forme de l'embryon. *Arabidopsis thaliana* est un organisme modèle dont les outils génétiques ont été développés dans ce sens.

1.2 La division cellulaire chez les plantes

Un des mécanismes cellulaires de la morphogenèse de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana* est la division. Durant la division, des nouvelles membranes sont mises en place pour séparer la cellule en deux. La formation de la paroi est ensuite induite dans la zone inter-membranaire. L'orientation du plan de division, et sa position, sont deux paramètres importants dans les cellules possédant une paroi empêchant la migration. Pour se diviser, les plantes n'utilisent pas le mécanisme de division de type anneau contractile présent chez les cellules animales ou bactériennes : un autre système moléculaire est utilisé.

1.2.1 Les mécanismes moléculaire de la division

Structures moléculaires impliquées

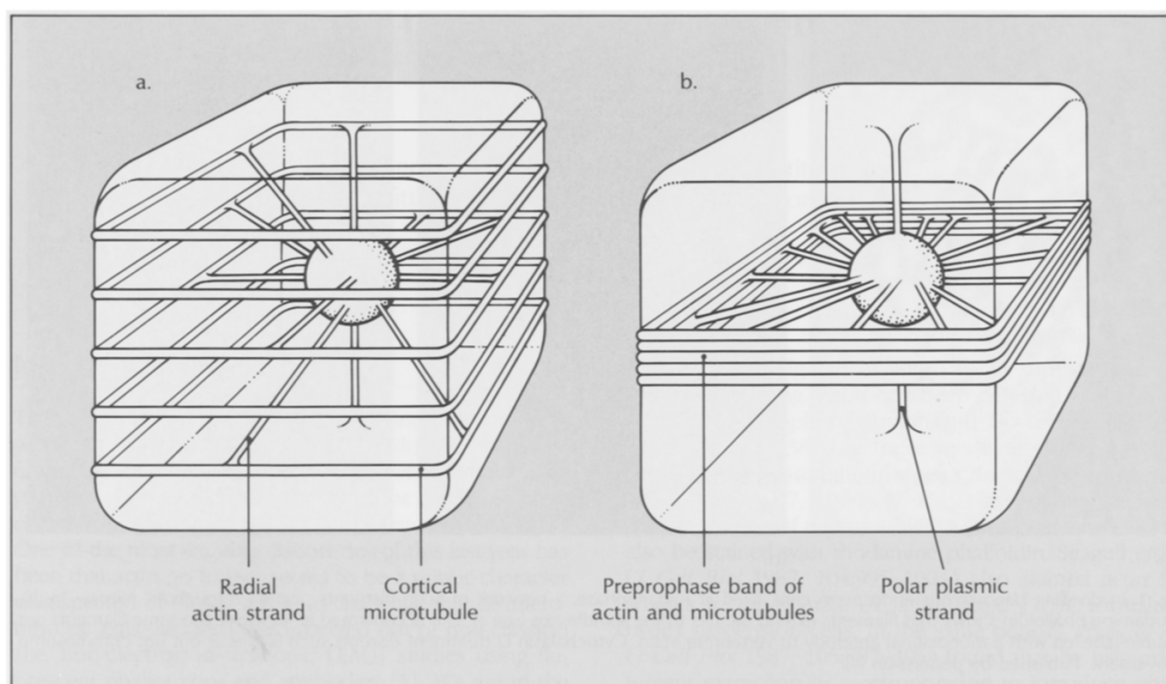


FIGURE 1.9 – Organisation 3D du PPB et du noyau dans la cellule (a) qui se prépare à la mitose et (b) en préprophase, (extrait de [Lloyd, 1989]).

Peu avant l'entrée en mitose, une structure propre aux plantes, dérivée du cytosquelette, va se mettre en place : la bande de préprophase (PPB). Cette structure est faite de microtubules et d'actine. Au début, le PPB rayonne du noyau au cortex de la cellule où se situent des filaments positionnés circulairement sur une bande assez large (schéma 1.9 a et 1.10 early PPB) [Flanders et al., 1990]. Par la suite, les filaments cytosquelettiques vont se concentrer sur

une fine bande en position corticale faisant le tour de la cellule au niveau du noyau (schéma 1.9 b et 1.10 late PPB). Cette structure est transitoire et ne va pas perdurer pendant la mitose, mais des marqueurs moléculaires sont laissés à son emplacement qui serviront pour guider la formation de la membrane (revue dans [Rasmussen et al., 2011]). La nouvelle membrane est construite entre les chromosomes ségrégués, avec un système de fusion de vésicule contenant le matériel nécessaire à la formation de la paroi (figure 1.21). L'emplacement de l'établissement du plan de division concorde avec la position du PPB.

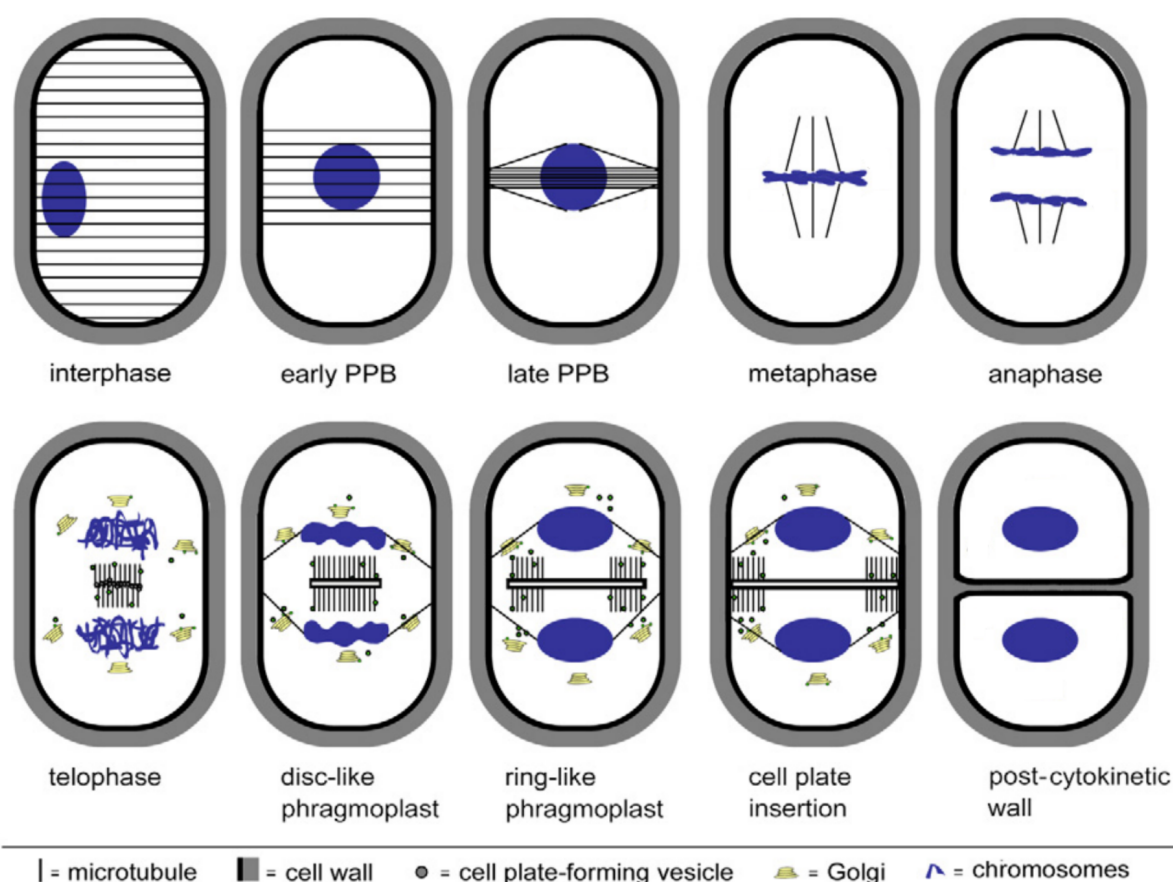


FIGURE 1.10 – Modèle de la division cellulaire chez les plantes, centré sur les états des structures mitotiques du cytosquelette, (adaptée de [Van Damme and Geelen, 2008]).

Une structure cytosquelettique (le PPB) irradiante du noyau, et issue d'un équilibre de tension [Goodbody et al., 1991], préfigure l'emplacement de la future paroi lors de la division, sans que le mécanisme complet ne soit compris.

Régulation du cytosquelette

Comme vu précédemment, le cytosquelette change d'organisation au cours du cycle cellulaire. La mise en place du plan de division est particulièrement influencée par des structures cytosquelettiques.

Des acteurs moléculaires aident à la mise en place des structures cytosquelettiques lors de la phase de préparation à la division. Un des réseaux moléculaires concernés met en jeu des interactions entre un complexe protéique, PP2A-FASS-PP2C, et un dimère de protéines TON1 et TRM [Spinner et al., 2013]. Les mutants correspondants (*fass*, *ton* ...) ont une organisation cellulaire modifiée avec des orientations des plans de division qui semblent anor-

males [Spinner et al., 2013]. Le pattern cellulaire du mutant *fass* a été décrit comme aléatoire [Torres-Ruiz and Jurgens, 1994]. Les géométries cellulaires sont très rapidement différentes de celles observées dans le sauvage (figure 1.22 F), avec une plus grande variabilité dans les volumes ratios des divisions et les volumes embryonnaires [Yoshida et al., 2014]. Malgré ces défauts, les embryons mutants sont peu impactés dans l'organogenèse et la morphogenèse [Torres-Ruiz and Jurgens, 1994] (figure 1.22). Les organes de ce mutant se forment et une morphologie cordiforme émerge de l'embryogenèse. Le mutant *ton* présente une absence de PPB [Camilleri et al., 2002] ce qui affecte la division et la croissance de ses cellules mais son développement embryonnaire mène également, dans une majorité des cas, à une morphologie de cœur (figure 1.22 G). Ces mutants remettent en question le lien entre les échelles car ils indiquent une certaine indépendance des processus à l'échelle tissulaire (patterning) et à l'échelle embryonnaire (morphogenèse).

En modifiant la régulation du cytosquelette on impacte essentiellement sur le patterning mais celui-ci peut également influencer la croissance (voir la section 1.3 page 30).

La perturbation de la mise en place du PPB modifie le patterning cellulaire de l'embryon : les géométries cellulaires et l'orientation des plans de division sont différents. Malgré une organisation cellulaire différente (patterning), certains mutants développent une morphologie de cœur.

Division asymétrique pour l'identité cellulaire

Le modèle proposé des mécanismes moléculaires de la division et de ses régulateurs a été développé dans les cellules présentant une division plutôt commune : une division symétrique quant à la destinée des cellules filles. Plusieurs hypothèses ont été émises sur l'origine de la divergence du destin cellulaire dans les divisions asymétriques (revue dans [Rasmussen et al., 2011]) :

- la présence de facteurs intracellulaires qui provoquent cette asymétrie, soit avec une répartition non homogène de facteurs dans la cellule mère, soit par le décalage des membranes formées (exemple des méristemoïdes dans la feuille) [Zhao and Sack, 1999].
- l'influence de l'environnement de la cellule qui en se divisant donne deux cellules qui n'ont pas le même entourage. Cette hypothèse est soutenue par des expériences d'ablation. En supprimant une cellule, sa voisine en se divisant donne une cellule fille à la même position qui va prendre l'identité cellulaire de la cellule détruite [van den Berg et al., 1995, Gooh et al., 2015]. Un système moléculaire d'inhibition réciproque entre les cellules adjacentes permet de restreindre l'expression de gènes, entre cellules voisines, et ainsi d'orienter leur identité cellulaire l'une par rapport à l'autre.
- le contrôle du mécanisme de division par des facteurs moléculaires ou physiques conduisant à une asymétrie volumique [Yoshida et al., 2014]. Le mécanisme permettant de contrôler l'orientation de la nouvelle paroi entre les deux cellules filles n'est pas connu.

Plusieurs divisions asymétriques surviennent au cours du développement embryonnaire précoce. Ces divisions mettent en place les différents types cellulaires présents dans les organes de la jeune plantule. Lors de la mise en place de l'axe apico-basal, les gènes *wox* auront une répartition différentielle en fonction de la position de la cellule selon cet axe [Haecker et al., 2004]. Entre autres, au stade 8c, on a une séparation de deux gènes *wox* entre les parties apicale et basale de l'embryon. Le gène *WOX2* est activé dans la partie apicale de l'embryon. Sa mutation, dans le mutant *wox2*, entraîne une altération de l'orientation du plan de division : la division, normalement péricline, dans les cellules apicales au stade 8c du sauvage, est transverse dans les cellules apicales du mutant (figure 1.11 B, flèche). Par la suite, l'embryon du mutant *wox2* a majoritairement un phénotype sauvage au niveau des cotylédons bien qu'il y ait également des cas de fusion des cotylédons [Lie et al., 2012].

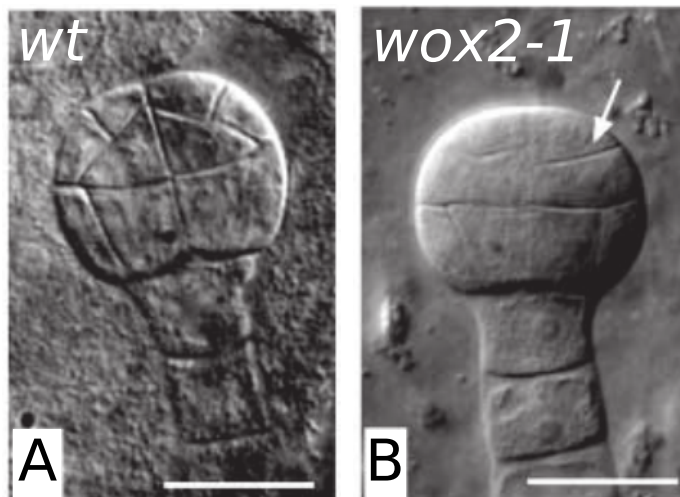


FIGURE 1.11 – Coupes d'embryons observés en microscopie à contraste interférentiel. (A) sauvage au stade 32 cellules environ, (B) mutant *wox2-1* au stade 32 cellules environ, barre d'échelle de $20\mu\text{m}$, (de [Haecker et al., 2004])

Un autre exemple, le mutant *scr* [Laurenzio et al., 1996] (protéine SCARECROW mutée), présente une racine courte avec une couche cellulaire en moins (figure 1.12 B). Ce défaut dans l'organogenèse vient d'un défaut au niveau du pattern de division : *scr* ne réalise pas la division asymétrique péricle de la huitième génération cellulaire dans la partie basale de l'embryon. Cette division crée deux cellules qui donneront deux tissus différents : l'endoderme et le cortex. La protéine SCARECROW est à l'origine de cette division asymétrique.

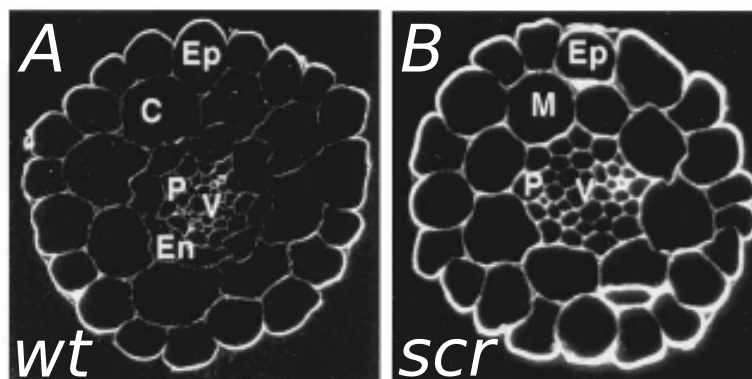


FIGURE 1.12 – coupes de racine avec les parois immunomarquées. (A) sauvage, Ep : epithelium, C : cortex, P : péricycle, En : endoderme, v : tissus vasculaire. (B) mutant *scr* avec en M la couche mutante, images de [Laurenzio et al., 1996]

L'asymétrie identitaire est parfois issue d'une division géométriquement asymétrique. Au cours du développement embryonnaire, pour mettre en place les plans d'organisation, des facteurs génétiques sont impliqués dans des divisions asymétriques générant des nouveaux types cellulaires.

Division symétrique

La prolifération cellulaire passe par des divisions qui sont symétriques au niveau de l'identité des cellules filles. Si des facteurs moléculaires ou physiques contrôlent la mise en place de divisions asymétriques, qu'en est-il pour celle des divisions symétriques ?

Dans l'embryon, les divisions stéréotypées, donnant la G2 et la G3, sont prolifératives mais le mutant *mp* (un mutant auxinique, détaillé section 1.4.1 page 33), change l'orientation du plan de la première division (figure 1.24) : le plan normalement longitudinal est transversal dans le mutant. Cette observation laisse à penser une implication de la voie auxinique dans cette division.

D'autre part, cette division est qualifiée de symétrique selon le critère d'identités cellulaires, elle l'est également avec le critère volumique car les deux cellules de la première génération descendante de la cellule apicale du zygote ont statistiquement le même volume [Yoshida et al., 2014]. Dans des stades plus tardifs, avec plus de 16 cellules, les divisions symétriques permettent la

prolifération des tissus formés, comme dans le protoderme basal, mais certaines produisent des cellules filles de volumes significativement différents [Yoshida et al., 2014]. La qualification de la symétrie d'une cellule est donc floue. L'association de la symétrie et de la prolifération cellulaire est discutable.

Dans la littérature, la division est qualifiée de symétrique lors de la prolifération d'un tissu. L'existence d'un contrôle de la mise en place du plan de division, via des facteurs moléculaires, a été vue dans certaines de ces divisions, mais quelle peut être la généralisation de ces observations isolées ?

Yoshida et al. ont lié la symétrie d'identité à la symétrie volumique mais :

Est-ce que des divisions symétriques au niveau développemental peuvent être asymétriques au niveau volumique ?

L'égalité des volumes ne sera pas parfaite entre les cellules filles, quand peut on considérer une division asymétrique ?

1.2.2 Règles géométriques de division symétrique

Au cours de l'observation des tissus, des similitudes dans les orientations des plans de division par rapport aux géométries cellulaires ont laissé penser qu'une règle serait à la base de la sélection de la position de la nouvelle membrane. Dans différents organismes, des règles respectées par un ensemble de cas similaires ont été cherchées. Les observations portaient sur des divisions accessibles, souvent anticlines, qualifiées de symétriques. Il s'en est dégagé des propositions (revue dans [Minc and Piel, 2012]) basées sur des observations en 2 dimensions de divisions symétriques dans des tissus animaux ou végétaux.

Des règles ont ainsi été proposées pour prédire le positionnement du plan de division à partir de la géométrie cellulaire. Les règles proposées peuvent être regroupées en règles déterministes d'une part et en règles stochastiques d'autre part. Les règles déterministes sont reproductibles : une cellule avec les mêmes paramètres initiaux donnera toujours le même plan de division. Les règles stochastiques proposent qu'une cellule avec les mêmes conditions initiales ne reproduit pas forcément la même division. Cette règle laisse à penser que le vivant admet de la variabilité et de la flexibilité.

Il est également possible de discerner les types de division et proposer des règles pour les divisions symétriques et des règles pour les divisions asymétriques.

Les différentes règles proposées sont décrites ci-dessous selon leur date de parution dans la littérature.

Règles déterministes géométriques

Les premières règles portaient sur des caractéristiques visuelles des cellules faciles à observer.

Hofmeister (1863) : le plan de division est perpendiculaire à l'axe principal de croissance (souvent le plus grand axe) pour les divisions symétriques chez les plantes [Hofmeister, 1863]. Cette règle nécessite de connaître l'orientation du champ de croissance mais apporte une solution possible pour toute géométrie cellulaire (figure 1.13).

Sachs (1878) : le plan de division est perpendiculaire à une paroi existante de la cellule en division [Sachs, 1887]. Pour une géométrie donnée, la règle de Sachs propose plusieurs possibilités de divisions (figure 1.14).

Errera (1888) : faisant l'analogie entre la cellule et une bulle de savon (similarité entre membrane biologique et membrane physique : tension, pression interne ...), Errera propose que le plan

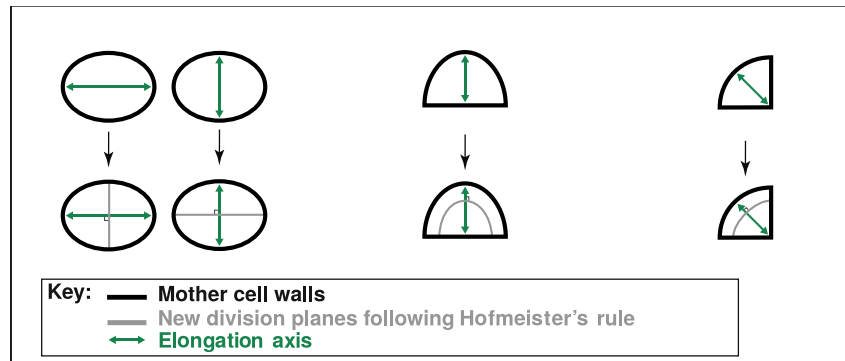


FIGURE 1.13 – Divisions possibles dans des géométries observées chez les plantes, selon différents axes de croissance possibles, avec la règle de Hofmeister (inspirée de [Minc and Piel, 2012]).

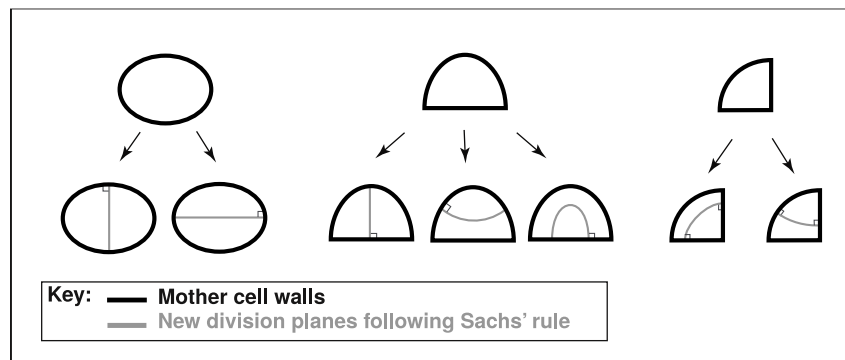


FIGURE 1.14 – Divisions possibles dans des géométries observées chez les plantes avec la règle de Sachs (extrait de [Minc and Piel, 2012]).

de division, tout comme une interface entre deux bulles de savon, tend à minimiser sa tension de surface. Le plan de division serait donc une surface minimale avec une courbure moyenne nulle [Errera, 1888]. Pour une géométrie donnée, cette règle propose une unique solution de division (figure 1.15).

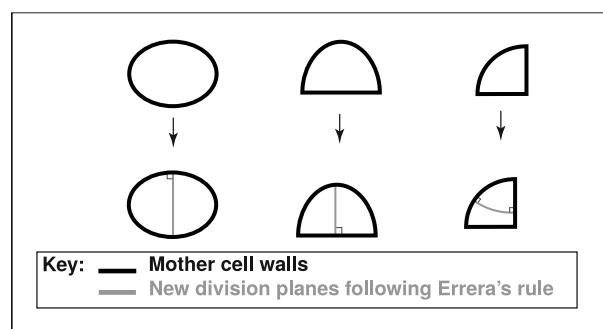


FIGURE 1.15 – Divisions possibles dans des géométries observées chez les plantes avec la règle d'Errera (extrait de [Minc and Piel, 2012]).

Hertwig (1884) : il est proposé que le plan de division soit mis en place perpendiculairement au plus long axe et passant par le centroïde de la cellule mère [Hertwig, 1884]. Pour une géométrie donnée, la règle d'Hertwig peut donner plusieurs solutions de division (figure 1.16).

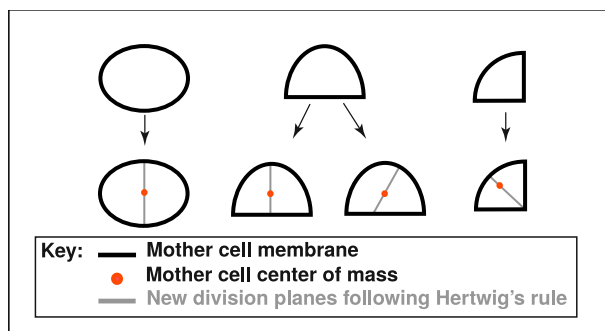


FIGURE 1.16 – Divisions possibles dans des géométries observées chez les plantes avec la règle de Hertwig (extrait de [Minc and Piel, 2012]).

Règles stochastiques géométriques

Les règles proposées jusqu'alors étaient déterministes et n'expliquaient pas l'observation de différents plans de division possibles dans des géométries cellulaires similaires.

Besson et Dumais (2011) : en 2011, Besson et Dumais, en se basant sur des expériences sur des bulles de savon comme l'avait fait Errera ainsi que sur des observations de tissus végétaux, ajoutent une composante stochastique dans l'établissement du plan de division [Besson and Dumais, 2011]. Ainsi, pour une même géométrie (exemple sur la figure 1.17(i) et (ii)), un profil d'énergie dépendant de l'aire de la surface de division peut être établi (exemple sur la figure 1.17 (iii)) qui détermine les probabilités de réalisation de chaque surface de division. Plus l'énergie est importante, plus la surface est grande, moins cette surface aura de probabilité d'être réalisée : la règle proposée est une minimisation de la surface du plan de division comme le proposait Errera, mais avec une composante stochastique.

Selon les géométries, il peut y avoir un unique minimum qui sera alors un minimum global, mais il peut également y avoir plusieurs minima locaux. Les minima locaux ne correspondent pas forcément à la division minimisant le mieux l'aire de la surface. L'aspect stochastique de la règle permet de réaliser des divisions qui ne sont pas des minima globaux mais qui sont également observées. Dans la nature, ce n'est donc pas forcément le plus petit plan qui sera réalisé mais en fréquence, ce sera celui statistiquement le plus observé (exemple sur la figure 1.17 (iv)). Cette règle expliquerait que la diversité observée soit restreinte.

Par ailleurs, Besson et Dumais mettent en relation cette observation et les mécanismes moléculaires de la division chez les plantes avec un modèle de recrutement des microtubules pour la mise en place du PPB (figure 1.17 ABCDE). La probabilité de recrutement à une position est fonction de la distance entre la paroi et le noyau, et dépend des propriétés mécaniques des microtubules. Le plan de division va se construire là où le plus de microtubules ont été recrutés.

Les auteurs précisent que cette règle permettrait également de prédire les divisions asymétriques.

Règles déterministes mécaniques

Louveaux et al. ont analysé en 2D la dynamique de division cellulaire dans le méristème apical caulinaire d'*Arabidopsis thaliana* [Louveaux et al., 2016]. Les auteurs ont montré que certaines cellules ne suivaient pas les règles proposées jusqu'à maintenant. Louveaux et al. ont d'abord regardé si la règle proposée par Besson et Dumais (minimisation stochastique du plan de division) était respectée. Les auteurs ont conclu que cette règle s'appliquait pour des tissus ayant une croissance isotrope et ne subissant pas de stress mécanique : le méristème et les primordia. Les cellules entre le méristème et les primordia ne suivent pas de règle connue dans leur comportement de division. Ce tissu subit un stress résultant des croissances différentielles entre le méristème et

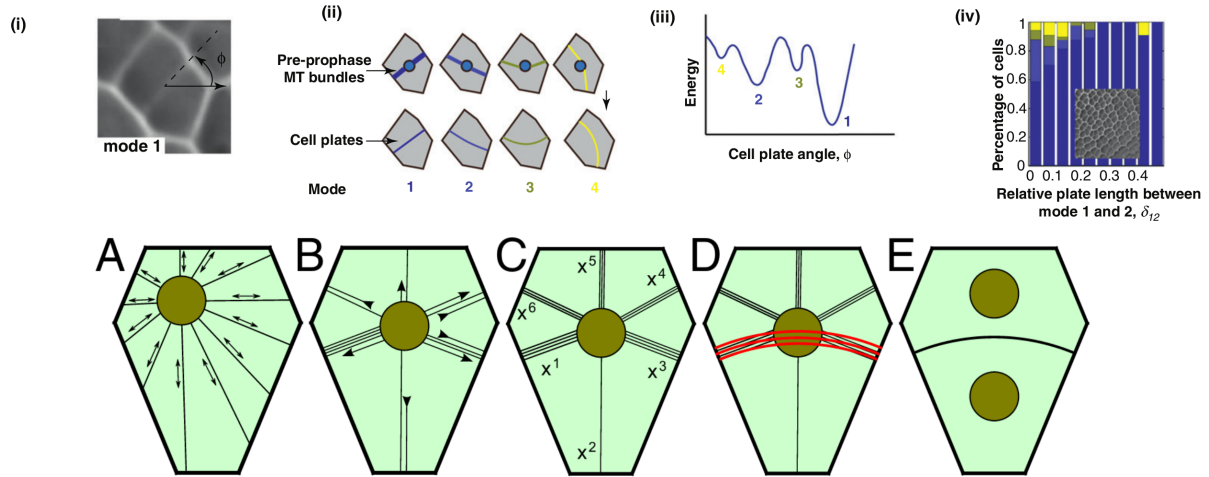


FIGURE 1.17 – Théorie de la division proposée par Besson et Dumais [Besson and Dumais, 2011], (extrait de [Minc and Piel, 2012]), (ABCDE) Dynamique du modèle de sélection du plan de division proposé par Besson et Dumais.

les primordia, ce qui a amené Louveaux et al. à proposer une nouvelle règle : la mise en place du plan de division le long du maximum local du tenseur de stress de la cellule (figure 1.18). Par modélisation, Louveaux et al. ont confirmé cette règle dans ces cellules frontalières où la division a tendance à suivre les contraintes mécaniques qu'elles subissent.

Les auteurs vont jusqu'à montrer que leur règle est aussi valable dans les tissus méristématiques et primordiaux. Ainsi, ils proposent cette règle comme une généralisation de la règle de minimisation de la surface, bien qu'elle enlève la composante stochastique.

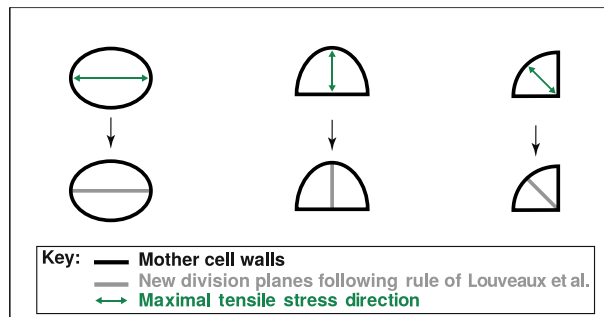


FIGURE 1.18 – Divisions possibles dans des géométries observées chez les plantes avec la règle de Louveaux et al. (inspirée de [Minc and Piel, 2012]).

Chez les plantes, les règles de division semblent dépendre de la géométrie de la cellule mère. Récemment, pour expliquer l'observation de différents plans de division dans une même géométrie cellulaire, une règle stochastique propose une modification de la règle de minimisation du plan de division, introduite par Errera : chaque configuration de division, reliée à une énergie dépendante de l'aire de la surface, a une probabilité de réalisation d'autant plus forte que cette énergie est faible.

Pour expliquer des divisions qui ne correspondent à aucune des règles proposées jusqu'à maintenant, en 2016, une règle de division dépendante de l'environnement mécanique de la cellule est énoncée. Cette règle relie l'orientation du plan de division au tenseur de stress subi par la cellule. Pour une cellule sans influence mécanique extérieure, on retrouverait la règle de minimisation de la surface. Cette règle dépendante de facteurs mécaniques serait une généralisation de la règle de minimisation de la surface de division.

1.2.3 Règle géométrique de division asymétrique

Pour les divisions asymétriques, les biologistes supposent, en général, que la présence de facteurs provoque une division qui détourne la réalisation de la possible règle de division [Minc et al., 2011, Yoshida et al., 2014]. Jusqu'à présent, aucune règle n'avait été proposée pour prédire les divisions asymétriques à partir de la géométrie cellulaire.

Dans une étude récente au laboratoire [Moukhtar et al., 2016], un modèle 3D stochastique a permis de proposer une nouvelle règle. Ce modèle numérique permet de simuler des divisions en minimisant de façon stochastique l'aire du plan de division tout en conditionnant par un volume ratio donné (division symétrique ou asymétrique). En l'appliquant dans des géométries de cellule d'embryon d'*Arabidopsis thaliana*, on observe que les divisions des premières générations sont les surfaces passant par le centroïde de la cellule mère dont l'aire est la plus petite. Cette règle a permis de reproduire toutes les divisions symétriques et asymétriques qui se réalisent dans les 4 premières générations cellulaires de l'embryon (jusqu'à obtenir le stade 16c).

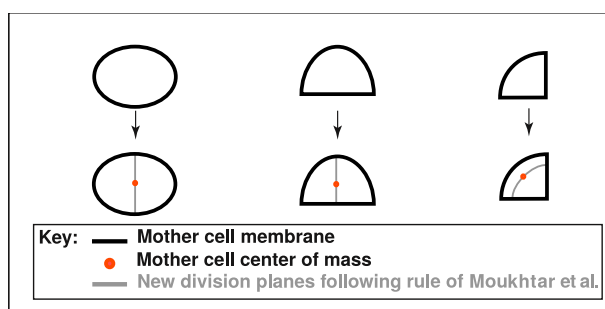


FIGURE 1.19 – Divisions possibles dans des géométries observées chez les plantes avec la règle de Moukhtar et al., (inspirée de [Minc and Piel, 2012])

Une règle propose que, peu importe la symétrie ou l'asymétrie de la division, le plan de division passe à proximité du centroïde et partage la cellule mère à l'aide d'une surface minimale (figure 1.19). La vérification de cette règle a été réalisée en 3D dans l'embryon précoce d'*Arabidopsis thaliana*, mais uniquement dans des géométries n'ayant pas de variabilité dans la division observée. La reproduction de la stochasticité observée dans certaines cellules n'a donc pas été testée.

1.2.4 Études et validations des règles de division

Les règles proposées pour prédire la division d'une cellule ont été testées, dans différents systèmes.

Pour étudier la division cellulaire, Minc et al. contraignent la géométrie de cellules isolées d'oursin avec des moules de formes différentes [Minc et al., 2011]. Les moules imposent que les cellules soient très plates, de manière à les assimiler à un système 2D. Leurs expériences confirment le lien entre l'orientation du plan de division et la géométrie cellulaire.

Dans la plupart des géométries, la règle d'Hertwig est respectée : le plan de division passe par le centroïde de la cellule mère. Dans quelques géométries cellulaires, le plan est perpendiculaire au plus grand axe, comme dans les cellules où la forme ne montre pas un grand axe très marqué. Dans d'autres géométries, le plan de division ne passe pas par la perpendiculaire au plus grand axe comme la règle d'Hertwig le propose. Dans le cas d'une cellule rectangulaire, le plus grand axe est la diagonale, et c'est une configuration qui n'est pas reportée dans les observations. Dans ces cellules, on observe des plans de division parallèles ou perpendiculaires aux plus grands cotés, Minc et al. proposent donc que l'axe important soit plutôt le plus grand axe de symétrie.

Pour expliquer la position des plans de division, un modèle 2D basé sur les forces exercées par le réseau cytosquelettique a été mis au point. Lors de la division dans les cellules animales,

une structure du cytosquelette, appelée fuseau mitotique, est mis en place. Lors de l'interphase, la géométrie cellulaire est détectée majoritairement par le réseau de microtubules qui positionne alors le noyau. L'orientation du plan de division est déterminée par rapport à la distorsion du noyau.

Leur modèle reproduit les divisions observées dans différentes formes et montre ainsi comment la géométrie cellulaire peut être déterminante pour la mise en place du plan de division. Cette étude réalisée avec des cellules animales pose une contrainte constante sur la forme qui peut être assimilée à celle exercée par la paroi sur la cellule.

En observant des algues (*Coleochaete*) en 2015, Wang et al. ont cherché à caractériser le lien entre la morphologie 2D d'une cellule et l'orientation du plan de division observé. Pour reconstruire les orientations possibles du plan de division d'une division symétrique, la règle de minimisation du plan de division a été reprise. Les auteurs se sont concentrés sur des géométries cellulaires allant de triangles isocèles, jusqu'à des portions de disque avec des angles plus ou moins grands. Dans ces formes, les auteurs obtiennent deux solutions possibles pour l'orientation du plan de division : les orientations radiales qui sont les divisions sur un rayon et les divisions tangentielles, le long d'un arc. En variant des paramètres de géométries cellulaires observées simplifiées, Wang et al. ont recherché l'orientation donnant le plus petit plan de division. Ainsi, pour chaque géométrie, une orientation est sélectionnée, ce qui permet d'en déduire le paramètre géométrique le plus déterminant dans l'orientation du plan de division : l'angle de la portion de sphère choisi conditionne beaucoup l'orientation.

Cette étude apporte une approche mathématique 2D pour prédire l'orientation du plan de division par rapport à la forme cellulaire. Par la suite, les simulations avec leur modèle de division, minimisant la longueur du plan de division, donnent des patterns cellulaires qui ressemblent à ceux observés.

Chez les plantes, plusieurs études 2D [Sahlin and Jönsson, 2010, Shapiro et al., 2015, Alim et al., 2012, Louveaux et al., 2016] sur le SAM ont cherché à évaluer la vraisemblance des différentes règles de divisions symétriques proposées (Hofmeister, Sachs, Errera). Des heuristiques de ces règles ont été simulées dans des tissus virtuels 2D de cellules polygonales et des caractéristiques mesurées sur l'état final (taille des cellules, forme des cellules, nombre moyen de voisin...) ont été comparé aux caractéristiques du tissu réel. Pour positionner le plan au sein de la cellule, Sahlin et Jönsson ont comparé la règle du passage du plan de division par le centroïde avec une règle où le plan passe par un point aléatoire dans la cellule [Sahlin and Jönsson, 2010]. Sur des données cellulaires du MAC, le passage par le centroïde a une meilleure compatibilité avec les données qu'un point aléatoire mais la règle induit plus de symétrie qu'observé. Les auteurs proposent d'ajouter un aspect aléatoire autour de la position du centroïde.

Tout comme Sahlin et Jönsson, les autres études s'accordent sur la règle du passage du plan de division par le centroïde de la cellule mère. Les autres auteurs ont adhéré à cette hypothèse soit par vérification en mesurant sur les données 2D [Shapiro et al., 2015] soit comme convention admise [Alim et al., 2012, Abera et al., 2014, Louveaux et al., 2016].

Assez rapidement, les études laissent à penser que la division cellulaire ne suit pas forcément une règle unique au sein d'un tissu cellulaire. Et selon les paramètres utilisés pour comparer, différentes règles semblent être favorisées.

Sahlin et Jönsson ont caractérisé les tissus selon le nombre de cellules, la géométrie cellulaire ou encore la forme des cellules voisines [Sahlin and Jönsson, 2010]. Les comparaisons montrent que les règles d'Hofmeister et de Errera sont souvent vérifiées.

Alim et al. ont cherché à identifier les règles qui diminueraient les tensions au sein du tissu [Alim et al., 2012]. La règle d'une division suivant l'axe de stress le plus important et minimisant l'aire (Errera) permettent de reproduire beaucoup d'observations.

En conclusion, chaque étude aboutit à une conclusion différente concernant les règles qui

orientent le plan de division.

La limite de ces études est leur restriction à une représentation 2D, une analyse à l'échelle du tissu et une modélisation en 2D. Yoshida et al., en 2015 réalisent un modèle de division 3D de la règle d'Errera avec des plans sans courbure passant par le centroïde. Le paramètre de validation est l'orientation du plan de division au sein de la géométrie cellulaire. L'application, dans des formes synthétiques de cellules des stades précoces de l'embryogenèse d'*Arabidopsis thaliana*, montre une bonne orientation pour les premiers stades ; mais le modèle ne reproduit pas la division péricline qui permet de séparer le protoderme et les tissus internes (stade dermatogène). À la quatrième génération cellulaire, selon Yoshida et al., un facteur intervient pour modifier la règle division lors de la division du stade 8c à 16c. L'orientation produite par leur modèle étant celle rencontrée dans des mutants auxiniques, Yoshida et al. concluent que le facteur serait l'auxine.

Une autre étude propose un modèle numérique de production de divisions asymétriques dans des tissus 2D de cellules polygonales [Abera et al., 2014]. La règle de division appliquée est la division perpendiculaire au plus grand axe et pour générer une asymétrie, au lieu de positionner le plan au niveau du centroïde de la cellule mère, et une position le long du plus grand axe est prise aléatoirement. Ce modèle permet de reproduire plus fidèlement les caractéristiques cellulaires (aire, forme ...) de tissus de feuilles.

La quasi-totalité des modèles a été développé en 2D pour les cas symétriques et asymétriques. Un modèle 3D de simulation de division symétrique et asymétrique a été développé par Moukhtar et al. [Moukhtar et al., 2016]. Ce modèle explore l'espace des partitions en deux domaines ayant une interface d'aire minimale, sous contrainte d'un volume ratio imposé. Avec des simulations dans des formes de cellules observées, Moukhtar et al. montrent que la partition réalisée par la cellule observée est la partition d'aire minimale qui passe à proximité du centroïde de la cellule mère.

Avec cette règle, toutes les divisions symétriques et asymétriques menant au stade 16c de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana* sont prédites.

Beaucoup de règles de division sont établies et étudiées en 2D, dans le cas symétrique. Pour les divisions asymétriques, des facteurs génétiques et/ou mécaniques sont avancés. Pour le développement embryonnaire précoce d'*Arabidopsis thaliana*, deux études ont regardé les règles de division, en 3D. Sur les quatre premières générations cellulaires, les plans de division sont des surfaces minimales.

1.2.5 Influence de la position du noyau sur l'orientation du plan de division

Les études des règles de divisions s'accordent pour admettre la règle du passage du plan de division par le centroïde de la cellule mère. Et plusieurs observations ont étayé cette hypothèse.

Dans les expériences de contraintes de la forme des cellules isolées d'oursins, faites par Minc et al., la position et l'orientation du noyau ont été suivies par marquage. Des micro-chambres de formes différentes ont été creusées dans un matériel permettant la survie de la cellule. Les cellules sont suivies avant l'entrée dans les chambres, pendant l'entrée et jusqu'à plusieurs divisions après. Le marquage noyau et des expériences avec des bloqueurs de la polymérisation des microtubules ont montré qu'après l'entrée de la cellule dans le moule, il y a un repositionnement du noyau par le réseau de microtubules par rapport à la nouvelle forme de la cellule. D'autre part, les auteurs remarquent que le noyau est généralement allongé le long du futur axe du fuseau mitotique, structure permettant la séparation des chromosomes dans les cellules animales. Des cellules en division avec un fuseau mitotique formé ont été stoppées et changées de moule, une réorientation du fuseau mitotique a alors été observée par rapport à la nouvelle forme. Toutes leurs expériences,

les ont mené à proposer un modèle où le fuseau mitotique est orienté par rapport à des forces exercées par des microtubules en s'appuyant sur les membranes de la cellule. L'orientation du plan de division dépend ensuite de l'organisation de cet équilibre. Les simulations du modèle reproduisent les observations des orientations du plan de division dans les différentes formes et également, les expériences réalisées de changement de forme en cours de division.

L'étude de Minc et al. montre l'importance de la forme dans la position du noyau et relie la position du noyau et l'orientation du plan de division par le positionnement de la structure cytosquelettique animale réalisant la séparation des chromosomes.

Chez les plantes, des expériences de centrifugation [Murata and Wada, 1991], pour déplacer le noyau, ont montré qu'après déplacement du noyau, la division s'effectuait au nouvel emplacement du noyau, qu'il y ait un PPB ou non.

La division partitionne le cytoplasme mais aussi le matériel génétique. Pour répartir également le matériel génétique entre les cellules filles, une hypothèse propose qu'il y a un lien entre la position du noyau et la position du plan de division. Ces deux expériences montrent l'importance de la position du noyau dans le positionnement du plan de division dans le règne animal et végétal. Les mécanismes impliqués ne sont cependant pas connus.

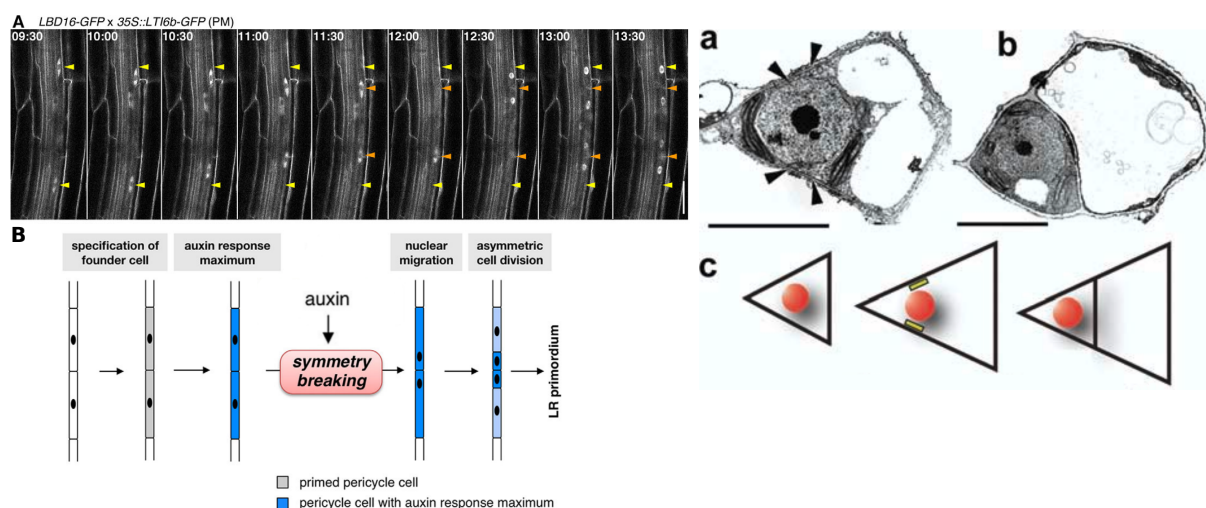


FIGURE 1.20 – Exemples de division asymétriques précédées d’une excentricité du noyau. (A,B) Division précurseur des racines latérales, (A) cinétique de la dynamique du noyaux dans des cellules d’une racine sauvage avec un marquage LTI6b (membrane) et un marquage LBD16 (gène activé par la voie auxinique, expression protéique dans le noyau), flèche jaune : position initiale du noyau, flèche orange : position après migration, barre d’échelle : 50 μm, (B) Modèle de l’induction d’une racine latérale (LR), (adapté de [Goh et al., 2012]). (a,b,c) Division des méristemoïdes dans les feuilles d’*Arabidopsis thaliana* ; (a) Image de microscopie électronique d’un méristemoïde polarisé. flèche : position du PPB, barre d’échelle : 5 μm ; (b) Après la division asymétrique : cellule méristemoïde régénérée à gauche et la deuxième cellule sœur à droite, plus grosse, barre d’échelle : 5 μm (extrait de [Zhao and Sack, 1999]) ; (c) Modèle des événements de division des cellules méristemoïdes, en rouge : le noyau, en jaune : position du site de division (extrait de [Geisler et al., 2003]).

Dans les divisions asymétriques, dont un exemple est la formation des racines latérales (revue dans [Vilches-Barro and Maizel, 2015]), on observe parfois des mouvements de noyau (figure 1.20A). Les racines latérales sont induites par un pic d’auxine (figure 1.20B). Après une division anticline d’une cellule du péri-cycle, les deux cellules filles voient leur noyau migrer de manière excentrique vers une même membrane sous l’influence de facteurs de réponse à l’auxine [Goh et al., 2012] et celles-ci vont se diviser asymétriquement au niveau de la nouvelle position

du noyau.

Un autre exemple de division asymétrique précédé d'un déplacement excentrique du noyau est la formation des cellules méristémoïdes dans les feuilles [Zhao and Sack, 1999, Geisler et al., 2003] (figure 1.20 a et c). Les cellules méristémoïdes sont des cellules indifférenciées qui continuent à se diviser, l'une de ces cellules filles gardera le caractère indifférencié tandis que l'autre, de temps en temps, se différenciera en cellule spécialisée pour donner la cellule mère des cellules de garde des stomates. Cette division asymétrique dans le destin cellulaire de ses cellules filles, l'est également dans la répartition des volumes (figure 1.20 b).

Dans les modèles de division, plusieurs équipes [Yoshida et al., 2014, Besson and Dumais, 2011, Shapiro et al., 2015] ont donc intégré dans leur règle de division le passage par le noyau, avec souvent le centroïde de la géométrie de la cellule mère comme proxy de la position du noyau, sans vérifier dans les observations l'exactitude ou sans en démontrer la légitimité.

Bien que non démontré, non quantifié et non expliqué, la position du noyau semble être importante pour le positionnement du plan de division, que se soit dans les divisions symétriques ou asymétriques. Dans les règles de division symétrique, la position du noyau est souvent mis au centre de la cellule mère.

1.3 Croissance cellulaire

1.3.1 Les mécanismes de croissance chez les plantes

Pour les cellules avec paroi, la croissance est directement dépendante de la rigidité de celle-ci (revue dans [Cosgrove, 2005]). La paroi est une structure dynamique qui lorsqu'elle se relâche crée une dépression dans la cellule provoquant l'entrée d'eau et donc l'expansion de la cellule. Au niveau moléculaire, cela se traduit par une composition ou encore une organisation des composants de la paroi différente. La croissance se fait alors que la paroi secondaire n'est pas encore formée. Cette expansion peut être de plusieurs types : réversible ou irréversible. La composition des parois pecto-cellulosiques est chimiquement connue ; il y a 3 types de structures dans les parois primaires (figure 1.21) :

- des microfibrilles de cellulose : de longues chaînes de sucres qui interagissent entre elles et forment ainsi la structure la plus grosse. La synthèse des microfibrilles se fait au niveau de la membrane par des complexes de cellulose synthase mobiles dans la membrane plasmique.
- des pectines : un polymère qui forme un gel hydrophile. La synthèse de ces polymères se fait dans le Golgi et ils sont apportés à la paroi dans des vésicules d'exocytose.
- des polymères d'hémicellulose, majoritairement des chaînes de xyloglucanes. La synthèse de ces polymères se fait dans le Golgi et ils sont apportés à la paroi dans des vésicules d'exocytose.

L'organisation 3D de ces composants n'est pas connue mais des modèles compatibles avec les expériences ont été proposés. Dans les modèles actuels (figure 1.21), la paroi est une matrice avec des composants indépendants qui forment un réseau flexible [Carpita and Gibeaut, 1993]. Ce réseau peut changer de conformation pour permettre la croissance. L'apport du matériel composant la paroi peut permettre la croissance sur un temps plus long que le remaniement des composants déjà présents.

À l'échelle de la cellule, différentes organisations des composés peuvent être observées, et notamment différentes orientations des fibres. Pendant l'interphase du cycle cellulaire, les fibres de la paroi peuvent ne pas avoir d'organisation orientée. Les fibres qui se croisent dans tous les sens empêchent une croissance orientée préférentielle et cette organisation aboutit à une croissance isotropique de la cellule. On peut aussi observer une orientation parallèle autour de la cellule, renfor-

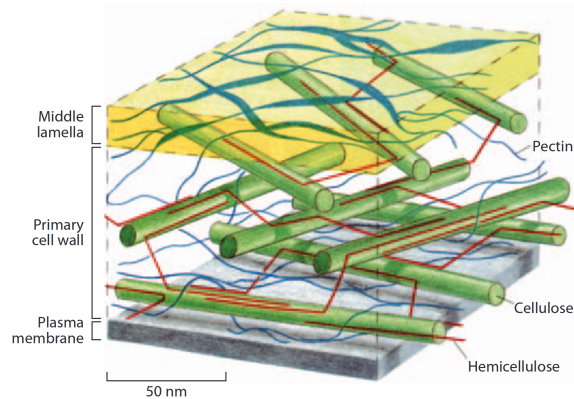


FIGURE 1.21 – Organisation 3D de la paroi à l'échelle moléculaire (extrait de [Lloyd, 1991]).

çant la résistance sur certaines parties et favorisant la croissance dans l'axe perpendiculaire à cette orientation, il en résulte une croissance anisotrope [Green and Brooks, 1978, Baskin, 2005].

De nombreux régimes de croissance sont possibles (revue dans [Geitmann and Ortega, 2009, Smith, 2003]) et sont souvent à l'origine de formes cellulaires variées.

Le cytosquelette est étroitement lié à l'orientation des fibres dans la paroi [Baskin et al., 2004], il est capable de guider les celluloses synthases [Paredez et al., 2006] et on trouve des corrélations entre l'orientation des microtubules dans le cytoplasme et celle des microfibrilles dans la paroi.

Le cytosquelette permet également l'apport de facteurs pour moduler la paroi [Mirabet et al., 2011]. Les mutants de gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette peuvent donc avoir une croissance cellulaire anormale. C'est le cas du mutant *ton2* (figure 1.22 G) qui présente des défauts de croissance orientée et dont certains tissus montrent une organisation des microtubules différente du sauvage (non orientée) [Camilleri et al., 2002].

Chez les végétaux, la croissance est liée à la composition de la paroi qui peut être hétérogène pour orienter la croissance et donc la forme cellulaire.

1.3.2 Les modèles de croissance cellulaire

Pour modéliser la croissance, une granularité plus ou moins fine peut être utilisée. La résolution moléculaire permet de prédire des patterns de microfibrilles [Emons and Mulder, 2000] mais pour travailler sur des tissus entiers des heuristiques à l'échelle cellulaire, avec plus ou moins de réalité biologique, sont utilisées. Ainsi, le modèle de Lockhart [Lockhart, 1965] combine pression interne, turgescence et résistance de la paroi dans un système d'équations différentielles permettant de prédire la croissance en volume de la cellule. Pour faire varier la croissance, la pression interne peut être modulée par apport d'eau et la résistance de la paroi peut être modulée par l'agencement des matériaux pariétaux [Anderson et al., 2010]. Dans ce modèle, la paroi peut se déformer à cause de la pression interne puis à partir d'un seuil, la déformation induite est irréversible. La paroi est assimilée à une structure visco-élastique.

Des études [Alim et al., 2012, Sahlin and Jönsson, 2010, Louveaux et al., 2016] modélisent la croissance par des mécanismes non explicatifs de grossissement des cellules isotropiquement, pour accélérer les temps de calcul des simulations. Pour modéliser des croissances anisotropiques, des gradients anisotropes peuvent être ajoutés au modèle [Kennaway et al., 2011].

Il n'y a pas de consensus sur l'utilisation de règles de croissance dans les études de morphogénèse.

1.4 Intégration des mécanismes au sein des tissus

La cellule dans un tissu interagit physiquement et chimiquement avec ses voisines à plus ou moins grande échelle. Les effets d'un mécanisme qui se déroule à l'échelle de la cellule peut avoir une portée différente à l'échelle de régions voire à l'échelle de l'organisme tout entier. Par exemple, la géométrie cellulaire est contrainte par celle de ses voisines [Lloyd, 1991].

1.4.1 Mécanismes endogènes

Croissance cellulaire

La cellule a les moyens de moduler et d'orienter sa croissance avec la modification de paramètres comme des variations locales de la rigidité de sa paroi. Mais la croissance observée est la résultante de la croissance réalisée par la cellule, contrainte par son environnement aussi une croissance qui semble anisotropique ne l'est peut-être pas au niveau cellulaire. Pour éclaircir cette vision, plusieurs études ont fait des modèles de croissance qui permettent de voir l'impact de l'intégration de multiples paramètres (mécanique, cellulaire, moléculaire) sur la croissance globale d'organes.

Une étude [Boudon et al., 2015] présente un modèle 3D de croissance de la couche épidermique du MAC. En modélisant la croissance avec le modèle de Lokhart, les auteurs regardent comment la croissance seule peut conduire à l'apparition des organes. Trois mécanismes de croissance sont inclus dans le modèle : la croissance autonome des cellules, la croissance émergente par impact de la croissance des cellules voisines, la croissance des tissus sous-épidermiques non modélisés. Pour faire émerger les futurs organes, les simulations montrent que plusieurs combinaisons non équivalentes de paramètres permettent d'arriver à une morphologie proche de celle observée. La forme émergente du MAC, durant la formation des nouveaux organes, peut être obtenue en augmentant la rigidité des parois de cellules épidermiques entourant une région de cellules avec une forte croissance. Les scénarios montrent que différentes propriétés mécaniques (rigidité localisée des parois) des cellules délimitant la zone de croissance, et la présence de taux de croissance différentielle, aboutissent à une protubérance. Ainsi des hypothèses ont été proposées sur les mécanismes mécaniques contribuant à la morphologie du MAC.

Pour étudier les facteurs qui peuvent impacter la croissance, Bassel et al. [Bassel et al., 2014] ont utilisé la transition de graine à jeune plantule des racines d'*Arabidopsis thaliana*. En effet lors de la germination, il n'y a pas de division dans la racine, uniquement de la croissance cellulaire. Ils ont ainsi pu voir, avec un modèle 3D, l'impact du pattern cellulaire existant de la racine et l'impact des patterns d'expression de facteurs moléculaires liés à la germination de la graine, sur le pattern radial et longitudinal de croissance. Cette étude montre l'importance du pattern cellulaire dans la possibilité d'expansion de la cellule. Selon la forme cellulaire, le nombre de faces libres, l'agencement des cellules les unes par rapport aux autres, les cellules n'auront pas la même capacité de croissance. Ainsi la croissance cellulaire observée ne sera pas la même et cela même pour des cellules possédant les mêmes paramètres mécaniques. À partir de ces résultats de simulation sur des formes élémentaires (cube, pavé), Bassel et al. ont pointé les paramètres cellulaires importants qui permettent de reproduire la répartition des tailles cellulaires au sein de la racine embryonnaire : des cellules plus courtes et moins larges à l'extrémité que dans le reste de la racine. Avec des facteurs moléculaires contrôlant la croissance, répartis en gradient depuis l'extrémité de la racine, des simulations de croissance, dans des racines virtuelles cellularisées 3D, reproduisent une caractéristique de croissance : une croissance plus importante après l'extrémité et qui forme un élargissement radial. Cette étude montre que les effets de croissance, au travers du pattern cellulaire, ne sont pas toujours liés à la présence de facteurs moléculaires.

Parfois, les études ont plutôt simplifié le modèle. Par exemple, Kennaway et al. ont regardé la croissance d'une fine couche 3D non-cellularisée [Kennaway et al., 2011]. En combinant champs de polarité et croissance différentielle, les formes atteignables par leur couche cellulaire ont été recensées. Cette étude permet de voir les formes émergentes de ces deux interactions. En partant d'un tube, la morphologie des fleurs de muflier a été reproduite à l'aide de champs de polarité. Ces modélisations permettent de tracer une histoire possible sur les mécanismes de croissance et de l'action de facteurs sur le contrôle de la croissance, afin d'orienter les expériences de validation.

L'organisation cellulaire peut impacter le régime de croissance cellulaire observé. Une même croissance cellulaire n'aura pas le même impact selon les contextes cellulaires.

À l'échelle des tissus, certains systèmes biologiques ont des régimes de croissances différentiels qui orientent la morphologie.

Signalisation hormonale : l'auxine

La voie hormonale de l'auxine

L'auxine est une phytohormone connue pour avoir des effets sur la croissance, la différenciation et dédifférenciation, sur les divisions (racines secondaires et hypothèse proposée par Yoshida et al. pour expliquer les divisions périclinales pour former le stade 16 cellules). Sa voie (figure 1.25) est composée d'enzymes de synthèse, de transporteurs : les protéines PIN pour l'import et les AUX pour l'efflux, un senseur (TIR1), un inhibiteur de ce senseur, des facteurs de transcription (les ARF) et des inhibiteurs de ces facteurs de transcription (les AUX/IAA). La voie de signalisation répondant à l'auxine est, par défaut, active, mais réprimée. La présence d'auxine, par activation de la synthèse ou par l'import d'auxine via les transporteurs, induit la dégradation des répresseurs AUX/IAA, en les envoyant au protéasome, et active ainsi, par libération des ARF, la transcription des gènes de réponse à l'auxine ou la répression d'autres gènes.

L'auxine dans l'embryon d'*Arabidopsis thaliana*

Dans l'embryon, des études [Steinmann et al., 1999] ont montré que le transport de l'auxine est polarisé et induit des zones de forte concentration de l'auxine [Friml et al., 2003] [Wabnik et al., 2013, Robert et al., 2013]. Dès le début de l'émergence des cotylédons, deux des pôles de forte concentration d'auxine sont situés à leur sommet (figure 1.23). Les mutants *pin* présentent des défauts dans le nombre de cotylédons, ainsi on trouve des mutants avec un seul cotylédon (ou deux fusionnés) et d'autres avec trois cotylédons (figure 1.22). La perturbation de la répartition de l'auxine par les transporteurs PIN1 dans l'embryon induit donc des malformations au niveau des cotylédons, qui sont visibles par un changement dans la forme.

Un autre pôle de forte réponse à l'auxine est au niveau de l'hypophyse (figure 1.23), cellule qui est à l'origine d'une partie du méristème racinaire. Le mutant *monopteros* (*mp*), qui code une protéine de type ARF (figure 1.25), ne présente pas de méristème racinaire, mais la morphologie reste globalement conservée. MP/ARF5 muté induit un changement dans l'orientation du premier plan de division (figure 1.24), au lieu d'une division longitudinale le long de l'axe apico-basal, la division est transverse et forme ainsi une cellule fille hémisphérique apicale et une basale en forme de bol. Durant le développement précoce du mutant *mp*, la cellule hémisphérique se comporte comme un embryon sauvage, et la cellule basale retrouve un pattern qui semble similaire à celui observé dans la partie basale d'un embryon sauvage (figure 1.22 J). Le mutant *mp* ne possède pas de méristème racinaire et n'est rapidement plus viable.

Le mutant de son inhibiteur *bodenlos* (*bdl*), un AUX/IAA (figure 1.25), présente dès les premiers stades, un patterning cellulaire modifié, puis la forme cœur est bien développée mais avec une physionomie différente d'une forme cœur sauvage [Hamann et al., 1999] (figure 1.24). Une construction avec cet AUX/IAA a été réalisée (RPS5A»*bdl*) pour qu'il soit exprimé constitutivement dans l'embryon. Cette version du gène, non dégradable, induit une insensibilité à l'auxine.

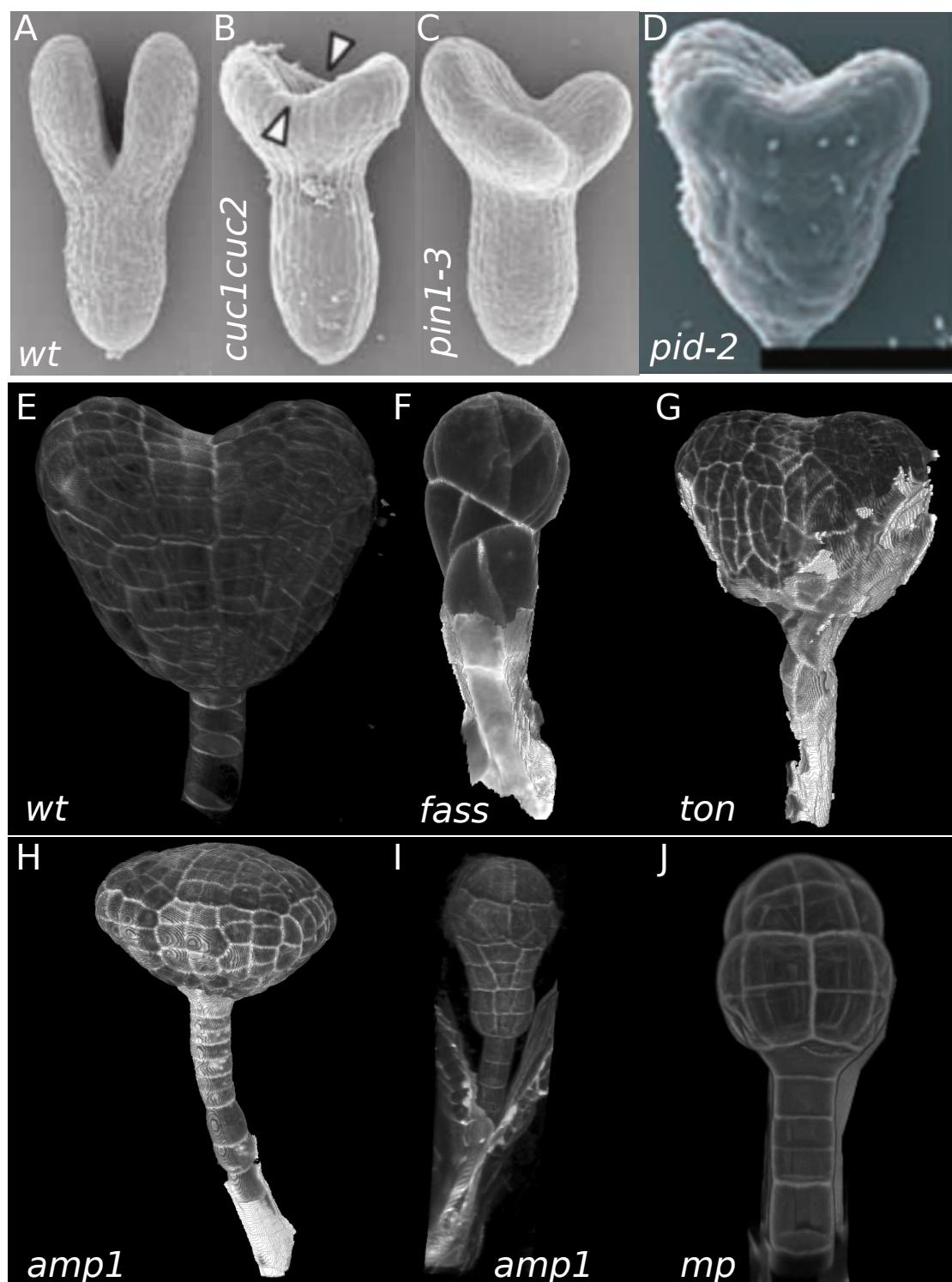


FIGURE 1.22 – Mutants d'*Arabidopsis thaliana* déficient dans l'établissement de la morphologie embryonnaire. (A,B,C,D) Images d'embryons d'*Arabidopsis thaliana* de stade cœur tardif (microscope électronique à balayage). (E,F,G,H,I,J) Images d'embryons d'*Arabidopsis thaliana* marqués à l'iodure de propidium (microscopie confocale). (A) Sauvage, (B) mutant *cuc1 cuc2*, (C) mutant *pin1-3*, images de [Aida et al., 2002], (D) mutant *pid-2* (barre d'échelle : 50 μm) image de [Furutani et al., 2004]. (E) Sauvage (F) mutant *fass* a un stade précoce, (G) mutant *ton* à un stade cœur (écotype ws), (H) mutant *amp1* à un stade "cœur", (I) mutant *amp1* à un stade précoce, (J) mutant *mp* à un stade entre 32 et 64 cellules.

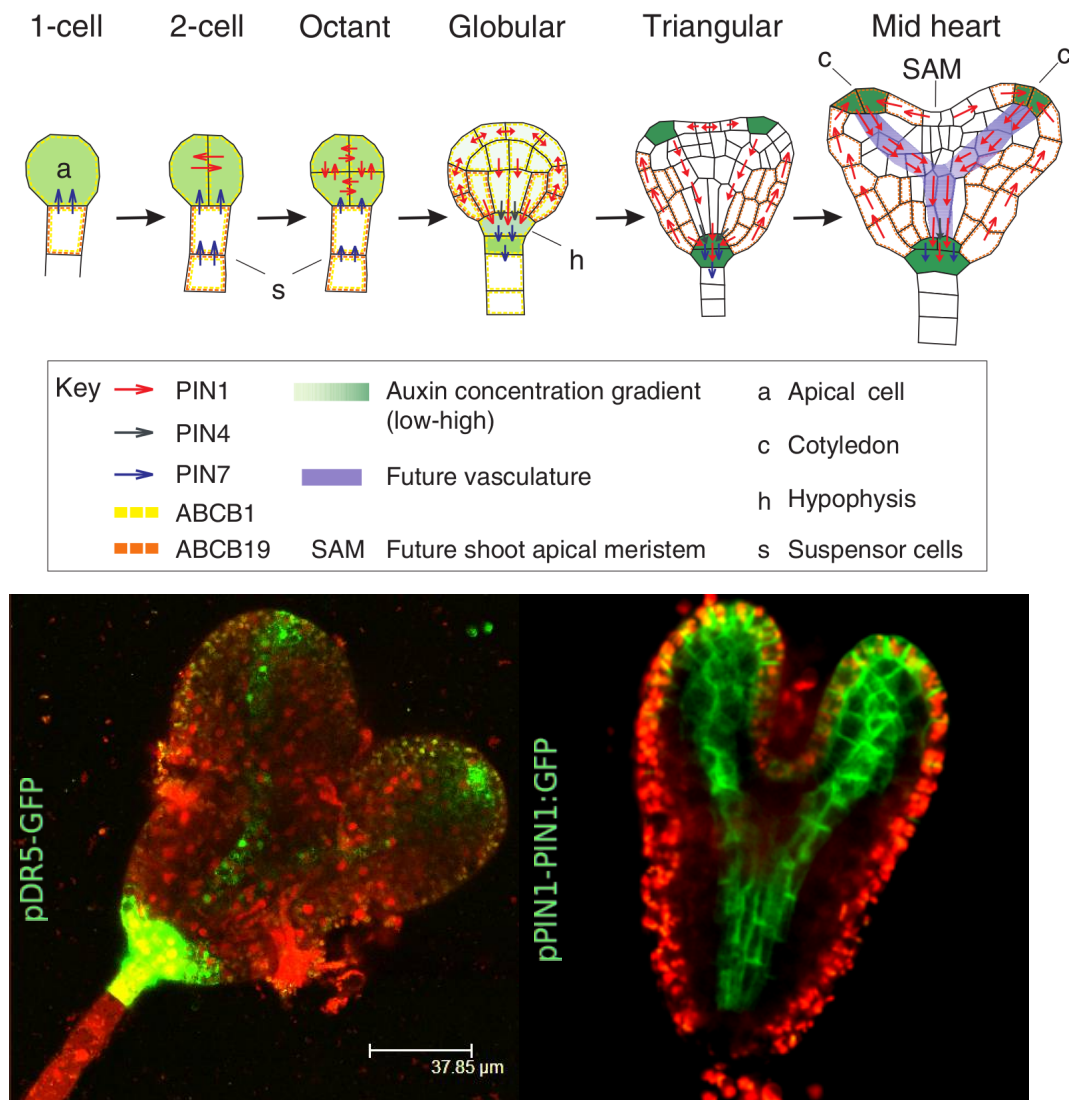


FIGURE 1.23 – Le transport polarisé de l’auxine dans l’embryon d’*Arabidopsis thaliana*. En haut : modèle de l’organisation des flux auxiniques au cours de l’embryogenèse précoce, figure de [Petrášek and Friml, 2009]. En bas : Images [Roudier et al., 2010] d’embryon au stade cœur, à gauche marquage en vert de la réponse à l’auxine avec le rapporteur DR5 et à droite en vert de la localisation de PIN1.

Yoshida et al. l’ont utilisé comme équivalent à une embryogenèse se déroulant indépendamment de l’auxine et d’autres modifications du pattern cellulaire sont observables, notamment l’absence de division péricline lors du passage de 8 à 16 cellules.

D’autres effecteurs de l’auxine ont également un impact sur le patterning cellulaire des tissus vasculaires, comme le complexe composé de TARGET OF MONOPTEROS5 (TMO5) et de LONESOME HIGHWAY (LHW) étudié par [Rybel et al., 2013]. Ce complexe permettrait le bon patterning des tissus vasculaires dès la formation des initiales au stade 16c et le bon développement des tissus vasculaires après l’embryogenèse précoce.

Ainsi, la plupart des mutants de la voie auxinique (mutant *mp*, *bd1*, *pid* ...) (revue dans [Möller and Weijers, 2009]) induisent différents effets sur la morphologie, le patterning ou encore l’organogenèse. À l’échelle cellulaire, la modification d’une orientation de plan de division peut induire une perte d’un organe puis d’une caractéristique morphologique.

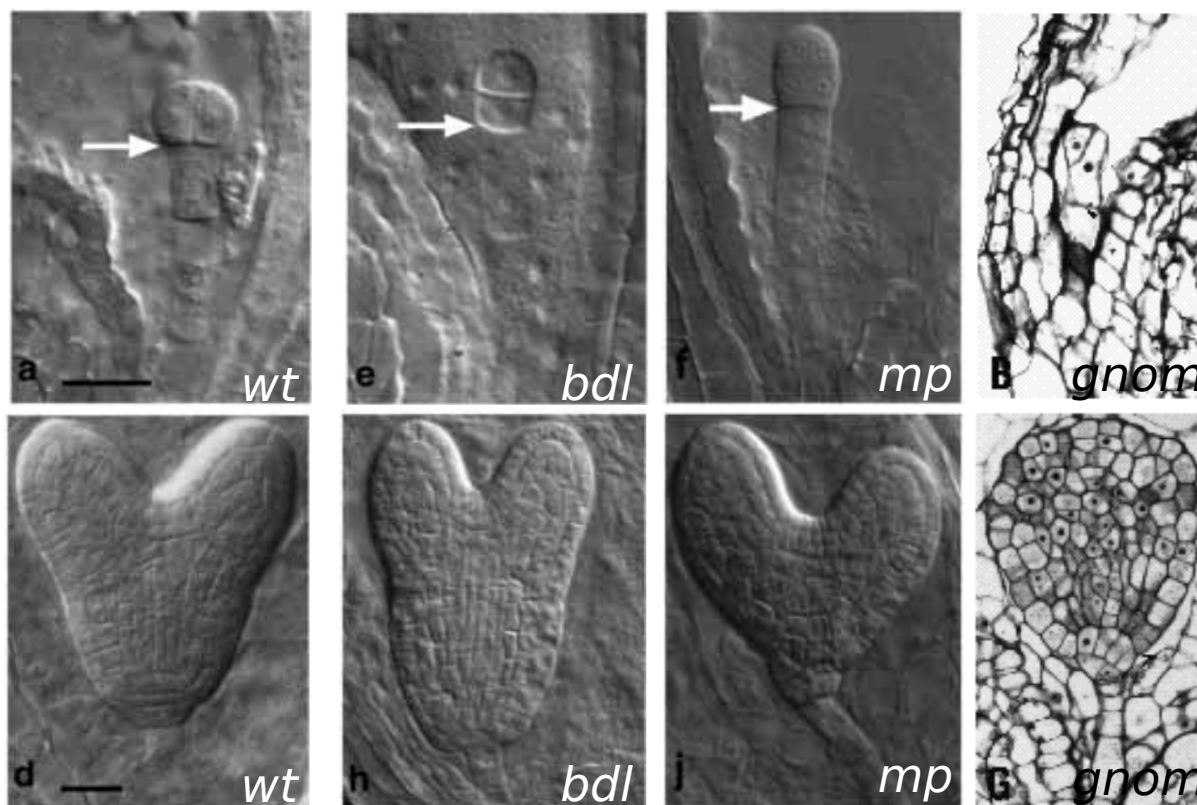


FIGURE 1.24 – Images de coupe d'embryons d'*Arabidopsis thaliana*, en haut de la première division, en bas de stade cœur tardif. (a,d,e,h) Images d'embryons observés en microscopie à contraste interférentiel [Hamann et al., 1999]. (a,d) sauvage (barre d'échelle : 20 μ m), (B,G) mutant *gnom* coupe histologique, image de [Mayer et al., 1993].

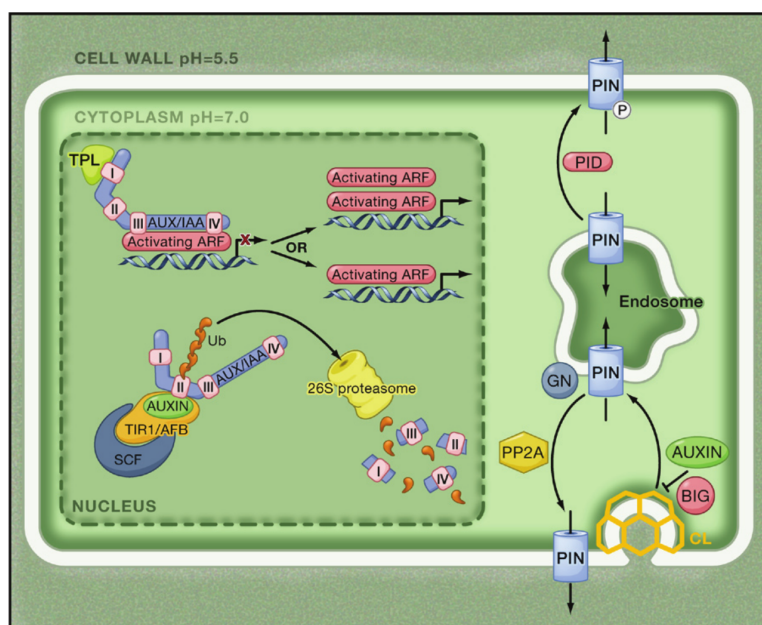


FIGURE 1.25 – Voies de signalisation impliquant l'auxine. À gauche, schéma de répression, par les AUX/IAA, des gènes de réponse à l'auxine en l'absence d'auxine, puis de la dégradation du complexe formé avec l'auxine en sa présence. À droite, acteurs impliqués dans le transport actif de l'auxine. (adaptée de [Vanneste and Friml, 2009]).

Dans l'embryon, l'auxine joue un rôle dans la mise en place des grands plans d'organisation.

Modèles sur les flux d'auxine

La mise en place du flux auxinique au cours du développement est moléculairement expliquée par une boucle de rétroaction de l'auxine sur les transporteurs d'efflux PIN, qui induit une

polarité membranaire (voir image 1.23). À l'échelle de l'organisme les orientations vont dépendre des sources d'auxine. Pour expliquer comment le pattern des PIN émerge dans l'embryon et aboutit à deux pôles de forte concentration d'auxine, [Wabnik et al., 2013] modélisent, dans des masques 2D d'embryon en coupe longitudinale, les interactions entre les transporteurs et l'auxine. Ils démontrent ainsi que la synthèse d'auxine au niveau de l'hypophyse permet la mise en place du pattern.

Par ailleurs, une étude [De Rybel et al., 2014] de modélisation en 2D dans des tissus vasculaires embryonnaires a montré l'importance de la géométrie et du patterning des tissus pour orienter le flux d'auxine et ainsi influencer la position des pôles d'auxine. Dans des masques approximant l'organisation cellulaire transversale dans la partie basale de l'embryon, ils ont mis un modèle d'interaction entre les transporteurs PIN et la concentration d'auxine à l'échelle de chaque cellule ainsi qu'un modèle de croissance cellulaire. Selon l'organisation cellulaire, si les jonctions cellulaires sont décalées ou non, les maxima d'auxine vont varier. Le pattern formé par la croissance et la division cellulaire influence des flux hormonaux déterminants se mettant en place au cours du développement.

Le pattern de réponse à l'auxine est mis en place dans l'embryon au cours du développement grâce à des flux d'auxine. La mise en place de ces flux est dynamique au cours de l'embryogenèse. Le pattern cellulaire influence le réseau fluide mis en place dans l'embryon.

Autres facteurs

La mise en place des organes au cours du développement dépend de nombreux facteurs différents (génétiques, hormonaux) qui interagissent (voir diagramme figure 1.26) (Le lecteur intéressé pourra consulter [Capron et al., 2009, Lau et al., 2012, Smolarkiewicz and Dhonukshe, 2013] et plus récemment [Colette et al., 2015]).

D'autres hormones influencent l'embryogenèse comme les cytokinines qui sont connues pour avoir un impact sur la croissance. Le mutant *amp1* présente, entre autres modifications physiologiques, une augmentation de cette hormone dans ses tissus [Chin-Atkins et al., 1996]. La morphologie de l'embryon *amp1* (figure 1.22 H et I) est modifiée dès le début de l'embryogenèse avec des changements dans le pattern de la partie basale de l'embryon qui sera à l'origine des cotylédons, qui parfois sont surnuméraires, tandis que la partie apicale, avec un patterning cellulaire non modifié, sera incorporée dans le MAC [Vidaurre et al., 2007]. Malgré une organisation cellulaire différente, les organes émergent. Des interactions non linéaires ont été proposées entre AMP1 et MP [Vidaurre et al., 2007].

Il y a de nombreuses interactions entre les facteurs et ce à plusieurs échelles.

1.4.2 Facteurs exogènes : Contraintes Mécaniques

La croissance est contrainte en partie par l'orientation des fibres dans la paroi. Plusieurs études [Lichtenegger et al., 1999, Baskin, 2005] ont montré que cette organisation ne résultait pas uniquement de facteurs génétiques mais également de facteurs mécaniques. Les pressions, tensions, et stress peuvent réorienter ces fibres pour minimiser les contraintes mécaniques que subit la cellule. Des expériences d'ablations [Hamant et al., 2008] ont montré que l'organisation du cytosquelette est sensible aux forces venant de l'environnement et que les tissus sont sous tension. En cas de relâchement du tissu, on observe une réorganisation des fibres du cytosquelette.

1.5 Modélisation de la morphogenèse : état de l'art

Indépendamment des effets de la division, la croissance peut générer des formes variées avec des différentiels dépendant de multiples facteurs, mais la combinaison des deux peut faire appa-

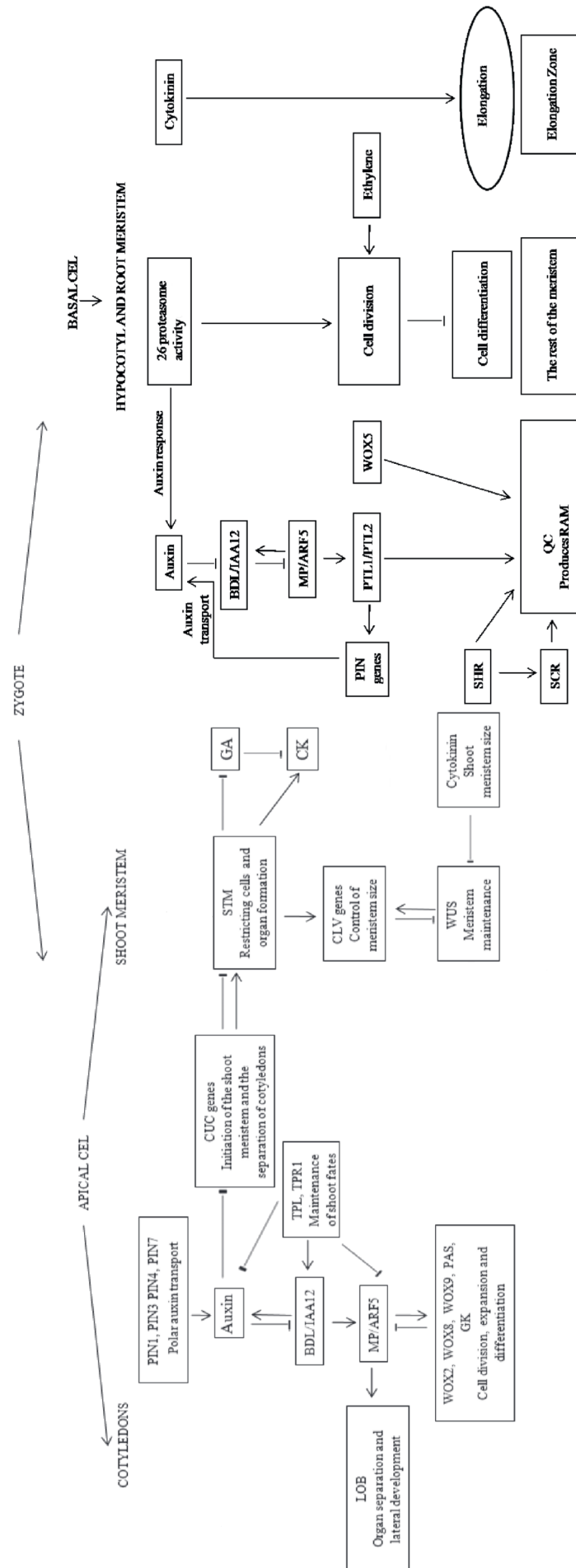


FIGURE 1.26 – Interactions entre les différents acteurs génétiques dans différentes parties du zygote. Figure adaptée de [Abid et al., 2010]

raître des nouvelles propriétés. Les patterns cellulaires, ou encore les formes, ne sont peut-être que des propriétés émergentes, des états non accessibles avec uniquement de la croissance cellulaire ou uniquement de la division cellulaire.

Pour voir comment ces deux processus interagissent, la modélisation apporte la possibilité d'accéder à des situations non accessibles sur un système vivant. Cette méthodologie permet de répondre à des questions plus facilement mais également d'orienter le choix des expériences à réaliser pour valider les résultats. La calibration du modèle est essentielle. Elle est souvent apportée par les quantifications expérimentales réalisées lors des descriptions de la morphogenèse.

Plusieurs études ont déjà mis en place des modèles afin de comprendre et quantifier les propriétés émergentes de l'interaction entre le processus de division et le processus de croissance cellulaire. Ces études faites sur divers systèmes modèles, nous apportent des pistes sur des voies à explorer dans l'analyse de la morphogenèse.

1.5.1 *Coleocheate*

Le modèle algue permet de suivre la morphologie entière d'un tissu et plusieurs équipes [Dupuy et al., 2010, Wang et al., 2015] l'ont modélisée en obtenant de bons résultats dans la reproduction de comportements morphologiques à partir de moteurs cellulaires de croissance et de division, en 2D.

Dans le modèle de Dupuy et al., la croissance et la division ne se font qu'aux marges de l'algue. Leur formalisme autorise la courbure des parois. La division est déclenchée par la taille de la cellule et le plan de division sélectionné est soit pericline asymétrique soit anticline symétrique selon que la cellule mère est épaisse en largeur ou en longueur, reproduisant la règle de Hofmeister. La croissance est la résultante d'un équilibre physique entre pressions, résistance de la paroi et taille des cellules.

Avec une calibration du modèle d'après leurs observations, les simulations de ce modèle ont reproduit les organisations cellulaires observées mais également des observations de ramifications par modification de la rigidité des parois ou par émergence lors de l'ablation d'une cellule. En ajoutant la diffusion de facteurs inhibiteurs, des comportements d'emboîtement entre individus ont aussi été obtenus.

Le modèle de Wang et al. contient une règle de division qui se rapproche de la règle de division d'Errera en calculant le plus petit chemin coupant la cellule en deux parties égales. Leur modèle diffère également par une croissance qui est homogène entre les cellules au sein du tissu. Avec des règles différentes, les simulations montrent également l'émergence de comportements observés comme l'asymétrie de la forme de l'algue après une mort cellulaire.

Des comportements identiques peuvent être reproduits avec des modèles différents, ce qui interroge sur le poids des messages tiré de la modélisation, et montre l'importance de connaître la définition et les limites du modèle pour pouvoir discuter de la pertinence des hypothèses posées.

1.5.2 Morphogenèse de l'épithélium du poisson zèbre

Xiong et al. modélisent avec Surface Evolver [Brakke, 1992] l'épithélium du poisson zèbre en 3D pour voir l'influence de paramètres de la géométrie cellulaire sur des paramètres de la géométrie des tissus et inversement [Xiong et al., 2014]. Cet épithélium peut faire des divisions périclines ou anticlines, il n'a pas de migration cellulaire car les cellules sont jointives et sa morphologie est maintenue au cours du développement. Mais les cellules changent de forme avant de se diviser en s'arrondissant, contrairement aux cellules végétales.

Cette étude met en évidence un lien entre la morphologie cellulaire et l'orientation du plan de division. Les cellules se divisent selon leur ratio largeur sur épaisseur : lorsque la cellule est plus épaisse la division est péricline et lorsqu'elle est plus large elle est anticline. Malgré cette variabilité, les tissus semblent canalisés pour retrouver un état équivalent : si les cellules sont

très épaisses, les divisions périclines vont les rendre moins épaisses et si elles sont très larges, les divisions anticlines vont les rendre moins larges. Il y a une robustesse dans la morphogenèse. Après modification de différents paramètres caractérisant le système, Xiong et al. concluent que la balance entre la réalisation des deux types de division influence beaucoup la forme de l'épithélium. Dans cette étude c'est l'orientation du plan de division qui semble le plus influencer la morphologie du tissu et non la croissance.

1.5.3 Les modèles sur l'embryon d'*Arabidopsis thaliana*

En 2014, Yoshida et al. présentent une interprétation du pattern de division observé dans les stades précoces du développement embryonnaire d'*Arabidopsis thaliana* (jusqu'à 16 cellules) à l'aide d'un modèle de division et de croissance cellulaire 3D [Yoshida et al., 2014].

En partant d'une sphère tronquée (voir 1.27), les auteurs essaient de reproduire l'orientation observée des plans de division avec une croissance constante et uniforme et des divisions qui interviennent lorsqu'une cellule atteint un certain volume. Ce paramétrage de la croissance a été choisi car l'embryon a peu d'augmentation de volume relativement à l'augmentation du nombre de cellules et il reste sphérique dans les stades considérés. La division suit différentes règles en fonction de l'avancement dans le développement :

- un plan d'aire minimale (modèle 3D de [Besson and Dumais, 2011]) passant par le centre de la cellule mère jusqu'à la troisième génération cellulaire (embryon de 8 cellules)
- puis pour la quatrième génération cellulaire, un plan pericline parallèle à la surface de l'embryon divisant la cellule en une cellule deux fois plus grosse que l'autre

Un changement de la règle de division qu'ils expliquent par l'influence de l'auxine en montrant que des mutants dans la voie de l'auxine (RPS5A»*bd1*) ont des orientations du plan de division de la quatrième génération cellulaire respectants la règle de minimisation de l'aire passant par le centroïde de la cellule mère. Les auteurs concluent donc que la division péricline de 8 à 16 cellules est mise en place sous l'influence de l'auxine. D'autre part, Yoshida et al. simulent la morphogenèse du mutant *fass*. Les orientations des plans de division du mutant *fass* sont caractérisées comme aléatoires. Avec une règle de division générant une orientation du plan de division aléatoire passant par le centroïde de la cellule mère, et une croissance isotropique, des embryons virtuels avec une grande variabilité dans la distribution des volumes ratios sont obtenus tout comme la distribution observée dans les embryons *fass*.

Leur modélisation 3D la morphogenèse utilise des règles dont la signification biologique n'est pas expliquée, et notamment au niveau des règles de divisions. Mais, l'étude de Yoshida et al. apporte quelques idées sur les paramètres pertinents dans l'évaluation de modèles 3D.

Les modèles de morphogenèse commencent à apporter des interprétations de ce qui est observé à l'échelle des tissus voir à l'échelle de l'organisme.

1.6 Les objectifs et stratégies de cette thèse

1.6.1 Contexte

Préalablement à ce travail de thèse, un projet visant à comprendre et à modéliser les règles régissant l'embryon d'*Arabidopsis thaliana* jusqu'au stade 32 cellules [Moukhtar et al., 2016] était mené dans les équipes d'accueil. À partir d'images 3D, une description précise des premières divisions a été présentée et un modèle 3D de division cellulaire a été testé (voir partie modélisation 4.1 page 90 pour précision). Suite à ce travail, Moukhtar et al. sont arrivés à la conclusion que les 4-5 premières séries de divisions stéréotypées étaient issues d'une règle de division en deux étapes successives suivantes :

- passage par le centroïde de la cellule du plan de division (proposition de Hertwig)

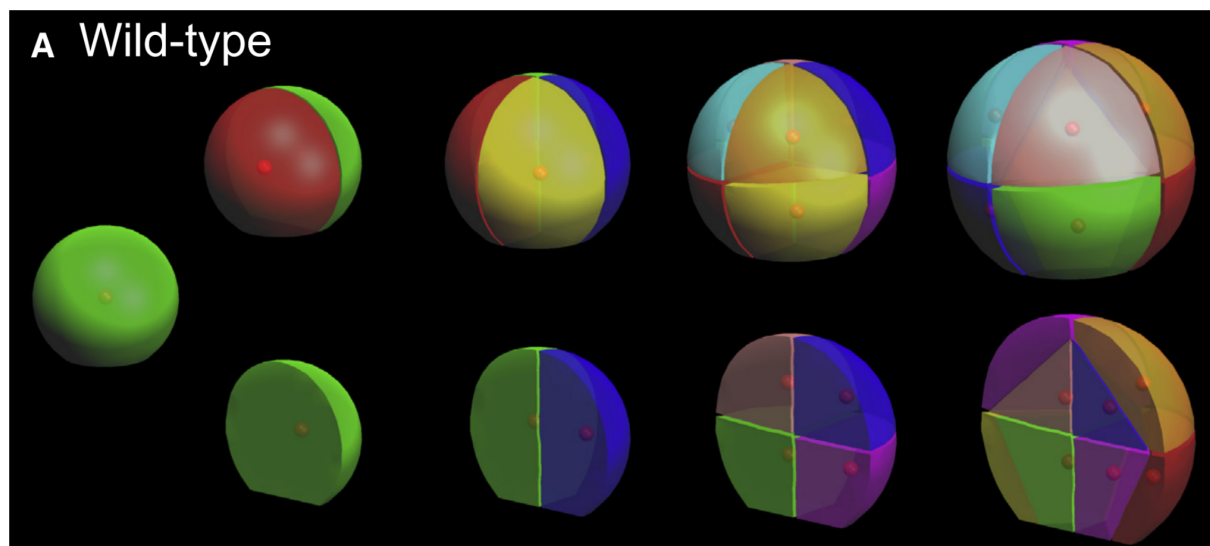


FIGURE 1.27 – Résultat du modèle de développement de l’embryon proposé par [Yoshida et al., 2014] sur quatre générations cellulaires. En haut, l’embryon dans sa globalité et en bas, l’évolution d’une moitié d’embryon. Les petites sphères sont les centres des cellules. (extrait de [Yoshida et al., 2014])

- ensuite, minimisation de l’aire de la surface de division (règle proposée par Errera)

Cette règle montre la dépendance entre la mise en place du plan de division et la géométrie de la cellule mère. Les résultats obtenus, alors, ont permis de reproduire les observations, à savoir les divisions pour arriver au 16c.

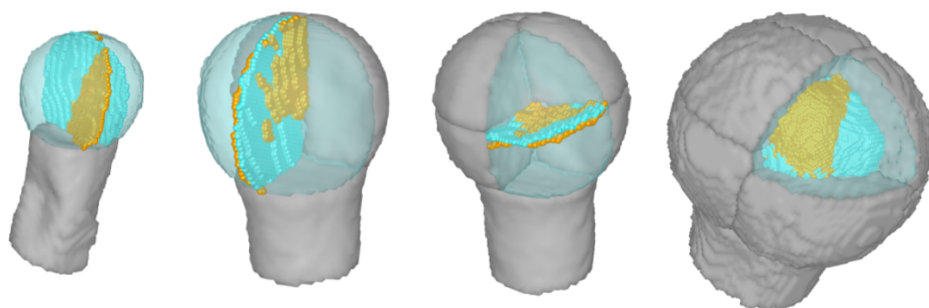


FIGURE 1.28 – Modélisation des premiers plans de division. Gris : surfaces des cellules obtenues par segmentation, Transparent : cellules mère obtenues par fusion des cellules filles, Bleu : surfaces de divisions observées issues de la segmentation, Orange : surfaces de divisions simulées avec le modèle [Moukhtar et al., 2016] et passant par le centroïde de la cellule mère

Ces stades sont stéréotypés et ont permis d’établir des règles sur le comportement de division dans l’embryon. La continuité de cette règle après le stade 16c, où de la variabilité s’installe et un changement de forme de l’embryon apparaît, était une des questions qui se posait par la suite.

Une stratégie d’identification des facteurs impliqués dans le contrôle de la mise en place des grands plans d’organisation de l’embryon (organes, axes de symétrie, morphologie) est l’analyse de mutants déficients dans cette mise en place. Les événements se déroulant à toutes les échelles dans l’embryon sauvage doivent donc d’abord être connus pour ensuite réaliser une comparaison avec les événements se déroulant dans le mutant, et ainsi permettre une conclusion sur l’implication d’un facteur.

Ce projet fait suite à une étude du laboratoire autour de la description et de l'interprétation des premiers stades de l'embryogenèse chez *Arabidopsis thaliana* (jusqu'à 16 cellules). Il a permis de décrire précisément les événements de la morphogenèse jusqu'au stade cœur.

1.6.2 Questions et stratégies

Le processus de développement de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana* présente beaucoup d'avantages pour l'étude de la morphogenèse :

- Le changement de forme est visible et stéréotypé d'une forme quasi sphérique à une forme cœur.
- Le changement s'opère en un nombre raisonnable de générations cellulaires : moins d'une dizaine de générations.
- Il y a peu de contraintes externes sur les cellules : on part d'une cellule unique et l'endosperme n'est pas encore cellularisé.
- Le changement de forme est accompagné de la mise en place des tissus avec des différenciations cellulaires : des facteurs modulant la division ou la croissance cellulaire pour orienter la forme seront présents et plus facilement identifiables.

À partir de 32 cellules, des changements morphologiques commencent à être visibles et la forme embryonnaire acquise reste la même entre les individus. Au niveau cellulaire, des différences d'organisations apparaissent : le pattern n'est plus stéréotypé entre les individus. À partir de cette observation, plusieurs questions se posent, notamment :

- Comment extraire l'évolution du phénotype embryonnaire (morphologie et organisation cellulaire), sans cinétique du développement embryonnaire ?
- Quels sont les événements, à toutes les échelles (embryonnaire, des domaines, cellulaire), se déroulant au cours du développement embryonnaire, qui permettent à la forme de cœur d'émerger ?
- Y a-t-il une modification des règles de division au cours du développement embryonnaire ?

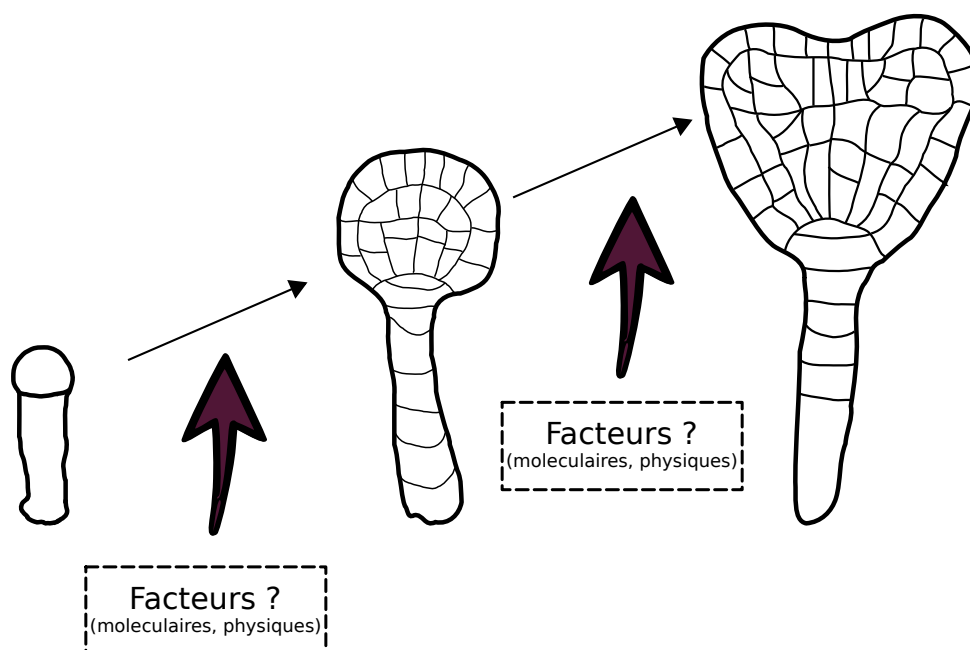


FIGURE 1.29 – Interactions multi-échelles dans le processus de morphogenèse de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana*.

Cette thèse s'articule essentiellement autour de la question suivante : Comment la forme de cœur de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana* est-elle formée ?

Pour répondre à ces questions, une banque d'images d'embryons sauvages a été faite avant que j'arrive. Elle contient des embryons à différents stades du développement. Cette banque, avec l'aide d'outils développés ou améliorés pour l'analyse des images et pour le lignage cellulaire, m'a permis d'enrichir une collection d'embryons segmentés avec des embryons de plus de 32 cellules, jusqu'au stade cœur (présenté dans le chapitre 2). Les outils nécessaires pour cette partie restaient les mêmes que ceux développés pour étudier le développement précoce : la segmentation des images. Cependant, les modifications morphologiques se font sur des objets plus gros, les outils nécessitaient donc une adaptation.

En partant de l'échelle embryonnaire, des caractérisations de plus en plus fines, jusqu'à des morphologies cellulaires, ont été réalisées (présenté dans le chapitre 3). Le phénotypage de la morphogenèse a nécessité la mise en place d'outils d'analyse de la morphologie à toutes les échelles. En suivant l'évolution de paramètres, des ruptures, des événements remarquables apparaissant au cours du développement pourront être mis en évidence. Ainsi l'évolution de la morphologie va être caractérisée en liant les phénotypes mesurés à chaque moment du développement et la position du stade au sein de l'embryogenèse. À l'échelle cellulaire, plusieurs scénarios sont possibles pour mettre en place la forme de l'embryon. Pour former un cœur, plusieurs séquences d'événements de croissance et de divisions sont possibles, de même qu'une large variété de paramétrages de ces deux processus peuvent coexister. Ainsi on peut imaginer toutes sortes de possibilités : l'excroissance des cotylédons peut être un taux de divisions plus important ou encore une croissance différentielle (variable au cours du temps, dans l'espace ; isotropique, anisotropique ou orientée). La caractérisation phénotypique va également permettre de répondre à certaines de ces questions, notamment en caractérisant l'ensemble des divisions cellulaires se déroulant au cours du changement de forme. La croissance cellulaire ne sera que partiellement caractérisée mais déjà certaines différences pourront être observées. Et pour vérifier les hypothèses, la modélisation nous a permis ensuite de séparer les processus cellulaires (croissance et division) pour les étudier indépendamment.

À partir des analyses issues de la description, une modélisation, de règles de division à l'échelle cellulaire, va être utilisée pour tenter d'expliquer le comportement cellulaire observé (présenté dans le chapitre 4 par un projet d'article). Au début du développement embryonnaire, l'équipe a montré que la mise en place du plan de division suit une règle unique pour toutes les divisions stéréotypées qui construisent l'embryon jusqu'au stade 16 cellules. Après la caractérisation des divisions dans les stades suivants (32 cellules à 256 cellules), la pérennité de la règle va être étudiée. Pour étudier les règles de division présentes dans l'embryon après le stade 32c, les résultats de simulations d'un modèle de division vont être comparés avec les plans de division observés.

Ainsi, la présence éventuelle de facteurs venant moduler les mécanismes cellulaires nécessaires à la mise en place de la morphologie stéréotypée de l'embryon pourra être déterminée (figure 1.29).

Chapitre 2

Établissement de la collection d'embryons

Pour mettre en relation des changements de forme de l'embryon au cours du développement et un changement dans les règles de division ou de croissance, il est nécessaire de disposer d'une description de l'embryon à l'échelle cellulaire tout au long du développement. Pour avoir cette information, les parois, ou les membranes, peuvent être marquées (Iodure de propidium [Truernit et al., 2008], FM64, pontamine fast scarlet). Par ailleurs, le développement embryonnaire se déroule dans la graine, une structure épaisse de plusieurs couches cellulaires, qui empêchent la bonne visualisation des marqueurs situés dans l'embryon. Jusqu'à récemment [Gooh et al., 2015], l'embryon ne pouvait pas être isolé et suivi dans son développement. Le développement est donc étudié avec des embryons fixés à différents instants du développement, ce qui, malgré la variabilité inter-embryonnaire, permet une extrapolation du développement au cours du temps. D'autre part, la fixation permet d'appliquer un marquage assez fort pour bien détecter les limites de chaque cellule et ainsi avoir l'organisation cellulaire.

2.1 Matériel

Les étapes de culture, de prélèvement du matériel, de fixation, de marquage et d'acquisition des images, qui ont permis par la suite d'effectuer cette thèse, ont été faites, avant mon arrivée, par Katia Belcram.

Le stade cœur est atteint environ 10 jours après fécondation. Pour cibler toutes les étapes du développement, sur une même hampe d'*Arabidopsis thaliana* sauvage Columbia, assez âgée pour couvrir tous les stades jusqu'au cœur, l'ensemble des graines sont prélevées en notant leur position relative (des siliques les plus âgées aux plus jeunes) puis fixées.

Les tissus de la graine sont fixés avec un mélange de méthanol et d'acide acétique, puis perméabilisés pour permettre une bonne imprégnation de l'agent marqueur choisi : l'iodure de propidium. Ce marquage permet de visualiser les parois des cellules en microscopie confocale après une excitation laser à 488 nm et une détection du signal émis autour de 600 nm. Cependant, l'iodure de propidium a également des propriétés d'interaction avec les acides nucléiques, ce qui peut induire une légère fluorescence intra-cellulaire.

Les graines sont ensuite mises entre lame et lamelle dans un liquide légèrement visqueux (citifluor) afin de, entre autres, limiter les mouvements lors de l'acquisition. Après repérage à faible grossissement, les embryons sont imagés en 3D par microscopie confocale (voir figure 2.1 a et d) avec un pas en Z de $0,35 \mu\text{m}$ (en général), une limite fixée par la diffraction de la lumière. La taille de voxels en x et en y est entre $0,17$ et $0,26 \mu\text{m}$ selon les images. Les voxels des images sont donc des parallélépipèdes rectangles.

Une grande collection d'images d'embryon avait été ainsi constituée. Les images avaient été ordonnées en fonction du prélèvement des graines sur la hampe et annotées soit en fonction du

nombre de cellules dans l'embryon pour les plus jeunes, soit par le stade présupposé de la génération cellulaire de l'embryon (16, 32, 33-64, 65-128, ou 129-256) soit par la forme embryonnaire pour les plus tardifs.

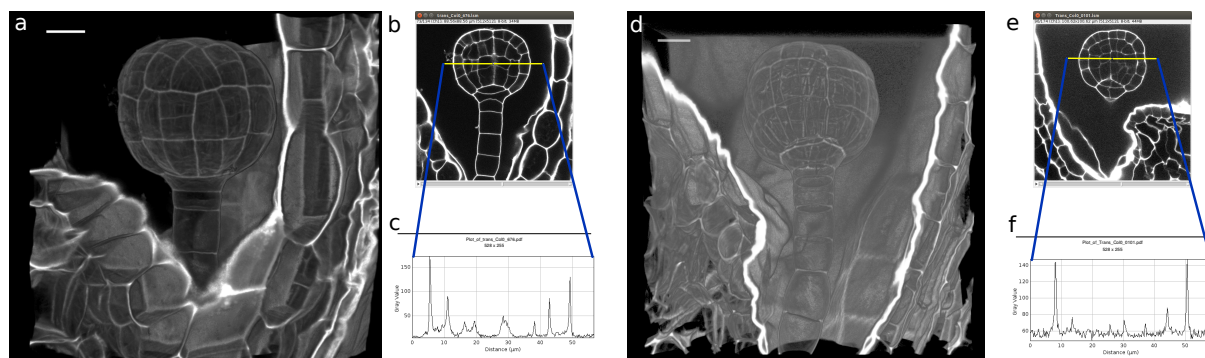


FIGURE 2.1 – Deux exemples d'images d'embryons marqués à l'iodure de propidium : (a,b,c) le 676, présent dans la collection, et (d,e,f) le 0101, non retenu. (a,d) vue 3D avec le viewer 3D d'ImageJ/Fiji, barre d'échelle de 10 μ m, (b,e) une coupe 2D (x,y) du stack 3D avec une sélection, (c,f) profil d'intensité le long du segment jaune de l'image 2D du dessus.

2.2 Segmentation

Chaque image 3D est segmentée en régions correspondants aux différentes cellules présentes. Pour un embryon, cette segmentation en cellules permet alors l'accès à différents types d'informations, à l'échelle individuelle des cellules, de domaines cellulaires, de l'embryon, et même des plans de division cellulaire. Pour faire toutes les mesures nécessaires d'autres représentations de l'information, que les images labellisées, vont parfois être utiles : des surfaces ou encore des graphes.

Pour segmenter des images, plusieurs algorithmes de segmentation existent (seuillage, contour actif ou lasso, par apprentissage, ligne de partage des eaux, ...). La méthode de seuillage binarise une image en séparant les voxels, avec une intensité supérieure au seuil demandé, et les voxels avec une intensité inférieure. Cette méthode permet de séparer les objets présents dans l'image par contraste, ils sont ensuite étiquetés.

Ces algorithmes sont souvent mis en œuvre après des prétraitements (débruitage, rehaussement, correction de flou, correction d'atténuations, ...) qui permettent de se rapprocher du cadre théorique d'application de ces algorithmes. Parfois, certains de ces prétraitements sont intégrés à l'algorithme de segmentation.

La méthode des contours actifs (appelée aussi level set ou snake) emprisonne des ensembles de voxels connexes en partant d'un contour large à l'extérieur ou d'un point à l'intérieur de l'objet à segmenter (appelé graine). Le contour progresse dans un paysage énergétique dépendant de l'intensité [Kass et al., 1988, Pound et al., 2012]. Cette méthode demande un contour pour chaque objet de l'image que l'on veut isoler. Dans les cas où plusieurs contours sont utilisés, le choix de la graine de chacun d'eux peut être automatisé ou sélectionné par l'utilisateur. L'utilisateur peut également décider de faire un contour englobant pour diviser les différents objets. La méthode de segmentation par apprentissage demande à l'utilisateur la sélection de voxels appartenant à chacune des régions à isoler afin de trouver les voxels similaires et pas forcément connexes. Il faut donc apprendre à l'algorithme à reconnaître autant de régions qu'il y a d'objets à isoler [Sommer et al., 2011]. La méthode de la ligne de partage des eaux (LPE ou watershed en anglais) [Vincent and Soille, 1991] consiste à remplir les bassins d'un paysage topographique à partir de ses minima.

Le choix de la méthode de segmentation est d'autant plus déterminant qu'un grand nombre de segmentations doit être réalisé et validé. Deux critères principaux entrent en jeu : la disponibilité des logiciels, la qualité de la segmentation obtenue. La qualité peut s'apprécier par la facilité à corriger et valider les segmentations.

2.2.1 Choix de la méthode

Nos images nécessitent la reconnaissance de contours d'objets (cellules) caractérisés par leur intensité lumineuse. Chaque image contient un nombre important d'objets en contact à segmenter (entre 17 à 260 cellules). Le paysage d'intensités de l'image est composé de crêtes, au niveau des parois cellulaires, et de creux dans les cellules. La continuité des parois est parfois relative car les intensités des voxels la constituant peuvent fluctuer très fortement (figure 2.1 b et e). Le protocole de fixation-marquage-imagerie a parfois déclenché la rupture de parois, mais surtout il résulte souvent en l'inhomogénéité du marquage des parois, au sein de l'embryon (voir figure 2.1 b,c et e,f). La coloration des parois se faisant par diffusion à travers l'embryon, plus les parois sont internalisées moins il y a de colorant. De plus, cette diminution du signal est augmentée lors de l'acquisition par la diminution du nombre de photons enregistrés au fur et à mesure que l'on s'enfonce dans l'objet (en Z). Pour détecter les bassins, au sein de l'image, ce n'est donc pas l'intensité absolue qui doit être prise en compte mais la morphologie locale du signal. Pour segmenter ces images une routine basée sur la méthode de la LPE a été utilisée.

2.2.2 LPE

L'algorithme de la ligne de partage des eaux (LPE) [Vincent and Soille, 1991] doit son nom à l'analogie avec un processus d'immersion d'un paysage par de l'eau. L'image en niveau de gris à segmenter est assimilée à un paysage avec des vallées, des crêtes et des plateaux (voir figure 2.2 B et C). À partir de marqueurs, généralement positionnés au fond des vallées, on fait monter de l'eau, lorsque l'eau de différents bassins entre en contact, une démarcation est placée : la ligne de partage des eaux (LPE) (voir figure 2.2D). Cette version de la LPE sépare chaque bassin par un voxel de digue (dam), le résultat est une segmentation ouverte (voir figure 2.3A). Une alternative à cet algorithme produit une image segmentée sans LPE où la segmentation est fermée en collant les bassins les uns aux autres (voir figure 2.3B).

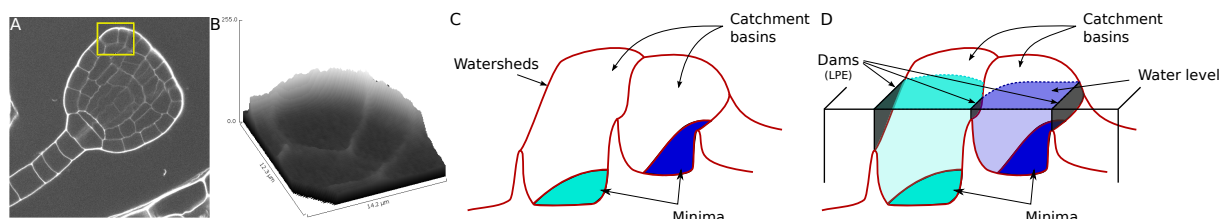


FIGURE 2.2 – Algorithme de la LPE. (A) Image à segmenter. (B) Surface des intensités situées dans le cadre jaune de (A). (C) arguments d'entrée de l'algorithme : niveaux de gris de l'image à segmenter formant le paysage topographique (en rouge) avec des bassins et les minima considérés (points). (D) Montée des eaux (immersion) qui illustre le fonctionnement de l'algorithme de la LPE. Figure adaptée de [Vincent and Soille, 1991]

Les marqueurs passés en entrée de la LPE seront donc les graines à l'origine des différentes régions de l'image. Ces graines peuvent être des voxels ou des ensembles de voxel connexes. La détermination des graines peut être faite de manière automatique avec des méthodes de détection telles que des minima régionaux d'intensité ou des plus grandes distances aux contours. Une image binaire, donnant la position des graines, peut également être construite manuellement.

Classiquement, un nouveau paysage est créé à partir du paysage original et de l'ensemble des marqueurs (e.g. ensemble des minima régionaux). Dans ce nouveau paysage, les voxels corres-

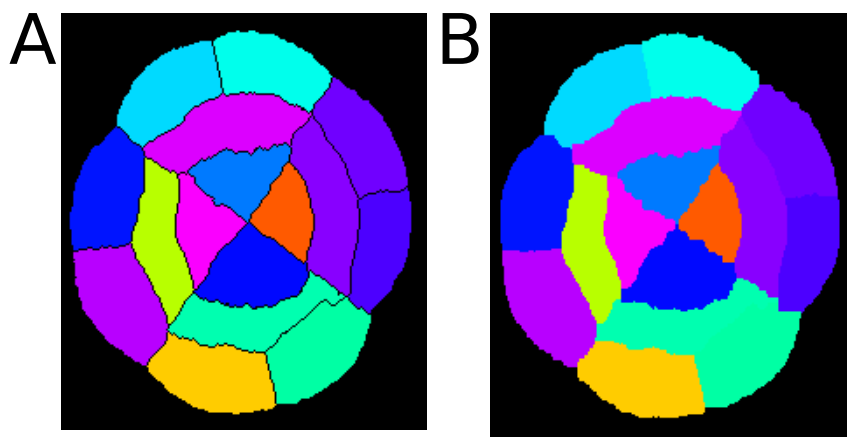


FIGURE 2.3 – Segmentation ouverte vs segmentation fermée. (A) Coupe d'un embryon avec une segmentation ouverte. (B) Coupe du même embryon avec une segmentation fermée

pondants aux marqueurs sont des minima globaux. Cette opération d'imposition des marqueurs garantira l'association d'un bassin versant à chaque marqueur par l'algorithme de la LPE.

2.2.3 Procédure de segmentation initiale

Dans une étude précédente du laboratoire [Moukhtar et al., 2016], la segmentation des images contenant des embryons de 2 à 32 cellules était réalisée avec une procédure reposant sur plusieurs composants logiciels d'origines diverses. Dans un premier temps, les images étaient rééchantillonnées dans AvizoTM afin que les voxels soient cubiques. Des points de repère, qui pointaient vers des cellules de l'embryon, étaient créés avec AvizoFireTM pour délimiter l'embryon. L'image rééchantillonnée ainsi que les points de repères étaient les données d'entrées d'un script Matlab. Dans ce script, une première application de l'algorithme de la LPE, avec les points de repère comme minima, permettait de délimiter l'embryon. Après extraction des labels de l'embryon, un masque était créé puis dilaté pour extraire une zone élargie de l'embryon. Sur chaque coupe de l'image de l'embryon, un programme C++ extrayait les contours avec l'algorithme de steger 2D [Steger, 1998]. Une deuxième LPE était ensuite réalisée dans l'image contour formée. Les marqueurs de la LPE étaient les minima locaux de la distance aux contours. Un filtre sur la taille des régions était ensuite appliqué et la LPE était ensuite recalculée. L'image labellisée obtenue contenait les lignes de partage des eaux. Pour fermer morphologiquement l'embryon, les bassins étaient étendus avec un algorithme de dilatation des bassins du logiciel AvizoFireTM.

Pour améliorer la segmentation d'une image, très peu de paramètres étaient modulables, ce qui ne permettait pas d'interaction avec la segmentation, et la visualisation des états intermédiaires était inexistante, entre autres, dues à l'absence de visualisation 3D facile sous Matlab. Des erreurs de segmentation arrivaient fréquemment sur des embryons de fort effectif ($> 32c$) pour lesquels le marquage est encore plus faible à l'intérieur. Malgré des tentatives d'amélioration de cette procédure, avec des réductions du nombre de logiciels différents à utiliser et l'utilisation de filtres pour améliorer les images (débruitage, atténuation de correction en z, l'utilisation des gradients dans la construction du paysage pour la LPE, etc, ...), il nous est apparu que la segmentation automatique des embryons était un objectif difficile à atteindre et qu'il nous fallait un outil permettant de réaliser des corrections manuelles rapides sur des segmentations de qualité variable.

2.2.4 L'outil de segmentation proposé

Plusieurs équipes ont développé des outils de segmentation basées sur la LPE. Des logiciels indépendants comme MorphographX [Barbier de Reuille et al., 2015] ou encore Mars-alt

[Fernandez et al., 2010] avaient été utilisés avec succès dans des publications.

Dans l'équipe de Philippe Andrey, Ignacio Arganda-Carreras et David Legland développaient une interface de segmentation [Legland et al., 2016] sur ImageJ/Fiji [Schindelin et al., 2012] (voir figure 2.5 A). Dans cette interface, la segmentation est contrôlée par un paramètre de sensibilité au contraste local, appelé la tolérance. Pour déterminer les marqueurs de la LPE, dans ce plugin, l'algorithme des h-minima est utilisé. L'opération des h-minima est une méthode qui permet de remplir les trous de hauteur inférieure à un paramètre h (voir figure 2.4 A et B), ce qui permet d'obtenir les minima significatifs au sens de ce seuil [Soille, 2003].

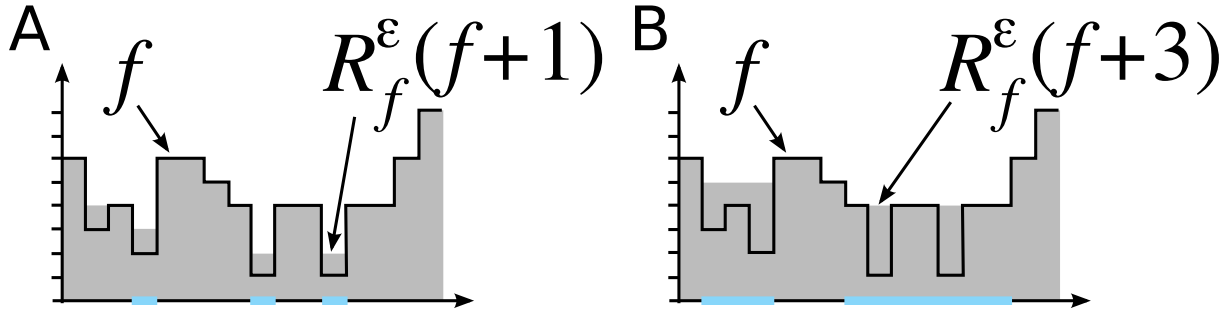


FIGURE 2.4 – La transformation h-minima. Exemple de l'opération morphologique R^{ϵ}_f avec un paramètre de tolérance de 3 (A) ou de 1 (B) d'un signal 1D (f). En bleu : minima étendus correspondants. Figure adaptée de [Soille, 2003]

Sur l'interface, le paramètre de hauteur h correspond au paramètre de tolérance donné par l'utilisateur. Ainsi, le paysage créé contient une version de l'image originale où les variations d'intensité sont lissées lorsqu'elles sont inférieures à la valeur du paramètre (voir figure 2.4 A et B). Dans cette nouvelle image synthétique, les minima locaux étendus sont calculés (voir figure 2.4 A et B en bleu) et extraits dans une image qui sera passée à la fonction qui va calculer la segmentation par LPE. Une valeur du paramètre de tolérance faible créera des minima locaux de faibles profondeurs qui peuvent être uniquement du au bruit dans l'image (voir figure 2.4 A). Une valeur élevée, ne prendra en compte que les pics les plus grands, pour la définition des graines des bassins (voir figure 2.4 B).

Nos images présentent une diminution de l'intensité du marquage au fur et à mesure que l'on entre dans l'embryon (voir figure 2.1 c et f), une valeur élevée du paramètre de tolérance ne permet pas la détection de toutes les cellules internes et une valeur faible détecte beaucoup de bruit, même après un lissage gaussien 3D de 0.5, ce qui provoque une sur-segmentation de l'image.

Pour pallier les variations d'intensité au sein de chacune de nos images et pouvoir effectuer des corrections, l'interface de segmentation a été enrichie ; des nouveaux outils ont été ajoutés (voir figure 2.5B).

Les nouvelles fonctionnalités sont basées sur des modifications semi-automatiques ou manuelles des marqueurs.

De nouvelles visualisations :

Dans un premier temps, la possibilité d'importer une carte des marqueurs externes a été ajoutée, afin que d'autres méthodes de sélection des marqueurs puissent être utilisées, mais également pour avoir la possibilité de charger une ancienne session de segmentation. En effet, la carte des marqueurs peut être sauvegardée à tout moment. Pour visualiser la carte des marqueurs, des nouveaux modes d'affichage ont été ajoutés :

- l'image binaire qui correspond aux marqueurs utilisés par l'algorithme de la LPE (voir figure 2.5C)
- une superposition des marqueurs avec l'image à segmenter (voir figure 2.5D)

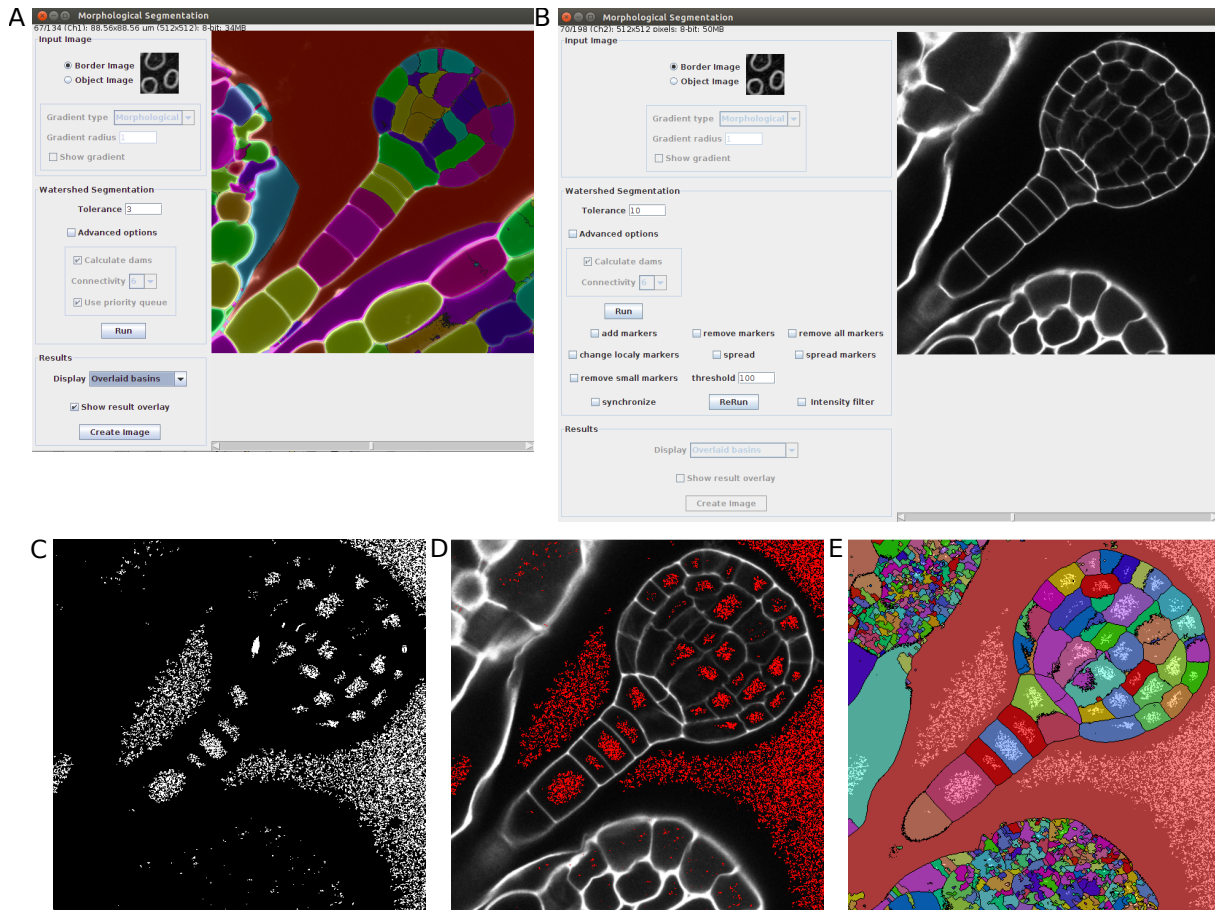


FIGURE 2.5 – Plugin ImageJ/Fiji de segmentation. (A) interface du plugin *Morphological Segmentation* du package MorphoLibJ [Legland et al., 2016] en 2014. (B) interface modifiée pour corriger les segmentations. (C, D et E) nouvelles visualisations : carte des marqueurs (C), superposition des marqueurs et des intensités (D) et superposition des marqueurs et des bassins (E)

- une superposition des marqueurs avec l'image labellisée calculée par le plugin (voir figure 2.5E)

Des outils de corrections :

À partir d'une première segmentation par LPE, différents outils d'édition permettant des modifications, semi-automatiques ou manuelles, des marqueurs de manière locale ont été ajoutés :

- pour pallier l'atténuation de la profondeur provoquée par l'épaisseur des tissus, un outil qui permet de recalculer des marqueurs dans un bassin sélectionné. Les bassins contenant plusieurs cellules ont la particularité d'avoir un contraste faible par rapport au contraste provoqué par les parois délimitant l'embryon. En modifiant le paramètre de tolérance, cet outil ajoutera localement des marqueurs calculés sur le paysage topologique modifié.
- Un outil interactif d'ajout de voxels étiquetés « marqueur » directement sur la carte des marqueurs. Cela permet a) d'ajouter des graines de nouveaux bassins lorsque aucune méthode automatique ne les détecte ou b) de rectifier la délimitation des bassins lorsque les intensités non homogènes des parois ont conduit à faire des géométries cellulaires aberrantes.
- Un outil interactif pour enlever des voxels étiquetés « marqueur » directement sur la carte des marqueurs. Cela permet d'enlever des voxels « marqueurs » entre deux bassins afin

de séparer une région en deux lors de sous-segmentation et également de corriger des sur-segmentation.

- un outil qui enlève tous les marqueurs présents dans une région sélectionnée. Cela peut permettre de supprimer un bassin qui serait issu d'une sur-segmentation.
- un outil, basé sur un paramètre de taille, calcule la taille de chaque bassin et lorsque cette taille est inférieure à la taille demandée, l'ensemble des marqueurs de cette région est enlevé. Cet outil, bien qu'avec un temps de calcul proportionnel au nombre de bassins présents (coûteux), permet de supprimer automatiquement des petits labels d'une sur-segmentation ou ajoutés lors de modifications interactives. On a ainsi l'assurance que l'image ne contient que les labels d'une taille correspondant à la taille des objets à détecter.

Toutes ces modifications nécessitent plusieurs exécutions de l'algorithme de la LPE. Après plusieurs cycles de ces corrections, basées sur les connaissances de l'utilisateur, on peut arriver à une image qui est plus proche d'une bonne segmentation de l'image d'entrée. Modifier la carte des marqueurs permet d'avoir une trace des corrections faites, et ainsi de reproduire la segmentation, à nouveau, pour la perfectionner encore.

2.2.5 Application

La segmentation des embryons pour construire la collection, à nécessité un filtrage Gaussien 3D ($\sigma = 0,5 \text{ voxels}$) afin de lisser le bruit, et ainsi améliorer la carte des marqueurs obtenue par le plugin de segmentation. Chaque embryon a nécessité un chemin différent de paramétrage et de corrections itératives, pour arriver à une segmentation validée visuellement en 2D dans toutes les directions de l'espace, et en 3D pour chacune des couches cellulaires. La dernière LPE appliquée a toujours été sans labellisation des lignes de partage des eaux afin de fermer les embryons.

Au cours de la segmentation de la collection d'embryons, certaines limites sont apparues. L'application de l'algorithme de la LPE sur nos images, avec des graines issues de la méthode des h-min (voir figure 2.4), présente certains problèmes qui n'ont pas été résolus.

- les interfaces entre les bassins sont très bruitées, car les intensités des contours cellulaires sont souvent faibles, peu contrastées et inhomogènes. Des traitements post-segmentations ont été ajoutés pour lisser les contours des régions. Un filtre de vote majoritaire a été appliqué cinq fois aux images labellisées, lorsque des masques de cellules ont dû être extraits. Pour l'extraction des surfaces cellulaires et maillages associés, effectuée par le logiciel AvizoFireTM avec un algorithme issu de [Hege et al., 1997], un lissage non contraint de 5 a été appliqué. Ce lissage correspond à un filtre Gaussien modifié. Une probabilité d'appartenance d'un voxel à un label est attribuée en fonction de sa distance aux bords.
- dans certaines images, l'embryon est très proche des tissus de la graine qui sont très fortement marqués (voir figure 2.1 a et d). L'algorithme de la LPE aura alors tendance à considérer les tissus de la graine comme la délimitation des cellules embryonnaires les plus proches (voir 2.9 embryons 1157, 1204 ou encore 1193). Les quelques cellules des tissus protodermiques, avec une géométrie déformée, ont été écartées des analyses de formes cellulaires lorsque cela était possible. Dans le cas contraire, elles ont été considérées comme ayant un impact négligeable car présentes en faible proportion.

Cette nouvelle procédure contient donc beaucoup d'étapes manuelles pour améliorer les segmentations, certains des artefacts de la LPE restent non résolus et nécessitent des étapes supplémentaires sur d'autres logiciels. L'utilisation de ImageJ/Fiji a permis l'incorporation de tous les outils déjà présents à toutes les étapes : des traitements post segmentation, de la visualisation pendant la segmentation. Cela a beaucoup facilité la validation des segmentations et a permis aussi d'effectuer rapidement quelques analyses (volumique, cartes de paramètres cellulaires ...).

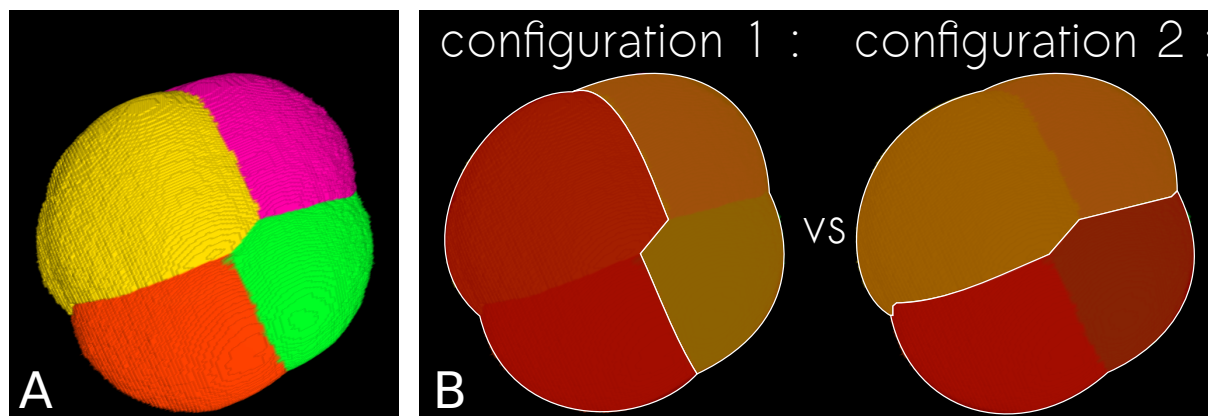


FIGURE 2.6 – Exemple de décision basée sur la géométrie cellulaire. (A) configuration à filier à la génération n , (B) 2 configurations possibles à la génération $n - 1$, la deuxième sera évaluée "plus probable", car les géométries des cellules-mères sont plus plausibles, et donc retenue.

2.3 Filiation

Pour retracer les événements de division malgré la nature statique des données, le lignage cellulaire de chaque embryon a été reconstruit. Chaque cellule présente dans l'embryon résulte d'une chronologie de division (et de croissance). Le lignage, effectué ici, consiste à inférer cette histoire, en remontant du stade observé jusqu'à la première division. Chaque génération cellulaire va être rembobinée : les cellules filles d'une même cellule mère vont être liées de façon récursive. Ligner un embryon nécessite des prises de décisions dans le choix des cellules qui sont sœurs. Le lignage d'un embryon s'appuie sur des aspects géométriques des cellules (surface commune, alignement des surfaces, volumes), et également sur la connaissance des stades antérieurs par lesquels il a pu passer.

2.3.1 Outil

Il n'existe pas, à ma connaissance, d'outil de lignage automatique opérant sur un seul instantané du développement, j'ai donc reconstruit, entièrement à la main, les filiations cellulaires de chaque embryon. Pour ne pas ajouter des erreurs de retranscription, une interface a été réalisée sous la plateforme ImageJ/Fiji (voir manuscrit pour projet d'article, rejeté, ci-dessous). Elle permet de construire un arbre de filiation, de le sauvegarder sous un format standard, et donc de le réutiliser pour l'analyse, mais également de favoriser la communication des données. Enfin cette interface facilite l'analyse puisque l'arbre peut être annoté pour extraire des sous-arbres, voire des sous ensembles de cellules sélectionnés par l'utilisateur.

2.3.2 Application

La reconstruction des lignages cellulaires de la collection d'embryons a été réalisée en suivant l'ordre chronologique du développement, d'abord parce que ligner les plus jeunes embryons est plus simple, mais également parce qu'il est nécessaire de connaître les configurations antérieures possibles pour en déduire la filiation des embryons plus âgés. Si le développement est très stéréotypé pour l'embryon sauvage jusqu'à 16 cellules, après, on a pu observer une variabilité des divisions parfois importante, avec des cas parfois très peu fréquents (résultat détaillé dans le chapitre 4 page 92). Il est donc nécessaire de reconstruire le lignage d'une grande quantité d'embryons pour échantillonner toute la variabilité. Il peut y avoir des incertitudes, sur le lignage, dues au manque d'observation et même parfois des erreurs mais cela, dans tous les cas, restera assez localisé dans l'arbre sans impacter tout l'arbre de filiation. Une autre source d'incertitude

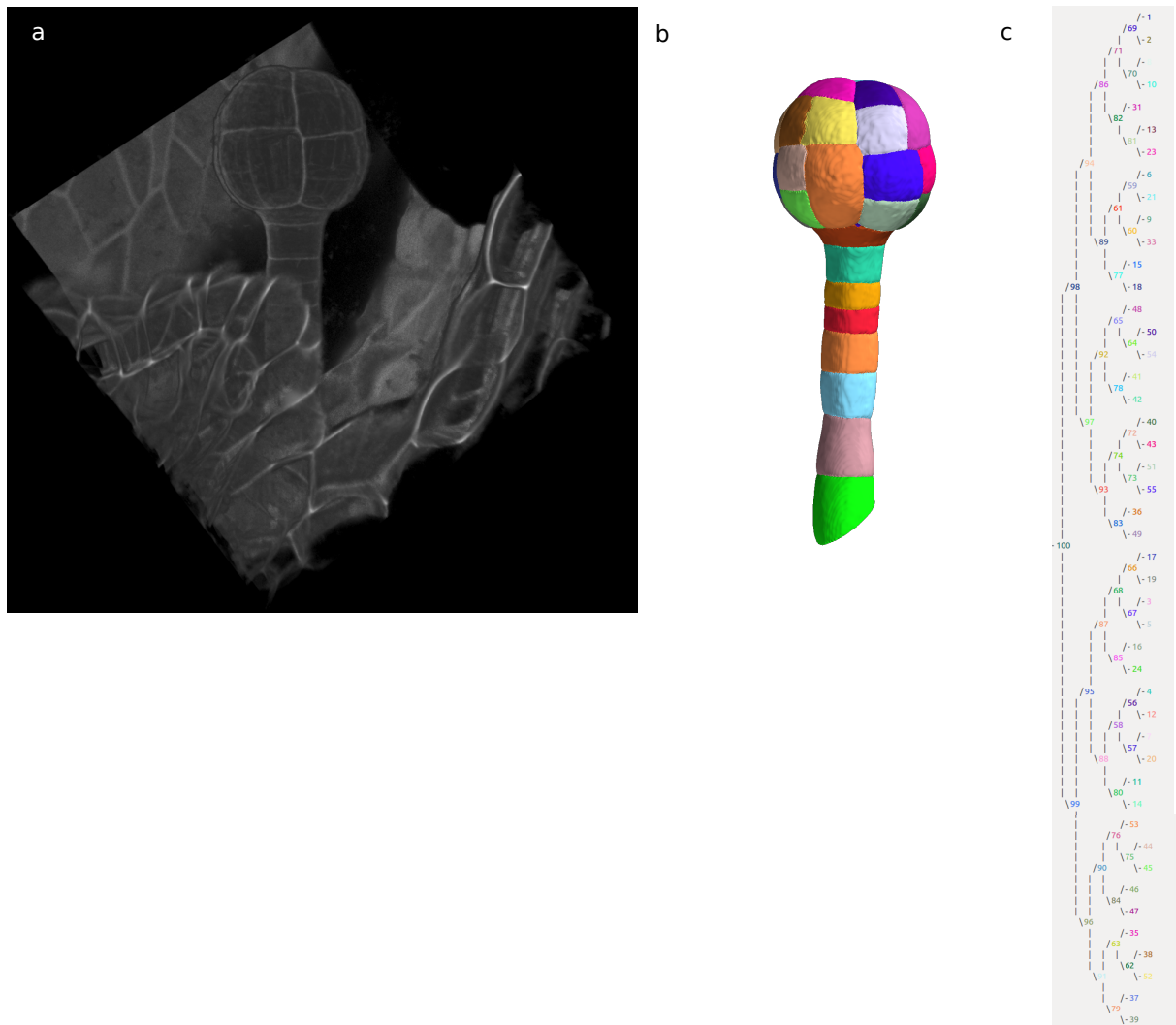


FIGURE 2.7 – Exemple de filiation. (a) visualisation volumique de l'image brute de l'embryon (1173) avec le viewer 3D [Schmid et al., 2010] de ImageJ/Fiji. (b) visualisation surfacique (avec mayavi [Ramachandran and Varoquaux, 2011]) de l'embryon segmenté créé avec AvizoFireTM. (c) Arbre de filiation de l'embryon.

locale, sur l'arbre de filiation, est issue de la capacité de l'embryon d'arriver à des organisations cellulaires identiques via différentes voies (résultat détaillé dans le chapitre 4 page 92).

En général la géométrie cellulaire nous donne des informations suffisantes pour prendre une décision (voir figure 2.6). Cependant, l'histoire cellulaire de l'embryon ne dépend pas uniquement des divisions mais également de la croissance. La croissance peut parfois nous aider à résoudre des cas où il y aurait pu y avoir une incertitude [Korn, 1974] mais dans d'autres cas, surtout dans les stades tardifs, elle nous apporte de l'incertitude en déformant les géométries initiales.

Les lignages ont été reconstruits (exemple figure 2.7 c) en utilisant l'expertise acquise au cours de ces reconstructions. Parfois des sous-segmentations ou des sur-segmentations ont été détectées et corrigées suite à des arbres de lignage avec des profondeurs singulières.

Bioimage informatics

TreeJ : an ImageJ plugin for interactive cell lineage reconstruction from static images

Elise Laruelle^{1,2,*}, Philippe Andrey^{1,3}, Jean-Christophe Palauqui¹ and Alain Trubuil^{2,*}

¹Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, RD10, 78026 Versailles Cedex, France,

²MalAGE, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France and

³Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UFR927, F-75005, Paris, France

*To whom correspondence should be addressed.

Associate Editor: XXXXXXXX

Received on XXXXX; revised on XXXXX; accepted on XXXXX

Abstract

Motivation: In developmental biology, cell lineages are generally reconstructed from time lapse data. However, dedicated tools are required when only static images are available.

Results: We developed an interface to assist users in the building and editing of a lineage tree from a 3D labeled image. Each cell within the tree can be tagged. From the created tree, cells of a sub-tree or cells sharing the same tag can be extracted. The tree can be exported in a format compatible with dedicated software for advanced graph visualization and manipulation.

Availability: The TreeJ plugin of ImageJ/Fiji is implemented in Java. The code source is available at <http://imagej.net/TreeJ>.

Contact: alain.trubuil@jouy.inra.fr

1 Introduction

Understanding how cell organizations emerge is one of the major challenges in developmental biology. Cells at any particular stage result from several rounds of cell divisions. Reconstructing the history of successive cell division events as a cell lineage tree is thus essential for understanding cell patterning. In situations amenable to time lapse microscopy, various programs exist to track cells and their divisions (ALT (Fernandez et al., 2010), LineageTracker (Downey et al., 2011), MorphographX (Barbier de Reuille et al., 2015) ...). In some contexts, however, tissue fixation is required prior to image acquisition. Cell lineage can still be inferred from the resulting static images, by recursively backtracking cell division events. This requires that the patterning is stereotyped enough or that cues are available for the biologist to identify daughter cells. To date, no user-friendly tool has been proposed in the bioimage informatics community to assist biologists in this reconstruction process. Here, we present a graphical interface integrated in ImageJ/Fiji (Schindelin et al., 2012) to reconstruct a lineage tree from a static 3D image stack. The interface design is intuitive and the experimenter can easily link and annotate cells in a recursive way.

2 TreeJ functionality

The interface is composed of three parts (Fig. 1A). The current slice of the 3D image stack is shown in the middle. The right-panel displays buttons to construct, label, and extract trees and sub-trees. The left-panel frame displays the ongoing tree and provides input/output buttons. Depending on the user question, different outputs can be generated.

Input. TreeJ is compatible with a large spectrum of label images obtained by any region segmentation software. The interface can be launched on any 2D or 3D label image from 8 to 32 bits. The labeling can be discontinuous (i.e., missing labels), as frequently encountered as a result of post-processing operations applied to segmented images.

Lineage reconstruction. The user reconstructs the lineage tree by recursively pairing sister cells. To link two cells, the user must either click the pair of cells on the image or enter manually their label values in the dedicated fields (Fig. 1A). Validating the pairing results in a new node in the tree, the merging of the pair of cells, and the automatic update of the display.

Errors can easily be corrected at any depth in the tree. The unlink button undoes erroneous pairings by splitting back any selected mother cell.

Annotating cells and sub-trees. TreeJ allows the introduction of biologically important information such as cell identity or localization

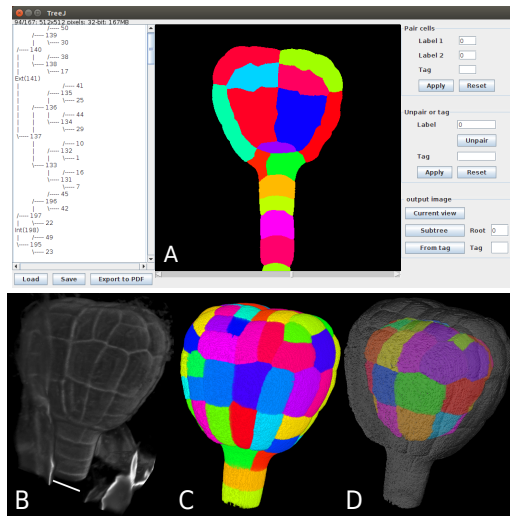


Fig. 1. TreeJ interface and sample illustration. (A) TreeJ interface showing an *A. thaliana* 122-cells embryo traced back over four cell generations. (B) 3D embryo raw image (scale bar : 10 μm). (C) 3D segmented embryo, (D) output image of tagged internal tree nodes.

in specific anatomical domains. Each node of the cell lineage tree can be tagged with an arbitrary text identifier. This annotation can be done when pairing cells, or later on. The same tag can be used for different cells (mother and daughters), thus supporting the annotation of whole domains (see the displayed tree in Fig. 1A).

Output. At any time the user can create an independent copy of the modified label image, which can thus be visualized and analyzed with any tool available in ImageJ. TreeJ also allows to create images containing subset of cells from a sub-tree specified by its mother cell label or a subset of cells sharing the same tag (Fig. 1C-D). This provides further opportunities for validating the reconstructed lineages and to analyze quantitatively selected anatomical domains.

The reconstructed tree graphs can be saved under PDF, treeV, or Newick file formats. TreeV, a home made format, can be taken as input by TreeJ, thus allowing lineage reconstruction through several sessions. Newick is a generic tree format recognized by other tools for further tree processing.

3 Application

The early *Arabidopsis thaliana* embryo development is a very stereotypical process (Yoshida et al., 2014; Gooh et al., 2015) w.r.t. geometry and patterning. To study embryo cellular organization, embryos were fixed and cell walls were stained with Propidium Iodide (Truernit et al., 2008) (Fig 1B). The acquired 3D images were segmented with the *Morphological Segmentation* plugin (Legland et al., 2016).

Tissue differentiation is an important aspect of embryo development. At the fourth cell generation, the protoderm emerges from a volume asymmetric periclinal division. We used TreeJ to reconstruct lineage trees and annotate the mother cells corresponding to the protoderm (Ext) and the inner tissues (Int). The sample tree shown in Fig. 1A, reconstructed from a 122-cell stage embryo, is unbalanced, the protoderm layer having at least one additional cell generation compared with internal tissues. Using the

tag image extraction functionality of TreeJ, we isolated all cells descending from the ancestors of the epidermal or of the inner tissues (Fig. 1D). From the obtained two images, we observed that more cells were present in the protoderm (73 cells) than in the inner tissue (49 cells). This result was consistent with the recently reported generational shift (Gooh et al., 2015). In addition, the average volume for internal cells was $468.8 \pm 198.7 \mu\text{m}^3$ and $404.3 \pm 140.3 \mu\text{m}^3$ for external cells. These volume distributions were also in agreement with previous reports (Yoshida et al., 2014).

4 Conclusion

With TreeJ, cell lineages can easily be constructed, visualized, and exported. The formatted tree representation shows the relative division rates and can be used as a phenotype of the system to compare between individuals or mutants. Using TreeJ adds robustness to the lineage reconstruction process from static images and provides standardized representations that facilitate communication and sharing among the community. In addition to cell lineage reconstruction, TreeJ supports further analyses related to cell genealogy, such as extracting the descendants from a common precursor or rewinding cell organizations back to previous configurations. TreeJ can be used on any segmented tissue, be it animal or vegetal. Future development encompass the automation of pairing based on previous entries with machine-learning schemes.

Acknowledgments

We thanks Katia Belcram for embryo images, and Ignacio Arganda-Carreras and David Legland for help with Java programming.

Funding

This work was supported by the MIA and BAP departments of INRA. The IJPB benefits from the support of the Labex Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-10-LABX-0040-SPS).

References

- Barbier de Reuille, P. et al. (2015). MorphographX: A platform for quantifying morphogenesis in 4D. *eLife*, 4:e05864.
- Downey, M. J. et al. (2011). Extracting fluorescent reporter time courses of cell lineages from high-throughput microscopy at low temporal resolution. *PLoS ONE*, 6(12):1–12.
- Fernandez, R. et al. (2010). Imaging plant growth in 4D : robust tissue reconstruction and lineaging at cell resolution. *Nat. Methods*, 7:547–553.
- Gooh, K. et al. (2015). Live-cell imaging and optical manipulation of arabidopsis early embryogenesis. *Dev. Cell*, 34(2):242 – 251.
- Legland, D. et al. (2016). MorpholibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with imageJ. *Bioinformatics*.
- Schindelin, J. et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, 9(7):676–682.
- Truernit, E. et al. (2008). High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in arabidopsis. *Plant Cell*, 20(6):1494–1503.
- Yoshida, S. et al. (2014). Genetic control of plant development by overriding a geometric division rule. *Dev. Cell*, 29(1):75 – 87.

2.4 La collection

La collection d'embryons, déjà présente au laboratoire avant mon arrivée, contenait une dizaine d'embryons de chaque stade canonique jusqu'à 32 cellules (donc sur 5 générations cellulaires). L'observation des stades canoniques, des stades où l'ensemble des cellules présentes sont à la même génération cellulaire (nombre de cellules en puissance de 2), était possible de par la synchronisation des divisions au début du développement. Mais dès la troisième génération (de 16 à 32 cellules), l'asynchronisation prend de l'amplitude et des stades intermédiaires ont dû être également sélectionnés pour avoir un effectif satisfaisant. Par la suite les embryons ont été regroupés par groupes générationnels, délimités par les stades canoniques (si les taux de divisions étaient homogènes entre les tissus au sein de chaque embryon).

Les embryons avaient été préalablement triés en fonction, soit du nombre de cellules, lorsqu'il y en avait peu, soit en fonction de la forme globale. Ce premier classement a permis de situer à première vue les embryons les uns par rapport aux autres au cours du développement. Pour cibler l'ensemble du développement, les embryons ont été choisis dans ce tri de manière à avoir une dizaine d'embryons par génération cellulaires (c.à.d entre stades canoniques successifs).

La collection d'embryons segmentés, après de multiples révisions, n'a finalement pas une répartition homogène des individus le long de la période développementale ciblée (figure 2.8). Durant cette thèse, la collection a été agrandie de 39 embryons contenant entre 33 et 257 cellules.

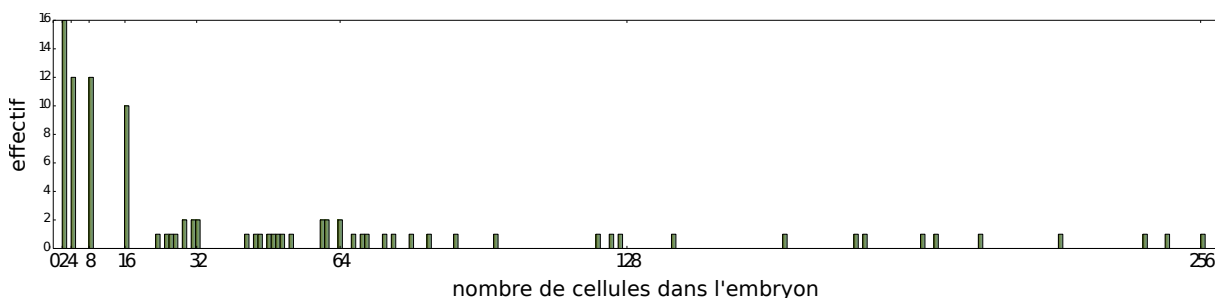


FIGURE 2.8 – Répartition des embryons de la collection par rapport au nombre de cellules dans chaque embryon.

2.4.1 Vérification et validation

Après segmentation, chaque embryon a été filié, ce qui a permis de (re)vérifier l'exactitude des segmentations. En effet, toutes les sur-segmentations et même des sous-segmentations, réparables grâce à la connaissance du système et notamment de la dynamique de division inférée grâce au lignage, ont été corrigées. Pour les lignages, la connaissance, progressivement acquise, a permis de remettre parfois en question le travail effectué, et ainsi de revenir sur des décisions de lignage.

2.4.2 Données

La collection contient 47 embryons de plus de 16 cellules, entre 23 à 257 cellules (figure 2.8 et figure 2.9). Pour chaque embryon, un ensemble de données a été généré pour et par l'analyse (listé dans le tableau 2.1). D'autres annotations peuvent aussi être aisément enregistrées (graphe de voisinage des cellules, ...).

nom	définition	type
image brute	stack d'images 2D en niveau de gris 8-bits	image 3D
image des marqueurs	stack d'images binaires 2D	image 3D
image labellisée	stack d'images 2D 16-bits	image 3D
maillage surfacique	liste de patches triangulés annotés	maillage
arbre de lignage	liste des parents de chaque région labellisée $1, 2, \dots, n$	liste
domaines	liste des labels appartenant à la couche protodermique, à la partie apicale et à la partie basale	liste
cellules de l'hypophyse	liste des cellules descendant de l'hypophyse	liste
suspenseur	liste des cellules appartenant au suspenseur (hypophyse exclue)	liste
plan de division	surface	maillage
phénotypage des divisions	liste (label cellule-fille 1, label cellule-fille 2, type de division) où le type de division est une valeur correspondant à une configuration théorique	liste
volumes ratios	rapport caractérisant chaque division : $\frac{\min(\text{volume}_{\text{cellule-fille1}}, \text{volume}_{\text{cellule-fille2}})}{\text{volume}_{\text{cellule-fille1}} + \text{volume}_{\text{cellule-fille2}}}$	liste
repère	axes pour orienter l'embryon par rapport à son axe apico-basal	vecteurs
volumes cellulaires	volumes de chaque cellule en μm^3	scalaires
POIs	points positionnés au niveau de zones remarquables (détails chapitre 3, section courbure locale)	coordonnées

TABLE 2.1 – Données contenues dans la collection

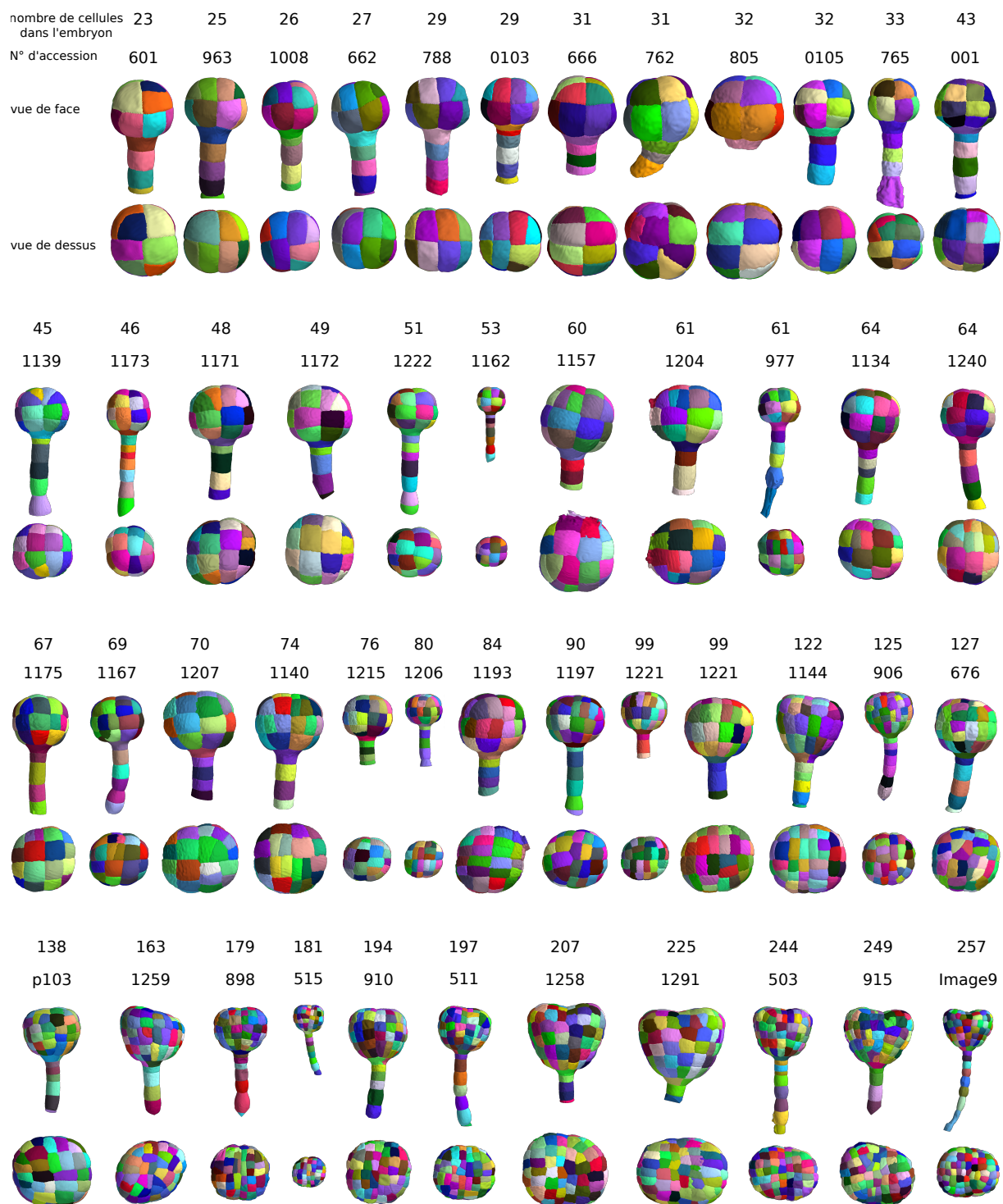


FIGURE 2.9 – Embryons, de la collection, de plus de 16c, ordonnés en fonction du nombre de cellules descendant de la cellule zygotique apicale. L'échelle est arbitraire et différente d'un embryon à l'autre. La couleur des cellules est aléatoire.

Chapitre 3

Descriptif multi-échelle du développement jusqu'au stade cœur

Pour comprendre la morphogenèse de l'embryon au cours du développement, celle-ci a besoin d'être d'abord phénotypée plus précisément et ce à plusieurs échelles (embryonnaire, domaine, cellule).

L'apparition de la forme est le fruit de tous les événements se déroulant à toutes les échelles dans l'embryon. Mais quelle est la contribution apportée par chaque domaine de l'embryon et à quel point est elle différente d'un domaine à l'autre ? Les cellules de l'embryon peuvent être séparées en domaines cellulaires, en fonction de paramètres communs. Les domaines seront donc définis comme des groupements de cellules qui partagent, une position dans l'embryon, une différenciation cellulaire, une origine cellulaire ou encore une forme cellulaire commune.

Les domaines comparés seront donc parfois des couches cellulaires, et d'autres fois des régions plus compactes de cellules, dont l'union forme l'embryon entier. Afin de quantifier la contribution de chacun des domaines à l'acquisition de la forme et du pattern de division de l'embryon, chaque mesure y sera appliquée et pourra être comparée entre ces domaines. On pourra ainsi évaluer quelles sont ces modifications morphologiques, et où et quand elles apparaissent.

Chez les végétaux, l'émergence d'une forme est contrôlée par deux processus cellulaires : la croissance et la division [Perrot-Rechenmann, 2010, Reinhardt and Kuhlemeier, 2002]. Une croissance différentielle peut générer de la diversité morphologique [Dupuy et al., 2010]. En fonction des formes cellulaires, en partie déterminées par l'orientation du plan de division, la croissance n'aura pas le même impact [Fozard et al., 2013, Alim et al., 2012]. De même la prolifération des cellules peut changer le destin de la forme [Reddy et al., 2004]. Bien que les embryons soient fixés, on inférera l'évolution de forme, le comportement de division et le comportement de la croissance cellulaire, à partir de mesures moyennes sur un grand nombre d'observations ou encore en regardant les tendances au cours du développement. Ainsi dans cette partie, la quantification de la forme passera essentiellement par des mesures de croissance différentielle, de volume ou encore de nombre de cellules.

Cette étude nous permettra également d'avoir des données qui serviront, en partie, à paramétrer les modèles de division et de croissance et en partie, de référence pour analyser les résultats de la modélisation.

3.1 Échelle embryonnaire

Au cours du développement, l'embryon change de forme, il passe d'une forme quasi-sphérique avec une symétrie radiale à une forme de cœur avec une symétrie bilatérale. Comment connaître qualitativement cette transition à l'échelle de l'embryon entier ? Nous examinons ci-dessous l'évolution du volume de l'embryon et de sa forme, au travers de la courbure.

3.1.1 Volume embryonnaire

Sur les premières générations (jusqu'au stade 16), l'embryon grossit peu : il double seulement son volume alors qu'il multiplie son nombre de cellules par 16 [Yoshida et al., 2014]. Le volume embryonnaire n'évolue donc pas proportionnellement au nombre de cellules : l'embryon se divise et les cellules sont de plus en plus petites. Par la suite, entre le 16 cellules et le globulaire, le volume double encore [Yoshida et al., 2014]. La croissance semble être lente au début puis être sur un régime exponentiel par rapport au nombre de cellules dans l'embryon. Quelle dynamique de croissance précise suit l'embryon sur l'ensemble du développement ?

Pour mesurer le volume total de l'embryon, l'ensemble des cellules descendant de la cellule apicale du zygote a été pris en compte (comme fait par les précédentes études [Yoshida et al., 2014] [Moukhtar et al., 2016]). Les voxels contenus dans ces cellules sont additionnées et la somme est convertie en volume réel avec la calibration de l'image.

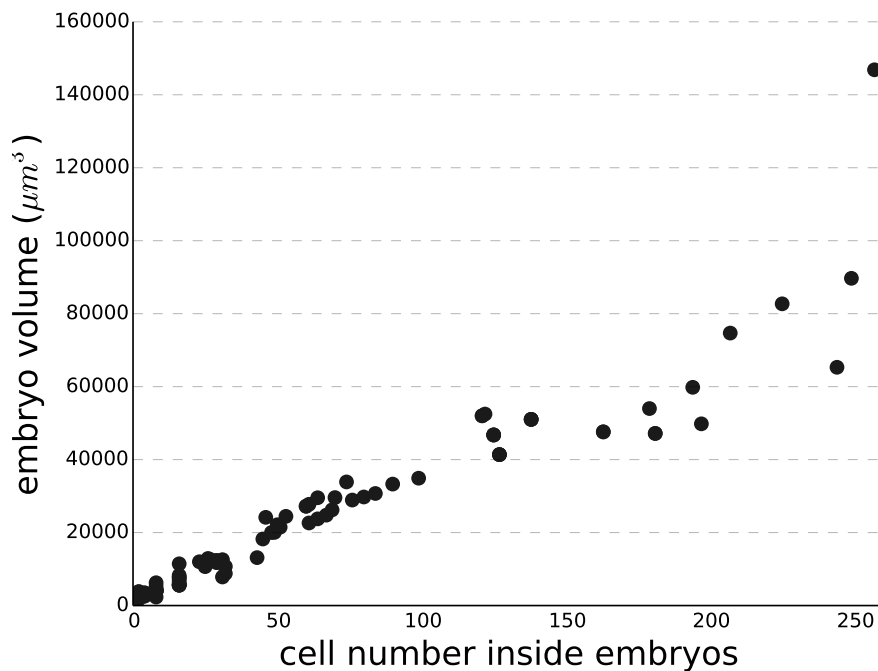


FIGURE 3.1 – Évolution du volume de l'embryon au cours du développement jusqu'à 257 cellules

Bien que les descriptions montrent une croissance volumique exponentielle de l'embryon jusqu'au stade 32 cellules [Yoshida et al., 2014], l'intégration des volumes embryonnaires de 2c à 257c montre une dynamique globale linéaire avec de plus en plus de variations (figure 3.1).

Bien qu'à certains moments du développement, plus d'occurrences seraient nécessaires pour affiner la dynamique (vers 150 cellules notamment), le volume embryonnaire croît linéairement au cours du développement. Il ne semble pas y avoir de rupture dans l'évolution du volume qui pourrait être annonciateur d'un changement dans les règles de croissance.

3.1.2 Forme globale de l'embryon (Sphéricité)

Lors des premiers stades embryonnaires, les embryons ont une forme quasi sphérique. La mesure de la sphéricité de l'embryon au cours du développement, nous permet d'avoir un aperçu de

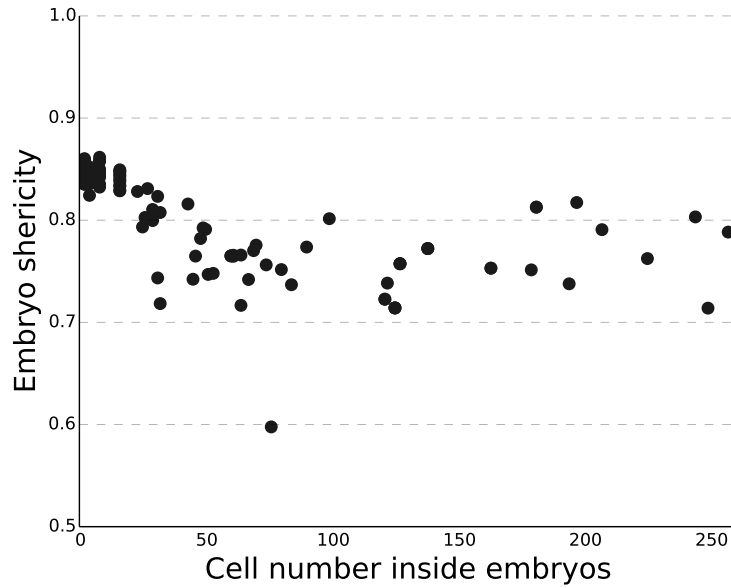


FIGURE 3.2 – Évolution de la sphéricité de l'embryon au cours du développement.

l'évolution de sa forme vers une forme cœur.

La sphéricité est une mesure qui permet d'appréhender l'éloignement à une forme sphérique. Plusieurs méthodes existent pour l'approximer [Bullard and Garboczi, 2013][Rodriguez et al., 2013], ici nous avons utilisé la formule classique suivante :

$$S(A, V) = \frac{\pi^{\frac{1}{3}}(6V)^{\frac{2}{3}}}{A} \quad [\text{Wadell, 1935}]$$

(ratio de la surface de la sphère de même volume sur l'aire de la forme). La mesure de l'aire a été réalisée sur une surface maillée de l'enveloppe externe de l'embryon.

On trouve une sphéricité importante au début du développement, puis elle décroît à partir du stade 16c jusqu'à environ le stade 50c où elle atteint un plateau et varie entre 0.7 et 0.85 après ce stade (figure 3.2).

Moukhtar et al. ont montré que la sphéricité est maximale chez le 2c puis qu'elle diminue jusqu'au 32 cellules. On retrouve ici ce comportement. Il y a, rapidement, une perte de la forme sphérique dès le stade 16c. Ensuite, l'embryon ressemble de moins en moins à une sphère, et, à partir de 50c, on observe une fluctuation de la mesure de la sphéricité, peu informative sur l'évolution de la forme. Ce premier descripteur de forme apporte une vue globale insuffisante ; il ne permet de préciser ni la localisation, ni l'origine mécanique des changements de forme, pour ces raisons d'autres descripteurs vont être utilisés.

3.1.3 Courbures de l'embryon

Courbures globales

Pour passer d'une forme quasi-sphérique à une forme en cœur, des variations de courbures vont apparaître à des positions particulières sur la surface de l'embryon. Pour suivre l'évolution de la forme, les courbures principales peuvent être estimées en chaque point de la surface de l'objet. Le produit des deux courbures principales, nous donnera la courbure Gaussienne tandis que le moyenne nous donnera la courbure moyenne au point étudié. Des cartes de courbures pour

chaque embryon peuvent alors être réalisées. En partant d'une « quasi » sphère, on peut émettre l'hypothèse d'une persistance de courbures telles que des courbures Gaussiennes positives au niveau de la partie supérieure des quatre octants apicaux pour donner les deux cotylédons ou encore l'apparition d'une courbure Gaussienne négative au centre de la surface apicale.

Ainsi, on se demandera : Quelles courbures émergent pour aboutir au cœur ? Quelle est la dynamique des ces courbures ? Avec quelles variations ? Dans quelles intensités ? À quels moments interviennent ces changements ?

La courbure d'un objet, défini par un ensemble de voxels labellisés, peut être évaluée directement à partir de l'image des labels, ou indirectement après une approximation de la surface de l'objet [Rusinkiewicz, 2004][Gatzke and Grimm, 2006]. On peut trouver des implémentations du calcul des courbures Gaussiennes et moyennes sur des maillages surfaciques au sein de nombreux logiciels comme MorphographX [Barbier de Reuille et al., 2015], Meshlab [Cignoni et al., 2008], MatlabTM ou encore AvizoTM.

Dans la plupart des outils, le calcul des courbures n'est pas modulable : il ne considère que la variation locale de la surface sur un voisinage du deuxième voire troisième ordre. On ne peut donc pas contrôler l'échelle spatiale à laquelle on souhaite faire l'estimation.

Avec une triangulation dense, seules les variations à petites échelles seront estimées. Avec ces méthodes, pour appréhender la forme globale de l'embryon, un sous échantillonnage des sommets du maillage est nécessaire. Or, ce sous-échantillonnage de la forme aboutit à une simplification, et donc une modification, de celle-ci, et ne permet pas de contrôler l'échelle spatiale à laquelle on veut estimer les courbures. Une méthode basée sur un petit voisinage [Kroon, 2014] a été modifiée pour introduire la possibilité d'ajuster le voisinage sur la base d'une distance Euclidienne et ainsi prendre en compte explicitement l'échelle spatiale.

Dans la fonction Matlab, utilisée pour estimer la courbure en chaque point d'un maillage, Dirk-Jan Kroon a utilisé la méthode d'ajustement d'une fonction quadratique sur des points de la surface voisins du point considéré et replacés dans un repère local.

Pour chaque point de la surface, un voisinage, d'ordre deux ou trois, est extrait. Un repère local est construit à partir du plan tangent de la surface en ce point.

Dans ce repère local, une surface polynomiale du second ordre d'équation $z = ax^2 + by^2 + cxy + dx + ey + f$ est ajustée aux points sélectionnés. On calcule alors la matrice Hessienne (matrice des dérivées partielles secondes) au point considéré, soit :

$$H(x, y) = \begin{pmatrix} 2 \times a & c \\ c & 2 \times b \end{pmatrix}$$

Les valeurs propres λ_1, λ_2 de cette matrice sont les courbures principales.

On définit :

$$\begin{aligned} \kappa_G &= \lambda_1 \times \lambda_2 \quad (\text{courbure de Gauss}) \\ \kappa_M &= \frac{\lambda_1 + \lambda_2}{2} \quad (\text{courbure moyenne}) \end{aligned}$$

Pour mesurer la courbure de la surface de l'embryon à une échelle choisie, R , en chaque point $\mathbf{x}_0 = (x_0, y_0, z_0)$ évalué, un parcours de la triangulation va être réalisé afin d'extraire un sous-ensemble de points $\mathbf{x}_i = (x_i, y_i, z_i)$, $i = 1, 2, \dots, n$ dans une boule de rayon R (figure 3.3 étape 2). Cette sélection comprend le point $\mathbf{x}_0$ et un sous-ensemble de points échantillonnés dans la boule avec une probabilité choisie. Ce dernier sous-échantillonnage permet de moduler les temps de calcul. Les points de la sélection serviront dans l'approximation de la surface. Ainsi la courbure

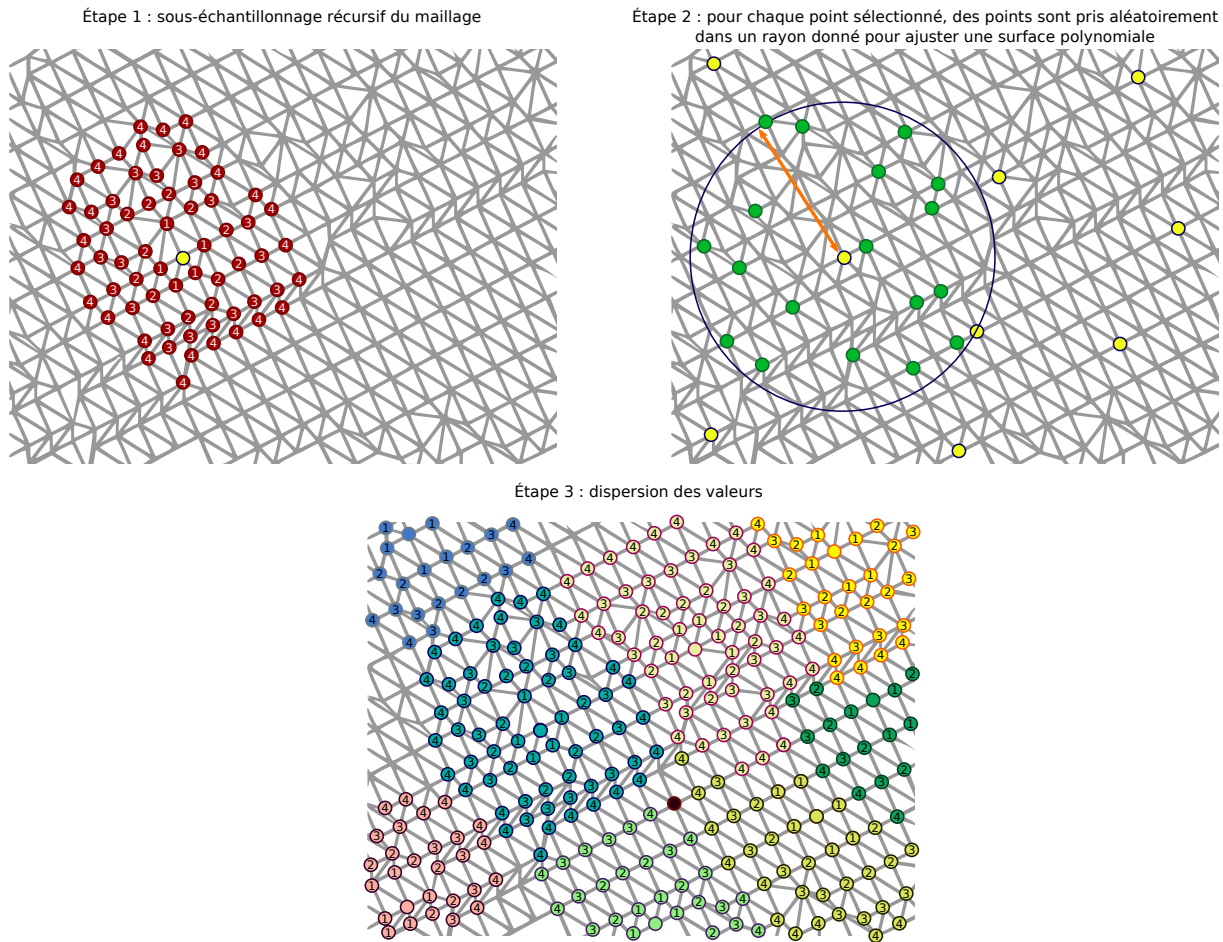


FIGURE 3.3 – Illustration de la méthode de gestion du maillage pour la mesure de la courbure à l'échelle de l'embryon avec le paramètre de voisinage à 4 (1) étape de sous échantillonnage, points sélectionné (en jaune), points dans un rayon de voisinage 4 qui seront enlevés pour le choix des autres points (en rouge), (2) points selectionnés (en vert) pour mesurer la courbure en un point (en jaune), (3) étape pour combler les valeurs non mesurées sur le maillage avec les valeurs mesurées au niveau des points jaunes en (2) et pour un voisinage d'ordre 4

peut être estimée à une plus grande échelle.

Sur l'ensemble de la surface de l'objet, la courbure a été estimée sur un sous-ensemble de points plus ou moins dense, selon la demande de l'utilisateur. Ainsi, pour un maillage dense, le temps de calcul peut être diminué mais, comme précédemment, un sous-échantillonnage trop important peut aboutir à une mauvaise approximation de la surface pour mesurer la courbure et à une mauvaise caractérisation de la forme étudiée. Le choix de la densité passe par un paramètre de voisinage (ci-après dénommé p). Un premier point est tiré aléatoirement parmi tous les points de la surface (figure 3.3 étape 1). Puis les points dans le voisinage d'ordre p sont retirés de la liste des points où la courbure doit être estimée. De manière récursive, ces étapes sont répétées jusqu'à ce que tous les sommets du maillage soient ou sélectionnés, ou trop proche pour être choisis. La courbure est interpolée à partir de cet échantillon de sommets du maillage (figure 3.3 étape 3).

Pour résumer, l'algorithme proposé est le suivant (figure 3.3) :

1) Sélection de points sur la surface où calculer les courbures (step 1 dans 3.3). Itérativement

chaque point va être tiré au sort dans l'ensemble des points restants du maillage moins son p-ième voisinage (voisinage d'ordre 4 sur la figure).

2) Pour chaque point sélectionné, on effectue un parcours récursif des voisins dans un rayon défini par l'utilisateur. Ce rayon est l'étendue sur laquelle sera estimée la courbure. Les courbures principales sont ensuite calculées sur la base des paramètres de la surface théorique (utilisation des fonctions développées par Dirk-Jan Kroon [Kroon, 2014]).

3) Pour visualiser les courbures sur la surface, les valeurs de courbures vont être étendues à l'ensemble des p-voisins où la mesure n'a pas été réalisée.

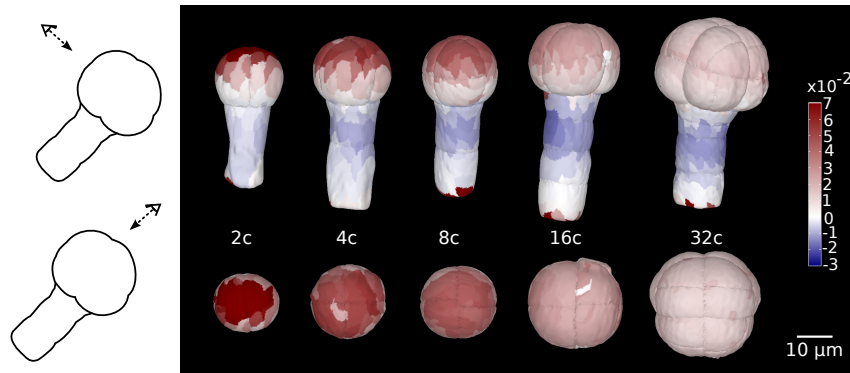


FIGURE 3.4 – Courbures Gaussiennes mesurées sur une distance de $20 \mu\text{m}$

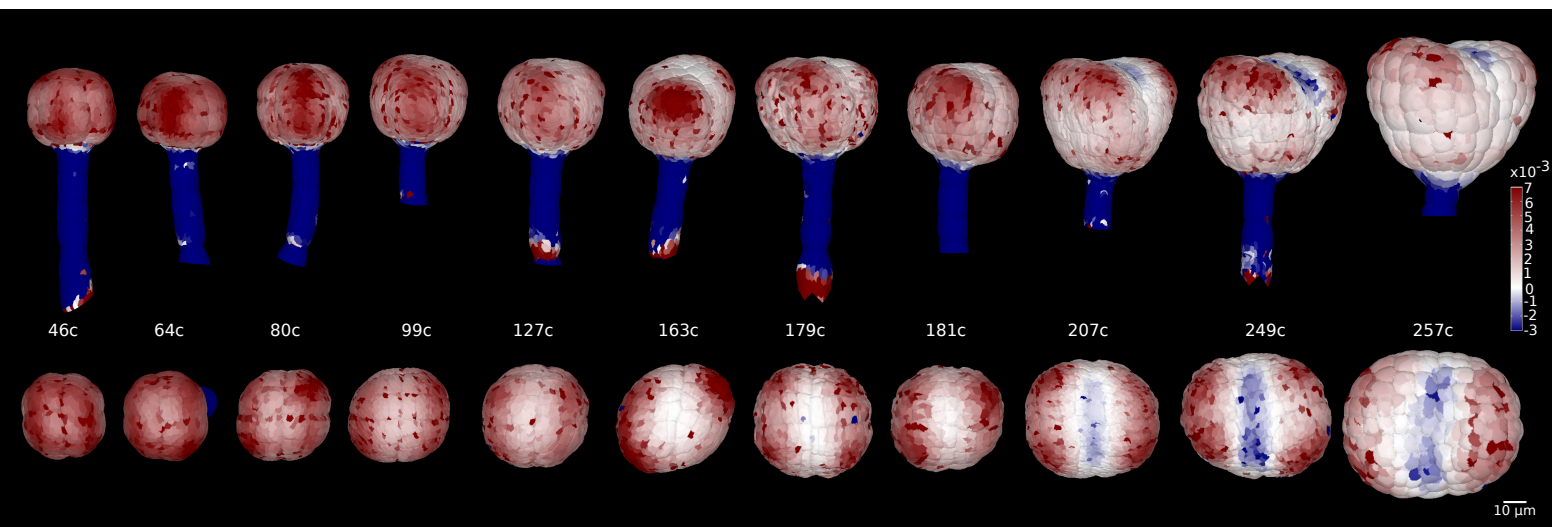


FIGURE 3.5 – Courbures Gaussiennes mesurées sur une distance de rayon $20 \mu\text{m}$

Sur une gamme de 16 embryons répartis au cours du développement (figures 3.4 et 3.5), on mesure la courbure Gaussienne sur une distance de $20 \mu\text{m}$ pour détecter l'émergence de courbures variables à l'échelle des organes. Au début du développement, on observe de fortes courbures Gaussiennes positives au niveau de l'embryon, des fortes courbures Gaussiennes négatives au niveau du suspenseur et des courbures intermédiaires au niveau de la jointure entre hypophyse et embryon. Sur le stade 2 cellules, un pôle de courbures Gaussiennes positives sur le haut de l'embryon montre que, sur un diamètre de $40 \mu\text{m}$, l'embryon est courbé dans le même sens dans toutes les directions de l'espace. En descendant le long de l'axe apico-basal, les courbures se rapprochent de zéro (courbure nulle dans au moins une des directions de l'espace) puisque l'on se rapproche du suspenseur qui crée une courbure moins importante le long de l'axe apico-basal.

À la jonction avec le suspenseur, les courbures Gaussiennes passent à zéro puis au niveau du suspenseur la courbure devient négative puisque, dans une direction (le long de l'axe apico-basal), on reste relativement droit, et dans l'autre direction (transversalement au suspenseur), c'est très courbé, on a donc des points selles venant de ces courbures inversées. On retrouve ce pattern de courbure tout au long du développement précoce mais avec une diminution de l'intensité de la courbure au niveau apical, l'embryon au niveau apical, sur un diamètre de 40 μm , est moins courbé, ce peut être dans une direction ou dans les deux et on ne peut le savoir qu'en regardant d'autres descripteurs. En considérant le volume embryonnaire, on sait qu'il y a une croissance de l'embryon et, que si elle est homogène radialement, alors il y aura une courbure plus faible. Entre le stade 2c et les stades après 32c, la variation des valeurs des courbures Gaussiennes est plus forte d'un facteur 10, elle est également assez homogène au niveau de l'embryon. Après 32c on commence à voir des variations avec des arcs le long de l'axe apico-basal de courbures Gaussiennes plus importantes. Ces arcs se situent au niveau des quartiers descendants du stade 4c. Il y a donc 4 quartiers. Entre les quartiers, les courbures sont plus faibles ce qui indique un certain aplatissement. À partir de 99c, on voit assez sûrement qu'on n'a plus que 2 pôles au niveau apical : pour un axe, la jonction entre deux des quatre pôles, on voit sa courbure plus faible qu'au niveau de la jonction dans l'axe perpendiculaire, où la courbure reste dans la continuité avec celles trouvée au sommet des quartiers. Certains quartiers sont très asynchrones dans leur développement (ex : le 163c sur la figure 3.5). La courbure négative, formée par la croissance des deux cotylédons, apparaît entre 181c et 207c où elle est déjà bien installée. Pour une meilleure précision du stade de l'apparition de cette incursion, il faudrait analyser davantage d'embryons. Dans la partie basale de l'embryon, une légère trace des arcs, séparant les quatre quartiers, perdure, et on peut voir que les faces de l'embryon, parallèles à l'axe formé par les cotylédons, sont plus aplaties que perpendiculairement (très visible sur le 181c de la figure 3.5).

Avec les courbures, on peut voir que les cotylédons, qui caractérisent la forme de cœur, ont déjà émergés avant 100 cellules dans l'embryon. D'autre part, pour arriver à cette forme, on passe bien par un embryon plat avec une courbure Gaussienne nulle, au centre, dans un rayon de 20 μm . La courbure négative est nettement installée après 207 cellules.

La visualisation de la courbure sur l'ensemble de l'embryon, nous permet de voir à quel moment la symétrie radiale est perdue. Mais regarder à l'échelle embryonnaire ne permet pas d'avoir une bonne évaluation de l'évolution des courbures et de faire des comparaisons faciles entre des changements de courbures.

Courbures locales

Pour avoir une vision plus précise de l'évolution des courbures, des points d'intérêt (POI), où des événements de changement de forme se produisent, peuvent être isolés afin de tracer l'évolution de la courbure locale en fonction de l'âge de l'embryon sur lequel a été prélevée la valeur. Ainsi, dix points ont été sélectionnés pour leur position remarquable (figure 3.6) et leur facilité d'identification :

- (A) L'intersection des surfaces externes des quatre quartiers (de la sphère), au niveau apical. En ce point, une courbure Gaussienne négative devrait s'installer.
- (ABXX) Les intersections entre le plancher séparant les parties apicales et basales, du passage de quatre à huit cellules ($G = 3$), les surfaces longitudinales internes des quatre quartiers et la surface externe de l'embryon. En ces quatre points, les courbures Gaussiennes pourraient devenir négatives si la croissance radiale des parties apicales et des parties basales diffère.
- (BXX) Les intersections des surfaces longitudinales internes des quatre quartiers avec, la surface externe de l'embryon et le plancher de la partie basale de l'embryon. En ces quatre points, les courbures Gaussiennes devraient être négatives.
- (B) L'intersection des quatre quartiers au niveau du centre de l'hypophyse. Le point obtenu

pourrait nous informer sur l'impact de la croissance de l'hypophyse sur les tissus internes de l'embryon.

L'identification automatique de ces points d'intérêt est possible grâce aux arbres de filiation. Mais toutefois, une ambiguïté gauche-droite demeure sur l'identité des deux cellules issues de la première division de l'embryon. Les points ABXX et BXX sont donc définis à une symétrie près, les deux points au niveau de la première surface de division seront notés AB1X (AB11 et AB12) et B1X (B11 et B12) et ceux construits sur la deuxième et troisième divisions seront notés AB2X (AB21 et AB22) et B2X (B21 et B22).

Pour comparer les courbures entre les embryons et ainsi obtenir une dynamique, les courbures ont été calculées à certains points remarquables du maillage (figure 3.6) avec un même rayon. Pour identifier de manière automatique les points, on utilise à la fois les arbres de filiation, le

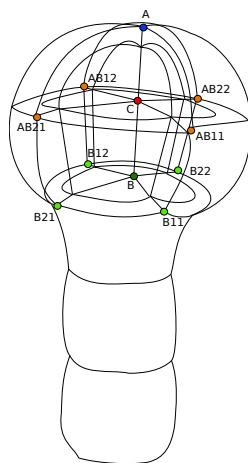


FIGURE 3.6 – Positions des POIs sur un embryon de 16 cellules

repère de l'embryon, pour orienter les embryons selon leur axe apico-basal, mais également des mesures que l'on peut faire sur le maillage. Le maillage créé par AvizoTM isole chaque interface entre deux labels, ce qui nous a permis de retrouver facilement les côtés des différentes cellules ainsi que leur position au sein de l'embryon (contact entre cellules).

Les courbures ont été mesurées sur plusieurs distances autour de chaque POI, afin de comparer les comportements à différentes échelles.

POI A :

Avec un rayon de $8\mu\text{m}$, on observe au sommet de l'embryon une courbure Gaussienne positive importante dans les premiers stades, synonyme de deux courbures principales convexes qui reflètent la forme de sphère (figure 3.7 a). Par la suite, la courbure Gaussienne décroît très rapidement vers zéro jusqu'à 32c, jusqu'à passer dans des valeurs négatives entre 128c et 256c. La courbure Gaussienne négative est synonyme de concavité de la surface à cette échelle, et reflète l'apparition des cotylédons. Les embryons de 64c à 128c présentent une partie apicale plate sur un rayon de $8\mu\text{m}$. La courbure moyenne montre également l'inversion de la courbure, avec une courbure moyenne qui devient négative vers 64c pour un rayon de $8\mu\text{m}$ (figure 3.7 b).

Avec un rayon de $15\mu\text{m}$, on observe une courbure Gaussienne positive qui est plus importante que dans un rayon de $8\mu\text{m}$, et qui décroît plus faiblement jusqu'à 128c (figure 3.7 c). L'embryon est convexe au niveau apical au début du développement, et le reste jusqu'à 128C, si on regarde un rayon de $15\mu\text{m}$ autour du sommet. Comme précédemment, il y a un passage à une courbure Gaussienne négative entre 128c et 256c qui reflète l'apparition des cotylédons. La courbure

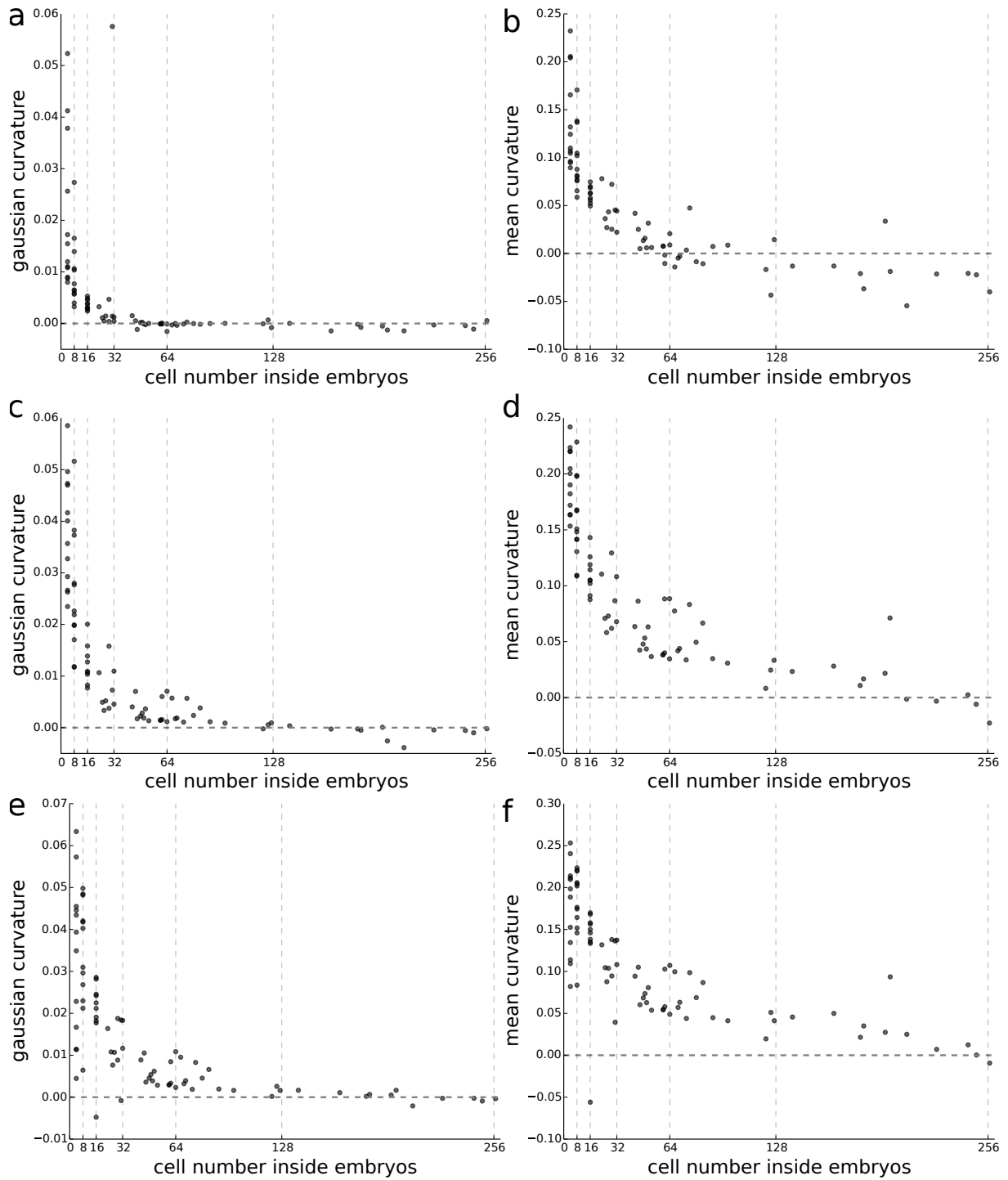


FIGURE 3.7 – Courbures Gaussiennes (à gauche) et moyennes (à droite) mesurées sur une distance de $8\mu\text{m}$ (a,b), $15\mu\text{m}$ (c,d) et $22\mu\text{m}$ (e,f) autour du POI apical A.

moyenne s'inverse vers 200c, donc de manière tardive, par rapport aux observations dans un rayon de $8\mu\text{m}$ et par rapport à la courbure Gaussienne dans un rayon de $15\mu\text{m}$ (figure 3.7 d). Ce décalage, entre la courbure Gaussienne et la courbure moyenne, laisse à penser qu'une des courbures reste fortement positive entre 128c et 200c tandis que l'autre est légèrement négative et reflète une asymétrie de croissance selon les deux axes principaux.

Avec un rayon de $22\mu\text{m}$, on observe une courbure Gaussienne de même amplitude qu'avec un rayon de $15\mu\text{m}$ mais qui décroît plus lentement jusqu'à zéro et passe dans le négatif, bien après le stade 128c, vers 200c (figure 3.7 e). La courbure moyenne décroît et quelques valeurs négatives arriveront vers la fin du développement (figure 3.7 f) tandis que la courbure Gaussienne passe dans le négatif plus tôt dans le développement.

Les différences observées, entre ces différentes échelles, montrent des effets de la croissance à l'échelle embryonnaire : des effets sont d'abord visibles à petite échelle et plus tardivement à grande échelle. L'apparition du sillon, entre les deux futurs cotylédons, est visible à toutes les échelles. Un petit rayon de courbure accentue le passage par le stade transition entre la forme sphérique et la forme de cœur. Tandis qu'un grand rayon souligne l'asymétrie de croissance qui se développe dans la partie apicale par rapport à deux axes.

POI ABXX :

Pour évaluer les effets de courbure au niveau de la jonction entre la partie apicale et la partie basale, quatre points sont utilisés : deux issus de l'intersection avec le premier plan de division et deux provenant de l'intersection avec les deux divisions qui donnent la génération suivante (figure 3.6). L'axe droite-gauche ne pouvant être suivi entre les embryons, deux ensembles de points (AB1X et AB2X) ont été utilisés pour mesurer la courbure. Cette mesure a permis d'analyser les différences au niveau radial dans la forme. Pour mieux distinguer des tendances et des différences entre ces deux ensembles, des polynômes de degré 3 ont été ajustés aux nuages de points. Trois rayons ont été utilisés pour mesurer la courbure à ces points. Avec un rayon de $8\mu\text{m}$, on observe au début du développement une courbure Gaussienne positive qui reflète la sphéricité de l'embryon (figure 3.8 a). La courbure Gaussienne décroît jusqu'à 64c jusqu'à parfois passer dans le négatif. Les sillons créés dans un faible rayon, et visibles ponctuellement, peuvent être la trace des parois qui, en contraignant la surface de la cellule, génèrent des dépressions dans la surface extérieure de l'embryon. Par la suite, les courbures Gaussiennes fluctuent autour de zéro entre 64c à 256c sans ordre apparent, ni par rapport à la position sur l'embryon, ni entre les stades.

Avec un rayon de $15\mu\text{m}$, on observe une forte courbure Gaussienne positive au début du développement qui décroît jusqu'à 128c (figure 3.8 c). Entre 128 et 256c, les courbures sont proches de zéro mais restent positives : l'embryon reste bombé. D'autre part, on remarque que selon la position (AB1X ou AB2X) sur la surface de l'embryon, l'intensité de la courbure n'est pas la même (figure 3.8 c et d). Au niveau des points venant de l'intersection avec la première interface (AB1X), la courbure est plus importante, ce qui montre la création d'une asymétrie radiale, dans la forme de l'embryon, en lien avec les premières divisions cellulaires du développement.

Avec un rayon de $22\mu\text{m}$, on observe une courbure Gaussienne positive au début du développement qui décroît jusqu'à 256c (figure 3.8 e). Entre 128 et 256c, les courbures sont à nouveau ordonnées en fonction de la position sur la surface de l'embryon (figure 3.8 e et f). L'intensité de la courbure est plus importante au niveau des points venant de l'intersection avec la première interface (AB1X), qu'au niveau de ceux venant de l'intersection avec les divisions suivantes, signe, à nouveau, d'une asymétrie de forme au niveau radial.

Les différentes mesures, nous ont montré des détails de niveaux variables dans la courbure de l'embryon. Avec un faible rayon, on révèle des courbures au niveau cellulaire, tandis que, pour des rayons plus grands, on voit la courbure de la forme, ce qui nous permet même de voir des différences en fonction de la position radiale de la mesure.

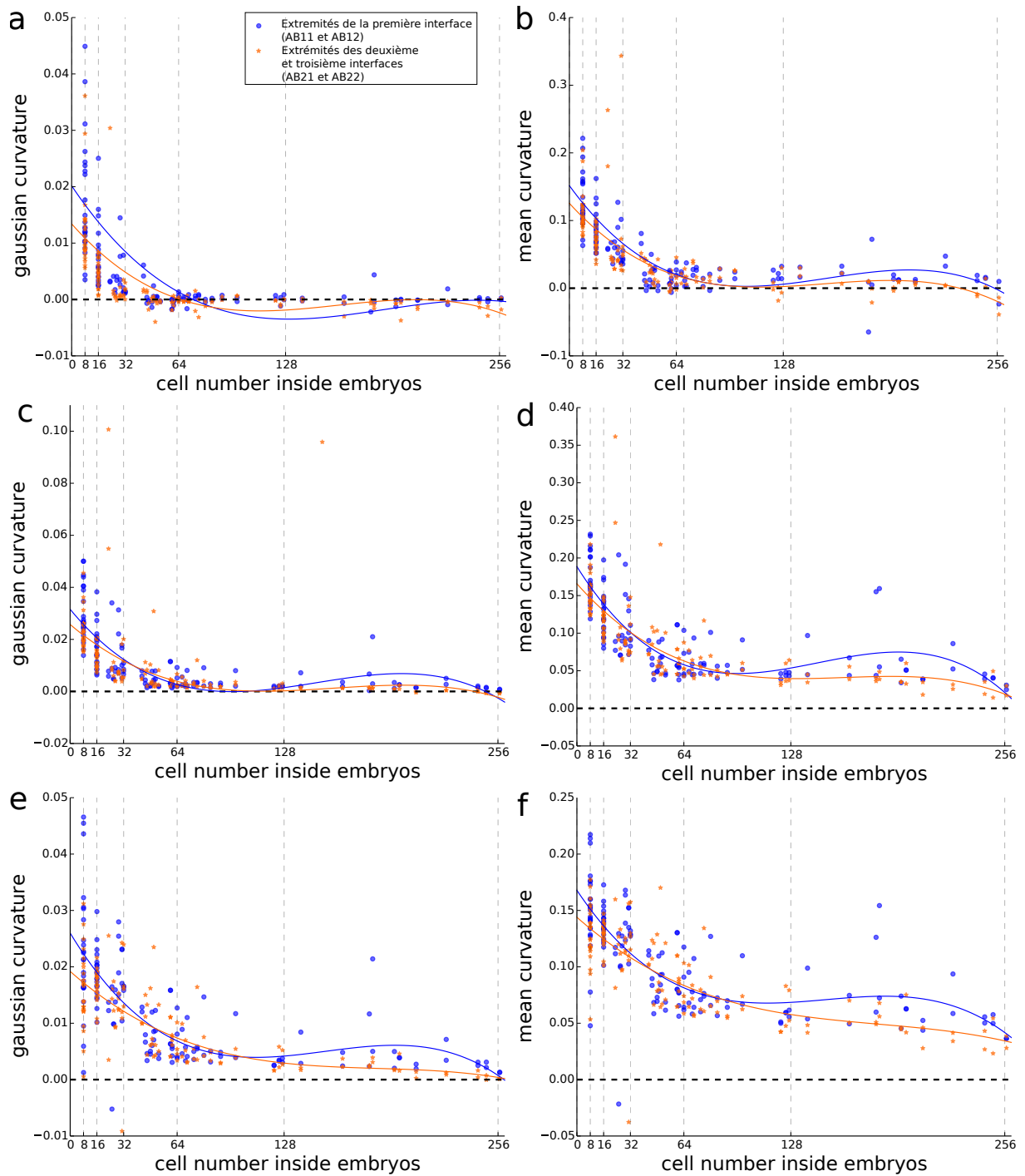


FIGURE 3.8 – Courbures Gaussiennes (à gauche) et moyennes (à droite) mesurées sur une distance de $8\mu\text{m}$ (a,b), $15\mu\text{m}$ (c,d) et $22\mu\text{m}$ (e,f) autour des POI à l'interface apical-basale : AB11 et AB12 (en bleu) et AB21 et AB22 (en orange). Un polynôme de degré 3 a été ajusté sur les deux ensembles de points.

POI BXX :

La jonction entre la partie basale et les tissus issus de l'hypophyse devrait présenter des courbures singulières. Pour cela deux ensembles de points ont été positionnés sur la surface de l'embryon : un au niveau des intersections avec le premier plan de division et l'autre aux intersections avec les deux divisions donnant la génération suivante (figure 3.6). Les questions d'une évolution de ces courbures au cours du développement et de la symétrie de l'embryon à ce niveau, entre les deux ensembles, se posent. Avec un rayon de $8\mu\text{m}$, on observe au début du développement une forte courbure Gaussienne négative (figure 3.9 a) tandis que la courbure moyenne est positive (figure 3.9 b), qui montre un point selle à ce niveau, avec une orientation principale très fortement courbée dans un sens, tandis que, l'autre orientation est légèrement courbée dans l'autre sens. Ces caractéristiques sont expliquées par la forme de tube du suspenseur. Par la suite la courbure moyenne et la courbure Gaussienne se rapprochent de zéro jusqu'au stade 64c (figure 3.9 a et b), la courbure devient de plus en plus faible à cette échelle. Entre 64c et 256c, les courbures ne montrent pas de tendance particulière avec des valeurs qui restent relativement proche de zéros (voir figure 3.9 a et b). Avec un rayon de $15\mu\text{m}$, la courbure Gaussienne montre peu de tendance, tout au long du développement (figure 3.9 c), mais en moyenne les courbures sont positives (figure 3.9 d), on a donc au moins une courbure principale positive importante. Avec un rayon de $22\mu\text{m}$, on observe au début du développement majoritairement des courbures Gaussiennes négatives jusqu'à 32c, puis elles deviennent rapidement majoritairement positives et le restent jusqu'à 256c (figure 3.9e). À $15\mu\text{m}$ et $22\mu\text{m}$, le suspenseur est mal détecté car trop petit au début du développement, la méthode n'est donc plus adaptée.

Haut de l'hypophyse (POI B) :

Pour connaître la courbure que crée l'hypophyse en interagissant avec l'embryon, un POI sur la surface de l'hypophyse a été placé. Pour mesurer la courbure, un rayon assez grand pour capter des changements de courbure mais pas trop pour qu'il soit défini dans les plus jeunes embryons, a été utilisé. Les courbures Gaussiennes mesurées au début du développement sont très faibles mais positives (figure 3.10 b). Les deux courbures principales sont donc dans le même sens et plutôt positives comme le montre la courbure moyenne (figure 3.10 d). Par la suite la courbure Gaussienne augmente jusqu'à 32c puis diminue jusqu'à 256c. L'hypophyse dans un rayon de $15\mu\text{m}$ devient de plus en plus courbe au début puis dans ce même rayon la courbure diminue, donc l'hypophyse augmente sa surface perpendiculairement à l'axe apico-basal.

Avec les courbures, on peut voir que les cotylédons, qui caractérisent la forme de cœur, ont déjà émergé avant 100 cellules dans l'embryon. D'autre part, pour arriver à cette forme, on passe bien par un embryon plat avec une courbure Gaussienne nulle, au centre, dans un rayon de $20\mu\text{m}$. La courbure négative est nettement installée après 207 cellules.

Conclusion

La visualisation des courbures permet de majorer le moment où il y a une rupture de symétrie et de minorer celui où le stade cœur est installé. La symétrie bilatérale est clairement installée à 100c, et le sillon concave entre les deux cotylédons apparaît après 128c, et avant 200c. La forme triangulaire est atteinte entre 64c avant 128c puis la forme de cœur apparaît entre 128c et 200c. Avec les quantifications, des informations, que l'on manquerait à l'œil nu, sont distinguables et apporte de nouvelles précisions.

3.1.4 Ce qu'on peut retenir à l'échelle de l'embryon

À l'échelle globale de l'embryon, les mesures nous montrent un processus continu de changement de forme avec des stades où certaines caractéristiques du stade cœur sont bien installées : dès 90c, on a le sillon central entre les deux cotylédons, dès 100 cellules on voit également l'asymétrie de croissance bilatérale. On peut voir un décalage temporel entre les différents descripteurs,

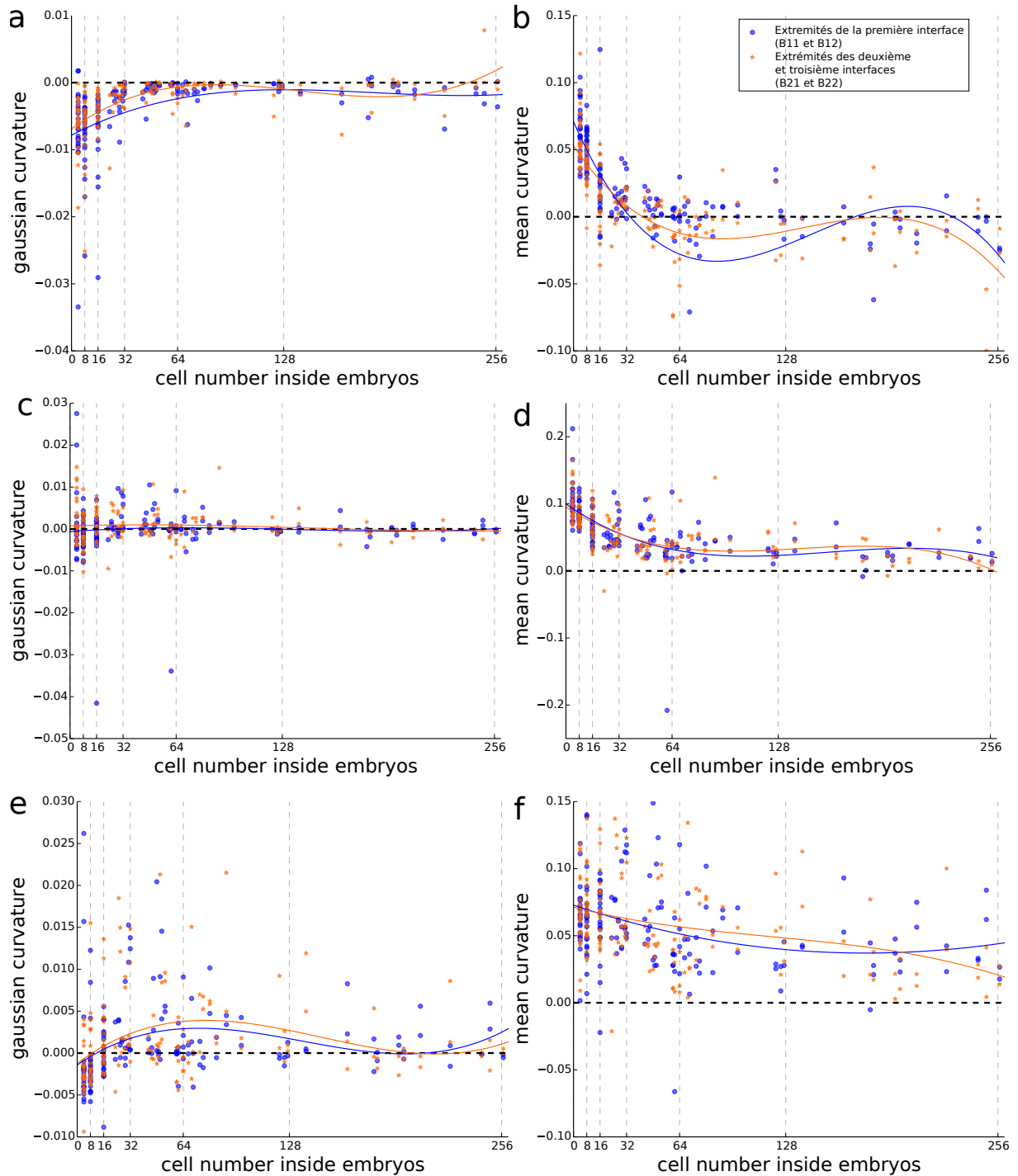


FIGURE 3.9 – Courbures Gaussienne (à gauche) et moyenne (à droite) mesurées sur une distance de 8 μm (a,b), 15 μm (c,d) et 22 μm (e,f) autour des POI à l'interface entre la partie basale de l'embryon et l'hypophyse : B11 et B12 (en bleu) et B21 et B22 (en orange). Un polynôme de degré 3 a été ajusté sur les deux ensembles de points.

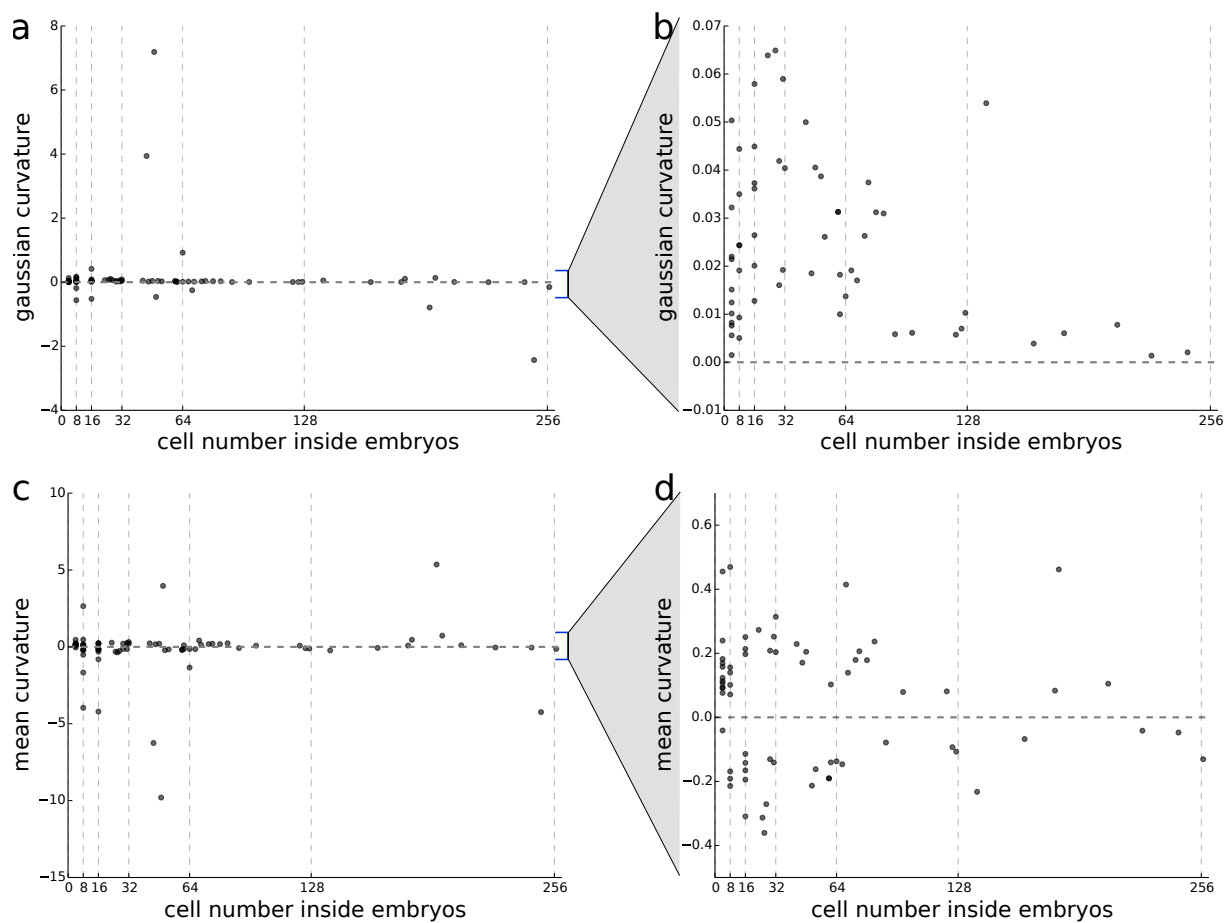


FIGURE 3.10 – Courbures Gaussiennes (a,b) et moyennes (c,d) mesurées sur une distance de $15\mu\text{m}$ autour du POI B (hypophyse).

les ruptures n'ont pas le même timing. Regarder l'embryon avec plusieurs échelles et plusieurs descripteurs a permis de découpler et de voir différentes transitions. Pour plus de précisions dans les transitions de forme, d'avantage d'embryons auraient été nécessaires, particulièrement entre 80 et 200 cellules. Pour savoir quels mécanismes cellulaires prédominent (division, croissance), des échelles plus précises vont être regardées.

3.2 Échelle sous-embryonnaire : les domaines AE, AI, BE, BI

Dans un embryon au stade cœur, on voit clairement que les différentes régions, descendantes de chaque cellule du stade 16 cellules, n'ont pas donné la même part à l'embryon en terme de forme le long de l'axe apico-basal et radialement. Pour quantifier ces différences, les sous-arbres de ces domaines vont être isolés et regroupés par destinées cellulaires pour être analysés. Ainsi, la couche protodermique sera composée de deux domaines : le domaine apical (AE) et le domaine basal (BE). Cette division permettra de savoir si l'épiderme se comporte de la même façon quelque soit la position dans l'embryon, ou s'il y a une sous-régionalisation. La partie interne de l'embryon sera également divisée en deux parties selon l'axe apico-basal : le domaine apical interne (AI) et le domaine basal interne (BI). Ces deux domaines permettront de voir si les futurs tissus vasculaires (BI) émergent avec un comportement différent des futurs tissus internes des cotylédons (AI).

3.2.1 Division

Les études cellulaires, sur les premiers stades du développement, ont montré que la division péricle qui est mise en place dans tous les octants de l'embryon 8c, le fait passer à 16 cellules et qui permet de former une première couche cellulaire, est une division asymétrique au niveau volumique [Yoshida et al., 2014][Moukhtar et al., 2016]. La partie protodermique, dans l'embryon 16 cellules, est deux fois plus volumineuse que la partie interne. Comment ces sous-domaines évoluent-ils en matière de taux de divisions cellulaires ?

Pour suivre ces domaines, chaque embryon a été « rembobiné » (replacer à un état révolu du développement) jusqu'à la quatrième génération cellulaire (stade 16c), en utilisant le lignage cellulaire. On obtient alors l'équivalent des cellules mères de chaque domaine, déformée par la croissance cellulaire et les divisions. Les volumes cellulaires seront calculés à partir des images labellisées. Et le taux de division sera inféré à partir du nombre de cellule dans chaque domaine.

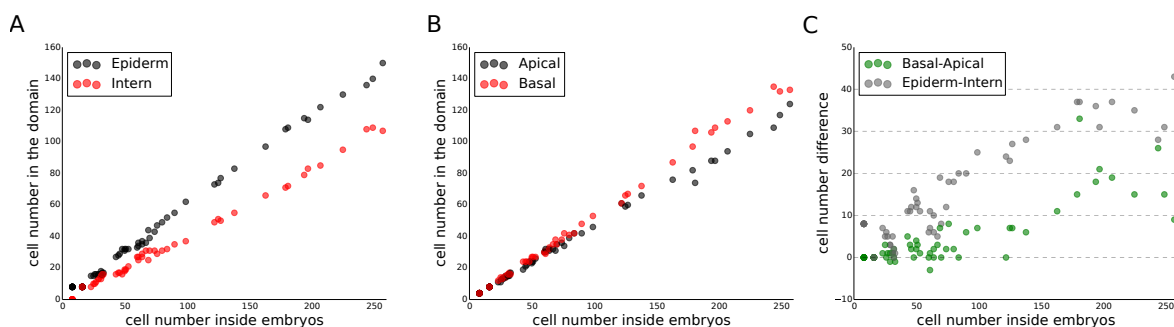


FIGURE 3.11 – Nombre de cellules dans les différents domaines de l'embryon. (A) domaine protodermique et intra-embryonnaire. (B) Domaine apical et domaine basale de l'embryon. (C) Différence du nombre de cellules entre les domaines.

Divisions cellulaires dans les tissus (protoderme vs tissus internes)

On observe un décalage du nombre de cellules présentes entre le futur domaine épidermique et la partie interne de l'embryon au cours du développement (figure 3.11 A) : le futur domaine épidermique a toujours plus de cellules que les parties internes de l'embryon. Parfois les effectifs se rapprochent, comme vers 32c et 64c où le nombre de cellules de l'épiderme est rattrapé par le nombre de cellules internes, mais ce rapprochement est de plus en plus faible lorsque l'on avance dans le développement (figure 3.11 C). Dès le stade 16c, les arbres de filiation montrent qu'il y a un décalage générationnel entre le protoderme et les tissus internes : le protoderme se divise toujours en premier. Plusieurs observations ont laissé penser que le déclenchement de la division d'une cellule est reliée à son volume [Jenik et al., 2005]. L'asymétrie volumique de rapport 2 entre la cellule protodermique et la cellule interne induirait un décalage des timings de division qui expliquerait le nombre de cellules observé dans ces deux domaines. Le décalage absolu est de plus en plus grand (figure 3.11 C), mais est-ce que le décalage relatif, c'est-à-dire en terme de génération, est changeant ? L'observation des profondeurs des arbres de filiation montre que les arbres sont relativement équilibrés, avec des différences générationnelles, généralement inférieures à deux générations, entre les sous-arbres. Si le décalage relatif générationnel était conservé et ne se creusait pas plus, on observerait :

- Lorsqu'il y a 16 cellules (une génération de plus) dans l'épiderme, il y en a que 8 dans les parties internes. Donc dans la totalité de l'embryon, on a 24 cellules et il y a 8 cellules de différence entre le tissu protodermique et les tissus internes. Effectivement au début du développement, on ne dépasse pas une différence de 8 cellules entre les deux tissus (figure 3.11 C). On observe même que la différence reste à moins de 8 jusqu'à presque 50 cellules dans l'embryon. Le décalage d'une génération ne serait donc pas total : on n'a jamais réellement toutes les cellules du protoderme avec une génération de plus que dans les tissus internes.
- Avec une génération cellulaire de plus et un décalage d'une génération entière, pour 32 cellules dans le protoderme, on aurait 16 cellules à l'intérieur et donc 48 cellules au total. On observe que pour presque 50 cellules, on a moins de 16 cellules de différence entre les deux tissus, mais après 50 cellules et jusqu'à presque 100 cellules, on a effectivement des embryons qui sont dans cette gamme de différence (figure 3.11 C).
- À la génération suivante avec le décalage générationnel, on aurait 64 cellules dans le protoderme, 32 dans les tissus internes et 96 cellules en tout dans l'embryon. Cette différence de 32 cellules entre les deux tissus n'est pas atteint avant 200 cellules (figure 3.11 C).
- À la génération suivante avec le décalage générationnel, on aurait 128 cellules dans le protoderme, 64 dans les tissus internes et 192 cellules en tout dans l'embryon. Or vers 200 cellules, on a dépassé la trentaine de cellules de différence mais jusqu'à 260 cellules on est loin de 64 cellules de différence (figure 3.11 C).

Le décalage générationnel entre le protoderme et les tissus internes est donc bien présent tout au long du développement mais il n'est jamais total et par la suite il a tendance à être légèrement plus faible mais il n'est pas rattrapé.

Divisions cellulaires dans la partie apicale versus dans la partie basale

Les parties apicales et basales de l'embryon sont toutes les deux composées de l'épiderme et de tissus internes de manière équivalente. Au début du développement, on trouve autant de cellules apicales que basales (figure 3.11 B) comme attendu. En dessous du stade 64c, une différence s'installe entre la partie apicale et la partie basale mais avec toujours plus de cellules dans la partie basale (figure 3.11 C). Cette asymétrie perdure jusqu'à 128c, puis elle semble s'intensifier en passant au-dessus de la barre des 10 cellules de différence entre la partie apicale et la partie basale.

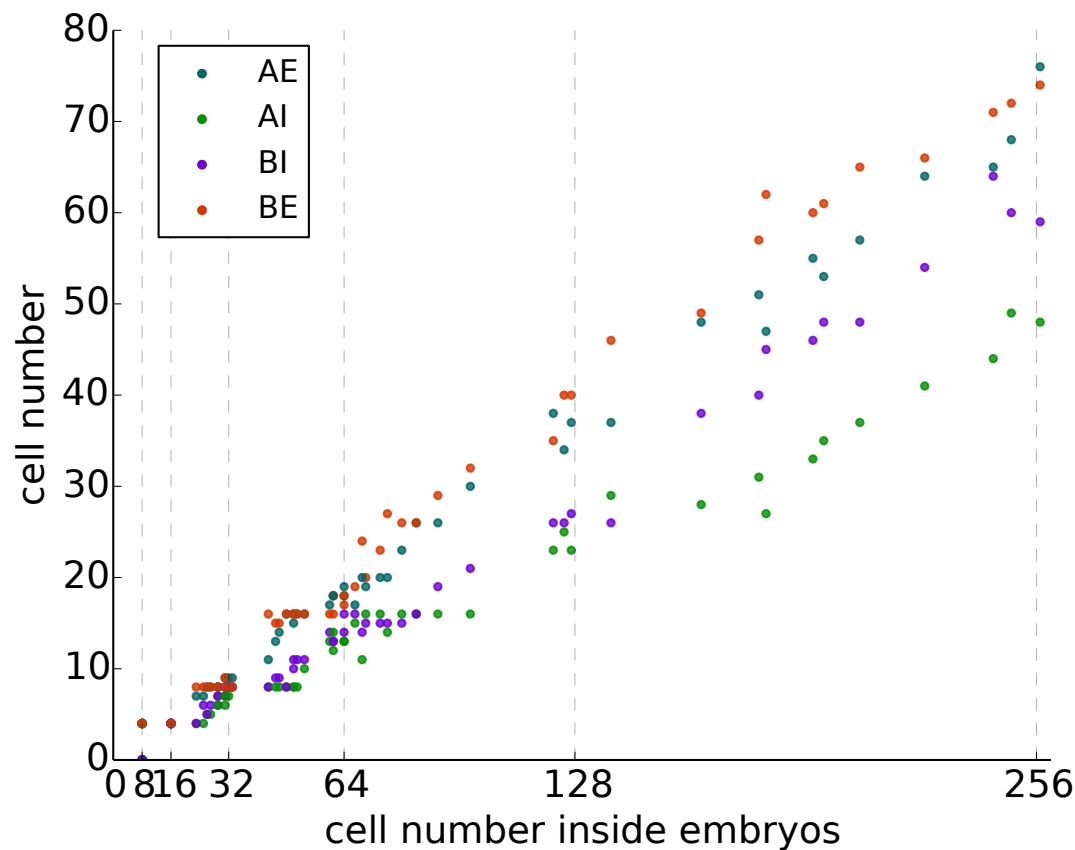


FIGURE 3.12 – Nombre de cellules dans les différents domaines de l'embryon.

Conclusion

Les filiations montrent que les divisions semblent s'effectuer d'abord dans les parties protodermiques, comme montré par des suivis d'embryons sur les premières générations cellulaires [Gooh et al., 2015]. Un décalage générationnel est présent et ne se creuse pas entre les parties épidermiques et les parties internes, ainsi le taux de divisions pour une cellule est constant, mais l'évolution du nombre de cellules, dans chaque domaine, n'est pas la même. La partie BE est la partie qui a le plus de cellules et a le taux d'augmentation de cellules le plus important. Tandis que la partie AI est celle qui en a le moins avec un taux d'évolution qui a l'air légèrement plus faible (figure 3.12). La partie BI voit son nombre de cellules augmenter plus fortement que la partie AI, sans dépasser celle présente dans la partie AE.

3.2.2 Croissance

Volumes

Les étapes de divisions stéréotypées montrent des asymétries volumiques. Or les cellules filles de ces étapes sont précurseurs de types cellulaires différents que l'on a regroupés en domaines. On peut alors se demander comment le volume de ces domaines évolue-t-il ?

Volume des parties apicale et basale

Les divisions du stade 4c au stade 8c mettent en place la délimitation entre la partie apicale et la partie basale de l'embryon. Dans chaque quartier, cette division est légèrement asymétrique avec

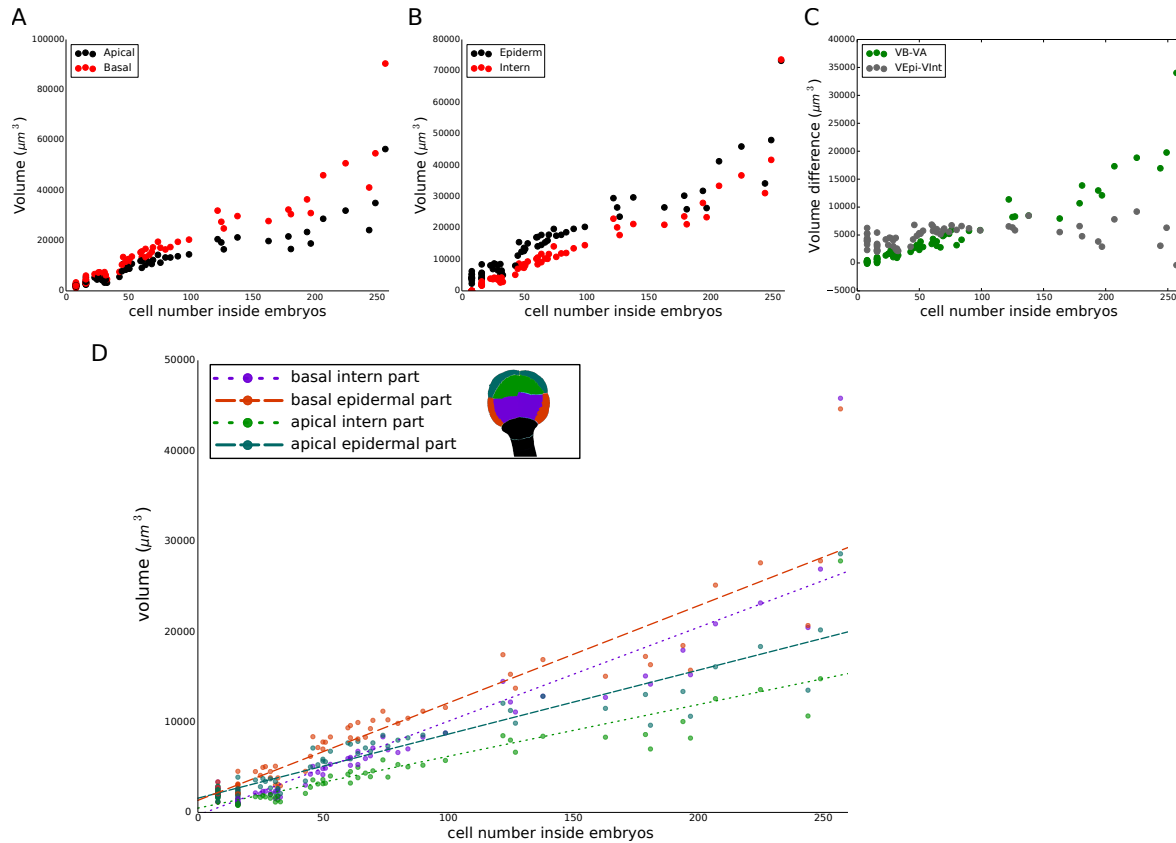


FIGURE 3.13 – Volumes mesurés des différents domaines de l'embryon. (A) Volume des parties apicale et basale. (B) Volumes des parties épidermique et intra-embryonnaire. (C) Différence de volume entre les domaines. (D) volumes des domaines AI, AE, BI et BE, avec les droites correspondantes.

un volume ratio de 0.45 en faveur de la cellule basale [Yoshida et al., 2014, Moukhtar et al., 2016]. Au fur et à mesure du développement, la différence volumique entre les parties apicale et basale, va s'amplifier linéairement en fonction de l'effectif cellulaire (figure 3.13 A). L'asymétrie apico-basale peut être expliquée, en partie au moins, par l'augmentation plus importante du nombre de cellules dans la partie basale (voir paragraphe 3.2.1), mais une asymétrie de croissance au sein des différents types cellulaires en formation n'est pas à exclure également.

Volume des tissus : protodermique vs intra-embryonique

Au début du développement, on retrouve l'asymétrie volumique en faveur des tissus protodermiques, provoquée par la division péricline qui mène au stade dermatogène (figure 3.13 B). Puis une différence persiste, qui semble stable autour de 5000 μm^3 , avec des variations (figure 3.13 C). En fin de développement précoce, vers 150c, une tendance à la baisse apparaît (et une vitesse de croissance un peu plus rapide des deux domaines) mais il y a trop peu de points pour l'assimiler à une décroissance franche. Au regard du nombre de cellules présentes dans ces domaines, la croissance de chaque cellule n'est pas équivalente entre la partie interne et la partie externe : la différence de cellules entre les deux parties augmente (figure 3.11 C) tandis que la différence volumique stagne (figure 3.13 C). On a donc une croissance différentielle entre le domaine protodermique et le domaine intra-embryonique avec une croissance plus importante dans la partie interne.

Évolution des volumes des domaines AE, AI, BE, BI

Toutes les cellules du protoderme, bien que donnant le même type cellulaire, n'appartiendront pas à un même organe. En croisant avec les positions le long de l'axe apico-basal, on observe une tendance linéaire de l'évolution du volume de chaque domaine (figure 3.13 D). L'ajustement de droites sur les observations montre que le comportement de la croissance volumique des domaines semble être similaire au sein des domaines apicale et basale avec des courbes parallèles pour la partie interne et la partie externe. La croissance serait plus variable en fonction du positionnement le long de l'axe apico-basal qu'en fonction de la position dans les tissus. Les domaines dans la partie apicale grossissent moins que les domaines dans la partie basale de l'embryon. Par ailleurs, on retrouve les asymétries évoquées dans les paragraphes précédents.

Asymétrie de croissance radiale

La forme cœur contient deux plans de symétries : un plan sagittal longitudinal passant par le creux et un plan frontal longitudinal passant par le sommet des deux cotylédons [Long and Barton, 1998] (figure 3.14 A). La perte de la symétrie radiale de l'embryon peut être causée par une croissance différentielle, entre ces deux plans dans l'embryon (figure 3.14) : soit un plan voit son élongation augmenter, soit l'autre plan le voit ralentir. Le cœur, qui forme l'embryon, semble plus allongé le long du plan frontal. De plus, il a été montré que le plan sagittal est, pour la plupart des embryons, corrélé avec le premier plan de division de la cellule apicale embryonnaire [Saulsberry et al., 2002, Yoshida et al., 2014].

La bilatéralité observée serait déterminée assez tôt au cours du développement embryonnaire d'*Arabidopsis thaliana* mais est-ce que l'émergence de cette asymétrie est aussi précoce ?

Afin de mesurer cette différence, les diamètres de l'embryon ont été mesurés le long de chaque plan et ce pour plusieurs altitudes le long de l'axe apico-basal (figure 3.16) : un plan dans la partie apicale et un plan dans la partie basale.

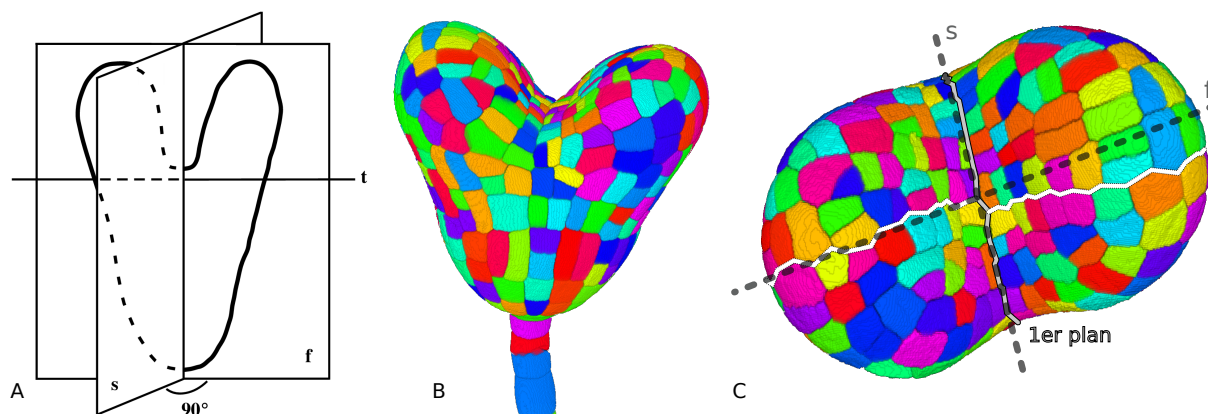


FIGURE 3.14 – (A) Nomenclature des axes remarquables sur un embryon cœur tardif. *f* : frontal longitudinal; *s* : sagittal longitudinal; *t* : transverse, extrait de [Long and Barton, 1998], (B-C) Embryon d'*Arabidopsis thaliana* au stade cœur tardif segmenté, vue 3D sous ImageJ, (B) vue frontale, (C) vue du dessus; plan frontal (*f*); plan sagittal (*s*); premier plan de division (en jaune); deuxième et troisième plans de division (en blanc).

Pour voir l'évolution de la forme au cours du développement, il est parfois nécessaire d'orienter les embryons afin de cibler des positions précises et replacer dans l'espace les mesures effectuées. Pour mesurer l'asymétrie orientée que montre l'embryon au stade cœur, un repère a été défini par rapport au premier plan de division et l'axe apico-basal. Pour chaque embryon, après segmentation, l'objet surfacique est construit. Puis pour orienter l'embryon, la filiation est utilisée

pour reconstruire l'hypophyse et la surface du premier plan de division (en jaune sur la figure 3.15). L'hypophyse est reconstruite en cherchant les cellules non-embryonnaires (n'appartenant pas à l'arbre de filiation) en contact avec des cellules embryonnaires. La surface du premier plan est constituée de toutes les surfaces séparant les deux cellules reconstruites de la G1.

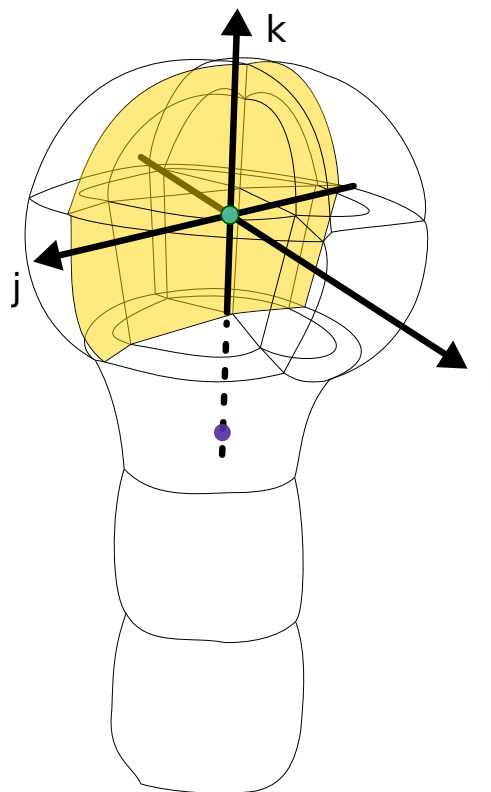


FIGURE 3.15 – Construction standardisée d'un repère associé à l'embryon. Illustration sur un embryon schématisé au stade 16c. Premier plan de division (en jaune). Centre du premier plan de division et du repère (en vert). Centre de l'hypophyse (en violet).

Le repère de l'embryon est centré sur le centroïde du premier plan de division (point vert sur la figure 3.15), ses axes sont définis comme suit :

- Le premier axe ($\vec{i}$) est la normale à la surface de la première division (en jaune sur la figure 3.15). Le côté droit du côté gauche ne pouvant pas être différencié, l'orientation est arbitraire. Une croissance différentielle, entre les deux cellules issues de la première division de l'embryon, ne pourra donc pas être identifiée.
- Le troisième axe ($\vec{k}$) est obtenu en projetant l'axe passant par le centre de l'hypophyse (point violet sur la figure 3.15) et l'origine du repère sur le plan orthogonal au premier axe.
- Le deuxième axe ($\vec{j}$) forme un trièdre direct avec les deux autres axes.

Une fois l'embryon orienté, se déplacer sur l'axe des Z correspond à se déplacer le long de l'axe apico-basal (si l'on considère l'inclinaison de l'interface négligeable par rapport à l'axe du suspenseur). Des coupes virtuelles de l'embryon vont être réalisées le long de cet axe (Z) pour calculer les élongations à des positions précises dans l'embryon. Pour mesurer l'élongation dans la partie apicale, la coupe a été réalisée à une distance égale de l'intersection entre les parties

apicale et basale, et la surface externe de l'embryon (figure 3.16 A). Pour mesurer l'élongation dans la partie basale, une coupe, à égale distance entre l'intersection entre les parties apicale et basale et le point de contact entre l'hypophyse et l'axe central des quatre quartiers de l'embryon, a été choisie (figure 3.16 A). Une mesure au niveau de la jonction apicale basale est également réalisée.

À ces différents pas en Z, le contour extérieur de l'embryon a été extrait (figure 3.16 B) et les intersections du plan Z, avec les trois premiers plans de division, ont été positionnées par rapport au contour. Les élongations sont calculées par les diamètres pour éviter les effets liés à la variabilité droite-gauche de l'embryon. Pour mesurer la différence entre les croissances radiales de l'embryon, un ratio est ensuite calculé : $\frac{diam1}{diam2}$ où diam1 est le diamètre mesuré le long du premier plan de division, et diam2 le long de l'axe du deuxième et troisième plans de division.

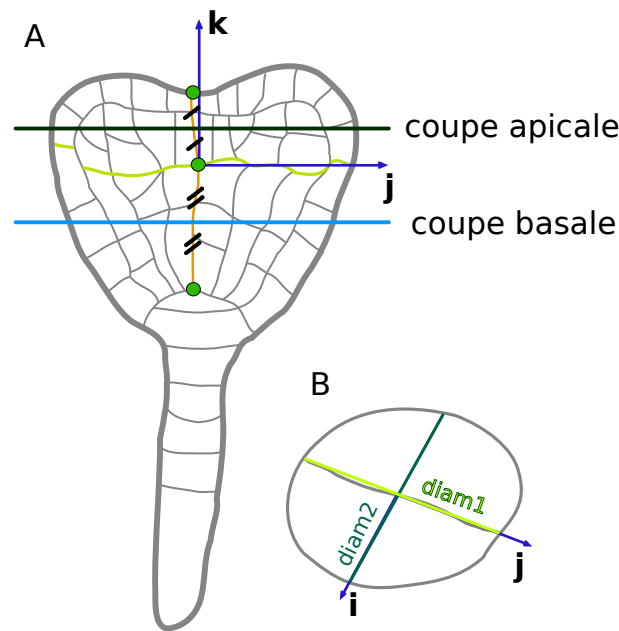


FIGURE 3.16 – Méthodologie de mesure des diamètres. (A) sur une coupe frontale, (B) sur une coupe transversale de l'embryon dans un repère euclidien (i,j,k). Position de la coupe transverse utilisée pour les mesures de la partie apicale (resp. basale) en vert foncé (resp. bleu clair). Les coupes sont positionnées par rapport à 3 points (ronds verts) de l'embryon.

Quelque soit l'endroit où la différence de croissance radiale est mesurée, elle n'est jamais exactement nulle, même au début du développement lorsque l'embryon semble parfaitement radial le long de l'axe apico-basal (voir les graphes 3.17 A et B). Une certaine différence est attendue, car la variabilité biologique fait que les cellules ne se comportent pas toujours de la même manière, même si les signaux, les conditions, et les caractéristiques sont identiques.

Asymétrie radiale dans la partie apicale de l'embryon

Avant 100 cellules, des asymétries légères sont présentes dans la partie apicale de chaque embryon (figure 3.17 points verts). Mais celles-ci ne semblent pas corrélées avec le premier plan de division (diam1). À partir de 100 cellules dans l'embryon, bien que quelques points voient leur tendance inversée, l'asymétrie est de plus en plus forte et semble beaucoup plus orientée vers un plus grand axe le long des deuxième et troisième plans de division.

Il y a donc deux hypothèses : soit on se trompe sur le premier plan de division avant 100 cellules car l'historique des divisions n'est pas assez visible et il y a des erreurs dans la détermination du premier plan de division, soit après 200 cellules, on est biaisé par la forme de l'embryon

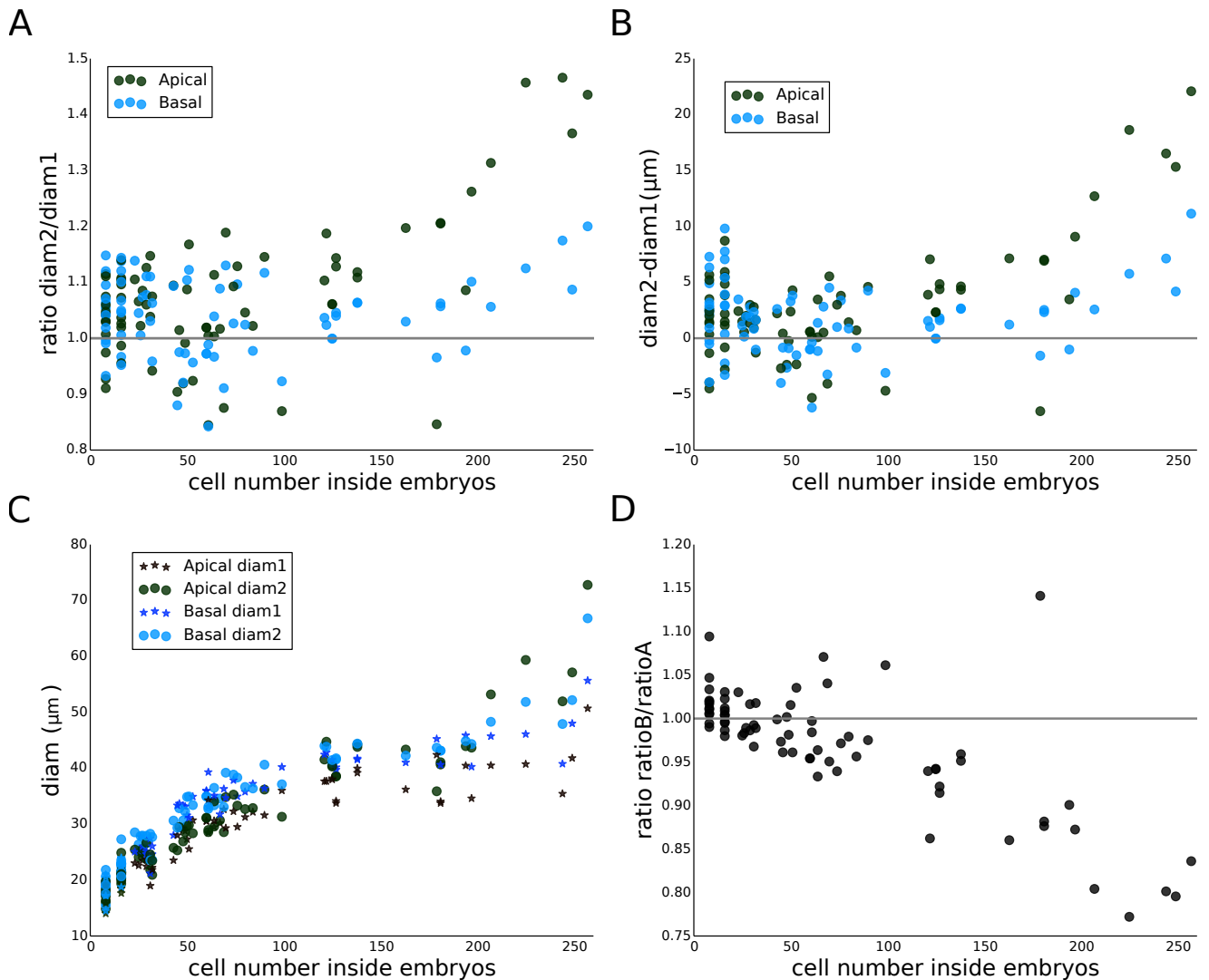


FIGURE 3.17 – Graphes des mesures sur les longueurs radiales dans les parties apicale et basale. (A) Ratio, (B) différence, (C) longueur des diamètres, (D) ratio des ratio.

pour le choix du premier plan, ou encore l'asymétrie crée une déformation tellement importante qu'elle efface les traces de l'historique des divisions. Les quelques points, après 100 cellules, qui ont un plus grand axe le long du premier plan de division, peuvent soit être également des filiations incertaines, soit montrer que le choix du plan grand axe a une part d'aléatoire et n'est pas 100% orienté identiquement comme l'ont proposé Saulsberry et al. [Saulsberry et al., 2002].

Sans regarder la corrélation avec les événements de division, dans la partie apicale, l'asymétrie de croissance entre le plan frontal et le plan sagittal présente, au début du développement, une différence maximale de $10 \mu\text{m}$ (figure 3.17 B) puis celle-ci passe à $20 \mu\text{m}$ au stade cœur. L'inflexion semble arriver entre 100 et 200 cellules avec un plateau entre ces deux stades. Cette différence est-elle une différence en terme de croissance cellulaire ou en terme de taux de division ?

Asymétrie radiale dans la partie basale de l'embryon

Dans la partie basale (figure 3.17 points bleus), dans un premier temps, l'asymétrie est aussi variable que dans la partie apicale avec une direction qui fait environ 1.1 fois l'autre (figure 3.17 A), sans avoir toujours la même orientation majeure entre les premiers plans de division. Puis l'asymétrie semble se creuser un peu, sans atteindre l'asymétrie dans la partie apicale mais qui

serait dans le même sens par rapport au premier axe de division.

Conclusion : L'asymétrie dans la partie apicale de l'embryon, caractéristique de la forme cœur, tend à être de plus en plus forte, par rapport à celle présente dans la partie basale de l'embryon après le stade 200c (figure 3.17 D). Ce comportement semble être progressif, avec des changements de forme qui se mettent en place au fur et à mesure et auraient commencé dès le début du développement.

Hauteurs des domaines le long de l'axe apico-basal de l'embryon

Les données volumiques et les mesures d'élongation radiale ont montré que les croissances des domaines apicale et basale étaient différentes. La partie apicale de l'embryon croît différemment entre deux plans radiaux. La partie basale a une croissance beaucoup moins asymétrique au niveau radial. Afin de continuer la caractérisation de la croissance différentielle de ces domaines, une mesure de la croissance le long de l'axe apico-basal a été ajoutée. La croissance se comporte-t-elle différemment le long de l'axe apico-basal entre la partie apicale et la partie basale de l'embryon ?

Avec l'utilisation des arbres de filiation, des POIs avaient été isolés (voir section 3.1.3 page 64). Parmi eux, un point A apical situé au centre des quartiers de l'embryon 4c, un point (B) basal situé à l'intersection de la droite formée par les mêmes quatre quartiers et de l'hypophyse. Un dernier point (c) a été repéré au niveau de l'intersection des quatre surfaces de division des quatre quartiers du 4c pour donner le 8c (divisant les parties apicales et basales). Pour mesurer la croissance en hauteur de la partie apicale (resp. basale), la longueur entre les point A et C (resp. C et B) a été utilisée.

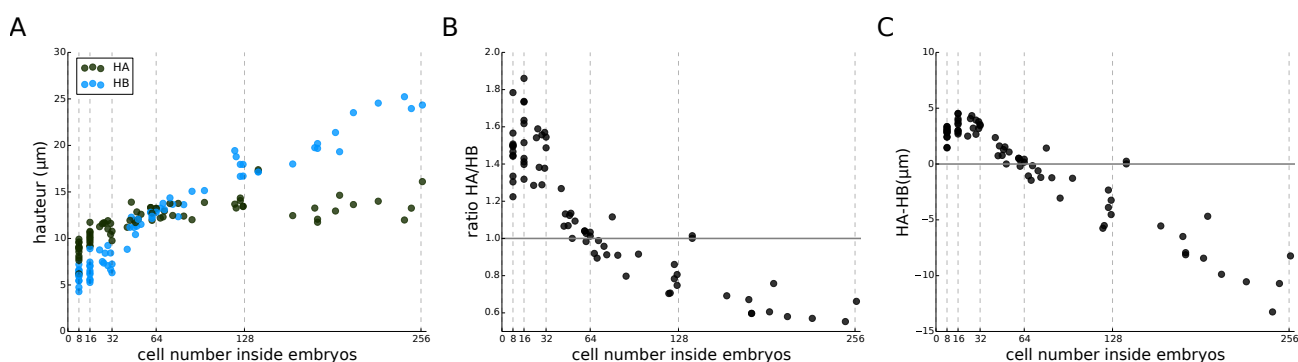


FIGURE 3.18 – Mesures sur les hauteurs des domaines apical et basal. (A) Hauteurs observées. (B) Ratio de la hauteur de la partie apicale sur la hauteur de la partie basale. (C) Différence entre la hauteur de la partie apicale et la hauteur de la partie basale

Le ratio, des hauteurs apicale et basale, montre qu'au début du développement, la partie apicale est plus épaisse le long de l'axe apico-basal que la partie basale jusqu'à 64c, puis la tendance s'inverse (figure 3.18). La décroissance ne commence qu'à 32c. Avant, les domaines semblent avoir une épaisseur le long de l'axe apico-basal fluctuante selon les individus mais sans tendance particulière (figure 3.18 A). Et lorsque l'on regarde la différence des hauteurs dès 32c, la décroissance est déjà visible (figure 3.18 A). Après le stade 64c où les deux parties sont égales, la décroissance des ratios est moins abrupte tandis que celle de la différence continue à être linéaire. La partie apicale reste dans les mêmes valeurs de hauteur, tandis que la partie basale continue de croître.

La croissance le long de l'axe apico-basal est différente entre les parties apicale et basale entre 32c et 257c. La partie basale devient de plus en plus longue par rapport à la partie apicale.

3.2.3 Ce qu'on peut retenir à l'échelle des domaines

Le rythme de division d'une cellule ne semble pas être différent entre les quatre domaines puisque les niveaux de générations cellulaires restent relativement les mêmes. Mais, les mesures de volumes montrent que la croissance n'a pas le même comportement dans chacun des domaines. La partie basale devient plus grosse que la partie apicale avec une élongation très importante le long de l'axe apico-basal et une croissance radiale presque homogène. Dans la partie apicale, la croissance est très asymétrique radialement, avec une élongation préférentielle selon un plan, mais son épaisseur le long de l'axe apico-basale reste faible. Pour mieux caractériser la croissance, par rapport à la forme, un descripteur de croissance, au niveau des cotylédons, aurait été intéressant. D'autre part, ces domaines ne prennent pas en compte tous les destins, en effet une sous-partie du protoderme, à cheval sur les quatre quartiers AE, donnera une partie du MAC. En l'absence de facteur moléculaire ou génétique, aucun moyen ne permet de distinguer cette zone puisque qu'aucune description cellulaire n'indique quels paramètres géométriques diffèrent.

3.3 Échelle cellulaire

Pour comprendre quels sont les événements qui permettent l'émergence de la forme de cœur au cours du développement, on a montré que c'est majoritairement les comportements de croissance des différents domaines de l'embryon qui changent. Comment ces comportements, à l'échelle de populations cellulaires, se traduisent-ils au niveau des individus ? Au niveau cellulaire, plusieurs paramètres peuvent différer d'une cellule à l'autre et impacter l'évolution d'un tissu :

- la croissance cellulaire qui peut varier en intensité et directionnalité entre les cellules.
- la forme de chaque cellule qui peut impacter l'orientation de la croissance cellulaire.
- l'orientation du plan de division qui permet de créer de nouvelles formes de cellule
- l'asymétrie des divisions qui en apportant des cellules de tailles différentes, créera une asymétrie dans les tissus

Avec des données provenant d'embryons différents, observés à un instant seulement de leur développement, certaines caractéristiques relatives aux géométries des cellules, aux plans de division peuvent être estimées, d'autres comme le taux de croissance sont plus difficiles à évaluer même si à l'aide des outils de lignage cellulaire, et en s'appuyant sur une certaine reproductibilité du développement, certaines estimations pourraient être produites à l'échelle des domaines, voire à l'échelle des cellules pour certaines d'entre elles. Nous analysons donc, tour à tour, les volumes cellulaires, les formes cellulaires, les divisions et les formes et volumes ratios qu'elles engendrent.

3.3.1 Volumes cellulaires

En observant des différences d'évolution de volumes entre les domaines de l'embryon, on peut se demander si cela vient d'une sous-population de cellules dans le domaine, ou s'il y a une homogénéité de croissance des volumes cellulaires. À partir des images labellisées, les volumes de chaque cellule ont été mesurés.

Au début du développement, on retrouve la diminution des volumes jusqu'à 32c reportée par Yoshida et al. [Yoshida et al., 2014]. De 32c à 256c, les volumes cellulaires restent dans une gamme à peu près constante bien qu'il y ait quelques variabilités en fonction des embryons. Le dernier embryon (257c) semble avoir des volumes plus importants mais aucune conclusion ne peut être prise sur la base d'une seule observation. Les volumes cellulaires s'étalent majoritairement entre 200 et 800 μm^3 . Cette grande amplitude peut être expliquée par une hétérogénéité de la position des cellules dans le cycle cellulaire : certaines viennent juste de se diviser et d'autres

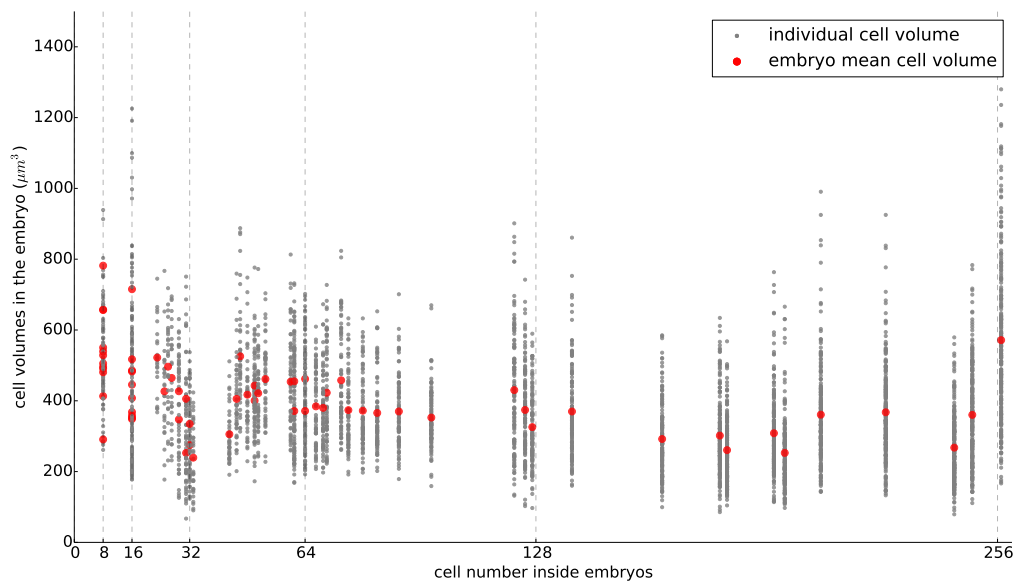


FIGURE 3.19 – Volumes cellulaires au cours du développement embryonnaire d'*Arabidopsis thaliana*.

vont l'être. On ne peut donc pas faire de conclusion précise sur le comportement de la croissance cellulaire et son influence sur l'embryon.

En ajoutant le paramètre de destinée cellulaire avec la séparation en domaines, on retrouve les tendances montrées par les volumes des domaines et le nombre de cellules par domaine (figure 3.20) :

- La partie BI de l'embryon a, avant 32c, des cellules plus petites que la moyenne (figure 3.20 C), ce qui explique que le volume du domaine soit un des plus petits (figure 3.13 D). Après 32c, les cellules BI deviennent les plus grosses de l'embryon (figure 3.20 C), ce qui explique que le volume du domaine a une croissance importante et devienne le deuxième plus gros compartiment de l'embryon (figure 3.13 D) malgré un nombre de cellules qui reste moins important que dans les domaines BE et AI (figure 3.12). Pour expliquer cette observation, on peut émettre l'hypothèse que la croissance des cellules BI est assez importante et que cela entraîne plus de cellules dans cette partie.
- La partie BE de l'embryon a des cellules plus grosses que la moyenne quelque soit le moment du développement (figure 3.20 D), ce qui explique que le domaine BE soit le plus gros (figure 3.13 D) avec le plus de cellules (figure 3.12).
- La partie AI a, jusqu'à environ 100c, des cellules plus petites que la moyenne (figure 3.20 B). Entre 100c et 257c, les cellules de la partie AI sont réparties autour de la moyenne totale embryonnaire.
- La partie AE a des cellules dont la taille est relativement fluctuante par rapport aux volumes cellulaires moyens des embryons, et ce tout au long du développement (figure 3.20 A). Entre 16 et 32c, les volumes sont dans la moyenne puis ils deviennent plus petits, jusqu'avant 64c, et redeviennent distribués autour de la moyenne, avec parfois des asymétries de distribution vers des valeurs plus faibles. Ces observations expliquent que malgré un nombre de cellules important (figure 3.12), le volume de la partie AE soit le deuxième plus petit (figure 3.13 D). La partie AE aurait donc tendance à fabriquer d'avantage de cellules pas trop grandes, une raison hypothétique pourrait être l'adaptation à la forme de la partie apicale.

Les distributions des volumes cellulaires ne montrent pas de sous-population bien distincte de volumes au sein des domaines.

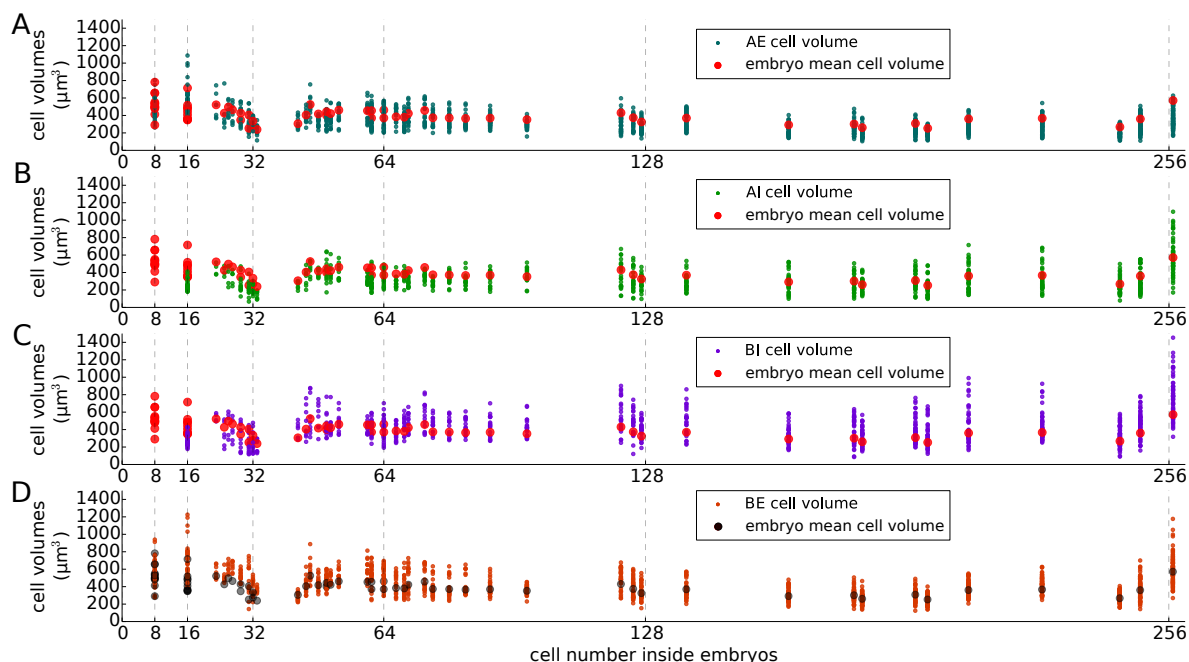


FIGURE 3.20 – Volumes des cellules au sein de chaque domaine d’embryons à différents stades de développement. (A) AE, (B) AI, (C) BI, (D) BE. En rouge (A,B,C) ou noir (D) : volume moyen des cellules d’un embryon.

Le volume cellulaire nous laisse des indications de la croissance réalisée dans les différentes parties de l’embryon. On remarque d’abord qu’elle ne semble pas homogène parmi les domaines, avec une forte croissance dans la partie BI malgré l’espace contraint où sont situées ces cellules. Une croissance qui semble importante dans la partie BE, peut-être pour s’adapter à la forte poussée venant des tissus internes. Dans la partie apicale, la croissance semble faible avec une couche externe un peu plus grande, peut-être pour s’adapter à l’augmentation de volume venant du bas, ce qui nécessiterait d’augmenter la croissance pour augmenter le nombre de cellules.

3.3.2 Formes cellulaires

La forme des cellules peut influencer sur la manière dont croît un tissu [Alim et al., 2012] et également la manière dont va se diviser la cellule [Hofmeister, 1863] [Errera, 1888] [Hertwig, 1884] [Besson and Dumais, 2011]. Durant les trois premières générations cellulaires, les formes ont été décrites comme sphère tronquée puis demi-sphère tronquée, puis comme octant de sphère et octant de sphère tronquée [Moukhtar et al., 2016] [Yoshida et al., 2014]. Pour analyser les formes dans les stades suivants, une revue de toutes les formes présentes à partir du stade 16 cellules (G4) a été réalisée, en les approximant par une forme géométrique proche (détaillé chapitre 4 section "Description of cell patterning events").

Sur la collection d’embryons et au cours des générations, malgré la variabilité, si on fait abstraction des proportions, trois formes majeures (en fréquence) sont observées des prismes à base triangulaire (figure 3.21a), des cuboïdes (figure 3.21b) et des pyramides à base triangulaire (figure 3.21c). Les cuboïdes et les prismes triangulaires se retrouvent dans trois des quatre domaines de l’embryon : AE, BI, et AI pour le prisme triangulaire et BE, AE et BI pour le cuboïde. On trouve la pyramide triangulaire dans la partie AI de l’embryon. Ces formes sont toutes présentes dès la génération 4 et jusqu’à la génération 8. Des formes rares apparaissent à différents endroits

Shape theoretical description	face number	Sommet number	schematic shape	base shape	face shape	Symmetries	example	dividing behavior
(a) triangular prism	5	6		triangular	rectangular		 AE  BI  AI	 (1)  (2)  (3)
(b) cuboid	6	8		rectangular	rectangular		 AE  BI  BE	 (1)  (2)
(c) triangular pyramid	4	4		triangle	triangular		 AI	 (1)  (2)

FIGURE 3.21 – Résumé des principales géométries observées (figure du chap4).

dans l'embryon (description chapitre 4). Si l'on regarde uniquement les formes majoritaires, il n'y a pas de rupture, la diversité des formes perdure. Ces formes présentent des plans, des axes et des centres de symétrie au sein de la cellule, pour voir les changements dans ces formes, on les a replacées dans le repère de l'embryon et des mesures de longueur ont été réalisées (voir chap. 4 section "Correlation between mother cell geometry and new cell wall orientation"). Ainsi, on peut voir que les formes ne sont pas parfaites, d'un embryon à l'autre il y a une variabilité au sein des populations de cellules identiques en forme et situées à la même position dans l'embryon. L'embryon est donc constitué de cellules dont les géométries sont dans une gamme limitée de possibilités mais au sein d'une même géométrie, les formes peuvent présenter de la variabilité dans leurs proportions.

3.3.3 Description des événements de divisions

Des études ont montré que la forme de la cellule influençait l'orientation du plan de division (voir introduction, section division). Pour savoir si le comportement de division est le même au cours du développement et dans toutes les parties de l'embryon (spatio-temporel), on a d'abord, grâce aux filiations, pu extraire tous les plans de division dans toutes les formes rencontrées et reconstruites. Cela nous a permis de mettre en évidence des caractéristiques du comportement de division des cellules en fonction de leur forme, à l'aide d'un modèle de partitionnement de volume, d'explorer plus en détail des divisions de volume sous contraintes (voir chapitre 4).

La filiation de l'ensemble des embryons a permis de mettre en évidence différents patterns de division (détaillé chapitre 4) à partir des formes présentes dans l'embryon 16c. On remarque que :

1) Toutes les cellules ayant la même géométrie présentent le même comportement dans l'orientation du plan de division (figure 3.21).

Pour le prisme triangulaire, les orientations observées sont au nombre de trois : planaire longitudinale (figure 3.21a1), planaire transverse (figure 3.21a2) ou arquée (figure 3.21a3). Chaque orientation permet la création de cellules avec leur propre géométrie. La division longitudinale crée un cuboïde et un prisme triangulaire. La division transverse (parallèle aux bases) crée deux prismes triangulaires. La division arquée, plus rare, crée une géométrie non convexe polyédrique peu commune, et un prisme triangulaire.

Pour le cuboïde, les orientations observées sont au nombre de deux : planaire (figure 3.21b1) ou arquée (figure 3.21b2). La division planaire divise le cuboïde en deux cuboïdes. La division arquée, plus rare, crée une géométrie concave polyédrique peu commune et un prisme triangulaire.

Pour la pyramide à base triangulaire, les orientations observées sont au nombre de deux : planaire (figure 3.21c1) ou courbe (figure 3.21c2). La division planaire crée un prisme triangulaire et une pyramide à base triangulaire. La division courbe crée deux prismes triangulaires.

2) Lorsque l'on replace les formes dans leur environnement, on remarque l'apparition de la variabilité dans les patterns de division observés, après 16c.

3) En répertoriant les divisions, un phénomène d'attraction des pattern a été remarqué (voir chapitre 4). En effet, malgré la variabilité, des organisations cellulaires similaires se retrouvent entre des embryons qui n'ont pas la même histoire cellulaire. En regardant à une échelle plus grande, on pourrait parler de patterns stéréotypés.

4) Avec un approche de modélisation 3D (voir chapitre 4), on a montré que l'ensemble de la variabilité observée, dans l'embryon, peut s'expliquer par une même règle de division : une règle stochastique de minimisation de l'aire de la surface de division passant à proximité du centroïde de la cellule mère. Toutes les surfaces observées sont donc des surfaces minimales proche du centroïde.

5) Avec des mesures de proportions des formes cellulaires (voir chapitre 4), on observe que les proportions des différentes orientations du plan de division sont modifiées, selon un autre facteur indépendant de la forme. On en conclut que la surface de division est tirée dans un profil énergétique reflétant la tension de surface (Besson et Dumais), la distance au centroïde, et d'autres contraintes appliquées à la cellules encore indéterminés. Plusieurs paramètres peuvent être envisagés, comme le stress mécanique que subit la cellule (Iouvaux et al.), ou encore des facteurs génétiques. La règle de division est donc constant entre les cellules, mais produit de la variabilité dans les plans de divisions mis en place.

3.3.4 Partage volumique lors de la division (volume ratio)

La division peut être vue comme un moyen de perturber le système et ainsi de modifier le devenir de l'embryon. Ainsi, le positionnement d'un plan de division a au moins deux conséquences topologiques et géométriques immédiates. D'une part, le graphe de voisinage des cellules est modifié et la dynamique de transport dans l'embryon peut se trouver affectée [Rybel et al., 2013], d'autre part, le volume cellulaire peut être partitionné de manière asymétrique et cela peut avoir un impact sur la croissance des cellules filles. Nous verrons ci-dessous que le volume ratio, rapport du volume d'une des cellules filles (on prendra la plus petite) sur la somme des volumes des cellules filles, semble, au moins dans les premiers stades du développement embryonnaire, assez important dans le destin cellulaire [Yoshida et al., 2014] :

- il est légèrement asymétrique lors de la division 4 à 8, avec une cellule fille plus grande dans la partie basale (figure 3.24 A).
- il est de $1/3$ lors de la division 8 à 16 qui forme une première couche cellulaire en distinguant le protoderme et les tissus internes (figure 3.24 B).

Yoshida et al. ont mis en relation cette asymétrie volumique avec la présence de facteurs moléculaires et génétiques de différenciations cellulaires. Sans marqueurs moléculaires, nous avons analysé les volumes ratios des générations cellulaires suivantes et exploré un lien possible entre configuration cellulaire, volume ratio particulier et destin cellulaire ?

À la génération 5, les volumes ratios peuvent, pour une même orientation du plan de division, être très variables (figure 3.22). Certaines configurations sont exclusivement asymétriques, d'autres sont asymétriques mais présentent quelques individus avec un volume ratio plutôt symétrique, et enfin d'autres ont une tendance plutôt symétrique, mais avec une légère variabilité. On remarque cependant que la division péricline, augmentant le nombre de couches cellulaires dans la partie BI, reste asymétrique. La division courbe dans la pyramide à base triangulaire est aussi systématiquement asymétrique. C'est une division qui permet de séparer une cellule périphérique

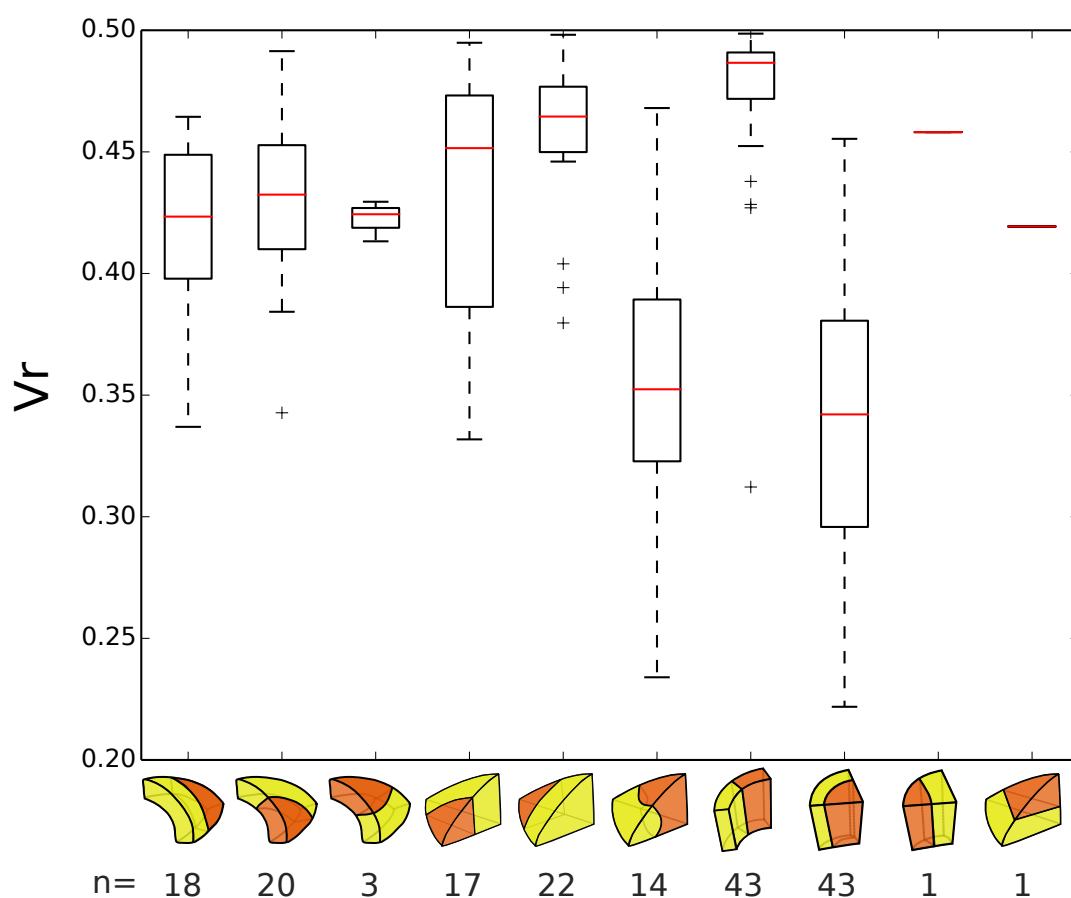


FIGURE 3.22 – Volume ratio de toutes les divisions de cellules au stade G4.

d'une cellule plus interne dans la partie AI, bien que cette division soit peu fréquente, peut-être est elle liée à la mise en place du futur méristème apical caulinaire.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer les grandes variabilités observées, comme la dépendance à un autre facteur, la non-importance de cette valeur ou encore le regroupement de sous-populations de cellules différentes selon un autre critère.

Le volume ratio de divisions établissant des types cellulaires bien définis ont donc été regardés (figure 3.23) :

- La division BI donnant à la 8e génération cellulaire deux cellules filles qui se différencieront en cortex et en péricycle, est une division péricline, de volume ratio 0,32, dans une géométrie cuboïde.
- La division donnant les initiales du méristème racinaire caulinaire, à la génération 6 aboutit à deux cellules en forme de prismes à base triangulaire. Le volume ratio de cette division est en moyenne de 0.46.

Ces deux divisions ont donc un volume ratio plus ou moins asymétrique mais la division donnant la partie apicale et la partie basale (de G2 à G3) a montré qu'une légère asymétrie pourrait suffire pour faire la différence.

D'autre part, la possibilité d'une croissance différentielle dans les deux cellules filles, juste après la division, nous empêche d'avoir une précision sur les valeurs mesurées. Ce problème est d'autant plus présent dans les tissus BI où l'on a remarqué une croissance cellulaire plus impor-

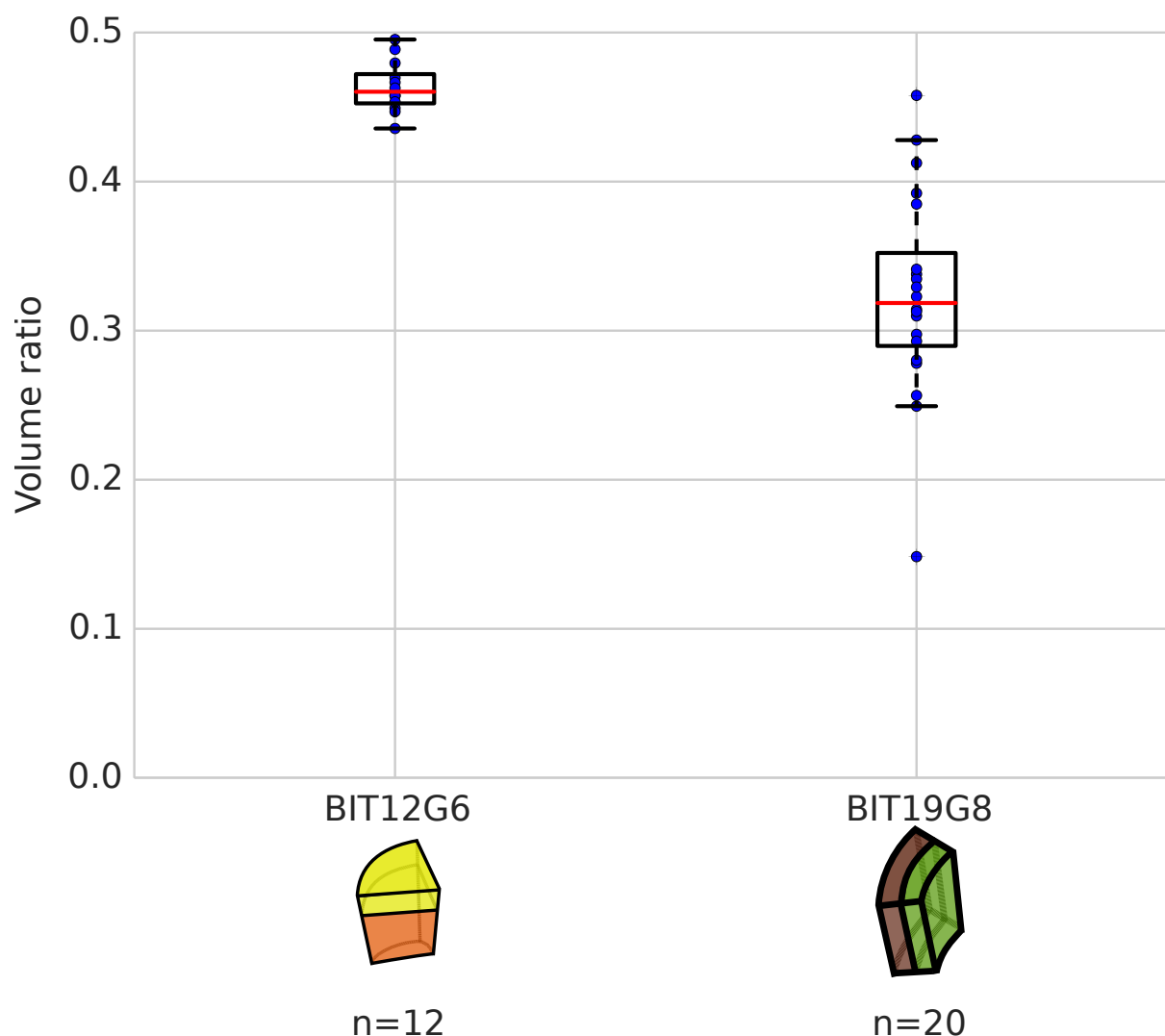


FIGURE 3.23 – Volume ratio de divisions asymétriques pour le destin cellulaire de ces cellules filles : BIT12G6, pour la division donnant le centre quiescent du méristème racinaire, et BIT19G8, pour la division séparant le cortex, et les tissus du pericycle. Observations en bleu et medianes en rouge.

tante. En suivant l'évolution du volume ratio de deux cellules filles sur plusieurs descendance, on peut voir des cas où une légère asymétrie sera amplifiée, comme entre les parties basales et apicales (figure 3.24 A). Mais le cas inverse existe également, la division péricline donnant le 16c donne deux domaines qui se rééquilibrent en terme de volume (figure 3.24 B). Le rééquilibrage dans la partie basale est plus grand que celui dans la partie apicale. Cette autre vision de l'évolution des domaines est expliquée par les volumes cellulaires des domaines respectifs.

Aucune règle ne se dégage vraiment concernant l'implication du volume ratio dans le changement de forme. On a vu, pour des divisions qui ne sont pas connues pour être des charnières dans les étapes du développement, des comportements volumiques symétriques et d'autres asymétriques. Dans le cas inverse, on a vu des divisions importantes pour le développement être presque symétriques dans leur comportement volumique.

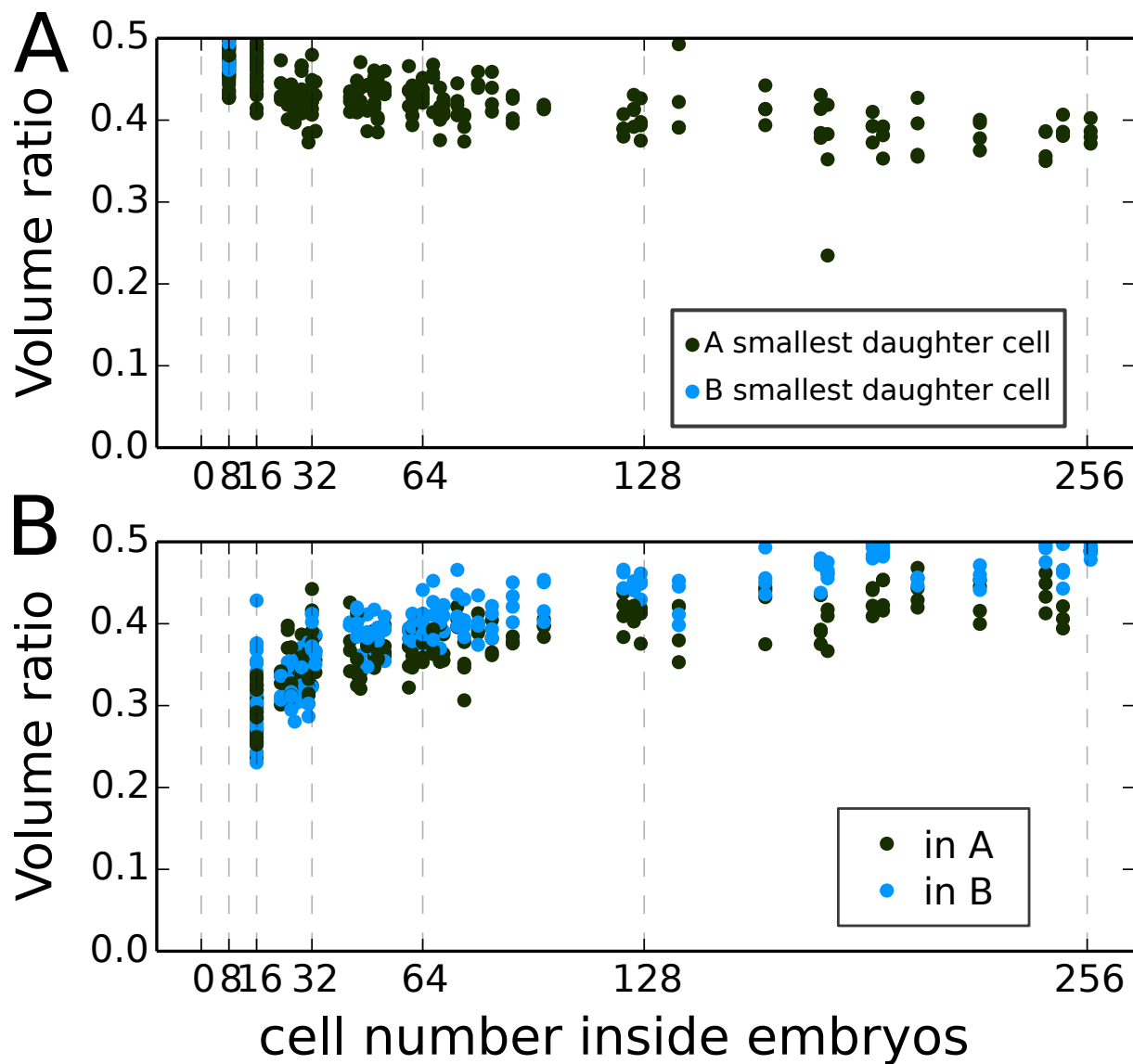


FIGURE 3.24 – Évolution des volumes ratios des divisions dans les cellules de G2 (A) donnant les parties apicales et basales de l’embryon et des divisions dans les cellules de G3 (B) donnant les parties internes et externes à l’embryon.

3.3.5 Ce qu’on peut retenir à l’échelle cellulaire

À l’échelle cellulaire, la croissance est difficile à caractériser précisément. Quelques tendances montrent qu’elle diffère entre les tissus et elles corréler les mesures effectuées sur les domaines mais également les mesures sur les formes. Les orientations de la croissance, au niveau cellulaire n’ont pas été investiguées et permettraient de comprendre les changements différentiels orientés de formes entre la partie basale et apicale.

Au cours du développement d’*Arabidopsis thaliana*, la règle de division en action semble être stochastique (développé chapitre 4). Malgré la variabilité qu’elle génère, des patterns cellulaires identiques entre les embryons sont observés. Quelques mesures sur les géométries cellulaires laissent à penser, qu’au cours des générations, d’autres facteurs que la géométrie cellulaire viendrait impacter les orientations des plans de division tout en restant dans un répertoire d’orientations du plan de division restreint.

3.4 Conclusion

Les descripteurs ont permis de mettre en évidence des événements caractéristiques se déroulant au cours du développement. L'histoire hypothétique, à toutes les échelles, est résumé sur le schéma chronologique suivant (figure 3.25) :

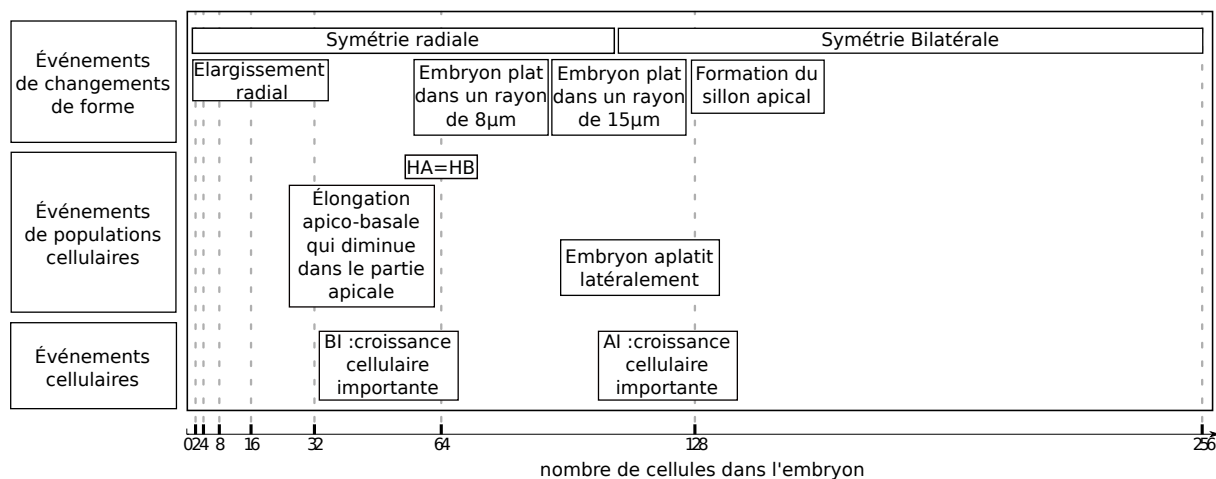


FIGURE 3.25 – Récapitulatif des principaux événements hypothétiques, placés approximativement au cours du développement.

Chapitre 4

Modélisation des patterns de division

La description des états possibles de l’embryon au cours du développement et des différentes histoires qui ont amené à ces états, a apporté des observations de références pour une possible modélisation. La modélisation permet ensuite d’explorer différentes règles, de reproduire les observations et, une fois le modèle validé, de prédire les événements. Ainsi, pour l’étude des règles de division se déroulant dans l’embryon au cours de son développement, la simulation de règle de division va nous permettre de savoir si cette règle est celle réalisée, en comparant les résultats de simulations et les observations. Par modélisation, une règle de division sous-tendant le développement stéréotypé jusqu’à 16c a été proposée précédemment : le plan de division correspondrait à une surface passant par le centroïde et minimisant son aire. Qu’en est-il pour les divisions après 32c où on a décrit de la variabilité ? Est-ce que cette règle est toujours réalisée ou est-ce une autre ? Est-ce qu’une règle basée sur la forme de la cellule est envisageable et, si oui, est-ce que les variations dans la géométrie cellulaire peuvent expliquer les variations dans les fréquences d’observations d’orientation des plans de division ?

L’étude des règles de divisions se présente sous la forme d’un projet d’article. Le modèle utilisé sera présenté dans une introduction.

4.1 Introduction : l’étude précédente du laboratoire et fondatrice de ce projet

Les premières étapes du développement embryonnaire précoce d’*Arabidopsis thaliana* sont très stéréotypées. Moukhtar et al. ont caractérisé les stades embryonnaires jusqu’au 32c avec une collection de plus de 60 embryons segmentés et filiés. Pour décrire ces stades, plusieurs paramètres ont été quantifiés : la forme des cellules, l’orientation des plans de divisions, les volumes ratios des divisions et la distance du plan de division au centroïde de la cellule mère [Moukhtar et al., 2016]. Les quatre premières étapes sont stéréotypées par leur forme géométrique et par leur orientation du plan de division mais également, bien qu’il soit un peu variable, par le volume ratio des divisions. Les distances des plans de division aux centroïdes, sont peu variables et assez petites, moins de 1 μm de distance en moyenne, pour les trois premiers plans de division. Le quatrième plan de division, correspond à une division asymétrique pour le volume et pour l’identité cellulaire.

Moukhtar et al. ont développé un modèle stochastique 3D de division cellulaire qui partitionne un volume en deux, suivant deux contraintes :

- la minimisation de l’aire de contact entre les deux parties (proposée par Errera)
- une répartition du volume fixée entre les deux parties

L’énergie du modèle est le suivant :

$$E(x) = E_{\text{aire}}(x) + \alpha E_{\text{volume}}(x)$$

$$\text{avec } E_{\text{volume}}(x) = (\text{VolumeRatio}(x) - \rho^*)^2$$

Où le VolumeRatio est le nombre de voxels d'une cellule fille par rapport au nombre de voxels dans la cellule mère et ρ^* est le volume ratio cible. $E_{\text{aire}}(x)$ est l'aire de la surface de division. α est un paramètre qui permet d'ajuster la balance entre les deux contraintes.

Simulations : Le modèle est implémenté sur une grille discrète 3D. Chaque voxel de cette image a trois états possibles :

- la non appartenance à la cellule définie par le masque de la cellule mère donné en entrée de l'algorithme
- l'appartenance à la première cellule fille
- l'appartenance à la deuxième cellule fille

Les voxels appartenant à la cellule sont initialisés aléatoirement pour définir leur appartenance à l'un ou l'autre des cellules filles. Pour faire évoluer le système, une nouvelle configuration, dans laquelle un voxel choisi au hasard change d'appartenance, est générée. La différence d'énergie, entre l'ancienne configuration et la nouvelle configuration, est évaluée au regard des règles énoncées plus haut. Si la nouvelle configuration a une énergie plus faible, donc une plus petite surface et/ou un volume ratio plus proche du volume ratio ciblé, la configuration est acceptée. On a donc une minimisation de l'énergie du système. Pour une différence d'énergie positive, la configuration est acceptée selon un algorithme de Metropolis. Ainsi, certaines configurations non avantageuses au regard des règles, pourront être acceptées et le paysage énergétique pourra être plus facilement parcouru. La simulation est arrêtée après vérification que le système semble stable avec une variation de l'énergie qui est très faible.

Leur modèle est donc stochastique : à chaque simulation une configuration différente peut être obtenue.

Applications : Pour avoir le masque des cellules mères, les arbres de filiation sont rembobinés sur une génération. Les formes cellulaires des deux cellules filles ($f1$ et $f2$) sont fusionnées. Le volume ratio correspondant est mesuré de la manière suivante :

$$Vr = \frac{\min(V_{f1}, V_{f2})}{V_{f1} + V_{f2}}$$

Dans un premier temps, le paramètre α , la balance entre la contrainte de minimisation et la contrainte du volume ratio, a été choisi pour optimiser la minimisation de surface. Par la suite, l'ensemble des simulations ont été faites avec une valeur de 2.

Moukhtar et al. ont simulé les surfaces de divisions possibles dans les cellules mères de tous les stades jusqu'à 16c et des configurations cellulaires issues de périclines pour les embryons de 16c à 32c. Pour les simulations des divisions donnant les cellules de la génération 4 (stade dermatogène) avec le Vr observé ($\rho^* = 1/3$), plusieurs orientations du plan ont été obtenues dont l'orientation observée, la péricline, mais qui n'était pas la surface avec la plus petite aire. Pour comparer, des surfaces divisant les mêmes cellules symétriquement ont été générées ($\rho^* = 0.5$), lorsque les divisions observées étaient asymétriques. Les surfaces divisant les cellules symétriquement avaient effectivement une distance au centroïde très faible, mais les aires de ces surfaces étaient plus grandes que la surface péricline divisant la cellule asymétriquement.

À partir de cette observation, Moukhtar et al. ont proposé que le plan de division soit la surface passant par le centroïde qui a l'aire la plus petite pour un volume ratio donné. Cette règle a été retrouvée, avec la même démarche, pour les divisions de 4c à 8c qui sont légèrement asymétriques, mais également pour les deux premières divisions de la cellule apicale du zygote qui elles sont symétriques.

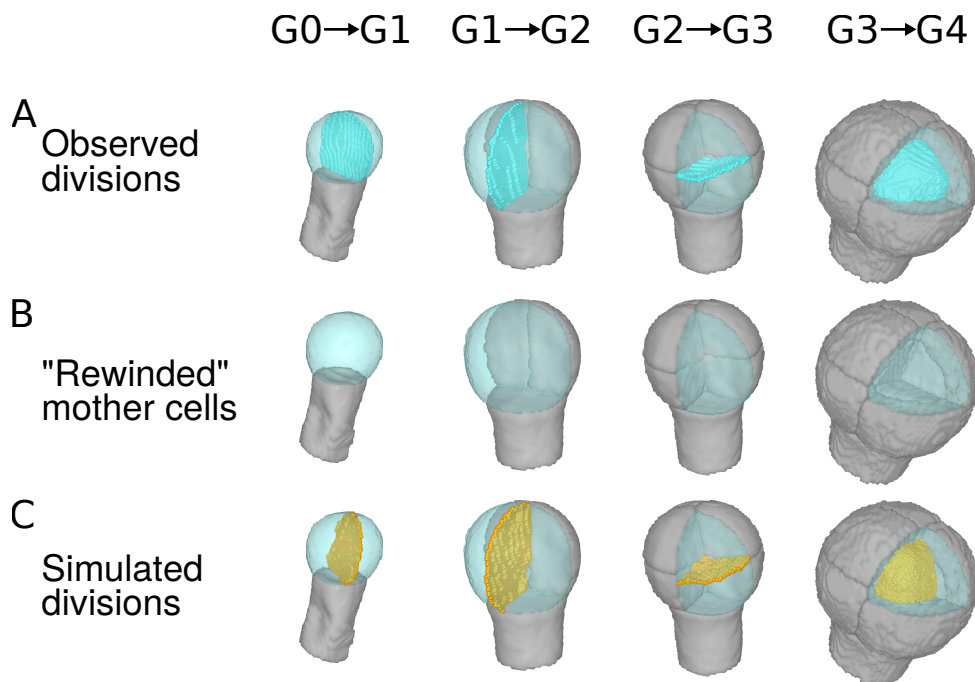


FIGURE 4.1 – Modélisation des divisions de l'embryon précoce d'*Arabidopsis thaliana* jusqu'à 32c. (A) orientation des plans de division observés, (B) reconstitution des cellules mères correspondantes, (C) orientations des plans de division prédits par la règle de Moukhtar et al..(adaptée de [Moukhtar et al., 2016])

Cette étude a apporté une collection d'embryons segmentés et filiés, des phénotypes mais également des nouvelles hypothèses, elle a également mis en place des outils d'analyse et de modélisation, tout comme elle a ouvert la porte à de nouvelles questions sur la division, l'embryogenèse, ou encore la morphogenèse.

4.2 Règle de division dans l'embryon de plus de 16c

Résumé : L'organisation cellulaire de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana* est bien décrite jusqu'au stade 16 cellules [Yoshida et al., 2014]. Ces premiers stades sont stéréotypés. Une règle de division a été validée pour ces stades. Les divisions observées sont établies par minimisation de l'aire de la surface de division passant par le centroïde de la cellule mère [Moukhtar et al., 2016]. Après 16c dans l'embryon propre, de la variabilité apparaît dans l'organisation cellulaire. Comment peut-on la décrire et est-elle régie par la même règle de division que les stades précédents ? L'étude des patterns cellulaires et des règles de division commence par l'analyse des observations au niveau cellulaire des embryons. Pour cela une collection d'embryons fixés à différents moments du développement, jusqu'au stade cœur, a été segmentée et les lignages cellulaires ont été reconstruits. Dans un premier temps, on peut observer que les formes cellulaires rencontrées peuvent être résumées par 3 géométries, lorsque l'on fait abstraction des asymétries des formes cellulaires (Figure 1).

On a pu également regrouper les divisions en types dépendants des géométries générées par la division. On remarque que les divisions d'une géométrie cellulaire se réalisent toujours de la même façon avec peu de variabilité, lorsqu'on les caractérise selon leur orientation dans le repère de la forme géométrique. Ces caractéristiques ne changent, ni en fonction de la position dans l'embryon, ni en fonction des générations cellulaires (au cours du développement).

Ces géométries ont des axes, des plans et des points de symétries, ce qui ajoute, au sein de l'embryon, des patterns cellulaires possibles à partir des mêmes configurations de division (figure

2 et 12). En replaçant les cellules selon leur orientation dans l'embryon, on met en évidence de la variabilité avec de multiples orientations d'un même type de division.

Les règles de division proposées lient l'orientation du plan de division et la forme de la cellule. Ainsi, des mesures ont été réalisées, pour voir à quel point la variabilité de la forme prédisposait de l'orientation du plan de division, lorsque celui-ci était variable (partie apicale de l'embryon) (figure 3). Une caractérisation des formes cellulaires a été réalisée par mesure des asymétries par rapport à une géométrie parfaite, ce qui permet d'évaluer les proportions de chaque forme d'une même géométrie. On peut mettre en évidence des corrélations entre la forme cellulaire et l'orientation du plan de division dans le repère de l'embryon.

Par modélisation 3D de règle stochastique, d'une règle de minimisation de l'aire du plan de division, conditionnée par le volume ratio, on peut voir quelles sont les divisions possibles dans une forme cellulaire donnée [Moukhtar et al., 2016]. L'application de ce modèle, dans les formes 3D des cellules mères de la cinquième génération cellulaire, montre que la division cellulaire semble suivre la règle proposée par Moukhtar et al. pour toutes les cellules de la quatrième génération cellulaire, sauf pour les cellules basales internes dont peu de prédictions conformes aux divisions observées ont été reproduites.

Pour les cellules basales internes, les divisions observées semblent être des surfaces minimales mais ne correspondent pas à des minima globaux. Un facteur déterminant semble orienter la division réalisée vers cette orientation spécifique. Des mesures d'asymétrie sur des cellules de géométrie identique, présentes à différentes générations cellulaires, montrent qu'il y a un changement progressif d'une division, dont le plan est un minimum global, à une division dont le plan correspond à un minimum local.

Un récent papier (Louveaux 2016) a proposé une nouvelle règle basée sur le stress subit par la cellule. La cellule se diviserait de telle manière à diminuer les contraintes mécaniques. Cette règle serait compatible avec nos observations. En effet, plus on va profondément dans les tissus plus les contraintes sont importantes car le tissu est en développement et les cellules grossissent en poussant vers la seule interface libre : l'extérieur. Cette hypothèse expliquerait que les cellules les plus internes changent leur règle de division. Dans l'embryon, la division pourrait être la mise en place d'une surface minimale passant par le centroïde de la cellule mère, tant que les tissus ne sont pas contraints.

Studying *Arabidopsis thaliana* early embryo cell patterning variability to understand cell division rules

Elise Laruelle 1,2 ,Katia Belcram 1 ,Jean-Christophe Palauqui 1 ,
Alain Trubuil 2 , and Philippe Andrey 1,3

1 Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, RD10, 78026 Versailles Cedex, France

2 MaIAGE, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

3 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UFR927, F-75005, Paris, France

1 Introduction

The pecto-cellulosic walls of the plant cells are mechanical constraint to build a morphology during morphogenesis. Cells are embedded and the layout forms the cell pattern. Cell growth, depending on this pattern will allow the emergence of different shapes [2]. To construct a cell pattern, disposition of the future division wall is one of the main parameters. To study cell division, the *Arabidopsis thaliana* embryo is an advantageous model, despite the difficulty to access to tissues. It starts from one cell and establishes all organs through multiple cell differentiation processes. Moreover, during the four first cell generations of the embryo proper, the cell shapes and the divisions are very stereotyped, division plane orientations and the volume repartition (volume ratio) are similar between embryos. This stereotyped situation has allowed to describe the cell lineage until 16 cells in the embryo proper [5, 9] and over eight cell generations in the pro-vascular part of the embryo [13].

To explain observed division planes, deterministic rules for symmetric divisions have been proposed since the 19th century. These rules (reviewed in [8]) aim at capturing the relations between mother cell shape and the division plane orientation coming from observations.

Recently, a stochastic rule has been proposed by Besson and Dumais [3]. This rule is based on surface minimization (Errera’s rule [4]) and associates a division plane orientation with a probability of realization depending on an energy profile. Plant studies that have modeled the division process with this rule have reproduced observed 2D cell pattern [11, 7].

In the *Arabidopsis thaliana* embryo, two labs [13] [9] have challenged the division rule occurring in the early embryo development in 3D. The *Arabidopsis thaliana* zygote elongates to form apical-basal axis and then divides asymmetrically to form a small apical cell that will give the embryo proper (G0). This cell divides longitudinally to the apical basal axis to give the two first generation cells of the embryo proper. Both cells divide symmetrically and longitudinally again. Then, the fourth cells divide transversely to the apical-basal axis, the embryo proper acquires a basal part and an apical part. The fourth round of divisions is composed of geometrically asymmetric periclinal divisions to create inner and outer domain of the embryo proper. From this stage, we can define four domains corresponding to the different cells present in the 16 cell embryos: the apical inner

(AI), the apical protodermal cell (AE), the basal inner part (BI), that will give vascular cells, and the basal protodermal part (BE). After these stages, the division plane orientations are variable in the apical part and seems to stay stereotyped in the inner basal parts that will give vascular tissues [13].

Division rule studies agree with an Errera's rule explaining observed division plane of the first third divisions [13, 9]. The fourth division is an asymmetric periclinal division, asymmetric for the volume but also for the fate of daughters. The external cells give the protodermal layer and the inner daughter cells give inner tissues (cortex and vascular tissues). Yoshida et al. failed to reproduce this periclinal division plane with a 3D division model based on plane minimization passing through the mother cell center and concluded that auxin factors modify the division rule in these cells. But, Moukhtar et al. demonstrate with a 3D model based on a stochastic surface minimization, that the periclinal division planes dividing the third generation cells are minimized surface passing through the mother cell centroid [9]. In the embryo the fourth stereotyped first divisions (symmetric ones and asymmetric ones) are smallest surface passing through the mother cell center.

We address the question of the validity of this division rule beyond the 16 cell stage, especially in the apical part where there is some variability in the division plane orientation.

A collection of embryos standing from 17 cells to 257 cells has been established. Embryo cells have been segmented and cell lineages have been reconstructed. All divisions have been categorized with a description of the division plane orientation. We observed remarkable cell division behaviors along the early embryo development, as a restricted variability of cell geometry and division plane orientation, as a self-similarity feature and a fate independence of the division behavior. To look at correlations between the division behaviors and cell shapes, we measured cell shape aspect ratios of cells with variable possible division plane orientations to correlate shapes and division variability. Division modeling of one cell generation of the embryo enabled to explain observed cell patterns and to explore the possible division rules.

2 Description of cell patterning events

Embryo patterns have been progressively described along diverse studies. Invariable patterns have been highlighted from the first division of the embryo proper to the division occurring in the cell of the third generation. After 16c, the embryo cell pattern is stereotyped in the basal part of the embryo. The apical part hadn't been characterized as precisely as the basal part. It has been qualified as a mix of division orientations [1], random division [6] or also diverse transverse divisions [12].

To precise apical cell pattern, we segmented a collection of 47 fixed embryos. Embryos were non uniformly distributed from 17 cells to 257 cells in the embryo proper (figure 10 B). The data set amounted 4357 cells over three to four cell generations. The cell geometries and the observed cell pattern allowed us the establishment of the cell lineage of each embryo (figure 10 C).

The browsing of all observed cell divisions showed that we could resume cell shapes by their proximity to solids in terms of the face geometries and the vertex number (figure 11 and 12). Ignoring face curvature, three main solid geometries were found over all embryos : triangular prism (figure 1 a), cuboid (figure 1 b) and triangular pyramid (figure 1 c). The three geometries were present at the four cell generations (G4 to G7) (table 1). But, in the four parts of the 16 cell embryo, the diversity of geometries behaved differently. The AE and BI diversity increased and then stabilized. The AI diversity always increased. The BE part contained only one cell geometry over the cell generations.

These geometries had different division behavior along the cell generations (table 1). From reconstructed mother cells taken independently of the embryo space, we have reviewed all possible configurations of division (figure 1). It showed that there was few possible division configurations in each corresponding geometry. Triangular prisms had three ways to divide : a plane oriented longitudinally to rectangular faces that created a cuboid and a triangular prism (figure 1 a1), a plane oriented parallel to the bases that created two triangular prisms (figure 1 a2) and a rare curved orientation that gives a triangular prism and an uncharacterized geometry (figure 1 a3). Cuboid had two ways to divide : a straight plane that created two cuboids (figure 1 b1) and a rare curved orientation that gives a triangular prism and an uncharacterized geometry (figure 1 b2). Triangular pyramid had two ways to divide : a plane oriented parallel to one faces that created a cuboid and a triangular pyramid (figure 1 c1) and a curved plane that creates two triangular prisms with orthogonal directions (figure 1 c2). From the G5, rare solid geometries emerged at different parts of the embryo and hacked the regularity (configurations : dark green daughter cell and dark yellow daughter cell in Figure 11 and 12B). These supplemental solids were composed of 8 vertices and 5 faces or 10 vertices and 7 faces and lastly 8 vertices and 6 faces. The division of these polyhedrons created two new different shapes. The frequency of each division configurations of each geometries wasn't the same.

To analyze cell pattern, we replaced cells in the embryo orientation and classified all realized divisions from the first embryo proper cell by the division plane orientation relative to the embryo space and the daughter cell geometries. From this embryo population, all lineage trees with the division characterizations have been merged (figure 11) and frequencies of observed division configurations at each cell generation have been determined to highlight main streams and exceptions in all possible divisions patterns. The weight of calculated frequencies decreased as the cell generation increased because of the quantity of observations : in the younger generations, we had embryos at theses generations but also older embryos that were rewound with the cell lineages.

For each of the four domains of the embryo, simplified trees with most frequent branches were extracted (figure 2 and 12). Geometries were organized in configurations. Starting from stereotyped embryos at G4, the phenotypes of embryos were not unique. From G4 to G5, there were three major configurations of division in the apical outer part (figure 2 AE), three major configurations in the apical inner part (figure 2 AI) and only one in the basal part (figure 12). The diversity of the major part of the cell lineage tree could produce 81 embryos with different cell patterns only one cell generation after a stereotyped cell configuration. The AE cell at G4 was a triangular prism and all of the three observed configurations were divisions with the same orientation in the cell space : it created a cuboid and a triangular prism. The cell geometry had a rotation symmetry of order three, the three cell patterns could be generated with the same division plane orientation. The AI at G4 was a triangular pyramid and two of the configurations were division with the same orientation in the cell space : it created a triangular prism and a triangular pyramid. The cell geometry had a rotation symmetry of order four and if we look at small frequency observation, the third and fourth cell configurations were possible, thus the four cell patterns could be generated with the same division plane orientation. Most of the observed variability of the cell patterns was explained by cell symmetries. Hence, the observed variability did not correspond to complete randomness, but rather seemed to be limited to a range of configurations that was closely related to cell geometry.

The apical part became more variable in division pattern after the 16 cell stage than before and than the basal part at the same stage. But it is always the same variability: the same geometries and the same division behaviors, in all apical parts.

3 Variability

Description of the cell patterns after the 16c stage showed more variability than in previous stages. We tried to characterize this diversity in time and space.

Different level of variability was observable in cells patterns. Despite stereotyped division plane orientation in the stages before 16c, some variability have been observed in the cell volume [13], in the volume ratio of daughter cells [13, 9] and in the exact position of the division plane as showed by the distance of the division plane to the mother cell center [9].

Stages older than the 16c had smaller cells on average and cell volume were as in younger stage variable (figure 13). The volume ratio during division was variable between division configurations but also variable for a same division configuration (figure 14).

Additionally to this variability, we found different division plane orientations in one cell geometry. Looking inside the embryo, we observed variable patterns (figure 2 and 12). At G5, in AE, we saw that the variation seemed to be linked to a cell geometry symmetry. The G4 AE geometry had three possible patterns in the embryos (figure 2 A) that came from a rotational symmetry of the same division plane orientation (typed a1 on figure 1). The three possible configurations had not the same observed frequency. In the AI part, there were only three main patterns (figure 2 B) and a rare pattern (freq. 0.6%)(figure 11), but, similarly to the AE part, we should expect at least 7 possible cell patterns, as there were two division plane orientations in triangular pyramidal cells (typed c1 and c2 on figure 1) and that triangular pyramidal cells had several possible symmetries (axial, plane). Alternative cell patterns that came from the same division plane orientation (typed c1) had not the same frequency : two had nearly 40% and one was observed only one time. Difference of frequency was also present between the two possible division plane orientations (c1 and c2), two alternative cell patterns were observed around 40% and the cell pattern of the second division plane orientation was around 20%. There was variability, in cell pattern, and also in cell pattern frequencies.

Contrastingly, over all cell generation, cuboid geometries showed one main division plane orientation, plus a rare orientation (freq. 3%) in the apical part and in the BE part. Cuboids were also present in the basal inner part lineage, but the rare division plane orientation was not observed.

In the basal inner part, we observed a rare orientation (freq. 2%) at G5, unreported by Yoshida et al. [13] but mentioned in Scheres et al. [10] (figure 12B). The cuboid peripheral cells of the G5 had not a variable division lineage, in our embryo collection, as previously described [13]. Descriptions made in previous studies suggested a very constrained cell division history in all the BI part, but, in older cell generations, we observed some variability in the inner cells being descended from the triangular prisms of the G5. No variability has been observed in the descendant of the BI peripheral cell of the G5.

Variability in the exact position of division plane orientation is also present after the 16c stage and participate in cell pattern establishment. The apical part has many more possible cell patterns than in the basal part and contains also more varieties of geometries. In all the embryos, geometries can have unique possible division plane orientation that creates a constraint and stereotyped cell pattern and some others have more than four possible different orientations. But, the diversity is limited and mostly in a known repertoire of cell geometry and of division plane orientations.

4 Self-similarity

Observed cell patterns bring evidence to investigate the operated division rule. Firstly, we wonder what kind of division plane orientations we observed along cell generations ? Is there a change in the behavior among cell generations ?

Starting from G4, in the AE part of the embryo, we had a triangular prism, whatever the division plane orientation was, at G5 we had also a triangular prism (figure 2 A). Its behavior was the same : whatever the division orientation was, it created same geometries that the G4 created. This continued all the generation over the four cell generations we looked at. Along cell generation, the frequency between cell division orientation changed depending on the previous realization, but variability was still present (figure 11 A). Rarely, successive division plane orientations were identical.

In the AI part, the G4 triangular pyramids could divide to create a triangular pyramid with two orientations or a little frequent triangular prism. In 80%, G5 was composed of a triangular pyramid again. These G5 cells divided with an orientation plane that created again a triangular pyramid in 93% (67/72). At the next generation division generated 56% (14/25) of triangular pyramids.

In the BE part, G4 cuboids generated cuboids, G5 cuboids created cuboids, G6 cuboids generated cuboids in 98% (figure 12A). In the BI part, G4 triangular prisms generate at least one triangular prism in all division plane orientation (figure 12B). These triangular prisms generated also a triangular prism at the G6 to G8 generations.

At any cell generations from G4 to G8, the typical rule was that any cell geometry engendered at least one daughter cell with the same geometry. This self-similarity process perpetuates the geometry along cell generations and limit variability of the cell geometries. This behavior let suspect a constant division rule along development.

5 Fate independence

In each embryo domain, cells with similar geometries have common division behaviors. We wondered how expendable among the embryo was this observed feature. To compare division rules between the different parts of the embryo, we categorized the cells from different domains of the embryo by their closest geometry and looked at the similarities and divergences of the cell division behavior. Triangular pyramids were excluded as they are present in only one domain.

Cuboids were present in BE (figure 12 A), BI (figure 12 B) and AE (figure 2) parts of the embryo. In protodermal layers (AE, BE), cuboid cells were present at multiple cell generations: in the basal part from the G4 to the G8 and in the apical part from the G5 to the G8. BI part had cuboid cells from the G5 to the G9. Rarely, we observed divisions that create a triangle prism and a concave polyhedron, however, they are observed at G7 and G8 generations in several domains : AE, AI, BE (figure 11 and 12 A). In the majority of cases, the cuboid was divided mainly to cut the shape into two cuboids (figure 2 and 12, typed b1 on figure 1).

The triangular prism geometry was present in BI (figure 12 B), AE (figure 2 A), AI (figure 2 B) domains. In the protodermal apical layer, triangular prisms were present from the G4 to the G8. Triangular prisms were present, in the AI part, from the G5 to the G8 and, in the BI part, from the G4 to the G8. Triangular prisms had a rare division plane orientation (freq. 8%, typed a3 on figure 1) observed at several generations in the AI part (figure 11 B). In the AI part at G6, triangular prisms had two possible ways (typed a1 and a2 on figure 1) to divide (figure 2 B). But in AE, only one of these division plane orientations was observed (typed a1 on figure 1), no matter the cell generations (figure 2 A). In the BI triangle prisms, same division plane orientation as in the

AI part were present (typed a1 and a2 on figure 1, Figure 12). This geometry has a division plane orientation repertoire containing three ways to divide, but without the same balance in frequency of division plane orientation observations depending on the domain.

Considering only the geometry without taking aspect ratios into account (figure 1), these results showed that a given shape had no different division behaviors between the different embryo domains. However, the frequency distribution over possible division patterns for a given geometry may vary between domains. This may reflect different aspect-ratios of cell extensions for a given cell shape from one domain to the others.

6 Correlation between mother cell shape and new cell wall orientation

Considering geometries and not the shape of cells, the cell pattern description had suggested a common behavior of division along cell generation and everywhere in the embryonic tissues. Most of the debated division rules are based on the shape of the cell [8]. We wondered how aspect ratio of the cell shape impact the division plane orientation variation. The variations in cell patterns were more important in the apical part. The division of the apical G4 cells presented multiple possible orientations of the division plane replaced in the embryo. At G4, the apical geometries was a triangular prism and a triangular pyramid, they had symmetries that could explain the possible cell configurations coming from the same type of division. But cell shapes were not that symmetric, triangles of prisms and of pyramids could have a longer side and a smaller side. To describe characteristics of the shape of the cells, we measured the length of the cell sides derived from the geometry (figure 3A). Two quantitative measures are used that reflected asymmetries of the shape : one characterized the radial asymmetry of the shape in the embryo (figure 3B) and the second one showed the relative height of the shape in the embryo (figure 3 C).

Triangular prism cells of AE (n=47) and Triangular pyramid cells (n=50) were in average radially asymmetric with a wide distribution (figure 3B), and depending on the orientation of the division plane in the embryo of the cell, the asymmetry was not in the same direction. For AE configurations where the cuboid cell was on the left side of the mother cell (figure 3, orange), the mean radial asymmetry was under 1, but for AE configurations where the cuboid cell was on the right side, the mean radial asymmetry was upper 1 (figure 3B green). The third AE orientation presented a mean radial asymmetry closest to a perfect symmetry than in the two previous configurations (figure 3B brown), but the measure of the flatness along the embryo apical basal axis (figure 3C brown) shows that this shape was the highest one. The two division planes oriented along the apical-basal axis were division made in cells smaller in the relative height of the shape in the embryo. To sum up, division planes seemed to be oriented in function of the shape of the mother cell and more precisely of the asymmetry of cell extension along different axes.

For AI configurations where the triangular pyramid cell was on the right side of the mother cell (figure 3B purple), the mean radial asymmetry was under 1, but for AI configurations where the triangular pyramid cell was on the left side, the mean radial asymmetry was upper 1 (figure 3B blue). The configuration that generated two triangular prisms presented a mean radial asymmetry closer to a perfect symmetry than in the two previous configurations, but the measure of the flatness along the embryo apical basal axis showed that this shape was the higher one (figure 3C dark green). The rare case (n=1) where the triangular pyramid cell is on the top of the mother cell, which is also the third symmetric case of the two first configurations, was very atypically high along the apical-basal axis of the embryo (figure 3C yellow), and very symmetric radially (figure 3B yellow).

Hence, in inner apical cells, the tendency was also to orient the division plane in function of the shape asymmetry as in the AE part.

In regards of the division plane orientation, the division plane tended to be oriented parallel to the smallest length of the radial asymmetry. In case of a low radial asymmetry, a division plane oriented along the external surface was more observed. This suggested that the frequency of configurations reflects the a shape diversity relative to the corresponding geometry.

We concluded that there was asymmetries in apical shapes and they influenced the division plane orientation in most of the cases. For cases that were not following the principle, we hypothesized that the realized division rule had a stochastic component like Besson and Dumais suggested [3].

7 Pattern attractor - canalization of the cell patterning

The identification of possible sequences of division showed that a cell defined by its geometry could generate different cell organizations. We wondered how the variability can end to common cell pattern characteristics like the same number of tissue layers.

In the basal part, variability in the cell patterns was nearly absent and from the development of basal part emerges all the layers of the future vascular tissues with successive periclinal divisions [13] (figure 4 C left). But, at G5, there was an alternative configuration (freq. 2%) of the periclinal division (figure 12 B). In our collection, this singularity was observed in three embryos. Two of them were at the G5, we will not know how they evolved. In one embryo the fixation was one cell generation later and we observed that each daughter cell of the non-periclinal division divided to obtain a peripheral layer (figure 4 C right bottom), a behavior also observed by Scheres et al. in 1991. Firstly, this different path missed a layer formation and then in the next division round fall back to the same main cell organization and correct tissue development. Hence, the two possible paths from the G4 BI cell, resulted in the same cell pattern. We called this configuration an attractor pattern. The existence of such "attractor pattern" provides robustness to cell organizations.

In the protodermal layer of the basal part, some variability appeared in the division plane orientation established in the G6 cuboid cells (figure 12A). In 5.3% of the cases, division plane was transverse in regards of the embryo apical-basal axis. The next round of division mainly (80%) realized longitudinal orientation and restored a regular pavement cell pattern.

In the apical part, variability in the cell patterns was high and from the development of the apical part emerges the cotyledons and the shoot apical meristem. At G5, inner part and outer part presented numerous possible configurations, but at G6 the cells with a similar to the mother cell geometry did not divide with this high variability. We observed that successive divisions were not similar and alternate among the three orientations. This again resulted in local attractors (figure 4 A and B): whatever the sequence of division is, relative repartition of geometries were similar one cell generation later.

We concluded that the variability in cell division is erased along the development, to converge on pattern attractors, a local cell configurations obtained with different cell division sequences. The cell organization seemed to show a control at the tissue organization and not on the cell scale.

8 The minimized surfaces for a volume ratio in a cell shape

Qualitative descriptions of 32 to 256-cells stages brought a first idea of the division behavior when variability in division started to appear. Division rules found in previous division of *Arabidopsis*

thaliana embryo were deterministic. During the first four round of cell divisions, division planes are stereotyped. With 3D division modeling, two teams [13, 9] had studied the realized division rule and modified rules of division plane minimization were reproducing partially [13] or totally [9] the early division plane orientations. The third first divisions corresponded to pure Errera determinist rule, they were minimized surfaces [13, 9] dividing cells symmetrically or asymmetrically. The fourth ones were asymmetric division and were resulting from a more constrained rule, they were not the smallest possible surface but one precise local stable solution of surface minimization [9]. In the next stages, divisions were variable and no division rule was proposed in the literature. To explain multiple solutions of division in different kind of observed plant cell shape, Besson and Dumais proposed a 2D stochastic version of the Errera's division rule based on minimization of the surface tension energy [3].

To explore a possible relation of the division rule with the surface minimization, we used a model that We questioned whether the variability of division plane orientation beyond the 16c stage could result from a stochastic surface area minimization principle. To this end, we used a model that simulates 3D stochastic surface area minimization in a given shape and with a given volume ratio between daughter cells [9].

The model enabled to simulate and visualize possible minimized surfaces in our observed shapes in function of specified volume ratio of the targeted division. To simulate division of the fourth cell generation, we merged daughter cell to reconstruct the mother cell shape and extracted the observed volume ratio (the smallest daughter cell volume over the mother cell volume). After convergence of the energy minimization, each simulation provided a local solution of the system energy composed of surface minimization and volume ratio constraint. Multiple simulations were run to sample the repertoire of possible surface solutions. The solution that matches the observed division plane will be called the actual one.

In apical external shape, we picked up five cells for each of the three observed division plane orientations and in each cell 100 simulations were run (figure 6). In the cells that divided to create a cuboid shape at their left, we found three main types of surfaces : the actual surface orientation but also the two orientations that were observed in other AE G4 cells (figure 6A). We found exactly the same types of surface orientation in shapes that realized the two observed alternative orientations. This showed that all surfaces observed in the AE shape were local minimal surfaces. To compare results between cells, we ordered all obtained surfaces of each simulation by their area, and attributed to the actual orientations a rank : areas smaller than all other obtained surfaces were ranked zero and the bigger than all other obtained surfaces were ranked one. This normalization showed that the actual orientations were the lowest areas (figure 6B,F,J) among the other obtained orientation : they were the global minimum of the energy minimization.

In the inner apical shapes (figure 7 A,E,I and M), simulations gave more than seven types of surface orientation. Among them, we found the three most frequently observed surface orientations, a rare type and two types observed in the similar shapes of later generations. The two geometrical constraints contained in the model encompass the whole observed orientations and some rarely observed ones. Moreover the actual surfaces tended to be the smallest ones (figure 7B,F,J,M). The observed variation in the apical part could be only coming from multiple solutions of surface minimization.

In the basal domain (BI and BE) where the fourth cell generation divided without variation, the model gave several solutions (figure 8A and 9A and B) that contained the observed division plane orientations. In the cuboid shape of the BE part, the actual division planes had the smaller areas and all others orientations were only local solutions where the minimization was not global. In the triangular prism of the BI part, we obtained periclinal planes in only two cells over the six tested

cells (figure 9B), and they had not the smallest area of the predicted solutions (figure 9B cell1 and cell5).

In almost all shapes of the fourth cell generation, the modeling of surface minimization showed that the observed division planes were minimized interfaces dividing the cells with the observed volume ratio. The absence of simulated solutions reproducing actual patterns in several BI cells and the success in two cases could be interpreted as missing components to a division rule based on an area minimization of the division plane.

9 Division rules in embryos with more than 32-cells

Studies on the fourth cell divisions of the *Arabidopsis thaliana* embryogenesis [13, 9] had proposed a new view of the occurring division rule. Yoshida et al. showed that the division plane minimization was the rule of the three first divisions and that the fourth division was not a minimized plane. Author's interpretation is that minimization was a default rule and it was overridden in the division that formed new tissue layer due to the action of a deterministic factor : an hormonal signal. Moukhtar et al. proposed another rule on this early embryogenesis : the surface minimization passing through the mother cell center [9].

From this base, we asked if, as in the fourth division, the actual division plane was constrained by passing through the mother cell center. We looked at the distance to the mother cell center of simulated division surfaces in divisions that make the 32-cell stage.

In apical parts (figure 6 and figure 7), despite the variability of the predicted division surfaces, distance to the mother cell center of the division planes that are oriented as the observed division plane were on average at less than $1\mu m$ distance from the mother cell centroid (less than two voxel distance at our resolution) (figure 6 C,G,K and figure 7 C,G,K,M). Simulated surfaces reproducing actual divisions were globally closer to the mother cell centroid than the other solutions (figure 6D,H,L and figure 7D,H,L,M). In apical parts of the *Arabidopsis thaliana* embryo, a division rule based on a surface minimization constrained by the mother cell centroid distance seems to hold for the 16c to 32c divisions.

In the basal parts, the protodermal layer was following the same tendency with smaller distances from actual surfaces to mother cell centroid than other obtained surfaces (figure 8C and D).

In the inner part (figure 9B cell1 and cell5), measurements showed small distances to the mother cell center of actual division surfaces, but we could not conclude with only two successful cases. A division rule constraining distance to the mother cell centroid in BI cells of the 16c to 32c embryo could be possible. But, the division area of the observed division surface was much more important than some other obtained surfaces. It could indicate the possibility of another factor action on the division plane establishment to balanced the area and the distance to mother cell centroid minimization.

At the G5, all proliferative division planes were minimized surfaces passing through the mother cell center. But, the periclinal division of the BI part is not that clear. Self-similarity and fate independence hypothesis suggest a continuity of the division rule along the cell generations.

10 Divergence toward another behavior of division in the BI part ?

The modeling of a stochastic minimization rule had not reproduced observed division planes in most of the BI cells. The reproduction in two cells showed that the pericline division in triangular prisms was a local minimized surface. In the apical part, division planes are local minimal surfaces passing through the mother cell center. Dependency to the cell center is the factor, but in the basal inner part many other local minimized planes were closer to the mother cell center than the observed periclinal one or at a similar distance (figure 9 cell2, 3, 4 and 6). We thus examined more closely the relationship between cell shape and division plane orientation in the BI domain

In the BI part, cuboid cells divided symmetrically ($vr = 0.5$), division planes were thus passing through the mother cell center as all the possible minimized surfaces in this shape. Along generations, the division plane orientation was similar, the division planes were oriented along the apical basal embryo axis (figure 12B). The measurement of length side asymmetries of the cuboid cells in BI showed a change in the aspect ratio of shapes. Cuboid cells became more and more elongate along the apical-basal axis (figure 5 A). At the G4, the division plane orientation in the cell was along the smallest axis and progressively along the cell generations, the division plane turned toward an orientation along the longest axis of the cell. This observation led us to think of a control by a factor other than cell geometry along the cell generation. In the BI part, these cuboid cells established more and more deeper in the embryo radial depth along the cell generation establishment. The factor could be the mechanical constraints exerted on cells as proposed by Louveaux et al. [7].

generation / position	BE	BI	AE	AI	embryo proper
G=4 (16c)	1	1	1	1	3
G=5 (32c)	1	2	2	2	3
G=6 (64c)	1	2	2	3	3
G=7 (128c)	1	2	2	3	3
G=8 (256c)	1	2	-	-	-

Table 1: Evolution of the catalog of geometries of *Arabidopsis thaliana* cells: number of geometries in the domains of the embryo depending on the cell generation.

Shape theoretical description	face number	Sommet number	schematic shape	base shape	face shape	Symmetries	example	dividing behavior
(a) triangular prism	5	6		triangular	rectangular		 AE BI AI	 (1) (2) (3)
(b) cuboid	6	8		rectangular	rectangular		 AE BI BE	 (1) (2)
(c) triangular pyramid	4	4		triangle	triangular		 AI	 (1) (2)

Figure 1: The main cellular geometries and the associated division configurations beyond the 16c stage.

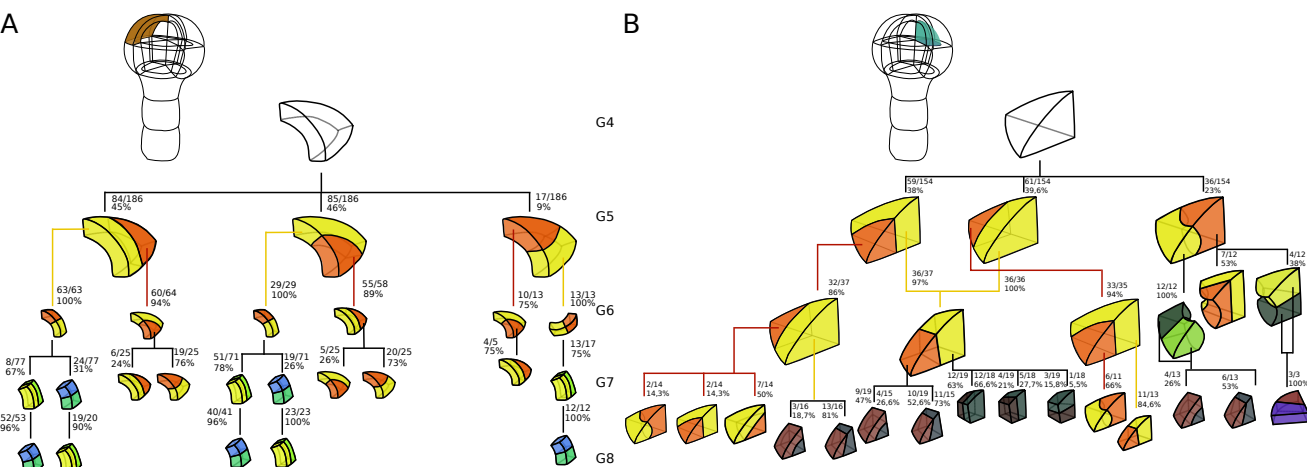


Figure 2: Apical cell pattern (main paths) of protodermal layer (A) and inner domain (B). All cell shapes are oriented as observed in the embryo. Aspect ratios are qualitative and are not representative of actual measurements. The shapes are oriented along the apical basal embryo axis.

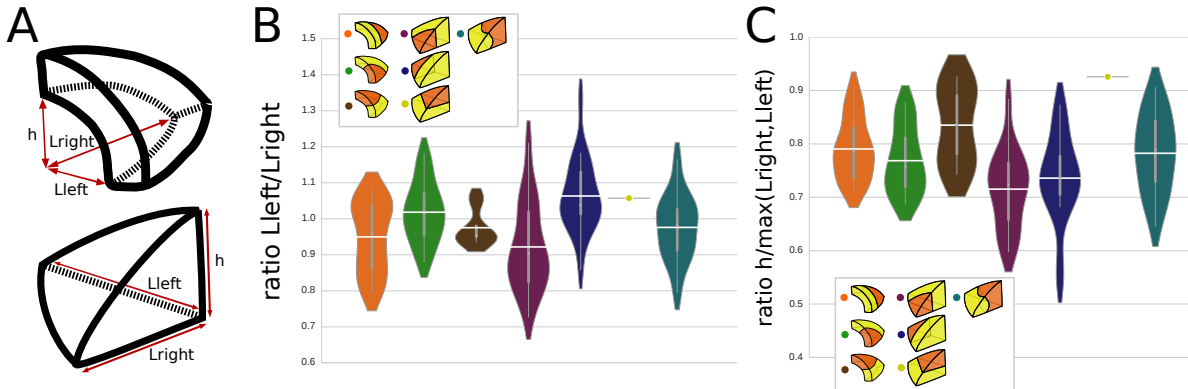


Figure 3: Apical shape parameter. (A) Measured lengths on apical geometries. (B) Radial asymmetry : ratio left length on right length on cells of G5 : 20 cells typed orange, 23 cells typed green, 4 cells typed brown, 16 cells typed violet, 19 cells typed blue, 14 cells typed turquoise, 1 cells typed yellow (C) flatness asymmetry : height over maximal value between right left and left length. white line : distribution mean, white dot : median

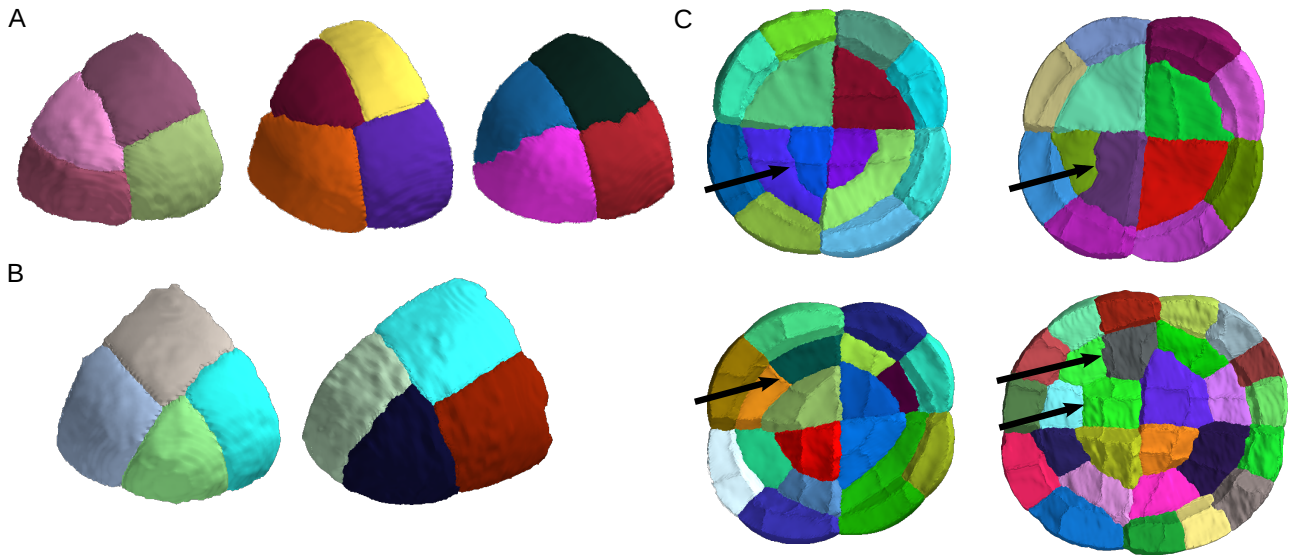


Figure 4: Cell pattern of different domains of the *Arabidopsis thaliana* embryo. (A,B) Two possible types of AE pattern attractor found in different embryos. (C) Top vue of the basal part of the embryo, left : main BI cell patterns at G5 (top) and at G6 (bottom), right : rare BI cell patterns at G5 (top) and at G6 (bottom), arrow : BI division plane pertinent to the corresponding cell generation.

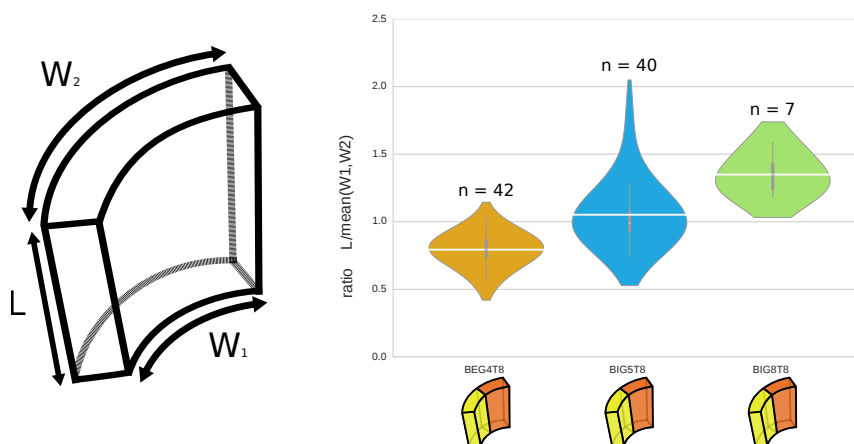


Figure 5: Cuboid shape parameter of basal cuboid cells. White line : distribution mean, white dot : median distribution.

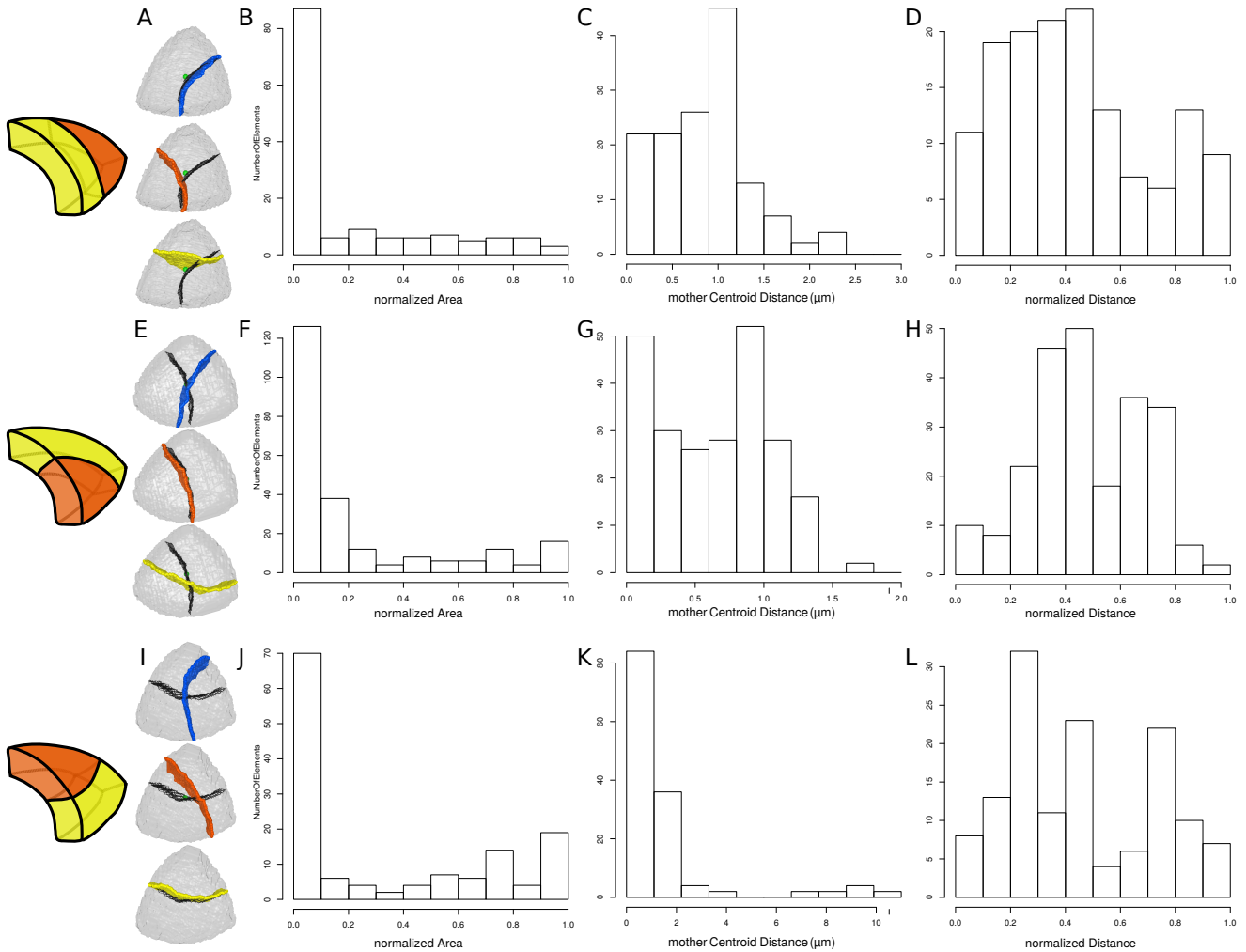


Figure 6: Simulated divisions in extern apical cells at stage 16c (G4). (A,B,C,D) Results for shapes with division giving the cuboid shape at the left, (E,F,G,H) Results for shapes with division giving the cuboid shape at the right, (I,J,K,L) Results for shapes with division giving the cuboid shape at the periphery. (A,E,I) main obtained division orientation (color) in shapes (grey) that just divided (division plane surface in black dot) with the green sphere as mother cell centroid, (B,F,J) the distribution of normalized ranks of predictive surface areas among the other obtained surface areas, (C,G,K) distance of predictive surfaces to the mother cell center, (D,H,L) the distribution of normalized ranks of predictive surface distances to the mother cell center among the other obtained distances to the mother cell center.

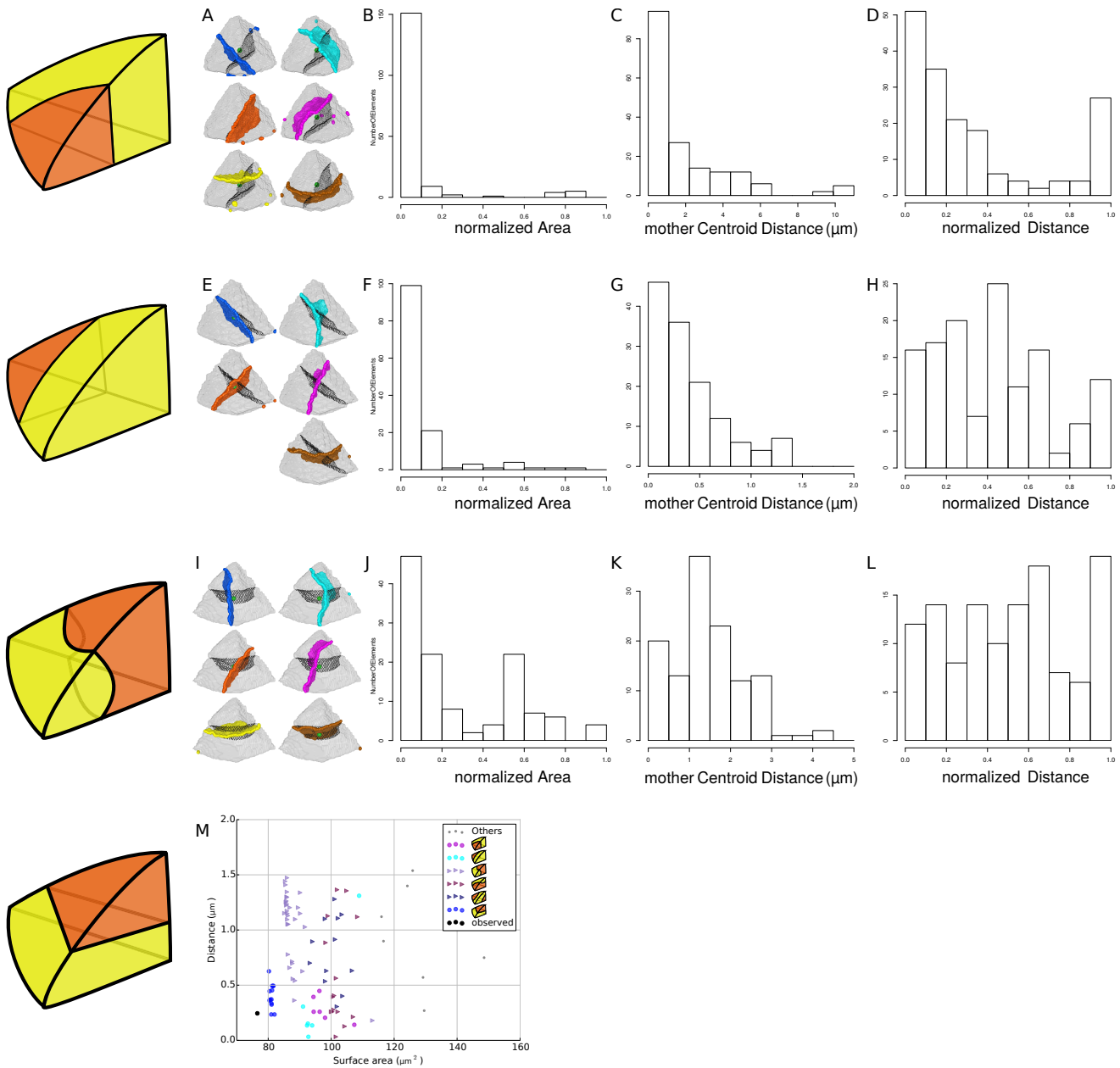


Figure 7: Simulated divisions in inner apical cells at stage 16c (G4). (A,B,C,D) Results for shapes with division giving the triangular prism shape at the left, (E,F,G,H) Results for shapes with division giving the triangular prism shape at the right, (I,J,K,L) Results for shapes with division giving two triangular prism shapes, (M) Results for shapes with division giving the triangular prism shape under the pyramidal shape. (A,E,I) Main obtained division orientation (color) in shapes (grey) that just divided (division plane surface in black dot) with the green sphere as mother cell centroid, (B,F,J) the distribution of normalized ranks of predictive surface areas among the other obtained surface areas, (C,G,K) distance of predictive surfaces to the mother cell center, (D,H,L) the distribution of normalized ranks of predictive surface distances to the mother cell center among the other obtained distances to the mother cell center.

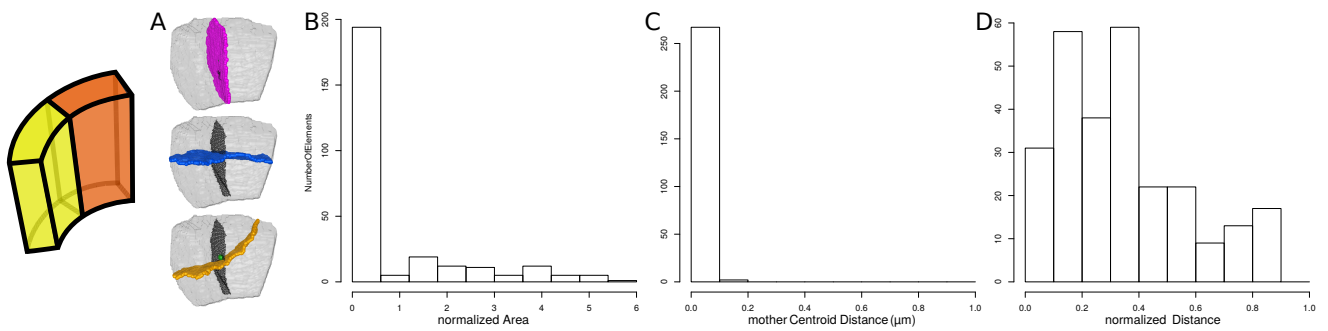
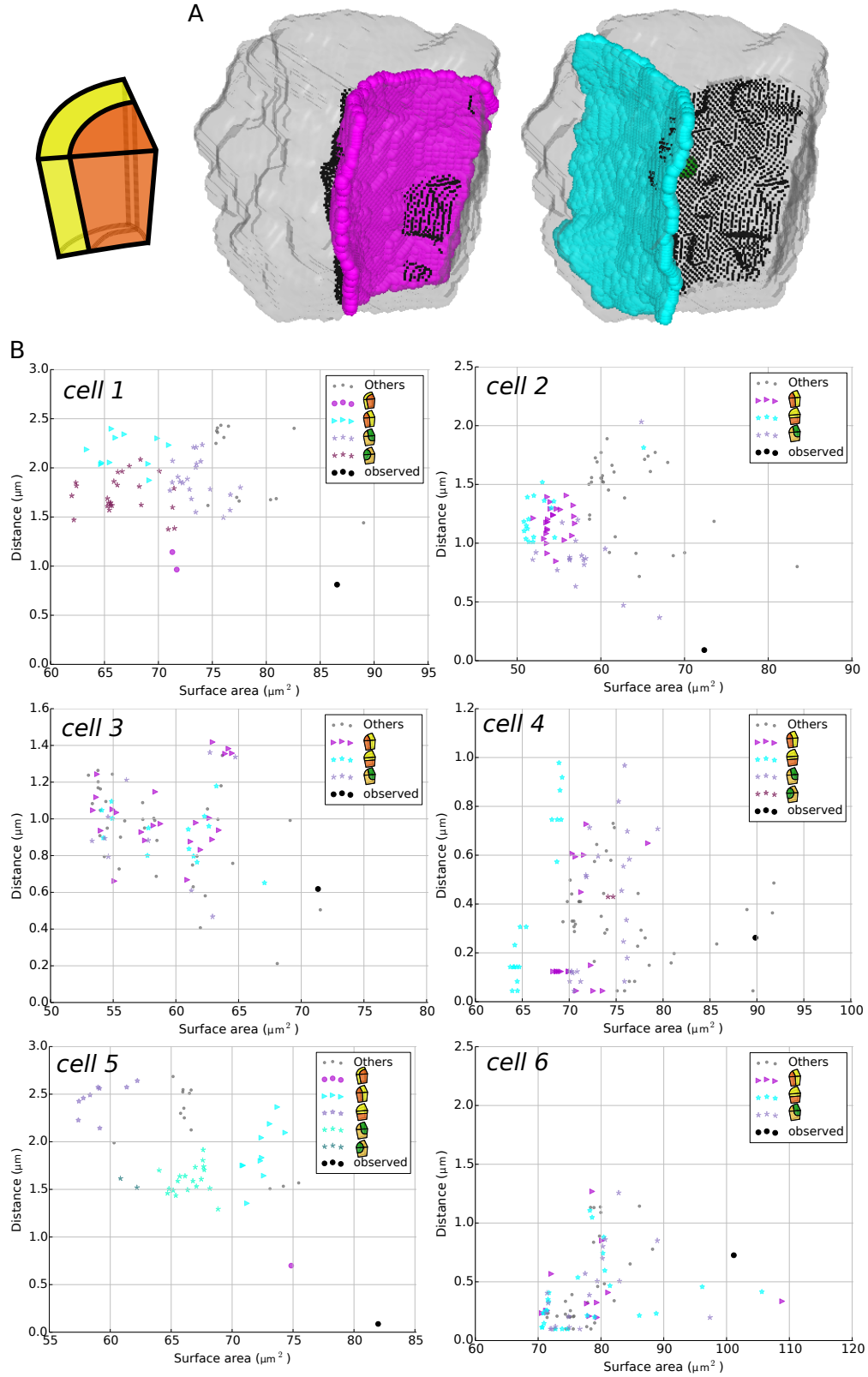


Figure 8: Simulated divisions in basal extern cells at stage 16c (G4). Results for shapes dividing longitudinally. (A) Main obtained division orientation (color) in shapes (grey) that just divided (division plane surface in black dot) with the green sphere as mother cell centroid, (B) the distribution of normalized ranks of predictive surface areas among the other obtained surface areas, (C) distance of predictive surfaces to the mother cell center, (D) the distribution of normalized ranks of predictive surface distances to the mother cell center among the other obtained distances to the mother cell center.



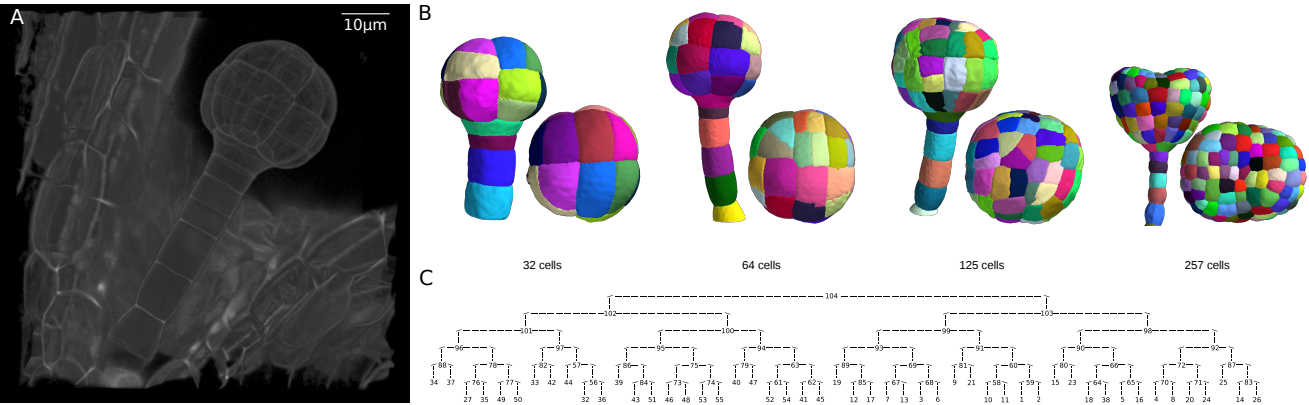
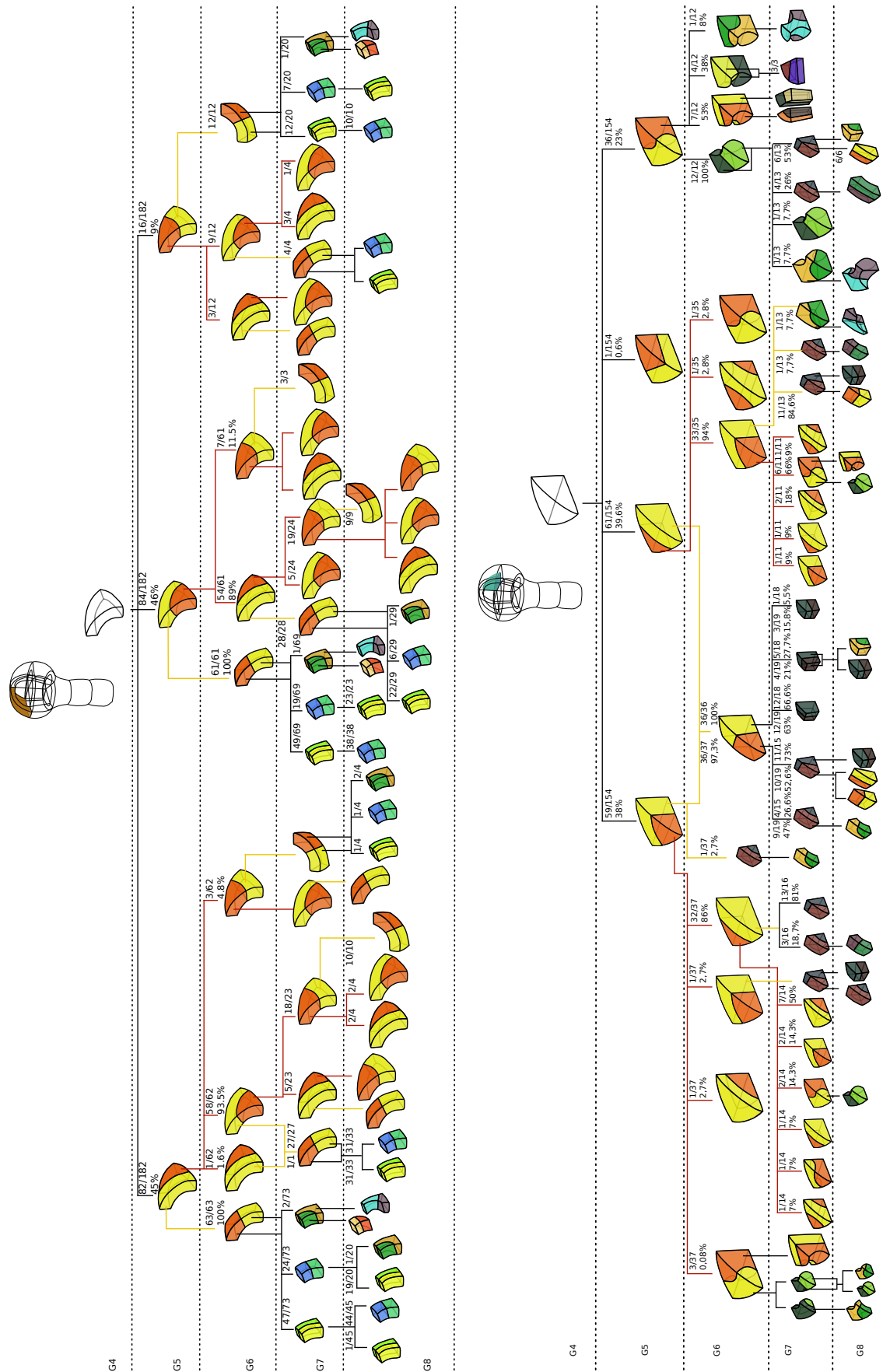
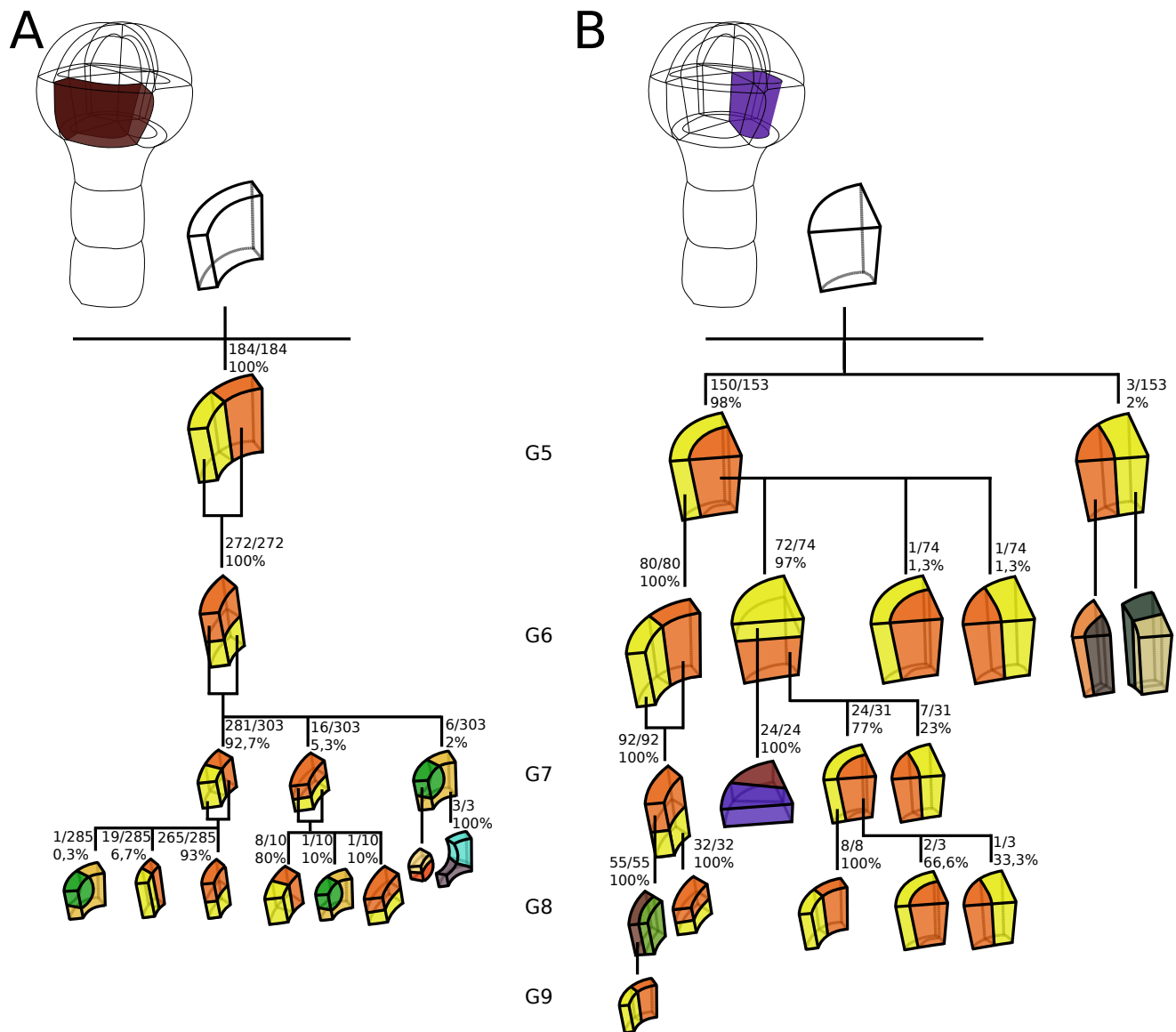


Figure 10: Sup 1. Material. (A) A raw image example, (B) Examples of segmented embryo surfaces, (C) An example of tree cell lineages, numbers are cell label and mother cell label.

Figure 11: Sup 2. Apical cell lineages from the G4 of the 47 *Arabidopsis thaliana* embryos.



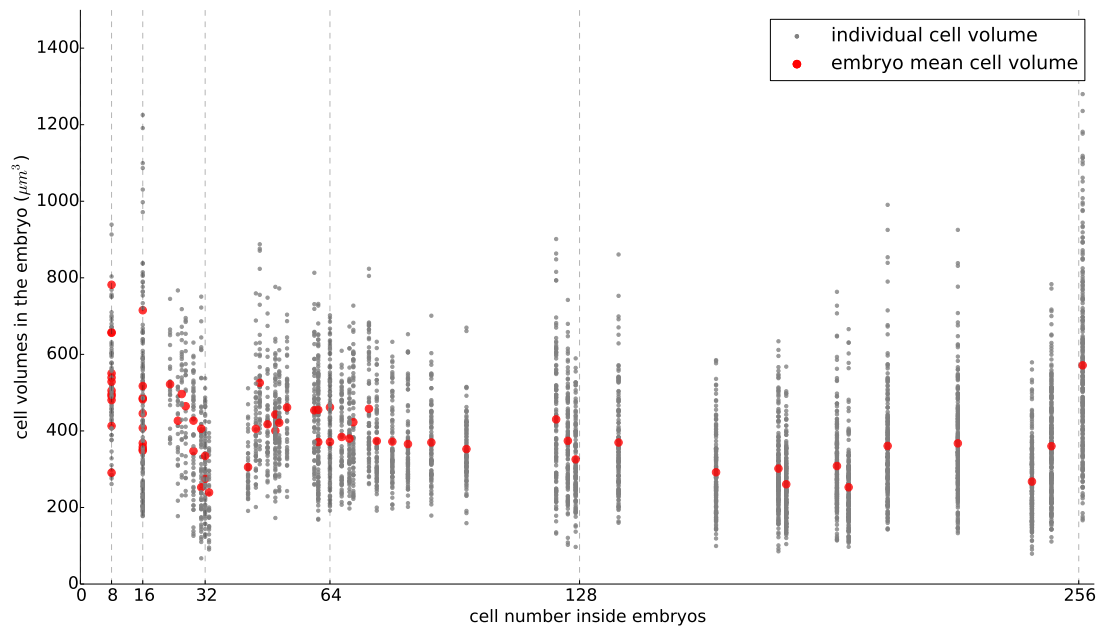


Figure 13: Cell volume distributions in each embryo

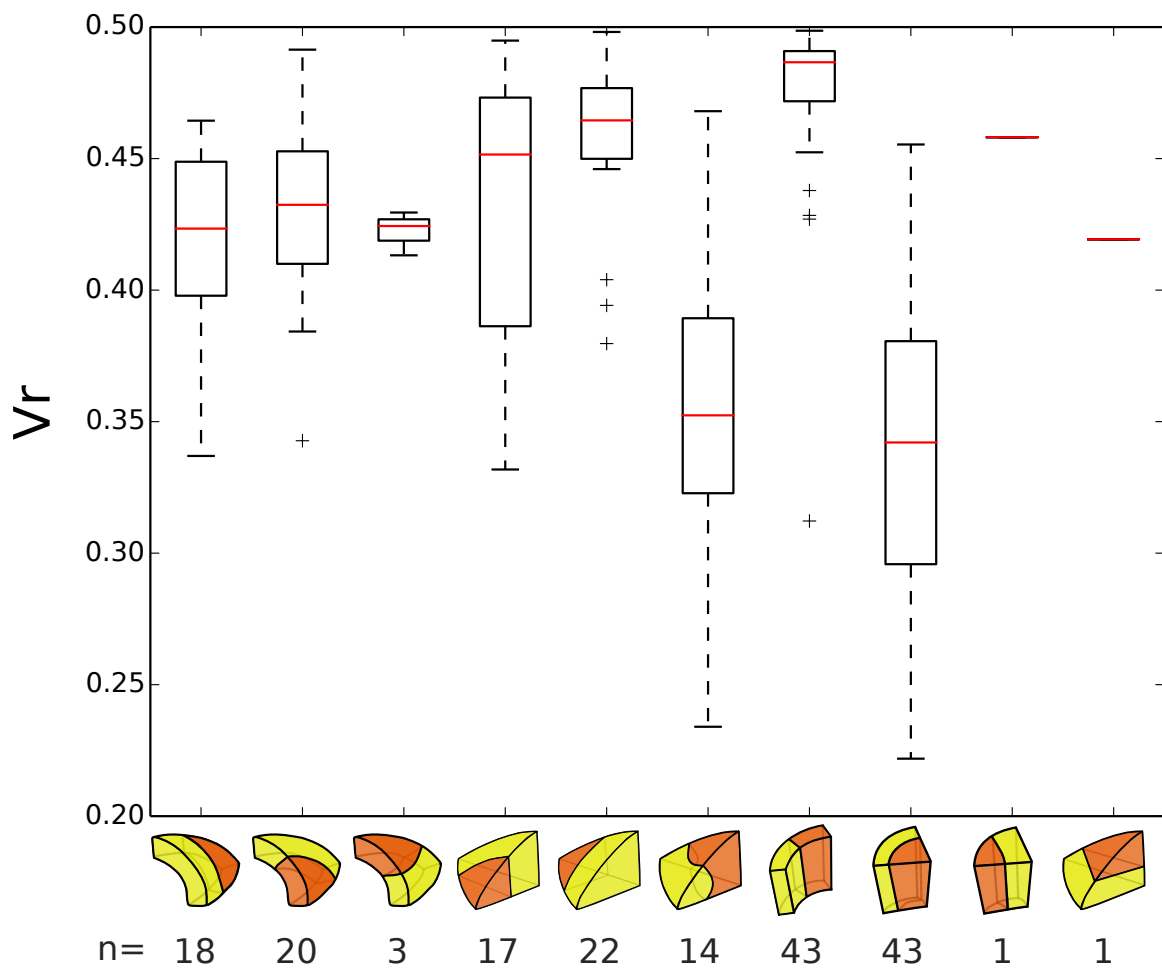


Figure 14: Distributions of volume ratios observed in each cell pattern at the G5.

References

- [1] M. K. Barton and R. S. Poethig. Formation of the shoot apical meristem in *arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. *Development*, 119(3):823–831, 1993.
- [2] George W Bassel, Petra Stamm, Gabriella Mosca, Pierre Barbier de Reuille, Daniel J Gibbs, Robin Winter, Ales Janka, Michael J Holdsworth, and Richard S Smith. Mechanical constraints imposed by 3D cellular geometry and arrangement modulate growth patterns in the *arabidopsis* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(23):8685–8690, 2014.
- [3] Sébastien Besson and Jacques Dumais. Universal rule for the symmetric division of plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(15):6294–6299, 2011.
- [4] L Errera. Über zellformen und seifenblasen. *Bot Centralbl*, 34:395–398, 1888.
- [5] Gerd Jürgens, Ulrike Mayer, Torres Ruiz Ramon A., Thomas Berleth, and Simon Miséra. Genetic analysis of pattern formation in the *arabidopsis* embryo. *Development*, 113(Supplement 1):27–38, 1991.
- [6] Gerd Jrgens. Cell division and morphogenesis in angiosperm embryogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 7(6):867 – 872, 1996.
- [7] Marion Louveaux, Jean-Daniel Julien, Vincent Mirabet, Arezki Boudaoud, and Olivier Hamant. Cell division plane orientation based on tensile stress in *arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, page 201600677, 2016.
- [8] Nicolas Minc and Matthieu Piel. Predicting division plane position and orientation. *Trends in Cell Biology*, 22(4):193 – 200, 2012.
- [9] Julien Moukhtar, Alain Trubuil, Katia Belcram, David Legland, Aurlie Urbain, Philippe Andrey, and Jean-Christophe Palauqui. Cell geometry determines symmetric and asymmetric division plane selection in *arabidopsis* early embryos. *En rvision*, 2016.
- [10] B. Scheres, L. Di Laurenzio, V. Willemsen, M. T. Hauser, K. Janmaat, P. Weisbeek, and P. N. Benfey. Mutations affecting the radial organisation of the *arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development*, 121(1):53–62, 1995.
- [11] Bruce E Shapiro, Cory Tobin, Eric Mjolsness, and Elliot M Meyerowitz. Analysis of cell division patterns in the *arabidopsis* shoot apical meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(15):4815–4820, 2015.
- [12] Viola Willemsen and Ben Scheres. Mechanisms of pattern formation in plant embryogenesis. *Annual Review of Genetics*, 38(1):587–614, 2004. PMID: 15568987.
- [13] Saiko Yoshida, Pierre Barbier de Reuille, Brendan Lane, George W. Bassel, Przemyslaw Prusinkiewicz, Richard S. Smith, and Dolf Weijers. Genetic control of plant development by overriding a geometric division rule. *Developmental Cell*, 29(1):75 – 87, 2014.

Chapitre 5

Discussion et perspectives

5.1 Conclusion

Grâce à la mise en place d'outils d'analyse et d'une collection d'embryons d'*Arabidopsis thaliana* jusqu'à 257 cellules, on a exploré la morphogénèse 3D de l'embryon à travers les processus cellulaires de division et de croissance. L'étude des stades de 32 cellules à 256 cellules dans l'embryon a apporté un phénotypage des événements de croissance cellulaire, de division et de changement de forme, au moment où le plan d'organisation de l'embryon est mis en place. La description apporte des informations quantitatives sur les événements cellulaires au cours du développement et des liens qu'ils peuvent avoir avec la forme qui émerge. L'embryon passe d'une forme hémisphérique avec une symétrie radiale à une forme de cœur avec deux symétries bilatérales avec une évolution progressive. Des croissances différentielles au sein des différentes parties de l'embryon semblent apporter une partie du changement de la forme comme une croissance importante dans les futurs tissus vasculaires qui apporte une forte élongation de la partie basale de l'embryon. L'émergence des cotylédons ne résulte pas d'une croissance cellulaire plus importante. Le taux de division reste le même au sein de l'embryon mais il y a un décalage entre les parties internes et les parties externes. Les parties externes ont moins d'une génération cellulaire de plus, peut-être due à leur émergence d'une cellule plus grosse que pour les parties internes.

La description des patterns cellulaires nous a montré une constance dans le comportement de division dans tout l'embryon au cours des générations. Une constance dans les géométries cellulaires rencontrées, dans les géométries cellulaires qu'elles peuvent générer et dans les types d'organisations de ces géométries. La variabilité est contrainte à un petit répertoire de possibilités.

Les formes dérivées de ces géométries ont des asymétries qui orientent des plans de divisions au sein de l'embryon. En utilisant la modélisation, on met en évidence une règle de division stochastique basée sur la forme cellulaire. Les simulations montrent que les plans de divisions observés sont des surfaces minimales passant par le centroïde de la cellule mère. Ceci est vrai pour toutes les parties de l'embryon à l'exception du domaine donnant les futurs tissus vasculaires (basal interne). Dans ce domaine, un autre facteur que la géométrie cellulaire semble influencer le positionnement du plan de division. Le changement, opéré par ce facteur, est progressif au cours des générations cellulaires. Au cours des générations cellulaires dans les futurs tissus de la racine, on voit une augmentation du nombre de couches cellulaires. Ces observations laissent à penser que les divisions suivent une règle proposée par Louveaux et al. [Louveaux et al., 2016] dont le facteur influant est le stress subit par la cellule. Le plan de division mis en place serait donc plus libre lorsque les contraintes sont faibles, avec une règle stochastique de minimisation d'une surface passant par le centroïde de la cellule mère, et plus les contraintes sont présentes plus la minimisation serait faible pour favoriser la minimisation du stress cellulaire. Cette règle basée sur trois facteurs (aire de la surface, stress mécanique et centroïde) serait présente tout le long du développement embryonnaire. D'autres facteurs pourraient être envisagés comme des facteurs moléculaires. Des mutants présentent des phénotypes altérés dans les patterns cellulaires des

tissus vasculaires [Rybel et al., 2013]. Ceci laisse penser que des facteurs génétiques contrôlent une partie de la mise en place de l'organisation cellulaire dans la partie basale interne. Ce sont des bons candidats pour contraindre la mise en place du plan de division.

5.2 Discussion

5.2.1 Limites

L'étude de l'embryon présente quelques limites qui restreignent la portée des résultats possibles surtout en l'absence de cinétique.

Les embryons fixés imposent des dynamiques approximatives. Pour avoir le comportement de la cellule le long du cycle de cellulaire d'autres méthodes devront être utilisées [Gooh et al., 2015]. Des interrogations sur l'évolution de la croissance de la cellule entre deux divisions, ou encore la régulation du rythme et de l'instant de division, ne peuvent pas être tranchées.

D'autre part, la nécessité de travailler avec des embryons fixés demande une grande quantité d'embryons pour avoir une description fine. Notre collection présente en plus une non-uniformité de la répartition des embryons au cours de l'embryogenèse surtout dans les stades tardifs où la variabilité a permis des organisations cellulaires parfois inattendu en l'absence d'un échantillonnage poussé de toutes les configurations possibles. Une plus grande quantité d'embryons permet d'approximer plus précisément les comportements. Par exemple, les fréquences observées des configurations cellulaires possibles dans l'embryon, peuvent changer d'une collection à une autre mais plus il y aura d'embryons moins l'incertitude sera grande. Un nombre important d'embryons permet d'avoir un grand échantillonnage de la variabilité possible et d'autre part de confirmer des tendances imprécise comme au niveau des évolutions morphologiques de l'embryon, ou encore de la quantification de la croissance cellulaire.

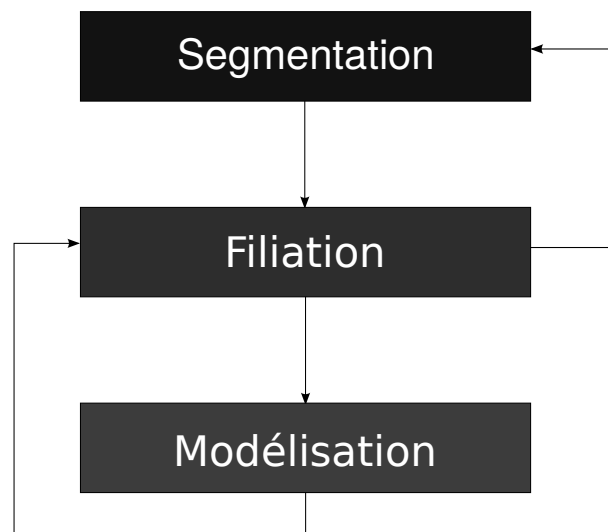


FIGURE 5.1 – Schéma des interactions entre les principales étapes de l'analyse

Le phénotypage de l'embryon a demandé l'agrandissement d'une collection d'embryons fixés et dont les organisations cellulaires ont été extraites et validées par plusieurs approches telles que l'œil expert mais également, par des retours expérimentaux comme la modélisation (figure 5.1). Chaque embryon de la collection a un arbre de filiation cellulaire qui est le plus probable parmi tous ceux possible. En effet, comme certaines configurations cellulaires sont obtenues par plusieurs histoires de divisions cellulaires, on ne peut être absolument sûr mais ces incertitudes ne remettent pas en question la structure générale de l'arbre basée sur les étapes stéréotypées de

l'embryogenèse. Les erreurs seront sur des sous-arbres. Les résultats descriptifs, tirés des filiations réalisées, ne sont pas impactés par l'incertitude de la filiation car cela se traduit souvent par des géométries et des volumes ratios similaires quelque soit le scénario de filiation.

Les arbres de filiation nous ont permis de reconstruire les cellules mères des divisions cellulaires. On a ainsi la géométrie proche de la cellule mère, aux croissances entre deux divisions près, mais également une approximation de la surface qui a divisé cette cellule selon une règle que l'on recherche. Le modèle de division a apporté une bonne reproduction des plans de division observés et il a permis de conclure à une règle de division proche d'une règle qui minimise de façon stochastique l'aire de la surface de division. L'algorithme de modélisation pour générer les surfaces minimales contient la dépendance à un autre paramètre : le volume ratio. Peut-être que d'autres volumes ratios minimiseraient plus la surface, tout en passant par le centroïde, que le volume ratio observé (qui est celui utilisé dans toutes les simulations réalisées dans les générations cellulaires supérieures à 3). D'autre part, le volume ratio observé, tout comme la géométrie de la cellule mère, peuvent avoir été modifiés dans le cas où de la croissance différentielle a été réalisée entre les deux cellules filles avant l'instant observé. Les résultats sont donc à replacer dans ce contexte et doivent être modulés par ces incertitudes dans les données. Ces incertitudes sont amplifiées par la résolution en terme d'imagerie qui approxime les volumes, par l'étape de segmentation qui peut modifier les géométries cellulaires. Le bruit du système peut apporter du bruit dans les résultats des simulations, les quantifications réalisées permettaient d'avoir des tendances plus que des valeurs fiables pour confronter les hypothèses.

On peut supposer que le volume ratio n'est pas un facteur régulé lors de la division et qu'il peut varier comme l'ont montré les distributions des volumes ratios des divisions identiques dans une même géométrie, à une même position dans l'embryon. Une modification de l'algorithme du modèle pour incorporer une contrainte dépendante du centroïde et pour supprimer la dépendance au paramètre de volume ratio, a apporté des solutions où l'une des cellules filles prend le dessus sur l'autre au niveau volumique avec une surface de division conique (testé et non montré). Cela montre que la présence de facteurs dépendant de la physique des membranes et des parois pour apporter une rigidité du plan de division est importante dans la mise en place du plan de division. À cette implémentation directe de la règle proposée par Moukhtar et al., l'ajout de contraintes de courbure à l'interface de division est envisagé.

5.2.2 Interprétations

Dans le processus de morphogenèse, les idées apportées par cette études tendent vers une régulation non-homogène dans l'embryon et plutôt progressive au cours des générations cellulaires, par des facteurs autres que la géométrie de la cellule. Une hypothèse est l'action de contraintes mécaniques que subit la cellule ou encore de facteurs moléculaires sur le mécanisme de division cellulaire. Ce peut être couplé à la régulation de la croissance des cellules par des facteurs qui peuvent être de nature mécanique, génétique ou encore hormonale.

Dans les mécanismes cellulaires de division et de croissance, il semble y avoir une importance de la géométrie cellulaire.

L'orientation des plans de division observés, sur l'ensemble des générations considérées dans cette études, semble essentiellement basées sur la géométrie de la cellule mère. Et elles expliquent le pattern cellulaire sous contrainte d'une croissance cellulaire isotrope. Ainsi, la simple géométrie cellulaire expliquerait la succession des événements cellulaires de division et donc le pattern cellulaire. Comme la morphologie est directement liée à l'organisation des cellules, on peut émettre l'hypothèse que la géométrie cellulaire du départ conditionne la morphologie embryonnaire à l'arrivée.

Mais plusieurs mutants semblent contredire cette hypothèse : le mutant *fass* qui a un pattern complètement modifié mais qui aboutit quand même à un embryon fonctionnel qui se développe avec des feuilles et des fleurs bien que celui-ci ne soit pas fertile, ou encore le mutant *ton*.

Dans ces mutants, les protéines ciblées sont souvent impliquées dans plusieurs processus essentiels et ne sont donc pas dissociées au niveau des effets observés. FASS est impliquée dans la division mais aussi la croissance, bien que la croissance du mutant semble sauvage (contrairement à *ton*), peut-être que de très légères modifications suffisent à modifier la géométrie de la cellule mère et ainsi à expliquer le pattern chaotique. Est-ce qu'un processus d'atténuation de la variabilité, comme la canalisation des patterns observée dans le sauvage, serait aussi l'un des mécanismes permettant l'émergence de la forme embryonnaire ?

Le processus de division a été approché de manière cellule centrée. Louveaux et al. ont montré que les contraintes générées par la présence de cellules environnantes peuvent influencer l'orientation du plan de division par la présence d'une contrainte mécanique [Louveaux et al., 2016]. D'autre part, la division est un processus dynamique, la division d'une cellule voisine peut modifier la géométrie d'une cellule [Gibson et al., 2011], si cette cellule est en cours de division y aura-t-il des modifications ?

On peut se demander à quel point la croissance, et les contraintes qu'elle génère, impacte le patterning ?

En 1990, Scheres et al. avaient également décrit en 2D le pattern du domaine basal de l'embryon sur quelques générations et parfois bien moins précisément mais ils avaient observé une variabilité, avec la présence d'une alternative, moins observée, à la division péricle (cas A de la figure 5.2) : une orientation de la nouvelle paroi qu'ils ont appelée tangentielle (cas B de la figure 5.2). Ne trouvant pas de trace dans les embryons plus tardifs de cette alternative, ils en ont conclu qu'un glissement des parois permettait de retrouver la même organisation que pour des divisions péricle. Dans la précédente étude, cette division alternative a été retrouvée 3 fois dans toute la collection d'embryons (freq. 2%). Les trois embryons concernés étaient soit à cette génération soit à une génération plus tardive mais aucune trace n'a été retrouvée après. Une hypothèse peut être effectivement un jeu des contraintes dû à la croissance qui réorganiserait légèrement les cellules dans une configuration qui n'est pas distinguable de la configuration prédominante. Cette hypothèse laisse penser que la variabilité cellulaire peut être « rattrapée » au niveau du pattern cellulaire. D'autre part, cette configuration ne devrait pas être confondue avec le pattern classique, qui n'a que deux cellules cuboïdales en périphérie contre 3 dans la configuration alternative.

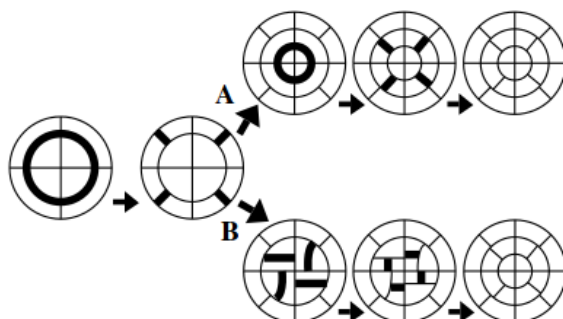


FIGURE 5.2 – Schéma des patterns observés dans la partie basale de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana* en coupe transversale, (extrait de [Scheres et al., 1995]).

5.3 Perspectives

Au delà de cette étude, cette collection d'embryons peut être analysée avec d'autres méthodes pour apporter des réponses à des questions actuelles comme l'impact de l'agencement cellulaire 3D sur la distribution des facteurs transportés et diffusés [De Rybel et al., 2014]. Ou même sur les contraintes exercées au sein de l'embryon et leurs impacts sur l'organisation cellulaire. Ou encore apporter une référence pour valider des outils de segmentations, des méthodes automatiques de filiation, des modèles cellulaires 3D de croissances...

Pour confirmer les interprétations faites sur la présence de croissances différentielles entre les différents domaines de l'embryon, la modélisation d'un mécanisme de croissance ajouté au modèle de division est une des prochaines étapes. Ainsi cela permettrait de savoir si sans l'influence de facteurs génétique ou moléculaire, uniquement avec des mécanismes physiques, on peut faire émerger la forme de cœur à partir de la géométrie du zygote. Et ainsi prédire l'évolution morphologique d'un système multicellulaire.

D'autre part, des observations réalisées par d'autres laboratoires montrent des comportements cellulaires ou morphologiques dans l'embryon qui peuvent être liés aux descriptions faites dans cette thèse. Un regard nouveau peut être fait sur l'impact des facteurs moléculaires sur les événements de division et de croissance cellulaire dans la mise en place de la morphologie de l'embryon. Plusieurs raisons peuvent entraîner la perte d'une morphologie, comme celle observée dans les mutants tels que les mutants auxiniques ou les mutants du cytosquelette. Avoir une référence sur les événements cellulaires permet de cibler dans les mutants les processus défaillants pour déterminer quelles sont les acteurs de leur régulation.

Bibliographie

- [Abera et al., 2014] Abera, M. K., Verboven, P., Defraeye, T., Fanta, S. W., Hertog, M. L. A. T. M., Carmeliet, J., and Nicolai, B. M. (2014). A plant cell division algorithm based on cell biomechanics and ellipse-fitting. *Annals of Botany*, 114(4) :605–617. 27, 28
- [Abid et al., 2010] Abid, G., Jaquemin, J.-M., Sassi, K., Muhovski, Y., Toussaint, A., and Baudoin, J.-P. (2010). Gene expression and genetic analysis during higher plants embryogenesis. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement= Biotechnology, Agronomy, Society and Environment [= BASE]*, 14(4) :667–680. 17, 38
- [Aida et al., 1999] Aida, M., Ishida, T., and Tasaka, M. (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during arabidopsis embryogenesis : interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development*, 126(8) :1563–1570. 13, 17
- [Aida et al., 2002] Aida, M., Vernoux, T., Furutani, M., Traas, J., and Tasaka, M. (2002). Roles of PIN-FORMED1 and MONOPTEROS in pattern formation of the apical region of the arabidopsis embryo. *Development*, 129(17) :3965–3974. 17, 34
- [Alim et al., 2012] Alim, K., Hamant, O., and Boudaoud, A. (2012). Regulatory role of cell division rules on tissue growth heterogeneity. *Frontiers in Plant Science*, 3 :174. 9, 27, 31, 58, 83
- [Anderson et al., 2010] Anderson, C. T., Carroll, A., Akhmetova, L., and Somerville, C. (2010). Real-time imaging of cellulose reorientation during cell wall expansion in arabidopsis roots. *Plant Physiology*, 152(2) :787–796. 31
- [Barbier de Reuille et al., 2015] Barbier de Reuille, P., Routier-Kierzkowska, A.-L., Kierzkowski, D., Bassel, G. W., Schüpbach, T., Tauriello, G., Bajpai, N., Strauss, S., Weber, A., Kiss, A., et al. (2015). MorphoGraphX : a platform for quantifying morphogenesis in 4D. *Elife*, 4 :e05864. 47, 61
- [Barton and Poethig, 1993a] Barton, M. K. and Poethig, R. S. (1993a). Formation of the shoot apical meristem in arabidopsis thaliana : an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. *Development*, 119(3) :823–831. 10, 15
- [Barton and Poethig, 1993b] Barton, M. K. and Poethig, R. S. (1993b). Formation of the shoot apical meristem in arabidopsis thaliana : an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. *Development*, 119(3) :823–831. 17
- [Baskin, 2005] Baskin, T. I. (2005). Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21 :203–222. 31, 37
- [Baskin et al., 2004] Baskin, T. I., Beemster, G. T., Judy-March, J. E., and Marga, F. (2004). Disorganization of cortical microtubules stimulates tangential expansion and reduces the uniformity of cellulose microfibril alignment among cells in the root of arabidopsis. *Plant Physiology*, 135(4) :2279–2290. 31
- [Bassel et al., 2014] Bassel, G. W., Stamm, P., Mosca, G., de Reuille, P. B., Gibbs, D. J., Winter, R., Janka, A., Holdsworth, M. J., and Smith, R. S. (2014). Mechanical constraints imposed by 3D cellular geometry and arrangement modulate growth patterns in the arabidopsis embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(23) :8685–8690. 8, 10, 32

- [Beemster et al., 2002] Beemster, G. T., De Vusser, K., De Tavernier, E., De Bock, K., and Inzé, D. (2002). Variation in growth rate between arabidopsis ecotypes is correlated with cell division and a-type cyclin-dependent kinase activity. *Plant Physiology*, 129(2) :854–864. 9
- [Besson and Dumais, 2011] Besson, S. and Dumais, J. (2011). Universal rule for the symmetric division of plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(15) :6294–6299. 7, 24, 25, 30, 40, 83
- [Bilsborough et al., 2011] Bilsborough, G. D., Runions, A., Barkoulas, M., Jenkins, H. W., Hasson, A., Galinha, C., Laufs, P., Hay, A., Prusinkiewicz, P., and Tsiantis, M. (2011). Model for the regulation of arabidopsis thaliana leaf margin development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(8) :3424–3429. 9
- [Boudon et al., 2015] Boudon, F., Chopard, J., Ali, O., Gilles, B., Hamant, O., Boudaoud, A., Traas, J., and Godin, C. (2015). A computational framework for 3D mechanical modeling of plant morphogenesis with cellular resolution. *PLoS Comput Biol*, 11(1) :e1003950. 9, 10, 32
- [Brakke, 1992] Brakke, K. A. (1992). The surface evolver. *Experimental mathematics*, 1(2) :141–165. 39
- [Bullard and Garboczi, 2013] Bullard, J. W. and Garboczi, E. J. (2013). Defining shape measures for 3D star-shaped particles : Sphericity, roundness, and dimensions. *Powder Technology*, 249 :241 – 252. 60
- [Camilleri et al., 2002] Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O., and Bouchez, D. (2002). The arabidopsis TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *The Plant Cell*, 14(4) :833–845. 20, 31
- [Capron et al., 2009] Capron, A., Chatfield, S., Provar, N., and Berleth, T. (2009). Embryogenesis : pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis Book*, page e0126. 37
- [Carpita and Gibeaut, 1993] Carpita, N. C. and Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants : consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1) :1–30. 30
- [Chin-Atkins et al., 1996] Chin-Atkins, A. N., Craig, S., Hocart, C. H., Dennis, E. S., and Chaudhury, A. M. (1996). Increased endogenous cytokinin in the arabidopsis amp1 mutant corresponds with de-etiolation responses. *Planta*, 198(4) :549–556. 37
- [Cignoni et al., 2008] Cignoni, P., Callieri, M., Corsini, M., Dellepiane, M., Ganovelli, F., and Ranzuglia, G. (2008). Meshlab : an open-source mesh processing tool. In *Eurographics Italian Chapter Conference*, volume 2008, pages 129–136. 61
- [Colette et al., 2015] Colette, A., Lu, K.-J., and Weijers, D. (2015). Building a plant : cell fate specification in the early arabidopsis embryo. *Development*, 142(3) :420–430. 37
- [Cosgrove, 2005] Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology*, 6(11) :850–861. 30
- [De Rybel et al., 2014] De Rybel, B., Adibi, M., Breda, A. S., Wendrich, J. R., Smit, M. E., Novák, O., Yamaguchi, N., Yoshida, S., Van Isterdael, G., Palovaara, J., Nijse, B., Boekschoten, M. V., Hooiveld, G., Beeckman, T., Wagner, D., Ljung, K., Fleck, C., and Weijers, D. (2014). Integration of growth and patterning during vascular tissue formation in arabidopsis. *Science*, 345(6197). 37, 121
- [Dubrovsky et al., 2001] Dubrovsky, J. G., Rost, T. L., Colón-Carmona, A., and Doerner, P. (2001). Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in arabidopsis thaliana. *Planta*, 214(1) :30–36. 8
- [Dupuy et al., 2010] Dupuy, L., Mackenzie, J., and Haseloff, J. (2010). Coordination of plant cell division and expansion in a simple morphogenetic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(6) :2711–2716. 9, 39, 58

- [Emons and Mulder, 2000] Emons, A. M. C. and Mulder, B. M. (2000). How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. *Trends in Plant Science*, 5(1) :35 – 40. 31
- [Errera, 1888] Errera, L. (1888). Über zellformen und seifenblasen. *Bot Centralbl*, 34 :395–398. 23, 83
- [Fernandez et al., 2010] Fernandez, R., Das, P., Mirabet, V., Moscardi, E., Traas, J., Verdeil, J.-L., Malandain, G., and Godin, C. (2010). Imaging plant growth in 4D : robust tissue reconstruction and lineaging at cell resolution. *Nature methods*, 7(7) :547–553. 48
- [Flanders et al., 1990] Flanders, D. J., Rawlins, D. J., Shaw, P. J., and Lloyd, C. W. (1990). Nucleus-associated microtubules help determine the division plane of plant epidermal cells : avoidance of four-way junctions and the role of cell geometry. *The Journal of cell biology*, 110(4) :1111–1122. 18
- [Fozard et al., 2013] Fozard, J., Lucas, M., King, J., and Jensen, O. (2013). Vertex-element models for anisotropic growth of elongated plant organs. *Frontiers in Plant Science*, 4 :233. 58
- [Friml et al., 2003] Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., and Jürgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of arabidopsis. *Nature*, 426(6963) :147–153. 33
- [Furutani et al., 2004] Furutani, M., Vernoux, T., Traas, J., Kato, T., Tasaka, M., and Aida, M. (2004). PIN-FORMED1 and PINOID regulate boundary formation and cotyledon development in arabidopsis embryogenesis. *Development*, 131(20) :5021–5030. 34
- [Gatzke and Grimm, 2006] Gatzke, T. D. and Grimm, C. M. (2006). Estimating curvature on triangular meshes. *International journal of shape modeling*, 12(01) :1–28. 61
- [Geisler et al., 2003] Geisler, M. J., Deppong, D. O., Nadeau, J. A., and Sack, F. D. (2003). Stomatal neighbor cell polarity and division in arabidopsis. *Planta*, 216(4) :571–579. 29, 30
- [Geitmann and Ortega, 2009] Geitmann, A. and Ortega, J. K. (2009). Mechanics and modeling of plant cell growth. *Trends in plant science*, 14(9) :467–478. 31
- [Gibson et al., 2011] Gibson, W. T., Veldhuis, J. H., Rubinstein, B., Cartwright, H. N., Perrimon, N., Brodland, G. W., Nagpal, R., and Gibson, M. C. (2011). Control of the mitotic cleavage plane by local epithelial topology. *Cell*, 144(3) :427 – 438. 120
- [Goh et al., 2012] Goh, T., Joi, S., Mimura, T., and Fukaki, H. (2012). The establishment of asymmetry in arabidopsis lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development*, 139(5) :883–893. 29
- [Goodbody et al., 1991] Goodbody, K., Venverloo, C., and Lloyd, C. (1991). Laser microsurgery demonstrates that cytoplasmic strands anchoring the nucleus across the vacuole of premitotic plant cells are under tension. implications for division plane alignment. *Development*, 113(3) :931–939. 19
- [Gooh et al., 2015] Gooh, K. et al. (2015). Live-cell imaging and optical manipulation of arabidopsis early embryogenesis. *Dev. Cell*, 34(2) :242 – 251. 10, 12, 14, 20, 44, 74, 118
- [Green and Brooks, 1978] Green, P. B. and Brooks, K. E. (1978). Stem formation from a succulent leaf : its bearing on theories of axiation. *American Journal of Botany*, pages 13–26. 31
- [Haecker et al., 2004] Haecker, A., Groß-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M., and Laux, T. (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in arabidopsis thaliana. *Development*, 131(3) :657–668. 20, 21
- [Hamann et al., 1999] Hamann, T., Mayer, U., and Jurgens, G. (1999). The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the arabidopsis embryo. *Development*, 126(7) :1387–1395. 33, 36

- [Hamant et al., 2008] Hamant, O., Heisler, M. G., Jönsson, H., Krupinski, P., Uyttewaal, M., Borkov, P., Corson, F., Sahlén, P., Boudaoud, A., Meyerowitz, E. M., et al. (2008). Developmental patterning by mechanical signals in arabidopsis. *science*, 322(5908) :1650–1655. 37
- [Hege et al., 1997] Hege, H.-C., STALLING, D., SEEBASS, M., and Zockler, M. (1997). A generalized marching cubes algorithm based on non-binary. Technical report, Citeseer. 50
- [Hertwig, 1884] Hertwig, O. (1884). The problem of fertilization and of isotropy of the egg, a theory of heredity. *Jena Z Naturwiss*, 18 :21–23. 23, 83
- [Hofmeister, 1863] Hofmeister, W. (1863). Zusätze und berichtigungen zu den 1851 veröffentlichten untersuchungen der entwicklung höherer kryptogamen. *Jahrbucher für Wissenschaft und Botanik*, 3 :259–293. 22, 83
- [Jenik et al., 2005] Jenik, P. D., Jurkuta, R. E., and Barton, M. K. (2005). Interactions between the cell cycle and embryonic patterning in arabidopsis uncovered by a mutation in DNA polymerase ϵ . *The Plant Cell*, 17(12) :3362–3377. 14, 73
- [Jürgens et al., 1991] Jürgens, G., Mayer, U., Ramon A., T. R., Berleth, T., and Miséra, S. (1991). Genetic analysis of pattern formation in the arabidopsis embryo. *Development*, 113(Supplement 1) :27–38. 10, 12, 17
- [Jürgens, 1996] Jürgens, G. (1996). Cell division and morphogenesis in angiosperm embryogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 7(6) :867 – 872. 15
- [Kass et al., 1988] Kass, M., Witkin, A., and Terzopoulos, D. (1988). Snakes : Active contour models. *International journal of computer vision*, 1(4) :321–331. 45
- [Kennaway et al., 2011] Kennaway, R., Coen, E., Green, A., and Bangham, A. (2011). Generation of diverse biological forms through combinatorial interactions between tissue polarity and growth. *PLoS Comput Biol*, 7(6) :e1002071. 31, 33
- [Korn, 1974] Korn, R. W. (1974). The three-dimensional shape of plant cells and its relationship to pattern of tissue growth. *New Phytologist*, 73(5) :927–935. 52
- [Kroon, 2014] Kroon, D.-J. (2014). Patch Curvature. <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/32573-patch-curvature>. 61, 63
- [Kuchen et al., 2012] Kuchen, E. E., Fox, S., Barbier de Reuille, P., Kennaway, R., Bensmihen, S., Avondo, J., Calder, G. M., Southam, P., Robinson, S., Bangham, A., and Coen, E. (2012). Generation of leaf shape through early patterns of growth and tissue polarity. *Science*, 335(6072) :1092–1096. 9
- [Lau et al., 2012] Lau, S., Slane, D., Herud, O., Kong, J., and Jürgens, G. (2012). Early embryogenesis in flowering plants : Setting up the basic body pattern. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1) :483–506. PMID : 22224452. 10, 37
- [Laurenzio et al., 1996] Laurenzio, L. D., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M. G., Feldmann, K. A., and Benfey, P. N. (1996). The {SCARECROW} gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the arabidopsis root. *Cell*, 86(3) :423 – 433. 15, 18, 21
- [Laux et al., 2004] Laux, T., Würschum, T., and Breuninger, H. (2004). Genetic regulation of embryonic pattern formation. *Plant Cell*, 16 :S190–S202. 13
- [Le et al., 2010] Le, B. H., Cheng, C., Bui, A. Q., Wagmaister, J. A., Henry, K. F., Pelletier, J., Kwong, L., Belmonte, M., Kirkbride, R., Horvath, S., Drews, G. N., Fischer, R. L., Okamoto, J. K., Harada, J. J., and Goldberg, R. B. (2010). Global analysis of gene activity during arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(18) :8063–8070. 11
- [Legland et al., 2016] Legland, D., Arganda-Carreras, I., and Andrey, P. (2016). MorphoLibJ : integrated library and plugins for mathematical morphology with imagej. *Bioinformatics*, page btw413. 48, 49

- [Lichtenegger et al., 1999] Lichtenegger, H., Reiterer, A., Stanzl-Tschegg, S., and Fratzl, P. (1999). Variation of cellulose microfibril angles in softwoods and hardwoods—a possible strategy of mechanical optimization. *Journal of Structural Biology*, 128(3) :257 – 269. 37
- [Lie et al., 2012] Lie, C., Kelsom, C., and Wu, X. (2012). WOX2 and STIMPY-LIKE/WOX8 promote cotyledon boundary formation in arabidopsis. *The Plant Journal*, 72(4) :674–682. 20
- [Lloyd, 1989] Lloyd, C. (1989). The plant cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 1(1) :30 – 35. 18
- [Lloyd, 1991] Lloyd, C. W. (1991). *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. London, etc. : Academic Press. 31, 32
- [Lockhart, 1965] Lockhart, J. A. (1965). An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of Theoretical Biology*, 8(2) :264 – 275. 31
- [Long and Barton, 1998] Long, J. and Barton, M. (1998). The development of apical embryonic pattern in arabidopsis. *Development*, 125(16) :3027–3035. 76
- [Louveaux et al., 2016] Louveaux, M., Julien, J.-D., Mirabet, V., Boudaoud, A., and Hamant, O. (2016). Cell division plane orientation based on tensile stress in arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, page 201600677. 7, 9, 24, 27, 31, 117, 120
- [Mansfield and Briarty, 1991] Mansfield, S. G. and Briarty, L. G. (1991). Early embryogenesis in arabidopsis thaliana. ii. the developing embryo. *Canadian Journal of Botany*, 69(3) :461–476. 12
- [Mayer et al., 1993] Mayer, U., Buttner, G., and Jurgens, G. (1993). Apical-basal pattern formation in the arabidopsis embryo : studies on the role of the gnom gene. *Development*, 117(1) :149–162. 36
- [Mayer et al., 1991] Mayer, U., Ruiz, R. A. T., Berleth, T., Miseera, S., and Juurgens, G. (1991). Mutations affecting body organization in the arabidopsis embryo. *Nature*, 353(6343) :402–407. 10, 11, 12, 17
- [Minc et al., 2011] Minc, N., Burgess, D., and Chang, F. (2011). Influence of cell geometry on division-plane positioning. *Cell*, 144(3) :414 – 426. 26
- [Minc and Piel, 2012] Minc, N. and Piel, M. (2012). Predicting division plane position and orientation. *Trends in Cell Biology*, 22(4) :193 – 200. 22, 23, 24, 25, 26
- [Mirabet et al., 2011] Mirabet, V., Das, P., Boudaoud, A., and Hamant, O. (2011). The role of mechanical forces in plant morphogenesis. *Annual review of plant biology*, 62 :365–385. 31
- [Moukhtar et al., 2016] Moukhtar, J., Trubuil, A., Belcram, K., Legland, D., Urbain, A., Andrey, P., and Palauqui, J.-C. (2016). Cell geometry determines symmetric and asymmetric division plane selection in arabidopsis early embryos. *En révision*. 13, 26, 28, 40, 41, 47, 59, 72, 75, 83, 90, 92, 93
- [Murata and Wada, 1991] Murata, T. and Wada, M. (1991). Effects of centrifugation on preprophase-band formation in adiantum protonemata. *Planta*, 183(3) :391–398. 29
- [Möller and Weijers, 2009] Möller, B. and Weijers, D. (2009). Auxin control of embryo patterning. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(5). 35
- [Paredes et al., 2006] Paredes, A. R., Somerville, C. R., and Ehrhardt, D. W. (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*, 312(5779) :1491–1495. 31
- [Perrot-Rechenmann, 2010] Perrot-Rechenmann, C. (2010). Cellular responses to auxin : Division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5). 58
- [Petrášek and Friml, 2009] Petrášek, J. and Friml, J. (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136(16) :2675–2688. 35

- [Pound et al., 2012] Pound, M. P., French, A. P., Wells, D. M., Bennett, M. J., and Pridmore, T. P. (2012). CellSeT : novel software to extract and analyze structured networks of plant cells from confocal images. *The Plant Cell*, 24(4) :1353–1361. 45
- [Péret et al., 2009] Péret, B., Rybel, B. D., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplace, L., Beeckman, T., and Bennett, M. J. (2009). Arabidopsis lateral root development : an emerging story. *Trends in Plant Science*, 14(7) :399 – 408. 9
- [Ramachandran and Varoquaux, 2011] Ramachandran, P. and Varoquaux, G. (2011). Mayavi : 3D Visualization of Scientific Data. *Computing in Science & Engineering*, 13(2) :40–51. 52
- [Rasmussen et al., 2011] Rasmussen, C. G., Humphries, J. A., and Smith, L. G. (2011). Determination of symmetric and asymmetric division planes in plant cells. *Annual Review of Plant Biology*, 62(1) :387–409. PMID : 21391814. 8, 19, 20
- [Reddy et al., 2004] Reddy, G. V., Heisler, M. G., Ehrhardt, D. W., and Meyerowitz, E. M. (2004). Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of arabidopsis thaliana. *Development*, 131(17) :4225–4237. 58
- [Reinhardt and Kuhlemeier, 2002] Reinhardt, D. and Kuhlemeier, C. (2002). Plant architecture. *EMBO reports*, 3(9) :846–851. 58
- [Robert et al., 2013] Robert, H. S., Grones, P., Stepanova, A. N., Robles, L. M., Lokerse, A. S., Alonso, J. M., Weijers, D., and Friml, J. (2013). Local auxin sources orient the apical-basal axis in arabidopsis embryos. *Current Biology*, 23(24) :2506 – 2512. 33
- [Robinson et al., 2013] Robinson, S., Burian, A., Couturier, E., Landrein, B., Louveaux, M., Neumann, E. D., Peaucelle, A., Weber, A., and Nakayama, N. (2013). Mechanical control of morphogenesis at the shoot apex. *Journal of experimental botany*, page ert199. 9
- [Rodriguez et al., 2013] Rodriguez, J. M., Edeskär, T., and Knutsson, S. (2013). Particle shape quantities and measurement techniques—a review. *Electronic Journal of Geotechnical Engineering*, 18 :169–198. 60
- [Roudier et al., 2010] Roudier, F., Gissot, L., Beaudoin, F., Haslam, R., Michaelson, L., Marion, J., Molino, D., Lima, A., Bach, L., Morin, H., Tellier, F., Palauqui, J.-C., Bellec, Y., Renne, C., Miquel, M., DaCosta, M., Vignard, J., Rochat, C., Markham, J. E., Moreau, P., Napier, J., and Faure, J.-D. (2010). Very-long-chain fatty acids are involved in polar auxin transport and developmental patterning in arabidopsis. *The Plant Cell*, 22(2) :364–375. 35
- [Rusinkiewicz, 2004] Rusinkiewicz, S. (2004). Estimating curvatures and their derivatives on triangle meshes. In *3D Data Processing, Visualization and Transmission, 2004. 3DPVT 2004. Proceedings. 2nd International Symposium on*, pages 486–493. IEEE. 61
- [Rybel et al., 2013] Rybel, B. D., Möller, B., Yoshida, S., Grabowicz, I., de Reuille, P. B., Boeren, S., Smith, R. S., Borst, J. W., and Weijers, D. (2013). A bHLH complex controls embryonic vascular tissue establishment and indeterminate growth in arabidopsis. *Developmental Cell*, 24(4) :426 – 437. 12, 15, 35, 85, 118
- [Sachs, 1887] Sachs, J. v. (1887). Lecture XXVII. relations between growth and cell-division in the embryonic tissues. *lectures in plant physiology. clarendon Press, Oxford*, pages 431–459. 22
- [Sahlin and Jönsson, 2010] Sahlin, P. and Jönsson, H. (2010). A modeling study on how cell division affects properties of epithelial tissues under isotropic growth. *PloS one*, 5(7) :e11750. 9, 27, 31
- [Saulsberry et al., 2002] Saulsberry, A., Martin, P. R., O’Brien, T., Sieburth, L. E., and Pickett, F. B. (2002). The induced sector arabidopsis apical embryonic fate map. *Development*, 129(14) :3403–3410. 12, 15, 76, 79
- [Scheres et al., 1995] Scheres, B., Di Laurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M. T., Janmaat, K., Weisbeek, P., and Benfey, P. N. (1995). Mutations affecting the radial organisation of

- the arabidopsis root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development*, 121(1) :53–62. 15, 120
- [Schindelin et al., 2012] Schindelin, J. et al. (2012). Fiji : an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, 9(7) :676–682. 48
- [Schmid et al., 2010] Schmid, B., Schindelin, J., Cardona, A., Longair, M., and Heisenberg, M. (2010). A high-level 3D visualization API for Java and ImageJ. *BMC bioinformatics*, 11(1) :1. 52
- [Schulz and Jensen, 1968] Schulz, S. R. and Jensen, W. (1968). Capsella embryogenesis : The early embryo. *Journal of Ultrastructure Research*, 22(5) :376 – 392. 12
- [Shapiro et al., 2015] Shapiro, B. E., Tobin, C., Mjolsness, E., and Meyerowitz, E. M. (2015). Analysis of cell division patterns in the arabidopsis shoot apical meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(15) :4815–4820. 9, 27, 30
- [Smith, 2003] Smith, L. G. (2003). Cytoskeletal control of plant cell shape : getting the fine points. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(1) :63 – 73. 31
- [Smolarkiewicz and Dhonukshe, 2013] Smolarkiewicz, M. and Dhonukshe, P. (2013). Formative cell divisions : principal determinants of plant morphogenesis. *Plant and Cell Physiology*, 54(3) :333–342. 37
- [Soille, 2003] Soille, P. (2003). *Morphological image analysis : principles and applications*. Springer Science & Business Media. 48
- [Sommer et al., 2011] Sommer, C., Straehle, C., Köthe, U., and Hamprecht, F. A. (2011). Ilastik : Interactive learning and segmentation toolkit. In *2011 IEEE international symposium on biomedical imaging : From nano to macro*, pages 230–233. IEEE. 45
- [Spinner et al., 2013] Spinner, L., Gadeyne, A., Belcram, K., Goussot, M., Moison, M., Duroc, Y., Eeckhout, D., De Winne, N., Schaefer, E., Van De Slijke, E., Persiau, G., Witters, E., Gevaert, K., De Jaeger, G., Bouchez, D., Van Damme, D., and Pastuglia, M. (2013). A protein phosphatase 2A complex spatially controls plant cell division. *Nat Commun*, 4 :1863. 19, 20
- [Steger, 1998] Steger, C. (1998). An unbiased detector of curvilinear structures. *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence*, 20(2) :113–125. 47
- [Steinmann et al., 1999] Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C. L., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K., and Jürgens, G. (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science*, 286(5438) :316–318. 33
- [Torres-Ruiz and Jurgens, 1994] Torres-Ruiz, R. and Jurgens, G. (1994). Mutations in the FASS gene uncouple pattern formation and morphogenesis in arabidopsis development. *Development*, 120(10) :2967–2978. 20
- [Truernit et al., 2008] Truernit, E. et al. (2008). High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in arabidopsis. *Plant Cell*, 20(6) :1494–1503. 44
- [Van Damme and Geelen, 2008] Van Damme, D. and Geelen, D. (2008). Demarcation of the cortical division zone in dividing plant cells. *Cell Biology International*, 32(2) :178–187. 19
- [van den Berg et al., 1995] van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1995). Cell fate in the arabidopsis root meristem determined by directional signalling. *Nature*. 15, 16, 20
- [Vanneste and Friml, 2009] Vanneste, S. and Friml, J. (2009). Auxin : A trigger for change in plant development. *Cell*, 136(6) :1005 – 1016. 36
- [Vidaurre et al., 2007] Vidaurre, D. P., Ploense, S., Krogan, N. T., and Berleth, T. (2007). AMP1 and MP antagonistically regulate embryo and meristem development in arabidopsis. *Development*, 134(14) :2561–2567. 37

- [Vilches-Barro and Maizel, 2015] Vilches-Barro, A. and Maizel, A. (2015). Talking through walls : mechanisms of lateral root emergence in *arabidopsis thaliana*. *Current opinion in plant biology*, 23 :31–38. 29
- [Vincent and Soille, 1991] Vincent, L. and Soille, P. (1991). Watersheds in digital spaces : an efficient algorithm based on immersion simulations. *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*, 13(6) :583–598. 45, 46
- [von Wangenheim et al., 2016] von Wangenheim, D., Fangerau, J., Schmitz, A., Smith, R. S., Leitte, H., Stelzer, E. H., and Maizel, A. (2016). Rules and self-organizing properties of post-embryonic plant organ cell division patterns. *Current Biology*, 26(4) :439–449. 10
- [Wabnik et al., 2013] Wabnik, K., Robert, H. S., Smith, R. S., and Friml, J. (2013). Modeling framework for the establishment of the apical-basal embryonic axis in plants. *Current Biology*, 23(24) :2513 – 2518. 33, 37
- [Wadell, 1935] Wadell, H. (1935). Volume, shape, and roundness of quartz particles. *The Journal of Geology*, 43(3) :250–280. 60
- [Wang et al., 2015] Wang, Y., Dou, M., and Zhou, Z. (2015). The fencing problem and coleochaete cell division. *Journal of Mathematical Biology*, 70(4) :893–912. 9, 39
- [Willemsen and Scheres, 2004] Willemsen, V. and Scheres, B. (2004). Mechanisms of pattern formation in plant embryogenesis. *Annual Review of Genetics*, 38(1) :587–614. PMID : 15568987. 15
- [Xiong et al., 2014] Xiong, F., Ma, W., Hiscock, T. W., Mosaliganti, K. R., Tentner, A. R., Brakke, K. A., Rannou, N., Gelas, A., Souhait, L., Swinburne, I. A., et al. (2014). Interplay of cell shape and division orientation promotes robust morphogenesis of developing epithelia. *Cell*, 159(2) :415–427. 39
- [Yoshida et al., 2014] Yoshida, S., de Reuille, P. B., Lane, B., Bassel, G. W., Prusinkiewicz, P., Smith, R. S., and Weijers, D. (2014). Genetic control of plant development by overriding a geometric division rule. *Developmental Cell*, 29(1) :75 – 87. 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 21, 22, 26, 30, 40, 41, 59, 72, 75, 76, 81, 83, 85, 92
- [Zhao and Sack, 1999] Zhao, L. and Sack, F. D. (1999). Ultrastructure of stomatal development in *arabidopsis* (brassicaceae) leaves. *American Journal of Botany*, 86(7) :929–939. 20, 29, 30

Titre : Vers une modélisation des grands plans d'organisation de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana*

Mots clés : embryon, développement, modélisation, analyse d'images

Résumé : Au cours du développement embryonnaire, la plupart des éléments de la plante sont mis en place. Ce processus donne lieu à un embryon mature qui possède toutes les caractéristiques d'une jeune plantule. Ces étapes se déroulent durant les premiers stades du développement et sont associées à un changement de forme, ou morphogenèse. Ces deux processus sont stéréotypés chez *Arabidopsis thaliana*.

Au cours du développement embryonnaire, l'embryon passe d'une forme globulaire avec une symétrie radiale, à un embryon en forme de cœur avec une symétrie bilatérale. Ces changements sont basés sur des événements de croissance différentielle et de divisions cellulaires avec des orientations particulières de la surface de division dans l'embryon, des mécanismes qui sont étroitement régulés et sous le contrôle de facteurs moléculaires. Si certaines caractéristiques des stades de développement sont connues, comme le nombre de cellules ou encore des événements moléculaires, d'autres comme le changement de symétrie et l'acquisition d'une forme, qui est spécifique de l'embryon, n'ont pas encore été étudiées. Pour comprendre l'origine de la forme de cœur, une description multi-échelle et une quantification précises des changements de forme ont été réalisées. Pour cela une collection pré-existante d'images d'embryons fixés à différents stades du développement, a été enrichie de 47 embryons pour couvrir le développement embryonnaire précoce sur 8 générations cellulaires. Chaque embryon de la collection a été numérisé en 3D et ses cellules segmentées. À partir de ces images, une filiation cellulaire de l'embryon et des données de description de l'organisation des cellules ont été générées.

L'évolution des paramètres mesurés montre un changement progressif de la forme qui démarre de manière très précoce et bien avant que des modifications morphologiques ne soient supposées. Pour suivre l'évolution de traits caractéristiques de la forme et l'attribuer à des dynamiques cellulaires particulières, des mesures sur les événements de division et de croissance cellulaire ont été calculées. Des modifications de croissances cellulaires apparaissent très précocement alors que l'embryon n'est encore que globulaire. Les caractéristiques des divisions changent également, les plans de division passent d'une orientation stéréotypée à une orientation variable. Malgré la variabilité, des comportements similaires apparaissent au cours des générations cellulaires mais également au sein des différents précurseurs des tissus et organes de l'embryon.

La variabilité des divisions observées est questionnée à travers la recherche de règles simulées à l'aide d'un modèle stochastique 3D de partitionnement volumique. En testant une règle de minimisation stochastique de l'aire de la surface de partition, l'ensemble des orientations des plans de division observés ont pu être reproduites dans les formes observées et avec une répartition du volume donnée. L'hypothèse d'une règle stochastique basée sur la géométrie cellulaire et la minimisation de l'aire de la surface est envisagée, mais les générations avancées laissent entrevoir l'action progressive d'une autre contrainte sur la mise en place du plan de division. L'ensemble du phénotypage devrait définir de bonnes bases pour mieux comprendre les facteurs moléculaires qui régulent les mécanismes cellulaires de division et de croissance impliquée dans la mise en place de la forme de cœur de l'embryon.

Title :Toward a modelling of *Arabidopsis thaliana* embryo body plans

Keywords : embryo, development, modelling, image analysis

Abstract : During embryonic development, the major body plans of the plant are implemented. This process gives rise to a mature embryo which possess all the characteristics of a young seedling and is associated with a morphological change. These two processes are stereotyped in *Arabidopsis thaliana* embryo development.

Over the developmental process, the embryo shape switches from a globular form, with a radial symmetry, to a heart form with a bilateral symmetry. These changes are based on a differential cellular growth and on particular cell division plane orientation in the embryo, mechanisms that are tightly regulated and under control of molecular factors.

If a number of cellular and molecular steps are known, the evolution of the symmetry and the acquisition of the specific embryo shape have not yet been explored.

To understand the origin of the heart shape, we proceed to a detailed multi-scale description and quantification of embryo shape changes during embryo stages. We completed a collection of fixed embryo images with 35 embryos distributed along the embryo development over eight cell generations. The embryos have been digitized in 3D and cell segmented. From these images, embryo cell lineages have been reconstructed and their cell organizations characterized.

The evolution of parameter measurements showed a progressive change of the shape. The change has begun at an early embryo stage where morphology still look like a globular form. To correlate the morphological change and the cells events, the division and the cell growth were inferred through measurements. The cell growth behavior changed in the globular embryo. Changes in the division behavior were also observed. The division plane orientations stopped to be stereotyped. Despite the variability, similar behaviors were observed over cell generations and also among precursor of tissues and organs of the embryo.

The cell division behavior has been further analyzed by a search of the realized division rules which explain observations with a stochastic model of volume partition. A division rule based on a stochastic 3D surface area minimization has reproduced all observed division plane orientations depending on the volume repartition among daughter cells. The hypothesis of a stochastic division rule based on the cell geometry with a surface area minimization of surface passing through the mother cell centroid seemed to become apparent. But divisions in older cell generations suggested a progressive action of another factor on the division plane.

The overall phenotyping the embryo early development should provide a framework for the analysis of molecular factors involved in the heart shape.