



**HAL**  
open science

# Growth and Mechanics of Cellular Structures : Continuous Models for Tissue Growth

Joseph Ackermann

► **To cite this version:**

Joseph Ackermann. Growth and Mechanics of Cellular Structures: Continuous Models for Tissue Growth. Soft Condensed Matter [cond-mat.soft]. Sorbonne Université, 2022. English. NNT: 2022SORUS054 . tel-03885483

**HAL Id: tel-03885483**

**<https://theses.hal.science/tel-03885483>**

Submitted on 5 Dec 2022

**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.



**SORBONNE  
UNIVERSITÉ**



**COLLÈGE  
DE FRANCE**  
—1530—

Thèse préparée à l'École Normale Supérieure  
Sorbonne Université

École doctorale 564 Physique en Ile-de-France

# **Growth and Mechanics of Cellular Structures**

*Croissance et mécanique des structures cellulaires*

## **Continuous Models for Tissue Growth**

*Modélisation continue de la croissance des tissus*

par Joseph Ackermann

Thèse de doctorat de Physique

- dirigée par

Martine Ben Amar, Professeur à l'École Normale Supérieure et à Sorbonne Université  
et Jean-François Joanny, Professeur au Collège de France

- présentée et soutenue publiquement le lundi 24 janvier 2022, devant un jury composé de

Arezki Boudaoud, Professeur à l'École Polytechnique, rapporteur  
Giuseppe Sciumè, Maître de conférence à l'Université de Bordeaux, rapporteur  
Alain Goriely, Professeur à Oxford University, examinateur  
Benoît Perthame, Professeur à Sorbonne Université, examinateur  
Mathilde Badoual, Professeur à l'Université de Paris, examinateur  
Philippe Benaroch, Directeur de recherche à l'Institut Curie, invité

# Growth and Mechanics of Cellular Structures

*Croissance et mécanique des structures cellulaires*

par Joseph Ackermann

## Résumé

La reproduction par division et la mort cellulaire sont deux caractéristiques essentielles des systèmes vivants. Néanmoins, le langage mathématique peut prendre en compte ces phénomènes, et permet de construire des modèles physiques qui présentent bien souvent des analogies avec des formalismes utilisés dans d'autres domaines de la physique dont ils s'inspirent d'ailleurs très fréquemment. Ces processus prennent place dans un environnement possédant des propriétés passives et actives, qui doivent être prises en compte. Des interactions entre différents types de cellules peuvent avoir une influence sur les caractéristiques de cette croissance. En utilisant le plus souvent des modèles continus, cette thèse vise à décrire la formation et la croissance de structures cellulaires, à travers des cas variés comme la prolifération de cellules cancéreuses en interaction avec des cellules du système immunitaire *in vitro*, la croissance de kystes de cellules souches, et les étapes primaires du développement de l'aile de la drosophile.

## Mots-clés

Prolifération cellulaire, mort cellulaire, croissance tumorale, macrophages, morphogenèse, kyste, agrégat multicellulaire, cellules souches, méthode des éléments finis, modèle des mélanges, élasticité

---

## Abstract

Reproduction by division and cell death are two essential characteristics of living systems. Nevertheless, mathematical language can take these phenomena into account, and allows the construction of physical models which very often present analogies with formalisms used in other fields of physics, and are often inspired by them. These processes take place in an environment with passive and active properties, which must be taken into account. Interactions between different types of cells can influence the characteristics of this growth. Most often using continuous models, this thesis aims at describing the formation and growth of cellular structures, through various cases such as the proliferation of cancer cells in interaction with cells of the immune system *in vitro*, the growth of stem cell cysts, and the primary stages of wing development in *Drosophila*.

## Keywords

Cell proliferation, cell death, tumor growth, macrophages, morphogenesis, cyst, multi-cellular aggregate, stem cells, finite elements method, mixture model, elasticity

## Remerciements

Je remercie avant tout mes directeurs de thèse Martine Ben Amar et Jean-François Joanny pour le plaisir qu’auront été ces années de thèse. Un plaisir d’apprendre tous les jours grâce à leur prolifique culture scientifique, un plaisir de se voir encadré dans des problématiques diverses et passionnantes, et un plaisir pour la liberté et la confiance ressenties.

Par ordre chronologique, même si nous n’avons pas travaillé avec elle, le premier élan de cette thèse a été donné par Eliane Piaggio, qui nous a guidé lors de la recherche d’une collaboration à l’institut Curie.

Philippe Benaroch et Jovan Nikolic nous ont accompagnés durant ces trois ans dans une collaboration fructueuse. Leur patience, leur curiosité et leur pédagogie auront été précieuses. Cette rencontre a été extrêmement enrichissante. Merci aussi à Thierry Rose de nous avoir rejoint dans ce projet. Nous avons aussi croisé la route d’Anick Pauchet et de Nicolas Kiavue, qui ont fait avancer cette thèse par leur contributions aux expériences.

A Bordeaux (ou plutôt Talence), merci à Pierre Nassoy, Philippe Cohen et les membres de la start-up Treefrog avec qui nous avons travaillé sur la croissance des kystes de cellules souches.

Merci à Loïc le Goff, qu’étrangement je n’aurait pas vu ! Mais nous avons tout de même bien travaillé par mails interposés.

In the team, thanks to Paul-Qiuyang and Anna for the scientific and numerical discussions, and for the friendly environment in the small team we have formed.

Je remercie Arezki Boudaoud et Giuseppe Sciumè d’avoir accepté d’être rapporteurs. Merci beaucoup à Mathilde Badoual, Alain Goriely, Benoît Perthame, de nous faire l’honneur de faire partie du jury, dans lequel nous sommes aussi heureux de compter Philippe Benaroch. J’espère que vous prendrez plaisir à la lecture de cette thèse ainsi qu’à la soutenance. Merci à vous d’avoir accepté de vous déplacer, de près et de loin, en ces temps où monter dans un train ou un avion prend parfois des airs d’un exploit sanitario-administratif.

A l’échelle de 29 ans (à la date de la soutenance), le périple vers cette thèse aura été une aventure en soi, et cela n’aurait pas été possible (ou au moins beaucoup plus difficile) sans un certain nombre de personnes éparpillées aux quatre coins du monde. Il faudrait faire une liste bien longue, depuis mes indispensables parents (ce n’est pas vraiment l’endroit pour faire un résumé de ce que je leur dois), mes frères et soeurs, et toute une famille entourant d’affection, en passant par les grands-parents qui ont fait baigner la famille dans une atmosphère stimulante et curieuse, et en élargissant aux tontons tatas cousines cousins. En Israël et aux États-Unis, merci aux Jofen, Weilgus, Taubenblatt, Merzbach, et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin aux expériences enrichissantes qu’ont été mes années à l’étranger. Shaïndel, merci pour tout, et en particulier d’avoir supporté m’entendre soupirer devant mon ordinateur tout en m’encourageant, et d’avoir participé à ma compréhension de nombreux aspects biologiques et médicaux de cette thèse. Tu es ma première motivation pour le télé-travail.

Dans le milieu universitaire, je remercie grandement l’ex-UPMC pour avoir organisé une licence et un master de physique à distance ainsi que la licence de mathématiques à distance ! Merci beaucoup aux professeurs ayant participé à ces programmes. Ces structures m’ont permis de progresser dans mon cursus de physique et de mathématiques, tout en voyageant et en effectuant d’autres cursus à l’étranger !

La passerelle de Jussieu à l’ENS a été une belle opportunité, et l’année de M2 a été extrêmement enrichissante. C’est d’ailleurs à l’ENS que j’ai fait connaissance de Martine qui y enseignait.

Merci aussi à l’école doctorale et Jean-François Allemand, toujours disponible et attentif lorsque j’ai eu besoin de lui. Merci aux secrétaires de l’ICFP et du laboratoire, notamment Nora Sadaoui, Medina Mahrez, Camille Sardin, Olga Hodges, pour leur efficacité et leur disponibilité, et merci au personnel technique, notamment Yann Colin et Zaire Dissi. Merci à Nabil qui a été d’une grande aide dans mon initiation à Comsol Multiphysics. Je suis aussi redevable au service technique de Comsol à Grenoble qui a eu la patience de répondre à mes innombrables questions.

Enfin, cette thèse s’est construite sur des bases bien bâties par des anciens étudiants de Martine : Thibaut et Fabrizio avec qui les discussions ont été très utiles pour la thèse, et Clément dont j’ai consulté sans arrêt le manuscrit de thèse pendant ces trois ans.



# Table des Matières

Introduction . . . . .	8
<b>1 Description physique du vivant</b>	<b>11</b>
1.1 Cellules, tissus, organes . . . . .	11
1.2 Description discrète . . . . .	12
1.2.1 Le modèle de vertex . . . . .	12
1.2.2 Modèle de Potts cellulaire . . . . .	13
1.2.3 Modèle de suivi de particules (Particle Based Model) . . . . .	14
1.2.4 Modèles d'automates cellulaires . . . . .	14
1.3 Descriptions continues . . . . .	16
1.3.1 Modèles hydrodynamiques et mécaniques . . . . .	16
1.3.2 Modèles intégrés . . . . .	16
1.4 Critères de choix du modèle . . . . .	16
<b>2 Dérivation variationnelle d'un modèle continu</b>	<b>19</b>
2.1 Modèle des mélanges . . . . .	19
2.1.1 Énergie libre effective et tensions de surface . . . . .	20
2.1.2 Introduction au principe variationnel du Rayleighien . . . . .	22
2.1.3 Définition du Rayleighien . . . . .	22
2.1.4 Équations dynamiques pour les fractions volumiques des cellules . . . . .	23
2.1.5 Taux de croissance, nutriments, signaux chimiques . . . . .	25
2.1.6 Détermination des paramètres . . . . .	26
2.2 Applications . . . . .	29
2.2.1 Agrégation de cellules dans un puits à 3 dimensions . . . . .	29
2.2.2 Dynamique de la séparation de phases dans un agrégat multicellulaire . . . . .	30
2.3 Conclusion . . . . .	33
Annexe 2.A Méthodes numériques : Comsol Multiphysics . . . . .	34
2.A.1 Agrégation dans un puits (section 2.2.1) . . . . .	34
2.A.2 Structure d'un agrégat avec plusieurs types de cellules (section 2.2.2) . . . . .	36
Annexe 2.B Dérivation variationnelle du modèle des mélanges . . . . .	36

<b>3</b>	<b>Croissance d'agrégats multi-cellulaires</b>	<b>39</b>
3.1	Introduction . . . . .	39
3.1.1	Les agrégats multicellulaires . . . . .	39
3.2	Agrégation et croissance de sphéroïdes simples . . . . .	40
3.2.1	Théorie . . . . .	40
3.2.2	Applications . . . . .	43
3.3	Conclusion . . . . .	46
	Annexe 3.A Absorption-diffusion des nutriments . . . . .	47
	Annexe 3.B Dérivation des équations pour le modèle de croissance globale/agrégation . . . . .	49
<b>4</b>	<b>Interactions entre le système immunitaire et les tumeurs</b>	<b>51</b>
4.1	Interactions entre le système immunitaire et les tumeurs . . . . .	51
4.1.1	Cancer . . . . .	51
4.1.2	Le système immunitaire . . . . .	52
4.1.3	Cancer et système immunitaire . . . . .	53
4.1.4	Cancer et macrophages . . . . .	53
4.2	Interactions entre le système immunitaire et les tumeurs . . . . .	55
4.3	Interactions entre le système immunitaire et les tumeurs . . . . .	58
4.3.1	Analyse transcriptomique . . . . .	58
4.3.2	Analyse des facteurs de croissance . . . . .	58
4.3.3	Apport de l'approche biophysique . . . . .	58
4.4	Interactions entre le système immunitaire et les tumeurs . . . . .	59
4.4.1	Localisation des macrophages et des KPs dans l'agrégat . . . . .	59
4.4.2	Prolifération cellulaire et nucléation . . . . .	59
4.5	Interactions entre le système immunitaire et les tumeurs . . . . .	61
4.6	Interactions entre le système immunitaire et les tumeurs . . . . .	64
4.6.1	Modèle de suivi de particules (Particle Based Model) . . . . .	64
4.6.2	Fusion . . . . .	69
4.6.3	Retard d'agrégation et compaction : la maturation de l'adhésion . . . . .	69
4.6.4	Prolifération et mort cellulaire . . . . .	70
4.7	Interactions entre le système immunitaire et les tumeurs . . . . .	71
	Annexe 4.A Interactions entre le système immunitaire et les tumeurs . . . . .	72
<b>5</b>	<b>Kystes de cellules souches</b>	<b>75</b>
5.1	Les cellules souches, leurs applications et leur production . . . . .	75
5.2	Résultats expérimentaux . . . . .	78
5.3	Croissance et élasticité des kystes . . . . .	79

5.3.1	Dynamique de croissance anisotrope . . . . .	79
5.3.2	Morpho-élasticité d'une coque en croissance . . . . .	81
5.3.3	Contact avec la capsule . . . . .	83
5.4	Comparaison du modèle théorique avec les données expérimentales . . . . .	85
5.5	Conclusions . . . . .	86
Annexe 5.A	Fracture de l'alginate . . . . .	90
Annexe 5.B	Apparition de lumières secondaires en cours de croissance . . . . .	90
Annexe 5.C	Coalescence de kystes . . . . .	92
Annexe 5.D	Description du modèle de Potts . . . . .	93
5.D.1	Energie . . . . .	93
5.D.2	Mitoses . . . . .	93
5.D.3	Stabilisation . . . . .	93
<b>6</b>	<b>Disque imaginal de l'aile de la drosophile</b>	<b>95</b>
6.1	Introduction . . . . .	95
6.2	Motivation expérimentale : biomécanique des disques imaginaires de l'aile <i>Drosophila</i> . . . . .	96
6.3	Théorie de Föppl-von Kármán adaptée à une bicouche en croissance. . . . .	98
6.4	Simulations numériques avec la méthode des éléments finis . . . . .	101
6.4.1	Précontrainte sur une bicouche initialement courbée . . . . .	101
6.4.2	Épaisseur et défaut de croissance sur les plaques et coquilles en croissance . . . . .	101
6.4.3	Place d'un défaut . . . . .	102
6.4.4	Dépendance des conditions aux limites . . . . .	102
6.5	Confrontation de la théorie FvK et des simulations par éléments finis avec les expériences sur l'aile de la drosophile . . . . .	102
<b>7</b>	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>107</b>

## Introduction

### Une courte histoire de la biophysique

La question de l'existence de lois communes au vivant et à l'inanimé possède une longue histoire, naturellement indissociable de la construction du concept de loi physique et de la formulation des différentes lois. Descartes écrit en 1646 : *"Je sais bien que les bêtes font beaucoup de choses mieux que nous, mais je ne m'en étonne pas car cela même sert à prouver qu'elles agissent naturellement et par ressorts, ainsi qu'une horloge, laquelle montre bien mieux l'heure qu'il est, que notre jugement ne nous l'enseigne. Et sans doute que, lorsque les hirondelles viennent au printemps, elles agissent en cela comme des horloges. Tout ce que font les mouches à miel est de même nature, et l'ordre que tiennent les grues en volant et celui qu'observent les singes en se battant, s'il est vrai qu'ils en observent quelqu'un, et enfin l'instinct d'ensevelir leurs morts, n'est pas plus étrange que celui des chiens et des chats, qui grattent la terre pour ensevelir leurs excréments, bien qu'ils ne les ensevelissent presque jamais : ce qui montre qu'ils ne le font que par instinct et sans y penser."* [1]. Cette théorie de l'animal-machine affirme le déterminisme du comportement animal, auquel échappe l'humain du fait de sa raison. Cette vision ouvre la voie à une investigation systématique du vivant. Voulant construire une méthode générale pour une analyse systématique, Paul-Joseph Barthez (1734-1806) écrit néanmoins dans "Nouveaux éléments de la science de l'homme" : *"Le plus grand nombre des Physiologistes du dernier siècle a cru pouvoir expliquer tous les phénomènes de la Physique des animaux, par des principes de Mécanique ou de Physique générale... Cette secte des Mécaniciens a été très bien réfutée par Stahl et les autres Animistes, dont les opinions sont aussi fort répandues... Dans l'état actuel de nos connaissances sur l'Homme, on doit rapporter les divers mouvements qui s'opèrent dans le corps humain vivant, à deux Principes différents, dont l'action n'est point mécanique, et dont la nature est occulte. L'un est l'Ame pensante, et l'autre est le Principe de la Vie... La bonne Méthode de Philosophie dans la Science de l'Homme, exige qu'on rapporte à un seul Principe de la Vie dans le corps humain, les forces vivantes qui résident dans chaque organe, et qui en produisent les fonctions, tant générales, de sensibilité, de nutrition, etc. que particulières, de digestion, de menstruation, etc."* [2]. Mais dès la fin du 18<sup>e</sup> siècle, Luigi Galvani découvre "l'électricité animale", et une controverse naît autour du rôle passif ou actif des tissus dans la conduction électrique. Dans le même temps, Bichat affirme son scepticisme au sujet de l'application de la méthodologie des sciences physiques au vivant : *"On calcule le retour d'une comète, les résistances d'un fluide parcourant un canal inerte, la vitesse d'un projectile, etc.; mais calculer avec Borelli la force d'un muscle, avec Keil la vitesse du sang, avec Jurin, Lavoisier et d'autres la quantité d'air entrant dans le poumon, c'est bâtir sur un sable mouvant un édifice solide par lui-même, mais qui tombe bientôt faute de base assurée"* [3].

Au milieu du XIX<sup>e</sup> siècle, Johannes Müller et ses élèves fondent une école de physiologie où les connaissances issues de la physique et de la chimie sont associées à celles tirées de l'anatomie : *"La physiologie est la science des propriétés et des phénomènes des corps organiques, animaux et végétaux, et des lois d'après lesquelles se produisent leurs effets. La première question à laquelle il faut répondre en entrant dans cette science est celle de la différence entre les corps organiques et inorganiques. Les corps qui présentent les phénomènes de la vie sont-ils différents dans leur composition matérielle des corps inorganiques dont les propriétés sont étudiées par la physique et la chimie ? Et puisque les apparences sont si différentes dans les deux royaumes ; les forces fondamentales qui les produisent sont-elles aussi différentes, ou bien les forces fondamentales de la vie organique ne sont-elles que des modifications des forces physiques et chimiques ?"* [4]. Peu après et dans le même élan, D'Arcy Thompson publie "On Growth and Form" (1917) qui traite de la morphogénèse dans le vivant, avec l'objectif suivant : *"Nous voulons voir comment, dans certains cas au moins, les formes des êtres vivants, et des parties des êtres vivants, peuvent s'expliquer par des considérations physiques, et réaliser qu'en général il n'existe de formes organiques que celles qui sont conformes aux lois physiques et mathématiques"* [5].

Rapidement, la nature physique du vivant est exploitée et amène à des progrès considérables, notamment dans le domaine de l'imagerie. Par exemple, la cristallographie aux rayons X a permis la découverte en 1953 de la structure de l'ADN (isolée pour la première fois dès 1869 par le biologiste suisse Friedrich Miescher) par Franklin, Wilkins, Watson et Crick.

Depuis, la physique s'est introduite profondément dans les domaines biologique et médical, aussi bien du côté des outils (comme l'imagerie), de la description de phénomènes purement physiques, que de la modélisation quantitative spatio-temporelle. Ces dernières décennies, la biophysique s'attaque à des problèmes de plus en plus

complexes, complexité qui se décline de deux façons. La première est une complexité provenant de l'interaction de nombreux éléments dans les phénomènes du vivant. Cette complexité se retrouve dans les mécanismes de régulation génétique, les gènes interagissant (épistasie) de façon à s'inhiber ou s'activer mutuellement de façon complexe, ou encore au niveau de l'hétérogénéité des cellules dans les tissus et les tumeurs, qui rendent compliqué l'appréhension de ces processus. Dans ce cas, la biophysique cherche à créer des systèmes minimaux, discriminant parmi les éléments en présence les moins négligeables. La deuxième est une complexité due à la multitude d'échelles spatiales à décrire, depuis les gènes jusqu'aux organes, et sur des échelles de temps s'étalant de fractions de secondes à des années. Un exemple de question centrale traitant un type de complexité est celle du repliement des protéines en fonction de leur composition chimique.

Le développement exponentiel des outils numériques a bien sûr révolutionné le domaine, tout comme l'introduction de l'intelligence artificielle (IA). L'exploitation en biophysique de savoirs provenant d'autres branches de la physique, comme la matière condensée, la matière molle, la mécanique, l'hydrodynamique, la physique statistique, la thermodynamique ou même la physique quantique et la théorie de l'information a considérablement enrichi le domaine.

## Présentation de la thèse

L'objet de cette thèse est la modélisation physique, théorique et numérique, des tissus et la confrontation de ces modélisations avec des expériences réalisées par nos collaborateurs.

Les approches et techniques utilisées dans le contexte actuel pour l'étude des tissus, dont certaines seront utilisées plus tard dans ce manuscrit, sont d'abord introduites dans le chapitre 1, avant d'aborder les différents sujets dont cette thèse fait l'objet.

Dans un premier temps, au chapitre 2, un cadre théorique est dérivé formellement, puis il est appliqué à plusieurs situations concernant des agrégats de cellules adhérentes entre elles. Le chapitre 3 simplifie ce modèle afin de le rendre plus flexible et facile à calibrer à des données expérimentales. Ce dernier chapitre contient aussi des exemples d'ajustements de paramètres du modèle qui permettent de retrouver des résultats expérimentaux.

Le contexte du chapitre 4 est le succès rencontré par l'immunothérapie en oncologie, qui consiste à renforcer l'action du système immunitaire contre les cellules tumorales. Néanmoins, son efficacité est très variable, notamment selon le type de cancer. Son développement exige une compréhension accrue des interactions entre le système immunitaire et les cellules cancéreuses.

De manière plus générale, certaines études et observations actuelles dans le domaine médical sont susceptibles d'éveiller l'intérêt des bio-physiciens.

La médecine de précision (dite aussi personnalisée) entend adapter le soin à chaque patient, d'une part en prenant en compte l'histoire du traitement, de la génétique, et d'autres caractéristiques propres à chaque malade, et d'autre part en optimisant le traitement thérapeutique. Par exemple, les tests génomiques tels que MammaPrint ou Oncotype DX sont utilisés afin de prévoir l'évolution de la maladie dans différents cancers [6]. Cet objectif nécessite l'analyse complexe de différents facteurs et la prédiction d'un traitement idéal s'échelonnant dans le temps, laissant place à une modélisation spatio-temporelle. Spatiale car analysant la maladie *in situ* dans le corps, et temporelle car récapitulant la situation actuelle, en l'expliquant par l'analyse des processus passés, puis en prédisant son évolution. D'où l'intérêt de construire des modèles théoriques décrivant dans l'espace et dans le temps l'évolution de la maladie. En ajustant les modèles théoriques à chaque patient, on peut imaginer inférer des paramètres du modèle correspondant à ce malade, afin de prévoir son évolution future.

Dans le même ordre d'idée, la recherche de traitements optimisés nécessite des outils de modélisation permettant de prévoir les effets de tel ou tel traitement [7], pour les comparer, puis les appliquer de façon précise, sans passer par des expérimentations dangereuses, coûteuses, et chronophages. L'intelligence artificielle (IA) est déjà utilisée dans cette entreprise [8]. Néanmoins, l'IA est avant tout une technologie d'analyse de données. Les populations de cellules sont soumises à des équations dynamiques issues de forces, et à des équations de conservation. Quant aux signaux chimiques, ils répondent aussi à des lois physiques telles que la diffusion dans les milieux liquides ou poreux. La physique et ses outils constituent donc une piste de choix dans l'analyse des phénomènes cellulaires. Des modèles quantitatifs peuvent ainsi aider à déterminer la façon optimale d'administrer un traitement

[9, 10, 11, 12]. En outre, des outils de modélisation décrivant le phénomène *in situ* peuvent aussi posséder une force particulière dans l'appréhension et la visualisation par le personnel médical de la maladie et du traitement pour chaque patient. Enfin, si les biologistes ont énormément progressé dans la compréhension des phénomènes liés au cancer, la complexité de ces phénomènes et la difficulté de les appréhender ensemble peut devenir un obstacle à leur compréhension profonde. Des formalismes provenant de la physique et des mathématiques peuvent jouer un rôle important à cet égard, en intégrant les nouvelles connaissances à l'intérieur de systèmes quantitatifs [13].

Parallèlement à ces tendances, un nombre considérable de données issues des patients ou d'expériences *in vitro* sont disponibles dans les laboratoires. Il existe deux façons de rendre compte des données expérimentales : une première étape est l'explication qualitative, qui pointe du doigt certains facteurs capables d'expliquer des observations (ces assertions peuvent être de simples hypothèses ou bien peuvent être accumulées puis confrontées à une certaine réalité). Une deuxième étape est de retrouver quantitativement le résultat des expériences à partir de modèles mathématiques prédictifs (ici encore le modèle peut être hypothétique ou bien confronté à des expériences/cas cliniques). Si la recherche en biologie procède à une analyse qualitative poussée, les études quantitatives sont plus rares. Justement, les bio-physiciens analysent quantitativement les données, mais dans des systèmes très contrôlés, et dans des expériences souvent moins complexes que les équipes biologiques. Dans ce contexte, il serait intéressant de construire des modèles théoriques prenant en compte la complexité et parfois le côté non contrôlé des expériences biologiques, afin d'extraire des conclusions quantitatives sur les systèmes complexes du vivant (chapitres 2-4). On entend par le terme "contrôle" la maîtrise d'aspects expérimentaux qui permettent de minimiser la complexité du système. Par exemple, rafraîchir le milieu de culture permet de s'assurer de la constance des conditions de culture. *In vivo*, une tumeur croît bien sûr de manière totalement incontrôlée, et réussir à tenir compte de ce caractère serait un premier pas vers une description exhaustive des phénomènes *in vivo*.

Le chapitre 5 a pour objet la modélisation de la croissance des cellules souches. Les cellules souches sont à la base de nouvelles approches thérapeutiques. Si les greffes de moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques du patient lui-même ou de membres de sa famille pour soigner des maladies du sang ont émergé dans les années 50 [14] et sont aujourd'hui communes, de nouvelles pistes ont éclos pour soigner diverses maladies ou remplacer des organes. Les cellules souches ont notamment été utilisées afin d'imprimer un cœur en 3 dimensions [15]. Une des grandes avancées de ces dernières années est la possibilité de reprogrammer des cellules différenciées en cellules souches [16]. Malgré tout, les thérapies à base de cellules souches se heurtent à des soucis en amont dans la chaîne de production, où des quantités littéralement astronomiques de cellules doivent être produites pour certaines thérapies. A cette fin, il est crucial d'améliorer les modes de production et les taux de croissances tout en assurant le caractère souche des cellules produites. Nous montrons dans le chapitre 5 que les contraintes mécaniques y jouent un rôle important.

La modélisation de la croissance des kystes de cellules souches est à la frontière entre la description des tissus structurés comme les mono-couches cellulaires auxquelles les kystes ressemblent en début de croissance, et les agrégats cancéreux non structurés introduits plus haut. Les tissus étudiés dans le chapitre suivant sont des structures fines ou des tissus en 2 dimensions auxquelles les kystes ressemblent à des stades plus tardifs.

Au chapitre 6, nous étudions le disque imaginal de l'aile de la drosophile. Les contraintes mécaniques sont omniprésentes dans le vivant surtout dans les phases de croissance, et la morphogenèse des organes ne fait pas exception. Étrangement, les comportements pathologiques dus à des mutations peuvent aussi donner des informations sur les caractéristiques mécaniques et la structure de l'organe sain dans le disque imaginal de l'aile de la drosophile. Dans ce dernier chapitre, nous avons montré que les tissus épithéliaux composés d'au moins de deux couches d'élasticité et croissance distinctes, deviennent très sensibles à des défauts localisés (telles que les mutations génétiques) et présentent une instabilité de flambage à l'origine de l'effondrement du disque imaginal.

Ces divers exemples étudiés en étroite collaboration avec des équipes expérimentales démontrent l'importance des phénomènes physiques dans le vivant, et l'intérêt de la confrontation entre les modélisations et les données expérimentales.

# Chapitre 1

## Description physique du vivant

### 1.1 Cellules, tissus, organes

Les organismes vivants peuvent être unicellulaires ou multicellulaires. Dans les organismes multicellulaires, le nombre de cellules varie dans de large proportions : On dénombre dans les larves écloses de *C. Elegans* environ 600 cellules non gonadales [17], alors qu'un humain adulte compte environ  $3.5 \cdot 10^{13}$  cellules [18, 19]. De plus, dans un même organisme, différents types cellulaires coexistent : il existe environ 200 types cellulaires différents dans le corps humain [20].

D'un point de vue biophysique, les organismes multicellulaires tels que les animaux et les plantes peuvent être décrits à plusieurs niveaux. Des groupes de cellules similaires et leur matrice extra-cellulaire peuvent s'organiser en un tissu et se développer collectivement. Il existe 4 types différents de tissus animaux : les tissus épithéliaux (qui sont des revêtements à la surface des organes), les tissus conjonctifs (reliant ou séparant d'autres tissus ou organes), les tissus musculaires (tissus contractiles actifs) et les tissus nerveux (dans le système nerveux). De plus, certaines cellules sont présentes dans les fluides corporels. Les tissus s'assemblent donc pour former des organes, qui remplissent une fonction spécifique. On trouve environ 100 organes dans le corps humain (le nombre dépend de la définition d'un organe). Le nombre de cellules dans ces organes est de l'ordre de  $10^9$ . Par exemple, il y a environ  $3 \cdot 10^9$  cellules dans le foie humain. Ces différents niveaux de description imposent différentes contraintes et l'approche physique doit être adaptée aux échelles de temps et de longueur pertinentes aux phénomènes biologiques étudiés.

Une approche physique peut aider à mieux comprendre les phénomènes biologiques. En effet, les contraintes mécaniques, les phénomènes dits de réaction-diffusion d'espèces chimiques dans les milieux cellulaires, la capacité de détection des cellules, leur motilité, ainsi que la croissance et les interactions entre les cellules peuvent être traitées dans le cadre de la physique. Ce cadre peut ensuite fournir des prédictions quantitatives, notamment à l'aide d'outils numériques.

Les modèles physiques des tissus peuvent être divisés en deux catégories principales. Les modèles discrets [21, 22, 23, 24] considèrent chaque cellule individuellement. Les modèles continus considèrent des moyennes spatiales de différentes variables physiques pertinentes afin d'expliquer la dynamique et les morphologies à l'échelle d'organes ou d'organismes. Ces différents types de modèles sont également présents dans l'étude des tissus végétaux [25]. La méthode utilisée dépend donc du niveau de précision ou de description voulu et des tailles des échantillons étudiés.

Dans cette introduction, suivant notre article, référence [26], les différents modèles discrets, puis continus sont survolés, ainsi que les critères permettant de choisir l'une ou l'autre des méthodes pour la résolution d'un problème donné. Des applications directes apparaissant dans cette thèse sont évoquées pour certaines méthodes. Dans certains cas, des programmes existent et permettent ainsi au physicien de disposer d'outils numériques déjà constitués. Nous en citons donc certains dans les parties concernées [27].

## 1.2 Description discrète

Les modèles discrets considèrent chaque cellule séparément. Ils sont appropriés pour étudier de petits agrégats cellulaires. S'ils sont adaptés aux simulations numériques avec un nombre limité de cellules, leur utilité est limitée pour un nombre élevé de cellules (quelques milliers). Les modèles discrets permettent de prendre en compte l'état biochimique, la géométrie de chaque cellule et les forces agissant sur chaque cellule individuellement. Ils sont donc étroitement liés à la description biologique et biomécanique des cellules et à leurs interactions. Une cellule individuelle est composée d'une membrane plasmique, contenant le cytoplasme. Dans le cas des organismes eucaryotes, le cytoplasme contient un noyau renfermant l'ADN. Dans le cas des organismes procaryotes, l'ADN est "enfermé" dans le cytoplasme. Ce sont les eucaryotes qui constituent les organismes multicellulaires, tandis que les bactéries ou les archées sont des procaryotes. Il existe d'importantes différences même entre les eucaryotes. Par exemple, les cellules végétales possèdent une matrice extracellulaire composée notamment de pectine et de cellulose, et dite paroi pectocellulosique, qui lui donne une rigidité  $10^3$  fois plus importante que celle des cellules animales [28]. Cette structure leur permet de soutenir des pressions osmotiques importantes (turgescence), que les cellules animales gèrent par des phénomènes de transport actif. Par ailleurs, le cytoplasme possède une structure complexe ainsi que de nombreux organites ; il présente une viscosité pouvant être  $10^6$  supérieure à celle de l'eau [29]. Les cellules individuelles se meuvent, se déforment, et se divisent activement, tout en étant soumises à de nombreux phénomènes passifs.

En principe, de nombreuses variables physiques peuvent être incluses dans les modèles discrets. Néanmoins l'équivalence de ces variables avec les descriptions macroscopiques des tissus n'est pas simple à dériver. Le couplage des modèles discrets avec des phénomènes continus même à échelle cellulaire, telles que la diffusion de molécules comme les morphogènes dans un tissu est également difficile à introduire. La plupart des modèles discrets sont basés sur le principe de minimisation d'une énergie, et font intervenir explicitement une stochasticité soit car le modèle est construit sur une équation maîtresse (donc une équation probabiliste), soit afin de prendre en compte des phénomènes aléatoires. Néanmoins, il faut noter que le modèle des mélanges a aussi été utilisé pour représenter chaque cellule comme une phase dans les travaux originaux de Makiko Nonomura [30], Kulawiak et al [31], ou encore Najem et Grant [32]. La référence [33] utilise aussi un modèle non conservatif de type *phase field* à cet effet (voir aussi la revue Ref. [34]). Ces derniers modèles peuvent être considérés comme des modèles discrets car décrivant chaque cellule et se focalisant sur des échelles de longueur proches de celle de la cellule et non de celle du tissu, même si le formalisme employé est bien celui d'un modèle continu où les variables sont définies sur l'ensemble de l'espace.

Les modèles discrets de tissus correspondent soit à des modèles sur réseau tels que le modèle cellulaire de Potts ou les automates cellulaires, soit sont définis en dehors d'un réseau comme le modèle des vertex où les modèles de suivi de particules (Particle Based Model).

### 1.2.1 Le modèle de vertex

A l'origine utilisé à 2 dimensions afin de reproduire l'apparition de motifs dans l'épithélium de l'oviducte<sup>1</sup> de cailles adultes [35], puis dans l'étude de la rhéologie et du drainage de liquide à travers les mousses [36], le modèle des vertex met l'accent sur la géométrie des cellules, et sur la topologie des épithéliums en 2 ou 3 dimensions [37]. Il a été utilisé aussi bien pour décrire des tissus animaux que des tissus végétaux [38, 39, 40]. Chaque cellule est représentée sous la forme d'un polygone (en 2 dimensions) ou d'un polyèdre (en 3 dimensions). Le modèle de vertex a surtout été utilisé en deux dimensions et dans le but d'étudier les tissus épithéliaux soit dans des géométries planes [41, 42, 43, 44, 45] soit dans des géométries courbes comme les kystes [46]. Par exemple il a servi à analyser des propriétés statistiques telles que la distribution du nombre de voisins par cellule [47] ou la dynamique cellulaire collective et la structure spatiale dans un épithélium [48, 49, 50, 51, 52]. Un très bon accord avec des résultats expérimentaux a été obtenu pour la description de la croissance du disque alaire de la drosophile [53, 54] et de l'aile au cours du développement de la drosophile [55, 56]. Le modèle des vertex a récemment été étendu à 3 dimensions [46, 57, 58, 59]. Il a aussi été couplé à des phénomènes continus comme les mécanismes de diffusion-réaction d'espèces chimiques. Par exemple, Okuda et al étudient la régulation de la prolifération cellulaire par des systèmes d'inhibiteurs et activateurs moléculaires, conduisant à la formation de

1. **Oviducte** : Conduit par lequel l'ovule quitte l'ovaire.

formes spécifiques [60] (figure 1.1(a)).

Néanmoins, relier le modèle de vertex aux modèles continus comme l'approche mécanique, demeure une difficulté majeure. Plusieurs travaux ont été réalisés dans cette direction [61, 62, 63]. Récemment, un modèle hydrodynamique a été formellement dérivé en 2 dimensions [64], étudiant les instabilités dans un tissu en croissance, et mettant en lumière le rôle des contraintes résiduelles.

Dans le modèle des vertex en 2 dimensions, chaque cellule est un polygone indexé par un entier  $\alpha$  et avec une aire  $A_\alpha$ . Le tissu est un graphe formé par les sommets des polygones reliés par des arêtes entre les cellules. Chaque arête indexée par  $i$  a une longueur  $l_i$ . L'énergie du tissu dépend à la fois de la longueur des bords et de l'aire des cellules. A chaque cellule correspond une aire optimale  $A_\alpha^0$ , et chaque bord subit une tension de ligne  $\Lambda_i$ , qui dans certains modèles dépend du périmètre de la cellule  $P_\alpha$ . L'énergie du tissu s'écrit [23, 65, 66] :

$$E = \sum_i \Lambda_i l_i + \sum_\alpha \left[ \frac{K_\alpha}{2} (A_\alpha - A_\alpha^0)^2 + \Gamma_\alpha P_\alpha^2 \right] \quad (1.1)$$

où  $K_\alpha$  est une élasticité de surface qui tend à imposer l'aire préférée  $A_\alpha^0$  à chaque cellule,  $\Lambda_i$  est la tension de l'arête  $i$ , tandis que  $\Gamma_\alpha$  est lié à la modification de la tension de ligne avec le périmètre de la cellule.

La prolifération cellulaire et la mort cellulaire sont prises en compte en ajoutant ou en supprimant des arêtes, et en ajustant l'aire préférée par la cellule, ce qui modifie la topologie du réseau cellulaire. Un autre type de processus topologique appelé  $T_1$  permet l'échange d'arêtes entre les cellules voisines. Ces processus ont été introduits à l'origine en physique des mousses [67].

Le modèle des vertex prend donc en compte de manière simplifiée la géométrie des cellules, et introduit aussi bien les effets de surface que de volume. S'il est bien adapté pour étudier les couches de cellules en forme de polyèdre, il l'est moins dans le cas des cellules moins régulières, pour lesquelles un modèle plus précis, comme le modèle cellulaire de Potts, est nécessaire. Un avantage important du modèle de vertex est qu'il donne un traitement très intuitif des concepts physiques et mécaniques tels que l'élasticité du volume, l'adhésion cellule-cellule ou la polarisation cellulaire. Il fournit également une description convaincante des déformations cellulaires sous contrainte externe. Chaste est un programme précodé permettant de mettre en pratique le modèle des vertex [68].

### 1.2.2 Modèle de Potts cellulaire

Le modèle de Potts cellulaire est un modèle sur réseau basé sur le modèle de spins à plusieurs états de Potts en physique statistique [69]. Chaque cellule est représentée par un ensemble de spins dans le même état. Le nombre d'états de spin est le nombre de composants dans le tissu : un état pour chaque cellule, et un pour chaque autre composant tels que les fluides ou la matrice extracellulaire. Avant d'être introduit en biophysique, le modèle de Potts avait déjà été utilisé dans un esprit similaire pour étudier la croissance des grains [70] en sciences des matériaux, et le grossissement des mousses [67].

Le modèle de Potts a été utilisé à 2 dimensions pour étudier l'organisation de différents types de cellules sur un substrat [71]. Comme le modèle des vertex, il n'a été que rarement utilisé pour décrire les agrégats cellulaires à 3 dimensions. Les travaux sur les sphéroïdes avasculaires [72] et sur les kystes [73] (figure 1.1(c)) en sont des exemples représentatifs. La raison de cette différence entre 2 et 3 dimensions est que les calculs deviennent de plus en plus lourds à mesure que le nombre de cellules augmente. Néanmoins, pour certains tissus comme les épithéliums, des simulations en 2 dimensions donnent un aperçu qualitatif du comportement tridimensionnel du tissu même si la cellule n'est décrite que par son aire apicale [57]. Un autre exemple d'application à 2 dimensions est l'étude sur le rôle de la matrice extracellulaire dans l'invasion des gliomes [74].

L'hamiltonien du modèle de Potts inclut l'énergie d'interaction spin-spin, et un coût énergétique qui force les cellules à un volume préféré ou une aire préférée. A 3 dimensions, l'énergie s'écrit :

$$E = \sum_{i \neq j} J(\sigma_i, \sigma_j) + \sum_I [a_I (A_I - A_I^0)^2 + b_I (V_I - V_I^0)^2] \quad (1.2)$$

où la première somme est effectuée sur les sites du réseau, et la deuxième sur les cellules. Le premier terme  $J(\sigma_i, \sigma_j)$  correspond à la matrice d'interaction de Potts entre spins voisins, tandis que les deux autres termes  $a_I (A_I - A_I^0)^2 + b_I (V_I - V_I^0)^2$  imposent la surface et le volume préférés des cellules.

Le modèle de Potts permet de décrire toute forme de cellule. Par exemple, la forme cellulaire obtenue dans les kystes est polyédrique alors que les simulations d'autres types de cellules conduisent à des formes plus rondes. Des versions plus raffinées du modèle permettent de quantifier la contribution du noyau aux propriétés mécaniques de la cellule [75, 76]. Cependant, les cellules ont également une élasticité, avec une structure interne qui n'est pas capturée par le modèle de Potts. Dans ce modèle, les déformations cellulaires sont contrôlées par leur surface, alors qu'en réalité, elles dépendent souvent d'autres éléments, tels que la mécanique du cytoplasme. Cette remarque est également valable pour le modèle des vertex. Comme on le voit, le terme correspondant dans le modèle des vertex à la longueur des arêtes est remplacé ici par la matrice d'interaction, qui est défini plus localement, mais correspond aussi principalement à des effets de surface.

Dans ce cadre là, CompuCell3D et Morpheus sont des programmes pré-codés permettant d'appliquer le modèle de Potts à des situations diverses, tout en couplant celui-ci à la diffusion, la production ou la consommation d'espèces diffusives [77, 78].

Le modèle de Potts sera décrit un peu plus en détail dans l'annexe du chapitre 5 qui concerne la modélisation des kystes de cellules souches.

### 1.2.3 Modèle de suivi de particules (Particle Based Model)

Dans ce modèle où les cellules sont assimilées à des particules, chaque cellule est représentée par un objet adhésif élastique qui peut se déplacer dans l'espace sous l'action des forces extérieures et des forces d'interaction avec les cellules voisines. Ces forces d'interaction incluent des termes de friction, qui sont le vecteur principal de la dissipation d'énergie dans le système. Le bruit est introduit dans le système et est associé à une température effective. Le tissu étant un matériau actif, le bruit hors-équilibre est dû aux fluctuations spontanées des signaux moléculaires pouvant entraîner une diffusion effective, aux fluctuations de la forme des cellules et à la stochasticité de processus biologiques tels que la division ou la mort cellulaire. Par exemple, la référence [79] propose un modèle minimal pour étudier la rhéologie des tissus et la compétition entre différents types cellulaires. Ce même article relie le modèle discret et la caractérisation continue des tissus. La dynamique du tissu est régie par une équation de Langevin généralisée. Les cellules adhèrent les unes aux autres par des forces à courte portée et la dissipation est dominée par la friction visqueuse. Les cellules subissent également une division et une apoptose, toutes deux contrôlées par une pression homéostatique. Cette approche est donc basée sur les forces agissant sur les cellules. Une généralisation de cette approche produisant plus de précision sur la géométrie des cellules individuelles est le Deformable Cell Model (DCM), dans lequel les cellules sont composés de plusieurs nœuds qui répondent aux équations de forces, et qui sont liés entre eux de façon viscoélastique.

Il est difficile de coupler la description particulière au transfert d'informations dans un tissu et cette méthode est souvent utilisée pour étudier les effets de forces physiques entre les cellules. Le couplage avec la diffusion de molécules nécessite des modèles hybrides discrets/continus. Des résultats qualitatifs et quantitatifs au sujet de la relation entre contraintes osmotiques [80] ou élastiques et la croissance tumorale ont été étudiés avec cette approche [81, 82]. L'évolution de tissus [83] et l'exploration des structures à l'état stationnaire [84] de mélanges entre divers types de cellules en 3 dimensions ont également été effectuées. Un exemple représentatif et impressionnant est le travail de Hoehme et al sur le foie [85] (figure 1.1(b)). L'équation de Fokker-Planck relie la dynamique des particules au comportement continu du tissu.

Pour ce modèle, PhysiCell, Chaste et CellSys sont des programmes pré-codés utilisant la méthode de suivi de particules [27, 68, 86].

Une description basée partiellement sur ce modèle sera développée lors de la modélisation des interactions entre les cellules cancéreuses et les macrophages au chapitre 4.

### 1.2.4 Modèles d'automates cellulaires

Dans les modèles d'automates cellulaires, les cellules sont représentées par un très petit nombre de pixels. Des règles simples sont données pour l'évolution du tissu, qui prennent en compte la stochasticité des processus. Ils permettent de considérer un large éventail de phénomènes à des échelles de longueur beaucoup plus grandes que

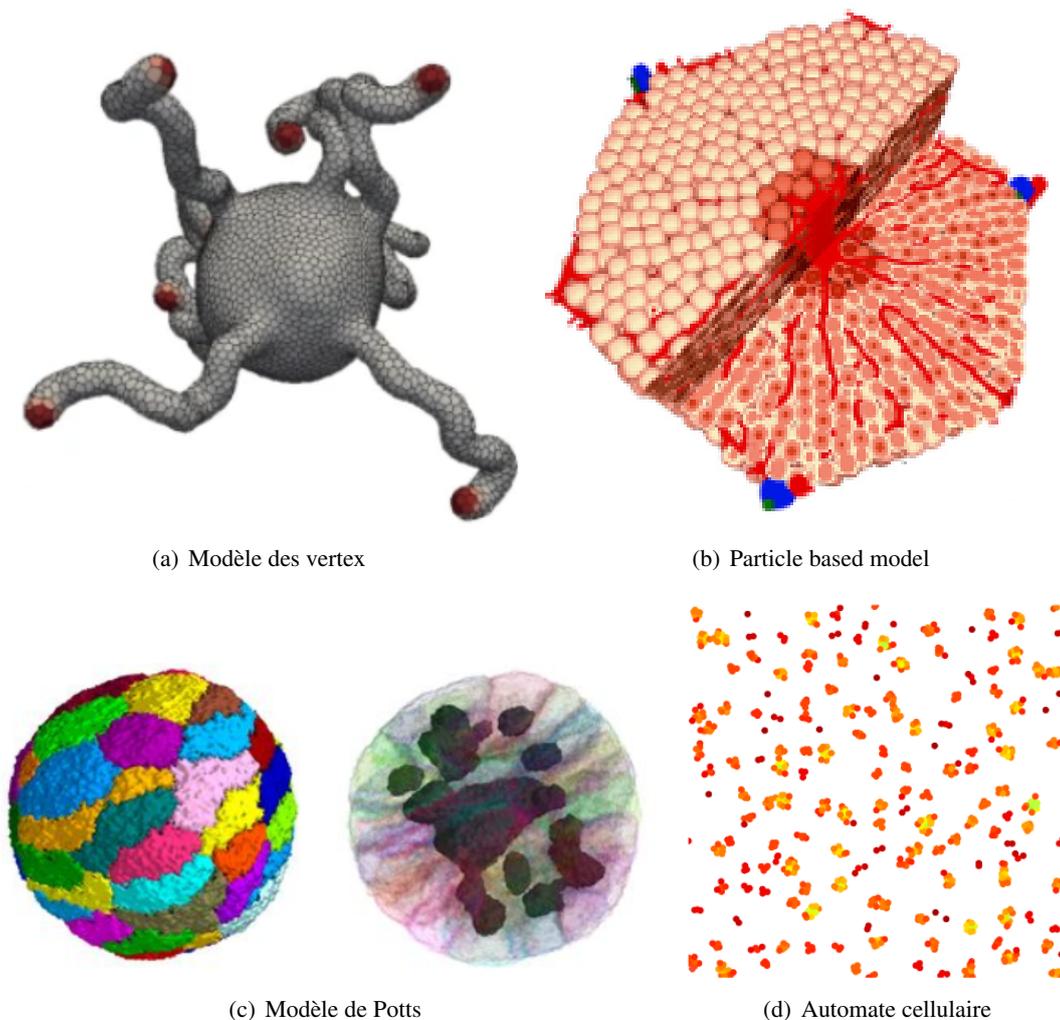


FIGURE 1.1 – Exemples de simulations pour les différents modèles discrets évoqués. **(a)** : Formation de tubes fins par combinaison entre le modèle des vertex pour un agrégat et les motifs de Turing, tiré de Okuda et al (2018) [60]. **(b)** : Modélisation du foie en utilisant le Particle Based Model, tiré de Hoeme et al (2010) [85]. **(c)** : Structure interne d'un kyste obtenue grâce au modèle de Potts, tiré de Cerruti et al (2013) [73]. **(d)** : Nucléation de sphéroïdes sur substrat, tiré de Adenis et al (2020) [91].

celle d'une cellule. À cet égard, les modèles d'automates cellulaires sont proches d'un modèle continu [87]. Dans certains modèles, le nombre de cellules par nœuds du réseau peut être supérieur à un.

L'évolution du système est contrôlée par une équation maîtresse, qui peut aussi prendre en compte la division cellulaire.

Une remarque générale au sujet des modèles sur réseau concerne la régularité du maillage qui peut provoquer des artefacts, comme remarqué dans les modèles de croissance d'Eden (où l'amas croît par agrégation de nouveaux éléments au niveau des parois) [88, 89]. A cet effet, des réseaux irréguliers ont été élaborés [90].

Des modèles d'automates cellulaires ont été utilisés pour étudier l'agrégation de cellules sur divers substrats [91] (figure 1.1(d)) ou encore des mélanges avec plusieurs types cellulaires par exemple en se focalisant sur l'interaction entre cellules cancéreuses et macrophages associés aux tumeurs en 2 dimensions [92]. Les tumeurs et les sphéroïdes en 3 dimensions ont également été étudiés, notamment dans le cas de tumeurs cérébrales [93], ou concernant la réponse d'une tumeur à différents traitements [94].

### 1.3 Descriptions continues

Pour étudier la variations de variables sur des tailles significativement supérieures à la taille d'une cellule, il n'est souvent pas nécessaire de considérer les détails au niveau de chaque cellule. Considérer les moyenne des variables sur cette taille caractéristique est en général suffisant (sec. 1.3.1). Un modèle continu est donc plus approprié dans ce cas qu'un modèle discret. Parfois, les valeurs d'intérêt sont des variables non locales, comme la taille d'un agrégat particulier. Dans ce cas, le modèle continu peut-être intégré sur un sous-système (sec. 1.3.2).

#### 1.3.1 Modèles hydrodynamiques et mécaniques

Dans les modèles hydrodynamiques et mécaniques, les variables d'intérêt sont les densités et concentrations des différents composants du systèmes, les déformations du milieu, les vitesses des différents composants, les contraintes mécaniques, ou encore les taux de croissance. Ces différentes variables peuvent être couplées de multiples manières, donnant par exemple lieu à des modèles viscoélastiques tenant compte de la croissance. Selon le rapport entre la durée d'observation et le temps caractéristique des processus internes, le matériaux aura un comportement élastique, viscoélastique, ou visqueux. Des séparations d'échelles en temps et en espace permettent de simplifier le problème dans certains cas particuliers. Ainsi, des approximations adiabatiques peuvent-être effectuées pour certaines équations, alors que d'autres gardent une dépendance explicite en temps. Une question centrale en mécanique des milieux continus dans l'élasticité finie, est la détermination de la configuration sans contrainte, qui n'est pas toujours bien définie dans un système biologique. Les modèles continus permettent aussi d'incorporer des composantes actives [95].

Les modèles continus peuvent être dérivés à partir de différents principes très généraux, comme la recherche des symétries du systèmes (hydrodynamique généralisée), ou encore le principe d'extrémisation de la dissipation (voir chapitre 2). En mécanique, des relations constitutives permettent de relier énergie mécanique et déformations. Celles-ci prennent différentes formes, selon le matériau étudié.

Au chapitre 2, une dérivation complète des équations hydrodynamiques est proposée dans le cadre du modèle des mélanges, qui est alors appliquée dans le chapitre 4 pour étudier les mélanges cellules cancéreuses/macrophages.

La mécanique des milieux continus est l'outil d'analyse principal dans deux chapitres :

- au chapitre 5 pour étudier les kystes de cellules souches dans un modèle analytique,
- au chapitre 6 qui traite du disque imaginal de l'aile de la drosophile dans un modèle utilisant la méthode numérique des éléments finis en 2 dimensions,

#### 1.3.2 Modèles intégrés

Pour obtenir une variable non locale dépendant d'un système d'équations locales, comme le rayon d'un agrégat en croissance, il est possible d'intégrer analytiquement ou numériquement le système d'équations locales sur la structure étudiée. Sans avoir à effectuer des calculs numériquement lourds, cette méthode permet d'ajuster les paramètres apparaissant dans la théorie aux données de façon rapide. Parfois, des modèles simples intégrés fournissent des informations non triviales sur le système étudié à partir de données expérimentales. Des exemples en sont données dans l'investigation des comportements de différentes lignées de cellules cancéreuses s'agrégeant pour former des agrégats en croissance au chapitre 4. Une fois l'échelle inférieure intégrée, on peut coupler ce résultat avec la description de phénomènes qui se déroulent à des échelles supérieures comme des processus d'agrégation. Cette approche consiste donc à partir d'équations où la dépendance spatiale apparaît explicitement, puis à les intégrer afin d'écrire un système dynamique classique.

### 1.4 Critères de choix du modèle

En conclusion, chaque type de modèle discret se concentre sur un aspect différent du comportement des cellules dans un tissu. Les modèles des vertex et de Potts fournissent des informations sur le changement de la

géométrie et des propriétés mécaniques de chaque cellule individuelle, tandis que les modèles à base de particules et les automates cellulaires sont plus grossiers et visent à étudier les tissus à une échelle supérieure à la taille de la cellule, tout en partant des propriétés individuelles de chaque cellule. La principale limitation des modèles cellulaires individuels est la difficulté à atteindre l'échelle de populations contenant un grand nombre de cellules et à décrire le comportement collectif des cellules dans un tissu. Ils nécessitent aussi souvent la création d'un modèle hybride pour prendre en compte la diffusion des espèces chimiques.

Ainsi, lorsqu'il n'est pas nécessaire de partir de propriétés individuelles et que l'étude porte sur des tailles caractéristiques supérieures à la taille d'une cellule, les modèles continus se présentent comme des alternatives plus adaptées. Un autre avantage des modèles continus est qu'ils partagent un formalisme commun, même s'il faut décider lequel des modèles hydrodynamique, mécanique, ou encore viscoélastique, est le plus adapté. Néanmoins, il leur est plus difficile d'appréhender des densités très faibles, pour lesquelles la notion même de densité a peu de sens.

En reliant les modèles discrets et continus et en reliant leurs paramètres, des approches qui zooment ou qui prennent de la hauteur sur un phénomène unique afin d'en décrire les différentes échelles apparaissent prometteuses.



## Chapitre 2

# Dérivation variationnelle d'un modèle continu

Dans ce chapitre, nous dérivons à partir du principe de minimisation de la dissipation des équations continus qui décrivent les tissus. Ce chapitre est en grande partie tiré de l'article coécrit par Martine Ben Amar, Jean-François Joanny, et moi-même, en référence [96]. Dans la section 2.1, nous dérivons et détaillons le modèle continu utilisé, et nous en présentons des applications dans la section 2.2.

### 2.1 Modèle des mélanges

Il existe différents types de modèles continus. Par exemple, les modèles issus de la mécanique des milieux continus, qui ont été appliqués à des simulations en 3 dimensions notamment dans le cadre de la morphogenèse des plantes [97]. Nous nous focalisons ici sur le modèle des mélanges.

Un mélange consiste en un ensemble de sous-populations formant une population caractérisée par des fonctions d'états extensives. La théorie des mélanges permet d'écrire l'évolution locale des contributions des sous-populations à ces variables [98, 99, 100, 101, 102]. Par exemple, la théorie des mélange a été appliqué aux milieux poreux [103]. Les constituants, l'un liquide et l'autre solide, sont alors caractérisées par leur fraction volumique. On peut alors associer à cette description d'autres composants possédant une fraction nulle, ou des grandeurs physiques comme les contraintes mécaniques externes, qui sont couplés à l'évolution de ces fractions volumiques.

Dans ce chapitre, les ingrédients du modèle des mélanges sont d'une part des types cellulaires et des phases inertes de fractions massiques et volumiques non négligeables, et des composés diffusifs de fractions volumiques et massiques négligeables. Les équations dynamiques des premiers sont celles du modèle des mélanges et nous les dérivons à partir du principe de dissipation minimale dans le système. Ce principe initié par Rayleigh [104]<sup>1</sup>, a été formalisé et étendu par Onsager dans deux articles pionniers [107, 108] puis développée par Doi et Onuki [109] dans le contexte de la physique des polymères. Il a également été utilisé plus récemment à la fois dans le cadre de la formation de motifs en physique des polymères [110, 111] et en oncologie [112, 113, 114, 115]. Il peut être appliqué aux systèmes dissipatifs où l'inertie est négligeable (par exemple dans le régime de Stokes lorsque le nombre de Reynolds est petit). Il conduit aux mêmes résultats que les théories hydrodynamiques construites à partir d'arguments de symétrie. Nous utilisons ici l'approche du Rayleighien afin de dériver les équations pour les vitesses locales des différents composants dans un tissu composé de différents types cellulaires. Cette approche peut être étendue à d'autres composants biologiques tels que la matrice extracellulaire ou des fibres. Dans les équations de conservation, la vitesse de chaque composant est définie à partir du flux de ce composant. Ces flux sont reliés aux gradients des potentiels chimiques partiels. Il est donc nécessaire de définir une énergie libre effective pour le système.

---

1. On note également qu'un principe de dissipation minimale a été formulé et démontré dans le cadre des écoulements de Stokes par Helmholtz, Korteweg, et Rayleigh [105, 106]

### 2.1.1 Énergie libre effective et tensions de surface

Chaque type cellulaire avec des cellules de masse  $m_i$  dans le mélange est traité comme un composant de concentration  $n_i$  et de masse volumique  $\rho_i = n_i m_i$ . La masse volumique totale est donc  $\rho = \sum_i \rho_i$  et les fractions massiques sont définies par  $\phi_i = \rho_i / \rho$ . Le fluide interstitiel entre les cellules est traité comme une phase fluide inerte, contenant des cellules mortes et des débris de cellules. Ses variables sont indexées par l'indice 0,  $(\rho_0, \phi_0)$ . Puisque  $\sum_i \phi_i = 1$ , les fractions massiques ne sont pas des variables indépendantes et la fraction massique du fluide inerte  $\phi_0 = 1 - \sum_{i \neq 0} \phi_i$  peut être exprimée en fonction des fractions massiques des différents types cellulaires. On note que les densités de masse des différents composants sont très proches [116, 117]. Par conséquent, les fractions massiques sont presque identiques aux fractions volumiques. Sauf dans les cas où la gravité joue un rôle, nous considérons donc que les  $\phi_i$  sont aussi les fractions volumiques. Dans ce chapitre, nous introduisons une énergie libre correspondant aux interactions entre les différents composants, et tenant compte des propriétés de chacun d'entre eux. Il faut noter que certains modèles continus des mélanges n'utilisent pas exactement la même stratégie, mais écrivent directement une équation d'équilibre des forces [112, 118].

Dans l'esprit de la théorie de Cahn-Hilliard pour la séparation de phases des fluides [119, 120], nous écrivons tout d'abord une énergie libre effective globale  $\mathcal{F}$  en tant qu'intégrale sur l'espace d'une densité locale d'énergie libre  $F$ . Nous exprimons la densité d'énergie libre en fonction de la masse volumique  $\rho$  et des fractions massiques  $\phi_i$  avec  $i \neq 0$ . La différentielle de la densité d'énergie libre est  $dF = \mu d\rho + \sum_{i \neq 0} \rho \bar{\mu}_i d\phi_i$  où  $\mu$  et  $\bar{\mu}_i$  sont liés aux potentiels chimiques usuels  $\mu_i = \frac{\partial F}{\partial n_i}$  par les expressions suivantes :  $\bar{\mu}_i = \frac{\mu_i}{m_i} - \frac{\mu_0}{m_0}$  et  $\mu = \sum_i \frac{\phi_i \mu_i}{m_i}$ . La pression est  $P = \sum_i n_i \mu_i - F = \rho \mu - F$  et sa différentielle est  $dP = \rho d\mu - \sum_{i \neq 0} \rho \bar{\mu}_i d\phi_i$ .

Dans la littérature de mécanique, l'énergie libre  $F$  est appelée potentiel d'interaction. Si la masse volumique et les fractions massiques ne sont pas homogènes, nous nous inspirons des énergie libre de Ginzbourg-Landau ou de Van der Waals, en développant la densité d'énergie libre en puissances des gradients de  $\rho$  et  $\phi_i$ . La densité d'énergie libre est alors remplacée par :

$$f[n_i] = F[n_i] + \sum_{i,j} \frac{\epsilon_{ij}^2}{2} (\nabla n_i \nabla n_j) \quad (2.1)$$

où les coefficients  $\epsilon_{ij}$  correspondent au coût d'énergie libre dû aux gradients de concentration.

Le choix du potentiel d'interaction est essentiel afin de déterminer les propriétés d'agrégats multicellulaires. Deux types d'interactions doivent être considérés : les interactions entre les différents types de cellules au sein de l'agrégat et les interactions avec un substrat ou le milieu extérieur. Le milieu extérieur peut être inerte comme le récipient dans l'expérience et la matrice extracellulaire, ou actif comme le stroma autour des tumeurs *in vivo*.

Différents types de potentiels d'interaction entre les cellules ont été utilisés dans la littérature. Nous en donnons ici quelques exemples. Une extension de l'énergie libre de Flory-Huggins utilisée en physique des polymères [121, 122] qui peut être dérivée à partir de la dynamique microscopique de Langevin et des équations de Fokker-Planck [123, 124], conduit à [125] :

$$\begin{aligned} F &= \sum_i kT_i n_i \log(n_i) + \sum_{i,j} a_{ij} n_i n_j + \sum_i n_i \mu_i^0(P) \\ &= \sum_i \frac{kT_i}{m_i} \rho \phi_i \log\left(\frac{\rho \phi_i}{m_i}\right) + \sum_{i,j} \frac{a_{ij} \rho^2}{m_i m_j} \phi_i \phi_j + \sum_i \frac{\rho \phi_i}{m_i} \mu_i^0(P) \end{aligned} \quad (2.2)$$

où  $\mu_i^0(P)$  est le potentiel chimique de référence du composant  $i$  qui ne dépend que de la pression. Sa dérivée est  $d\mu_i^0(P)/dP = w_i$  où  $w_i$  est le volume d'une particule d'espèce  $i$  [126].

Lorsque la masse volumique totale  $\rho$  est constante, cette expression peut être simplifiée en définissant de nouveaux coefficients :  $D_i = \rho kT_i / m_i$  qui caractérisent l'activité des cellules, et les coefficients de Flory  $\alpha_{ij} = a_{ij} \rho^2 / (m_i m_j)$  qui mesurent les interactions physiques entre les cellules dues à l'adhésion cellule-cellule et à leur élasticité. L'adhésion cellulaire induit une contribution attractive alors que l'élasticité induit une contribution répulsive. Les deux contributions peuvent être prises en compte en procédant à une expansion du viriel. Dans la définition de  $D_i$ ,  $k$  est la constante de Boltzmann et  $T_i$  une température effective qui serait liée aux contributions

entropiques pour un système à l'équilibre :

$$F = \sum_i D_i \phi_i \log(\phi_i) + \sum_{i,j} \alpha_{ij} \phi_i \phi_j + \sum_i \rho \phi_i \mu_i^0(P)/m_i + \sum_i \phi_i C_i \quad (2.3)$$

où  $C_i = D_i \log(\rho/m_i)$  est une constante indépendante des fractions massiques. Le terme  $\sum_i \phi_i C_i$  ne joue aucun rôle dans la dynamique. Il est bien établi en physique des polymères que ce potentiel  $F$  conduit souvent à une séparation de phases même à de faibles concentrations cellulaires.

Il se trouve que pour des simulations numériques, des potentiels phénoménologiques plus simples ont un coût computationnel moins élevé [127] tels que :  $F(\{\phi_i\}_i) = \sum_{i,j} \alpha_{ij} (\phi_i - \phi_i^0)^2 (\phi_j - \phi_j^0)^2$  ou  $F(\{\phi_i\}_i) = \sum_i \alpha_i (\phi_i - \phi_i^0)^n$  [128, 129] mais ils ne conduisent pas à une séparation de phases à des concentrations faibles.

Dans le domaine de l'oncologie mathématique, d'autres potentiels d'interaction ont été utilisés [112, 113, 114, 115], de type :

$$F(\phi_1) = \frac{\phi_1^n (\phi_1^m - \alpha)}{(1 - \phi_1)^l} \quad (2.4)$$

(pour deux composants  $\phi_0$  et  $\phi_1$ ) où  $\alpha$  est inférieur à 1 et  $l, m, n$  sont des exposants supérieurs à 1. Comme le potentiel de Flory-Huggins, ces potentiels imposent une fraction massique cellulaire (ou de manière équivalente une fraction volumique) inférieure à 1. Ils sont inspirés des modèles à champ de phase [119] et peuvent conduire à une séparation de phase entre une phase fluide pure et une phase cellulaire qui contient également une petite fraction de fluide interstitiel [130]. On note cependant que l'observation d'anomalies pour les fractions volumiques dans une monocouche cellulaire en 2 dimensions sur un substrat peut indiquer un empilement dans la troisième dimension [113, 114].

Afin de modéliser l'adhésion à un substrat, un potentiel à courte portée de la forme suivante peut être utilisé :

$$F_{adh}(z) = \rho \sum_i \beta_i \phi_i e^{-z/\ell} \quad (2.5)$$

où  $z$  est la distance de la cellule au substrat. Pour les types de cellules adhérentes au substrat  $\beta_i < 0$ . La longueur  $\ell$  est la portée de l'attraction au substrat.

A l'équilibre, la pression  $P_{eq}$  et les potentiels chimiques partiels  $\mu_{i,eq}$  des espèces indexées par  $i$  ont les mêmes valeurs dans les différentes phases. La tension superficielle peut alors être dérivée de la densité d'énergie libre effective. C'est une grandeur physique caractéristique liée à l'énergie associée aux interfaces entre deux phases dans les liquides et les tissus. Suivant l'approche standard de Cahn-Hilliard en métallurgie [119, 131, 132], à l'équilibre, la tension superficielle est définie comme la différence (par unité de surface) entre la valeur réelle de l'énergie libre du système et la somme des énergies libres dans le volume des deux phases en équilibre chimique et mécanique :

$$\Sigma = \int_{-\infty}^{+\infty} \left\{ f[n_i] + P_{eq} - \sum_i n_i \mu_{i,eq} \right\} dz \quad (2.6)$$

où  $z$  est la coordonnée normale à l'interface.

Pour des potentiels d'interaction simples, une expression explicite de la tension superficielle existe. Par exemple, on considère un mélange à 2 composants, de fractions massiques  $\phi_1 = \phi$  pour les cellules et  $\phi_0 = 1 - \phi$  pour le fluide interstitiel. On choisit une densité d'énergie libre effective  $f = F + \frac{\epsilon^2}{2} (\nabla \phi)^2$  et un potentiel d'interaction de la forme  $F = \frac{1}{2} f_0 (\phi - \phi_a)^2 (\phi - \phi_b)^2$ . La tension superficielle est  $\Sigma = \frac{1}{6} \epsilon f_0^{1/2} \Delta \phi^3$  où  $\Delta \phi$  est la différence de fractions massiques pour les composants entre les deux phases. La taille de l'interface est  $\xi = 2\epsilon / (f_0^{1/2} \Delta \phi)$  [119, 132].

Le concept de tension de surface est considéré comme un facteur déterminant dans l'auto-organisation des tissus, par exemple lors de regroupement de cellules de mêmes types, par analogie avec les phénomènes de structures thermodynamiques. Les effets physiques à l'origine de la tension superficielle dans les tissus et les agrégats cellulaires sont un sujet de discussion actuel. Les deux principaux facteurs sont l'adhérence (DAH : hypothèse

d'adhérence différentielle) [133, 134], et la tension corticale (DITH : hypothèse de tension interfaciale différentielle) [135]. Des modèles prenant en compte les deux effets existent également [136]. Ces deux effets sont pris en compte lors de la dérivation de la tension superficielle à partir de la densité d'énergie libre effective, puisque le terme  $a_{ij}$  exprime l'adhésion cellulaire, tandis que les termes saturant l'adhésion jouent le rôle de l'élasticité de la matière. On note qu'en plus de l'adhésion entre les cellules et de la contractilité, la tension superficielle dans un tissu pourrait également dépendre de la croissance, comme suggéré dans la référence [137], qui montre que la prolifération abaisse les tensions de surface.

### 2.1.2 Introduction au principe variationnel du Rayleighien

Le principe variationnel du Rayleighien est un principe mécanique dont la seule condition d'application est l'absence d'inertie. On peut donc l'appliquer à l'analyse de certains systèmes thermodynamiques proches de l'équilibre. Soit un système possédant une énergie libre  $F$ . Dans un processus isotherme, si aucun travail n'est extrait du système, l'énergie libre tend vers un minimum si bien que :  $dF/dt \leq 0$ . A partir d'un paramètre  $\lambda$  dont l'énergie libre dépend, on développe la variation d'énergie libre en puissances de  $d\lambda/dt$ . Puisque  $dF/dt \leq 0$ , le développement commence au deuxième ordre :

$$\frac{dF}{dt} = -M \left( \frac{d\lambda}{dt} \right)^2 \quad (2.7)$$

Il en ressort :

$$\frac{d\lambda}{dt} = -M^{-1} \frac{dF}{d\lambda} \quad (2.8)$$

qui est une équation de force avec la force  $f$  donnée par :  $f = -\frac{dF}{d\lambda}$ .

Ces équations peuvent être généralisées à une famille de paramètres :

$$\frac{d\lambda_i}{dt} = -M_{ij}^{-1} \frac{dF}{d\lambda_j} \quad (2.9)$$

avec  $M_{ij}^{-1}$  la matrice inverse de  $M_{ij}$ . Puis on les reformule en utilisant un principe variationnel. On définit en effet le Rayleighien  $R$  :

$$W = \sum_i \sum_{j < i} \frac{d\lambda_i}{dt} M_{ij} \frac{d\lambda_j}{dt} ; \frac{dF}{dt} = \sum_i \frac{\partial F}{\partial \lambda_i} \frac{d\lambda_i}{dt} \quad (2.10)$$

$$R = W + \frac{dF}{dt}$$

et le principe variationnel s'obtient en extremisant  $R$  par rapport à  $\frac{d\lambda_i}{dt}$ .

### 2.1.3 Définition du Rayleighien

Le flux massique de chaque type de cellule peut être écrit comme  $\mathbf{J}_i = \rho_i \mathbf{V} + \mathbf{j}_i$  où  $\mathbf{V}$  est la vitesse du centre de masse et  $\mathbf{j}_i = \rho_i \mathbf{v}_i$  est le flux du composant  $i$  dans le référentiel du centre de masse. La vitesse du fluide inerte  $\mathbf{v}_0$  est alors exprimable en termes des vitesses des différents types de cellules,  $\rho_0 \mathbf{v}_0 = -\sum_{i \neq 0} \rho_i \mathbf{v}_i$ . La loi de conservation pour chaque type de cellule s'écrit :

$$\rho(\partial_t \phi_i + \mathbf{V} \cdot \nabla \phi_i) + \nabla \cdot \mathbf{j}_i = k_i^g \rho_i \quad (2.11)$$

où  $k_i^g$  est le taux de croissance du type de cellule  $i$  en raison des divisions et morts cellulaires. Ce taux de croissance peut dépendre par exemple de la concentration en nutriments (voir section 2.1.5), des contraintes mécaniques, ou encore de traitements thérapeutiques [10]. Dans les tissus, les types cellulaires peuvent se transformer les uns dans les autres par différenciation. Celle-ci peut être régulée par des signaux biochimiques. Dans ce cas, le membre de droite dans Eq. (2.11) se transforme en  $\sum_j k_{ji} \rho_j - \rho_i \sum_{j \neq i} k_{ij}$  où les  $k_{ij}$  sont les taux de différenciation des types

$i$  en  $j$ , et  $k_{ii} = k_i^g$  est le taux de croissance du type cellulaire  $i$ . La différenciation cellulaire n'est pas prise en compte dans ce qui suit.

En utilisant l'intégration par parties et les lois de conservation (voir Appendice 2.B), la dérivée temporelle de l'énergie libre effective s'écrit :

$$\frac{d\mathcal{F}}{dt} = \int \left\{ \mathbf{V} \cdot \nabla P + \sum_{i \neq 0} \mathbf{j}_i \nabla \bar{\mu}_i + \dot{F}_0 \right\} d\mathbf{r} \quad (2.12)$$

où  $\dot{F}_0 = \sum_{i \neq 0} k_i^g \rho_i \bar{\mu}_i$  est une contribution qui ne dépend pas des vitesses des cellules et qui ne joue aucun rôle dans la dynamique. Dans le cas où la gravité est prise en compte :

$$\frac{d\mathcal{F}}{dt} = \int \left\{ \mathbf{V} \cdot (\rho g \mathbf{e}_z + \nabla P) + \sum_{i > 0} \mathbf{j}_i \nabla \bar{\mu}_i + \dot{F}_0 \right\} d\mathbf{r} \quad (2.13)$$

Ci-après, nous supposons que le tissu est incompressible et que la densité de masse totale  $\rho$  est constante.

Les forces dissipatives dans le tissu sont prises en compte en introduisant la fonction dissipative  $\mathcal{W}$ . Cette fonction est telle que sa dérivée fonctionnelle par rapport à la vitesse  $v_i$  du composant  $i$  est la force dissipative par unité de masse agissant sur le composant  $i$ . Nous introduisons deux types de dissipation : la friction relative entre les différents composants  $\mathcal{W}_f$  et la dissipation visqueuse  $\mathcal{W}_v$  des cellules que nous considérons comme un fluide visqueux [138]. D'où  $\mathcal{W} = \mathcal{W}_f + \mathcal{W}_v$ .

La dissipation due à la friction entre les différentes composantes du mélange s'écrit :

$$\mathcal{W}_f = \int \sum_{i \neq j} \frac{\rho \phi_i \phi_j M_{ij}^{-1}}{2} (\mathbf{v}_i - \mathbf{v}_j)^2 d\mathbf{r} \quad (2.14)$$

où la somme s'effectue sur tous les composants du mélange et les  $M_{ij}^{-1} \phi_i \phi_j$  sont les termes de friction relatifs entre les composants  $i$  et  $j$ , qui sont proportionnels aux fractions massiques des deux composants.

La fonction de dissipation associée à la viscosité tissulaire peut s'écrire sous la forme :

$$\mathcal{W}_v = \int \sigma_{\alpha\beta} V_{\alpha\beta} d\mathbf{r} \quad (2.15)$$

où les indices grecs font référence aux coordonnées spatiales, et  $V_{\alpha\beta}$  est le gradient de vitesse du centre de masse :  $V_{\alpha\beta} = (\partial_\alpha V_\beta + \partial_\beta V_\alpha)/2$ .

Si le tissu est isotrope, la contrainte visqueuse est donnée par l'expression standard pour un fluide isotrope  $\sigma_{\alpha\beta} = 2\eta V_{\alpha\beta} + \zeta \delta_{\alpha\beta} V_{\gamma\gamma}$ , où  $\eta$  est la viscosité globale de cisaillement et  $\zeta$  la viscosité globale dans le volume [138]. La force dissipative associée  $\mathbf{f}$  par unité de volume de fluide est  $f_\alpha = \partial_\beta \sigma_{\alpha\beta}$ .

Ci-après, on ne considère que les situations où il n'y a pas de mouvement du centre de masse dans le mélange de sorte que  $\mathbf{V}$  s'annule [112, 139].

Le Rayleighien est obtenu en sommant le taux de variation d'énergie libre et la fonction dissipative :

$$\mathcal{R} = \mathcal{W} + \frac{d\mathcal{F}}{dt} \quad (2.16)$$

#### 2.1.4 Équations dynamiques pour les fractions volumiques des cellules

Les équations dynamiques du mélange de cellules sont obtenus par extrémisation du Rayleighien par rapport aux vitesses  $\mathbf{v}_i$  ( $i \neq 0$ ) de tous les types cellulaires composant le mélange :

$$\frac{\delta \mathcal{R}}{\delta \mathbf{v}_i} = 0 \quad (2.17)$$

ce qui conduit pour chaque type cellulaire à une expression de la forme :

$$\sum_j A_{ij} \mathbf{v}_j = -\phi_i \nabla \bar{\mu}_i \quad (2.18)$$

où  $A_{ij}$  est la matrice des frictions. Par souci de simplicité, par la suite, on considère que les propriétés de friction de tous les types cellulaires sont identiques. Dans ce cas, il n'y a que deux coefficients de friction indépendants. Pour deux différents types de cellules ( $i, j \neq 0$ ), la friction est  $M_{ij}^{-1} = 1/M$ . Et pour tous les types de cellules, la friction avec le fluide inerte s'écrit  $M_{0i}^{-1} = 1/m$ . Les deux mobilités  $M$  et  $m$  peuvent dépendre de la fraction massique du fluide  $\phi_0$ . On définit aussi les deux coefficients de friction moyens :  $1/\bar{M} = \phi_0/m + (1 - \phi_0)/M$  et  $f_r = (1 + \phi_0)/(m\phi_0) - 1/M$ . Dans cette limite,  $A_{ij} = \phi_i \delta_{ij} / \bar{M} + f_r \phi_i \phi_j$ .

L'inversion de la matrice de friction  $A_{ij}$  conduit à des relations de type Onsager entre les flux  $\mathbf{j}_i = \rho_i \mathbf{v}_i$  et le gradient de potentiel chimique :

$$\mathbf{j}_i = \sum_{j \neq 0} -\rho \bar{M} (\phi_j \delta_{ij} - \phi_i \phi_j \phi_0 m f_r) \nabla \bar{\mu}_j \quad (2.19)$$

Les équations dynamiques des concentrations cellulaires sont obtenues en insérant l'équation constitutive du flux (2.19) dans l'équation de conservation (2.11) :  $\rho \partial_t \phi_i + \nabla \cdot \mathbf{j}_i = k_i^g \rho_i$ .

A pression constante, l'expression des potentiels chimiques partiels  $\bar{\mu}_i$  en fonction des fractions massiques  $\phi_j$ , équation (2.19), conduit à une loi de Fick généralisée,  $\mathbf{j}_i = -\sum_{j \neq 0} D_{ij} \nabla \phi_j$ . Le mélange de cellules est alors instable lorsque le déterminant de la matrice de diffusion  $D_{ij}$  devient négatif. Cette instabilité appelée décomposition spinodale est la signature d'une séparation de phases macroscopique entre les cellules et le composant inerte, ou entre les différents types cellulaires [119]. Pour un mélange à deux composants (un type de cellule), il existe une constante de diffusion proportionnelle à la dérivée seconde de l'énergie libre, donnée par l'équation (2.1). Le tissu est instable dans la plage de paramètres où la constante de diffusion est négative : on parle d'effet anti-diffusif [140, 141].

La pression cellulaire qui correspond à la pression osmotique en thermodynamique classique des solutions est définie par  $\Pi = \sum_{j \neq 0} \rho \phi_j \bar{\mu}_j - F$ . Elle satisfait l'équation de Gibbs-Duhem  $d\Pi = \sum_{j \neq 0} \rho \phi_j d\bar{\mu}_j - \frac{\mu_0}{m_0} d\rho$ . On note que pour des raisons pratiques, si nous ne nous intéressons pas aux effets spécifiques de la gravité, la densité de masse  $\rho$  du tissu peut être considérée comme constante. En additionnant sur tous les types de cellules, on obtient le bilan des forces sur les cellules :

$$0 = -\sum_{i \neq 0} \rho \phi_i \partial_\alpha \bar{\mu}_i - \gamma v_\alpha \quad (2.20)$$

En supposant une masse volumique constante, l'équation de Gibbs-Duhem mentionnée ci-dessus devient :  $d\Pi = \sum_{j \neq 0} \rho \phi_j d\bar{\mu}_j$  qui transforme l'Eq. (2.20) en une loi de Darcy :

$$\gamma v_\alpha = -\partial_\alpha \Pi \quad (2.21)$$

où  $\gamma$  représente la friction par unité de volume sur les cellules du fluide inerte :  $\gamma = \frac{\rho(1-\phi_0)}{\phi_0 m}$ . Ces équations généralisent à plusieurs types de cellules les résultats de Réf. [142]. Par ailleurs, la loi de Darcy dans les milieux poreux, qui relie la vitesse cellulaire au gradient de pression cellulaire, a largement été utilisée pour étudier les tissus [112, 143, 144, 145, 146]. La comparaison entre les contraintes visqueuses et la force de perméation des fluides introduit la longueur hydrodynamique d'écrantage  $\lambda = (\frac{\eta}{\gamma})^{1/2}$  [147]. Si l'échelle de variation de la vitesse est plus petite que la longueur hydrodynamique d'écrantage, la viscosité de la phase cellulaire domine la dissipation. C'est la limite traitée dans Réf. [148]. Dans le cas contraire, c'est la perméation du fluide inerte à travers les cellules qui domine. La plupart des travaux sur les agrégats cellulaires considèrent cette limite [128, 149].

En outre, l'effet d'un champ externe tel que la gravité peut être inclus dans le potentiel chimique. Néanmoins il n'y a pas de contribution explicite de la gravité au potentiel chimique  $\bar{\mu}_i$  car les contributions de  $\mu_i$  et  $\mu_0$  s'annulent. Cependant, ces potentiels chimiques doivent être considérés comme des fonctions des fractions massiques  $\phi_i$  et de la pression  $P$ . Le gradient de pression est donné par la loi hydrostatique  $\nabla P = -\rho \mathbf{g}$  où  $\mathbf{g}$  est l'accélération de

la gravité. Pour chaque type de cellule,  $d\bar{\mu}_i = dP(\frac{w_i}{m_i} - \frac{w_0}{m_0})$ ,  $w_i = \frac{\partial \mu_i}{\partial P}$  étant le volume partiel du composant  $i$ . En sommant sur tous les types de cellules, la force totale due à la gravité dans l'Eq. (2.20) est  $\rho g(1 - \frac{\rho w_0}{m_0})$ . Cette force correspond à l'effet direct de la gravité diminuée de la poussée d'Archimède.

Si la vitesse du centre de masse ne s'annule pas, par exemple lorsque la gravité est prise en compte, la vitesse du centre de masse est déterminée en écrivant le bilan des forces, qui est dérivé par extrémisation du Rayleighien par rapport à la vitesse du centre de masse :

$$-\nabla P + \nabla \cdot \sigma - \rho g e_z = 0 \quad (2.22)$$

où  $\sigma$  est la contrainte déviatoire agissant sur le centre de masse de l'élément de volume local. Par la suite, sauf lorsqu'on discutera de l'effet de la gravité, on suppose que le tissu est incompressible et que tous les composants ont la même densité  $m_i/w_i$ . Dans ce cas la masse volumique  $\rho$  est constante et le bilan de force sur la cellule est donné par Eq. (2.21).

## 2.1.5 Taux de croissance, nutriments, signaux chimiques

### Consommation des nutriments et croissance cellulaire

Les cellules consomment divers nutriments [150, 151], et leurs taux de croissance  $k_i^g$  dépendent de la concentrations  $c$  des nutriments. Cela inclut aussi les cellules cancéreuses, malgré leur relative résistance à la privation en nutriments [152]. Le taux de croissance est positif si la concentration en nutriments est supérieure à une concentration critique  $c_i^0$ . Cela ne signifie pas qu'il n'existe pas de mort cellulaire, mais que celle-ci est inférieure à la prolifération cellulaire. Pour chaque type de cellule, on peut utiliser :  $k_i^g = \Gamma_i(c - c_i^0)$ , soit une dépendance linéaire du taux de croissance avec la concentration en nutriments. Par exemple, les concentrations critiques en oxygène pour l'entrée des cellules en hypoxie sont documentées selon les types de cellules [153]<sup>2</sup>. Ce modèle est un raffinement du modèle en fonction Heaviside proposé Greenspan [155, 156], un des premiers modèles pour la croissance des tumeurs avasculaires. Cependant, il s'agit certainement d'une simplification excessive, même au voisinage du point critique  $c_i^0$ . En effet, la division cellulaire s'accompagne d'une augmentation de la masse cellulaire totale et nécessite un supplément de matière. Ce matériau est extrait du fluide inerte. On s'attend donc à ce qu'en cas de prolifération ( $c > c_i^0$ ), le taux de croissance augmente avec la fraction fluide  $\phi_0$ .

Cependant, étant donné que tous les nutriments n'ont pas d'effet limitatif sur les taux de prolifération, et afin de clarifier la discussion, nous nous concentrons ici principalement sur le glucose ou l'oxygène. En effet, le glucose est une source d'énergie majeure impliquée dans la glycolyse, et constitue une source de carbone pour la biosynthèse [151]. Concernant l'oxygène, l'hypoxie a été largement étudiée [157, 158, 159]. La cinétique de Michaelis-Mentens [160, 161, 162], ainsi que des fonctions affines par morceaux [163] ont été utilisées pour modéliser l'absorption d'oxygène par les cellules. Divers modèles ont été proposés pour tenir compte du taux d'absorption du glucose par les cellules en fonction de la concentration [164, 165]. Dans ce qui suit, puisque dans une approche de champ moyen, le taux de consommation de nutriments est proportionnel à la probabilité de contact entre une cellule et une molécule nutritive, nous écrivons le taux de consommation sous la forme  $cd_i\rho\phi_i$ .

L'équation de diffusion-absorption pour la concentration en nutriments  $c$  dans un mélange cellulaire s'écrit :

$$\partial_t c = D\nabla^2 c - c\rho \sum_{i \neq 0} d_i \phi_i \quad (2.23)$$

où  $\rho\phi_i$  correspond à la densité de masse cellulaire de l'espèce  $i$ .

La référence [166] montre un grand nombre d'extensions de l'équation (2.23) décrivant le processus de diffusion-réaction des nutriments dans les tissus. On choisit ici la forme la plus simple qui prend en compte à la fois la diffusion et la consommation des nutriments avec le plus petit nombre possible de paramètres.

La constante de diffusion des nutriments dépend de la composition locale du mélange. Une première approximation consiste à considérer le mélange cellulaire comme un milieu poreux pour la diffusion des nutriments avec une relation linéaire :  $D = D_0\phi_0$ . La diffusion dans les milieux poreux est un sujet en soi, et de nombreux modèles

2. Il existe plusieurs unités pour la mesure des concentrations en oxygène. Voir la référence [154]

ont été proposés pour la décrire [167]. Un des modèles les plus utilisés introduit la tortuosité  $\tau$  (défini comme le rapport du chemin effectif et de la distance séparant 2 points) de telle sorte que :  $D = D_0\phi_0/\tau$ .

Cependant, il a été rapporté [168] que la respiration peut parfois augmenter le coefficient de diffusion dans des conditions physiologiques dans les tissus par un mécanisme actif. Il a également été signalé [169] que certains types de cellules et probablement les cellules cancéreuses adaptent leur consommation de nutriments à la disponibilité de ceux-ci dans le milieu.

Par ailleurs, en oncologie, les taux de prolifération des cellules sont directement corrélés au pronostic vital du patient [170].

## Chimiotaxie

La chimiotaxie est le mouvement des cellules dû à un gradient de solutés (chimio-attractant ou -répulsifs). Elle peut être prise en compte en ajoutant à la densité d'énergie libre la contribution  $F_c = a(\mathbf{r}) \sum_{i \neq 0} \chi_i \rho_i$  où  $a(\mathbf{r})$  est la concentration de chimio-attractif ou de répulsif (qui dépend de la position) et  $\chi_i$  est le coefficient chimiotactique du type de cellule  $i$  (avec des signes différents pour les chimio-attractants et les chimio-répulsifs). La chimiotaxie ajoute une nouvelle contribution au flux  $\mathbf{j}_i^c = \sum_j -\rho \bar{M} (\phi_j \delta_{ij} - \phi_i \phi_j \phi_0 m f_r) \chi_j \nabla a$ .

Dans la section suivante, nous montrons comment relier les paramètres phénoménologiques du modèle des mélanges, comme les interactions cellulaires à des propriétés biologiques mesurables. Par ailleurs, nous récapitulons plusieurs valeurs tirées de la littérature.

### 2.1.6 Détermination des paramètres

Bien que les tissus soient principalement composés de cellules similaires, les différents types cellulaires qui constituent les organes peuvent être plus ou moins ségrégués. Le modèle des mélanges peut décrire comment les différents types de cellules interagissent les uns avec les autres et comment ils se mélangent ou se séparent. Plus précisément, le tissu pour lequel la tension de surface avec le milieu extérieur est la plus faible se présente à l'extérieur de celui pour lequel la tension est plus forte (figure 2.1(b)) [171]. L'architecture des agrégats cellulaires possède bien sûr un rôle crucial lors de la morphogenèse de l'embryon. En oncologie, on la suspecte aussi d'être un facteur primordial lors des métastases, du fait de résultats selon lesquels les cellules métastatiques doivent nécessairement être en contact avec la matrice extracellulaire [172] (figure 2.1(a)).

À l'état stationnaire, les potentiels chimiques de tous les types cellulaires indexés par  $i$  et les pressions sont égaux dans les différentes phases indexées par  $m, n$ . On annule les flux et on trouve que :  $\mu_{i,m} = \mu_{i,n}$  et  $P_m = P_n$ , où  $\mu_{i,m}$  est le potentiel chimique partiel à l'équilibre des espèces  $i$  dans la phase  $m$  et  $P_m$  représente la pression à l'équilibre dans la phase  $m$ . La détermination des paramètres du potentiel peut être effectuée par une analyse d'un agrégat cellulaire en régime stationnaire.

On peut imposer les valeurs des paramètres du potentiel d'interaction pour déterminer la composition dans l'état stationnaire (voir figure 2.1(d)). Par ailleurs, si la composition à l'équilibre de chaque phase est mesurée expérimentalement, un système linéaire d'équations des paramètres du potentiel d'interaction permet d'inférer les  $D_i$  et  $\alpha_{ij}$  (voir figure 2.1(c)).

Des quantités globales mesurables caractéristiques de l'équilibre et définies à partir de l'énergie libre effective, telles que la tension superficielle des tissus (Eq. 2.6), peuvent également être utilisées pour déterminer certains des paramètres. Dans le cas d'un potentiel d'interaction simple pour lequel la tension superficielle a une expression analytique, les mesures des tensions superficielles des tissus donnent directement accès à la valeur des paramètres du modèle. Des valeurs typiques pour la tension superficielle des tissus (pour les tissus embryonnaires de poulet [171, 173], ou d'agrégats multicellulaires tumoraux [174]) sont de l'ordre de  $\sigma \sim 0.1 - 20 \text{ mN.m}^{-1}$  (voir table 2.1 pour plus de valeurs). Les tensions de surface sont souvent données en dyn/cm dans la littérature, avec  $1 \text{ dyn/cm} = 1 \text{ mN/m}$ .

La taille de l'interface est celle d'un petit nombre (1-3) de cellules et est d'ordre  $\xi \sim 20 \mu\text{m}$  (voir Ref. [175])

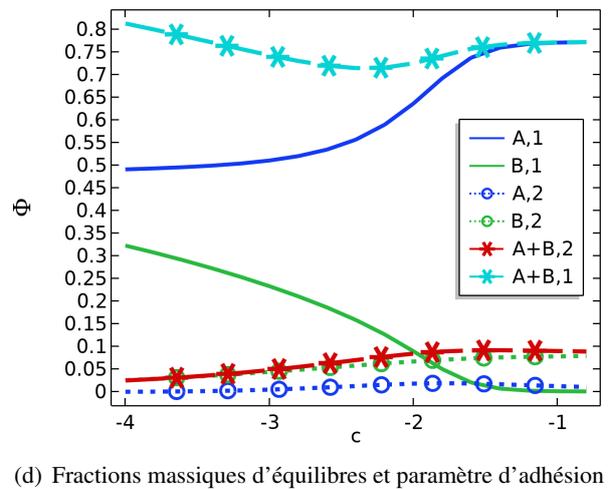
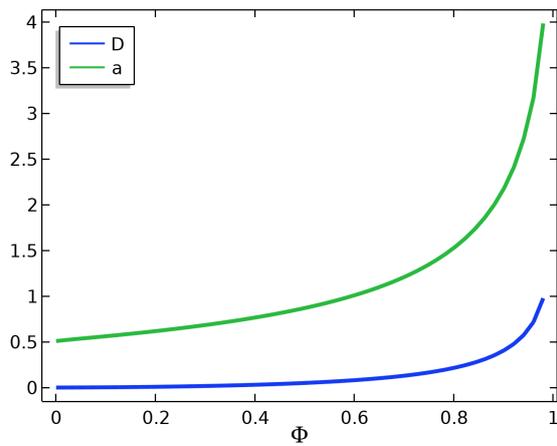
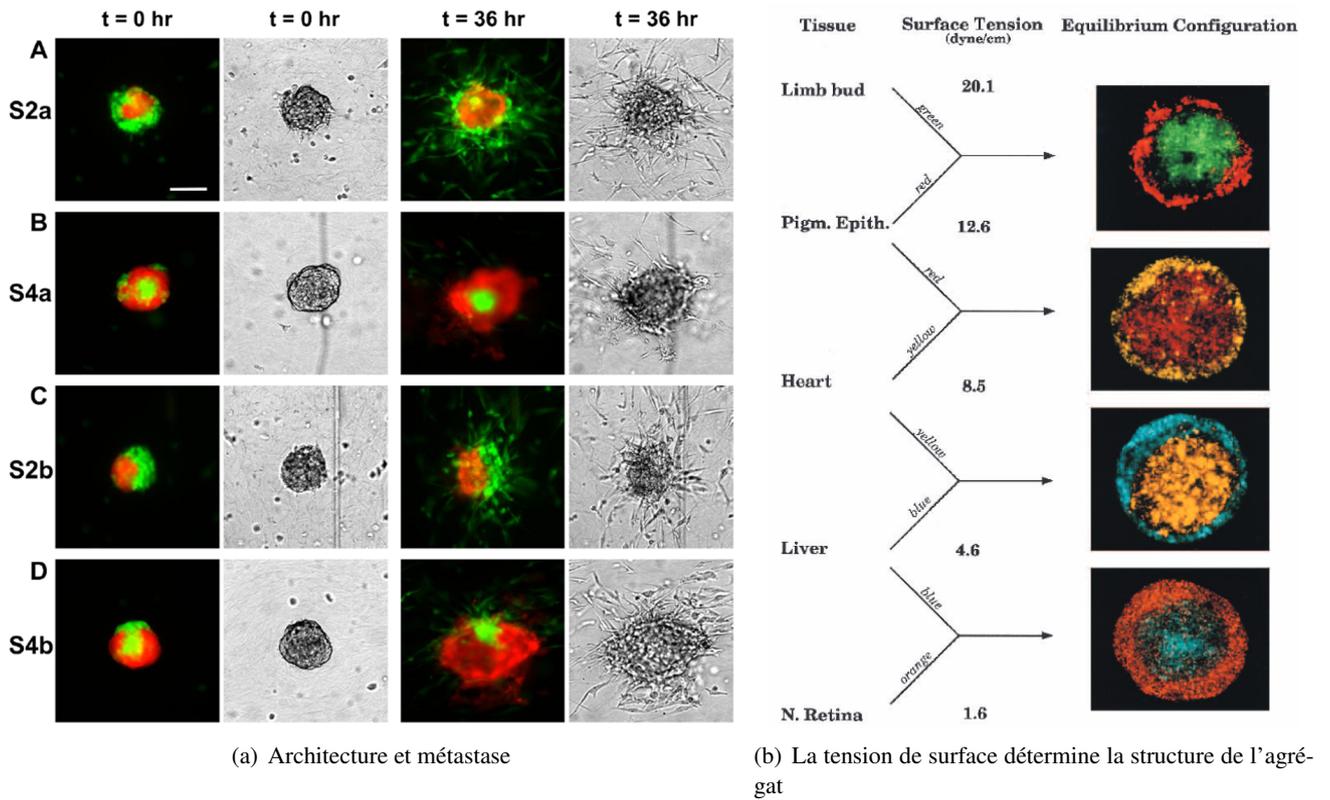


FIGURE 2.1 – Les figures **a** et **b** sont issues de la littérature, les figures **c** et **d** ont été produites par l'auteur. **(a)** : (tiré de [172]) : Les propriétés métastatiques d'une tumeur dépendent de la localisation des cellules métastatiques (en rouge) par rapport aux cellules non métastatiques (en vert). L'architecture dépend des propriétés d'adhésion ainsi que de l'intensité de la prolifération [137]. **(b)** : (tiré de [171]) : La valeur des tensions de surface de différents tissus permet de prévoir leur positionnement dans un agrégat les contenant. **(c)** : Paramètres du potentiel de Flory-Huggins :  $F \sim (1 - \phi) \log(1 - \phi) + D\phi \log(\phi) - a\phi^2$  selon la valeur de la densité dans la phase condensée. Dans la phase diluée  $\phi = 0.02$ . **(d)** : Variation des fractions massiques de 2 composants A et B dans une phase 1 condensée et une phase 2 diluée. A possède pour fraction massique d'équilibre 0.01 et 0.75 lorsque B est absent. Par ailleurs B n'adhère pas avec lui-même. L'énergie libre du système est :  $F \sim (1 - \phi_A - \phi_B) \log(1 - \phi_A - \phi_B) + a_0\phi_A \log(\phi_A) + a_1\phi_B \log(\phi_B) - b\phi_A^2 + c\phi_A\phi_B$ . On fait varier ici le paramètre c. Il faut noter que la taille de la phase condensée varie avec la variation des fractions d'équilibre.

espèce	organe	tension de surface (mN/m) [source]
poussin	mésoderme du bouton de pied	20.1 [171]
poussin	épithélium pigmentaire	12.6 [171]
poussin	cœur	8.5 [171]
poussin	foie	4.6 [171]
poussin	rétine	1.6 [171]
poisson-zèbre	ectoderme	0.75 [184]
poisson-zèbre	mésoderme	0.45 [184]
rat	prostate : fibroblastes	23 [174]
rat	prostate : muscles	19 [174]
humain	Gliosarcome	9 [185]
humain	Esthesioneuroblastome	17 [185]
humain	Glioblastome	26-46 [185]
humain	Ependymome	46-56 [185]

TABLE 2.1 – Valeurs des tensions de surface de certains tissus issues de la littérature. Ces valeurs varient sur 3 ordres de grandeurs. D'autres références intéressantes sur les tensions de surface d'agrégats de cellules cancéreuses sont par exemple [186], qui trouve des valeurs entre 2 et 35 mN/m, selon la lignée de cellules cancéreuses et le traitement effectué.

Variable	notation	valeur [source]
Taux de prolifération	$\Gamma$	0.2-3 jour <sup>-1</sup> [187]
Taux de consommation en oxygène	$dn_0$	10 <sup>-3</sup> -10 <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> [188, 189]
Viscosité d'un tissu	$\eta$	300-10 <sup>3</sup> Pa.s
Friction entre une phase cellulaire et un liquide	$m$	10 <sup>-5</sup> -10 <sup>-11</sup> s
Friction entre deux phases cellulaires	$M$	10 <sup>-12</sup> s

TABLE 2.2 – Valeurs de différentes variables qui interviennent dans le modèle des mélanges appliqué aux agrégats de cellules.

pour un profil de la densité cellulaire dans un agrégat, et Ref. [176] pour le profil de l'intensité de la fluorescence dans un sphéroïde).

La fraction massique dans la phase dense est d'environ  $\Delta\phi \sim 0.7 - 0.85$  [177, 178]. Il existe de nombreuses références concernant la fraction volumique de fluide dans la peau et plus précisément la cornée [179, 180, 181, 182]. Le milieu intercellulaire peut-être de 23% dans les carcinomes basocellulaires [183].

Si nous supposons une densité d'énergie libre effective telle que celle décrite dans section 2.1.1 :  $f = \frac{f_0}{2}(\phi - \phi_a)^2(\phi - \phi_b)^2 + \frac{\epsilon^2}{2}(\nabla\phi)^2$ , les valeurs précédentes conduisent à  $\epsilon \sim 10^{-3} - 10^{-4} J.m^{-1}$  et  $f_0 \sim 2.10^2 - 2.10^5 J.m^{-3}$ .

On détermine maintenant les mobilités  $m$  associée au frottement cellule-fluide et  $M$  associée au frottement cellule-cellule. Une cellule sphérique de rayon  $R$  se déplaçant dans un fluide de viscosité  $\eta$  loin de l'agrégat et  $\eta_0$  dans l'agrégat (puisque les macro-molécules sont présentes dans le fluide interstitiel [190]) où la distance entre les cellules est  $h$ , peut être comparée à une sphère se déplaçant à une distance  $h$  d'un mur (cas étudié dans la référence [191]). L'énergie dissipée par unité de temps est d'ordre  $6\pi RV^2(\eta + \eta_0 R/h)$  où  $V$  est la vitesse (loi de Stokes). Dans le modèle des mélanges, elle est d'ordre :  $m^{-1}4\pi R^3 V^2 \rho/6$ . En comparant ces deux résultats, on obtient  $m \sim R^2 \rho / (9(\eta + \eta_0 R/h)) \sim 10^{-5} - 10^{-11} s$  (en supposant  $\eta_0 \sim 10^{-3} - 1 Pa.s$ ,  $h \sim 10^{-5} - 10^{-8} m$ ,  $R \sim 10^{-5} m$ ). La mobilité  $M$  correspondant au frottement entre les différents types de cellules est plus complexe à estimer car elle reflète à la fois les frottements de surface et l'encombrement. L'énergie dissipée par unité de temps pour les frottements de surface est liée à la rupture des liaisons adhésives entre les cellules et est d'ordre :  $4\pi R^2 \xi V^2$  où  $\xi$  est une constante de frottement par unité de surface. On prend  $\xi \sim 10^{10} Pa.s.m^{-1}$  [192] ce qui donne  $M \sim 10^{-12} s$ . Ces valeurs sont cohérentes avec les travaux de Basan et al [79].

Dans la section suivante, nous illustrons l'approche Rayleighienne, en résolvant numériquement les équations dynamiques dans différents cas.

## 2.2 Applications

Le modèle des mélanges a été utilisé à la fois afin de modéliser des agrégats *in vivo* et *in vitro*, principalement en 2 dimensions [113, 114, 115] et plus rarement en 3 dimensions [129], afin de décrire des tissus et des organes possédant des géométries très différentes. Il permet d'étudier l'impact de la concentration en nutriments ou en activateurs/inhibiteurs, et des contraintes mécaniques sur leur croissance. Une question récurrente en oncologie mathématique est de savoir comment les caractéristiques microscopiques au niveau cellulaire provoquent des changements morphologiques à un niveau macroscopique. En effet, l'agressivité d'une tumeur est souvent corrélée à sa morphologie [172, 193, 194, 195] et cette interaction peut être capturée par le modèle des mélanges. Pour le mélanome, le modèle des mélanges montre que la combinaison d'un faible taux de consommation de nutriments et d'une adhésion différentielle entre les cellules cancéreuses et les cellules saines conduit à une instabilité morphologique qui n'existe pas pour un naevus bénin [113]. Pour l'adénocarcinome canalaire pancréatique, la prolifération et la chimiotaxie peuvent être prises en compte dans le modèle des mélanges. Le modèle prédit alors l'apparition d'une interface entre le pancréas normal et la tumeur lorsque l'échelle de temps mitotique est plus petite que l'échelle de temps de la chimiotaxie. L'existence de cette interface est donc une indication de la gravité de la pathologie [146].

Un sujet actif est la modélisation de l'angiogenèse dans les tumeurs vascularisées. Une stratégie courante consiste à utiliser des modèles hybrides, en couplant le modèle des mélanges avec un modèle à base d'agents [196, 197, 198]. Intégrer la vascularisation dans le modèle des mélanges complète la représentation des tumeurs multi-composantes *in vivo* [127, 128]. La vascularisation a également été intégrée dans des modèles continus qui ne font pas intervenir d'interface abrupte entre les phases [118].

Nous présentons maintenant plus en détail deux applications du modèle des mélanges : l'agrégation dans un puits, et la distribution spatiale des cellules dans un agrégat en croissance contenant 2 types de cellules. L'étude comprend tous les aspects décrits dans la section 2.1 au sujet des cellules et des nutriments. Les solutions numériques du modèle des mélanges sont obtenues avec le programme `Comsol Multiphysics` [199].

### 2.2.1 Agrégation de cellules dans un puits à 3 dimensions

Nous nous intéressons d'abord à la formation d'un agrégat au fond d'un puits à 3 dimensions dans le contexte du projet sur les interactions entre les macrophages et les cellules cancéreuses, longuement traité dans le chapitre 4. L'agrégation et la compaction de l'agrégat ont été étudiées avec des modèles discrets [91], et d'un point de vue mécanique [200], mais pas avec le formalisme du modèle des mélanges.

Dans les Fig. 2.2 et 2.3, on montre la formation d'un agrégat multicellulaire au fond d'un puits de rayon 1 mm. En partant d'une faible fraction massique initiale uniforme de cellules à  $t = 0$  h au fond du puits, les cellules sédimentent sous l'effet de la gravité. Les échelles de temps typiques sont 1 h pour le processus de sédimentation et 10 h pour le processus d'agrégation. Dans la figure 2.2, les cellules qui sont introduites dans le puits ont un paramètre d'adhésion cellule-cellule nul à l'instant initial. L'adhésion cellule-cellule augmente lors du contact entre les cellules en raison du processus de maturation, conduisant à la formation d'un agrégat. Dans la figure 2.3, au contraire, le paramètre d'adhésion est déjà maximal à  $t = 0$  h. Plusieurs agrégats se forment rapidement après la sédimentation et finissent par fusionner. Dans les deux cas, si aucune croissance ne se produit, l'agrégation se poursuit jusqu'à ce qu'un état stable soit atteint pour la taille de l'agrégat.

Dans ces expériences, il n'y a qu'un seul type de cellule, et la dynamique de la suspension cellulaire suit l'équation de conservation, l'équation (2.11), où la vitesse est donnée par l'équation (2.19) et l'équation (2.22). La vitesse du centre de masse est nulle au cours de ce processus. Le délai d'agrégation présenté par certaines lignées de cellules peut-être attribué à la maturation de l'adhésion entre les cellules [201, 202].

Afin de décrire le processus de maturation de l'adhésion, le paramètre d'interaction cellule-cellule  $\alpha_{11}$  du potentiel d'interaction Flory-Huggins est imposé comme proportionnel à la concentration en cadhérine à la surface cellulaire. Une équation d'advection-diffusion avec un terme source pour la concentration en cadhérine et donc pour le paramètre d'interaction cellule-cellule  $\alpha_{11}$  est définie :

$$\partial_t \alpha_{11} + \mathbf{v}_1 \cdot \nabla \alpha_{11} - D_\alpha \nabla^2 \alpha_{11} = \tau_a^{-1} (\alpha_{11}^0 - \alpha_{11}) \phi_1^n - \tau_b^{-1} \alpha_{11} \quad (2.24)$$

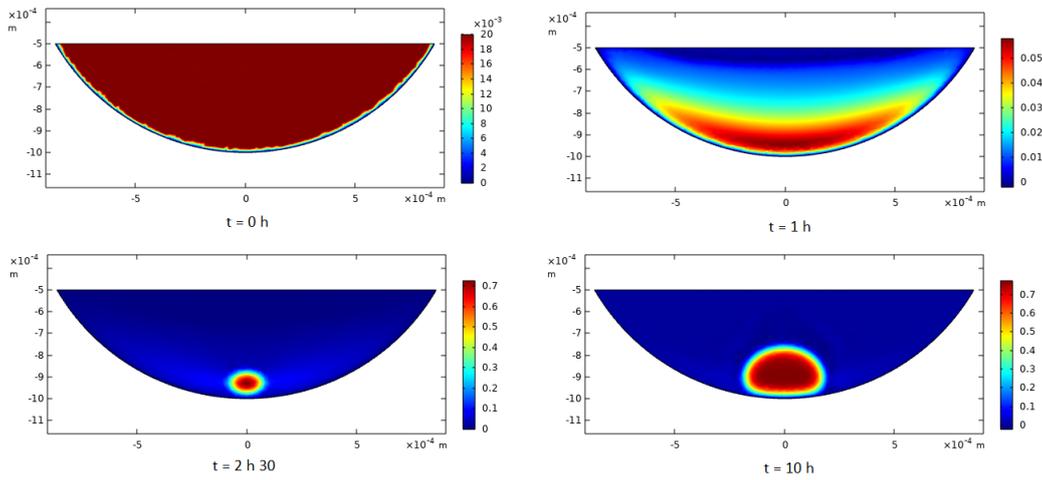


FIGURE 2.2 – *Processus d'agrégation d'un agrégat unique sans adhérence au substrat. ( $\phi_1 = 0$  sur le substrat). A  $t = 0$  h, des cellules avec un paramètre d'adhésion cellule-cellule  $\alpha_{11} = 0$  sont injectées au fond du puits, où elles sédimentent et finissent par s'agréger. La condition initiale au fond du puits est  $\phi_1(0, \mathbf{r}) = 0.02 + \delta(\mathbf{r})$  où  $\delta$  est un petit bruit. Cela correspond à une quantité de 2902 cellules de rayon  $r = 8 \mu\text{m}$ . Le puits a un rayon de  $R = 1 \text{ mm}$ .*

où  $\mathbf{v}_1$  est la vitesse cellulaire,  $\tau_a$  un temps caractéristique pour le recrutement des cadhérines, et  $\tau_b$  le temps caractéristique associé à la rupture des liaisons cadhérines. La valeur maximale du paramètre d'adhésion  $\alpha_{11}^0$  correspond à une saturation de la concentration en cadhérine. Le recrutement des cadhérines et leur transport vers la surface sont déclenchés par le contact entre les cellules. Il s'agit donc d'un phénomène coopératif, que l'on caractérise par une loi de puissance dépendante de la fraction massique  $\phi_1^n$  avec un exposant  $n \geq 2$ . La diffusion cellulaire est également incluse avec une constante de diffusion  $D_\alpha$ . Cette équation conduit à un délai d'agrégation des cellules dépendant de la valeur du temps de recrutement  $\tau_a/\phi_1^n$  et des conditions initiales pour  $\alpha$  et  $\phi_1$ .

Sans surprise, l'angle de mouillage de l'agrégat sur le puits dépend de l'énergie d'interaction entre le substrat et l'agrégat, comme pour le mouillage des gouttes liquides [203, 204]. L'énergie d'adhésion totale des cellules à la surface du puits est donnée par l'équation (2.5), où la force d'adhésion est donnée par les paramètres d'adhésion cellule-substrat  $\beta_i$  pour le type de cellule  $i$ . On fait varier le paramètre d'adhésion cellule-substrat pour induire l'étalement de l'agrégat dans la figure 2.4.

Les nutriments satisfont l'équation de diffusion-absorption Eq. (2.23) avec une condition aux limites sans flux aux bords (les parois du puits et l'interface des milieux de culture et l'air au bord supérieur). Dans la majeure partie de l'agrégat, la concentration en nutriments est faible (Fig. 2.5-B,D) et peut être inférieure à la concentration critique en nutriments  $c_0$  pour la prolifération définie par l'Eq. (3.6). Dans ce cas, le taux de croissance est négatif comme le montre la Fig. 2.5-A pour un agrégat à  $t = 3$  jours après sédimentation des cellules. Au contraire, près de la surface du sphéroïde, la concentration en nutriments est élevée et le taux de croissance est positif.

Une autre présentation (méthode de suivi des particules) des résultats est affichée dans la Fig. 2.5-D où la densité cellulaire est représentée par des cellules fictives (sphères colorées selon les valeurs de la concentration de nutriments normalisés par la concentration initiale de nutriments).

## 2.2.2 Dynamique de la séparation de phases dans un agrégat multicellulaire

Un deuxième exemple est l'étude numérique d'un agrégat comprenant deux types de cellules. Il faut noter que ce système est un mélange ternaire puisque la phase fluide intercellulaire inerte est également présente. La structure de l'agrégat dépend des paramètres du potentiel d'interaction de Flory-Huggins (section 2.1.1). Les cellules les plus agressives ou plus sujettes aux métastases, doivent être accessibles au médicament [205]. Il est donc crucial de connaître leurs localisations à l'intérieur d'une tumeur étant donnée la difficulté de pénétration du médicament. La localisation cellulaire dans la tumeur est particulièrement pertinente pour comprendre les résultats des tests pharmacologiques sur les sphéroïdes cancéreux *in vitro*, qui contiennent des cellules cancéreuses et des cellules souches cancéreuses [115, 206]. Dans notre exemple, nous suivons les modèles produits à partir de cellules souches

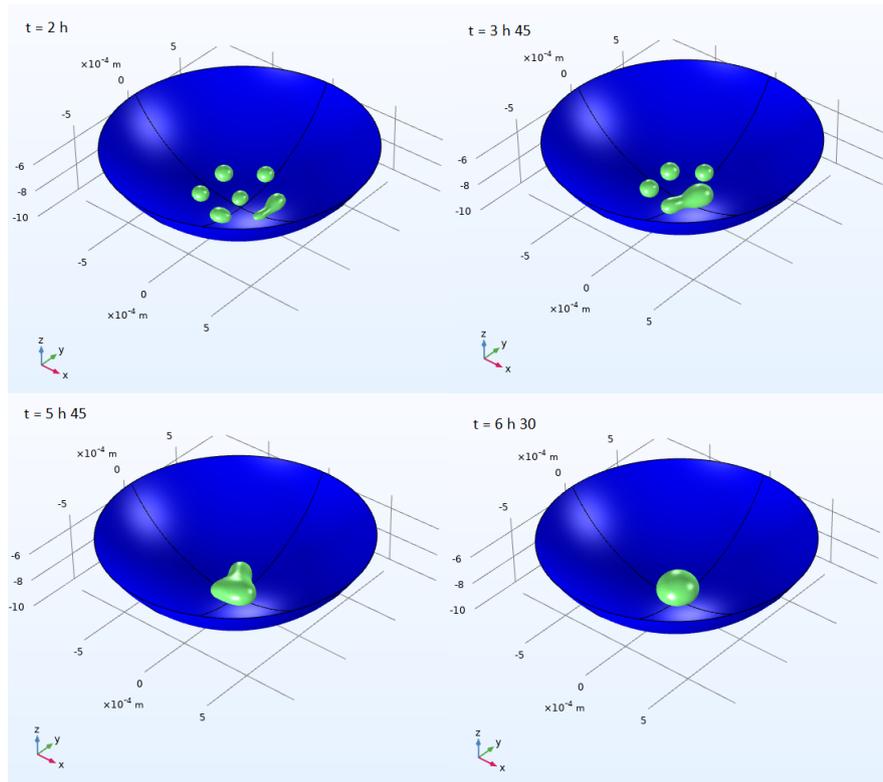


FIGURE 2.3 – Étude numérique de l'agrégation de plusieurs sphéroïdes proliférant au fond du puits à l'aide du modèle des mélanges. On montre ici l'iso-surface de  $\phi_1 = 0.35$  dans le mélange. Cela correspond à l'interface entre les sphéroïdes compacts et le milieu extérieur (eau avec nutriments). Dans ce cas, les cellules injectées dans le puits sont déjà "activées", de sorte que la nucléation de plusieurs sphéroïdes cellulaires se produit avant que les cellules ne sédimentent totalement. Les cellules n'adhèrent pas du tout au substrat ( $\phi_1 = 0$  sur le substrat). La condition initiale au fond du puits est  $\phi_1(0, \mathbf{r}) = 0.02 + \delta(\mathbf{r})$  où  $\delta$  est un petit bruit. Il correspond à 2902 cellules de rayon  $r = 8 \mu\text{m}$ . Le puits a un rayon de  $R = 1 \text{ mm}$  comme dans Fig. 2.2.

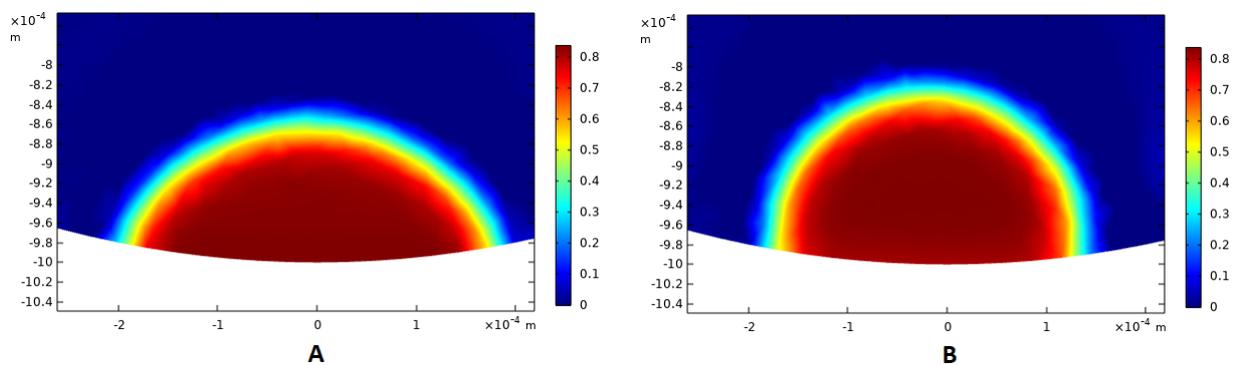


FIGURE 2.4 – Section de l'agrégat multicellulaire et fractions massiques des cellules pour 2 valeurs du rapport adhérence cellule-substrat/adhérence cellule-cellule :  $\beta/\alpha_0 = -0.077$  (A) et  $\beta/\alpha_0 = 0.154$  (B). L'agrégat multicellulaire s'étend et l'angle de mouillage du substrat cellulaire augmente lorsque la tension superficielle du substrat cellulaire diminue.

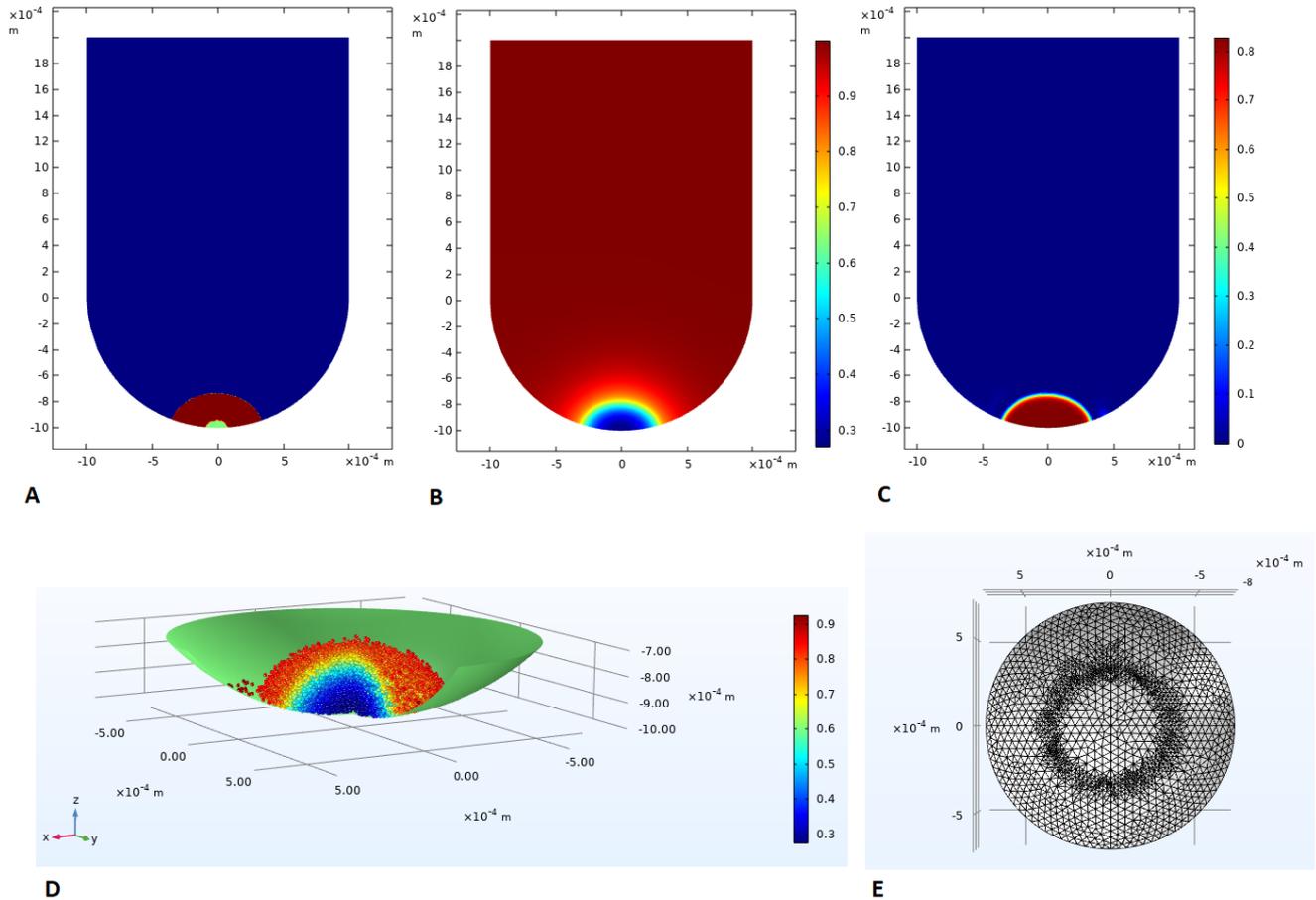


FIGURE 2.5 – Résultats numériques au jour 3 pour la croissance d'un agrégat dans un puits. Les mêmes conditions initiales sont identiques à celles de la Fig. 2.2. L'énergie d'interaction cellule-substrat est ici négligée, ce qui donne un angle de mouillage  $90^\circ$  avec le substrat. La condition aux limites pour les nutriments est une condition aux limites sans flux sur tous les bords du système. **A** : Coupe du puits : en bleu la phase cellulaire diluée, en rouge la partie de l'agrégat où la concentration en nutriments est telle que le taux de prolifération est positif, et en vert la partie de l'agrégat où le taux de prolifération est négatif. **B** : Coupe du puits avec la concentration en nutriments normalisée par la concentration initiale en nutriments. **C** : Coupe du puits pour la fraction massique cellulaire. **D** : Représentation discrète de l'agrégat au fond du puits avec des cellules fictives (méthode de suivi des particules). Les cellules sont colorées en fonction de la concentration normalisée en nutriments décrite ci-dessus. **E** : Maillage au fond du puits. La méthode des éléments finis a été utilisée dans cette étude numérique. Nous utilisons un maillage adaptatif qui se raffine à l'interface de l'agrégat avec le milieu extérieur et qui devient plus grossier ailleurs.

cancéreuses, qui se divisent soit symétriquement entre deux cellules filles identiques, soit de manière asymétrique en une cellule souche et une cellule différenciée [115, 207]. Dans la figure 2.6, nous étudions la croissance d'un agrégat contenant deux types de cellules : T1 de fraction massique  $\phi_1$  (en cyan dans la représentation discrète) et T2 de fraction massique  $\phi_2$  (en rouge dans la représentation discrète). Les cellules T1 se divisent de manière asymétrique en cellules T1 et T2, tandis que les cellules T2 ne prolifèrent pas. Nous commençons à  $t = 0$  jour avec principalement des cellules de type T1 et quelques cellules de type T2 (Fig. 2.6-A,B,C,D). On observe dans la section de l'agrégat avec une représentation discrète (Fig. 2.6-D) que les quelques cellules T2 sont localisées majoritairement à la surface de l'agrégat, mais elles ne forment pas une phase continue. A  $t = 10$  jours, on observe une structure complexe avec une séparation de phases partielle : il existe deux domaines interpénétrés, chacun d'eux correspondant à l'une des phases en équilibre avec des valeurs bien définies  $\phi_1$  et  $\phi_2$ . La phase avec le plus grand  $\phi_1$  est située dans la majeure partie du sphéroïde tandis que la phase avec le plus grand  $\phi_2$  est située dans la partie externe de l'agrégat. A très long terme, la croissance de l'agrégat conduit à une séparation complète des phases en deux domaines, chacun ne contenant qu'une seule phase.

Dans cet exemple on suppose que la densité totale  $\rho$  est constante et on résout les équations de conservation Eq. (2.11) pour les fractions massiques  $\phi_1$  et  $\phi_2$  où les flux sont donnés par l'équation (2.19). Afin de se concentrer sur la ségrégation de phases nous utilisons le potentiel d'interaction de Flory-Huggins avec différents paramètres d'adhésion cellule-cellule  $\alpha_{11}, \alpha_{12}, \alpha_{22}$  et en ignorant la gravité et la chimiotaxie. Les paramètres du modèle sont données en Appendice 2.A.2.

La dynamique de la séparation de phases contribue également à la structure de l'agrégat. Par exemple, considérons un agrégat avec un seul type de cellules, où les cellules dans la partie interne meurent en produisant des débris cellulaires qui ne se transforment pas en fluides. Le temps de réorganisation nécessaire pour évacuer les débris est de  $\tau_R \sim \rho R^2 / (MD_c)$  où  $D_c$  est le coefficient d'activité des cellules vivantes défini dans l'Eq. (2.3) et  $M$  la mobilité relative entre les débris et les cellules vivantes définie dans la section 2.1.4. Si le temps de mort typique  $\tau_G \sim 1/k^g$  est grand par rapport à ce temps  $\tau_R$ , la compétition entre croissance et friction peut conduire à l'apparition d'un coeur nécrotique.

Comme écrit plus haut, d'après Steinberg et al [171], la localisation des différents types cellulaires peut être prédite en comparant les différentes tensions interfaciales. Ce simple critère de mouillage macroscopique conduit aux mêmes résultats que la minimisation de l'énergie libre, du modèle des mélanges, dans la limite d'une forte séparation de phases. Cependant, il ne prédit ni les compositions des phases ni la dynamique de la séparation de phases entre les différents types cellulaires.

## 2.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons dérivé et présenté un modèle physique continu local pour les tissus et les agrégats. Deux types de composants sont présents, et deux types de variables leur correspondent. Si la fraction volumique ou massique d'un composant dans le milieu est non négligeable, on utilise ces dernières variables pour le décrire. C'est le cas des différents types de cellules présents dans le milieu par exemple. Si ces fractions sont négligeables, on utilise plutôt des concentrations. C'est le cas des espèces diffusives. Le formalisme prend en compte différentes propriétés des tissus, comme la prolifération, la mort cellulaire, la chimiotaxie, la consommation et la pénétration de nutriments, ou encore l'adhésion et répulsion mutuelles des composants dans le milieu. Le formalisme décrit donc l'évolution locale de ces concentrations et fractions volumiques ou massiques. Nous avons également montré des exemples d'applications, concernant l'agrégation de cellules en agrégats, le mouillage à un substrat, et l'évolution d'un agrégat où se trouvent deux types de cellules.

Néanmoins, les modèles locaux nécessitent souvent des calculs numériques longs et complexes, qui ne sont pas toujours nécessaires. Dans le prochain chapitre, nous présentons un modèle basé sur un formalisme continu, mais qui peut être intégré sur certaines parties du système étudié en un modèle qui n'est plus local et dont le nombre de variables est réduit. Ce modèle sera aussi particulièrement facile à calibrer avec des résultats expérimentaux.

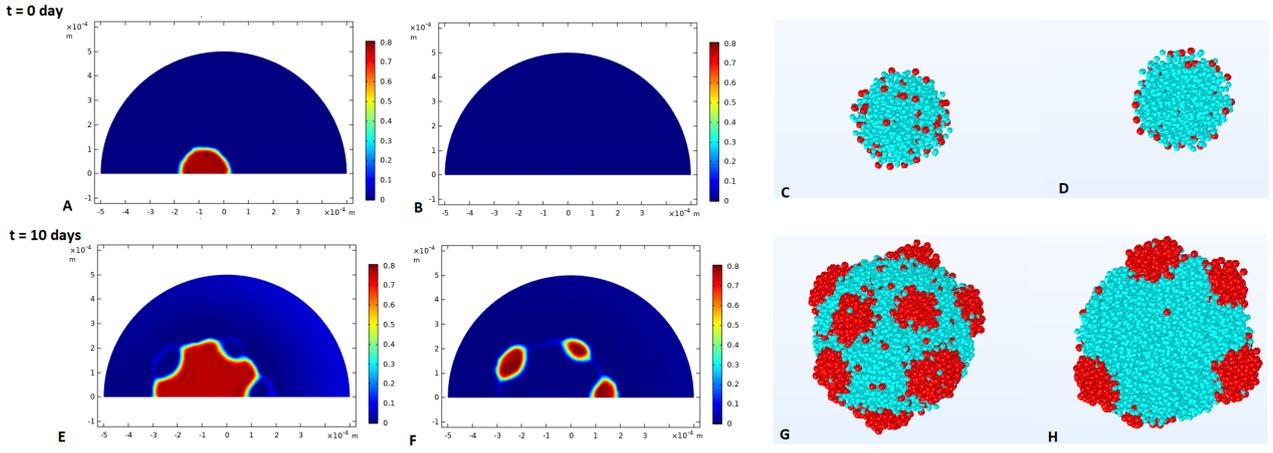


FIGURE 2.6 – Croissance d'un agrégat contenant deux types cellulaires  $T1$  et  $T2$ . La condition initiale à  $t = 0$  jour est la solution à l'état stationnaire pour un agrégat contenant 1668 cellules  $T1$  de rayon  $10 \mu\text{m}$  et 50 cellules  $T2$  de rayon  $8 \mu\text{m}$ . Les cellules  $T2$  se divisent de manière asymétrique en cellules  $T1$  et  $T2$ , tandis que les cellules  $T1$  prolifèrent peu et de façon symétrique. A  $t = 0$  jour, panneau **A** : Section de fraction massique  $T1$ , panneau **B** : Section de fraction massique  $T2$ . A  $t = 10$  jours, panneau **E** : Section de l'agrégat avec la fraction massique  $T1$ , panneau **F** : Section de l'agrégat avec la fraction massique  $T2$ . A droite, au temps  $t = 0$  jour, panneau **C** : Image de la surface de l'agrégat utilisant une représentation discrète. Les cellules  $T1$  sont colorées en cyan et les cellules  $T2$  en rouge. Dans le panneau **D** : section de l'agrégat. A  $t = 10$  jours, panneau **G** : Image de la surface de l'agrégat et en **H** : Section de l'agrégat.

## ANNEXES

### Annexe 2.A Méthodes numériques : Comsol Multiphysics

La solution numérique des équations du modèle des mélanges est obtenue à l'aide du programme `Comsol Multiphysics` basé sur la méthode des éléments finis. Les résultats sont présentés dans le chapitre 2, et nous donnons ici plus de détails.

#### 2.A.1 Agrégation dans un puits (section 2.2.1)

Nous étudions la croissance des agrégats à la partie inférieure d'un puits de rayon  $1 \text{ mm}$  (voir Fig. 2.7). Dans cette section, nous devons introduire à la fois la gravité et la maturation de l'adhésion cellule-cellule.

Les équations sont dérivées dans la section 2.1. Nous utilisons l'équation de conservation : Eq. 2.11, où nous introduisons le flux donné par l'Eq. 2.19. Le potentiel chimique est dérivé du potentiel de Flory-Huggins selon l'Eq. 2.3 avec le terme supplémentaire tenant compte de la gravité, introduit dans la section 2.1.4.

$$\begin{cases} \partial_t \phi_1 + \nabla \cdot \mathbf{j}_1 = \Gamma(c - c_0)\phi_1 \\ \mathbf{j}_1 = -M\phi_1(1 - \phi_1)\nabla \bar{\mu}_1 \\ \nabla \bar{\mu}_1 = \left( \frac{kT_1}{m_1} \frac{1}{\phi_1} + \frac{kT_0}{m_0} \frac{1}{1 - \phi_1} - \alpha_{11} \right) \nabla \phi_1 + \left( \frac{1}{\tilde{\rho}_1} - \frac{1}{\tilde{\rho}_0} \right) g \mathbf{e}_z - \epsilon^2 \nabla (\nabla^2 \phi_1) \\ \partial_t \alpha_{11} + \mathbf{v}_1 \cdot \nabla \alpha_{11} - D_\alpha \nabla^2 \alpha_{11} = \tau_a^{-1} (\alpha_{11}^0 - \alpha_{11}) \phi_1^n - \tau_b^{-1} \alpha_{11} \\ \partial_t c = D_c \nabla^2 c - d_c c \phi_1 \end{cases}$$

où  $\tilde{\rho}_i = m_i/w_i$  est la densité d'une cellule de phase  $i$ .

Les valeurs initiales sont  $\alpha(0, \mathbf{r}) = 0$  et  $\phi_1(0, \mathbf{r}) \approx 0.02$  au fond du puits et  $\phi_1(0, \mathbf{r}) = 0$  sinon. Cela correspond à 2902 cellules.

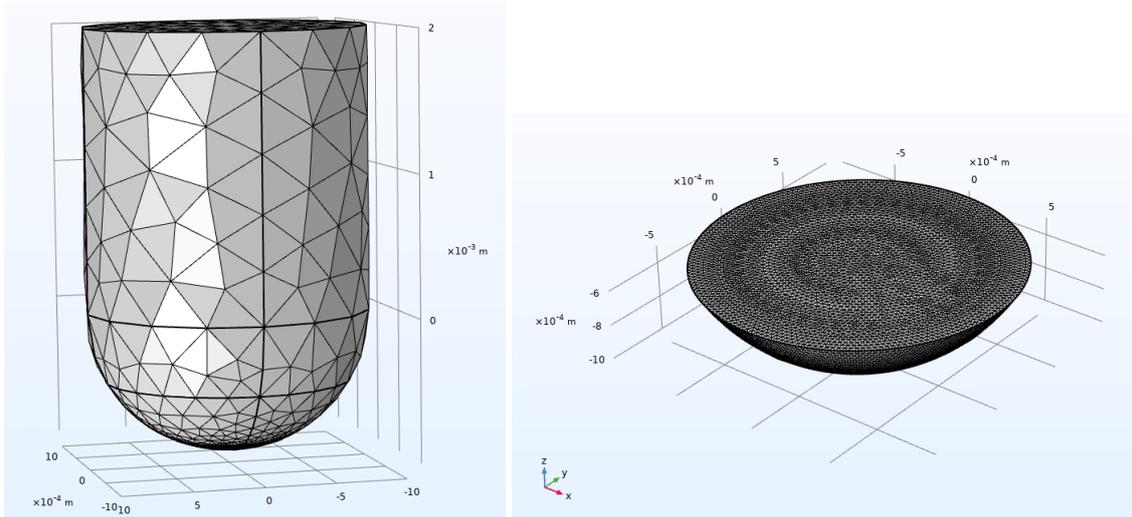


FIGURE 2.7 – **Gauche** : puits entièrement maillé. Le maillage est tétraédrique et a une taille de  $4.10^{-4} m$  au sommet du puits et  $3.10^{-5} m$  au fond. **Droite** : Zoom du fond du puits de rayon  $1 mm$  avec le maillage initial  $3.10^{-5} m$ .

Afin de stabiliser les solutions numériques, une viscosité effective pour chaque composant [208] est ajoutée au Reyleighien :  $\mathcal{W}_{stab} = \int \sum_{i \neq 0} \sum_{\alpha, \beta} \sigma_{i, \alpha \beta} v_{i, \alpha \beta} d\mathbf{r}$ , où  $\sigma_{i, \alpha \beta} = 2\eta_i V_{\alpha \beta}$  et  $v_{\alpha \beta} = (\partial_\alpha v_{\beta} + \partial_\beta v_\alpha)/2$ .

L'équation (2.30) devient :

$$-\sum_{k>0} A_{ik} v_{k, \alpha} = \rho \phi_i \nabla \bar{\mu}_i - \eta_i \partial_\beta \sigma_{i, \alpha \beta} \quad (2.25)$$

Les équations sont implémentées dans Comsol Multiphysics dans une interface Weak Form avec des ordres d'éléments linéaires, et les solutions sont calculées avec la méthode des éléments finis de type Galerkin. On écrit un système de 7 équations et donc 7 fonctions test pour  $\bar{\mu}_1^0, \phi_1, \alpha_{11}, v_{1,x}, v_{1,y}, v_{1,z}, c$ , où  $\bar{\mu}_1^0 = -2\alpha_{11}\phi_1 - \epsilon^2 \nabla^2 \phi_1$ . L'intégration par partie est utilisée pour réduire les termes du second ordre en termes du premier ordre. Dans le cas où la vitesse possède une expression analytique, on peut se limiter à deux équations pour un système à deux composants. Par exemple, le système :

$$\begin{cases} f = D_0(1 - \phi) \log(1 - \phi) + D_1\phi \log(\phi) - \alpha\phi^2/2 + \epsilon^2(\nabla\phi)^2/2 & ; \quad \mu = \frac{\delta}{\delta\phi} \int f d\Omega \\ \partial_t \phi + \nabla \cdot (M\phi(1 - \phi)\nabla\mu) = \Gamma \end{cases} \quad (2.26)$$

est écrit en 2 dimension en forme faible dans le code Comsol :

```
test(phi) * (mu+alpha*phi) - epsilon^2 * (test(phix) * phix + test(phiy) * phiy)
```

```
test(mu) * (phit - Gamma) + M*phi * (1-phi) * (test(mux) * mux + test(muy) * muy)
- M * (D1 + (D0 - D1) * phi) * (test(mux) * phix + test(muy) * phiy)
```

Un exemple simple de la méthode se trouve dans Equation view/weak form dans l'exemple : Mathematics/Moving interface/Phase field (pf) du logiciel Comsol Multiphysics.

La taille du maillage est choisie proche mais inférieure à la valeur de  $2\epsilon/\alpha_{11}^{1/2}$ , qui contrôle la taille de l'interface (voir section 2.1.1 et 2.1.6). Un maillage adaptatif est souvent nécessaire pour les fortes variations locales comme le montre la figure 2.7. Elle peut éventuellement évoluer dans le temps au cours de l'étude numérique. La représentation discrète est réalisée avec l'interface Mathematical particle tracing.

## 2.A.2 Structure d'un agrégat avec plusieurs types de cellules (section 2.2.2)

Nous étudions la structure d'un agrégat en croissance contenant 2 types cellulaires différents avec des propriétés d'adhésion différentes. L'espace de travail est un domaine sphérique où évolue l'agrégat. Ici, la gravité et la maturation sont négligées. Nous commençons par stabiliser une solution pour créer un agrégat initial avec la quantité souhaitée de cellules jusqu'à ce qu'elle atteigne une configuration d'équilibre. A cette étape, la croissance n'est activée qu'à l'équilibre complet.

Seules 4 équations faibles sont nécessaires pour déterminer  $\bar{\mu}_1$ ,  $\bar{\mu}_2$ ,  $\phi_1$  et  $\phi_2$ , et nous introduisons l'expression explicite des vitesses dans la conservation équations. Les coefficients de mobilité  $m$  et  $M$  sont supposés égaux. Ici, il n'y a ni besoin de termes stabilisateurs ni de maillage adaptatif. Nous avons utilisé un potentiel de Flory-Huggins :  $F = -a_{11}\phi_1^2 - a_{22}\phi_2^2 - a_{12}\phi_1\phi_2 + D_1\phi_1 \log(\phi_1) + D_2\phi_2 \log(\phi_2)$  avec  $a_{11} = 1.2297 \times 10^4 \text{ mJ.m}^{-3}$ ,  $a_{22} = 1.2278 \times 10^4 \text{ mJ.m}^{-3}$ ,  $a_{12} = 1.8886 \times 10^4 \text{ mJ.m}^{-3}$ ,  $D_1 = 0.86483 \times 10^4 \text{ mJ.m}^{-3}$ ,  $D_2 = 0.87212 \times 10^4 \text{ mJ.m}^{-3}$ . La taille du maillage est de  $2.4 \cdot 10^{-5} \text{ m}$ .

On introduit les termes de croissance  $\Gamma_1$  et  $\Gamma_2$  :

$$\begin{aligned} \partial_t \phi_1 + \nabla \cdot (\phi_1 \mathbf{v}_1) &= \Gamma_1 \\ \partial_t \phi_2 + \nabla \cdot (\phi_2 \mathbf{v}_2) &= \Gamma_2 \end{aligned} \quad (2.27)$$

où  $\Gamma_1 = (1 - \phi_1 - \phi_2)\phi_1\tau_{11}^{-1} + (1 - \phi_1 - \phi_2)\phi_2\tau_{12}^{-1}$  et  $\Gamma_2 = (1 - \phi_1 - \phi_2)\phi_1\tau_{21}^{-1} + (1 - \phi_1 - \phi_2)\phi_2\tau_{22}^{-1}$ . On prend comme paramètres :  $\tau_{11} = 240 \text{ h}$ ,  $\tau_{12} = 24 \text{ h}$ ,  $\tau_{21} = 240 \text{ h}$ ,  $\tau_{22} = 2400 \text{ h}$ . Cela signifie donc que les T2 et les T1 se divisent chacune en T1 et T2. Les T2 se divisent de façon très importante en T1 et de façon très faible en T2, et les T1 se divisent de façon symétrique en T1 et T2, à un taux inférieur comparé à la prolifération des cellules T2 en T1, mais à un taux bien supérieur comparé à la prolifération des T2 en T2.

## Annexe 2.B Dérivation variationnelle du modèle des mélanges

Nous commençons par le différentiel de la densité totale d'énergie libre  $F$ , fonction des concentrations cellulaires  $n_i$ .  $\phi_i$  est la fraction massique de l'espèce  $i$ . L'indice 0 fait référence au support (et non à un type de cellule).  $\rho_i = \phi_i \rho$  est la masse volumique partielle de l'espèce  $i$  où  $\rho = \sum_i \rho_i$  est la masse volumique totale,  $m_i$  est la masse d'un individu de type  $i$  (qui peut être une molécule d'eau ou une cellule).  $\mu_i = \partial F / \partial n_i$  est le potentiel chimique partiel de l'espèce  $i$ . On procède à un changement de variable  $n_i = \rho \phi_i / m_i$  dans le différentiel de la densité d'énergie libre :

$$dF = \sum_{i \geq 0} \frac{\partial F}{\partial n_i} dn_i = \mu d\rho + \sum_{i > 0} \rho \bar{\mu}_i d\phi_i$$

avec  $\mu = \sum_{i \geq 0} \frac{\mu_i \phi_i}{m_i}$  et  $\bar{\mu}_i = \frac{\mu_i}{m_i} - \frac{\mu_0}{m_0}$

### Dérivée temporelle de l'énergie libre

On définit l'énergie libre du système  $\mathcal{F}$  comme l'intégrale de la densité d'énergie libre  $f = F + \epsilon^2(\nabla \phi)^2/2$  sur le volume du système .

$$\mathcal{F} = \int f[n_i] dr$$

La dérivée temporelle de cette énergie libre conduit à l'Eq. (2.12) du texte principal, après avoir utilisé le résultat précédent pour la différentielle de la densité d'énergie libre, et effectué le changement de variable  $n_i = \rho \phi_i / m_i$ .

Le flux de chaque composante indexé par  $i$  s'écrit :  $\mathbf{J}_i = \rho_i \mathbf{V}_i = \rho_i (\mathbf{V} + \mathbf{v}_i)$  où  $\mathbf{v}_i$  est la vitesse de la composante indexée par  $i$ ,  $\mathbf{V}$  est la vitesse du centre de masse,  $\mathbf{v}_i$  la vitesse relative dans le repère du centre de masse et  $\mathbf{j}_i = \rho_i \mathbf{v}_i$  le flux relatif. On rappelle la définition de la pression :  $P = \sum_i \rho_i \frac{\partial f}{\partial \rho_i} - f$ . Ensuite, le taux de variation de l'énergie libre s'écrit :

$$\frac{d\mathcal{F}}{dt} = \int \left\{ \sum_{i \geq 0} \mu_i \partial_t n_i \right\} d\mathbf{r} = \int \left\{ \mathbf{v} \cdot \nabla P + \sum_{i > 0} \mathbf{j}_i \cdot \nabla \bar{\mu}_i + \dot{F}_0 \right\} d\mathbf{r}$$

Puisque  $\nabla F = \sum_i \frac{\partial F}{\partial \rho_i} \nabla \rho_i + \rho g$ , quand la gravité est introduite dans la densité d'énergie libre cette expression se réécrit :

$$\frac{d\mathcal{F}}{dt} = \int \left\{ \mathbf{v} \cdot (\rho g \mathbf{e}_z + \nabla P) + \sum_{i > 0} \mathbf{j}_i \cdot \nabla \bar{\mu}_i + \dot{F}_0 \right\} d\mathbf{r}$$

### Extrémisation du Rayleighien

On définit le Rayleighien  $\mathcal{R}$  comme la somme des dérivées temporelles de l'énergie libre :  $\frac{d\mathcal{F}}{dt}$ , la dissipation visqueuse par unité de temps  $\mathcal{W}_f$ , et la moitié de la fonction de dissipation du frottement  $\mathcal{W}_v$ , [109] :

$$\mathcal{W}_f = \int \sum_{i \neq j} \frac{1}{2} \rho \phi_i \phi_j M_{ij}^{-1} (\mathbf{v}_i - \mathbf{v}_j)^2 d\mathbf{r}; \quad \mathcal{W}_v = \int \sum_{\alpha, \beta} \sigma_{\alpha\beta} V_{\alpha\beta} d\mathbf{r} \quad (2.28)$$

avec  $V_{\alpha\beta} = (\partial_\alpha V_\beta + \partial_\beta V_\alpha)/2$

et

$$\frac{d\mathcal{F}}{dt} = \int \left\{ \mathbf{v} \cdot (\rho g \mathbf{e}_z + \nabla P) + \sum_{i \neq 0} \mathbf{j}_i \cdot \nabla \bar{\mu}_i + \dot{F}_0 \right\} d\mathbf{r}; \quad \mathcal{R} = \mathcal{W}_f + \mathcal{W}_v + \frac{d\mathcal{F}}{dt} \quad (2.29)$$

On procède d'abord à la minimisation du Rayleighien par rapport à la vitesse du centre de masse  $\mathbf{V}$  de coordonnées  $V_\alpha$  :

$$\frac{\delta \mathcal{R}}{\delta V_\alpha} = 0 \implies -\nabla P + \nabla \cdot \sigma - \rho g \mathbf{e}_z = 0$$

Ensuite, nous procédons à la minimisation par rapport à la composante de vitesse  $v_{i,\alpha}$  de l'espèce  $i$  dans la direction  $\alpha$  qui conduit à  $\frac{\delta \mathcal{R}}{\delta v_{i,\alpha}} = 0$ .

On rappelle que  $\phi_0 \mathbf{v}_0 = -\sum_{i \neq 0} \phi_i \mathbf{v}_i$  et  $\phi_0 = 1 - \sum_{i \neq 0} \phi_i$ .

$$\begin{aligned} \frac{\delta \mathcal{W}_f}{\delta v_{i,\alpha}} &= v_{i,\alpha} \rho \phi_i \left( \phi_i M_{i0}^{-1} + \phi_0^{-1} \phi_i \sum_{k \neq 0} \phi_k M_{k0}^{-1} + M_{i0}^{-1} + \sum_{j \neq i, j \neq 0} \phi_j (M_{ij}^{-1} - M_{i0}^{-1}) \right) \\ &\quad + \rho \phi_i \sum_{j \neq i, j \neq 0} v_{j,\alpha} \phi_j (M_{j0}^{-1} + \phi_0^{-1} \sum_{k \neq 0} \phi_k M_{k0}^{-1} + M_{i0}^{-1} - M_{ij}^{-1}) \\ \frac{\delta \mathcal{W}_v}{\delta v_{i,\alpha}} &= 0 \quad \text{and} \quad \frac{\delta}{\delta v_{i,\alpha}} \left( \frac{d\mathcal{F}}{dt} \right) = \rho \phi_i \partial_\alpha \bar{\mu}_i \end{aligned}$$

Cela mène à :

$$-\sum_{k > 0} A_{ik} v_{k,\alpha} = \rho \phi_i \partial_\alpha \bar{\mu}_i \quad (2.30)$$

$$\begin{cases} A_{ii} = \rho\phi_i M_{i0}^{-1} + \rho\phi_i^2 (M_{i0}^{-1} + \phi_0^{-1} \sum_{k \neq 0} \phi_k M_{k0}^{-1}) + \rho\phi_i M_{i0}^{-1} + \sum_{j \neq i, j \neq 0} \rho\phi_i \phi_j (M_{ij}^{-1} - M_{i0}^{-1}) \\ A_{ij} = \rho\phi_i \phi_j (M_{j0}^{-1} + \phi_0^{-1} \sum_{k \neq 0} \phi_k M_{k0}^{-1}) + \rho\phi_i \phi_j (M_{i0}^{-1} - M_{ij}^{-1}) \end{cases}$$

If  $M_{ij} = M$ ,  $M_{i0} = m$  :

$$\begin{cases} A_{ii} = \rho\phi_i M^{-1} + \rho\phi_i \phi_0 (m^{-1} - M^{-1}) + \rho\phi_i^2 \phi_0^{-1} m^{-1} + \rho\phi_i^2 (m^{-1} - M^{-1}) \\ A_{ij} = \rho\phi_i \phi_j \phi_0^{-1} m^{-1} + \rho\phi_i \phi_j (m^{-1} - M^{-1}) \end{cases}$$

Ce résultat peut être réécrit :  $A_{ij} = \rho\phi_i \bar{M}^{-1} \delta_{ij} + \rho f_r \phi_i \phi_j$  with  $f_r = m^{-1}(1 + \phi_0^{-1}) - M^{-1}$  et  $\bar{M}^{-1} = m^{-1} \phi_0 + M^{-1}(1 - \phi_0)$ .

### Inversion de la matrice de friction effective $A_{ij}$

La matrice de friction effective se réécrit  $A_{ij} = A_{ij}^0 + \bar{A} \phi_i \phi_j$  où  $A^0$  est une matrice diagonale et  $\bar{A} = \rho f_r$ . Sa matrice inverse est :

$$A_{ij}^{-1} = \rho^{-1} \phi_i^{-1} \bar{M} (\delta_{ij} - f_r m \phi_i \phi_0)$$

Ainsi :

$$v_{i,\alpha} = - \sum_{j \neq 0} \bar{M} (\delta_{ij} - f_r \phi_j \phi_0) \partial_\alpha \bar{\mu}_j$$

et on obtient l'équation (2.19) :

$$j_{i,\alpha} = \rho \phi_i v_{i,\alpha} = -\rho \sum_{j \neq 0} \bar{M} (\delta_{ij} \phi_j - f_r m \phi_i \phi_j \phi_0) \partial_\alpha \bar{\mu}_j \quad (2.31)$$

On obtient la vitesse moyenne des cellules en sommant les flux des cellules  $\mathbf{v}_c$ .

$$(1 - \phi_0) v_{c,\alpha} = \sum_{i \neq 0} j_{i,\alpha} = -\bar{M} \left( \sum_{i \neq 0} \phi_i \partial_\alpha \bar{\mu}_i - f_r m (1 - \phi_0) \phi_0 \sum_{i \neq 0} \phi_i \partial_\alpha \bar{\mu}_i \right)$$

Après avoir défini :  $\gamma = \frac{\rho(1-\phi_0)}{\phi_0 m_0}$ , on retrouve la relation (2.21).

# Chapitre 3

## Croissance d'agrégats multi-cellulaires

On introduit dans ce chapitre le concept et l'utilité des agrégats multicellulaires dans des expériences *in vitro*. Puis on décrit la formation d'agrégats et la croissance d'agrégats cellulaires. Il s'agit d'offrir une version simplifiée du modèle physique par rapport au modèle des mélanges. En effet, ce dernier est local, et en général, il ne pourvoit pas d'expression analytique ; des méthodes numériques telles que les Éléments Finis sont utilisées pour le résoudre. Dans ce chapitre, on vise à dériver des expressions analytiques simples à manier. On illustre le modèle avec des calibrations de celui-ci sur des expériences.

### 3.1 Introduction

#### 3.1.1 Les agrégats multicellulaires

Les expériences sur les tissus et organes peuvent être menées *in vivo*, *ex vivo* (sur des tissus extraits d'organismes vivants, ou sur des organoïdes dérivés de patients [209]), et *in vitro* (sur des cellules en culture). Bien que les expériences *in vivo* permettent la manipulation directe des organismes vivants, elles sont plus difficiles à contrôler et à interpréter. Elles sont également plus difficiles à modéliser de façon analytique et numérique. Par conséquent, il est crucial de développer des expériences, suffisamment complexes pour imiter les organismes vivants, mais suffisamment simples afin de contrôler précisément les paramètres, interpréter les résultats et finalement construire un modèle quantitatif. Les agrégats multicellulaires [210] apparaissent donc comme un niveau intermédiaire de description, utile dans la description des tissus et parfois des organes [211]. Les agrégats multicellulaires sont des amas de cellules en croissance d'une taille de l'ordre de quelques centaines de microns placés dans des puits [212], des capsules [213] ou des montages microfluidiques [214]. Les protocoles expérimentaux peuvent y être répétés plusieurs fois, et les données enregistrées automatiquement par des ordinateurs. Ce niveau de description, souvent choisi dans les expériences biologiques et biophysiques, correspond aussi à des échelles qui sont aujourd'hui atteignables avec la puissance des simulations numériques qui prennent en compte les effets microscopiques à l'échelle cellulaire. La formation de sphéroïdes réguliers est aussi d'une nécessité majeure en pharmacologie dans l'expérimentation de thérapies.

Plusieurs techniques existent, qui conduisent à des agrégats à 3 dimensions en utilisant des dispositifs microfluidiques [215]. En phase liquide, sur une surface non adhésive, selon la Liquid Overlay Technique [216], des agrégats croissent avec des formes plutôt irrégulières lorsque le substrat est plan. Pour pallier à cette difficulté, les surfaces non-adhérentes en U ou convexes donnent des sphéroïdes plus réguliers avec au final une taille quasi-uniforme (voir [217] pour une revue comparative de ces techniques réalisées dans les fluides). Des actions mécaniques comme la centrifugation ou l'agitation horizontale sont nécessaires au moins pour initier et améliorer le processus d'agrégation. Toutes les cellules humaines (cancéreuses ou non) ne sont pas capables de former des sphéroïdes [218] : certaines cellules cancéreuses restent isolées dans le milieu liquide sans s'agréger. La capacité à former des sphéroïdes semble dépendre de la nature des cellules et non de la méthode employée pour générer les sphéroïdes.

Les agrégats cellulaires ne contenant qu'un seul type de cellules noyées dans un fluide passif ou dans un gel,

croissent par division cellulaire et coalescent avec d'autres agrégats pour atteindre finalement une taille finie à l'état stationnaire [219, 220]. En raison du rapport surface/volume croissant, l'apoptose dans la partie interne de l'agrégat compense la prolifération au bord. Cette partition spatiale entre division cellulaire et mort cellulaire est le résultat de deux facteurs principaux.

- La division cellulaire produit des contraintes mécaniques internes plus élevées au centre de l'agrégat : pour proliférer, les cellules doivent exercer une pression sur leur environnement. Le nombre de voisins de chaque cellule étant plus petit en surface, la prolifération est plus facile en surface que dans le volume. Ces contraintes de compression entraînent également l'apoptose ou la nécrose [221, 222] et limitent le taux de croissance [44] dans la partie interne du sphéroïde.
- L'accès aux nutriments nécessaires à la division cellulaire est plus limité, voire impossible, au centre par rapport à la surface externe de l'agrégat.

Un rayon typique de l'agrégat à partir duquel un cœur nécrotique apparaît est de 100 à 250  $\mu\text{m}$  selon la lignée cellulaire et les conditions expérimentales [223, 224, 225, 226].

## 3.2 Agrégation et croissance de sphéroïdes simples

La segmentation en régions d'une tumeur dans l'analyse de sa croissance a été suggérée depuis les années 30 afin d'expliquer la dynamique de croissance [227]. Historiquement, la description mathématique de la prolifération cellulaire dans les tumeurs a d'abord été une description globale, comparant notamment les taux de croissance avec traitement ou sans traitement [227, 228].

### 3.2.1 Théorie

#### Prolifération et mort cellulaire

Comme plus haut Eq. (2.11) le taux de prolifération  $k^g = k_d - k_a$  est défini comme la différence entre le taux de division cellulaire  $k_d$  et le taux de mort cellulaire  $k_a$ . Le taux de croissance est négatif dans la majeure partie de l'agrégat  $k^g = -k_b$  et positif dans une couche limite mince proche de la surface  $k^g = k_s$ . L'évolution du nombre de cellules  $N$  à l'intérieur l'agrégat s'écrit :

$$\frac{dN}{dt} = -k_b(N - N_s) + k_s N_s \quad (3.1)$$

où  $N_s = \alpha N^{2/3}$  est le nombre de cellules de la couche externe qui se divisent plus facilement ( $\alpha$  étant un paramètre reflétant la géométrie) [82]. Le nombre de cellules augmente avec le temps pour atteindre un état stationnaire :  $N = (\frac{\alpha(k_s + k_b)}{k_b})^{1/3}$ . À l'équilibre, la division cellulaire dans la couche externe induit un flux de cellules de la surface où elles se divisent vers l'intérieur de l'agrégat où elles meurent [148]. Le champ de vitesse des cellules  $\mathbf{v}(\mathbf{r})$  est obtenu à partir de l'équation de conservation des cellules, introduite dans le chapitre précédent (Eq. (2.11)) :

$$\frac{\partial n(\mathbf{r}, t)}{\partial t} + \nabla \cdot (n(\mathbf{r}, t) \mathbf{v}(\mathbf{r})) = k^g(\mathbf{r}) n(\mathbf{r}, t) \quad (3.2)$$

où  $n(\mathbf{r})$  est localement le nombre de cellules par unité de volume et  $k^g(\mathbf{r})$  est le taux de croissance local qui est négatif dans la majeure partie de l'agrégat et positif sur une couche externe. En pratique, une bonne approximation [229, 230, 231] est de considérer que la densité cellulaire est constante dans l'agrégat  $n(\mathbf{r}, t) = n_c$ . Cette approximation est justifiée à partir de données expérimentales sur des sphéroïdes en absence de contrainte externe [81, 175, 176, 232]. L'équation de conservation de la cellule se réduit alors à :

$$\nabla \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}) = k^g(\mathbf{r}) \quad (3.3)$$

### Nutriments

Comme décrit dans le chapitre précédent section 2.1.5, les cellules cancéreuses consomment divers nutriments [151], et leur taux de croissance dépend des concentrations de ces derniers. Dans le cas où la variation du taux de division cellulaire est due à l'épuisement des nutriments dans le milieu par les cellules, une description plus précise peut être faite une fois le champ de concentration en nutriments déterminé. Les nutriments, de concentration  $c$ , diffusent à l'extérieur de l'agrégat de rayon  $R$  avec une constante de diffusion  $D_{ext}$  alors qu'à l'intérieur de l'agrégat, leur constante de diffusion est  $D_{int}$  et sont consommés par les cellules.

L'équation de diffusion-absorption pour la concentration locale  $c$  de nutriments s'écrit :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c - d_c n_c c \quad (3.4)$$

où  $D = D_{ext}$  et  $n_c = 0$  en dehors de l'agrégat ( $r \geq R$ ) tandis que  $D = D_{int}$  et  $n = n_c$  à l'intérieur ( $r \leq R$ ). La diffusion des nutriments est rapide par rapport à la croissance globale des cellules et atteint rapidement un état stationnaire. Les nutriments pénètrent à l'intérieur de l'agrégat sur une longueur  $\lambda = (D_{int}/(d_c n_c))^{1/2}$ . Si le nutriment limitant pour la croissance est l'oxygène, la concentration de gaz dissous dans l'eau est proportionnelle à la pression partielle d'oxygène décrite par la loi de Henry [233, 234]. Une estimation du temps nécessaire à un épuisement significatif des nutriments dans un puits typique est de 2 à 3 jours. En effet, l'évolution de la quantité totale de nutriments répond à l'équation :

$$\mathcal{C} = \int_{\Omega} c d\Omega ; \mathcal{D} = \int_{\mathcal{V}(t)} c d_c n d\mathcal{V}(t) ; \frac{d\mathcal{C}}{dt} = -\mathcal{D} \quad (3.5)$$

où  $c$  est la concentration locale en nutriments,  $\Omega$  le volume total,  $\mathcal{V}(t) = 4\pi R(t)^3/3$  le volume de l'agrégat,  $\mathcal{C}$  la quantité totale de nutriments, et  $\mathcal{D}$  le taux de consommation totale de nutriments. On peut évaluer l'échelle de temps typique pour l'épuisement des nutriments  $T_d = (\Omega\lambda)/(4\pi R^2 D)$ . On approche le puits par un cylindre de rayon  $r = 3$  mm et de hauteur  $h = 10$  mm. Pour un agrégat de rayon  $R \sim 100$   $\mu\text{m}$  et  $\lambda \sim 50$   $\mu\text{m}$ , on obtient  $T_d \sim 2.5$  jours. Ceci est cohérent avec les données de la littérature qui exigent que le milieu de culture soit changé tous les 2 à 5 jours [94, 235, 236, 237].

Ces calculs sont repris et détaillés dans l'annexe 3.A.

Le taux de croissance des cellules dépend de la concentration instantanée en nutriments  $c$ . La relation entre le taux de croissance et les nutriments dépend du type de nutriments et de la lignée cellulaire [223]. Comme le taux de croissance disparaît à une concentration homéostatique  $c_0$ , une hypothèse simple consiste à linéariser le taux de croissance autour de ce point :

$$k^g(\mathbf{r}) = \Gamma(c - c_0) \quad (3.6)$$

Si dans le milieu extérieur, la concentration en nutriments est supérieure à la valeur critique de concentration  $c_0$  pour la croissance, seules les cellules dans une région d'épaisseur finie  $\lambda$  à la surface de l'agrégat se diviseront. Dans de nombreux cas, les approximations d'un état stationnaire et de symétrie sphérique sont justifiées, et le profil de concentration des nutriments peut être calculé explicitement analytiquement. On intègre l'Eq. (3.3) sur l'ensemble de l'agrégat, et on écrit l'équation pour le rayon d'un agrégat incompressible :

$$\frac{dR}{dt} = R^{-2} \int_0^R r^2 k^g(r) dr \quad (3.7)$$

Comme indiqué plus haut, divers nutriments peuvent jouer un rôle (oxygène, glucose,...) mais les conditions aux limites sur la concentration en nutriments dépendent de la nature du nutriment. Puisque la pression partielle d'oxygène est constante à l'interface air du milieu de culture, la condition aux limites pour l'oxygène est différente de la condition aux limites pour les autres nutriments dans le milieu de culture. La concentration imposée (condition aux limites de Dirichlet pour l'oxygène) et le gradient de concentration imposé (condition aux limites de Neumann pour les nutriments de culture) sont utilisés dans les figures 3.1,3.2 comme conditions aux limites.

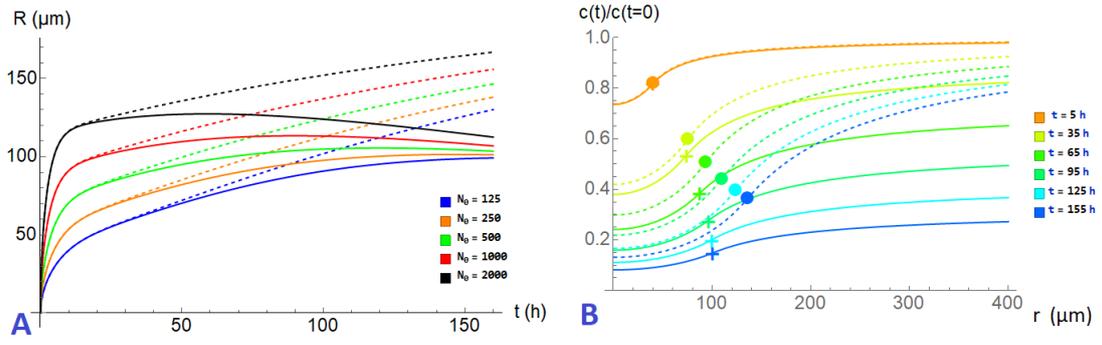


FIGURE 3.1 – Prédiction théorique pour la croissance d'un agrégat sphérique dans un puits de rayon  $L = 3 \text{ mm}$  et le profil de concentration des nutriments selon Eq. (3.3)-(3.7) et la version de l'Eq. (3.4) à l'état stationnaire. **A** : Evolution temporelle (échelle en heures) du rayon de l'agrégat  $R$  en  $\mu\text{m}$  pour différentes quantités initiales de cellules  $N_0$  et pour les deux conditions aux limites pour les nutriments. **Lignes continues** : Concentration en nutriments non fixée à  $r = L$ . **Pointillées** : concentration en nutriments fixe à  $r = L$ . **B** : Évolution temporelle des profils de concentration en fonction de la distance  $r$  du centre de l'agrégat, dans le cas  $N_0 = 250$  cellules dans les deux cas. Les rayons des agrégats sont indiqués par des croix (pour le cas où la concentration aux bords n'est pas fixée) et des cercles (pour le cas de concentration aux bords est fixée). Les traits pointillés et continus correspondent respectivement aux cas où la concentration est fixée et non fixée aux bords.

### Agrégation de cellules et d'agrégats

Comme souvent pour les colloïdes et les aérosols, le processus d'agrégation est étudié avec une équation de Smoluchowski [238]. En effet, dans de nombreuses expériences sur des cellules en suspension, les agrégats cellulaires se développent par prolifération cellulaire mais aussi par agrégation successive entre des agrégats plus petits [91, 239]. En plus d'être une étape cruciale dans la formation de sphéroïdes multicellulaires *in vitro*, l'agrégation est également un processus moteur dans de nombreux phénomènes cellulaires et l'équation de Smoluchowski a été exploitée pour étudier l'agrégation des plaquettes [240, 241, 242], et des cancers qui se développent dans des environnements fluides [243]. Elle pourrait également être appliquée à d'autres situations telles que les métastases péritonéales dans le cancer de l'ovaire [244]. Contrairement à notre cas d'étude, dans de nombreux cas, l'agrégation est causée par une migration cellulaire dirigée plutôt que par de la diffusion due au bruit ou une sédimentation [245]. L'équation de Smoluchowski [238] pour la concentration  $q_i$  d'agrégats par unité de volume contenant des cellules  $i$  s'écrit :

$$\frac{dq_i}{dt} = \frac{1}{2} \sum_{k+j=i} a_{kj} q_k q_j - \sum_j a_{ij} q_j q_i \quad (3.8)$$

Le noyau d'agrégation  $a_{ij}$  a deux contributions : une contribution provient de la diffusion relative entre les agrégats, et l'autre des interactions attractives entre les cellules qui conduisent la fusion totale des agrégats.

Dans le cas de l'agrégation péricinétique, l'agrégation est limitée par la diffusion et le noyau d'agrégation est :

$$a_{ij} = 4\pi(D_i + D_j)(R_i + R_j) \quad (3.9)$$

où  $D_i$  est la constante de diffusion d'un agrégat contenant  $i$  cellules en suspension.  $D_i$  dépend de la taille de l'agrégat  $i$ . Afin d'inclure la croissance, la dérivée temporelle de Eq. (3.8) doit être remplacé par une dérivée convective dans l'espace unidimensionnel discret du nombre  $i$  de cellules dans un agrégat [246] :

$$\frac{dq_i}{dt} = \frac{\partial q_i}{\partial t} + q_{i-1} v_{i-1} - q_i v_i \quad (3.10)$$

La vitesse de dérive  $v_i$  provient de la prolifération par division cellulaire. Si la mort cellulaire est ignorée,  $v_i = i \bar{k}_{d,i}$  où  $\bar{k}_{d,i}$  est le taux moyen de division cellulaire dans l'agrégat :  $\bar{k}_d = V^{-1} dV/dt = 3 \left( \int_0^R dr r^2 k_d(r) \right) / R^3$  avec

le taux de division local  $k_d(r)$  qui est fonction de la concentration en nutriments. En effet, pendant un intervalle de temps infinitésimal  $\delta t$ , un agrégat de taille  $i$  a la probabilité  $i\bar{k}_{d,i}\delta t$  d'augmenter son nombre de cellules de  $i$  à  $i + 1$ . La mort cellulaire peut être traitée de la même manière.

Les solutions exactes de l'équation de Smoluchowski ont été trouvées pour plusieurs formes du noyau d'agrégation ou de vitesse de croissance [247]. Lorsque l'agrégation est un processus rapide par rapport à l'échelle de temps de l'expérience, il n'est pas nécessaire de résoudre l'équation de Smoluchowski complète. Des hypothèses simplificatrices telles que l'agrégation de cellules individuelles sur un même noyau peuvent être justifiées [91]. L'équation de Smoluchowski peut aussi être étendue aux agrégats comprenant divers types cellulaires. Dans la section suivante 3.2.2, nous comparons les résultats expérimentaux concernant 2 différentes lignées cellulaires et la modélisation avec l'équation de Smoluchowski. Cette comparaison montre une caractéristique frappante : il existe potentiellement un retard dans la croissance expérimentale des agrégats qui pourrait être attribué à la maturation de l'adhésion cellule-cellule.

### 3.2.2 Applications

On compare les approches théoriques développées dans la section précédente 3.2.1 avec des données expérimentales sur les cellules cancéreuses. Le montage expérimental est un puits (Fig. 3.3-B) rempli de milieu de culture où les cellules sont introduites et s'agrègent après sédimentation. Nous montrons d'abord les applications du modèle de consommation de nutriments aux sphéroïdes, puis le modèle de croissance par agrégation. Les calculs numériques et les courbes ont été réalisées avec le logiciel Mathematica. Comme on le remarquera dans cette partie, le calibrage du modèle nécessite seulement le fit des systèmes d'équations de type système dynamique avec les courbes expérimentales. Cela est possible grâce aux approximations effectuées qui ont conduit à passer du modèle des mélanges, qui est un modèle spatio-temporel, à un système dynamique simplifié.

#### Profils de nutriments

Dans ce premier exemple, nous calibrons notre modèle pour la pression partielle en oxygène dans un agrégat sur des données expérimentales (Fig. 3.2). Nous résolvons le système d'équations suivant dans une géométrie possédant une symétrie sphérique :

$$\begin{cases} 0 = D_{ext}\nabla^2 P_{0_2,ext} & \text{pour } d_{O_2} < 0 & \text{et } 0 = D_{int}\nabla^2 P_{0_2,int} - d_c n_c P_{0_2,int} & \text{pour } d_{O_2} > 0 \\ D_{ext}\nabla P_{0_2,ext} = D_{int}\nabla P_{0_2,int} & \text{pour } d_{O_2} = 0 \\ P_{0_2,ext} = P_{0_2,int} & \text{pour } d_{O_2} = 0 \end{cases} \quad (3.11)$$

On note respectivement  $P_{0_2,int}$  et  $P_{0_2,ext}$  les pressions partielles en oxygène à l'intérieur et à l'extérieur de l'agrégat.  $D_{int}$  et  $D_{ext}$  sont respectivement les coefficients de diffusion à l'intérieur et à l'extérieur de l'agrégat.  $d_c$  correspond au taux de consommation de l'oxygène dans l'agrégat par cellule, et  $n_c$  à la densité de cellules dans l'agrégat.  $d_{O_2}$  correspond à la distance à la surface de l'agrégat, soit  $d_{O_2} = r_s - r$  où  $r$  est la distance au centre de l'agrégat et  $r_s$  la distance de la surface au centre de l'agrégat. Deux conditions aux limites existent à la surface de l'agrégat : l'une portant sur le flux d'oxygène  $D\nabla P_{O_2}$  et l'autre sur la valeur de la pression partielle. Ce sont des conditions de continuité de part et d'autre de la surface de l'agrégat.

La géométrie considéré est un sphéroïde contenu dans une sphère d'un certain rayon remplie de milieu de culture. Il faut donc définir des conditions aux limites de pour ce milieu de culture. Les conditions aux limites dépendent du type de nutriments qui limite la croissance. L'oxygène peut être traité en imposant une concentration fixe à l'interface entre le fluide et l'air à une distance  $L$  du centre du sphéroïde. Mais d'autres nutriments comme le glucose, également présent dans le milieu de culture dans de nombreux expériences, sont fournis dans une quantité finie bien définie et une condition aux limites de flux nul à l'interface entre le milieu et l'air semble plus appropriée. Par conséquent, ils peuvent être entièrement épuisés par la consommation des cellules. Ce n'est pas le cas de l'oxygène qui est en équilibre avec l'oxygène gazeux à l'interface entre le milieux de culture et l'air et qui est donc fourni en continu. Le nutriment limitant la croissance, l'oxygène ou le glucose, dépend de la lignée cellulaire. Dans la Fig. 3.2, nous présentons les données de la référence [169] montrant la pression partielle d'oxygène locale avec la calibration de l'équation de diffusion. Cette figure montre la précision du modèle

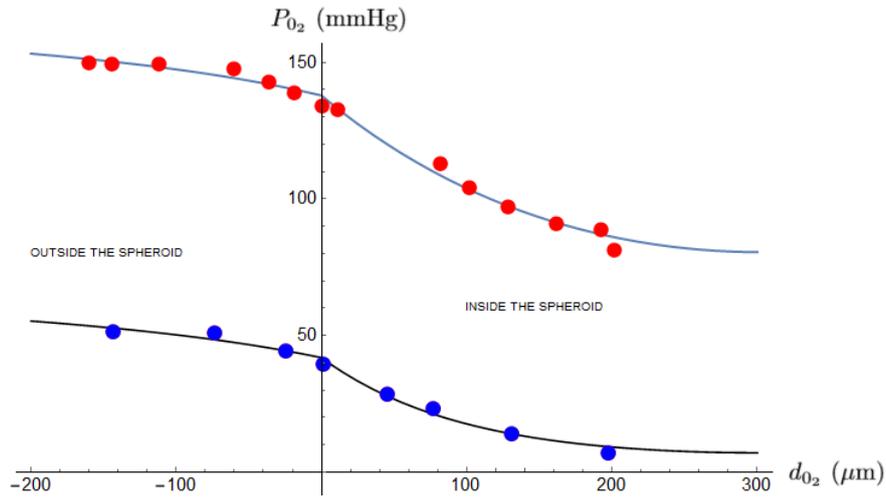


FIGURE 3.2 – Pression partielle d’oxygène  $P_{O_2}$  (mmHg) en fonction de la distance  $d_{O_2}$  à la surface du sphéroïde. Données expérimentales issues de Ref. [169] pour un milieu avec 20% (points rouges) et 5% en  $O_2$  (points bleus) pour des sphéroïdes de cellules thyroïdiennes HTh7. Les ajustements en bleu et en noir sont des solutions à la version à l’état stationnaire de l’équation (3.4). Le coefficient de diffusion  $D_{int}$  à l’intérieur de l’agrégat, la longueur de pénétration  $\lambda$  et le taux de consommation  $d_c$  sont liés par l’expression :  $\lambda = (D_{int}/(d_c n_c))^{1/2}$ . L’ajustement donne un coefficient de diffusion  $D_{int} = 571 \mu m^2 \cdot s^{-1}$ , ce qui est 3,5 fois inférieur à celui du milieu. Le taux de consommation peut être estimé à  $d_c n_c = 0.022 s^{-1}$  pour un milieu contenant 20% d’oxygène avec une longueur de pénétration de  $\lambda = 160 \mu m$ , et  $d_c n_c = 0.09 s^{-1}$  pour un milieu avec 5% d’oxygène avec une longueur de pénétration de  $\lambda = 79 \mu m$ . Le taux de consommation varie de sorte que la quantité d’oxygène consommée par unité de temps  $dP_{O_2}/dt = d_c n_c P_{O_2}$  soit maintenue à un certain niveau.

pour la consommation d’oxygène, et permet de déterminer la constante de diffusion de l’oxygène à l’intérieur de l’agrégat :  $D_{int} = 571 \mu m^2 \cdot s^{-1}$ , ce qui est 3.5 inférieur au coefficient de diffusion à l’extérieur de l’agrégat [248]. On peut remarquer que cette valeur donnée par la calibration du modèle de diffusion-absorption des nutriments est bien supérieure à celle donnée par la formule pour la diffusion de molécules dans un milieu poreux :  $D = D_0 \phi / \tau$  avec  $\tau$  la tortuosité. Du fait du pourcentage d’environ 10 – 15% seulement de liquide interstitiel dans l’agrégat, on aurait pu s’attendre à un rapport bien plus faible. La valeur du taux de consommation en oxygène est environ de  $0.022 - 0.09 s^{-1}$ , ce qui est cohérent avec les résultats trouvés en référence [248, 249]. A noter que les chambres microfluidiques sont de plus en plus utilisées pour étudier expérimentalement des agrégats, elles ont une géométrie complexe en fonction des flux imposés souhaités de fluides et de nutriments. Le calcul doit alors être adapté à la géométrie de la chambre.

### Croissance de sphéroïdes multicellulaires avec un seul type cellulaire

Nous couplons à présent les équations (3.4)-(3.7)-(3.8), que nous calibrons à l’aide d’expériences. Les équations qui sont résolues sont aussi détaillées en annexes 3.A et 3.B.

Parmi les nombreuses expériences qui étudient la croissance des tumeurs avasculaires, les agrégats cellulaires cancéreux sont de plus en plus utilisés comme modèle pour l’étude *in vitro* de médicaments [250, 251]. Cependant, afin de comparer quantitativement l’effet d’un médicament ou d’une mutation spécifique sur une lignée cellulaire, il est nécessaire de connaître précisément les paramètres physiques et biologiques spécifiques de chacune d’entre elles. Notre objectif ici est de montrer comment les paramètres d’intérêt peuvent être obtenus en comparant les résultats expérimentaux avec des simulations basées sur Eqs. (3.7) et (3.8). Nous montrons que, même avec un modèle où la dépendance spatiale des propriétés physiques n’est pas prise en compte, une modélisation quantitative avec un nombre limité de paramètres (ici le nombre initial de cellules) peuvent mettre en lumière certaines anomalies non intuitives et mettre à jour des mécanismes complexes tels que des délais d’agrégation. Les expériences sont réalisées en injectant des cellules du même type cellulaire dans un puits semi-sphérique où elles sédimentent et diffusent. Elles se détectent mutuellement et finissent par former un sphéroïde qui se développe au fond du puits [202, 252]. Le nombre de cellules injectées initialement peut varier et la croissance est observée par

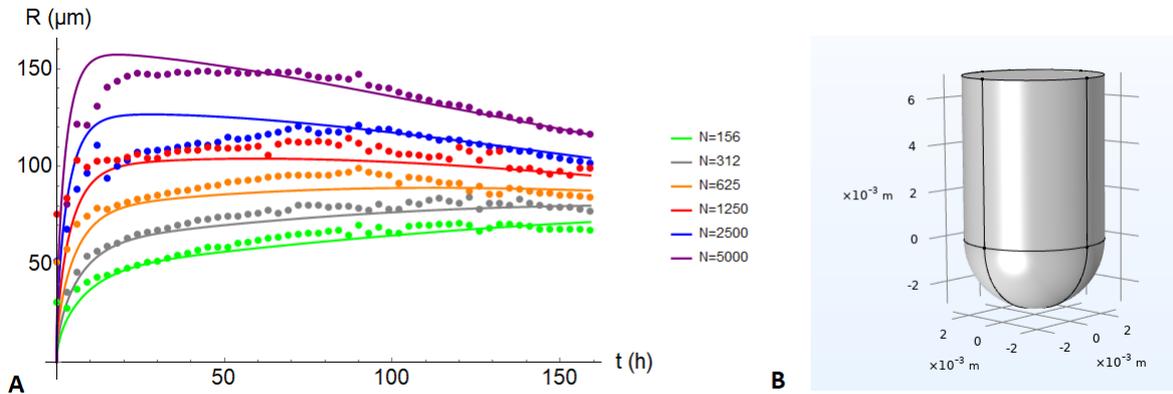


FIGURE 3.3 – **A** : Évolution du rayon des agrégats de cellules KP pour différents nombres initiaux de cellules  $N = \{156, 312, 625, 1250, 2500, 5000\}$ . L'ajustement aux expériences fournit les valeurs de plusieurs paramètres qui peuvent ensuite être introduits dans un modèle local. La longueur de pénétration est de  $\lambda = 50 \mu\text{m}$ , le taux de consommation des nutriments est de  $d_c n_c = 0.28 \text{ s}^{-1}$ . Ces valeurs sont du même ordre que les valeurs trouvées pour l'oxygène sur la figure 3.2, bien que l'épuisement des nutriments dans le puits ne soit pas compatible avec le comportement de l'oxygène. (Données expérimentales de P.Benaroch et J.Nikolic). **B** : Géométrie typique d'un puits où se déroulent les expériences.

fluorescence. Le milieu de culture n'a pas été changé pendant toute la durée des expériences (environ 150 heures). Nous présentons ci-après deux ensembles de données correspondant à deux lignées cellulaires différentes.

- Type de cellule KP :

Les cellules KP sont des lignées cellulaires cancéreuses de souris avec les mutations KRAS et P53. Pour ce système, on observe une croissance immédiate, finalement suivie d'une contraction, si le nombre initial de cellules est trop important. Le meilleur ajustement des données expérimentales correspond à une concentration en nutriments sans concentration fixe à l'interface entre le milieu de culture et l'air au bord supérieur du puits, ce qui exclut l'oxygène. Le nutriment limitant la croissance est vraisemblablement le glucose initialement contenu dans le milieu de culture. Les données sont cohérentes avec une fraction massique homogène de cellules dans l'agrégat et constante dans le temps. Ce résultat est le signe d'une tension superficielle élevée et d'un mouillage négligeable sur le substrat de sorte que les agrégats restent sphériques.

- Type de cellule A549 :

Les cellules A549 sont des cellules épithéliales basales alvéolaires humaines d'adénocarcinome ; ils servent notamment de modèles d'essai pour les médicaments dans le cadre du cancer du poumon [253, 254]. Dans la Fig. 3.4, on observe un délai inattendu pour l'augmentation du rayon en fonction du nombre initial de cellules. Ensuite, la croissance conduit à un plateau pour le rayon comme prédit par la théorie. Étonnamment, le meilleur ajustement pour l'ensemble de données montrées dans la figure 3.4 conduit à une fraction de masse qui diminue lorsque l'agrégat croît :  $\phi \sim R^{d_f-3}$ , avec un exposant apparent  $d_f = 2.5$ . La loi "fractale" pour la fraction massique [255] est difficile à justifier. On peut émettre l'hypothèse qu'il pourrait s'agir d'un artefact géométrique dû au mouillage du granulat en fond de puits ou/et à une tension superficielle assez faible : en tout cas, l'agrégat n'est probablement pas parfaitement sphérique.

De plus, le meilleur ajustement entre la théorie et les expériences est obtenu sous l'hypothèse de valeurs aux bords fixées pour la concentration (Dirichlet). Cela indique l'oxygène comme nutriment limitant la croissance. La longueur de pénétration du nutriment est de l'ordre de 150 à 200  $\mu\text{m}$  correspondant à un taux de consommation de nutriments  $d_c n_c \sim 0.05 - 0.1 \text{ s}^{-1}$ .

En comparant les résultats des deux expériences, la caractéristique frappante est le délai d'agrégation observé avec les cellules A549 et non avec des cellules KP. Elle peut être attribuée à une maturation de l'adhésion entre cellules pour la lignée cellulaire A549. Les cellules adhèrent les unes aux autres grâce à des protéines transmembranaires appelées cadhérines, alors qu'elles adhèrent à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire d'un autre type de protéines transmembranaires, les intégrines. Le mécanisme d'adhésion cellule-cellule médié par les cadhérines [256] est complexe, spécifique à chaque type cellulaire et il n'est pas instantané : après le contact entre deux cellules, l'adhésion n'est effective qu'après un temps de retard fini. De plus, l'adhésion nécessite un nombre suffisant de protéines cadhérines à la surface cellulaire [252] qui dépend des signaux reçus par chaque cellule de ses

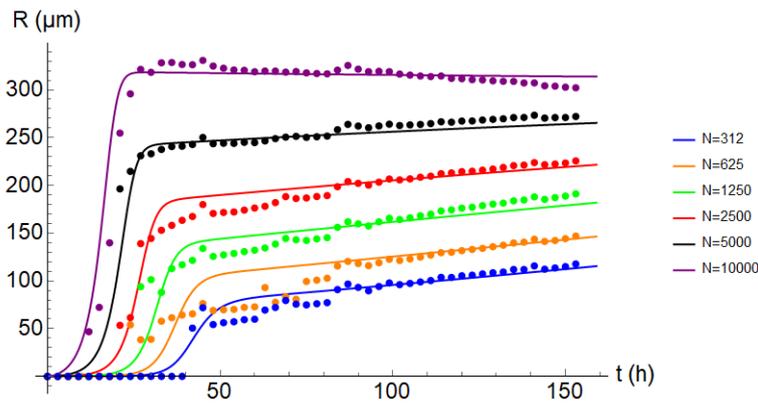


FIGURE 3.4 – Évolution du rayon des cellules cancéreuses A549 pour différentes quantités initiales de cellules  $N = \{156, 312, 625, 1250, 2500, 5000, 10000\}$ . La longueur de pénétration est de  $\lambda = 150 - 200 \mu\text{m}$  (puisque'elle dépend de la fraction massique qui dépend elle-même du rayon), le taux de consommation des nutriments est estimé à  $d_c n_c = 0,05 - 0,1 \text{ s}^{-1}$ . L'ajustement est cohérent avec un coefficient de diffusion des nutriments dans les agrégats égal au coefficient de diffusion à l'extérieur de l'agrégat. Chaque courbe présente un retard et un comportement croissant en douceur après le retard contrairement à la Fig. 3.3. (Données expérimentales de P. Benaroch et J.Nikolic, résultats non publiés).

cellules voisines. Ce retard de la maturation de l'adhésion est probablement dû à une barrière potentielle efficace causée par la répulsion stérique entre des molécules telles que les glycoprotéines à la surface cellulaire [257]. Ce processus de recrutement dure un temps typique qui dépend de la densité cellulaire initiale, comme le montre la figure 3.4. L'augmentation de la concentration de cadhérines à la surface des cellules induit une augmentation de l'attraction entre les cellules, qui conduit finalement à l'agrégation. On en déduit que le taux de cadhérines est faible pour les cellules A549 [252].

Dans toute cette section, nous n'avons pas considéré le mélange de différents types de cellules qui est une question biologique importante surtout pour les tumeurs. Les tumeurs comprennent toujours de multiples types cellulaires : des cellules cancéreuses avec différents phénotypes mais aussi des cellules saines de différents types. De plus, elles attirent les cellules du système immunitaire telles que les macrophages. Pour étudier des agrégats complexes hétérogènes, il faut utiliser une approche théorique appropriée qui permet une séparation de phase locale entre les types cellulaires tout en tenant compte de la croissance de chaque espèce dans l'agrégat et des interactions mutuelles.

### 3.3 Conclusion

L'objectif de ce chapitre a été de construire un formalisme plus rapide à utiliser que le formalisme dérivé au chapitre précédent. Cela passe par des approximations, notamment sur l'étude stationnaire de l'équation de conservation des nutriments, ainsi que par une simplification de la forme de l'agrégat, supposé sphérique. Ce modèle permet une calibration des paramètres plus facile qu'avec un modèle local comme le modèle des mélanges, et avec un nombre moins important de paramètres libres. Malgré sa simplicité, ce formalisme permet de mettre en lumière des effets subtils dans le processus d'agrégation et la croissance de ces agrégats, et de soulever des questions intéressantes. Il peut aussi être utilisé en préambule d'une application d'un modèle local, afin d'obtenir des indications sur des paramètres basiques du système, avant de le complexifier. Cependant, on verra dans le chapitre suivant que ce modèle a aussi ses limitations, par exemple lorsque la géométrie joue un rôle important.

## ANNEXES

## Annexe 3.A Absorption-diffusion des nutriments

Nous explicitons ici les formules pour le profil des nutriments à l'état stationnaire. Nous en déduisons le temps caractéristique d'épuisement des nutriments dans un puits.

L'équation de réaction-diffusion pour la concentration en nutriments  $c$  s'écrit (Eq. (3.4)) :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c - d_c c n \quad (3.12)$$

où  $D$  est le coefficient de diffusion des nutriments,  $d_c$  le taux de consommation de nutriments par cellule et par unité de concentration, et  $n$  la densité cellulaire qui est considérée comme constante à l'intérieur de l'agrégat, et qui s'annule à l'extérieur de l'agrégat.

Cette équation doit être adimensionnée afin d'évaluer les échelles de temps pertinentes. Les quantités sans dimension sont désignées par un tilde. Le phénomène considéré concerne la croissance d'un agrégat multicellulaire, l'échelle de temps naturelle est donc le temps de croissance  $T_\Gamma$  de l'agrégat multi-cellulaire et l'échelle de longueur naturelle le rayon de l'agrégat  $R$  :

$$\begin{aligned} \frac{\partial \tilde{c}}{\partial \tilde{t}} &= \frac{T_\Gamma}{T_D} \tilde{\nabla}^2 \tilde{c} - \frac{T_\Gamma}{T_C} \tilde{c} \\ \tilde{t} &= t/T_\Gamma ; \quad \tilde{\nabla} = R\nabla ; \quad \tilde{c} = c/c_0 \end{aligned} \quad (3.13)$$

où les échelles de temps pour la diffusion sont  $T_D = R^2/D$  et pour la consommation de nutriments  $T_C = 1/(d_c n) = \lambda^2/D$  avec  $\lambda$  la longueur de pénétration des nutriments à l'intérieur de l'agrégat. On peut estimer les valeurs de ces paramètres :  $D \sim 5 \cdot 10^2 \mu m^2 \cdot s^{-1}$ ,  $R \sim 10^2 \mu m$ . La valeur de référence  $c_0$  de la concentration du nutriment ne joue aucun rôle dans cette analyse. La longueur de pénétration est proche de  $\lambda \sim 50 \mu m$  [169], tandis que  $T_C$  et  $T_D$  sont d'ordre  $\sim 5 - 20$  s qui indique des processus très rapides par rapport aux échelles de temps de division et d'apoptose  $T_\Gamma$  qui est d'ordre  $\sim 1$  jour.

Étant donné que la diffusion et la consommation des nutriments sont rapides par rapport à l'échelle de temps de croissance, l'équation (3.4) peut être réécrite en régime stationnaire :

$$D\nabla^2 c - d_c c n = 0 \quad (3.14)$$

Le dispositif expérimental a un rayon  $r = L$  (voir Fig. 3.5) et le milieu qui entoure l'agrégat est un liquide contenant les nutriments. A l'interface agrégat-liquide, la concentration en nutriments et le flux de nutriments sont continus :

$$c(R_+) = c(R_-) \quad ; \quad D_{ext} \nabla c(R_+) = D_{int} \nabla c(R_-) \quad (3.15)$$

où  $c(R_+)$  et  $c(R_-)$  sont respectivement la concentration en nutriments à la surface externe et interne de l'agrégat.  $D_{ext}$  et  $D_{int}$  sont les coefficients de diffusion respectivement à l'extérieur et à l'intérieur de l'agrégat.

On obtient les expressions suivantes pour les concentrations de nutriments  $c_{int}$  à l'intérieur de l'agrégat ( $r < L$ ) et  $c_{ext}$  à l'extérieur de l'agrégat ( $r > L$ ) :

$$\begin{aligned} c_{int}(r) &= c_L c_{int}^0 \frac{\sinh\left(\frac{r}{\lambda}\right) / \sinh\left(\frac{r}{\lambda}\right)}{\left(\frac{r}{R}\right)}, \quad c_{int}^0 = \frac{\frac{D_{ext}}{D_{int}} \tanh\left(\frac{R}{\lambda}\right)}{\left(\frac{D_{ext}}{D_{int}} + \left(\frac{R}{L} - 1\right)\right) \tanh\left(\frac{R}{\lambda}\right) + \left(\frac{R}{\lambda}\right) \left(1 - \frac{R}{L}\right)} \\ c_{ext}(r) &= c_L \left( c_{ext}^0 + \frac{c_{ext}^1}{\frac{r}{R}} \right), \quad c_{ext}^0 = \frac{\left(\frac{D_{ext}}{D_{int}} - 1\right) \tanh\left(\frac{R}{\lambda}\right) + \frac{R}{\lambda}}{\left(\frac{D_{ext}}{D_{int}} + \left(\frac{R}{L} - 1\right)\right) \tanh\left(\frac{R}{\lambda}\right) + \left(\frac{R}{\lambda}\right) \left(1 - \frac{R}{L}\right)} \\ c_{ext}^1 &= \frac{\tanh\left(\frac{R}{\lambda}\right) - \frac{R}{\lambda}}{\left(\frac{D_{ext}}{D_{int}} + \left(\frac{R}{L} - 1\right)\right) \tanh\left(\frac{R}{\lambda}\right) + \left(\frac{R}{\lambda}\right) \left(1 - \frac{R}{L}\right)} \end{aligned} \quad (3.16)$$

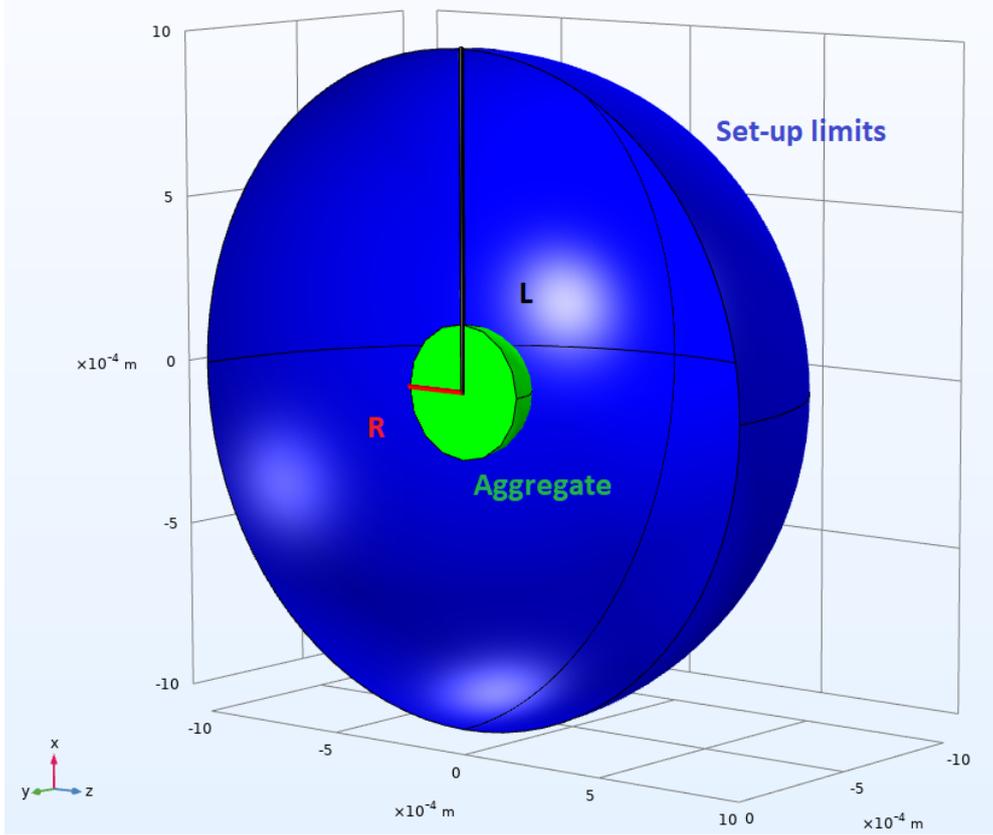


FIGURE 3.5 – Géométrie du montage. Dans la géométrie sphérique, l'agrégat de rayon  $R$  est au milieu d'une sphère de rayon  $L$ . L'agrégat est entouré d'un milieu liquide rempli de nutriments.

où  $c_L = c(L)$  est la concentration en nutriments à la frontière  $r = L$ .

Dans la limite  $R \ll L$ , on peut considérer le réservoir de nutriments  $L$  comme infini et  $c_L = c_\infty$ . Les concentrations à l'intérieur et à l'extérieur de l'agrégat se réduisent à :

$$c_{int}(r) = c_\infty c_{int}^0 \frac{\sinh\left(\frac{r}{\lambda}\right) / \sinh\left(\frac{R}{\lambda}\right)}{\left(\frac{r}{R}\right)}, \quad c_{int}^0 = \frac{\left(\frac{D_{ext}}{D_{int}}\right) \tanh\left(\frac{R}{\lambda}\right)}{\left(\frac{D_{ext}}{D_{int}} - 1\right) \tanh\left(\frac{R}{\lambda}\right) + \left(\frac{R}{\lambda}\right)} \quad (3.17)$$

$$c_{ext}(r) = c_\infty \left(1 - \frac{c_1}{\left(\frac{r}{R}\right)}\right), \quad c_1 = \frac{\frac{R}{\lambda} - \tanh\left(\frac{R}{\lambda}\right)}{\left(\frac{D_{ext}}{D_{int}} - 1\right) \tanh\left(\frac{R}{\lambda}\right) + \frac{R}{\lambda}}$$

La valeur de  $c_L$  dépend du type de nutriment. Si le nutriment est l'oxygène,  $c_L$  est fixé si le milieu extérieur ( $r > L$ ) est l'air. Pour d'autres nutriments comme le glucose par exemple,  $c_L$  peut être soit fixé expérimentalement en rafraîchissant le milieu, soit diminuer lentement avec le temps si la quantité consommée n'est pas remplacée. Dans ce dernier cas  $c_L$  est déterminé en résolvant l'équation suivante :

$$C = \int_{\Omega} c d\Omega; \quad \mathcal{D} = \int_{\mathcal{V}(t)} c d_c n d\mathcal{V}(t); \quad \frac{dC}{dt} = -\mathcal{D} \quad (3.18)$$

où  $c$  est la concentration en nutriments,  $\Omega$  le volume total (dans la géométrie sphérique,  $\Omega = 4\pi L^3/3$ ),  $\mathcal{V}(t) = 4\pi R(t)^3/3$  le volume de l'agrégat,  $C$  la quantité totale de nutriments, et  $\mathcal{D}$  le taux de consommation total de nutriments.

L'échelle de temps typique pour l'épuisement des nutriments  $T_d$ , est obtenue à partir de l'Eq. (3.18),  $T_d = \frac{\Omega\lambda}{4\pi R^2 \mathcal{D}}$

On fait l'approximation que le puits est un cylindre de rayon  $r = 3 \text{ mm}$  et de hauteur  $h = 10 \text{ mm}$ . Pour un agrégat de rayon  $R \sim 100 \mu\text{m}$  et  $\lambda \sim 50 \mu\text{m}$ , on obtient  $T_d \sim 2.5 \text{ days}$ .

### Annexe 3.B Dérivation des équations pour le modèle de croissance globale/agrégation

Dans la section 3.2.2, nous avons donné des exemples d'applications du modèle d'agrégation global pour 2 lignées cellulaires. Nous détaillons ici les équations utilisées pour obtenir les courbes de croissance agrégées dans les figures 3.3 et 3.4. L'équation d'évolution du rayon d'agrégat principal possède deux composantes indépendantes, l'agrégation et la croissance. Nous présentons d'abord la contribution de l'agrégation, puis la croissance, avant d'écrire l'équation complète.

On écrit l'équation de Smoluchowski (Eq. (3.8)), où  $q_i$  est la concentration des agrégats de cellules de taille  $i$  et  $a_{kj}$  est le noyau de collision entre les agrégats contenant respectivement  $k$  et  $j$  cellules :

$$\frac{dq_i}{dt} = \frac{1}{2} \sum_{k+j=i} a_{kj} q_k q_j - \sum_j a_{ij} q_j q_i \quad (3.19)$$

Dans ce qui suit, nous considérons une population contenant  $N(t)$  cellules isolées et un seul agrégat en croissance avec  $i(t)$  cellules. Cela conduit à  $q_1 = N/\Omega$  et  $q_i = 1/\Omega$  où  $\Omega$  est le volume du puits. Pour l'agrégat central de rayon  $R$ , le volume est  $\mathcal{V} = 4\pi R^3/3$  alors que le volume de la cellule est  $w_c = 4\pi r_c^3/3$ . On obtient :

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{a_{1i}}{\Omega} N \quad (3.20)$$

$$\frac{di}{dt} = -\frac{dN}{dt} = \frac{a_{1i}}{\Omega} N \quad (3.21)$$

Le noyau  $a_{1i} = 4\pi(D_1 + D_i)(r_c + R)$  est le noyau péricinétique (Eq. (3.9)) pour l'agrégation limitée par diffusion où  $D_1$  et  $D_i$  sont respectivement les coefficients de diffusion des cellules isolées et de l'agrégat constitué de  $i$  cellules.

Le volume de l'agrégat est  $\mathcal{V} = 4\pi R^3/3 = iw_c/\phi$  où  $\phi$  est la fraction massique des cellules de l'agrégat (égale à la fraction volumique). Nous considérons deux limites, la limite où la fraction volumique est constante et la limite où la fraction volumique dépend du rayon de l'agrégat. Dans cette dernière limite, nous supposons un comportement de type fractal  $\phi = \phi_0(R/r_c)^{d_f-3}$ . A partir de l'Eq. (3.21) on obtient la variation du rayon de l'agrégat avec le temps :

$$\frac{dR}{dt} = \frac{1}{4\pi R^2} \left( \frac{4\pi(D_1 + D_i)(r_c + R)w_c N}{\Omega\phi} - \frac{\mathcal{V} d\phi}{\phi dt} \right) \quad (3.22)$$

Hormis aux temps précoces, on peut considérer que  $R \gg r_c$  et  $D_i \ll D_1$ .

En utilisant la forme fractale de la fraction volumique, l'Eq. (3.22) pour le rayon de l'agrégat devient :

$$\frac{dR}{dt} = \frac{3}{d_f} \frac{D_1 w_c}{R \Omega \phi_0} \left( \frac{R}{r_c} \right)^{-d_f+3} N \quad (3.23)$$

Le noyau péricinétique suppose que l'agrégation est dominée par la diffusion et que la fusion entre deux agrégats est instantanée au contact. Ce n'est pas vrai en général car l'agrégation est ralentie par la barrière énergétique due aux interactions répulsives entre les agrégats. Le noyau d'agrégation peut alors s'écrire sous la forme  $a_{1i} = 4\pi(D_1 + D_i)(r_c + R)p_{1i}$  où  $p_{1i} < 1$  est l'efficacité de collision c'est-à-dire la probabilité d'agrégation lorsqu'une collision se produit. Le calcul de l'efficacité de collision est un problème classique en science des colloïdes [258, 259].

L'agrégation entre cellules n'est pas toujours instantanée et peut dépendre de la maturation de l'adhésion. Nous en tenons compte en introduisant un délai pour l'agrégation que nous extrayons des données expérimentales (section 3.2.2).

Enfin, il faut prendre en compte l'effet de la prolifération cellulaire, qui est contrôlée par les nutriments. La concentration des nutriments a été discutée dans l'annexe 3.A. Lorsque la croissance est prise en compte, la

variation du nombre  $i$  de cellules dans l'agrégat est due à la fois à l'agrégation et à la croissance. En utilisant la loi de croissance de l'Eq. (3.7), l'Eq. (3.21) devient :

$$\frac{di}{dt} = -\frac{dN}{dt} + \frac{\phi}{w_c} \int_0^R 4\pi r^2 k^g(r) dr \quad (3.24)$$

Cela conduit à l'équation dynamique pour le rayon de l'agrégat :

$$\frac{dR(t)}{dt} = \frac{3}{d_f} \frac{D_1 w_c}{R \Omega \phi} N(t) p_{1i}(t) + R(t)^{-2} \int_0^{R(t)} r^2 \Gamma(c(r) - c_0) dr ; R(0) = r_c \quad (3.25)$$

où nous avons supposé que la fraction volumique des cellules dans l'agrégat est constante. La croissance de l'agrégat dans le modèle global est calculée en résolvant numériquement les équations. (3.16),(3.20),(3.25).

## Chapitre 4

# Interactions entre le système immunitaire et les cellules cancéreuses

Ce chapitre vise à étudier et décrire les interactions entre des cellules cancéreuses et des macrophages, dans le cadre d'expériences utilisant des sphéroïdes multicellulaires.

Ce projet a été mené avec Philippe Benaroch et Jovan Nikolic de l'Institut Curie, équipe Cellules myéloïdes et Immunité, ainsi que Thierry Rose de l'Institut Pasteur.

Dans cette optique, nous étudions d'abord le comportement de cellules tumorales seules dans un puits, pour comparer ces résultats avec la combinaison de ces cellules avec des macrophages.

En résumé, nous constatons que les macrophages stimulent la prolifération et limitent la mort cellulaire des cellules cancéreuses indirectement, en procurant aux cellules cancéreuses une meilleure exposition aux nutriments. Ce mécanisme dévoile une nouvelle approche pour contrer une partie de l'activité pro-tumorale myéloïde. Un article est en cours d'écriture sur ce sujet. Les résultats présentés ici ne sont pour l'instant que des résultats préliminaires.

Dans la section 4.1, nous introduisons la problématique traitée par une description biologique du cancer et du système immunitaire. Dans la section 4.2, nous décrivons les expériences dont les résultats sont analysés en section 4.3. Dans la section 4.4, le modèle biophysique est comparé aux expériences et son aspect prédictif est abordé en section 4.5. Enfin, en section 4.6 et en annexe, nous décrivons mathématiquement le modèle physique, et nous donnons plus d'informations sur son implémentation numérique.

### 4.1 Introduction : Les cellules cancéreuses et le système immunitaire

#### 4.1.1 Cancer

Le cancer est une maladie du génome causant une prolifération incontrôlée de cellules dans l'organisme. Dans le cas des tumeurs bénignes, cette prolifération est localisée. Il existe des tumeurs solides, qui se rencontrent dans les tissus, et des tumeurs non solides, qui prennent place dans les fluides présents dans le corps comme le sang ou la lymphe. Les carcinomes (par exemple les cancers du sein, des poumons, de la prostate, de l'intestin, ou le mélanome) et les sarcomes (par exemple les cancers de l'os ou du cartilage) sont des tumeurs solides provenant respectivement des tissus épithéliaux et des tissus conjonctifs. Les lymphomes et les leucémies sont des cancers dits liquides, respectivement provenant du système lymphatique, et du sang ou de la moëlle osseuse. Nous nous concentrons ici sur les tumeurs solides.

La tumeur est maligne lorsqu'elle envahit d'autres parties de l'organisme par métastase. En l'absence de contrôle de la maladie, le pronostic vital du patient est engagé du fait de la perturbation de fonctions essentielles telles que la respiration, la digestion ou l'excrétion.

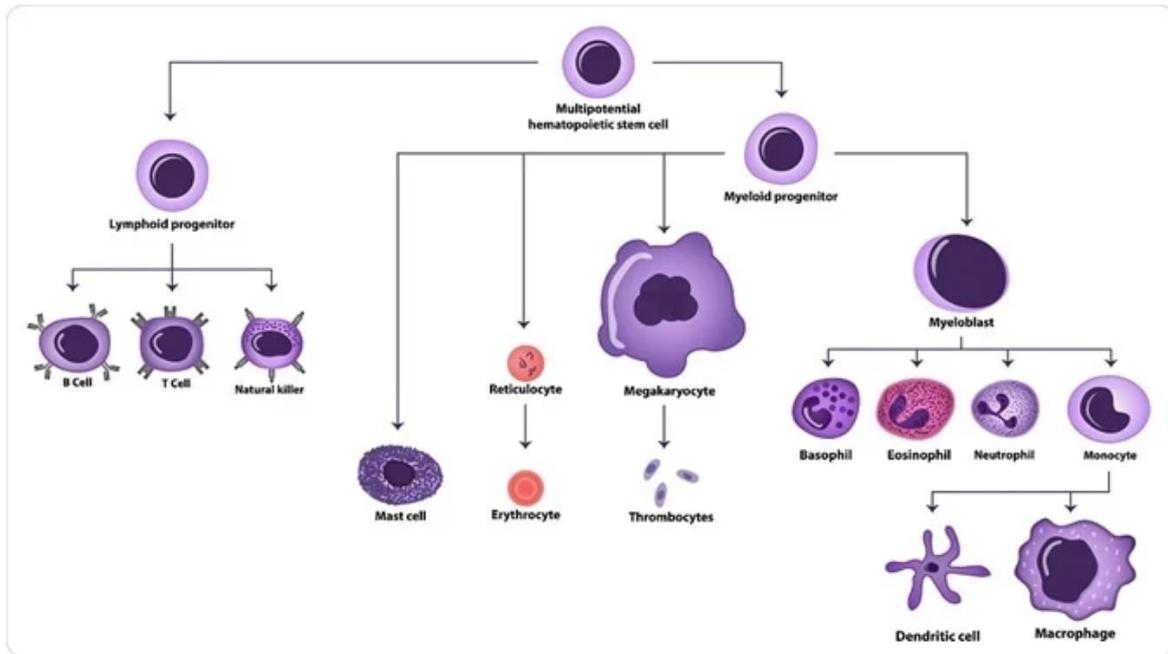


FIGURE 4.1 – Hématopoïèse : les deux lignées principales de cellules du système immunitaire dérivent de cellules souches hématopoïétiques.

#### 4.1.2 Le système immunitaire

On définit le système immunitaire d'un organisme comme l'ensemble des structures et processus qui permettent à l'organisme de se protéger contre des maladies. Il est ici décrit succinctement.

Deux mécanismes de défense contre des corps étrangers coexistent dans le fonctionnement du système immunitaire.

- L'immunité innée permet une défense immédiate (elle ne nécessite pas de division cellulaire) de l'organisme contre des agents infectieux, elle est non spécifique par rapport au type de pathogène, et répond de façon comparable lors de sollicitations répétées par le même pathogène (absence de mémoire immunitaire). Elle agit de plusieurs façons. D'abord en empêchant la pénétration d'agents infectieux (antigènes<sup>1</sup>) grâce à des barrières physiques (peau et muqueuses) et chimiques (mucus, salive, larmes et suc gastrique). Puis en détectant ces agents, en recrutant et activant des cellules immunitaires qui vont identifier et éliminer les antigènes, ainsi que les cellules mortes et les complexes immuns (anticorps-antigènes).
- L'immunité adaptative est activée après l'immunité innée. Les lymphocytes B repèrent l'antigène, ils se transforment ensuite en plasmocytes, qui produisent les anticorps correspondant à ces antigènes. Au premier contact avec un antigène, l'organisme prend deux à trois semaines pour produire ces anticorps. Les anticorps se fixent aux antigènes formant un complexe immunitaire. Les cellules présentatrices d'antigènes (par exemple des cellules dendritiques) les présentent aux lymphocytes T, qui éliminent directement les antigènes, et stimulent les lymphocytes B.

Par ailleurs, il existe deux lignées principales de cellules dans le système immunitaire, qui toutes deux dérivent de cellules souches hématopoïétiques par le processus d'hématopoïèse (figure 4.1(a)).

- La première est la lignée myélocytaire, responsable de l'immunité innée, et participe à l'immunité adaptative. On y compte notamment les monocytes, précurseurs des macrophages responsables de la phagocytose, et des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes.
- La deuxième lignée est responsable de l'immunité adaptative avec les lymphocytes B, les lymphocytes T et les natural killers.

1. **Antigène** : Macro-molécule pouvant être reconnue par un anticorps ou une cellule du système immunitaire.

### 4.1.3 Cancer et système immunitaire

Les cellules cancéreuses sont-elles reconnues par le système immunitaire ? La théorie de l'immuno-surveillance a proposée par Sir Macfarlane Burnet et Lewis Thomas en 1957 [260, 261, 262, 263] comme un mécanisme<sup>2</sup> de régulation évolutionniste. Elle a tout d'abord été invalidée par des expériences, avant d'être finalement réhabilitée et modifiée en une théorie de l'immunoédition à la fin des années 1990. Mais si les cellules cancéreuses sont bien reconnues par le système immunitaire, elles parviennent néanmoins souvent à lui échapper grâce à des procédés de camouflage, et en l'inhibant. Les tumeurs possèdent ainsi des propriétés immuno-suppressives. Dans la figure 4.2 issu de la Ref [264], l'environnement cellulaires de plusieurs cancers est décrit, et les cellules immunitaires en font systématiquement partie. Les macrophages peuvent représenter plus de 50% de la masse d'une tumeur. On y observe entre autres des structures lymphoïdes tertiaires (LTS), qui sont des agrégats cellulaires riches en lymphocytes B. La présence des LTS conduit à un taux de survie plus élevé, et une meilleure réponse aux immunothérapies [265, 266, 267].

De ce fait, une approche thérapeutique est de moduler la réponse immunitaire. Cette approche est née en 1911 dans le traitement des allergies [268]. Mais pour cela, une compréhension accrue des interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules du système immunitaire est nécessaire. A cet effet, la combinaison de la biologie cellulaire quantitative avec la dérivation de modèles physiques de croissance tumorale permet d'extraire des paramètres clés et de faire des prédictions qui sont testables à la fois par des simulations numériques et par des expériences *in vitro* et *in vivo*. Dans ce chapitre, nous étudions *in vitro* les interactions entre les macrophages résidents des tissus et les cellules cancéreuses du poumon, en mettant l'accent sur les caractéristiques physiques de ces interactions. En effet, décrypter les interactions entre les cellules myéloïdes infiltrant la tumeur et les cellules tumorales est une étape cruciale pour améliorer l'immunothérapie du cancer. Nous détaillons maintenant certains aspects de l'interaction entre les cellules myéloïdes et la tumeur.

### 4.1.4 Cancer et macrophages

Les tumeurs sont façonnées par un micro-environnement dynamique et complexe qui a un impact sur leur croissance, leur potentiel invasif et leur réponse à diverses thérapies. Dans les tissus adultes, les macrophages proviennent de deux populations différentes. Certains macrophages dits "macrophages résidant dans les tissus" (TRM) sont stationnés en permanence dans la majorité des tissus, et jouent ainsi un rôle de "sentinelles immunitaires" [269]. Ceux-ci constituent une population qui s'auto-renouvelle. Une seconde population de macrophages provient des monocytes qui circulent dans l'organisme. Ceux-ci jouent notamment un rôle important lors des inflammations [270].

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) se sont avérés être un composant cellulaire majeur du micro-environnement tumoral dans plusieurs types de cancers et peuvent représenter jusqu'à 50% de la masse tumorale comme dans le cas des tumeurs du sein [264, 271]. Il semble que les TAMs proviennent aussi bien des macrophages résidents que de ceux dérivés des monocytes [271, 272]. Les tumeurs produisent des cytokines, qui sont des protéines de signalisation permettant à des cellules d'agir à distance sur d'autres cellules. Ces cytokines guident le recrutement des cellules myéloïdes, alors que le micro-environnement tumoral a un impact sur la polarisation des macrophages [273]. En effet, dans la plupart des cancers, la progression de la maladie se produit en même temps que la polarisation des TAMs vers un phénotype pro-tumoral. Les signaux des cellules tumorales, lymphoïdes et stromales environnantes provoquent ce décalage fonctionnel qui donne lieu à une grande diversité de TAMs.

Les macrophages sont dotés d'un éventail très diversifié de fonctions [274]. Concernant le micro-environnement tumoral, les TAMs possèdent des activités qui peuvent être regroupées en deux catégories, car ils peuvent favoriser la croissance tumorale soit indirectement par leur activité sur d'autres types cellulaires, soit directement, par leurs interactions avec les cellules tumorales.

La première catégorie comprend la capacité des TAMs à favoriser l'angiogenèse<sup>3</sup> par la sécrétion de facteurs

2. "In large, long-lived animals, like most of the warm-blooded vertebrates, inheritable genetic changes must be common in somatic cells and a proportion of these changes will represent a step toward malignancy. It is an evolutionary necessity that there should be some mechanism for eliminating or inactivating such potentially dangerous mutant cells and it is postulated that this mechanism is of immunological character." (F. M. BURNET, The Concept of Immunological Surveillance, p3)

3. **Angiogenèse** : Formation de nouveaux vaisseaux depuis un réseau préexistant.

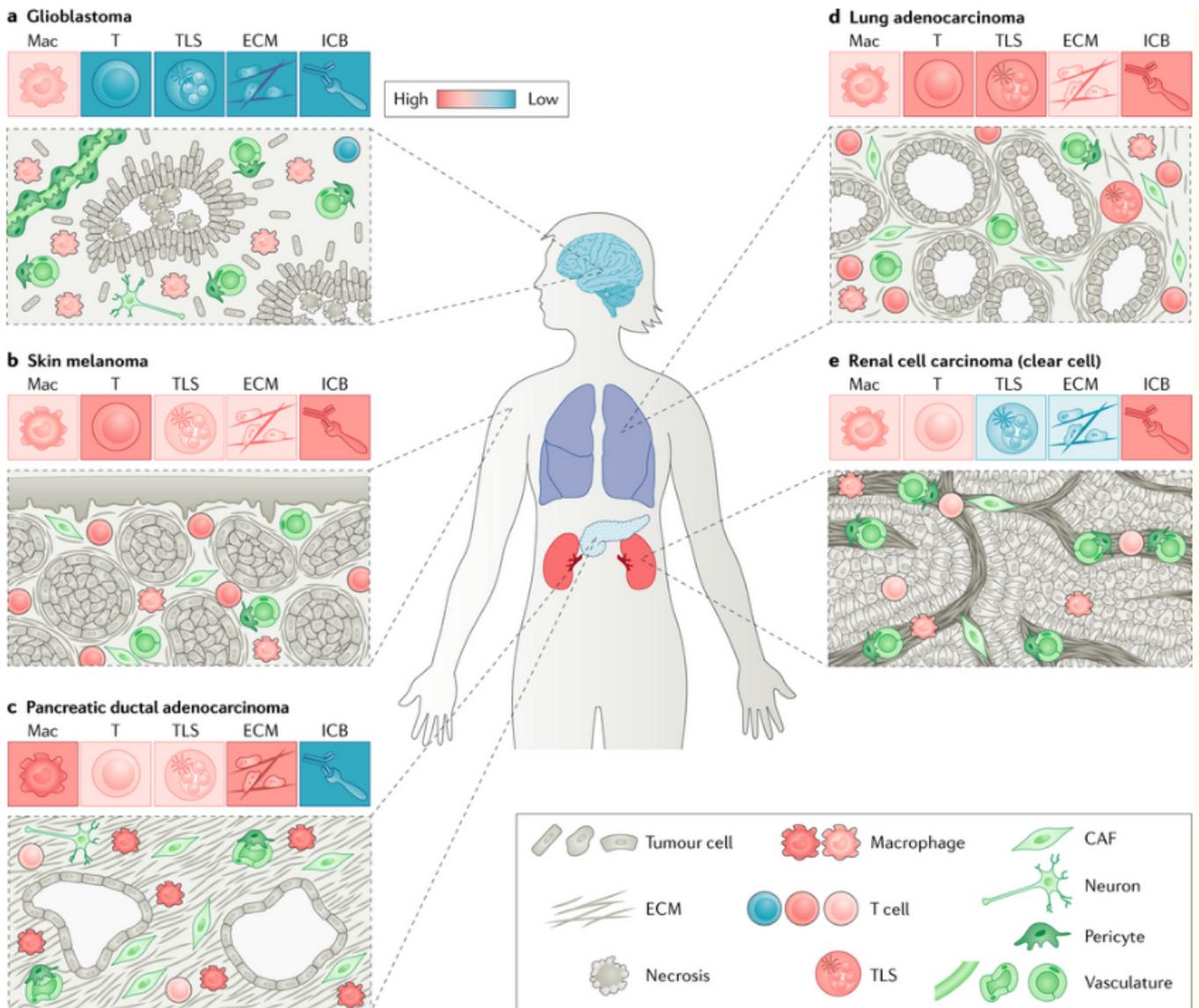


FIGURE 4.2 – Figure issue de la Ref. [264]. Les micro-environnements sont différents selon les tumeurs. Sont représentés ici le glioblastome (a), le mélanome cutané (b), l'adénocarcinome canalaire pancréatique (c), l'adénocarcinome pulmonaire (d), et un carcinome rénal (e). On observe des architectures différentes, ainsi que des environnements cellulaires différents. Dans l'encadré au-dessus des représentations spatiales, la dominance de chacun des types cellulaires est exprimée selon un code couleur. Les auteurs y ont représenté les cellules tumorales, la matrice extra-cellulaire (ECM), les macrophages (Mac), les cellules T, les structures lymphoïdes tertiaires (TLS), les fibroblastes associés au cancer (CAF), les points de contrôle immunitaires (ICB pour immune checkpoint blockade), les neurones et les péricytes, ainsi que la présence d'une vasculature, ou encore celle d'un phénomène de nécrose. Les structures lymphoïdes tertiaires sont des masses de cellules possédant beaucoup de lymphocytes B. On notera que les macrophages sont présents dans chacun des cas.

pro-angiogéniques [275], leur impact sur les cellules stromales, par exemple sur les fibroblastes associés au cancer (CAF) qui produisent la matrice extracellulaire [276], et leur capacité à inhiber le système immunitaire soit en favorisant le développement et le recrutement de cellules T régulatrices (sous-population de lymphocytes possédant la capacité d'inhiber la prolifération de lymphocytes T auxquels un antigène a été présenté et qui sont chargé de le détruire) ou en empêchant le recrutement ou l'activité de cellules T cytotoxiques spécifiques des antigènes tumoraux [277, 278, 279]. Une étude récente a révélé l'importance de l'expression de la protéine PD-1 par les TAMs pour leurs effets pro-tumorigènes, et a souligné le rôle clé des macrophages dans l'effet anti-tumoral du traitement anti-PD-1 et donc plus généralement dans l'immunité anti-tumorale [280].

Appartenant aux deux catégories d'activités, les TAMs favorisent également l'invasion et la métastase des cellules tumorales [281]. Cette propriété résulte d'interactions directes entre les TAMs et les cellules tumorales mais aussi d'interactions indirectes entre les TAMs et d'autres types cellulaires, comme les fibroblastes associés au cancer, qui à leur tour peuvent favoriser la transition des cellules tumorales vers la métastase.

Les macrophages ont la capacité de sécréter des facteurs de croissance, tels que le FGF, l'EGF ou le TGF- $\beta$ , qui ont un impact direct sur la croissance tumorale. À titre d'exemple, les TAMs humains sont une source majeure d'EGF dans les tumeurs [282], qui s'est avéré favoriser la croissance et la motilité des cellules tumorales.

Il a été rapporté récemment qu'un sous-ensemble spécifique de TAM (CD206+) était responsable de la sécrétion d'EGF dans le carcinome épidermoïde buccal, entraînant une prolifération et une invasion cellulaires accrues [283]. Les effets directs des TAM sur les cellules tumorales incluent également leur capacité à effectuer la phagocytose de gros débris cellulaires et même de cellules entières, y compris les cellules cancéreuses. De plus, les macrophages peuvent digérer la matrice extracellulaire et pénétrer dans les tumeurs solides, stimulant l'idée qu'ils pourraient être exploités pour lutter contre la croissance tumorale. Enfin, dans des situations non pathologiques, les macrophages fonctionnent comme un support pour le développement et le maintien de nombreux composants tissulaires, notamment les vaisseaux sanguins et les nerfs. La nécessité d'une présence de macrophages résidents dans les tissus pour le développement de tumeurs pulmonaires a été récemment démontrée [284].

L'impact des contacts directs entre TAMs et cellules tumorales sur le développement de la tumeur représente la question centrale que ce chapitre tente d'aborder par deux approches complémentaires basées sur la biologie et la modélisation physique de ces interactions.

## 4.2 Résultats expérimentaux

Les cellules cancéreuses utilisées sont issues de lignées cellulaires de carcinome pulmonaire de souris mutées pour Kras et P53, et sont donc nommées KP. Lorsque le gène codant pour la protéine Kras mute, une chaîne de signalisation contrôlant la prolifération se met en place de manière incontrôlée. Au contraire la protéine p53 est elle chargée de contrôler l'apoptose en cas de dommages cellulaires, et d'arrêt de la division cellulaire ; ce rôle inhibiteur est désactivé suite à la mutation.

Les cellules cancéreuses KPs et les macrophages sont placés dans des puits en trois dimensions, où elles sédimentent et forment des agrégats. Les agrégats sont imagés au cours du temps par fluorescence (figure 4.3). Aux jours 3 et 7, le plus gros des agrégats présents dans le puits subit un processus de transparence, dans le but d'étudier sa structure interne (figure 4.4).

Dans la figure 4.4, on observe la localisation des macrophages et la prolifération cellulaire. La prolifération cellulaire prend place surtout à la surface. Les macrophages semblent répartis de façon plutôt homogène dans le sphéroïde.

Dans la figure 4.5, on montre le nombre des différents agrégats contenant des KPs, le rayon effectif de l'aire du plus grand agrégat  $A_a$ , projetée sur le plan horizontal, ainsi que le rayon effectif de l'aire totale des agrégats contenant des cellules KP projetée sur ce même plan, et le nombre de KPs dans le plus grand agrégat présent dans le puits. Le rayon effectif correspond à  $R = \sqrt{A_a/\pi}$ . La comparaison des proliférations des cellules KP, en présence ou non de macrophages primaires résidant dans les tissus (TRM) montre que ces derniers favorisent la nucléation de sphéroïdes et la croissance tumorale. En l'absence de macrophages, les cellules tumorales forment rapidement une masse unique de cellules qui après une période d'intense prolifération, cesse rapidement de croître lorsque



FIGURE 4.3 – Description du protocole expérimental de la culture de sphéroïdes multicellulaires dans des puits. Les cellules sont précipitées dans un puits où elles forment des sphéroïdes. Les sphéroïdes sont alors imagés et les analysés.

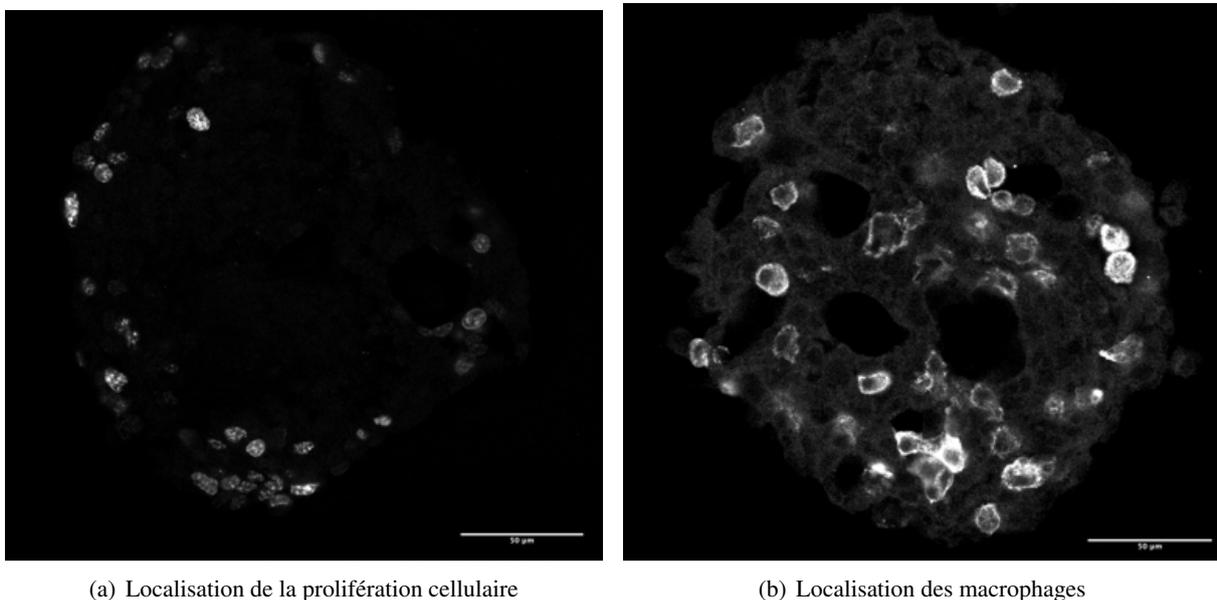


FIGURE 4.4 – Localisation de la prolifération cellulaire des KPs et des macrophages. (a) : Les cellules KPs qui prolifèrent sont localisées par localisation de l'activation de l'antigène ki-67. (b) : La localisation des macrophages est effectuée en localisant le récepteur siglec-F (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin F).

l'agrégat devient plus compact, et leur nombre diminue lorsque la mort cellulaire due notamment aux contraintes mécaniques et au manque de nutriments à l'intérieur de l'agrégat devient supérieur à la division cellulaire. En mettant dans le puits 2500 KPs, le plus grand sphéroïde présent dans ce puits renferme 4000 KPs à 3 jours mais seulement 2500 à 7 jours, ceci en l'absence de macrophages. La présence de macrophages déclenche une agrégation de multiples agrégats cellulaires dont le nombre décroît lentement dans le temps après une période intense de création et de fusion d'agrégats. En parallèle, le nombre de KPs observés dans le plus gros agrégat du puits en présence de macrophages est supérieur à celui observé sans macrophages. On en observe en moyenne 4500 au troisième jour, et environ 6000 au septième jour de coculture. Les effets sur la nucléation et la croissance des sphéroïdes augmentent avec le nombre de macrophages dans le puits.

Afin de caractériser plus précisément l'effet des macrophages sur les KPs, nos collaborateurs ont tout d'abord procédé à une analyse transcriptomique<sup>4</sup>, puis ont recherché d'éventuels facteurs de croissance dans le surnageant. Ici, nous apportons un regard biophysique sur le problème, pour lequel un modèle mathématique est construit et testé.

4. **Analyse transcriptomique** : Le transcriptome est l'ensemble des ARN issus de la transcription du génome. L'analyse transcriptomique permet de déterminer les gènes actifs.

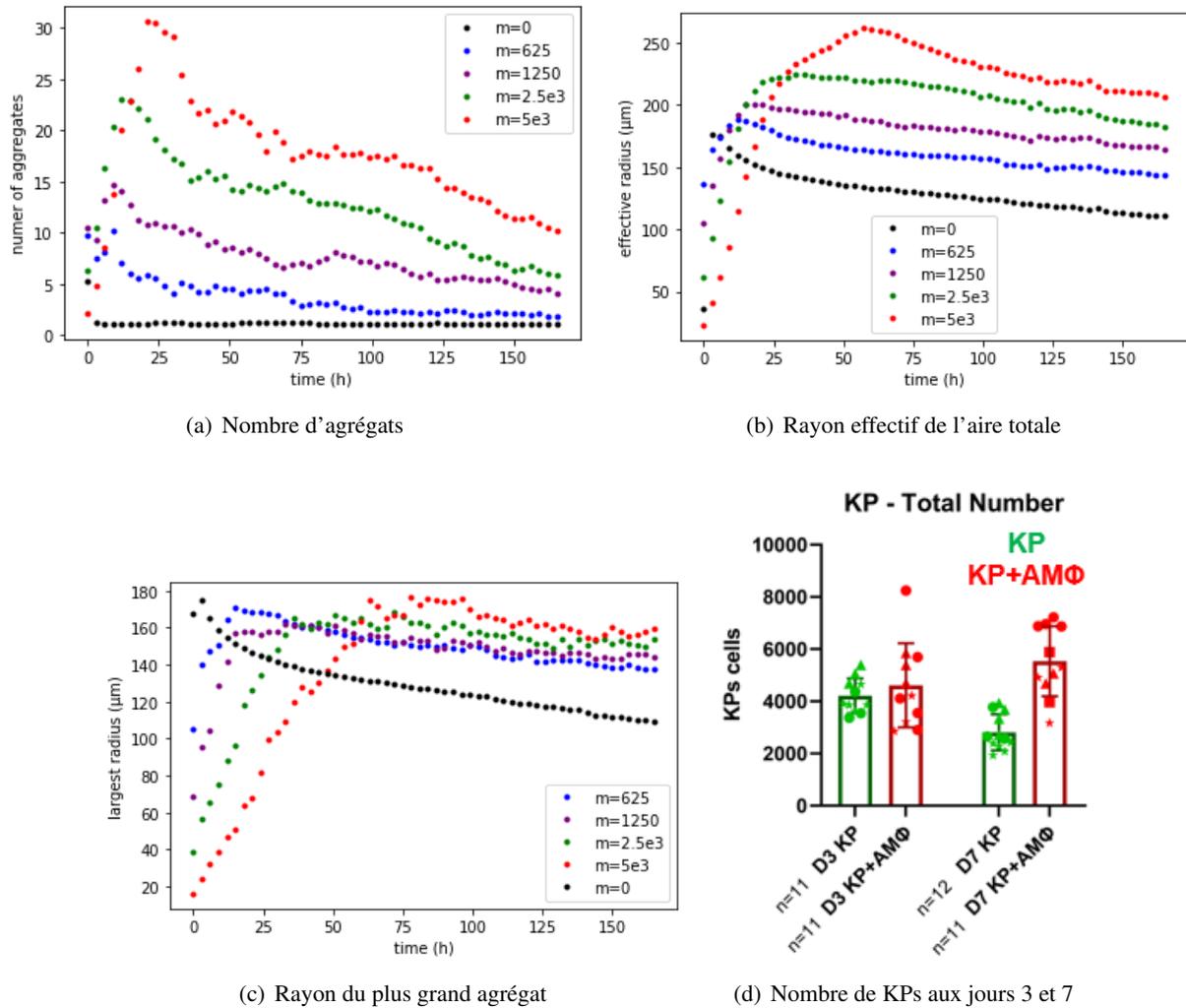
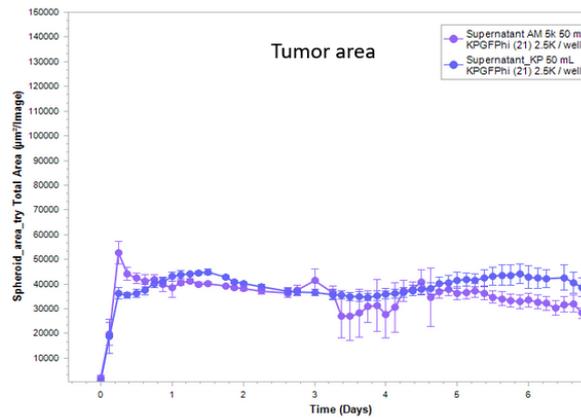


FIGURE 4.5 – Données expérimentales sur l'évolution du nombre d'agrégats dans le puits (a), du rayon effectif  $R = \sqrt{A/\pi}$  de l'aire totale  $A$  des agrégats projetée sur le plan horizontal dans une fenêtre de  $1600 \mu\text{m} \times 1600 \mu\text{m}$  au centre du puits (b) et du rayon du plus grand agrégat contenant des cellules cancéreuses dans cette même fenêtre (c). La figure (d) montre le nombre de KPs contenus dans le plus gros agrégat du puits dans plusieurs expériences, aux jours 3 (D3) et 7 (D7), en présence ou absence de macrophages ( $AM\Phi$  pour macrophages alvéolaires).  $n = 11$  correspond au nombre de sphéroïdes étudiés. Chaque point correspond aux données provenant d'une expérience.



(a)

FIGURE 4.6 – Expériences consistant à évaluer la présence de facteurs de croissance produits par les macrophages dans le surnageant. La présence de surnageant ne modifie pas la courbe de croissance de l'agrégat de KPs.

### 4.3 Caractérisation de la nucléation et de la prolifération cellulaire

#### 4.3.1 Analyse transcriptomique

Les résultats de l'analyse transcriptomique ont été publiés par nos collaborateurs en référence [284], voir par exemple la figure 3 dans ce dernier article. Les populations cellulaires triées avant et après coculture en sphéroïdes ont été analysées par RNAseq. L'analyse transcriptomique des cellules KP triées après 7 jours de culture a montré qu'elles étaient profondément impactées par la présence de macrophages résidants dans les tissus du poumon (TRM). Les analyses RNAseq ont en outre révélé que les cellules tumorales cocultivées avec des macrophages présentaient une signature transcriptionnelle typique de la transition épithéliale à mésenchymateuse (EMT), indiquant un potentiel de progression vers la métastase. Durant cette transition, l'adhésion cellule-cellule des cellules cancéreuses diminue, alors que leur adhésion avec la matrice extra-cellulaire augmente. Cette signature a été confirmée au niveau des protéines dans les cultures de sphéroïdes, car il a été observé que les cellules KP en présence de macrophages régulent négativement l'E-cadhérine et régulent positivement Twist et la bêta-caténine, deux marqueurs typique de l'EMT (figure 2 de la référence [284]).

Néanmoins, ces caractéristiques ne sont *a priori* pas liées à une croissance anormale telle qu'on l'observe dans notre cas.

#### 4.3.2 Analyse des facteurs de croissance

Il a été rapporté que les macrophages peuvent agir de différentes manières pour stimuler la prolifération cellulaire et les métastases. Dans notre cas, cela pourrait être réalisé par la production de divers facteurs de croissance [285]. Les facteurs de croissance sont des protéines qui stimulent la prolifération ou encore la différenciation cellulaire. Cette hypothèse a été invalidée en prélevant le surnageant de la coculture macrophages-KPs pour l'introduire dans une culture cellulaire de KPs sans macrophages. On n'observe aucune différence pour la croissance des agrégats de cellules cancéreuses KP avec ou sans surnageant provenant de la coculture macrophages-KPs (figure 4.6(a)).

#### 4.3.3 Apport de l'approche biophysique

Du fait de l'absence d'identification d'un mécanisme de régulation biochimique de la prolifération cellulaire par les macrophages, nous développons une approche basée sur la biophysique de la croissance cellulaire.

Il est bien documenté [113, 114, 148, 221, 232] que dans les sphéroïdes, la prolifération des cellules cancéreuses est limitée par des contraintes mécaniques et la pénétration des nutriments à l'intérieur de l'agrégat. Ces

phénomènes définissent une épaisseur typique près de la surface du sphéroïde jusqu'à laquelle les cellules cancéreuses peuvent proliférer et une taille maximale que les agrégats peuvent atteindre. Les sphéroïdes plus petits ont donc un taux de croissance qui dépasse le taux de croissance des sphéroïdes plus grands. Par conséquent, la nucléation de petits sphéroïdes, stimulée par la présence de macrophages, pourrait avoir un effet positif sur la croissance par rapport au cas où les macrophages sont absents et où un agrégat unique se constitue. Si tel est le cas, un paramètre crucial est l'adhérence entre les macrophages et les cellules cancéreuses qui déclenche une agrégation précoce. Plus tard, les macrophages adhèrent à la surface du puits, de sorte que la sédimentation en présence de macrophages est un processus lent, et la formation d'un agrégat unique de grande taille est retardée. En effet, le substrat dans le puits n'est pas adhérent pour les cellules KP, mais les macrophages semblent y adhérer. La sédimentation des cellules est donc ralentie. Les cellules ne s'agrègent pas rapidement en un agrégat unique, ce qui permet d'observer un nombre important d'agrégats sur un temps assez long. Ainsi la présence de macrophages cause la création de multiples agrégats sur la durée de l'expérience : ce phénomène augmente l'exposition des cellules cancéreuses aux nutriments, et stimule leur prolifération. Afin de tester cette hypothèse, nous construisons un modèle physique qui prend en compte les différents phénomènes, tout en tenant compte de la géométrie du système. Le formalisme est décrit en section 4.6 et est implémenté numériquement dans un code décrit dans l'appendice 4.A.

Par ailleurs, nous supposons que ce sont les propriétés d'adhésion qui sont les principales variables dont dépendent la composition en macrophages et en cellules cancéreuses KPs et leur localisation dans les agrégats. En effet, on observe que les macrophages sont répartis de façon homogène dans les agrégats.

## 4.4 Comparaison entre le modèle physique et les expériences

### 4.4.1 Localisation des macrophages et des KPs dans l'agrégat

Un modèle physique peut expliquer et prévoir l'homogénéité de la répartition des macrophages observée dans les agrégats. Cette répartition est un élément à prendre en compte dans le modèle physique de croissance des agrégats constitués par les macrophages et les KPs. Le modèle des mélanges présenté au chapitre 2 prévoit dans notre cas une séparation de phase entre seulement deux phases homogènes, malgré la présence de trois constituants qui sont le milieu de culture, les cellules cancéreuses KP et les macrophages. Cela provient des propriétés d'adhésion des différents constituants qui peuvent être prises en compte dans l'énergie libre du système.

On néglige les interactions entre le milieu de culture et les KPs, et entre le milieu de culture et les macrophages. En analysant les différents mélanges de macrophages et de KPs (voir figure 4.8(a),4.8(b)), on peut tirer les conclusions suivantes. Les macrophages et les KPs adhèrent fortement entre eux, de même que les KPs entre eux. Les macrophages en revanche, n'adhèrent pas les uns aux autres. On peut alors déterminer la composition des différentes phases à l'équilibre. On obtient une phase diluée en KPs et contenant des macrophages, et une phase dense homogène pour les KPs qui contient aussi des macrophages de façon homogène. Les fractions volumiques précises en macrophages et en KPs dans ces deux phases dépendent des forces d'adhésion précises entre les constituants. Néanmoins, on peut observer qu'à capacité d'adhésion égales, la phase dense contiendra beaucoup plus de KPs que de macrophages.

C'est ce qui est observé dans la figure 2.1(d) dans le chapitre 2.B, que l'on rapporte ici dans la figure 4.7(j). On y observe l'évolution de la composition de la phase dense en fonction du rapport des adhésions macrophages-KPs et KPs-KPs. Par ailleurs, on montre dans la figure 4.7 l'évolution de la distribution d'un agrégat en 2 dimension selon le rapport entre l'adhésion KP-macrophage et l'adhésion KP-KP, ainsi qu'une coupe de cette distribution dans un cas particulier. On en conclut que le modèle des mélanges décrit au chapitre 2 prévoit une très faible fraction volumique de macrophages dans la phase dense lorsque l'adhésion macrophages-KPs est comparable à l'adhésion KPs-KPs.

### 4.4.2 Prolifération cellulaire et nucléation

Nous résumons le modèle physique utilisé dans les simulations, avant de comparer les résultats de celles-ci avec les résultats expérimentaux. Les détails de la modélisation sont exposés en section 4.6. Le modèle physique

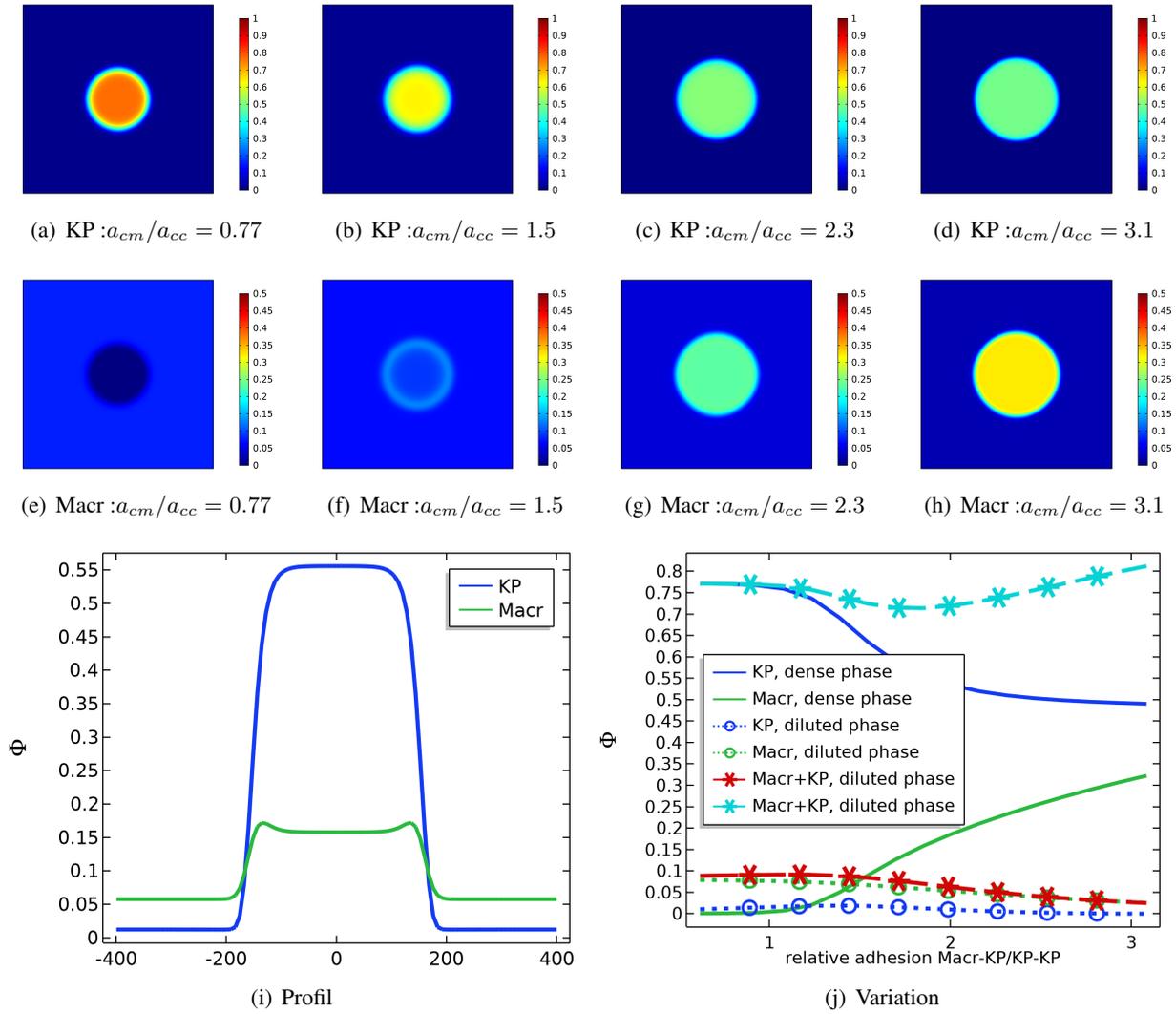


FIGURE 4.7 – Etude numérique à 2 dimensions d'un agrégat contenant 2 types de cellules et une phase inerte, en utilisant le modèle des mélanges. Soit une densité d'énergie dépendante des fractions massiques en cellules cancéreuses et macrophages de type Flory-Huggins définie au chapitre 2. Dans notre cas :  $F \sim (1 - \phi_c - \phi_m) \log(1 - \phi_c - \phi_m) + D_c \phi_c \log(\phi_c) + D_m \phi_m \log(\phi_m) - a_{cc} \phi_c^2 - a_{cm} \phi_c \phi_m$  où les indices  $c$  et  $m$  représentent respectivement les cellules cancéreuses et les macrophages. L'adhésion relative est définie comme le rapport des termes d'interaction entre les macrophages et les KPs :  $a_{cm}/a_{cc}$ . Les macrophages adhèrent aux cellules cancéreuses, les cellules cancéreuses adhèrent les unes aux autres, et les macrophages n'adhèrent pas aux macrophages. **(a)-(d)** : fractions volumique en KPs selon le rapport des forces d'adhésions. **(e)-(h)** : fractions volumique en macrophages selon le rapport des forces d'adhésions. **(i)** : Profil le long d'une coupe des fractions volumiques pour  $a_{cm}/a_{cc} = 2$ . **(j)** : Variation des fractions volumiques en macrophages et KPs dans la phase diluée et dans l'agrégat (phase dense) selon les forces d'adhésion relatives macrophages-KP et KP-KP. Ces prévisions correspondent effectivement à ce qui est observé en figure 4.4(b) au sujet de la localisation des macrophages.

prend en compte trois types de phénomènes. Tout d'abord, les agrégats sont en mouvement. Ce mouvement est causé par des forces qui s'exercent sur les agrégats : la gravité, la friction avec le milieu de culture et le substrat, et des mouvements aléatoires dûs à du bruit (par exemple les vibrations du matériel, ou les fluctuations en concentration de molécules chimiotactiques). Un deuxième phénomène est le processus d'agrégation des cellules et des agrégats. Dans le modèle, on considère que les agrégats fusionnent instantanément pour former de plus gros agrégats. Par ailleurs, le modèle prend en compte une période de maturation de l'adhésion des cellules, ainsi que la compaction des agrégats. Enfin, le modèle prend en compte la division et mort cellulaire, et les fait dépendre de la concentration en nutriments, ainsi que la pression à l'intérieur de l'agrégat. On observe alors dans les simulations (figure 4.10(f)) que la présence de macrophages ralentit la mort cellulaire des cellules cancéreuses KP, en stimulant la nucléation.

Notre but est de vérifier que le modèle rend bien compte des données expérimentales. C'est pourquoi on calibre le modèle sur celles-ci. Les contraintes permettant de calibrer le modèle sont :

- l'évolution au cours du temps du rayon effectif de l'aire des agrégats contenant des cellules KP,
- l'évolution au cours du temps du nombre d'agrégats pour de multiples quantités de macrophages,
- et le nombre de cellules KPs observé dans le plus gros agrégat présent dans le puits au jour 3 et 7 de la coculture lorsque 5000 macrophages sont ajoutés aux 2500 cellules KP.

Les paramètres concernant les KPs (longueur de pénétration des nutriments, taux de prolifération, dépendance du taux de prolifération à la compaction) sont calibrés en comparant le modèle sans macrophages avec des expériences effectuées pour diverses quantités de cellules cancéreuses KPs (Fig. 4.10(a),4.10(c),4.10(e)). Ces paramètres sont supposés rester inchangés par l'ajout de macrophages, de telle sorte qu'il n'y a aucun effet biochimique des macrophages sur les cellules cancéreuses.

On observe figure 4.10 que même si le calibrage n'est pas parfait, le modèle s'approche des données expérimentales pour le rayon effectif (Fig. 4.10(b)) et le nombre d'agrégats observés (Fig.4.10(d)). Par ailleurs, le modèle retrouve les résultats concernant le nombre de cellules dans l'agrégat le plus gros (Fig.4.10(f)). Dans la figure 4.8, on compare visuellement une image provenant d'une expérience et une provenant d'une simulation, les deux prises 75h après le début de l'expérience et de la simulation. Néanmoins, le modèle ne parvient pas totalement à retrouver le nombre de macrophages et leur proportion dans l'agrégat le plus gros (figure 4.10(g),4.10(h)). L'évolution temporelle du rayon du plus gros objet présent dans le puits est retrouvée dans le cas des KPs seules, mais n'est que approchée dans le cas d'un mélange KPs+macrophages (figure 4.10(i),4.10(j)).

Au début des simulations, la quantité de KPs croît rapidement, car les agrégats ne sont que faiblement compacts. Les contraintes mécaniques agissant sur les cellules sont très faibles, et les nutriments pénètrent facilement car à cet instant il existe une fraction volumique élevée de liquide interstitiel dans les agrégats. De plus, les agrégats ont des tailles encore faibles. Lorsque les agrégats deviennent moins nombreux, plus compacts et de plus grande taille, la croissance sature, et la mort cellulaire domine.

Nous avons donc démontré qu'un effet indirect des macrophages sur la prolifération des KPs était une explication plausible des résultats expérimentaux. Nous visons maintenant à tester ce modèle de façon critique.

## 4.5 Test critique du modèle physique : modulation de l'adhésion macrophages-KPs

Le modèle peut alors jouer un rôle prédictif. En effet, il implique que si on diminue les forces d'adhésion cellules-macrophages, la prolifération devrait elle aussi diminuer. De même, si on utilise un substrat moins adhérent pour les macrophages, la prolifération des KPs devrait diminuer.

Pour tester la première hypothèse, nos collaborateurs ont utilisé un anticorps nommé Anti-CD11c, qui bloque les protéines d'adhésion des macrophages, empêchant une adhésion efficace des macrophages aux KPs.

On observe figures 4.11(a),4.11(b) une diminution importante du nombre d'agrégats et de l'aire totale des cellules dans le puits, ce qui montre que c'est bien l'agrégation qui est à l'origine de la prolifération anormale des cellules cancéreuses.

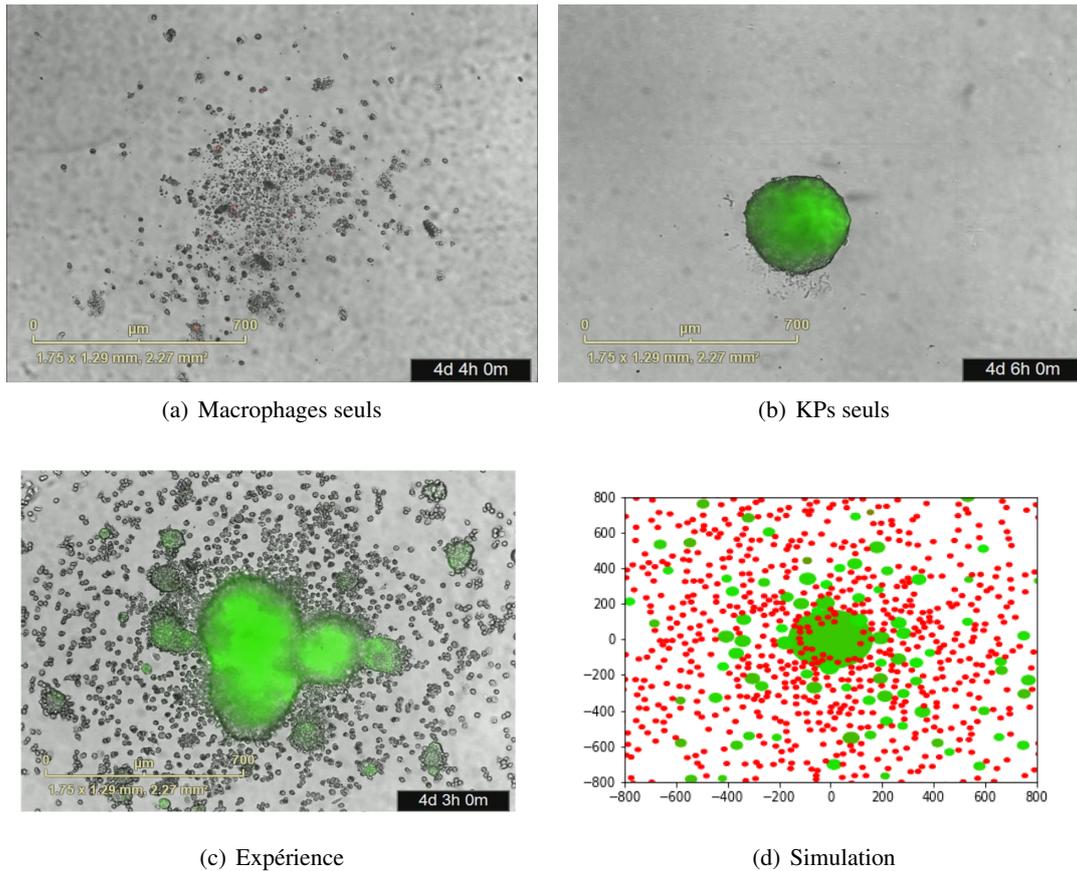
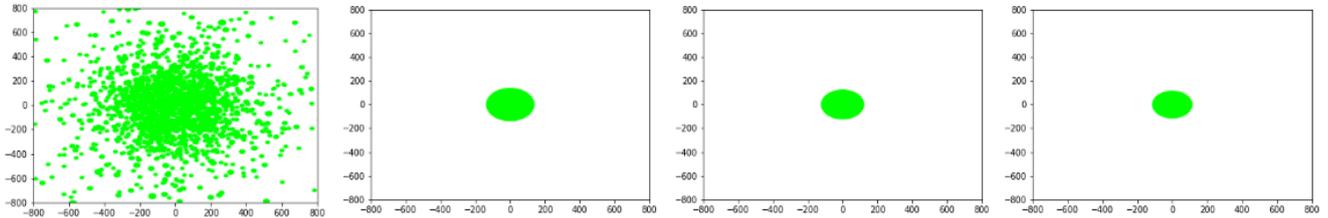
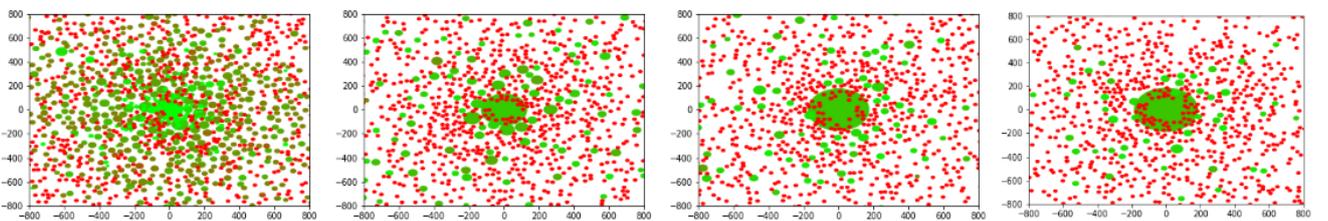


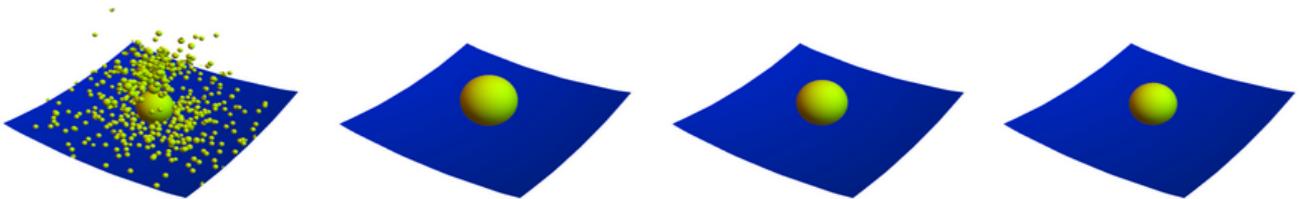
FIGURE 4.8 – **(a),(b)** : Expériences avec seulement des macrophages (a) et seulement des KPs (b). On observe que les macrophages n'adhèrent pas entre eux, contrairement aux KPs qui forment un sphéroïde compact à 4 jours. **(c),(d)** : On compare visuellement une expérience et une simulation contenant au départ 2500 cellules KP et 5000 macrophages. Les unités des axes dans l'image provenant de la simulation sont des micromètres.



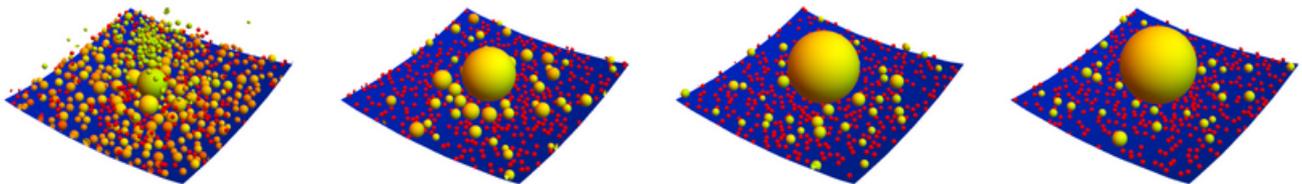
(a) KPs seuls au cours du temps



(b) KPs+macrophages au cours du temps



(c) KPs seuls au cours du temps



(d) KPs+macrophages au cours du temps

FIGURE 4.9 – (a),(b) : Images du centre du puits projetées en 2 dimensions pour 2500 cellules KP et 2500 cellules KP avec 5000 macrophages, aux instants  $t=1h$ ,  $t=60h$ ,  $t=120h$ , et  $t=160h$  de gauche à droite. Le niveau de couleur verte reflète la proportion de cellules KP dans les agrégats et le niveau de couleur rouge reflète la proportion de macrophages dans l'agrégat. Les axes sont en micromètres. (c),(d) : Images du centre du puits projetées en 2 dimensions pour 2500 cellules KP et 2500 cellules KP avec 5000 macrophages, aux instants  $t=1h$ ,  $t=60h$ ,  $t=120h$ , et  $t=160h$  de gauche à droite. Le code couleur est identique.

Dans le cadre des simulations, il s'avère que pour obtenir des résultats semblables, il est nécessaire de faire baisser l'adhésion au substrat en même temps que l'adhésion macrophages-KPs. Les résultats sont alors exposés en figures 4.11(c)-4.11(f).

## 4.6 Modèle hybride discret/continu : modèle de suivi de particules avec fusion et prolifération/mort cellulaire

Du fait du nombre important de cellules en présence (le nombre de cellules peut atteindre  $10^4$ ), un modèle totalement discret permettant un calibrage des paramètres en un temps raisonnable est difficile à mettre en oeuvre. Par ailleurs, un modèle complètement continu est aussi exclu du fait du nombre important d'agrégats, qui conduirait à un nombre trop important d'interfaces, et ralentirait de façon conséquente le calcul en 3 dimensions. En outre, utiliser un modèle d'agrégation classique de type Smoluchowski est aussi exclu car il ne peut pas prendre en compte la gravité en géométrie contrainte dans un puits. Or la sédimentation joue un rôle clé dans les expériences. Le modèle de Smoluchowski décrit au chapitre 3 a seulement été utilisé dans cette étude pour effectuer une étude préliminaire afin de s'assurer de façon qualitative des capacités des hypothèses émises à rendre compte des expériences.

C'est pourquoi nous construisons un modèle hybride, semi-discret et semi-continu. Nous considérons chaque agrégat (et chaque cellule isolée) comme un objet indépendant. Deux agrégats peuvent fusionner avec une certaine probabilité lorsqu'ils se rencontrent pour former un nouvel agrégat unique. Ces agrégats sont soumis à des forces de gravité, de friction, d'interaction avec le substrat ainsi qu'à un bruit diffusif. Les agrégats peuvent croître. La loi de croissance est contrôlée par les nutriments et la fraction massique des cellules dans l'agrégat. Elle est dictée par le modèle continu décrit plus haut au chapitre 3.

Afin de construire un modèle réaliste des agrégats composés de macrophages et de cellules cancéreuses, il est important de bien déterminer la localisation des macrophages et des cellules cancéreuses dans l'agrégat. Comme expliqué au chapitre 2, le modèle des mélanges permet de prédire la partition de l'agrégat selon les propriétés des différentes espèces de cellules en présence. Dans notre cas, une adhésion nulle entre les macrophages et des adhésions non nulles pour les couples KPs-KPs et KPs-macrophages induit l'existence d'une seule phase. La répartition des KP et des macrophages est alors homogène. Cette structure simplifie évidemment les calculs.

Le modèle mathématique et le programme codé en Fortran sont résumés dans la figure 4.12. Concernant le modèle numérique, à chaque pas de temps, on effectue une première boucle sur les agrégats afin de prendre en compte les processus de fusion des agrégats en nouveaux agrégats et de maturation. On intègre dans le processus de fusion un mécanisme de répulsion sphérique qui empêche les agrégats en contact de s'interpénétrer lorsqu'il ne fusionnent pas. Une deuxième boucle est alors effectuée pour implémenter la croissance des agrégats et leurs déplacements. D'autres informations concernant le programme numérique sont présent en annexe 4.A. On détaille à présent chaque ingrédient du modèle physique.

### 4.6.1 Modèle de suivi de particules (Particle Based Model)

Les agrégats sont soumis à différentes forces, ce qui détermine leurs vitesses. Puisque le système possède un nombre de Reynolds très faible, pour chaque agrégat :

$$\mathbf{F}_L + \mathbf{F}_g + \mathbf{F}_f + \mathbf{F}_s = \mathbf{0} \quad (4.1)$$

On détaille ces différentes forces :

- **Force de Langevin** : Une force aléatoire de Langevin correspondant au bruit qui s'exerce dans l'expérience sur les agrégats. C'est un bruit supposé blanc qu'on écrit de la façon suivante :

$$\mathbf{F}_L = \zeta_L ; \langle \zeta_L(t)\zeta_L(t') \rangle = 2\zeta_0\delta(t-t') ; \langle \zeta_L \rangle = 0 \quad (4.2)$$

Il faut noter que le bruit dépend de la distance au substrat, car les macrophages y adhèrent et s'y déplacent donc activement. La distribution gaussienne est générée numériquement par la méthode de Box-Muller.

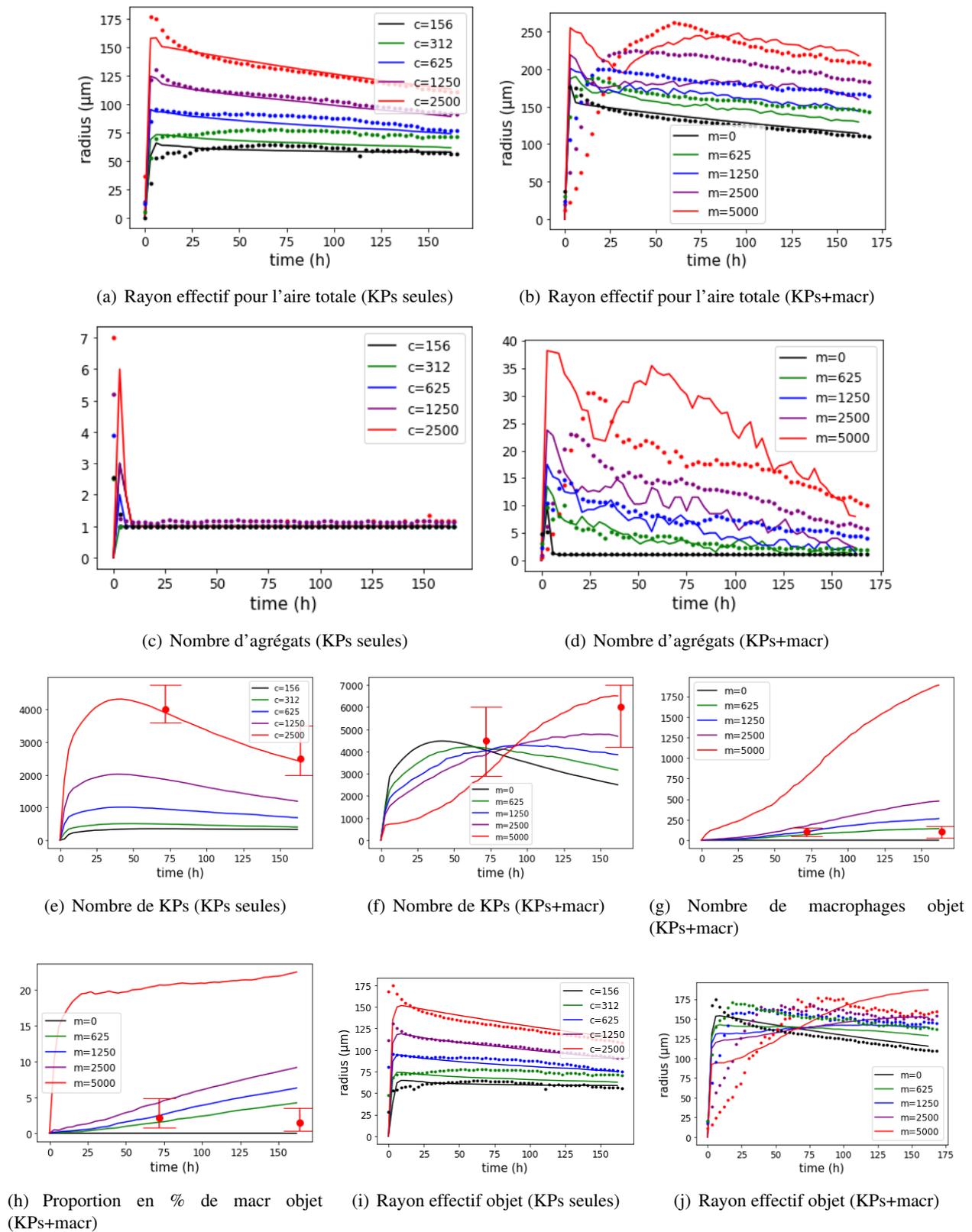


FIGURE 4.10 – Calibrages des simulations aux résultats expérimentaux au cours du temps. Les données expérimentales sont en pointillés ou indiquées par des bars d'erreurs, tandis que les simulations sont représentées en lignes continues. Les simulations et les expériences sont réalisées avec 2500 cellules KP, et un nombre de macrophages qui varie. Dans les légendes des figures,  $c$  correspond au nombre de KPs et  $m$  au nombre de macrophages dans l'expérience et la simulation. Le rayon effectif  $R$  est défini par  $R = \sqrt{A/\pi}$ , avec  $A$  l'aire totale des agrégats contenant des KPs. Les figures a,c,e,i correspondent à des simulations et expériences avec seulement des KPs, pour différentes quantités initiales de KPs. Les figures b,d,f,g,h,j correspondent à des simulations et expériences avec 2500 KPs et différentes quantités de macrophages. (a)-(b) : Rayon effectif de l'aire totale des agrégats, projetée sur le plan horizontal. (c)-(d) : Nombre d'agrégats dans le puits. (e)-(f) : Quantité totale de cellules KP dans le plus gros objet présent dans le puits. (g)-(h) : Quantité totale (g) et proportion en % (h) de macrophages dans le plus gros objet. (i)-(j) : Rayon effectif du plus gros objet présent dans le puits.

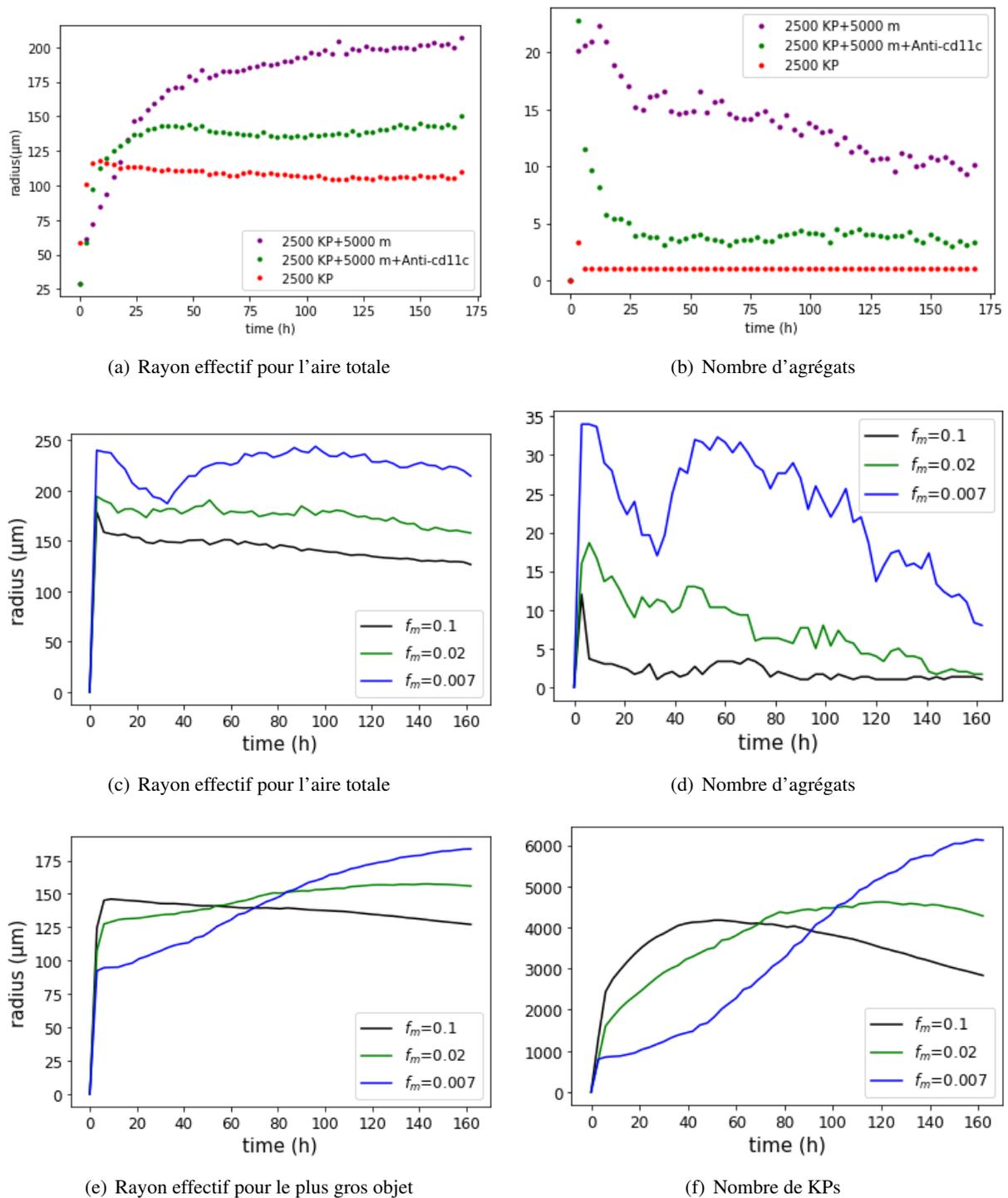
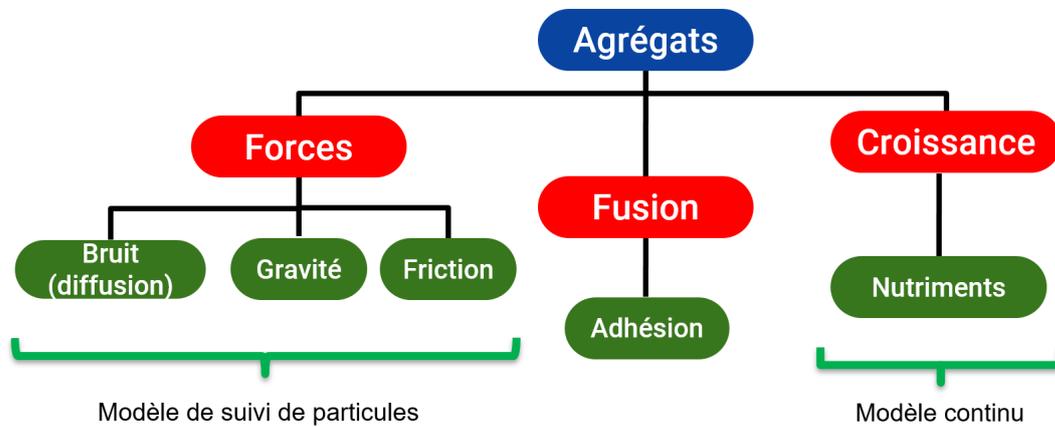
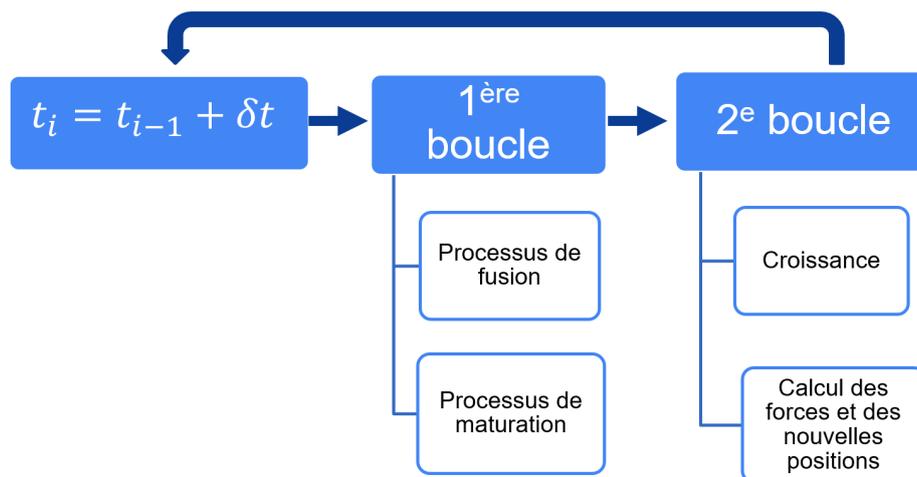


FIGURE 4.11 – (a),(b) : Comparaison des résultats expérimentaux pour 2500 cellules cancéreuses KP sans macrophages, pour 2500 cellules cancéreuses KP en présence de 5000 macrophages, puis pour 2500 cellules cancéreuses KP en présence de 5000 macrophages et d'anticorps anti-cd11C. On observe que la présence d'anticorps empêche la nucléation d'agrégats, et leur croissance. (c)-(f) : Prédiction pour le nombre d'agrégats (c), le rayon effectif de la zone GFP totale (d), le rayon effectif du plus grand objet dans le puits (e) et le nombre de cellules KP dans le plus grand objet GFP (f), lorsque la force d'adhésion des macrophages caractérisée par le paramètre  $f_m$  diminue. Le paramètre  $f_m$  est proportionnel aussi bien à  $a_{cm}^{max}$  qu'à  $f_{ms}$ .



(a) Structure du modèle physique



(b) Structure du code

FIGURE 4.12 – (a) : Le modèle mathématique peut être divisé en trois parties. La première est le calcul des différentes forces et des déplacements des agrégats, qui utilise un modèle discret de suivi de particules (Particle Based Model). Le deuxième est la modélisation des fusions entre agrégats. La troisième est la modélisation de la croissance des agrégats à l'aide d'un modèle continu. (b) : La structure du code numérique est décrite ici. A chaque pas de temps, on effectue une première boucle sur les agrégats afin de prendre en compte les processus de fusion des agrégats en nouveaux agrégats et de maturation. Une deuxième boucle est alors effectuée pour implémenter la croissance des agrégats et leurs déplacements.

- **Force de gravité :** On introduit de façon naturelle l'action de la gravité :

$$\mathbf{F}_g = V_a(\rho_a - \rho_e)\mathbf{g} \quad (4.3)$$

avec  $V_a$  le volume de l'agrégat,  $\rho_a$  la densité de l'agrégat,  $\rho_e$  celle du milieu liquide autour, et  $\mathbf{g}$  la constante de gravité. Dans la simulation,  $\rho_a = 1.5\rho_e$ .

- **Force de friction :** On ne considère que deux types de frictions : celle entre les agrégats et le fluide et celle entre les agrégats et le substrat. On ne considère pas la friction entre cellules. En effet, dans ce modèle nous ne modélisons pas explicitement le mouvement des cellules à l'intérieur des agrégats, puisqu'à chaque fois les cellules fusionnent en un agrégat qui est considéré comme un objet unique. Il ne reste donc que la friction agrégat-agrégat, qui est négligée.

$$\mathbf{F}_f = -f(\mathbf{r})\mathbf{v} \quad (4.4)$$

avec  $\mathbf{v}$  la vitesse de l'agrégat et  $f(\mathbf{r})$  le coefficient de friction, qui dépend de la localisation de l'agrégat. En effet, les macrophages s'accrochent au substrat, augmentant le coefficient de friction.

Soit  $R$  le rayon de l'agrégat et  $m$  la fraction volumique de cellules. On écrit :

$$f(r) = R^{4/3}(f_{ms}m)^{5/3} e^{-d_f/l_f} + f_0R \quad (4.5)$$

avec  $f_0R$  la friction entre l'agrégat et le milieu liquide qui suit une loi de Stokes  $f_0 = 6\pi\eta$  où  $\eta$  est la viscosité, et  $(f_{ms}m)^{5/3}R^{4/3}$  correspond à la friction de l'agrégat avec le substrat. Cette dernière force de friction est évaluée comme proportionnelle à la surface de contact entre les macrophages de l'agrégat et le substrat. Nous utilisons la théorie JKR [286] et nous déterminons que cette surface est proportionnelle à  $m^{5/3}R^{4/3}$  (voir encadré), du fait que les macrophages sont considérés comme répartis de façon homogène dans l'agrégat.  $d_f$  est la distance de l'agrégat au substrat,  $l_f$  est la longueur caractéristique à partir de laquelle la friction due au substrat agit sur l'agrégat.

#### Théorie JKR :

La théorie JKR (pour Johnson, Kendall et Roberts, auteurs de l'article en référence [286]) traite du contact pour les objets élastiques adhérents, soumis ou non à une contrainte mécanique. C'est une extension de la théorie de Hertz [287, 288] pour le contact d'objets élastiques. Dans la théorie JKR, le rayon  $r$  de la surface de contact entre deux sphères de rayon  $R_1$  et  $R_2$  possédant des modules élastiques et de Poisson identiques  $Y$  et  $\nu$ , est donné par :

$$r^3 = \frac{9\pi\gamma R^2(1-\nu^2)}{2Y} \quad (4.6)$$

où  $R = (R_1^{-1} + R_2^{-1})^{-1}$ ,  $\gamma$  correspond au gain d'énergie de surface par unité de surface lors du contact. Dans le cas de la friction avec le substrat, on évalue l'énergie de surface de l'agrégat avec le substrat  $\gamma \sim m$  où  $m$  est la fraction volumique de macrophages dans l'agrégat. La valeur absolue de la somme  $E$  de l'énergie d'adhésion et de l'énergie mécanique est quant à elle  $E \sim \gamma^{5/3}R^{4/3}$ .

- **Force de répulsion au substrat :**

Afin d'empêcher les cellules de traverser le substrat, on écrit une force répulsive à proximité du substrat, et normale à sa surface.

$$\mathbf{F}_s = -F_s\mathbf{n} \quad (4.7)$$

où  $\mathbf{n}$  est le vecteur unitaire normal au substrat.

La vitesse s'exprime alors :

$$\mathbf{v} = (\mathbf{F}_L + \mathbf{F}_g + \mathbf{F}_f + \mathbf{F}_s)f^{-1} \quad (4.8)$$

On remarque que cette expression permet de résoudre simplement les vitesses des différents agrégats sans créer de couplage entre leurs vitesses respectives. Pour  $N$  agrégats, à chaque pas de temps,  $N$  calculs suffisent. Par ailleurs, si les interactions entre agrégats avait été pris en compte,  $N(N - 1)/2$  calculs auraient été nécessaires.

Ainsi, pour chaque agrégat, on calcule à chaque pas de temps la nouvelle position :  $\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}\delta t$ .

#### 4.6.2 Fusion

A chaque pas de temps, si deux agrégats à des positions  $\mathbf{r}_1$  et  $\mathbf{r}_2$ , de volumes  $V_1$  et  $V_2$ , et comprenant respectivement  $C_1$  et  $C_2$  cellules, et  $M_1$  et  $M_2$  macrophages sont assez proches, il existe une probabilité qu'ils fusionnent. Le nouvel agrégat se situe alors à  $(\mathbf{r}_1 V_1 + \mathbf{r}_2 V_2)/(V_1 + V_2)$ . Il possède  $C_1 + C_2$  cellules et  $M_1 + M_2$  macrophages. Les densités en cellules KP et en macrophages sont notées respectivement pour les deux agrégats  $c_1$  et  $m_1$ ,  $c_2$  et  $m_2$ .

La probabilité de fusion  $p_f$  est supposée dépendre de la surface de contact entre les agrégats. En effet, on suppose que les surfaces des agrégats adhèrent l'une à l'autre naturellement. Ainsi le seul moyen d'empêcher la fusion est de détacher ces deux agrégats. On calcule pour chaque pas de temps  $p_f = 1 - e^{-E/k_B T}$  avec  $E$  l'énergie d'adhésion fournie par la théorie JKR [286] et  $k_B T$  une mesure de la température de fluctuation. L'énergie d'adhésion est calculée comme suit :

$$\frac{E}{k_B T} = (a_{cc}^1 a_{cc}^2 c_0 c_1 + a_{mc}^1 c_0 m_1 + a_{mc}^2 c_1 m_0)^{5/3} R^{4/3} \quad (4.9)$$

où  $a_{AB}^i$  quantifie l'aptitude de l'agrégat du type de cellules  $A$  de l'agrégat  $i$  à créer des liens avec le type de cellules  $B$  d'un autre agrégat. L'énergie d'adhésion par unité de surface est jugée proportionnelle au nombre de liens entre les deux surfaces. Dans le cas de l'adhésion cellules KP-cellules KP, qui produit le terme  $a_{cc}^1 a_{cc}^2 c_0 c_1$ , le nombre de liens est limité par les capacités des deux agrégats à créer des liens KP-KP. Au contraire, on considère que les macrophages ont la capacité d'adhérer aux KPs quel que soit le degré de maturation de celles-ci. C'est pourquoi le terme d'adhésion entre les macrophages et les KPs  $a_{mc}^1 c_0 m_1 + a_{mc}^2 c_1 m_0$  ne fait intervenir que des paramètres d'adhésion  $a_{mc}^1, a_{mc}^2$  liés aux macrophages présents dans les deux agrégats. Comme expliqué dans le paragraphe qui suit, les valeurs des paramètres  $a_{AB}^i$  peuvent varier avec le temps. Les valeurs maximales (c'est-à-dire les valeurs pouvant être atteintes après maturation) des paramètres utilisés dans les simulations qui calibrent les expériences sont :  $a_{cc} = a_{mc} = 0.1$ .

#### 4.6.3 Retard d'agrégation et compaction : la maturation de l'adhésion

On considère un phénomène de maturation de l'adhésion qui comprend deux parties [202] :

- Il existe une maturation qui débute avant même l'apparition de molécules d'adhésion à la surface des cellules. Cette maturation prend effet grâce aux contacts cellule-cellule par chocs successifs avant adhésion. Concrètement, à chaque pas de temps, si deux agrégats (ou cellules) sont en contact, il existe une probabilité  $p_f$  de fusion, qui dépend des variables d'adhésion  $a_{cc}^1, a_{cc}^2, a_{cm}^1, a_{cm}^2$  dans l'équation 4.9. Dans le cas d'un retard d'agrégation KPs-KPs, ce retard est exprimé en écrivant que  $a_{cc} = \max(\alpha_{cc} - \alpha_{cc}^0, 0)$ , où  $\alpha_{cc}$  est le degré de maturation des cellules, et  $\alpha_{cc}^0$  est un seuil critique pour l'agrégation.  $a_{cc}$  correspond donc à la maturation de l'adhésion à laquelle on soustrait le processus interne de maturation des cellules avant qu'elles n'acquière des capacités réelles d'adhésion. Si la fusion des deux agrégats (ou de deux cellules en un agrégat unique) n'a pas lieu, le contact entre les deux cellules donne lieu néanmoins à une maturation de l'adhésion de sorte qu'au pas de temps d'après  $t + \delta t$ , chaque agrégat aura vu ses capacités d'adhésion augmenter :

$$\alpha_{cc}(t + \delta t) = \alpha_{cc} + (\alpha_{cc}^{max} - \alpha_{cc})\tau_m^{-1}\delta t \quad (4.10)$$

où  $\alpha_{cc}^{max}$  est la valeur maximale pour le paramètre d'adhésion et  $\tau_m$  un temps de maturation. Dans les simulations, pour les cellules cancéreuses KP  $\tau_m = 15$  h. En revanche, les macrophages n'ont pas besoin

de subir un processus de maturation avec les cellules cancéreuses. On observe en effet que les macrophages créent sans délai des agrégats avec les KPs, nous conduisant à évaluer que s'il existe un délai de maturation celui-ci est extrêmement faible.

- Lorsque des cellules forment un agrégat, celui-ci connaît une maturation de l'adhésion, qui augmente jusqu'à atteindre une limite. Cette maturation post-fusion conduit à la compaction de l'agrégat. En effet, on suppose que la fraction volumique de cellules à l'intérieur d'un agrégat est linéairement reliée aux forces d'adhésion cellules-cellules à l'intérieur de l'agrégat. On ne prend pas en compte le phénomène de réorganisation de la structure interne de l'agrégat à force d'adhésion constante, qui n'est pas immédiat du fait de la dissipation de friction des cellules entre elles. On peut aussi considérer que la variable d'adhésion que l'on prend en compte est une variable d'adhésion effective qui englobe aussi bien les forces d'adhésion cellules-cellules et la réorganisation cellulaire. Ainsi, après fusion, à chaque pas de temps, l'adhésion d'un agrégat composé de plus d'une cellule devient plus mature.

Les paramètres de maturation pour les KPs sont calibrés en observant la formation des agrégats composés de KPs uniquement.

#### 4.6.4 Prolifération et mort cellulaire

Les équations qui contrôlent la croissance de chaque agrégat ont déjà été globalement décrites dans le chapitre 3. Néanmoins, certaines données tirées des résultats expérimentaux nous ont conduit à raffiner le modèle classique.

Un profil en nutriments est tout d'abord calculé, comme dans la section 3.2.1. Ce profil est la solution de l'équation stationnaire pour la concentration locale en nutriments  $c$  :

$$D\nabla^2 c = d_c n c \quad (4.11)$$

où on rappelle que  $d_c$  est le taux de consommation en nutriments,  $n$  est la densité en cellules et  $D$  le coefficient de diffusion des nutriments. Afin de tenir compte de l'effet de la compaction sur la croissance, on écrit :  $D = D_0(1 - \phi)$ , où  $D_0$  correspond au coefficient de diffusion dans le milieu extracellulaire,  $\phi$  est la fraction volumique de cellules, de sorte que  $1 - \phi$  est la fraction volumique en liquide interstitiel qui correspond à la porosité du milieu. Par ailleurs,  $n = v_c^{-1}\phi$  où  $v_c$  est le volume d'une cellule unique. Finalement, on peut résoudre cette équation de la même manière que dans le chapitre précédent (voir équations 3.17). La longueur de pénétration est alors :

$$l = \sqrt{\frac{D_0(1 - \phi)}{d_c v_c^{-1} \phi}} = l_p \sqrt{\frac{(1 - \phi)}{\phi}} \quad (4.12)$$

où  $l_p = 15 \mu\text{m}$ , qui diverge bien dans un milieu très dilué en cellules où  $\phi \rightarrow 0$ .

Puis on écrit l'équation de prolifération de chaque agrégat en fonction de la répartition en nutriments dans celui-ci. Dans le chapitre précédent nous avons écrit (équation 3.6,3.7) pour la variation du volume d'un agrégat du fait de la croissance :

$$\frac{dV}{dt} = \int_V dV \{ \tau_g^{-1} (c - c_c) \} \quad (4.13)$$

où  $c_c$  est la concentration critique en nutriments, et  $\tau_g$  un temps typique de croissance. Dans la modélisation de la croissance qui nous occupe dans ce chapitre, il s'avère qu'afin de faire correspondre le modèle physique aux données, il est nécessaire de modifier cette relation. En effet, on peut considérer que les taux de croissance en environnement compact et dans des sphéroïdes plus aérés sont différents, du fait des forces mécaniques de compression que le processus de division cellulaire doit surmonter :

$$\frac{dV}{dt} = \int_V dV \{ (c - c_c)/\tau_g^0 + (\phi_f - \phi)/\tau_g^1 \} \quad (4.14)$$

Le taux de croissance volumique des cellules s'écrit donc  $k_g = (c - c_c)/\tau_g^0 + (\phi_f - \phi)/\tau_g^1$ , avec  $\phi_f$  la fraction volumique finale en cellules. On peut voir cette dépendance comme une correction au premier ordre du taux de croissance par rapport aux forces de pressions agissant sur les cellules. On peut en effet développer la pression au

premier ordre en fonction de la fraction volumique. Ainsi nous prenons en compte l'effet mécanique déjà décrit dans la section 3.1. Les concentrations en nutriments sont renormalisées par  $c_\infty$  la valeur de la concentration loin de l'agrégat, de telle sorte que :  $dV/dt = \int_V dV \{(c/c_\infty - c_c/c_\infty)c_\infty/\tau_g^0 + (\phi_f - \phi)/\tau_g^1\}$ . Dans les simulations, on a comme paramètres  $c_c/c_\infty = 0.3$ ,  $\tau_g^0 = 33$  h,  $\tau_g^1 = 8$  h,  $\phi_f = 0.9$ .

## 4.7 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis en lumière les effets de stimulation indirecte de la prolifération de cellules cancéreuses par des cellules du système immunitaire desquels on pourrait donc attendre une action contraire. Ce phénomène est expliqué ici de façon purement physique, sans faire appel à des effets biochimiques, comme un enrôlement actif des macrophages par les cellules cancéreuses, même si les macrophages semblent être associés à une transition EMT tardive dans l'expérience. La nucléation des cellules cancéreuses à l'aide des macrophages est aussi attestée durant la métastase transco-élomique du cancer de l'ovaire [244], pendant laquelle cette agrégation évite aux cellules cancéreuses l'apoptose par anoïkose. Les capacités adhérentes des macrophages pourraient donc être un élément clé dans certains cancers, de par leur capacité à fournir un support qui soutient une prolifération cancéreuse hors d'une tumeur unique et centrale. Ce travail permet aussi d'apporter un autre exemple des nombreuses stratégies pouvant être choisies par les cellules cancéreuses pour optimiser leur prolifération. L'apport d'un regard biophysique est aussi démontré dans la construction d'un modèle minimal permettant d'appréhender des processus biologiques complexes, dans une expérience caractéristique de biologie, c'est-à-dire où l'accent est mis au niveau de l'analyse biologique et non du contrôle physique du système. Enfin, le projet offre une piste de traitement possible pour contrer ce phénomène, en agissant au niveau des protéines d'adhésion des macrophages.

## ANNEXES

## Annexe 4.A Structure du programme informatique

Le programme informatique utilisé pour les simulations a été réalisé en langage Fortran. A toute fin utile, nous expliquons ici la structure du programme informatique, schématiquement représentée dans la figure 4.12(b).

Suivant une procédure classique en langage Fortran, le programme possède une architecture où des routines sont appelées de manière successive. La routine principale est appelée `programme`. Après avoir défini les variables et les vecteurs utilisés, on écrit une routine `initialisation` qui initialise le programme, en assignant différentes valeurs pour les positions, rayons, compositions en cellules et macrophages, paramètres d'adhésion, où encore des masses aux agrégats initiaux. Dans notre cas, le programme débute avec seulement des cellules individuelles, qui sont donc des agrégats formées d'une seule cellule KP ou macrophage. Concernant les positions, les cellules sont distribuées de façon aléatoire dans une demi-sphère de rayon 3 mm qui représente le fond des puits utilisés dans les expériences. La routine intermédiaire `routine_principale` est la routine principale dans laquelle les processus temporels d'agrégation/croissance prennent place. La dernière routine `recuperation_donnees` est seulement une routine de récupération de données.

```
subroutine programme(...)
[Definition des variables et vecteurs]
call initialisation(...)
call routine_principale(...)
call recuperation_donnees(...)
return
end
```

La routine principale est composée d'une boucle temporelle pendant laquelle les calculs sont effectués à chaque pas de temps. Le pas de temps est  $\delta t = 0.01 \text{ h} = 36 \text{ s}$ . A chaque pas de temps, deux boucles sont effectuées sur tous les agrégats. La première `BOUCLE_fusion_croissance` concerne la fusion des agrégats et leur croissance. La deuxième `BOUCLE_deplacements` concerne leur déplacement.

```
subroutine routine_principale(...)
[Definition des variables et vecteurs]
[BOUCLE TEMPORELLE]
    call BOUCLE_fusion_croissance(...)
    call BOUCLE_deplacements(...)
return
end
```

La routine qui concerne la première boucle est constituée d'une routine pour la maturation interne des agrégats possédant plus d'une cellule (décrite dans la section 4.6.3), d'une pour la fusion des agrégats, et d'une pour la croissance. Celle qui concerne la fusion est de nouveau composée d'une autre boucle sur les agrégats (de telle sorte que seulement  $N(N-1)/2$  calculs sont nécessaires) car chaque agrégat peut potentiellement fusionner avec tous les autres. Cette dernière routine prend en compte la distance entre les agrégats, leur composition, leur adhésion, et calcule la probabilité d'adhésion entre eux. Dans le cas où ils n'adhèrent pas, le contact peut donner lieu à une maturation de l'adhésion par chocs successifs. La routine qui concerne la croissance utilise simplement la formule analytique de l'équation 4.14, afin de calculer un nombre entier de KPs à ajouter ou soustraire à l'agrégat.

```
subroutine BOUCLE_fusion_croissance(...)
[Definition des variables et vecteurs]
[BOUCLE SUR LES AGREGATS EXISTANTS]
    call maturation(...)
    call fusion(...)
    call Croissance(...)
```

```
return  
end
```

```
subroutine fusion(...)  
[Definition des variables et vecteurs]  
[BOUCLE SUR LES AGREGATS EXISTANTS]  
    [Calcul d'une probabilité de fusion]  
        [si fusion, on change les propriétés de chaque agrégat]  
        [si non fusion, maturation possible des agrégats]  
return  
end
```

Enfin, dans la routine `BOUCLE_deplacements(...)` qui détermine les déplacements de chaque agrégat, on calcule tout d'abord les forces qui s'exercent sur chaque agrégat, avant d'en déduire sa nouvelle position.

```
subroutine BOUCLE_deplacements(...)  
[Definition des variables et vecteurs]  
[BOUCLE SUR LES AGREGATS EXISTANTS]  
    call gravité(...)  
    call bruit(...)  
    call friction(...)  
    call reaction_normale(...)  
    call determination_vitesse(...)  
    call nouvelle_position(...)  
return  
end
```



## Chapitre 5

# Croissance de kystes de cellules souches pour les thérapie régénératrices et l'embryologie

Ce chapitre est consacré à une étude réalisée en collaboration avec Pierre Nassoy et avec l'équipe de la start up *Trefrog*. Nous avons élaboré la partie théorique, tandis que nos collaborateurs ont réalisé l'expérience et fourni les données expérimentales. Ce travail a débouché sur un article en cours de publication à *Journal of Mechanics of Solids*. Par ailleurs, une partie du travail réalisé n'a pas abouti, c'est pourquoi elle a été reléguée dans l'annexe qui suit le présent chapitre.

### 5.1 Les cellules souches, leurs applications et leur production

Nombre de maladies sont dues à des défaillances de mécanismes cellulaires. Une première cause peut-être une dégénérescence dans les tissus. C'est le cas de la maladie d'Alzheimer (due à des lésions dans le cerveau), de la maladie de Parkinson (dégénérescence dans le système nerveux central), ou encore de la maladie de Charcot (mort cellulaire des neurones commandant certains muscles). Une seconde cause peut aussi être un dysfonctionnement de cellules qui possèdent une certaine fonction. Ainsi, dans la phase tardive du diabète de type 2, les cellules du pancréas ne sont plus capables de sécréter assez d'insuline, menant à une hyperglycémie constante, qui altère les vaisseaux sanguins [289]. Dans l'hypothyroïdie, les cellules thyroïdiennes ne sécrètent plus certaines hormones T3 et T4, entraînant une hypothyroïdie, soit un ralentissement du métabolisme global de l'organisme. Enfin, une autre cause peut être la destruction de certaines cellules, comme dans le cas des grands brûlés pour qui il faut remplacer les cellules souches cutanées. Ou encore, suite à la chimiothérapie des leucémies, les cellules de la moelle osseuse sont détruites en intégralité menant à une aplasie médullaire, donc une absence du système immunitaire, de plaquettes, et de globules rouges.

De plus en plus, des thérapies cellulaires visent à soigner par apport de cellules dans l'organisme. Il existe deux catégories de thérapies cellulaires [290]. La première catégorie est l'immunothérapie cellulaire adaptative qui consiste à multiplier hors organisme des cellules immunitaires de l'individu puis à les lui réinjecter. La seconde catégorie, plus développée, est la médecine régénérative, qui consiste à injecter des cellules souches qui se différencient alors en un type de cellules voulu, dans le but de réparer un tissu ou un organe.

Les cellules souches sont caractérisées par deux propriétés : l'auto-renouvellement et la différenciation. Il existe quatre types de cellules souches [291]. Les cellules souches totipotentes peuvent se différencier vers tous les types cellulaires issus de l'embryon et des annexes embryonnaires (organes transitoires qui accompagnent l'embryon et le fœtus lors de leur développement). Les cellules souches pluripotentes peuvent se différencier vers tous les types cellulaires issus de l'embryon seulement. Les cellules souches multipotentes peuvent se différencier vers un nombre restreint de types cellulaires. Les cellules souches unipotentes ne peuvent se différencier que vers un seul type cellulaire. Les cellules souches pluripotentes humaines (hPSCs) sont donc devenues une des sources cellulaires les plus prometteuses pour les thérapies cellulaires, dans le domaine de l'ingénierie d'organes ou encore les tests de médicaments. La possibilité de reprogrammer des cellules différenciées en cellules pluripotentes induites par l'homme (hiPSC) [16] rend possible le développement à la demande à l'infini avant la différencia-

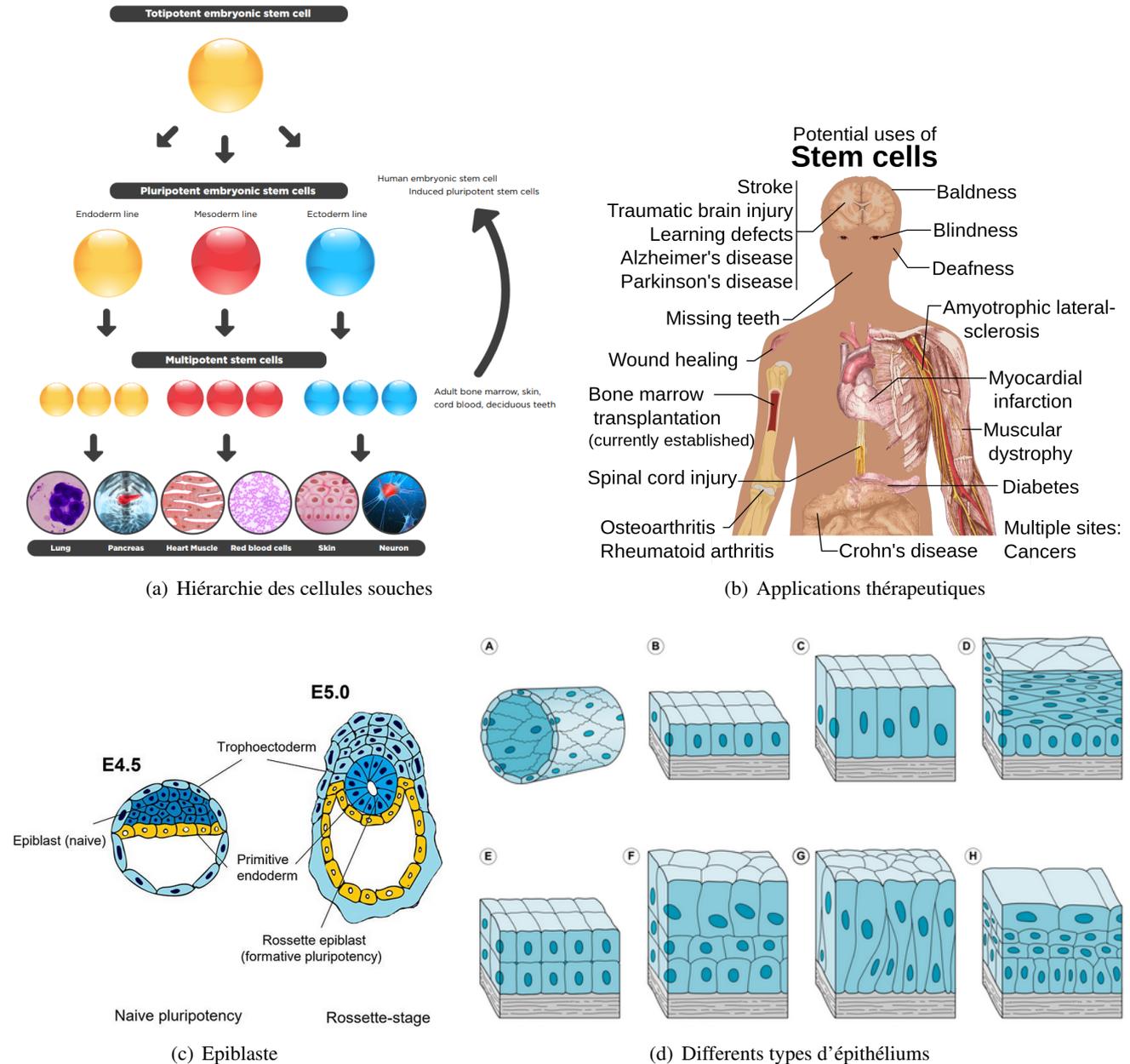


FIGURE 5.1 – (a) : (issue de [292]) *Arbre de différenciation* : Les cellules souches totipotentes donnent lieu à des cellules souches pluripotentes endodermes, mésodermes et ectodermes, d'où proviennent les cellules souches multipotentes. Ce sont celles-ci qui produisent des cellules matures. (b) : (issue de [293]) *Schéma détaillant différentes applications thérapeutiques possibles des cellules souches*. (c) : (issue de [294]) *Apparition d'une lumière dans l'épiblaste au 5e jour de l'embryon (E5)*. (d) : (issue de [295]) *Classification des différentes structures épithéliales*. Les épithéliums stratifiés possèdent plusieurs couches de cellules, contrairement aux épithéliums non stratifiés. Lorsqu'ils sont pseudo-stratifiés (voir figure 5.1(d)), toutes les cellules ont un point de contact avec la membrane basale de l'épithélium. A : Épithélium pavimenteux (paroi des vaisseaux). B : Épithélium cubique simple (tubules rénaux). C : Épithélium cylindrique simple (microvillosités des intestins). D : Épithélium stratifié pavimenteux (bouche, oesophage). E : Épithélium stratifié cubique (glandes). F : Épithélium stratifié cylindrique (urètre masculin). G : Épithélium pseudo-stratifié cylindrique (voies respiratoires). H : Épithélium transitionnel (système urinaire).

tion. Alors que les protocoles de différenciation vers des phénotypes matures ont été largement améliorés, l'une des limites principales des applications biomédicales reste en amont dans la chaîne de production : la culture et l'expansion des hPSCs à des nombres pertinents pour les applications cliniques.

Typiquement  $10^6 - 10^{12}$  cellules sont nécessaires pour les thérapies dérivées de cellules souches. Pour donner

une idée de ce que cela représente [296],  $10^6$  cellules correspondent à la capacité d'une boîte de Petri de 35 mm.  $10^7$  cellules correspondent à la capacité d'une plaque contenant entre 6 ou 12 puits de culture. On peut donc évaluer que la production devient un défi à partir de  $10^9 - 10^{10}$  cellules. La méthode standard d'expansion cellulaire repose sur les cultures cellulaires en 2 dimensions. Le taux d'expansion n'y est pas seulement limité par la surface des flacons, mais aussi par des tâches laborieuses de replaquage et de sélection de colonies qui conduisent à une hétérogénéité inhérente et au manque de reproductibilité. Une meilleure production, moins coûteuse en temps et plus rentable peut être réalisée avec des systèmes de culture en suspension tels que les microporteurs [297] ou des cultures d'agrégats dans des bioréacteurs agités [298]. Des cellules individuelles, des agrégats cellulaires ou des cellules sur microporteurs enveloppées dans un gel permettent d'autres améliorations, notamment dans le but de protéger la cellule contre les forces de cisaillement en jeu dans les cultures agitées [299]. Dans tous les cas, les marqueurs de pluripotence sont conservés mais le taux d'expansion dépend des détails de la méthode à savoir si les cellules sont intégrées dans une structure ou en suspension, la nature de cette structure, la densité initiale de cellules, les stratégies d'ensemencement (cellule unique par rapport à des ensembles de cellules) et la composition du milieu de culture. Le développement des hPSCs entraîne la formation et la croissance de sphéroïdes qui peuvent atteindre une taille maximale d'environ 300  $\mu\text{m}$ , alors que les contraintes dues à la diffusion de l'oxygène et des nutriments conduisent à la formation de cœurs nécrotiques.

Dans un tout autre contexte, les hPSCs ont été utilisés pour étudier *in vitro* les programmes d'auto-organisation qui sont exécutés dans l'embryon *in vivo* [300] et pour générer des organoïdes dérivés de cellules souches de haute qualité [301]. Ces derniers sont des structures tridimensionnelles fabriquées *in vitro* utilisées comme modèle biologique pour étudier les organes correspondant [302]. Plusieurs travaux ont montré que les cellules souches pluripotentes s'auto-organisent en kystes rappelant l'étape de formation de l'épiblaste luminal (voir figure 5.1(c)) [303]. Les kystes sont des structures de cellules polarisées contenant une poche. Cette poche est appelée lumière et peut contenir un milieu liquide ou gazeux (par exemple dans le cas des kystes aériques pulmonaires [304]) par exemple. À partir d'un assemblage à deux cellules [305] ou d'un seul hPSC avec une structure d'apicosome périméridien [306], les hPSCs semblent être programmées pour former une lumière et donc des kystes lors de la croissance.

Il est *a priori* surprenant que les cultures en 3 dimensions des cellules souches pluripotentes forment des agrégats (c'est-à-dire des sphéroïdes simples, sans lumière) [298, 299, 307] alors qu'ils s'auto-organisent facilement en kystes dans des travaux orientés vers la biologie du développement pour des conditions apparemment similaires. Pierre Nassoy et l'équipe de Treefrog, avec qui nous collaborons, ont développé une technique microfluidique qui permet de faire croître et différencier des cellules souches pluripotentes dans des micro-compartiments perméables ou des capsules avec un environnement de type matrice extracellulaire utilisé en micro-ingénierie [175, 308]. Sa capacité de débit élevé rend l'approche *a priori* compatible avec une production massive requise en médecine régénérative. Cependant, étant donné que tous les micro-compartiments peuvent être manipulés et suivis individuellement, nos collaborateurs ont également étudié la morphologie au sein de capsules individuelles et suivi de la croissance de cultures de hiPSC à 3 dimensions à partir d'une densité cellulaire initialement faible (entre 1 et 10 cellules par capsule). Dans ce chapitre, nous montrons que la structure en 3 dimensions des agrégats hiPSCs commence en effet sous forme de kystes qui deviennent ensuite des épithéliums pseudo-stratifiés fermés autour d'une lumière lorsqu'ils grandissent.

Puisqu'il est maintenant reconnu que les signaux mécaniques sont des régulateurs importants de l'auto-organisation et du destin des tissus [301, 309, 310], nous avons étudié les mécanismes de cette croissance "morphodynamique" particulière.

Nous avons proposé un modèle morfo-élastique simple pour tenir compte de l'expansion radiale et de l'épaississement du kyste de l'épithélium. Nous avons démontré qu'un formalisme élastique non linéaire continu combiné à un taux de croissance constant dans le temps mais anisotrope dans l'espace est suffisant pour retrouver la dynamique de croissance d'un kyste sphérique non contraint avec un épaississement notable. L'expansion globale du kyste est quasi exponentielle dans le temps. Elle ne se produit qu'avec de très faibles contraintes mécaniques, jusqu'au contact avec la capsule conduisant à une compression du kyste. Ensuite, nous avons évalué la diminution de la croissance due à la contrainte radiale de compression selon le concept d'homéostasie et expliqué simplement le changement de dynamique observé dans tous les jeux de données expérimentaux. La dynamique a été testée de manière critique et validée à tout moment, même après la confluence. Notre approche démontre également que les contraintes internes augmentent considérablement au cours de l'étape post-confluence, créant une structure

multicouche, similaire à un agrégat à 3 dimensions. L'étude de la présence de contraintes élevées est pertinente, car il est supposé que les contraintes peuvent altérer le caractère souche des cellules en induisant des mutations ou une différenciation non souhaitées [311]. Ainsi dans les épithéliums, les contraintes de compression favorisent la différenciation des cellules souches basales [310, 312, 313].

Ces résultats suggèrent que le contrôle de contraintes mécaniques réduites pourrait être une nouvelle voie à explorer pour une amplification cellulaire plus efficace notamment lors de la production industrielle de cellules souches.

## 5.2 Résultats expérimentaux

Une suspension de hiPSCs est encapsulée dans des capsules creuses d'alginate, suivant un protocole décrit dans la Ref. [308]. Du fait que les hiPSCs ont tendance à subir de l'anoïkose (apoptose qui résulte de la perte de l'adhésion cellulaire à la matrice extra-cellulaire) et que l'alginate est un répulsif cellulaire, du Matrigel<sup>1</sup> est introduit dans la suspension, et joue le rôle de la matrice extra-cellulaire. Le Matrigel forme alors dans les capsules une couche de quelques micromètres d'épaisseur sur la paroi interne de l'alginate, à laquelle les hiPSCs peuvent adhérer.

En utilisant l'imagerie à contraste de phase<sup>2</sup>, il est observé que les hiPSCs, encapsulés dans des capsules individuelles, s'auto-organisent en kystes (donc en 3 dimensions) autour d'une lumière centrale. Leur croissance est suivie au microscope sur une période de près de deux semaines. La figure 5.2(d) présente des images instantanées de la croissance des kystes.

Trois régimes principaux sont observés. D'abord, tant que le kyste est plus petit que la capsule, dans un stade dit de pré-confluence, le kyste hiPSC se développe librement, en conservant sa forme sphérique et en s'épaississant, à la différence des kystes de lignées cellulaires épithéliales comme les cellules MDCK [314]. Lorsque le kyste commence à entrer en contact avec la capsule, environ 7 jours après l'observation initiale, il épouse la forme de la capsule, qui présente toujours une certaine déviation de la sphéricité, due aux imperfections lors de sa formation. Néanmoins, dans la suite, il sera supposé que la forme reste sphérique et on caractérisera sa taille avec un rayon effectif dérivé à partir de la mesure de la section transversale du kyste. La deuxième étape correspond à la confluence, lorsque le kyste est complètement contraint par la paroi interne de la capsule. Enfin, au stade post-confluent, le kyste est comprimé par la capsule élastique et se développe principalement vers l'intérieur jusqu'à ce que le contraste entre la lumière et l'épithélium soit perdu, suggérant qu'un agrégat sans lumière est formé. Dans ce qui suit, les données ne portent que sur une durée pendant laquelle la lumière centrale existe.

Les kystes hiPSC se développent en monocouche. En effet, au stade pré-confluent, la figure 5.2(b) montre que les kystes sont organisés comme un épithélium pseudo-stratifié (voir figure 5.2(c)), où, bien que les noyaux se trouvent à des positions différentes, toutes les cellules font le pont entre le pôle apical et la membrane basale. L'actine est marquée avec la phalloïdine<sup>3</sup>[315], et le noyau avec DAPI<sup>4</sup>. L'actine étant principalement localisée dans le cortex sous-membranaire, la coloration à la phalloïdine permet de délimiter les contours cellulaires.

Une coloration par deux principaux marqueurs de pluripotence SOX2 et OCT4<sup>5</sup>, permet de vérifier la constance du caractère souche pendant l'expérience. Au stade post-confluent, lorsque des forces mécaniques externes sont en jeu et pourraient avoir un impact sur la différenciation cellulaire [316], il est observé que toutes les cellules restent positives pour SOX2 et OCT4, indiquant que la pluripotence est conservée pendant les deux semaines de la croissance du kyste.

1. Le Matrigel est une préparation de membrane basale solubilisée extraite de cellules de sarcome murin de la tumeur EHS (Engelbreth-Holm-Swarm), qui se solidifie pour former une structure équivalente à une membrane basale en termes de composition, de structure et de propriétés physiques. Le terme "Matrigel" est un nom commercial et il est produit par la société Corning Life Sciences.

2. Terme générique pour toutes les méthodes d'imagerie qui peuvent être utilisées pour visualiser même de petites différences dans l'indice de réfraction d'un échantillon. De telles méthodes sont toujours utilisées lorsque l'échantillon ne présente pratiquement aucun contraste d'absorption. (<http://www.x-ray-optics.de>)

3. Toxine extraite de champignons et se liant à l'actine. Ses dérivés fluorescents sont utilisés en imagerie pour localiser l'actine.

4. Molécule fluorescente se liant aux bases adénine (A) et thymine (T) de l'ADN.

5. Facteurs de transcription fortement exprimés dans les hiPSCs.

La figure 5.3(a) donne le kymographe d'un kyste sur une période de 7 jours. La lumière, l'épithélium et la capsule d'alginate sont visibles. En particulier, la confluence peut être détectée à partir de la déformation de la capsule, qui se produit simultanément des deux côtés de la ligne pointillée. Après la confluence, l'épaisseur du kyste augmente de façon plus dramatique. On observe aussi que même dans le stade pré-confluence, le kyste s'épaissit. Afin de fournir une explication issue de la mécanique à la dynamique de cette croissance, les rayons externes et internes des kystes,  $r_o$  et  $r_i$ , sont mesurés. Les figures (5.3(c),5.3(d),5.3(e)) montrent des courbes représentatives des variations de  $r_i$  et  $r_o$ , de l'épaisseur du kyste  $h$ , et du volume du kyste en fonction du temps. Bien que la taille initiale du kyste et de la capsule puissent différer légèrement d'une capsule à l'autre, les dynamiques suivies sur une longue période (environ 2 semaines) sont fortement similaires. En partant d'un rayon initial de  $r_o \sim 50 \mu\text{m}$  et d'une épaisseur de  $h \sim 15 \mu\text{m}$ , la confluence est atteinte pour  $r_o \sim 150 \mu\text{m}$ , après 7 – 10 jours.

A ce dernier stade, le kyste a déjà atteint une épaisseur d'environ  $50 \mu\text{m}$ , indiquant que les cellules sont considérablement étirées pour couvrir les deux côtés de l'épithélium. A partir de la confluence, la croissance des kystes est ralentie en raison du confinement par l'enveloppe d'hydrogel dont le module d'Young est  $E_{alg} \sim 68 \text{kPa}$  [175] et l'épaississement du kyste augmente considérablement, conduisant potentiellement à une fermeture de la lumière. Ces observations peuvent expliquer pourquoi les cultures cellulaires en 3 dimensions d'hiPSCs conduisent parfois à des kystes ou à des agrégats, selon l'échelle de temps à laquelle ils sont considérés.

## 5.3 Croissance et élasticité des kystes

Nous proposons ici une description théorique de la croissance du kyste à l'intérieur d'une capsule d'alginate. Cette description couple la croissance aux contraintes mécaniques dans le kyste et dans le système kyste-capsule. Le modèle, adapté de la référence [317] calcule la croissance d'un kyste sphérique avec une lumière centrale à des instants discrets en supposant que les contraintes mécaniques s'équilibrent à chaque pas de temps.

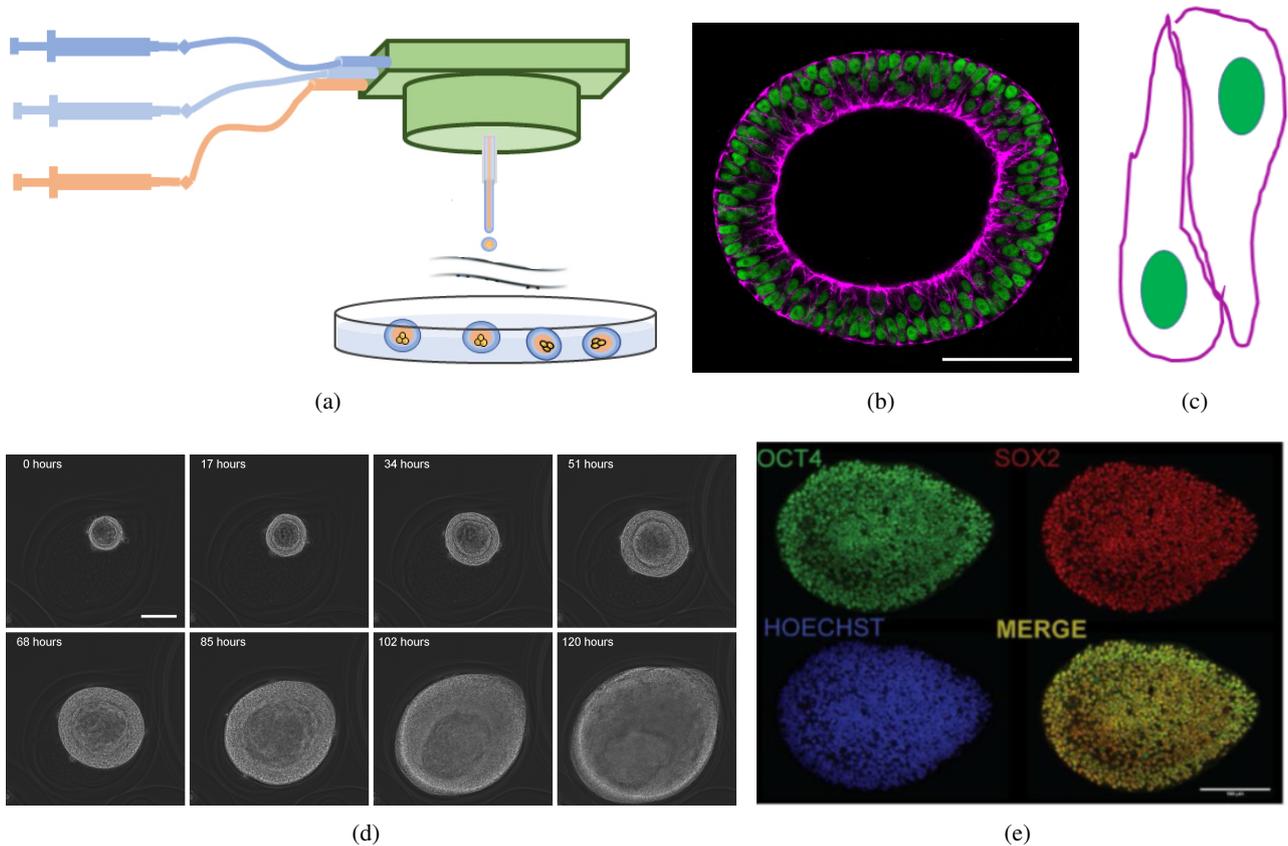
### 5.3.1 Dynamique de croissance anisotrope

On suppose qu'au cours du processus, seules l'élasticité et la prolifération des cellules régulent la dynamique du kyste. En morpho-élasticité, la croissance est représentée par un tenseur du second ordre, avec 3 valeurs propres dans des directions orthogonales. A un instant donné  $t$ , dans chacune de ces directions, la valeur propre  $\gamma_i$  représente l'élongation due à la croissance dans la direction  $i$  par rapport à l'état de référence à l'instant  $t = 0$  (voir figure 5.4). Si la symétrie sphérique du kyste est préservée pendant la croissance, les 3 directions propres sont la direction radiale  $r$  et les deux directions angulaires  $\theta$  et  $\phi$ , qui sont équivalentes de sorte que  $\gamma_\theta = \gamma_\phi$ . La croissance induit une déformation élastique du kyste caractérisée par les trois élongations élastique  $\alpha_i$ . Les gradients de déformation géométrique totale dans les 3 directions sont alors  $\alpha_r \gamma_r$  et  $\alpha_\theta \gamma_\theta = \alpha_\phi \gamma_\phi$ . Ces élongations donnent le changement de longueur d'un petit élément, dans la direction  $i$ , de taille  $dL_i$  dans l'état de référence, qui après une déformation pendant le temps  $t$  a une taille  $d\ell_i = \alpha_i \gamma_i dL_i$ .

De plus, l'incompressibilité est généralement supposée pour les tissus vivant [318]<sup>6</sup>, de sorte que toute augmentation ou diminution de volume n'est due qu'au processus de croissance et non à l'élasticité. Cette condition d'incompressibilité impose une relation entre les déformations élastiques :  $\alpha_r (\alpha_\theta)^2 = 1$ . Par conséquent, la seule inconnue restante est  $\alpha = \alpha_\theta = \alpha_r^{-1/2}$ . Le fait qu'un volume passe d'un volume initial  $V_i$  à un volume  $V_f$  est alors exprimé par  $J = V_f/V_i = \gamma_r \gamma_\theta^2$ . On définit également l'anisotropie de croissance comme  $\gamma = \gamma_r/\gamma_\theta$ . En principe, la croissance anisotrope reflète la structure du tissu, qui peut être due à l'orientation des fibres du cytosquelette cellulaire ; mais dans le kyste, l'anisotropie peut être dû aussi à l'arrangement des cellules due à leurs interactions.

La croissance du kyste résulte de la croissance de chaque cellule (puisque le volume de la cellule augmente pendant le cycle cellulaire avant division) et de la division cellulaire, qui sont plus lents que le réarrangement cellulaire et la mécanique de relaxation. Afin de calculer les déformations élastiques à chaque instant, le processus de croissance est divisé en pas de temps discrets de durée  $\delta t$ , qui couvrent ces trois étapes. Le processus de croissance est probablement de l'ordre de grandeur du temps de division cellulaire. Les gradients incrémentiels de déformation de croissance au cours du  $n$ ième pas de temps sont  $\gamma_r^0(n)$  et  $\gamma_\theta^0(n) = \gamma_\phi^0(n)$ . A un instant  $t = N\delta t$ ,

6. Néanmoins, il peut y avoir des déviations, voir par exemple [319] pour un cas *in vitro*.



**FIGURE 5.2 – Caractérisation de la croissance, de la morphologie et du caractère souche des kystes hiPSC encapsulés.** (a) : Dessin de l'encapsulation dans la plateforme microfluidique. Les trois solutions (solution d'alginate en bleu foncé, solution de sorbitol en bleu clair et mélange hiPSC/Matrigel en orange) sont injectés simultanément par ordinateur dans un appareil imprimé en 3 dimensions (en vert). Les gouttelettes composites formées lors de l'instabilité de Rayleigh tombent dans un bain de calcium et forment des capsules creuses emprisonnant les cellules. (b) : Image confocale du plan équatorial d'un kyste dont le noyau (DAPI en vert) et l'actine (phalloïdine en magenta) sont colorés. La barre d'échelle est de 100  $\mu\text{m}$ . (c) : Structure pseudo-stratifiée. Les cellules font le pont entre le pôle apical et la membrane basale et sont disposées tête-bêche. (d) : Images instantanées de kystes hiPSC se développant à l'intérieur d'une capsule d'alginate. L'intervalle de temps entre les images est de 17 h et la barre d'échelle est égale à 100  $\mu\text{m}$ . (e) : Images confocales de hiPSC encapsulées en stades tardifs ( $\sim 10$  jours après encapsulation) colorées pour deux marqueurs de caractère souche standard (OCT4 et SOX2) et le noyau (HOECHST).

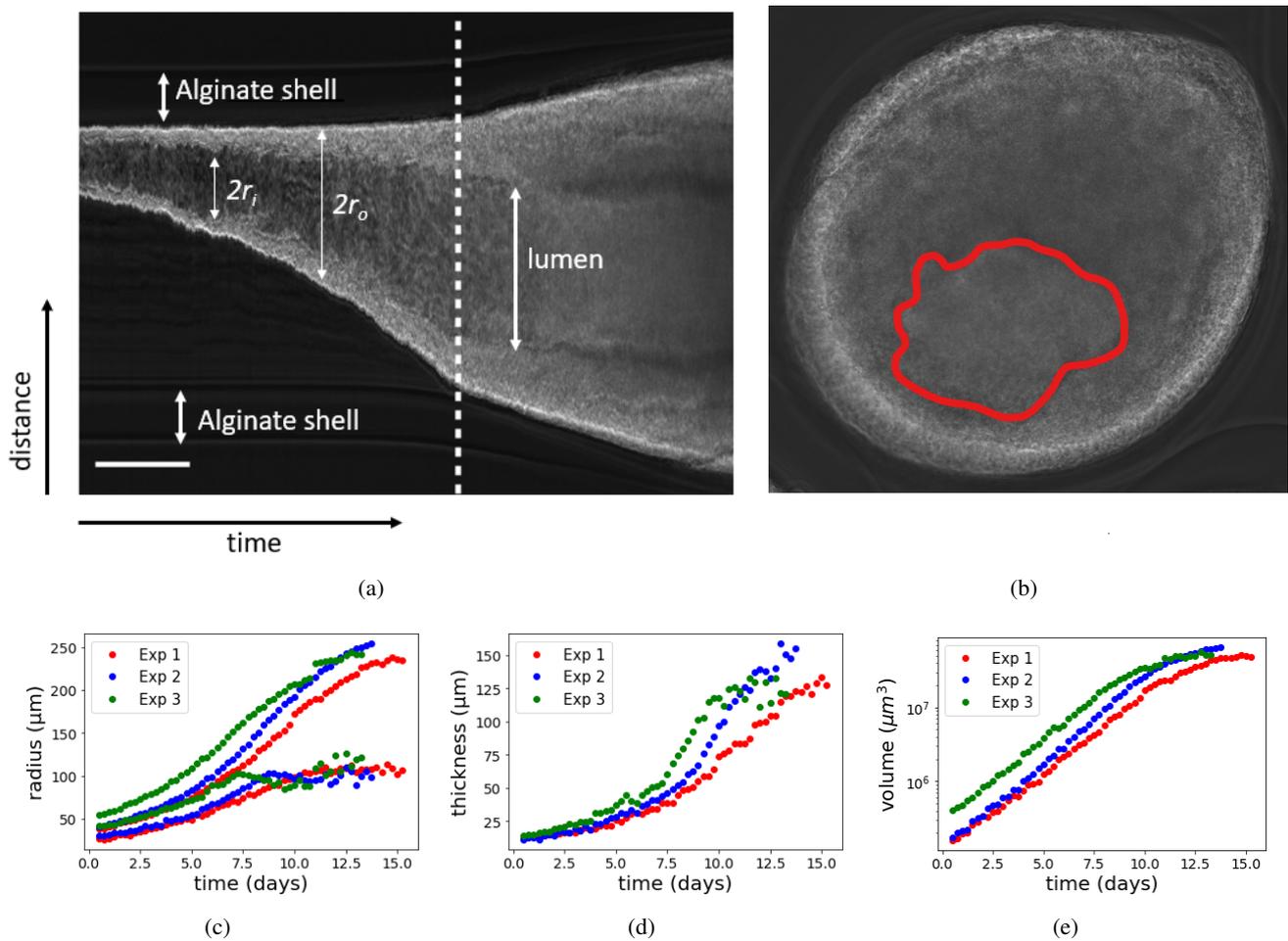


FIGURE 5.3 – **Évolution de la morphologie des kystes encapsulés en croissance.** (a) : Kymographe de la longueur en fonction du temps à travers un kyste hiPSC encapsulé. La ligne pointillée représente l'heure à laquelle la confluence est atteinte. La barre d'échelle correspond à 1 jour pour l'axe des abscisses et à  $100 \mu\text{m}$  pour l'axe des ordonnées. (b) : Image d'une instabilité de Biot à l'interface entre les cellules et la lumière. Le contour de l'instabilité est souligné en rouge. (c,d,e) : Données des valeurs des rayons interne et externe (c), des épaisseurs (d) et des volumes (e) de 3 kystes différents.

les valeurs propres du tenseur de croissance sont  $\gamma_i(t) = \prod_{n=1}^N \gamma_i^0(n)$ . Les taux de croissances  $k_i$  dans les trois directions sont définis comme  $k_i(t) = \partial_t \log \gamma_i(t)$ . Le taux de croissance du volume total est défini comme  $J = \gamma_r \gamma_\theta^2$ , et donc le taux de croissance du volume est  $k = k_r + 2k_\theta$  avec un temps de prolifération typique  $\tau = 1/k$ , et un temps de doublement  $\tau_d = \tau \ln(2)$ . Après un temps  $t = N\delta t$  les taux de croissance sont reliés aux gradients incrémentaux de la déformation due à la croissance par  $k_i = k_0 \log(\gamma_i^0(N))$  où  $k_0 = 1/\delta t$ . Si les facteurs de croissance incrémentaux sont constants dans temps et égaux à  $\gamma_r^0$  et  $\gamma_\theta^0$ , le taux de croissance est constant et les valeurs propres de la déformation due à la croissance augmentent de façon exponentielle avec le temps  $\gamma_i(t) = \exp(k_i t)$ . Dans ce cas, en utilisant les pas de temps discrets, après  $N$  temps pas, les gradients de déformation de croissance à un instant  $t$  sont  $(\gamma_r, \gamma_\theta) = ((\gamma_r^0)^N, (\gamma_\theta^0)^N)$ , l'anisotropie de croissance devient :  $\gamma(N) = (\gamma_r^0)^N / (\gamma_\theta^0)^N$  tandis que l'expression de la croissance totale du volume est  $J_N = \gamma_r \gamma_\theta^2 = (\gamma_r^0)^N (\gamma_\theta^0)^{2N}$ .

### 5.3.2 Morpho-élasticité d'une coque en croissance

La croissance anisotrope génère des déformations et des contraintes élastiques [317] : ceci constitue une caractéristique fondamentale de la morphogenèse et de l'embryogenèse. Ces quantités combinées à la géométrie du tissu expliquent la plupart des formes observées dans la nature telles que les formes du cortex cérébral [320], de l'intestin [321, 322], des algues [323], et des plantes [324, 325]. En effet, lorsque la croissance est suffi-

samment lente pour que l'élasticité domine, les tissus biologiques se déforment selon des règles simples : leurs formes minimisent une énergie élastique avec des contraintes données par les conditions aux limites [317, 326].

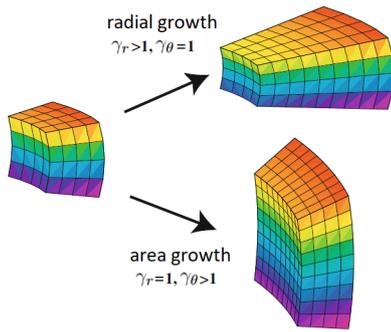


FIGURE 5.4 – Différence entre une croissance radiale due à  $\gamma_r$  et une croissance de surface due à  $\gamma_\theta$  (adapté de [326]).

Dans notre cas, les conditions aux limites imposent les valeurs de la contrainte normale aux surfaces intérieure et extérieure du kyste ou à l'interface entre le kyste et la capsule. Dans ce qui suit, nous faisons l'hypothèse importante que le kyste et l'alginate sont parfaitement poreux de sorte que tout flux liquide dû à des changements géométriques s'équilibre beaucoup plus rapidement que le processus de croissance lui-même. Par conséquent, la pression dans le fluide est constante à la fois à l'extérieur de la capsule, à l'intérieur de la capsule et dans la lumière du kyste, et cette constante est fixée à zéro. Ce choix est différent du modèle de Gin et al [327], qui considère une pression non négligeable dans la lumière et composée d'une pression osmotique et d'une pression élastique dans le cas d'un kyste de cellules MDCK. La référence [328] étudie aussi théoriquement l'évolution de kystes en supposant une différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur du kyste. La valeur de la pression à l'intérieur de la lumière peut-être mesurée [329], et les valeurs peuvent être très faibles

devant celles du module d'Young du tissu, ce qui justifie notre approche. La tension superficielle de la couche cellulaire s'annule donc dans ce modèle. Cela a pour effet l'annulation des contraintes normales interne et externe  $t_{r,i}$  et  $t_{r,o}$ . Les conditions aux limites sont donc  $t_{r,i} = t_{r,o} = 0$ .

On trouve alors la déformation élastique par minimisation de l'énergie élastique totale par rapport à la déformation circonférentielle  $\alpha$  ou de manière équivalente en écrivant le bilan des contraintes dans la direction radiale. L'énergie élastique totale  $\mathcal{E}$  est obtenue par intégration de la densité d'énergie hyperélastique  $\hat{W}$  sur le volume :

$$\mathcal{E} = 4\pi \int_{R_i}^{R_o} R^2 dR J \hat{W}(\alpha) \quad (5.1)$$

On utilise ici une description lagrangienne et  $R_i$  et  $R_o$  sont respectivement les rayons initiaux interne et externe du kyste. Dans une géométrie sphérique, le gradient de déformation est  $\alpha = r/(R\gamma_\theta)$ ,  $r$  étant le rayon dans la configuration courante de la sphère à l'intérieur du kyste, dont le rayon initial est  $R$ . On choisit le modèle Néo-Hookéen pour les matériaux incompressibles, qui est le modèle d'hyper-élasticité le plus simple. La densité d'énergie élastique du modèle Néo-Hookéen  $\hat{W}$  s'écrit :

$$\hat{W}(\alpha) = \frac{E}{6}(\alpha^{-4} + 2\alpha^2 - 3) \quad (5.2)$$

Le module d'Young du kyste  $E_{kyste}$  est inférieur au module d'Young de l'alginate  $E_{alg}$ . Contrairement au kyste, la capsule ne croît pas de sorte qu'à l'intérieur de la capsule  $\gamma_r = \gamma_\theta = \gamma = 1$ . En utilisant le bilan des contraintes radiales, on calcule la contrainte radiale de Cauchy [317] :

$$t_r - t_{r,i} = \int_{r_i}^r \frac{\alpha}{r} \partial_\alpha \hat{W} dr = \int_{\alpha_i}^\alpha \gamma \frac{\partial_\alpha \hat{W}}{\gamma - \alpha^3} d\alpha \quad (5.3)$$

Le modèle Néo-Hookéen donne :

$$t_r = \frac{E}{3} \left[ \frac{1}{2\alpha^4} + \frac{2}{\gamma\alpha} + \frac{(\gamma^2 - 1)}{3\gamma^{4/3}} \left\{ \log \left( \frac{\alpha(\alpha + \gamma^{1/3}) + \gamma^{2/3}}{(\alpha - \gamma^{1/3})^2} \right) - 2\sqrt{3} \tan^{-1} \left( \frac{2\alpha + \gamma^{1/3}}{\sqrt{3}\gamma^{1/3}} \right) \right\} \right]_{\alpha_i}^\alpha \quad (5.4)$$

où le crochet appliqué à toute fonction  $f$  donne sa variation  $[f(\alpha)]_{\alpha_i}^\alpha = f(\alpha) - f(\alpha_i)$ . La conservation du volume impose :

$$\alpha^3 = \gamma \left( 1 - R_i^3/R^3 \right) + \alpha_i^3 R_i^3/R^3 \quad (5.5)$$

L'équation (5.5) fournit la valeur du rayon externe du kyste à chaque pas de temps  $n$  pour une déformation interne donnée  $\alpha_i$ . Dans la phase pré-confluence de la croissance (Fig. 5.5(a),5.5(b)), la contrainte radiale de Cauchy aux

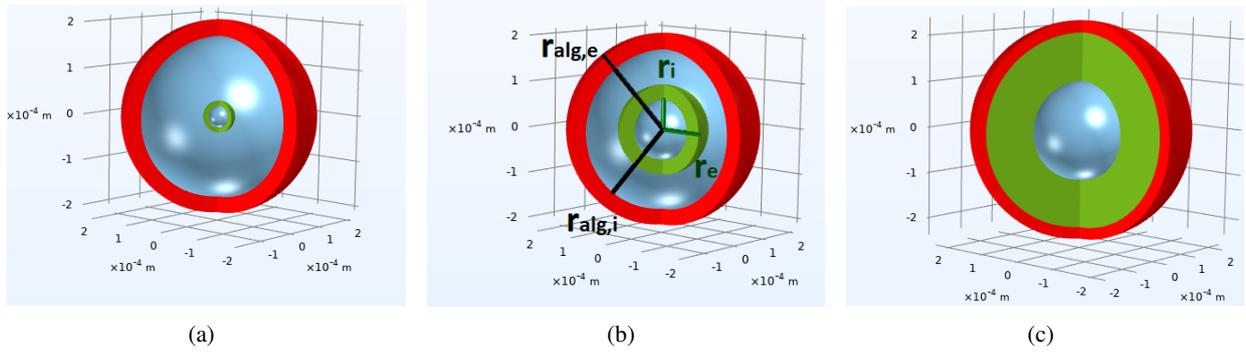


FIGURE 5.5 – **Schéma du système kyste-alginate.** (a) : Au temps  $t = 0$ . (b) : Pendant la croissance au stade pré-confluence. (c) : Après confluence. Le kyste est en vert et l'alginate en rouge, le bleu représente le fluide présent entre le kyste et l'alginate et dans la lumière.  $r_i, r_e, r_{alg,i}, r_{alg,e}$  correspondent respectivement au rayon interne du kyste, au rayon externe du kyste, au rayon interne de la capsule d'alginate et au rayon externe de la capsule d'alginate.

bords du kyste est égale à zéro et pendant cette période, la capsule n'est pas perturbée par la croissance du kyste. Après confluence (Fig. 5.5(c)), le kyste en croissance exerce une pression sur la capsule à  $R = R_o$  et la contrainte radiale s'annule à la surface externe de la capsule et à la surface interne du kyste. A l'interface kyste-capsule, la contrainte radiale est continue.

### 5.3.3 Contact avec la capsule

Dès que le kyste touche la capsule, la dynamique du kyste change brusquement, comme le montre les figures 1.3(c-e). Tout d'abord, le taux de croissance présente une diminution importante et le rayon interne semble saturer. Ces observations démontrent que la modélisation initiale doit être modifiée pour prendre en compte ce changement morphologique.

### Mécanique de l'ensemble kyste-capsule

A la confluence, on suppose que la limite externe du kyste et la limite interne de la capsule coïncident parfaitement et que la symétrie sphérique est maintenue. L'équation d'équilibre mécanique Eq. (5.3) est alors transformée en :

$$0 = \int_{\alpha_i}^{\alpha_o(\alpha_i)} \gamma \frac{\partial_{\alpha} \hat{W}_{cyst}}{\gamma - \alpha^3} d\alpha + \int_{\alpha_{i,alg}(\alpha_i)}^{\alpha_{o,alg}(\alpha_i)} \frac{\partial_{\alpha} \hat{W}_{alg}}{1 - \alpha^3} d\alpha \quad (5.6)$$

où nous avons séparé les apports du kyste et de la capsule.  $\hat{W}_{cyst}$  (resp.  $\hat{W}_{alg}$ ) est identique à  $\hat{W}$  défini dans Eq. (5.2) avec  $E = E_{cys}$  (resp.  $E = E_{alg}$ ). La déformation élastique circonférentielle  $\alpha_i$  est la valeur de la déformation prise à la surface interne du kyste,  $\alpha_o$  la déformation du kyste à l'interface entre le kyste et l'alginate,  $\alpha_{i,alg}$  la déformation à la surface interne de l'alginate, et  $\alpha_{o,alg}$  la déformation à sa surface externe. Toutes ces déformations peuvent être écrites en fonction de  $\alpha_i$  en utilisant les conditions d'incompressibilité valables pour les deux matériaux (Eq. (5.5)). Avant confluence, la déformation est  $\alpha = 1$  dans l'alginate et la seconde intégrale s'annule. Eq. (5.6) fournit la valeur de  $\alpha_i$ . Connaissant le gradient de déformation de croissance  $\gamma_{\theta}$ , il est possible de calculer le rayon interne dans l'état courant  $r_i = \alpha_i \gamma_{\theta} R_i$  à partir de la configuration de référence. La conservation du volume donne alors la valeur du rayon extérieur. Néanmoins, les résultats expérimentaux suggèrent que l'anisotropie de croissance  $\gamma$  ne poursuit pas sa croissance régulière. Il faut donc aussi modifier le modèle vis-à-vis de cette quantité.

### Evolution du taux de croissance : le concept d'homéostasie

Il est bien établi qu'il existe une rétroaction entre les contraintes mécaniques et la croissance des tissus vivants [326, 330, 331, 332]. La croissance est généralement inhibée en compression et favorisée en tension. Ce couplage entre croissance et mécanique peut expliquer la diminution de la croissance volumique du kyste détectée dans les expériences, Fig. 5.7(a), après son contact avec la capsule. En effet, la compression du kyste augmente du fait du contact avec la capsule.

Nous introduisons le couplage entre croissance et contrainte en écrivant qu'à chaque instant les gradients incrémentaux de déformation de croissance  $\gamma_r^0$  et  $\gamma_\theta^0$ , ou de manière équivalente, les taux de croissance  $k_r$  et  $k_\theta$  diminuent en présence de contraintes mécaniques compressives [333]. Pour des raisons de simplicité, nous proposons que les taux de croissance incrémentaux, qui sont des quantités tensorielles, dépendent linéairement du tenseur des contraintes. Par ailleurs, on effectue la moyenne des valeurs du tenseur des contraintes sur l'épaisseur et on itère le processus pas à pas [334]. On note les contraintes moyennes  $\langle t_r \rangle$  et  $\langle t_\theta \rangle$  pour les contraintes radiales et circonférentielles respectivement.

On choisit la correction la plus intuitive et la plus simple, qui est une dépendance linéaire des composantes du taux de croissance avec la contrainte radiale  $t_r$ , conduisant à :  $k_r = k_r^0 + k_r^1 \langle t_r \rangle$  et  $k_\theta = k_\theta^0 + k_\theta^1 \langle t_r \rangle$  où  $k_\theta^0, k_\theta^1, k_r^0, k_r^1$  sont des constantes positives (plus la contrainte radiale est compressive, plus les taux de croissance sont faibles). Après un temps  $t = N\delta t$ , les gradients de déformation de croissance s'écrivent  $\gamma_r(t) = e^{(k_r^0 t + k_r^1 \sum_{i=0}^{N-1} \langle t_r \rangle_i \delta t)}$  et  $\gamma_\theta(t) = e^{(k_\theta^0 t + k_\theta^1 \sum_{i=0}^{N-1} \langle t_r \rangle_i \delta t)}$ . Ce comportement peut s'expliquer par l'empilement de plus d'une couche cellulaire dans la direction radiale du kyste. La correction du tenseur de croissance étant un tenseur du second ordre, de nombreuses autres formulations sont alors possibles et testées, mais donnent des résultats moins satisfaisants.

On considère d'abord des taux de croissance constants :  $k_\theta = k_\theta^0, k_r = k_r^0$ . Une possibilité raffinée est une dépendance linéaire des taux de croissance par rapport à la pression moyenne  $k_\theta = k_\theta^0 + k_\theta^1 \langle P \rangle, k_r = k_r^0 + k_r^1 \langle P \rangle$ , où  $P = -(t_r + 2t_\theta)/3$ . Cette dernière donne une assez bonne description des expériences mais à long terme, le taux de croissance en volume  $k = k_r + 2k_\theta$  et donc le taux de croissance en volume incrémental atteignent un plateau, alors que dans les expériences il continue à décroître. Un comportement similaire est observé pour une dépendance à la contrainte orthoradiale. Les résultats sont présentés dans la figure 5.6. On choisit donc une variation des taux de croissance avec la contrainte radiale qui conduit à une diminution des taux de croissance pendant toute la durée de la phase de confluence (Fig. 5.6(c)).

Une erreur  $\epsilon$  est calculée afin de quantifier l'adéquation du modèle théorique aux expériences :

$$\epsilon = \frac{1}{3} \sum_{j=1}^3 \frac{1}{2\mathcal{N}_j} \sqrt{\sum_{k=1}^{\mathcal{N}_j} \left[ \left( r_{j,k}^{th,o} - r_{j,k}^{exp,o} \right)^2 + \left( r_{j,k}^{th,i} - r_{j,k}^{exp,i} \right)^2 \right]} \quad (5.7)$$

où  $j$  est le numéro de l'expérience (Exp 1-2-3),  $\mathcal{N}_j$  est le nombre de points expérimentaux dans cette expérience. Il y a  $\mathcal{N}_j$  points expérimentaux indexés par  $j, k$  pour le rayon externe du kyste  $r_{j,k}^{exp,o}$ , et  $\mathcal{N}_j$  points expérimentaux pour le rayon interne du kyste  $r_{j,k}^{exp,i}$ . Ces points correspondent aux points  $r_{j,k}^{th,o}$  et  $r_{j,k}^{th,i}$  dans le modèle théorique. Dans le cas où il n'existe pas de dépendance aux contraintes :  $\epsilon = 3.12$ , s'il existe une dépendance en  $P$  :  $\epsilon = 1.13$ , et pour la dépendance en  $t_r$  :  $\epsilon = 0.80$ .

### Application du modèle aux agrégats

Notre modèle s'applique également aux agrégats en croissance mais dans ce cas la géométrie parfaite du sphéroïde ne peut pas être maintenue en croissance anisotrope [326, 335]. En pratique cependant, les nutriments ne pénètrent pas complètement à l'intérieur du sphéroïde au-delà d'une longueur typique appelée longueur de pénétration [26, 336] et un anneau de cellules vivantes pour lesquelles la croissance est inexistante peut apparaître à l'intérieur de l'anneau de cellules proliférantes lorsque le rayon d'agrégat est supérieur à cette longueur de pénétration  $l_n$ . Par ailleurs, un cœur nécrotique peut-aussi apparaître en cas de forte hypoxie par exemple. Le même

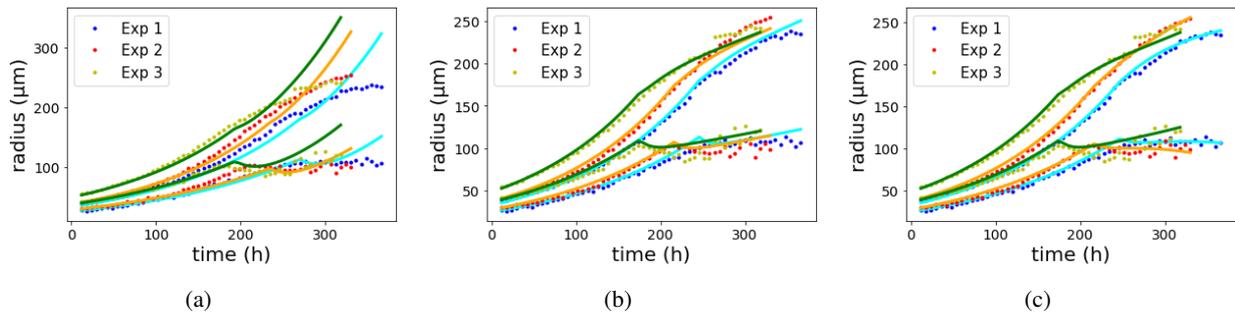


FIGURE 5.6 – *Ajustement des rayons du kyste au modèle.* **(a)** : Les taux de croissance sont constants dans le temps :  $\epsilon = 3.12$ . **(b)** : Les taux de croissance dépendent de la pression moyenne dans le kyste :  $\epsilon = 1.13$ . **(c)** : Les taux de croissance ont une dépendance linéaire de la contrainte radiale moyenne dans le kyste :  $\epsilon = 0.80$ .

modèle est donc applicable dans ce cas, en supposant une surface externe libre mais en imposant la continuité de la contrainte normale à l'interface fictive interne donnée par la longueur de pénétration et séparant les différentes zones de l'agrégat. Cette condition explique que la taille du noyau nécrotique augmente également avec le temps comme cela se produit pour le kyste. La principale différence vient du processus de croissance lui-même qui n'est pas homogène puisque seule la couche extérieure est en contact avec la source de nutriments. Une telle modélisation de la croissance a été étudiée dans la géométrie sphérique avec une croissance inhomogène mais isotrope dans Ref. [335] pour montrer que des contraintes sont générées dans le bord proliférant, de l'ordre de la longueur de pénétration, et que leur amplitude s'avère être plusieurs fois supérieure à la rigidité de cette couche. Ces contraintes soit radiales, soit circonférentielles sont dues dans ce cas à une croissance inhomogène, qui augmente du bord interne de l'anneau proliférant au bord externe de l'agrégat.

### Flambage

Une autre conséquence de l'augmentation des contraintes due à la croissance est une instabilité de flambage se produisant à la surface libre de l'agrégat. Cette instabilité décrite par Biot [337] dans le cadre de couches élastiques en compression résulte d'une brisure de symétrie qui minimise légèrement l'énergie élastique à une valeur critique  $J_B$  de la croissance volumétrique. Évidemment, la valeur  $J_B$  dépend de la géométrie initiale, et des conditions de croissance : homogénéité et/ou anisotropie et conditions aux limites. Dans le cas d'une surface plane, la valeur critique est de  $J = 3.38$ . Cette valeur est proche de celle trouvée dans notre cas entre le moment où l'instabilité apparaît (300 h) et le moment où les contraintes apparaissent (200 h), avec  $J = 3.55$  (voir la courbe bleue dans la figure 5.8(d)).

## 5.4 Comparaison du modèle théorique avec les données expérimentales

Notre modèle mécanique nécessite la connaissance des valeurs des paramètres physiques et biologiques du kyste et de la capsule d'alginate : les modules de Young du kyste et de l'alginate, les taux de croissance radiale et orthoradiale, ainsi que la sensibilité des taux de croissance aux contraintes mécaniques. Les paramètres élastiques ou de croissance sont inconnus pour le kyste, le rapport entre  $E_{alg}/E_{kyste}$ ,  $\gamma_r^0$  et  $\gamma_\theta^0$  ainsi que les facteurs correctifs de dépendance de la croissance aux stress. Nous considérons que les expériences fournissent les tailles initiales avec assez de précision : rayons externes et internes du kyste, rayon et épaisseur de la capsule. Notre traitement analytique fournit des valeurs explicites des contraintes, des déformations en fonction du temps et des rayons externes du kyste en fonction des inconnues. La comparaison avec les mesures expérimentales montrées dans la Fig. 5.3 permet d'inférer les paramètres élastiques et biologiques inconnus.

La figure 5.7 affiche une comparaison entre les ensembles de données pour les 3 différentes expériences et les courbes théoriques obtenues en utilisant le meilleur choix de paramètres. L'accord entre la théorie et l'expérience est satisfaisant. Dans tous les cas, la capsule a une épaisseur :  $\ell = 35 \mu\text{m}$  et la confluence se produit à  $t \approx 210 \text{ h}$ , qui correspond à un rayon interne de l'alginate  $R_{i,alg} = 170 \pm 10 \mu\text{m}$ . Comme observé sur la figure 5.7(a), les

Experiment	Exp 1	Exp 2	Exp 3
$E_{cyst}$ (kPa)	11.3	11.3	8.5
$k_r^0$ ( $10^{-3} \text{ h}^{-1}$ )	8.9	9.08	8.95
$k_\theta^0$ ( $10^{-3} \text{ h}^{-1}$ )	6.7	6.75	6.85
$k_r^1$ ( $10^{-3} \text{ Pa}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	4	1	5
$k_\theta^1$ ( $10^{-3} \text{ Pa}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	5	4.4	3

TABLE 5.1 – Tableau des valeurs des paramètres obtenues à partir de la comparaison du modèle avec les trois différentes expériences montrées dans la Fig. 5.7

taux de croissance changent de manière significative après la confluence entre le kyste et la capsule.

La figure 5.7(b) présente la comparaison des résultats théoriques pour les rayons extérieurs et intérieurs du kyste au cours du temps avec les différents ensembles de données expérimentales. On peut estimer les modules d'Young des kystes dans les deux expériences par comparaison du modèle avec les trois expériences différentes :  $E_{cyst} = 9.9 \pm 1.4 \text{ kPa}$ . Cette valeur est du même ordre de grandeur que les mesures précédentes sur des monocouches cellulaires de cellules MDCK, pour lesquelles le module de Young était de  $20 \pm 6 \text{ kPa}$  [338, 339].

Les valeurs obtenues pour  $k_r$  et  $k_\theta$  sont différentes, indiquant une anisotropie de croissance. Néanmoins, la croissance est plus isotrope avant confluence qu'après confluence, résultant en une relation entre  $r_i$  et  $r_o$  qui est presque linéaire (Fig. 5.7(c)) puisque  $\alpha = r/(R\gamma_\theta)$  et  $\alpha^{-2} = (dr/dR)/\gamma_r$ . Le gradient de déformation est également proche de l'unité avant confluence (Fig. 5.8(a)).

La Fig. 5.7(d) montre l'évolution dans le temps de la contrainte radiale ( $t_r$ )<sup>o</sup> prise à la surface externe du kyste (qui correspond avant confluence à l'interface avec le milieu externe et après confluence à l'interface avec l'alginate), la contrainte radiale moyenne dans le kyste  $\langle t_r \rangle$ , la contrainte circonférentielle moyenne  $\langle t_\theta \rangle$ , et moins la pression moyenne  $\langle -P \rangle$  dans le kyste. Toutes les contraintes sont normalisées par le module de Young du kyste  $E_{kyste}$ . La contrainte circonférentielle moyenne est modérément en tension avant la confluence et fortement en compression après la confluence. Fait intéressant, à la fin de l'expérience, la compression se relâche légèrement. La pression moyenne atteint également une valeur limite à la fin de l'expérience. La contrainte radiale moyenne est toujours compressive, et continue de décroître à la fin de l'expérience. La contrainte radiale à la surface externe du kyste vers la capsule disparaît avant la confluence puisqu'aucune compression n'est appliquée sur le kyste. Après confluence, elle devient très compressive, et agit comme une pression externe  $P > 0,5 E_{kyste}$  à la fin de l'expérience.

Enfin, une autre caractéristique typique de la morpho-élasticité est le flambement de surface pour la croissance orientée, qui se produit pour des valeurs suffisamment grandes de l'allongement. En effet, la croissance orientée, du fait des contraintes aux limites ou de l'anisotropie, génère des contraintes de compression dans la direction où la déformation est la plus compressive. Dans notre cas, la contrainte de compression est dans la direction orthoradiale où  $\alpha < 1$  (voir Fig. 5.8(a)). Cette brisure de symétrie a été expliquée pour la première fois par Biot [337]. Elle est observée sur la Fig. 5.2(d), 5.3(b) à la fin de l'expérience pour  $t > 315 \text{ h}$ . La contrainte radiale de Cauchy  $t_r$  à l'interface kyste/alginate agit comme une pression  $P \sim 0.5 E_{kyste}$  appliquée à  $R_o$ . Le rapport d'anisotropie de croissance  $\gamma \sim 3$  (Fig. 5.8(d)) et la déformation élastique orthoradiale interne  $\alpha \sim 0.65$  (Fig. 5.8(a)) indiquent une contrainte de compression sur la surface interne. Comme expliqué plus haut, l'instabilité de surface, qui apparaît sur la surface interne du kyste, est cohérente avec les valeurs de la contrainte trouvées dans l'étude de la bifurcation de la coquille réalisée [317] dans le cas de coquilles épaisses et de faible nombre d'oscillations.

## 5.5 Conclusions

Les agrégats d'hiPSCs formés dans les dispositifs d'ingénierie biomédicale contrastent avec l'auto-organisation en kystes de ces cellules rapportée en biologie du développement. En créant une niche de cellules souches dans des capsules chargées de très peu de hiPSC et en les imageant sur de longues périodes, nous avons résolu cette contradiction. Nous avons constaté que les hiPSC forment initialement des kystes qui se développent et s'épaississent,

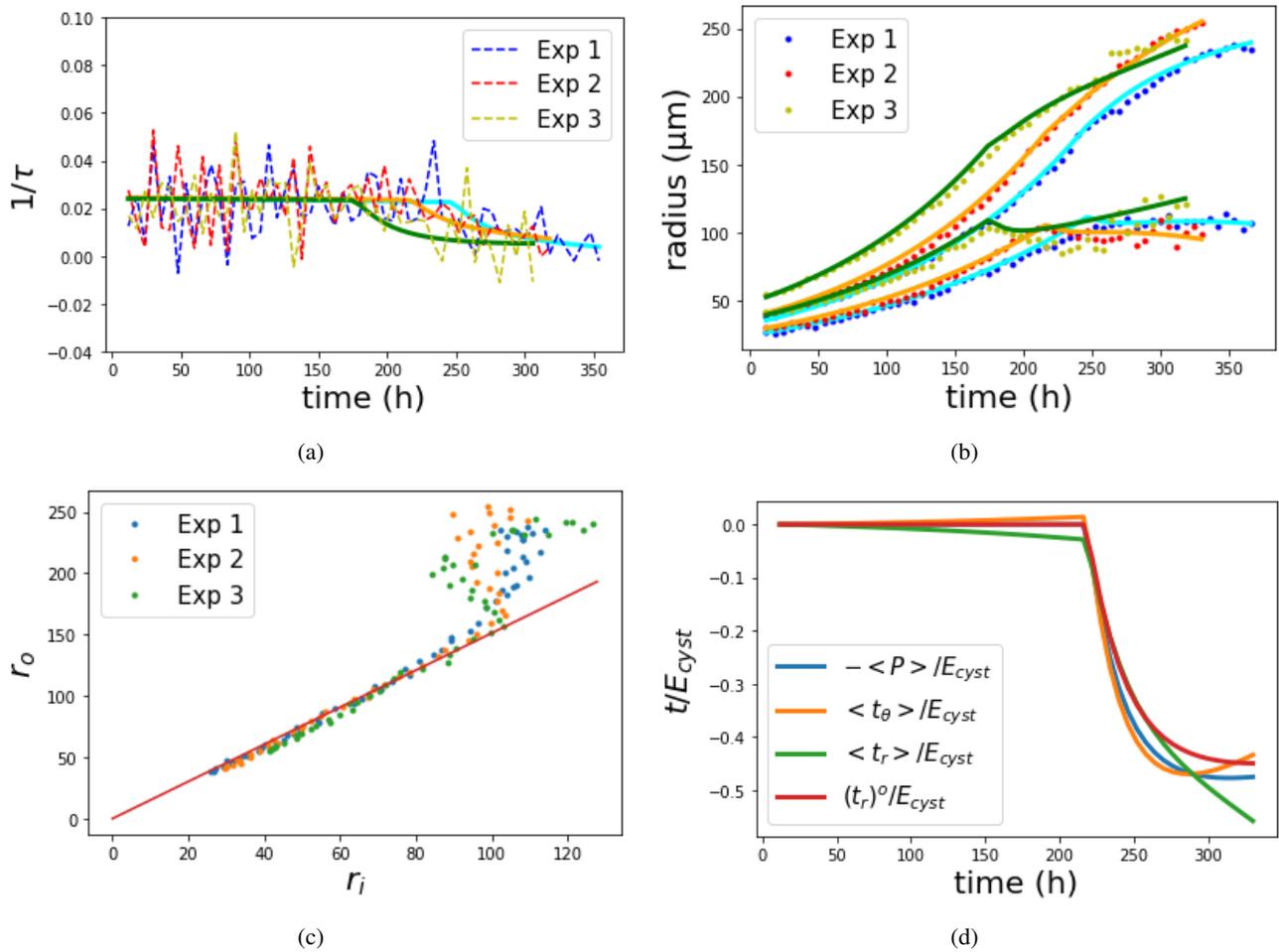


FIGURE 5.7 – Comparaison des résultats théoriques avec 3 jeux de données expérimentales. (les points et les lignes pointillées sont les données expérimentales, et les lignes continues sont obtenues par le présent modèle). **(a)** : Evolution des taux de croissance du volume avec le temps. La confluence ne se produit pas en même temps pour les différentes expériences. La valeur du taux de croissance du volume en l'absence de contrainte est  $k_0 = 1/\tau = (2.41 \pm 0.03) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Cela correspond à un temps de doublement :  $\tau_d = 28.7 \pm 0.3 \text{ h}$ . **(b)** : Rayons intérieur et extérieur à partir des données expérimentales (points) et des courbes théoriques (lignes). Les valeurs des différents paramètres dérivés sont indiquées pour les trois expériences dans le tableau 1. **(c)** : Rayon extérieur contre rayon intérieur. Avant confluence, la relation entre les rayons extérieur et intérieur est presque linéaire en raison de la faible interaction entre élasticité et croissance :  $r_o \approx (R_o/R_i) \times r_i \approx 1.5 \times r_i$ . **(d)** : La contrainte radiale moyenne, la contrainte circonférentielle moyenne et l'invariant de contrainte moyenne  $\langle t_r \rangle$ ,  $\langle t_\theta \rangle$ ,  $-\langle P \rangle$  ainsi que la contrainte radiale à la surface externe  $(t_r)_o$  normalisée par  $E_{cyst}$ .

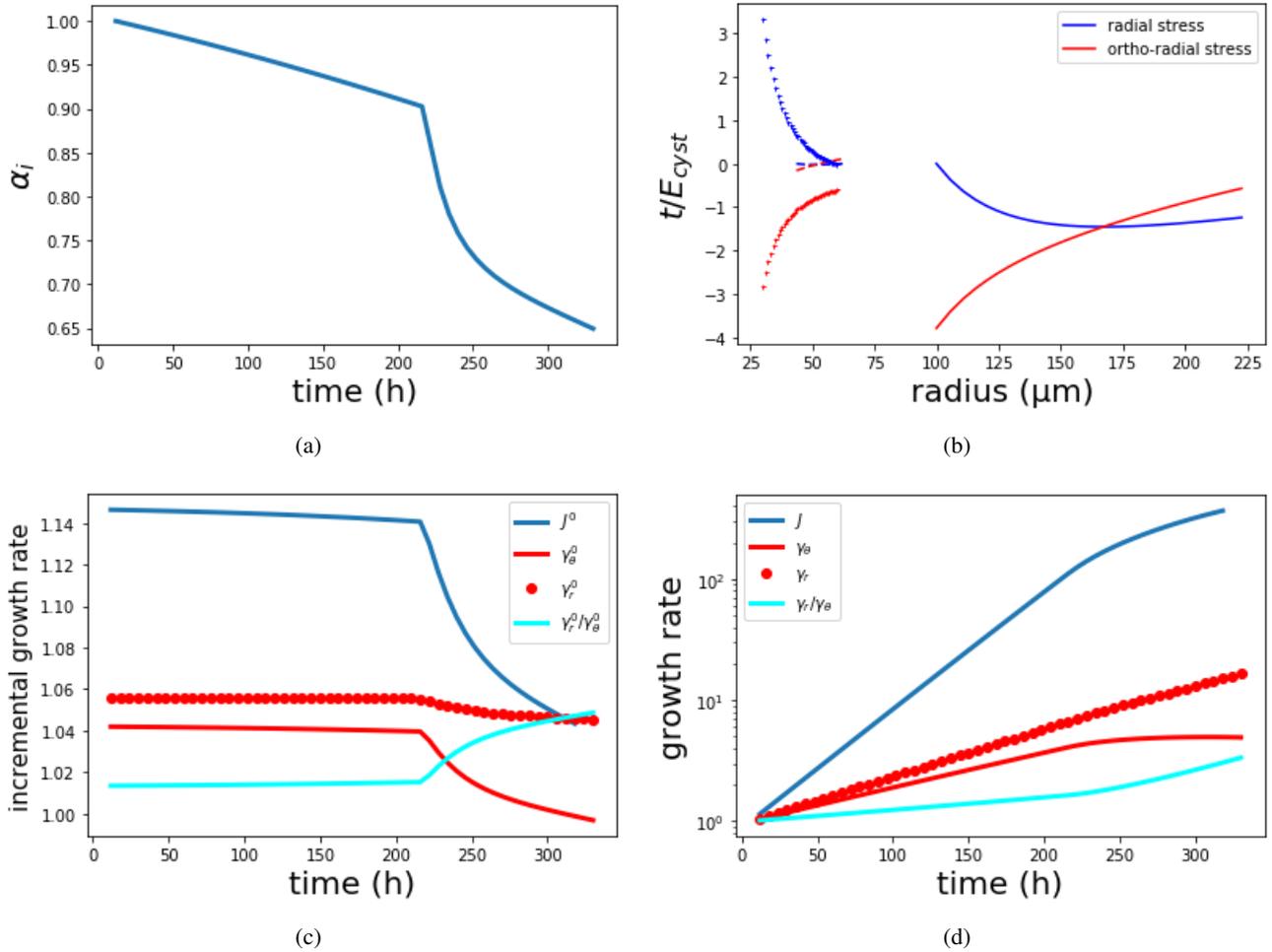


FIGURE 5.8 – *Évolution temporelle de plusieurs quantités théoriques dans l'Expérience 2. (a) : Évolution du gradient de déformation élastique angulaire à la surface interne du kyste  $\alpha_i$ . (b) : Contraintes théoriques locales normalisées par le module d'Young du kyste, projetées sur la configuration actuelle du kyste, avant confluence - à 3 jours (lignes pointillées), et après confluence - à 13 jours (lignes continues). En rouge les contraintes orthoradiales et en bleu les contraintes radiales. Les croix rouges et bleues correspondent aux valeurs théoriques des contraintes dans un agrégat à noyau solide suivant les mêmes lois d'élasticité et de croissance que le kyste, à 3 jours. L'agrégat présente des contraintes beaucoup plus élevées que le kyste à un temps équivalent. (c,d) : Evolution des différentes variables de croissance incrémentale (c) et totale (d)  $J = \gamma_\theta^2 \gamma_r$ ,  $\gamma_\theta$ ,  $\gamma_r$ ,  $\gamma = \gamma_r/\gamma_\theta$  avec le temps.*

deviennent des épithéliums pseudo-stratifiés et finalement remplissent tout le volume de la capsule. La configuration du kyste permet le même accès direct aux nutriments pour chaque cellule. Ceci est très différent de ce qui se passe dans les agrégats cellulaires. Cela conduit à une croissance homogène avec de faibles contraintes élastiques. En général, l'inhomogénéité de croissance due à l'accès aux nutriments est une source majeure de contraintes dans la croissance en volume. Les cellules n'étant soumises à aucune contrainte mécanique importante, elles conservent leur caractère souche et leur polarisation. Nous avons démontré que les contraintes augmentent lentement au cours de l'évolution du kyste en raison des effets de croissance anisotropes. Les stades tardifs de croissance, également associés au contact avec la capsule, présentent des contraintes plus importantes qui peuvent affecter le devenir des hiPSCs, par exemple en déclenchant une différenciation incontrôlée ou en induisant des mutations qui affectent la qualité phénotypique et génotypique globale de ces cellules souches pour des applications en médecine régénérative. Ce travail suggère que l'optimisation de la production industrielle nécessiterait un contrôle temporel précis de la croissance afin de savoir précisément quand l'arrêter avant de passer les cellules souches. À cette fin, la construction d'un modèle mécanique minimal qui décrit de manière précise et quantitative la dynamique de croissance de ces kystes fournit une approche prédictive qui pourrait permettre d'adapter les approches empiriques actuelles.

Par ailleurs, il existe plusieurs suites possibles de ce travail. Tout d'abord, on pourrait analyser de façon plus profonde encore l'effet des contraintes mécaniques sur le caractère souche. Il pourrait être intéressant de contrôler d'autres marqueurs du caractère souche, par exemple NANOG. Il pourrait être aussi intéressant d'étudier la perte du caractère souche à des temps plus tardifs, ou à des niveaux de contraintes plus élevées. Enfin, afin de valider complètement les hypothèses de départ concernant la pression à l'intérieur de la lumière, il serait intéressant de mesurer cette quantité. S'il s'avère qu'elle est non négligeable, un modèle plus raffiné tenant compte des mécanismes sous-jacents pourraient être imaginé. D'autres suites possibles sont développées en appendice.

## ANNEXES

Trois sujets ont été partiellement traités concernant les kystes, et n'ont pas été achevés. Nous les présentons dans cette annexe au chapitre. Par ailleurs, le modèle de Potts qui a été utilisé dans deux de ces sujets est abordé.

### Annexe 5.A Fracture de l'alginate

Lorsque le kyste croît après confluence, il exerce des contraintes sur l'alginate, qui vont en augmentant. Par ailleurs, la capsule d'alginate peut avoir des défauts, survenus lors de sa fabrication. La conjonction de l'atteinte d'un certain seuil de contrainte et de l'existence de ce défaut entraîne la fracture de la capsule. La mécanique de la fracture inventée par Griffith adresse justement le problème de la croissance d'un défaut dans un matériaux fragile.

Le critère de Griffith pour l'alginate s'écrit [340] :

$$\sigma_c = \sqrt{\frac{2E_{alg}\Gamma_c}{\pi\delta}} \quad (5.8)$$

avec  $\sigma_c$  la contrainte critique pour la fracture,  $E_{alg}$  le module élastique de l'alginate,  $\Gamma_c$  le taux de libération d'énergie par unité de surface de fracture, et  $\delta$  la taille du défaut préexistant à partir duquel la fracture se forme. Dans notre cas,  $E_{alg} = 68 \text{ kPa}$ . La valeur de  $\Gamma_c$  est de l'ordre de  $1 - 10 \text{ J.m}^{-2}$  pour les matériaux fragiles [341, 342].

Il est possible d'effectuer une évaluation de  $\Gamma_c$  à partir de l'expérience. On suppose que l'énergie dissipée par la fracture est de l'ordre de l'énergie de déformation contenue dans le matériau avant rupture. Cela correspond à :  $\Gamma_c = W/S$  avec l'énergie élastique totale de déformation  $W = E_{alg}/6(\alpha^{-4} + 2\alpha^2 - 3) \times V$  où  $V$  est le volume de la capsule, et  $S$  est la surface de la fracture. La surface de la fracture  $S$  correspond à peu près à la différence de surface entre l'état déformé juste avant fracture et l'état initial. Pour la capsule, on a donc :  $S = 4\pi R_0^2(\alpha^2 - 1)$  avec  $R_0$  le rayon intérieur moyen de la capsule d'alginate. D'après les informations transmises par nos collaborateurs, il est observé que la fracture arrive à  $\alpha \sim 1.25$  environ, ce qui correspond bien à la valeur indiquée dans la littérature [343]. Il ressort :  $\Gamma_{c,evaluation} \sim 0.5 \text{ J.m}^{-2}$  ce qui est un peu inférieur à ce qu'on attendrait.

On calcule maintenant la contrainte critique. En prenant  $\delta = h$  l'épaisseur initiale du kyste qui est la valeur caractéristique la plus basse dans l'expérience, on obtient :  $\sigma_c = 110 \text{ kPa}$  en utilisant  $\Gamma_c$ . En revanche, en utilisant  $\Gamma_{c,evaluation}$ , on obtient  $\sigma_{c,evaluation} = 25 \text{ kPa}$ . La valeur de la contrainte radiale au bord du kyste à la fin de l'expérience trouvé par le calibrage du modèle théorique avec l'expérience est d'environ :  $10 \text{ kPa}$  dont l'ordre de grandeur est cohérent avec la valeur de  $\Gamma_{c,evaluation}$ .

### Annexe 5.B Apparition de lumières secondaires en cours de croissance

Les kystes en croissance libre atteignent une certaine taille avant qu'une déstabilisation de la structure apparaisse du fait de l'apparition de lumières secondaires qui ne coalescent pas avec la lumière centrale. Cette déstabilisation n'est pas reliée à l'instabilité de Biot observée plus haut. Les mécanismes sous-jacents à ces observations ont été traités dans un contexte similaire par Cerruti et al [73]. Ici, nous essayons de raffiner la dépendance temporelle du modèle de Potts construit dans cette référence, et présenté au paragraphe 5.D.

Nous supposons que l'instabilité apparaît quand l'axe de division des cellules devient parallèle à la surface du lumen. Ainsi de nouvelles petites lumières sont emprisonnées dans le kyste (figure 5.9(c)). Cette modification de l'axe de division apparaît quand les contraintes mécaniques orthoradiales sur les cellules sont trop fortes.

La figure 5.9 compare les résultats issus de l'expérience et des résultats préliminaires provenant des simulations.

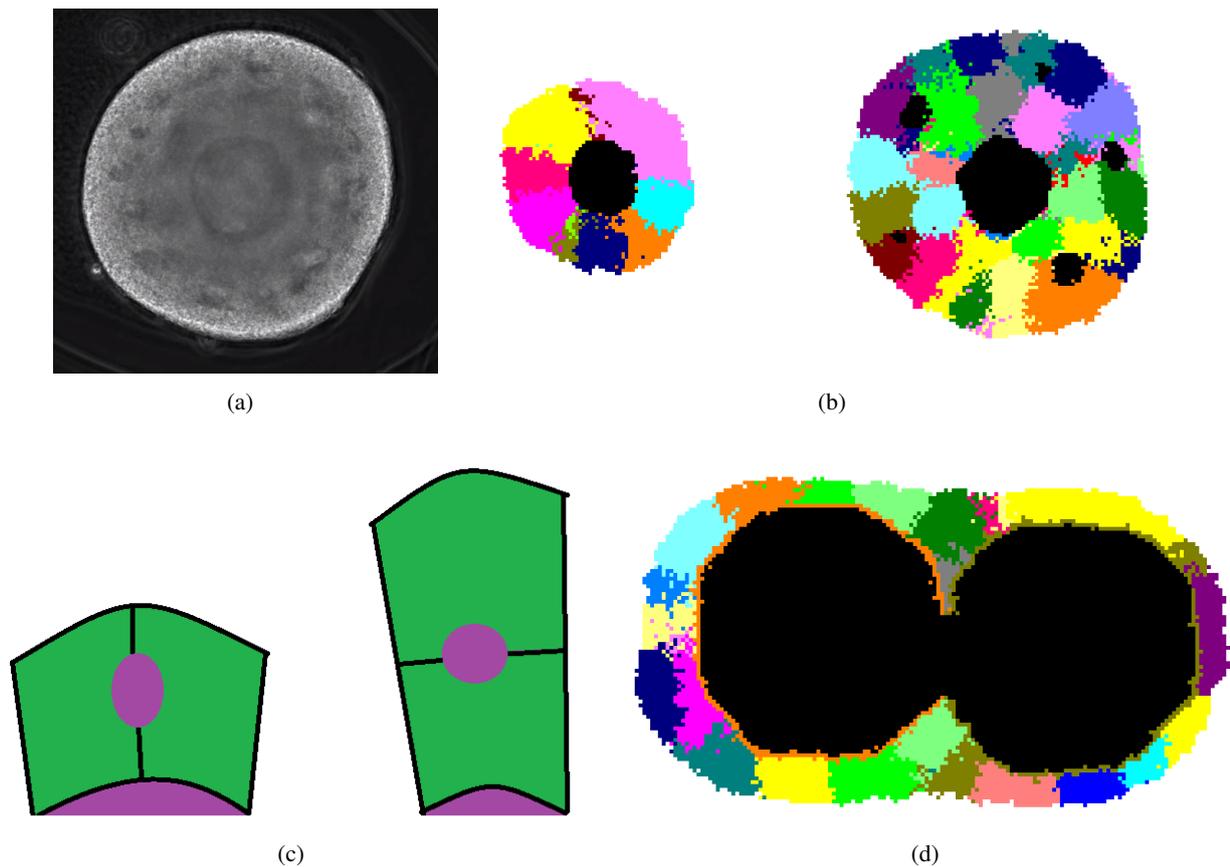


FIGURE 5.9 – **(a),(b)** : Comparaison des motifs obtenus dans l'expérience **(a)** et dans les simulations **(b)**. Dans les simulations, on montre deux instants de la croissance, un à un temps précoce où seule une lumière existe, et un autre instant pour lequel des lumières secondaires sont apparues. On observe une apparition de lumières secondaires au milieu de l'épaisseur de l'agrégat. **(c)** : Les lumières sont représentées en violet et les cellules en vert. La lumière centrale est située sous les cellules. La lumière qui est apparue entre les deux cellules est emprisonnée dans l'image de droite mais est libre de se déplacer le long des membranes des cellules vers la lumière centrale à gauche. **(d)** : Coalescence de kystes en utilisant le modèle de Potts.

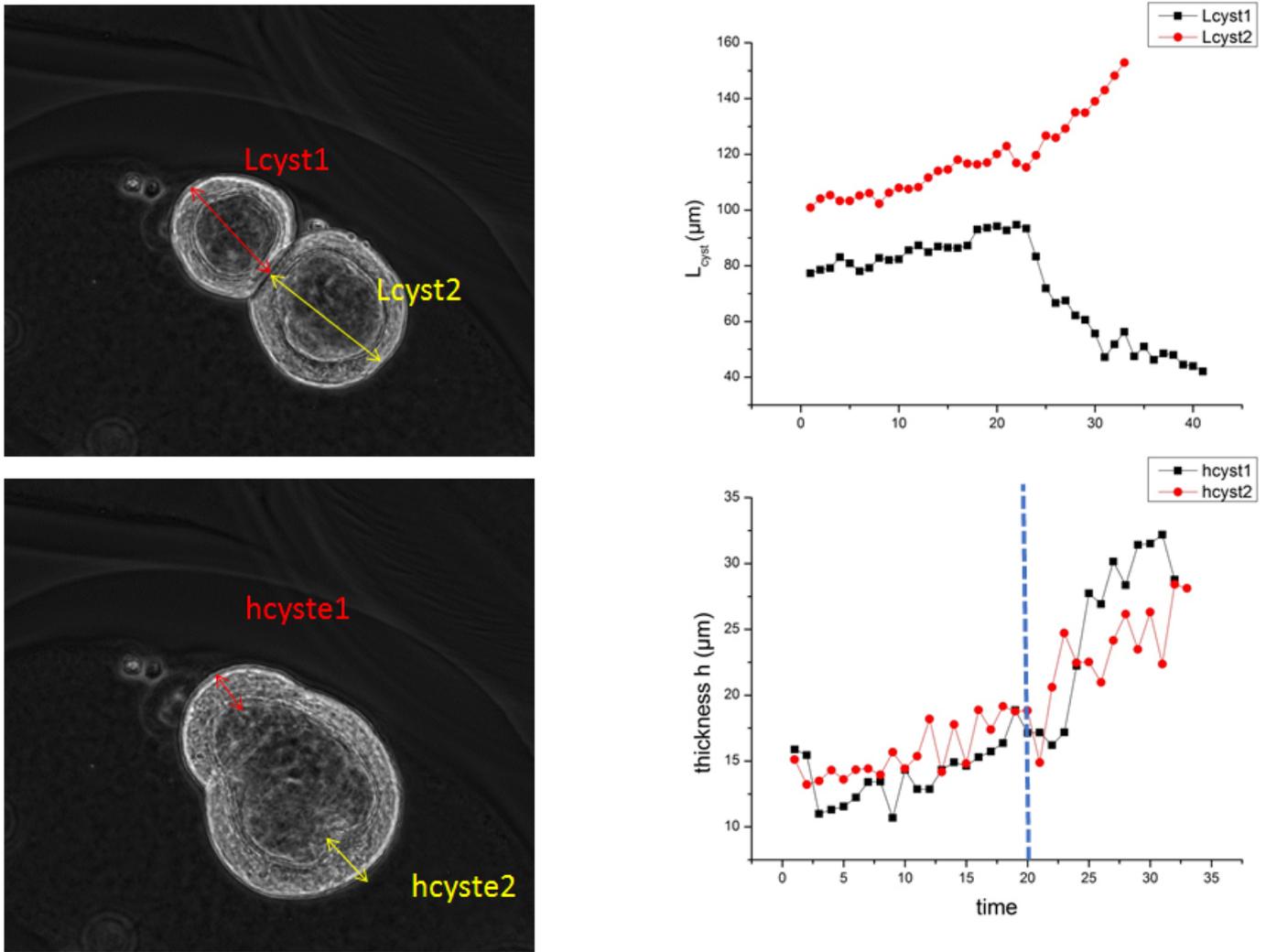


FIGURE 5.10 – Images expérimentales et évolution

### Annexe 5.C Coalescence de kystes

Nos collaborateurs ont aussi observé des coalescences de kystes. La coalescence de kystes possède un intérêt supplémentaire par rapport à une coalescence classique du fait de la structure particulière du kyste. Ainsi, la coalescence s'accompagne d'un épaissement du kyste dans la figure 5.10. La loi classique concernant le rayon de la surface de contact pour la coalescence d'agrégats cellulaires de rayons  $R_1$  et  $R_2$  sur un temps caractéristique bien inférieur à celui de la croissance s'écrit [344] :

$$\frac{r_0^2}{R_0^2} = 2^{2/3} \left(1 - e^{-t/\tau}\right) \quad \text{avec} \quad \tau = 2^{2/3} R_0 \frac{\eta}{\gamma} \quad \text{et} \quad R_0^3 = \frac{R_1^3 + R_2^3}{2} \quad (5.9)$$

où  $\eta$  est la viscosité de l'agrégat et  $\gamma$  sa tension de surface. Mais elle n'est pas applicable à la coalescence de kystes, du fait qu'il faut prendre en compte l'épaisseur non nulle du kyste, et la coalescence des lumières en plus de celle des agrégats cellulaires.

Une piste intéressante inspirée de la Ref. [344] mais non achevée consiste à écrire une énergie thermodynamique pour le kyste et à évaluer la variation de cette énergie thermodynamique avec la dissipation visqueuse, comme cela a été effectué par ailleurs dans le chapitre 2 :

$$\frac{dF}{dt} + W = 0 \quad (5.10)$$

La croissance quasi-isotrope du kyste avant coalescence semble être le résultat de la structure mécanique du

kyste, c'est-à-dire d'un agencement optimal des cellules. Il s'agit donc de construire une énergie  $F$  minimisée par une telle structure.

En parallèle, nous avons adapté le modèle de Potts à la coalescence. Des simulations ont été effectuées et sont présentées sur la figure 5.9(d).

## Annexe 5.D Description du modèle de Potts

Le modèle de Potts utilisé, déjà introduit dans le chapitre 1, est décrit succinctement ici. Il correspond en gros à celui utilisé dans l'article de Cerruti et al [73], et un code fortran y est disponible.

### 5.D.1 Energie

On écrit l'énergie de la façon suivante :

$$E = \sum_{ij} J_{ij} s^{ij} + l_A \sum_i (A^i - A^0)^2 + l_V \sum_i (V^i - V^0)^2 + l_c C \quad (5.11)$$

avec des multiplicateurs de Lagrange  $l_A$  pour l'aire de chaque cellule partagée avec le lumen,  $l_V$  pour le volume de chaque cellule, ainsi que  $l_c$  pour favoriser une courbure infinie pour la surface du lumen, phénomène donc lié à la pression.

La matrice d'interaction  $J$  s'écrit :

$$\begin{cases} J(\text{cell } i - \text{cell } i) = 0 \\ J(\text{cell } i - \text{cell } j, i \neq j) = -j_c \\ J(\text{cell}, \text{lumen}) = -j_l \\ J(\text{cell}, \text{outside}) = -j_e \\ j_l > j_e > j_c \end{cases}$$

### 5.D.2 Mitoses

La mitose se déroule en choisissant l'axe le plus grand de la cellule. Ce choix d'axe peut éventuellement être légèrement bruité. Cet axe est calculé en diagonalisant le tenseur d'inertie, et en prenant le vecteur propre avec la valeur propre la plus élevée.

On suppose que :

- Chaque cellule se divise.
- Le temps de vie moyen avant division est  $T$

Dans la simulation, on suppose qu'après un temps  $T + \delta_T$  avec  $\delta_T$  un petit bruit, la cellule se divise. Au début, les cellules sont fortement corrélées dans leur croissance. Cette corrélation s'atténue avec le temps, car le bruit sur la corrélation des mitoses est additif.

### 5.D.3 Stabilisation

A chaque pas de temps, on stabilise le système par un algorithme de Monte-Carlo. On choisit au hasard un spin et on lui change sa couleur. Si le changement est bénéfique d'un point de vue énergétique, on le confirme, sinon on le garde avec une probabilité  $e^{-\beta \Delta E}$ , avec  $\beta$  lié à une température.



## Chapitre 6

# Disque imaginal de l'aile de la drosophile

Ce chapitre porte sur le développement de la larve de la drosophile. Plus précisément, on étudie un stade précoce de la formation de ses ailes, pendant lequel la structure précurseur (le disque imaginal) de l'aile est assimilable à une multicouche courbée et mince. On compare un modèle de mécanique analytique et des simulations. Ce chapitre est une partie du résultat d'un travail commun mené par Martine Ben Amar, Paul-Qiuyang Qu, Loïc Le Goff, et moi-même, qui a débouché sur l'article Ref. [96]. Le formalisme analytique a surtout été construit par Martine Ben Amar et Paul-Qiuyang Qu. Il ne sera pas développé en détail ici. Loïc Le Goff a proposé l'étude et a réalisé la partie expérimentale.

### 6.1 Introduction

Un des quatre types de tissus vivants consiste en une structure laminaire appelée épithélium. Les épithéliums recouvrent la plupart de nos organes creux, tels que l'œsophage [345], l'intestin [321, 346] et l'estomac. La peau est aussi un épithélium constitué de plusieurs couches cellulaires. Les épithéliums sont structurés en une ou plusieurs couches cellulaires attachées, qui reposent sur un substrat polymérique plus désorganisé, appelé matrice extra-cellulaire (ECM). Même l'épithélium le plus simple, constitué d'une seule couche cellulaire, doit reposer sur une couche d'ECM.

Si le cortex d'actine du côté apical des cellules (le côté qui n'est pas en contact avec l'ECM) contribue aux propriétés mécaniques de l'épithélium [347], celles-ci dépendent aussi de l'ECM [348]. La couche cellulaire et l'ECM doivent donc être toutes deux prises en compte dans la description mécanique de l'épithélium.

Du point de vue biomécanique, un épithélium peut être considéré comme une bicouche constituée de deux matériaux mous différents avec des rigidités différentes et des modes de croissance différents : la couche cellulaire croît par augmentation de la masse et prolifération, tandis que l'ECM croît par ajout de chaînes de polymères et gonflement. Une bicouche peut également servir d'approximation pour d'autres géométries, telles que la peau qui est subdivisée en derme et épiderme. Entre les couches de cellules ou entre les cellules et les tissus conjonctifs, l'ECM peut se développer en une membrane rigide enrichie en filaments de collagène appelée membrane basale [349]. Les cellules épithéliales peuvent également avoir un cortex renforcé sur leur côté basal, augmentant la rigidité interfaciale [350, 351]. Une vision mécanique plus réaliste de l'épithélium serait ainsi celle d'une bicouche avec ajout d'interfaces rigides provenant de l'ECM ou du cytosquelette. C'est cette approche d'une multicouche fine que nous employons afin de construire un modèle analytique d'une expérience portant sur un stade initial de la formation de l'aile de la drosophile. Par ailleurs, nous étudions aussi cette modélisation par une méthode numérique d'éléments finis.

Dans un premier temps, dans la section 6.2, nous décrivons l'embryogenèse ainsi que le développement de la larve de la drosophile, et l'expérience effectuée sur le disque imaginal de son aile. Puis nous décrivons dans la section 6.3 succinctement le modèle analytique, basé sur la théorie de Föppl-von Kármán (FvK) pour les plaques minces. Dans la section 6.4, nous présentons de manière plus détaillée des études numériques en utilisant les éléments finis afin d'analyser les déformations de la bicouche en géométrie réelle. Nous analysons avec cette méthode plusieurs cas différents pour les taux de croissance, les pré-contraintes, et les défauts dans la bicouche.

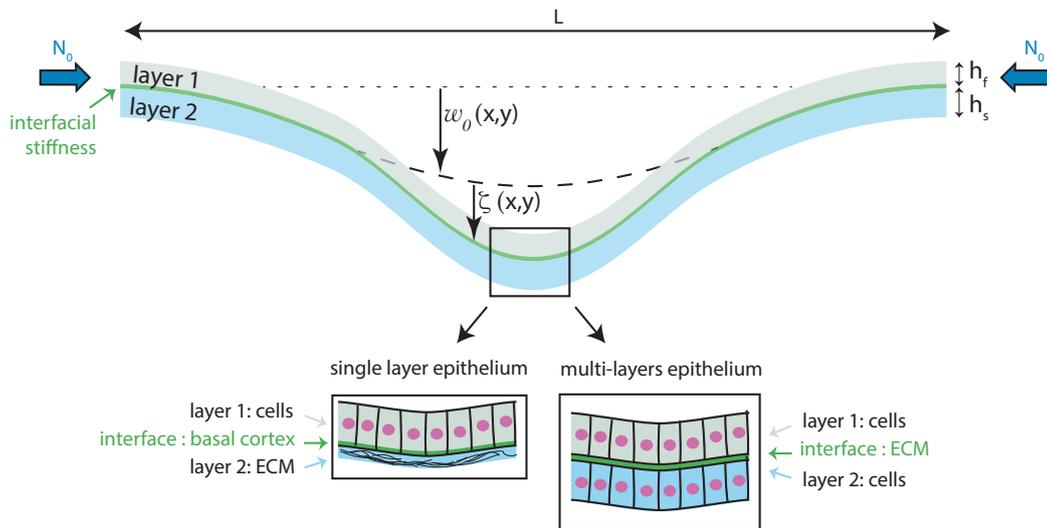


FIGURE 6.1 – Géométrie du modèle bicouche.  $w_0(x, y)$  est l'écart de la configuration initiale par rapport à une surface plane.  $\zeta(x, y)$  est le déplacement par rapport à cette configuration initiale sous l'action de la croissance et de la précontrainte ( $N_0$ ) obtenu par minimisation de l'énergie. Le schéma du bas représente le contexte biologique qui peut être modélisé par la théorie : les deux couches peuvent être soit des couches cellulaires, soit des couches ECM de hauteurs, de modules d'Young et taux de croissance différents ; l'interface rigide peut être un cortex cytosquelette ou une ECM mince.

Enfin, dans la section 6.5, nous appliquons les deux approches précédentes à l'expérience sur le disque imaginal de la drosophile.

## 6.2 Motivation expérimentale : biomécanique des disques imaginaires de l'aille *Drosophila*

Le développement des insectes se déroule en un nombre de phases différent selon le type d'insectes. Les insectes amétaboles ne subissent quasiment aucune métamorphose au sortir de l'œuf, et la seule différence avec l'adulte est la taille : il y a seulement deux stades de développement, l'œuf et l'adulte. Dans le cas des hétérométaboles (métamorphose incomplète), la larve est plus petite que l'adulte, possède des ailes pas complètement développées et des organes sexuels non fonctionnels ; il y a donc trois phases de développement l'œuf, la larve et l'adulte. Dans le cas des holométaboles (métamorphose complète), la larve doit subir une métamorphose durant le stade nymphatique, intermédiaire entre la larve et l'adulte. Pendant cette étape les différentes parties de l'insecte adulte se développent à partir de disques imaginaires, constitués au début de cellules souches qui se différencient et se développent en organes (figure).

Les disques imaginaires de l'aille de drosophile (les précurseurs de l'aille adulte) sont des tissus épithéliaux qui sont devenus, au fil des ans, l'un des systèmes les plus étudiés et les mieux caractérisés pour étudier la croissance des larves [352].

Le disque imaginal de l'aille en croissance affiche un champ de contraintes mécaniques très structuré [353, 354, 355]. Les cellules à la périphérie de l'épithélium subissent un fort étirement mécanique. Cette précontrainte s'accumule au fur et à mesure que le tissu se développe. De plus, le tissu se courbe au fur et à mesure du développement, passant progressivement d'une simple surface plane à une surface courbe plus complexe.

Jusqu'à récemment, la plus grande attention était portée sur le rôle de la surface apicale (la surface qui n'est pas en contact avec l'ECM) de l'épithélium dans la définition de ses propriétés mécaniques. Il a cependant été récemment démontré que la matrice extracellulaire sur laquelle repose l'épithélium joue un rôle majeur dans la formation du tissu. Les altérations de la composition de la membrane basale, qui comprend le collagène IV, la laminine, le nidogène et les protéoglycanes héparane-sulfate, ont des effets profonds sur la forme du disque

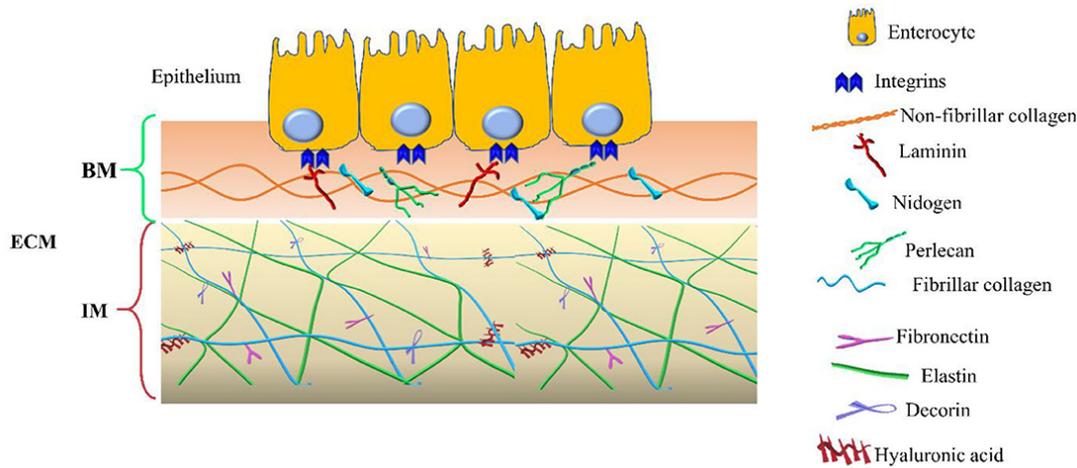


FIGURE 6.2 – Schéma des cellules épithéliales et de la matrice extracellulaire (ECM) avec ses composants dans le cas de la paroi intestinale (issu de [360]) : les deux compartiments sont la membrane basale (BM) et la matrice interstitielle (IM). Les composants de chaque partie sont indiquées.

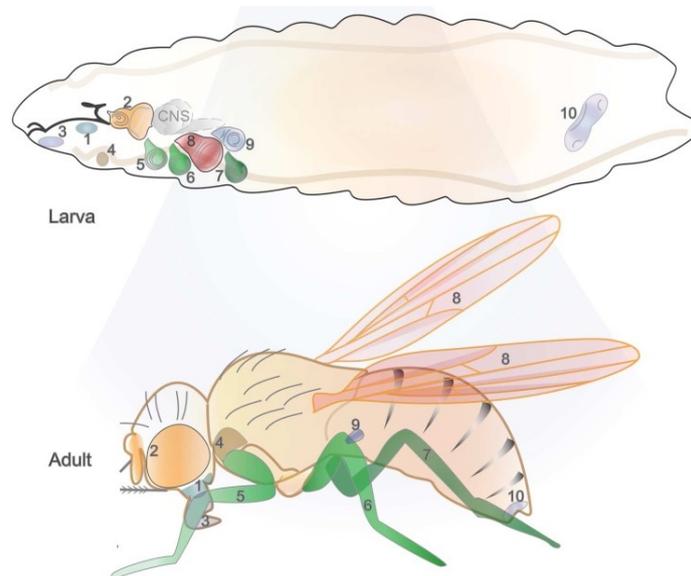


FIGURE 6.3 – Stades de développement larvaire et adulte d'un insecte holométabole (issue de [352]). Les disques imaginaux se métamorphosent en organes.

imaginal de l'aile [356]. Il a également été démontré que les altérations de la membrane basale jouent un rôle actif dans la définition de la forme tridimensionnelle du disque alaire en favorisant la formation des plis qui apparaissent progressivement dans le tissu [54, 357]. De ces expériences, il ressort maintenant que les disques imaginaux des ailes, et la plupart des épithéliums en général, sont des structures composites à deux couches. La couche cellulaire et la couche ECM participent activement à la formation du tissu [358].

Pour évaluer le rôle des membranes basales dans l'établissement des propriétés mécaniques des disques imaginaux, nous avons utilisé une approche génétique sur la drosophile. La métallo-protéase Mmp2 est exprimée dans une bande de cellules au centre du disque afin d'y dissocier l'ECM. L'action biochimique de Mmp2 est de dégrader les composants structurels de l'ECM [359], ce qui en termes mécaniques implique un changement possible de la rigidité de l'ECM ainsi que de son épaisseur. Nous ne pouvons pas exclure également un effet indirect sur le cortex cytosquelette basal des cellules, car une ECM altérée à proximité de la couche cellulaire implique une activation réduite des récepteurs des intégrines (voir figure 6.2). Le modèle élastique doit donc prendre en compte ces différentes contributions. Mmp2 est exprimée environ 18h. La figure 6.4c montre la coupe transversale d'un disque imaginal 18 heures après l'expression de la métallo-protéase. La région de perturbation est colorée en rouge sur la figure. La figure 6.4d montre le profil de la surface apicale de l'épithélium, qui présente une région

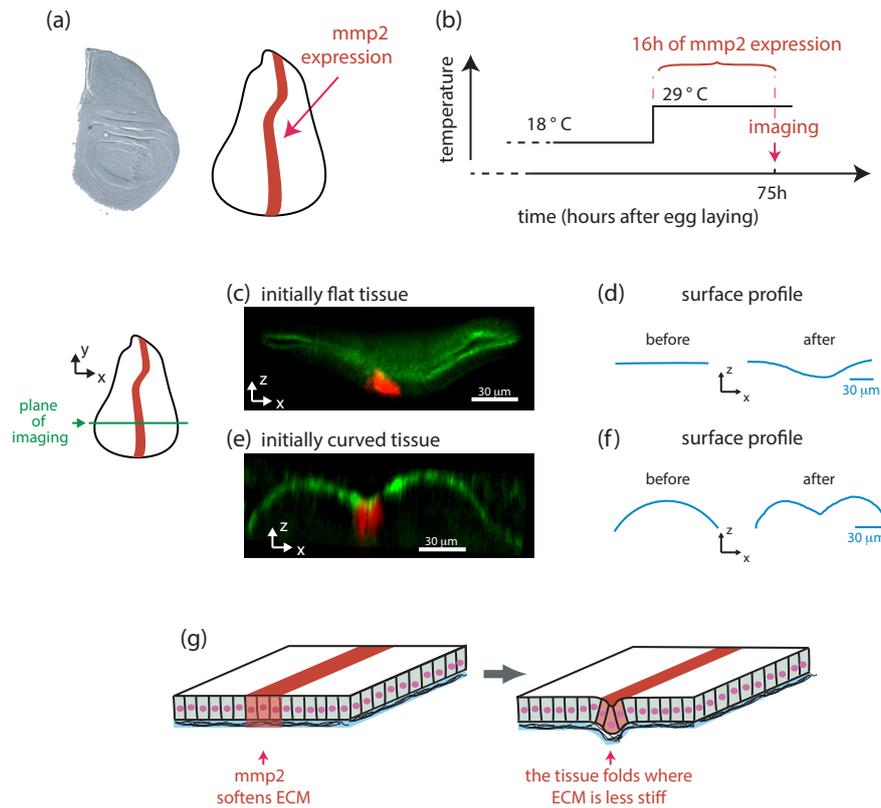


FIGURE 6.4 – Pliage d'un épithélium par dégradation locale de l'ECM. **(a)** : Imagerie par transmission de lumière d'un disque imaginal d'aile *Drosophila* (à gauche) et croquis correspondant avec la région d'expression localisée de la protéase *Mmp2* ombrée en rouge (à droite). **(b)** : Pour contrôler l'expression de la métalloprotéase, l'échantillon est passé de 18°C à 29°C plusieurs heures avant l'observation. **(c-f)** : Démonstration expérimentale. **(c)** : Une coupe transversale  $xz$  montre la forme d'un disque imaginal d'aile initialement plate sous l'effet d'une expression localisée de métalloprotéase (dans la région de couleur rouge). **(d)** : Changement de forme du tissu. **(e,f)** : Identique à (c,d) mais avec un disque imaginal d'aile initialement incurvé. **(g)** : Une représentation schématique des changements de forme observés dans le disque imaginal de l'aile.

d'inflexion proche de l'expression de la protéase. Ce profil figure 6.4c,d correspond à un disque imaginal d'aile initialement plat, alors que la figure 6.4d,e montre le même résultat de perturbation sur un imaginal d'aile disque initialement incurvé - la courbure s'accumule normalement aux stades tardifs du développement du disque alaire (environ 80 heures après la ponte). Le tissu résultant est très différent du cas précédent. Cette fois, le profil montre une configuration plus complexe : la courbure qui se produit est prédominante sur les bords du disque alaire et dans le même temps, l'action de la métallo-protéase dans la région de perturbation y induit une inversion de la courbure.

Pour conclure, lors de la dégradation de l'ECM (qui peut avoir un impact sur la rigidité, l'épaisseur et la mécanique interfaciale), l'épithélium se courbe dans la région de perturbation (figure 6.4h) que le tissu soit initialement plat ou incurvé. Ces observations expérimentales sont ensuite confrontées au modèle bicouche FvK et à des simulations par éléments finis.

Nous ne détaillons pas ici le calcul analytique.

### 6.3 Théorie de Föppl-von Kármán adaptée à une bicouche en croissance.

Plusieurs études traitent les substrats très mous [361, 362, 363, 364, 365, 366] comme une fondation élastique ou avec un potentiel de résistance ad-hoc [362, 363]. Un potentiel de résistance consiste à ajouter à l'énergie élastique de la couche de cellules, une contribution venant de la résistance du milieu à cette déformation. Cela a

été notamment utilisé dans le cas de l'étude de la formation des empreintes digitales [363]. Une fondation élastique consiste à rajouter une composante dans la déformation verticale de la plaque identique à celle d'un ressort, donc reliée seulement à la contrainte verticale.

Ces modèles deviennent essentiellement monocouches et ne peuvent pas rendre compte de la diversité de comportement des systèmes à deux couches où les deux couches jouent des rôles semblables et présentent des propriétés similaires. Dans cette section, nous présentons rapidement un modèle mécanique simple de bicouches minces utilisant les équations Föppl-von Kármán (FvK) avec croissance. Dans le cadre d'une hypothèse de plaque mince, les équations FvK permettent une réduction dimensionnelle de 3 dimensions à 2 dimensions qui simplifie considérablement le traitement analytique de la mécanique des plaques. Les équations FvK sont donc bien adaptées pour incorporer les nombreuses caractéristiques biologiques différentes des tissus stratifiés qui sont difficiles à manipuler analytiquement dans un formalisme entièrement tridimensionnel. Il a été récemment montré que les équations FvK avec croissance permettent d'expliquer d'une manière assez simple le flambement d'objets minces tels que les fleurs et les algues [367, 368], comparé au traitement complet de l'élasticité finie avec croissance [369]. De plus, ces équations légèrement modifiées permettent de traiter initialement une membrane faiblement courbée. Lors de la modélisation d'un épithélium monocouche, les deux couches du modèle sont l'ECM et les cellules, tandis que la rigidité interfaciale représente le cortex du cyto-squelette basal des cellules (encadré de gauche sur la fig. 6.1). Lors de la modélisation d'un système plus complexe, comme la peau, une couche du modèle représente les couches cellulaires de l'épiderme, la deuxième couche est le derme (un tissu conjonctif) et la rigidité interfaciale représente la membrane basale extracellulaire (encart à droite sur la figure 6.1) [349]. Dans le modèle, les différentes raideurs et épaisseurs (des couches de cellules ou des interfaces) peuvent également varier dans l'espace. De telles variations sont souvent présentes dans les tissus biologiques et sont considérées comme des générateurs de formes dans les processus morphogénétiques. Ces variations locales de propriétés mécaniques peuvent également être induites dans le cadre d'expériences, comme cela est d'ailleurs le cas dans ce chapitre.

Au-delà de l'influence des processus élasto-mécaniques sur la forme de l'épithélium, celle-ci provient d'une longue et complexe histoire de croissance, de la répartition des contraintes et des modifications des propriétés mécaniques. D'autre part, notre formalisme, qui utilise l'élasticité linéaire avec des déformations élastiques non linéaires modérées, ne peut prendre en compte que de légères variations de forme, couvrant des intervalles de temps généralement plus petits que le temps de doublement des cellules dans le tissu. Pour pallier ce problème, l'histoire du développement et de la morphogénèse est intégrée dans une forme initiale et dans une précontrainte. Cela permet une confrontation avec des expériences où le tissu, au début de l'observation, est rarement dans une configuration plane et sans stress et pour lequel l'histoire complète du développement est également inaccessible. Bien que le formalisme ait été initialement développé pour traiter la croissance biologique, il pourrait également servir pour le cas inverse de la résorption, ce qui pourrait présenter un intérêt à la fois dans un contexte de biologie et de science des matériaux.

Le modèle de Föppl-von Kármán (FvK) utilise le formalisme d'élasticité linéaire. On rappelle que dans ce formalisme, le tenseur des déplacements est défini localement par :

$$F_{ij} = \frac{dx_i}{dX_j} = \delta_{ij} + \frac{\partial u_i}{\partial X_j} \quad (6.1)$$

avec  $\mathbf{x}$  la position dans la configuration actuelle du point matériel de position  $\mathbf{X}$  dans la configuration initiale.  $\mathbf{u} = \mathbf{x} - \mathbf{X}$  correspond au déplacement du point matériel. Sans croissance, et en l'absence de plasticité, la déformation est seulement d'origine élastique. Lorsqu'on ajoute de la croissance, on peut procéder, comme cela est fait dans le chapitre 5 sur la croissance des kystes de cellules souches, à une décomposition de Kroner-Lee du tenseur de déformation. Le gradient de déformation est séparé entre un gradient de déformation élastique  $\mathbf{A}$  et un gradient de déformation dû à la croissance  $\mathbf{G}$ .

$$\mathbf{F} = \mathbf{A}\mathbf{G} \quad (6.2)$$

On suppose  $\mathbf{G} = \mathbf{I} + \tilde{\mathbf{g}}$  avec des  $\tilde{g}_{ij} \ll 1$ . En outre,  $\mathbf{A} = \mathbf{F}\mathbf{G}^{-1}$ . D'où :

$$A_{ij} = \delta_{ij} - \tilde{g}_{ij} + \frac{\partial u_i}{\partial X_j} - \frac{\partial u_i}{\partial X_k} \tilde{g}_{kj} \quad (6.3)$$

Cela permet donc d'écrire les composantes  $\epsilon_{ij}$  du tenseur  $E$  des déformations de Green-Lagrange.

$$E = \frac{1}{2} (C - I) \quad \text{avec} \quad C = A^T A \text{ le tenseur de Cauchy} \quad (6.4)$$

Nous épargnons au lecteur la formule analytique complète des composantes  $\epsilon_{ij}$ . Il faut malgré tout noter que des hypothèses sont faites sur l'ordre des différents  $u_i$  et  $g_{ij}$ .

Par ailleurs, on rappelle ici la formule générale reliant les contraintes  $\sigma_{ij}$  aux composants du tenseur de déformation élastique  $\epsilon_{ij}$  pour un matériau isotrope :

$$\sigma_{ij} = \frac{E}{1+\nu} \left( \epsilon_{ij} + \frac{\nu}{1-2\nu} \epsilon_{kk} \delta_{ij} \right) \quad (6.5)$$

Dans le modèle FvK, les contraintes possédant une composante normale s'annulent :  $\sigma_{33} = \sigma_{13} = \sigma_{23} = \sigma_{31} = \sigma_{32} = 0$ . D'une part, ces relations permettent de simplifier l'expression 6.5 en :

$$\sigma_{\alpha\beta} = \frac{E}{1-\nu^2} \left( (1-\nu)\epsilon_{\alpha\beta} + \nu\epsilon_{kk}\delta_{\alpha\beta} \right) \quad (6.6)$$

où les indices grecs  $\alpha, \beta$  ne peuvent prendre pour valeurs que 1, 2. C'est à dire que le problème est ramené à un problème plan. Néanmoins, le déplacement normal au plan  $u_3$ , tout comme les taux de croissance  $g_{i3}$  interviennent encore dans  $\epsilon_{xx}, \epsilon_{xy}, \epsilon_{yy}$ . D'autre part, ces relations permettent d'exprimer les déplacements  $u_1$  et  $u_2$  comme dépendant de  $u_3$  et  $g_{ij}$  de la façon suivante :

$$\begin{aligned} u_\alpha &= u_\alpha^0 + (Z - Z_n)u_\alpha^1 \\ u_\alpha^1 &= -\partial_\alpha u_3 + g_{\alpha 3} \end{aligned} \quad (6.7)$$

Le terme  $Z_n$  correspond à la surface neutre, c'est-à-dire la surface qui sépare la partie de la bicouche en compression de la partie en tension. Nous invitons le lecteur à consulter l'article Ref. [96] pour la dérivation de l'expression de  $Z_n$ .

On peut alors écrire une densité d'énergie :

$$\mathcal{E} = \int_\Omega d\Omega \sigma_{\alpha\beta} \epsilon_{\alpha\beta} - \int_S dS P u_3 \quad (6.8)$$

qui est la somme de l'énergie élastique interne et de l'énergie élastique due à la pression  $P$  perpendiculaire à la plaque, quand elle existe.

Enfin, les équations déterminant les déformations sont dérivées par une approche variationnelle qui consiste en la minimisation de l'énergie élastique totale selon les déplacement dans chaque direction :

$$\frac{\delta \mathcal{E}}{\delta u_i} = 0 \quad (6.9)$$

La minimisation par rapport aux déplacements dans le plan conduit simplement à l'équilibre des forces. La minimisation par rapport au déplacement  $u_3$  selon  $Z$  conduit à l'équation de FvK avec croissance pour une bicouche. On pose :  $u_3 = \zeta + w_0$ , avec  $\zeta$  le déplacement dû au processus de croissance et aux contraintes externes, tandis que  $w_0$  correspond à un pré-déplacement récapitulant l'histoire du tissu et produisant une courbure initiale. Nous ne détaillons pas ici la deuxième équation afin de ne pas rentrer dans des développements trop théoriques.

Dans le cas de l'expérience décrit en section 6.2, il n'est pas nécessaire de se placer dans le cas d'une plaque à 2 dimensions, et une réduction de dimension vers un système à une dimension (qui intègre en son sein les variations des propriétés du système dans la troisième dimension) est possible :

$$\left\{ \begin{array}{l} \partial_x \sigma_{xx} = 0 \\ \underbrace{\frac{d^2}{dx^2} \left( D \frac{d^2 \zeta}{dx^2} \right)}_{\text{Terme élastique}} + \underbrace{N_0 \frac{d^2(\zeta + w_0)}{dx^2}}_{\text{Pré-contraintes}} = \underbrace{F(N_0, \{g_{ij}\}_{i,j=1,3})}_{\text{Contribution de la croissance}} + \underbrace{P(x)}_{\text{Contraintes externes}} \end{array} \right. \quad (6.10)$$

où  $D$  correspond à la rigidité flexurale et  $N_0$  à la contrainte intégrée sur l'épaisseur de la bicouche. On englobe dans une fonction  $F(N_0, \{g_{ij}\}_{i,j=1,3})$  la contribution de la croissance au processus de déformation. Cette contribution contient donc l'effet de la croissance qui est couplée aux propriétés élastiques de la bicouche. Il faut aussi noter

que les paramètres  $D$ ,  $N_0$  et la fonction  $F$  peuvent dépendre de la localisation  $x$ , par exemple dans le cas où les paramètres élastiques et de croissance sont modifiés au niveau d'un défaut.  $D$ ,  $N_0$  et  $F$  sont par ailleurs des quantités intégrées sur l'épaisseur de la bicouche, de telle sorte que les propriétés élastiques et de croissance sont moyennées sur cette épaisseur, et pondérées par les propriétés élastiques du matériau.

Ces équations fournissent donc les valeurs de la déviation verticale  $\zeta$  de la plaque.

Nous incluons plus loin l'application de la théorie FvK aux expériences sur le disque imaginal de la drosophile.

## 6.4 Simulations numériques avec la méthode des éléments finis

Le problème de la flexion de la bicouche est considéré en élasticité linéaire en utilisant le programme d'éléments finis Comsol Multiphysics qui calcule les déformations dans la géométrie réelle de la bicouche, sans moyenner les propriétés élastiques. La bicouche étudiée est constituée d'une couche supérieure mince ( $h_f = 10 \mu\text{m}$ ) et relativement molle ( $E_f = 50 \text{ kPa}$ ) et d'une couche inférieure plus épaisse ( $h_s = 12 \mu\text{m}$ ) et plus rigide ( $E_s = 75 \text{ kPa}$ ). La longueur de la bicouche est de  $L = 500 \mu\text{m}$ . Les couches sont en croissance et sont soumises à des précontraintes. Les bords peuvent être libres ou soumis à des conditions aux limites. Nous étudions un défaut qui consiste en une destruction locale de la couche basale au milieu de la bicouche d'une longueur de  $10 \mu\text{m}$  et d'une épaisseur  $h_d \leq h_s$ , et qui peut également être un changement local de la rigidité et de la croissance dans la bicouche. La croissance est anisotrope et est introduite sous une forme tensorielle :  $G_{ij} = 1 + g \delta_{1i} \delta_{1j}$ , avec  $g \sim 0 - 0.1$ . La croissance peut être introduite soit uniquement dans la couche supérieure comme dans la section (6.4.2), soit uniquement dans la couche inférieure comme dans la section (6.4.4), ou encore dans les deux couches en même temps comme dans la section (6.4.3). La précontrainte consiste en une compression ou tension anisotrope, avec  $\sigma_{ij}^{PS} = -\sigma^{PS} \delta_{1i} \delta_{1j}$  où  $\sigma^{PS} \sim 0 - 500 \text{ Pa}$ .

Nous étudions également le cas d'une bicouche possédant déjà une courbure :  $W_0 = H \times (L/2)^{-2} ((L/2)^2 - X^2)$  où  $H$  est le déplacement à  $X = 0$ . Afin de comparer les différents résultats, le profil de l'interface entre la couche supérieure et inférieure est tracée (la ligne rouge sur la fig. 6.5e).

Enfin, les simulations FEM sont ajustées à l'expérience décrite précédemment. Le résultat est aussi comparé à celui obtenu à partir du calcul FvK.

### 6.4.1 Précontrainte sur une bicouche initialement courbée

Dans la fig.(6.5a), nous étudions différentes courbures initiales, caractérisées par  $H = -20 \mu\text{m}, 0 \mu\text{m}, 20 \mu\text{m}$  avec la même précontrainte  $\sigma^{PS} = 200 \text{ Pa}$  dans la bicouche. Pour une plaque sans courbure initiale, une flexion vers le côté basal le plus rigide et le plus épais est obtenue tandis que pour une coque convexe ou concave, la courbure initiale de la coque est renforcée en valeur absolue. Ceci est cohérent avec le modèle FvK précédent où l'écart de flexion suit la forme initiale de la coque.

### 6.4.2 Épaisseur et défaut de croissance sur les plaques et coquilles en croissance

Dans les systèmes biologiques, les deux couches de l'épithélium ne sont pas indépendantes. Par exemple, la membrane basale régule la prolifération et la différenciation dans l'épithélium. En général, la couche basale structure la couche supérieure de l'épithélium, et un défaut de la couche inférieure peut avoir des conséquences sur la prolifération et le métabolisme de la couche supérieure. Par conséquent, nous étudions maintenant le changement de forme au niveau d'un défaut qui modifie l'épaisseur de la couche basale et par conséquent la croissance de la couche supérieure de croissance. La figure 6.5b affiche les résultats lorsque la couche basale est retirée dans une proportion de 85 % (lignes pointillées) d'épaisseur et que la couche supérieure ne croît pas au niveau du défaut, ainsi que le cas sans défaut (lignes continues). On observe un flambement vers la membrane basale, au voisinage du défaut.

### 6.4.3 Place d'un défaut

Les défauts peuvent apparaître n'importe où le long d'une bicouche. Dans la fig. 6.5c des défauts sont placés sur une bicouche plane, situés à  $X = 0, 0.08, 0.16$  pour les lignes bleue, verte et rouge respectivement. Les deux couches croissent dans la même mesure avec  $g = 0.1$ . Le défaut consiste à enlever une partie de la couche inférieure. Fait intéressant, avec la même taille de défaut, l'amplitude de la déformation est différente, et le déplacement du défaut n'est pas seulement un déplacement de la déformation.

### 6.4.4 Dépendance des conditions aux limites

La comparaison entre les géométries confinées et libres est un sujet récurrent dans les études de croissance cellulaire [129, 175, 370] à partir de multiples perspectives, telles que le plissement des feuilletts épithéliaux [371]. Par ailleurs, les conditions aux limites des plaques ou coques bicouches sont nécessaires à l'étude analytique et numérique du système, même s'ils ne sont pas toujours parfaitement connus. Lorsque la configuration est symétrique, on peut utiliser ces symétries pour contraindre le problème, même si le système possède des conditions aux limites libres. Parfois l'expérience est telle que le système est encasté, ou perd sa symétrie. Les systèmes confinés dépendent fortement des conditions aux limites.

Dans la fig. (6.5d) nous comparons le flambage dans des géométries encastée et libre. Le flambement est très différent, et sa direction (vers le haut ou vers le bas) change en partant d'une géométrie concave. Cela peut conduire à de fortes imprécisions dans les simulations FEM de géométrie rectangulaire et des traitements semi-analytiques deviennent nécessaires, voir référence [372].

Il peut y avoir plusieurs types de géométrie contrainte. Dans la fig. 6.5d, elle est obtenue en imposant un déplacement nul en deux points sur les frontières latérales. Dans la fig. 6.5f, l'ensemble des frontières latérales se voit imposer un déplacement nul. Dans le second cas, le déplacement  $Z$  a une dérivée nulle comme conditions aux limites en ces bords.

## 6.5 Confrontation de la théorie FvK et des simulations par éléments finis avec les expériences sur l'aile de la drosophile

Nous utilisons l'approche analytique inspirée de la théorie FvK et la méthode des éléments finis pour reproduire la déformation du disque imaginal présenté dans l'expérience.

Dans le cas du modèle FvK, la mutation décrite plus haut est modélisée en introduisant une modification locale de croissance de la bicouche, conjuguée à une précontrainte mais sans courbure initiale dans le cas d'un disque imaginal jeune, et avec une courbure initiale dans le cas d'un disque imaginal plus âgé. Dans le dernier cas du disque imaginal plus âgé, le résultat final n'est pas sensible aux pré-contraintes. Les résultats des fits sont présentés en figure 6.6.

Une plus-value de la modélisation avec les éléments finis est qu'on peut observer vers quelle côté la courbure est censée se produire. Par ailleurs, elle permet de tester de façon critique le résultat d'une modification de la croissance au niveau du défaut. En effet, l'approche analytique ne considère que la courbure d'une plaque dans laquelle les caractéristiques sont moyennées, même si de façon non triviale.

Dans l'étude numérique, nous supposons que les contraintes à l'intérieur de la couche cellulaire sont induites par la croissance et sont relâchées lorsqu'un défaut est introduit. Comme en mécanique classique seule la configuration sans contrainte et la configuration obtenue après le processus sont à prendre en compte. On compare alors une croissance multicouche avec et sans défaut. Dans nos simulations, on observe qu'un modèle à 2 couches ne peut pas reproduire le changement de courbure observé expérimentalement lors de la dégradation de l'ECM. Ce n'est que lorsqu'une membrane apicale est introduite dans le modèle que nous pouvons reproduire ce comportement - ce qui en fait essentiellement un modèle à 3 couches. En effet, contrairement à la résolution de l'équation FvK où des conditions aux limites sont imposées, nous utilisons des conditions aux limites libres avec la méthode

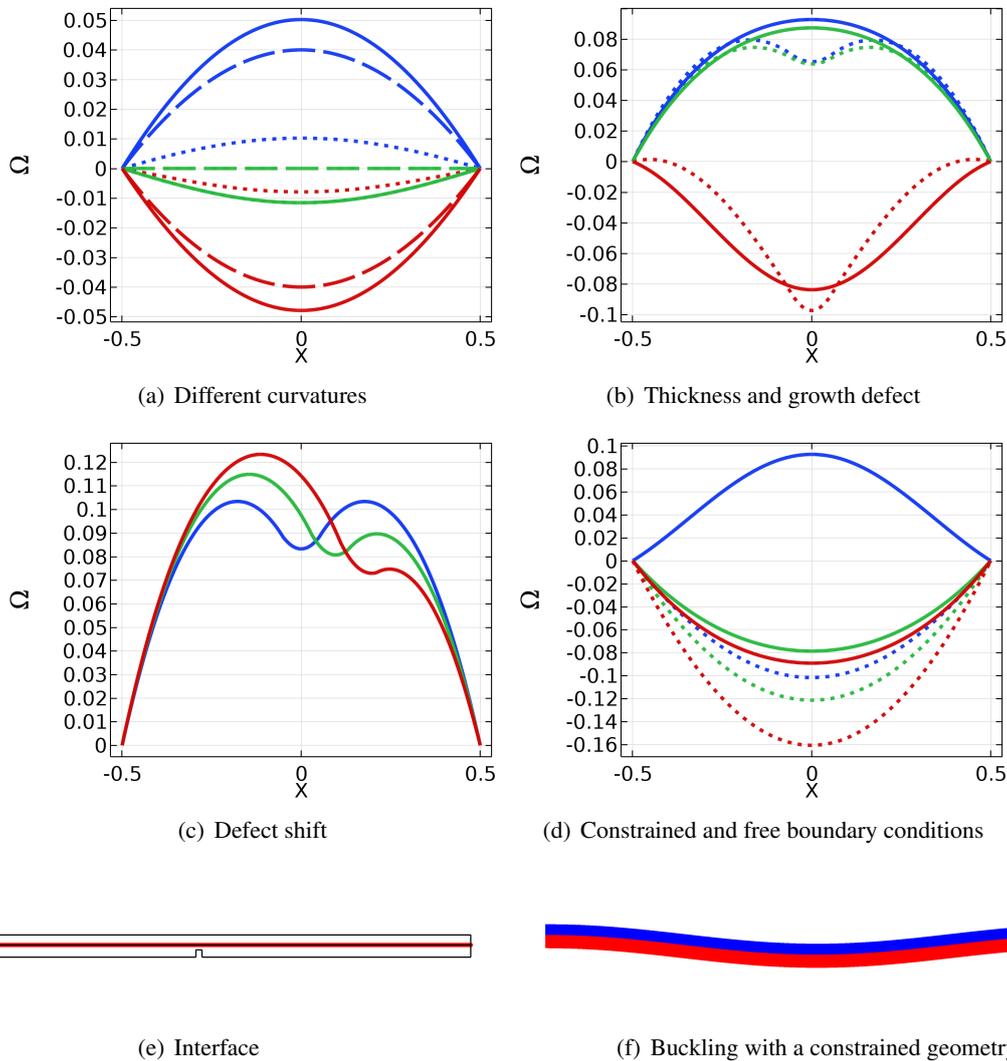


FIGURE 6.5 – **(a)** : Profil de l'interface entre les deux couches pour des courbures différentes et une précontrainte  $\sigma^{PS} = 200$  Pa, sans défaut dans la couche inférieure. Les lignes continues, en tirets et pointillées correspondent respectivement à  $W_0 + \zeta$ ,  $W_0$  et  $\zeta$ . Les lignes rouge, verte et bleue correspondent respectivement à  $H = \{-20, 0, 20\}$   $\mu\text{m}$ . **(b)** : Profil de l'interface entre les deux couches pour un cas avec un défaut d'épaisseur relative  $h_d/h_s = 0.85$  avec  $h_d$  l'épaisseur du défaut et  $h_s$  l'épaisseur de la couche inférieure. Le paramètre de croissance est  $g = 0.05$ . Les courbes verte, bleue et rouge correspondent respectivement aux cas avec une courbure initiale nulle, concave et convexe  $H = 0, 20, -20$ . **(c)** : Différents décalages pour le défaut, qui est à  $X = 0, 0.08, 0.16$  respectivement pour la ligne bleue, verte et rouge. L'amplitude de la déformation dépend de la localisation du défaut. Le paramètre de croissance prend la valeur  $g = 0.1$ . **(d)** : Comparaison entre les conditions aux limites contraintes (lignes pointillées) et libres (lignes continues) pour les courbures initiales nulles, convexes et concaves ( $H = 0, -20, 20$  pour les lignes verte, rouge et bleue) et une couche inférieure croissante ( $g = 0.03$ ). **(e)** : Interface entre la couche inférieure et supérieure en rouge. **(f)** : Flambage pour une bicouche contrainte avec une couche inférieure croissante et une courbure concave initiale.

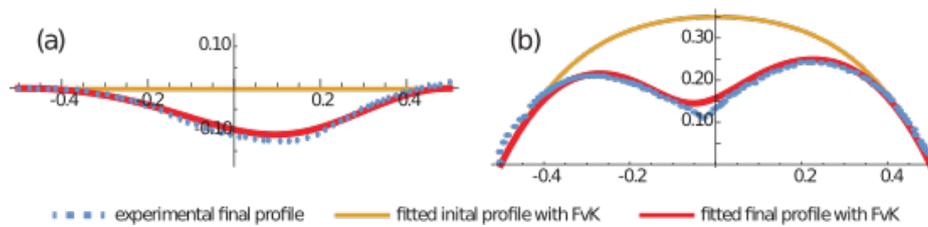


FIGURE 6.6 – Ajustement de profils expérimentaux de disques de l’aile avec la théorie FvK de la bicouche uniaxiale. **(a)** : Ajustement théorique d’un disque imaginal d’aile précoce, pour lequel le profil initial avant perturbation était plat (idem fig.(6.4c)). **(b)** : Ajustement théorique d’un disque imaginal d’aile plus ancienne, pour lequel le profil initial avant perturbation était courbé (idem fig.(6.4e)).

des éléments finis. Par conséquent, une troisième couche doit être ajoutée afin de contraindre le système à se courber vers le bon côté.

Plus précisément, nous avons simulé une couche cellulaire épaisse ( $15\ \mu\text{m}$ ) de longueur  $L = 500\ \mu\text{m}$ , poussant entre deux couches minces non croissantes. Ce processus crée une contrainte de compression dans les deux couches non croissantes. La couche supérieure a une épaisseur de  $5\ \mu\text{m}$  et la couche inférieure a une épaisseur de  $2\ \mu\text{m}$ . La membrane apicale peut représenter le cortex apical et la couche adhérente apicale qui dominent la mécanique apicale dans les épithéliums [347], tandis que la membrane basale représente l’ECM. Le gradient de déformation de croissance s’écrit as :  $G_{ij} = 1 + \delta_{1i}\delta_{1j}g_{11}$ . Les conditions aux limites sont libres.

On ajuste le modèle théorique aux expériences (fig. 6.8a,6.8b) et on trouve une ECM basal plus rigide ( $E_b = 100\ \text{kPa}$  ou  $E_b = 30\ \text{kPa}$ ) que la membrane supérieure et que la couche cellulaire ( $E = 10\ \text{kPa}$ ). Dans le cas du disque imaginale la plus jeune,  $g_{11} = 0.2$  et  $E_b = 30\ \text{kPa}$ , et pour le plus ancien disque imaginale  $g_{11} = 0.25$  et  $E_b = 100\ \text{kPa}$ . Nous introduisons également une asymétrie pour la place du défaut à  $X = -0.025$  pour l’épithélium ancien et  $X = 0.15$  pour l’épithélium précoce. La croissance apparente est donc plus élevée et l’ECM plus rigide pour l’ancien disque imaginale par rapport à la première aile imaginale. Ce montage se traduit par une flexion vers la couche supérieure dans le cas sans défaut pour l’ancienne aile imaginale et une légère flexion vers la face basale pour l’aile imaginale précoce (fig.(6.7a ,6.7c)). Cependant, lorsqu’un défaut de longueur  $l_d = 100\ \mu\text{m}$  est introduit sous la forme d’un retrait de l’ECM basal, la courbure subit une inversion vers le côté basal dans les deux cas (fig. 6.7b,6.7d).

Il semble que pour le disque imaginal précoce ce modèle soit suffisant afin de reproduire correctement le profil expérimental (fig. 6.8a). Cependant, l’accord n’est pas aussi bon pour l’ancien disque imaginal initialement incurvé (fig.(6.8b)). Le modèle basé sur la méthode des éléments finis (FEM) est donc ensuite modifié avec la même stratégie que pour le modèle FvK, en changeant la rigidité au niveau du défaut, rendant la couche cellulaire plus molle. Ce modèle raffiné fournit un meilleur ajustement aux expériences (fig. 6.7e,6.8c). Les nouvelles valeurs de l’ajustement pour l’ancienne aile imaginale sont :  $g_{11} = 0.43$  et  $E = 1.7\ \text{kPa}$  dans la couche cellulaire au niveau du défaut. Les autres paramètres restent inchangés. Au contraire, changer le taux de croissance au niveau du défaut n’améliore pas l’ajustement. On en déduit que la contribution dans le couplage entre l’élasticité et la croissance est principalement due à un changement de la rigidité de la couche cellulaire en croissance au niveau du défaut, plutôt qu’à un changement de croissance. Ceci est cohérent avec la durée d’expression de Mmp2 pendant l’expérience (18-24 h), voir sect. 6.2. Aucune précontrainte n’a été introduite dans les simulations FEM, puisque cette précontrainte est supposée être causée par la croissance, et la croissance peut être introduite explicitement avec un ordre de grandeur plus grand qu’avec FvK. Pour la même raison, la croissance engendre la courbure, qui n’est pas introduite explicitement. En conclusion, les simulations FEM valident les calculs FvK.

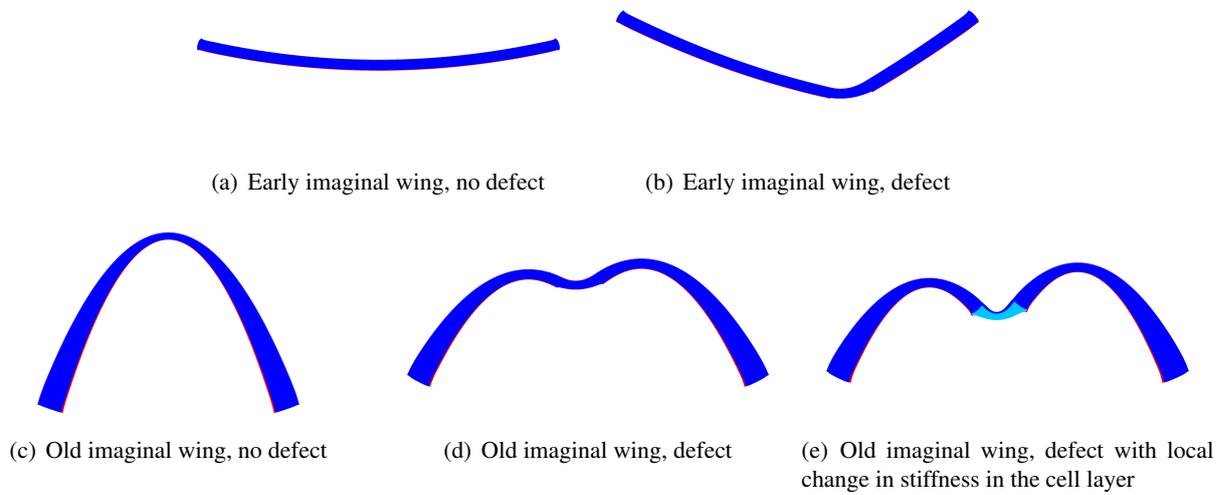


FIGURE 6.7 – Coupes d’une aile imaginale pour différentes études numériques avec et sans défaut. Les couleurs reflètent les différentes couches ayant des rigidités différentes : rouge pour l’ECM basal, bleu pour la membrane supérieure et la couche cellulaire, et cyan pour la zone de la couche cellulaire autour du défaut qui s’adoucit dans le modèle affiné.

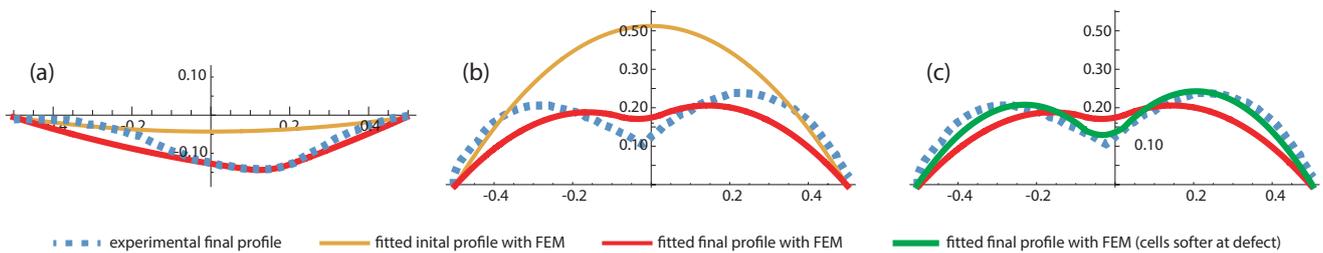


FIGURE 6.8 – Ajustement des profils expérimentaux du disque imaginal de l’aile en utilisant le modèle d’Elements Finis. **(a)** : Ajustement théorique d’un disque imaginal d’aile précoce, pour lequel le profil initial avant perturbation était plat (idem fig.(6.4c)). **(b)** : Ajustement théorique d’un disque imaginal d’aile plus ancien, pour lequel le profil initial avant perturbation était courbé (idem fig.(6.4e)). La rigidité de la couche cellulaire n’est pas altérée par le défaut. **(c)** : Comparaison entre l’ajustement raffiné pour lequel la rigidité de la couche cellulaire est altérée par le défaut (en vert) et le cas où il ne l’est pas (en rouge).



# Chapitre 7

## Conclusion et perspectives

Dans cette conclusion, nous récapitulons les développements de cette thèse. Suivent quelques réflexions d'ordre épistémologique. Finalement, des perspectives de recherches sont évoquées.

### Récapitulons

Dans le chapitre 1, nous avons décrit différentes méthodes analytiques et numériques, discrètes ou continues, utilisées pour la modélisation des tissus. Dans le chapitre 2, nous avons dérivé un modèle continu basé sur le modèle des mélanges et détaillé certaines applications. Dans le chapitre 3, un modèle continu intégrable sur des géométries simples d'agrégats est construit, et calibré sur des données expérimentales. Le chapitre 4 exploite les trois premiers chapitres (en utilisant un modèle hybride discret-continu et des résultats du modèle des mélanges) dans le but d'interpréter des expériences portant sur les interactions entre cellules cancéreuses et macrophages, dans le cadre d'une collaboration avec des expérimentateurs de l'Institut Curie. Autres lieux, autres sujets, autres méthodes. Les chapitres 5 et 6 sont axés sur une approche de mécanique des milieux continus. Dans le chapitre 5, on calibre un modèle analytique d'élasticité non linéaire afin de modéliser la croissance de kystes de cellules souches, outil utilisé pour la production industrielle des cellules souches par nos collaborateurs à Bordeaux. Le chapitre 6 est plus dirigé vers une modélisation numérique de la mécanique dans le cadre d'une collaboration expérimentale sur la larve de la drosophile. On y cherche à corroborer un modèle analytique d'élasticité fondé sur la théorie de Föppl-von Kármán sur les couches minces, dans l'interprétation et le calibrage des expériences effectuées.

### Quelques réflexions personnelles

Des méthodes diverses ont donc été utilisées dans cette thèse. Une leçon importante est la nécessité d'une adaptation des méthodes de résolution par rapport au problème posé. En effet, notre méthodologie durant cette thèse a été une approche minimaliste. C'est-à-dire la recherche d'une interprétation minimale comportant le moins de paramètres à calibrer, selon les contraintes des données expérimentales et les contraintes matérielles et techniques. Par exemple, un long processus, non détaillé dans ce manuscrit, nous a conduit dans le chapitre 4 à utiliser un modèle hybride discret/continu. Une première approche a été d'utiliser le modèle des mélanges pour traiter la nucléation des agrégats macrophages-cellules cancéreuses. C'est un échantillon de ces essais qui a produit la figure 2.3. Malheureusement, les temps de calculs avec l'ordinateur utilisé étaient beaucoup trop importants. Puis nous avons utilisé une approche plus globale basée sur les équations de Smoluchowski décrite très succinctement dans le chapitre 3. Ici, il s'est avéré après longues vérifications qu'au contraire du modèle continu, les équations de Smoluchowski ne pouvaient pas être calibrées sur les expériences car elles ne prenaient pas en compte des phénomènes dus à la particularité de la géométrie de l'expérience. Finalement, l'oscillation entre ces deux pôles de modèle trop ou pas assez précis s'est stabilisée autour d'un juste milieu qui a consisté en un modèle hybride discret/continu, qui possédait des temps de calculs pas trop longs (au maximum 3-4 heures par simulation). Modèle auquel nous avons associé des résultats issus du modèle des mélanges. Arrivé là, les hypothèses simples (mais non simplistes) du chapitre 3 sur la croissance d'agrégats auront aussi été mises à rude épreuve.

Une deuxième leçon aura en effet été l'importance cruciale de la mise à l'épreuve des modèles théoriques par les expériences (je devrais remercier ici Daniel Riveline avec qui j'ai eu une discussion très courte mais très instructive sur le sujet alors que j'étais en M2). Chaque collaboration expérimentale a été fertile en surprises de devoir intégrer des éléments nouveaux parfois difficiles à expliquer (je pense notamment à l'irruption d'une dépendance de type fractal de la fraction volumique au nombre de cellules dans certains agrégats dans le chapitre 3, ou la dépendance aux contraintes radiales du taux de croissance des kystes au chapitre 5), mais nécessaires au bon calibrage du modèle. Le modèle théorique élaboré *a priori* aura toujours été une base solide sur lequel construire, mais très souvent pas suffisant après vérification expérimentale, nous obligeant à réfléchir sur les extensions possibles. Idéalement, chacune des hypothèses effectuées afin de répondre aux exigences des courbes expérimentales pourrait et devrait être testée, comme c'est le cas pour le modèle minimaliste du chapitre 4 qui cherche à expliquer de façon simple l'influence néfaste et contre-intuitive des macrophages sur la prolifération des cellules cancéreuses. Mais ce n'est pas toujours le cas. Il faudra donc attendre d'autres publications avant d'infirmer ou confirmer ces intuitions.

La troisième réflexion pourrait s'intituler : De l'utilité de la culture générale. En effet, comme écrit plus haut, chaque projet possède sa méthodologie propre. Un modèle englobant toute la réalité a beau être un Graal scientifique, les multiples contraintes (de temps, de minimisation du nombre de paramètres, de matériel, etc...) implique une flexibilité dans l'utilisation des différentes méthodes à disposition. Mais là vient la nécessité d'une culture générale scientifique, pour ne pas être frustré d'un problème intéressant par manque de moyens et de connaissances. Par chance, Jean-François et Martine en possèdent une.

La quatrième réflexion vient prendre le contrepied de la précédente et concerne la transmission des méthodes utilisées, problématique soulevée par Martine Ben Amar au cours de nos discussions pendant cette thèse. Les méthodes et les sujets sur lesquels travaillent les chercheurs sont différents. Chacun concocte son code dans son laboratoire, et peut avoir ou non l'occasion de le transmettre. La mise en accès libre ou sur demande d'un code nécessite aussi l'apprentissage de ce code par quelqu'un, ce qui prend du temps. Mais il existe de plus en plus de logiciels en libre service, ou payant. Ces logiciels permettent alors souvent à des non spécialistes de les utiliser, sans avoir à faire l'effort de se former dans un domaine (le codage) qui à ses premiers pas est accessible au commun des mortels mais qui rapidement peut se transformer en une spécialité à part entière. Malgré cela, ces logiciels ne permettent pas souvent d'étudier des cas très précis, pour lesquels la création d'un nouveau code est nécessaire. La nécessité d'un ingénieur informatique peut alors devenir une nécessité dans le groupe. Mais cette nécessité n'est pas toujours remplie, ce qui peut entraîner un désavantage compétitif substantiel. Par ailleurs, dépendre d'un tiers pour écrire le code correspondant au modèle qu'un physicien a imaginé n'est peut-être pas forcément aisé. Il n'y a peut-être pas de solution idéale, mais rassembler plusieurs problèmes dans un formalisme unique (c'est-à-dire non hybride) peut-être un début de solution. Certains logiciels, comme Comsol Multiphysics qui utilise les Éléments Finis, requièrent aussi une compréhension minimale du codage, mais permettent à des étudiants/chercheurs ne possédant aucune formation en Éléments Finis (comme moi) d'entreprendre des simulations assez complexes, et très diverses.

Enfin, il aura été très intéressant de collaborer avec des biologistes. En effet, les expériences en biologie sont souvent beaucoup moins contrôlées que les expériences effectuées par des physiciens. Mais ce sont aussi des expériences beaucoup plus riches. Leur aspect incontrôlé peut rebuter des physiciens théoriciens. Malgré cela, une quantité non négligeable (c'est un euphémisme) des expériences sur le vivant est effectuée par des biologistes. De ce fait, il paraît très intéressant d'élaborer des méthodes qui peuvent s'adapter à ce type d'expériences, afin de pouvoir exploiter la grande quantité de données quantitatives produite par ces expériences. C'est ce que nous avons essayé de faire au chapitre 4. Le développement de l'imagerie de précision concourt à faciliter ce type de collaboration.

## Perspectives

Cette thèse offre plusieurs perspectives de recherches. Tout d'abord, tous les projets sauf celui sur l'embryogenèse ont concerné des structures cellulaires *in vitro*. L'avantage à étudier des systèmes *in vitro* est la relative simplicité du système. Au contraire, les systèmes *in vivo* sont extrêmement complexes. Malgré cela, une approche de physicien consisterait à chercher des systèmes minimaux mais assez complexes capables de rendre compte des phénomènes *in vivo*. Et de chercher quels cas d'études *in vivo* pourraient se prêter à ce type de sujet. Récemment,

des modèles très simples de croissance de tumeurs ont été testés sur des données cliniques [373]. Dans le contexte de l'engouement pour la médecine de précision, il existe donc une "fenêtre d'opportunité" dans ce domaine, qui m'intéresse particulièrement.

Dans cette optique, un sujet qui n'a pas été abordé dans cette thèse est la modélisation de structures irrégulières dans le contexte oncologique. Débuté durant cette thèse le projet sur la modélisation des vaisseaux sanguins et des métastases avec un modèle continu n'a fourni que des résultats préliminaires, même si prometteurs. L'influence des nutriments sur la croissance des tumeurs a été développée dans ce manuscrit. Mais les cellules hypoxiques sont aussi plus enclines aux métastases, et plus résistantes aux thérapies. La répartition des nutriments dans la région de la tumeur *in vivo* est donc cruciale. La modélisation des vaisseaux sanguins est le sujet de plusieurs articles qui utilisent soit le modèle des mélanges (ou plus rapidement des méthodes de *phase field*) [127, 374, 375], soit des modèles hybrides [128, 376, 377, 378]. Mais les modèles des mélanges utilisés ne possèdent pas le comportement asymptotique correct, ce qui n'est peut-être pas gênant dans les temps étudiés par les articles plus haut, mais qui peut-être gênant. De façon intéressante, c'est justement ce point qui est exploité dans la Ref. [196]. Dans la continuité de la réflexion sur l'unification de différents phénomènes sous un formalisme unique, et par curiosité intellectuelle, il est intéressant de compléter le tableau échafaudé au chapitre 2 par la présence de vaisseaux sanguins avec un formalisme qui assure leur structure en embranchement. Les mêmes constats s'appliquent à la modélisation des métastases, et d'autres phénomènes observés durant le développement des tumeurs *in vivo*.



# Glossaire

**analyse transcriptomique** Le transcriptome est l'ensemble des ARN issus de la transcription du génome. L'analyse transcriptomique permet de déterminer les gènes actifs.. 56

**angiogenèse** Formation de nouveaux vaisseaux depuis un réseau préexistant. 53

**antigènes** Macro-molécules pouvant être reconnues par un anticorps ou une cellule du système immunitaire.. 52

**cytokines** Protéines qui permettent à des cellules d'agir à distance sur d'autres cellules. 53

**hématopoïèse** Ensemble des mécanismes qui assurent le remplacement continu et régulé des différentes cellules sanguines. 52



# Bibliographie

- [1] Descartes R. Oeuvres et lettres, Lettre au marquis de Newcastle du 23 novembre 1646. Gallimard ;
- [2] Barthez PJ. Nouveaux éléments de la science de l’homme. vol. 1. Germer-Baillière ; 1858.
- [3] Bichat X. Recherches physiologiques sur la vie et la mort. Delahays ; 1855.
- [4] Müller J. Handbuch der physiologie des menschen. vol. 2. J. Hölscher ; 1840. Available from : <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k9737966c/f17.item.texteImage>.
- [5] Thompson DW, Thompson DW. On growth and form. vol. 2. Cambridge university press Cambridge ; 1942.
- [6] (Quality) OH. Gene Expression Profiling Tests for Early-Stage Invasive Breast Cancer : A Health Technology Assessment. Ont Health Technol Assess Ser. 2020 ;6(20) :1–234.
- [7] Karolak A, Markov DA, McCawley LJ, Rejniak KA. Towards personalized computational oncology : from spatial models of tumour spheroids, to organoids, to tissues. Journal of The Royal Society Interface. 2018 ;15(138) :20170703.
- [8] Beacher FD, Mujica-Parodi LR, Gupta S, Ancora LA. Machine Learning Predicts Outcomes of Phase III Clinical Trials for Prostate Cancer. Algorithms. 2021 ;14(5). Available from : <https://www.mdpi.com/1999-4893/14/5/147>.
- [9] Kogan Y, Halevi-Tobias K, Elishmereni M, Vuk-Pavlović S, Agur Z. Reconsidering the paradigm of cancer immunotherapy by computationally aided real-time personalization. Cancer research. 2012 ;72(9) :2218–2227.
- [10] Lorz A, Lorenzi T, Hochberg ME, Clairambault J, Perthame B. Populational adaptive evolution, chemotherapeutic resistance and multiple anti-cancer therapies. ESAIM : Mathematical Modelling and Numerical Analysis. 2013 ;47(2) :377–399.
- [11] DePillis L, Eladdadi A, Radunskaya A. Modeling cancer-immune responses to therapy. Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics. 2014 ;41(5) :461–478.
- [12] Leder K, Pitter K, LaPlant Q, Hambarzumyan D, Ross BD, Chan TA, et al. Mathematical modeling of PDGF-driven glioblastoma reveals optimized radiation dosing schedules. Cell. 2014 ;156(3) :603–616.
- [13] Anderson AR, Quaranta V. Integrative mathematical oncology. Nature Reviews Cancer. 2008 ;8(3) :227–234.
- [14] Thomas ED, Lochte Jr HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. New England Journal of Medicine. 1957 ;257(11) :491–496.
- [15] Noor N, Shapira A, Edri R, Gal I, Wertheim L, Dvir T. 3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts. Advanced Science. 2019 ;6(11) :1900344.
- [16] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. cell. 2006 ;126(4) :663–676.
- [17] Sulston JE, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. Developmental biology. 1977 ;56(1) :110–156.

- [18] Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, et al. An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of human biology*. 2013 ;40(6) :463–471.
- [19] Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS biology*. 2016 ;14(8) :e1002533.
- [20] AAAS. The Cells in Your Body;. Available from : <http://sciencenetlinks.com/student-teacher-sheets/cells-your-body>.
- [21] Honda H, Yamanaka H, Eguchi G. Transformation of a polygonal cellular pattern during sexual maturation of the avian oviduct epithelium : computer simulation. *Development*. 1986 ;98(1) :1–19.
- [22] Shraiman BI. Mechanical feedback as a possible regulator of tissue growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005 ;102(9) :3318–3323.
- [23] Farhadifar R, Röper JC, Aigouy B, Eaton S, Jülicher F. The influence of cell mechanics, cell-cell interactions, and proliferation on epithelial packing. *Current Biology*. 2007 ;17(24) :2095–2104.
- [24] Lin SZ, Li B, Feng XQ. A dynamic cellular vertex model of growing epithelial tissues. *Acta Mechanica Sinica*. 2017 ;33(2) :250–259.
- [25] Dumond M, Boudaoud A. Physical models of plant morphogenesis. In : *Mathematical Modelling in Plant Biology*. Springer ; 2018. p. 1–14.
- [26] Ackermann J, Ben Amar M, Joanny JF. Multi-cellular aggregates, a model for living matter. *Physics Reports*, in press 2021. 2021 :1–53.
- [27] Ghaffarizadeh A, Heiland R, Friedman SH, Mumenthaler SM, Macklin P. PhysiCell : An open source physics-based cell simulator for 3-D multicellular systems. *PLoS computational biology*. 2018 ;14(2) :e1005991.
- [28] Durand-Smet P, Chastrette N, Guiroy A, Richert A, Berne-Dedieu A, Szecsi J, et al. A comparative mechanical analysis of plant and animal cells reveals convergence across kingdoms. *Biophysical journal*. 2014 ;107(10) :2237–2244.
- [29] Wang K, Sun X, Zhang Y, Zhang T, Zheng Y, Wei Y, et al. Characterization of cytoplasmic viscosity of hundreds of single tumour cells based on micropipette aspiration. *Royal Society open science*. 2019 ;6(3) :181707.
- [30] Nonomura M. Study on multicellular systems using a phase field model. *PloS one*. 2012 ;7(4) :e33501.
- [31] Kulawiak DA, Camley BA, Rappel WJ. Modeling contact inhibition of locomotion of colliding cells migrating on micropatterned substrates. *PLoS computational biology*. 2016 ;12(12) :e1005239.
- [32] Najem S, Grant M. Phase-field model for collective cell migration. *Physical Review E*. 2016 ;93(5) :052405.
- [33] Löber J, Ziebert F, Aranson IS. Collisions of deformable cells lead to collective migration. *Scientific reports*. 2015 ;5(1) :1–7.
- [34] Moure A, Gomez H. Phase-field modeling of individual and collective cell migration. *Archives of Computational Methods in Engineering*. 2021 ;28(2) :311–344.
- [35] Honda H, Yamanaka H, Eguchi G. Transformation of a polygonal cellular pattern during sexual maturation of the avian oviduct epithelium : computer simulation. *Development*. 1986 ;98(1) :1–19.
- [36] Cox S, Weaire D, Glazier JA. The rheology of two-dimensional foams. *Rheologica acta*. 2004 ;43(5) :442–448.
- [37] Nagpal R, Patel A, Gibson MC. Epithelial topology. *BioEssays*. 2008 ;30(3) :260–266.
- [38] Alim K, Hamant O, Boudaoud A. Regulatory role of cell division rules on tissue growth heterogeneity. *Frontiers in Plant Science*. 2012 ;3 :174.

- [39] Uyttewaal M, Burian A, Alim K, Landrein B, Borowska-Wykręt D, Dedieu A, et al. Mechanical stress acts via katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in *Arabidopsis*. *Cell*. 2012;149(2) :439–451.
- [40] Louveaux M, Julien JD, Mirabet V, Boudaoud A, Hamant O. Cell division plane orientation based on tensile stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(30) :E4294–E4303.
- [41] Gibson MC, Patel AB, Nagpal R, Perrimon N. The emergence of geometric order in proliferating metazoan epithelia. *Nature*. 2006;442(7106) :1038–1041.
- [42] Chiou KK, Hufnagel L, Shraiman BI. Mechanical stress inference for two dimensional cell arrays. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(5) :e1002512.
- [43] Puliafito A, Hufnagel L, Neveu P, Streichan S, Sigal A, Fygenson DK, et al. Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(3) :739–744.
- [44] Streichan SJ, Hoerner CR, Schneidt T, Holzer D, Hufnagel L. Spatial constraints control cell proliferation in tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(15) :5586–5591.
- [45] Bi D, Yang X, Marchetti MC, Manning ML. Motility-driven glass and jamming transitions in biological tissues. *Physical Review X*. 2016;6(2) :021011.
- [46] Bielmeier C, Alt S, Weichselberger V, La Fortezza M, Harz H, Jülicher F, et al. Interface contractility between differently fated cells drives cell elimination and cyst formation. *Current Biology*. 2016;26(5) :563–574.
- [47] Aegerter-Wilmsen T, Smith AC, Christen AJ, Aegerter CM, Hafen E, Basler K. Exploring the effects of mechanical feedback on epithelial topology. *Development*. 2010;137(3) :499–506.
- [48] Lin SZ, Li B, Lan G, Feng XQ. Activation and synchronization of the oscillatory morphodynamics in multicellular monolayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(31) :8157–8162.
- [49] Lin SZ, Li B, Xu GK, Feng XQ. Collective dynamics of cancer cells confined in a confluent monolayer of normal cells. *Journal of Biomechanics*. 2017;52 :140–147.
- [50] Lin SZ, Li B, Feng XQ. A dynamic cellular vertex model of growing epithelial tissues. *Acta Mechanica Sinica*. 2017;33(2) :250–259.
- [51] Lin SZ, Ye S, Xu GK, Li B, Feng XQ. Dynamic migration modes of collective cells. *Biophysical journal*. 2018;115(9) :1826–1835.
- [52] Lin SZ, Bi D, Li B, Feng XQ. Dynamic instability and migration modes of collective cells in channels. *Journal of the Royal Society Interface*. 2019;16(156) :20190258.
- [53] Sagner A, Merkel M, Aigouy B, Gaebel J, Brankatschk M, Jülicher F, et al. Establishment of global patterns of planar polarity during growth of the *Drosophila* wing epithelium. *Current Biology*. 2012;22(14) :1296–1301.
- [54] Sui L, Alt S, Weigert M, Dye N, Eaton S, Jug F, et al. Differential lateral and basal tension drive folding of *Drosophila* wing discs through two distinct mechanisms. *Nature communications*. 2018;9(1) :1–13.
- [55] Haisenberg CP, Bellaïche Y. Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell*. 2013;153 :948–962.
- [56] Etournay R, Popovic M, Merkel M, Amitabha N, Blasse C, Aigouy B, et al. Interplay of cell dynamics and epithelial tension during morphogenesis of the *drosophila* pupal wing. *eLife*. 2015;4 :4 :e07090.
- [57] Hannezo E, Prost J, Joanny JF. Theory of epithelial sheet morphology in three dimensions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(1) :27–32.

- [58] Okuda S, Inoue Y, Adachi T. Three-dimensional vertex model for simulating multicellular morphogenesis. *Biophysics and physicobiology*. 2015 ;12 :13–20.
- [59] Messal HA, Alt S, Ferreira RM, Gribben C, Wang VMY, Cotoi CG, et al. Tissue curvature and apicobasal mechanical tension imbalance instruct cancer morphogenesis. *Nature*. 2019 ;566(7742) :126–130.
- [60] Okuda S, Miura T, Inoue Y, Adachi T, Eiraku M. Combining Turing and 3D vertex models reproduces autonomous multicellular morphogenesis with undulation, tubulation, and branching. *Scientific reports*. 2018 ;8(1) :1–15.
- [61] Murisic N, Hakim V, Kevrekidis IG, Shvartsman SY, Audoly B. From discrete to continuum models of three-dimensional deformations in epithelial sheets. *Biophysical journal*. 2015 ;109(1) :154–163.
- [62] Guirao B, Rigaus F, Bosveld, Bailles A, Lopez-Gay J, Ishihara S, Sugimura K, et al. Unified quantitative characterization of epithelial tissue development. *eLife*. 2015 ;4 :4 :e08519.
- [63] Merkel M, Etoiray R, Popović M, Salbreux G, Eaton S, Jülicher F. Triangles bridge the scales : Quantifying cellular contributions to tissue deformation. *Physical Review E*. 2017 ;95(3) :032401.
- [64] Grossman D, Joanny JF. Instabilities and geometry of growing tissue. *arXiv preprint arXiv :210805326*. 2021.
- [65] Staple DB, Farhadifar R, Röper JC, Aigouy B, Eaton S, Jülicher F. Mechanics and remodelling of cell packings in epithelia. *The European Physical Journal E*. 2010 ;33(2) :117–127.
- [66] Graner F, Glazier JA. Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended Potts model. *Physical review letters*. 1992 ;69(13) :2013.
- [67] Weaire DL, Hutzler S. *The physics of foams*. Oxford University Press ; 2001.
- [68] Mirams GR, Arthurs CJ, Bernabeu MO, Bordas R, Cooper J, Corrias A, et al. Chaste : an open source C++ library for computational physiology and biology. *PLoS computational biology*. 2013 ;9(3) :e1002970.
- [69] Potts RB. Some generalized order-disorder transformations. In : *Mathematical proceedings of the cambridge philosophical society*. vol. 48. Cambridge University Press ; 1952. p. 106–109.
- [70] Glazier JA, Anderson MP, Grest GS. Coarsening in the two-dimensional soap froth and the large-Q Potts model : a detailed comparison. *Philosophical Magazine B*. 1990 ;62(6) :615–645.
- [71] Glazier JA, Graner F. Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells. *Physical Review E*. 1993 ;47(3) :2128.
- [72] Stott EL, Britton NF, Glazier JA, Zajac M. Stochastic simulation of benign avascular tumour growth using the Potts model. *Mathematical and Computer Modelling*. 1999 ;30(5-6) :183–198.
- [73] Cerruti B, Puliafito A, Shewan AM, Yu W, Combes AN, Little MH, et al. Polarity, cell division, and out-of-equilibrium dynamics control the growth of epithelial structures. *Journal of Cell Biology*. 2013 ;203(2) :359–372.
- [74] Rubenstein BM, Kaufman LJ. The role of extracellular matrix in glioma invasion : a cellular Potts model approach. *Biophysical journal*. 2008 ;95(12) :5661–5680.
- [75] Scianna M, Preziosi L. Multiscale developments of the cellular Potts model. *Multiscale Modeling & Simulation*. 2012 ;10(2) :342–382.
- [76] Scianna M, Preziosi L, Wolf K. A Cellular Potts Model simulating cell migration on and in matrix environments. *Mathematical Biosciences & Engineering*. 2013 ;10(1) :235.
- [77] Swat MH, Thomas GL, Belmonte JM, Shirinifard A, Hmeljak D, Glazier JA. Multi-scale modeling of tissues using CompuCell3D. *Methods in cell biology*. 2012 ;110 :325–366.

- [78] Starruß J, De Back W, Bruschi L, Deutsch A. Morpheus : a user-friendly modeling environment for multiscale and multicellular systems biology. *Bioinformatics*. 2014 ;30(9) :1331–1332.
- [79] Basan M, Prost J, Joanny JF, Elgeti J. Dissipative particle dynamics simulations for biological tissues : rheology and competition. *Physical biology*. 2011 ;8(2) :026014.
- [80] La Porta CA, Ghilardi A, Pasini M, Laurson L, Alava MJ, Zapperi S, et al. Osmotic stress affects functional properties of human melanoma cell lines. *The European Physical Journal Plus*. 2015 ;130(4) :64.
- [81] Van Liedekerke P, Neitsch J, Johann T, Alessandri K, Nassoy P, Drasdo D. Quantitative agent-based modeling reveals mechanical stress response of growing tumor spheroids is predictable over various growth conditions and cell lines. *PLoS computational biology*. 2019 ;15(3) :e1006273.
- [82] Montel F, Delarue M, Elgeti J, Malaquin L, Basan M, Risler T, et al. Stress clamp experiments on multicellular tumor spheroids. *Physical review letters*. 2011 ;107(18) :188102.
- [83] Büscher T, Ganai N, Gompper G, Elgeti J. Tissue evolution : Mechanical interplay of adhesion, pressure, and heterogeneity. *New Journal of Physics*. 2020 ;22(3) :033048.
- [84] Ganai N, Büscher T, Gompper G, Elgeti J. Mechanics of tissue competition : interfaces stabilize coexistence. *New Journal of Physics*. 2019 ;21(6) :063017.
- [85] Hoehme S, Brulport M, Bauer A, Bedawy E, Schormann W, Hermes M, et al. Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 ;107(23) :10371–10376.
- [86] Hoehme S, Drasdo D. A cell-based simulation software for multi-cellular systems. *Bioinformatics*. 2010 ;26(20) :2641–2642.
- [87] Deutsch A, Dormann S, et al. Cellular automaton modeling of biological pattern formation. Springer; 2005.
- [88] Zabolitzky J, Stauffer D. Simulation of large Eden clusters. *Physical Review A*. 1986 ;34(2) :1523.
- [89] Batchelor M, Henry B. Limits to Eden growth in two and three dimensions. *Physics Letters A*. 1991 ;157(4-5) :229–236.
- [90] Block M, Schöll E, Drasdo D. Classifying the expansion kinetics and critical surface dynamics of growing cell populations. *Physical review letters*. 2007 ;99(24) :248101.
- [91] Adenis L, Gontran E, Deroulers C, Grammaticos B, Juchaux M, Seksek O, et al. Experimental and modeling study of the formation of cell aggregates with differential substrate adhesion. *Plos one*. 2020 ;15(2) :e0222371.
- [92] Mahlbacher G, Curtis LT, Lowengrub J, Frieboes HB. Mathematical modeling of tumor-associated macrophage interactions with the cancer microenvironment. *J Immunother Cancer*. 2018 01 ;6(1) :10.
- [93] Kansal AR, Torquato S, Harsh G, Chiocca E, Deisboeck T. Simulated brain tumor growth dynamics using a three-dimensional cellular automaton. *Journal of theoretical biology*. 2000 ;203(4) :367–382.
- [94] Brüningk SC, Ziegenhein P, Rivens I, Oelfke U, ter Haar G. A cellular automaton model for spheroid response to radiation and hyperthermia treatments. *Scientific reports*. 2019 ;9(1) :1–12.
- [95] Marchetti MC, Joanny JF, Ramaswamy S, Liverpool TB, Prost J, Rao M, et al. Hydrodynamics of soft active matter. *Reviews of Modern Physics*. 2013 ;85(3) :1143.
- [96] Ackermann J, Qu PQ, LeGoff L, Amar MB. Modeling the mechanics of growing epithelia with a bilayer plate theory. *bioRxiv*. 2021.
- [97] Boudon F, Chopard J, Ali O, Gilles B, Hamant O, Boudaoud A, et al. A computational framework for 3D mechanical modeling of plant morphogenesis with cellular resolution. *PLoS computational biology*. 2015 ;11(1) :e1003950.

- [98] Truesdell C, Toupin R. The classical field theories. In : Principles of classical mechanics and field theory/Prinzipien der Klassischen Mechanik und Feldtheorie. Springer; 1960. p. 226–858.
- [99] Truesdell C, Noll W. The non-linear field theories of mechanics. In : The non-linear field theories of mechanics. Springer; 2004. p. 1–579.
- [100] Atkin RJ, Craine R. Continuum theories of mixtures : basic theory and historical development. The Quarterly Journal of Mechanics and Applied Mathematics. 1976;29(2) :209–244.
- [101] Atkin R, Craine R. Continuum theories of mixtures : applications. IMA Journal of Applied Mathematics. 1976;17(2) :153–207.
- [102] Bowen R. Theory of Mixtures, vol. III. Academic Press New York; 1976.
- [103] Bowen RM. Incompressible porous media models by use of the theory of mixtures. International Journal of Engineering Science. 1980;18(9) :1129–1148.
- [104] Strutt JWLR. Some general theorems relating to vibrations. Proceedings of the London Mathematical Society. 1871;1(1) :357–368.
- [105] Korteweg D. XVII. On a general theorem of the stability of the motion of a viscous fluid. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science. 1883;16(98) :112–118.
- [106] Rayleigh L. LXV. On the motion of a viscous fluid. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science. 1913;26(154) :776–786.
- [107] Onsager L. Reciprocal relations in irreversible processes. I. Physical review. 1931;37(4) :405.
- [108] Onsager L. Reciprocal relations in irreversible processes. II. Physical review. 1931;38(12) :2265.
- [109] Doi M, Onuki A. Dynamic coupling between stress and composition in polymer solutions and blends. Journal de Physique II. 1992;2(8) :1631–1656.
- [110] Tree DR, Delaney KT, Ceniceros HD, Iwama T, Fredrickson GH. A multi-fluid model for microstructure formation in polymer membranes. Soft Matter. 2017;13(16) :3013–3030.
- [111] Tree DR, Dos Santos LF, Wilson CB, Scott TR, Garcia JU, Fredrickson GH. Mass-transfer driven spinodal decomposition in a ternary polymer solution. Soft matter. 2019;15(23) :4614–4628.
- [112] Byrne H, Preziosi L. Modelling solid tumour growth using the theory of mixtures. Mathematical medicine and biology : a journal of the IMA. 2003;20(4) :341–366.
- [113] Balois T, Amar MB. Morphology of melanocytic lesions in situ. Scientific reports. 2014;4 :3622.
- [114] Balois T, Chatelain C, Ben Amar M. Patterns in melanocytic lesions : impact of the geometry on growth and transport inside the epidermis. Journal of The Royal Society Interface. 2014;11(97) :20140339.
- [115] Olmeda F, Amar MB. Clonal pattern dynamics in tumor : the concept of cancer stem cells. Scientific Reports. 2019;9(1) :1–18.
- [116] Milo R, Phillips R. Cell biology by the numbers. Garland Science; 2015.
- [117] fondation I. Density;. Available from : <https://itis.swiss/virtual-population/tissue-properties/database/density/>.
- [118] Sciumè G. Mechanistic modeling of vascular tumor growth : an extension of Biot’s theory to hierarchical bi-compartment porous medium systems. Acta Mechanica. 2021;232(4) :1445–1478.
- [119] Cahn JW, Hilliard JE. Free energy of a nonuniform system. I. Interfacial free energy. The Journal of chemical physics. 1958;28(2) :258–267.
- [120] Hart EW. Thermodynamics of inhomogeneous systems. Physical Review. 1959;113(2) :412.

- [121] Flory PJ. Thermodynamics of high polymer solutions. *The Journal of chemical physics*. 1942;10(1) :51–61.
- [122] Huggins ML. Solutions of long chain compounds. *The Journal of chemical physics*. 1941;9(5) :440–440.
- [123] Grosberg A, Joanny JF. Nonequilibrium statistical mechanics of mixtures of particles in contact with different thermostats. *Physical Review E*. 2015;92(3) :032118.
- [124] Ilker E, Joanny JF. Phase separation and nucleation in mixtures of particles with different temperatures. *Physical Review Research*. 2020;2(2) :023200.
- [125] Hoshino T, Liu MW, Wu KA, Chen HY, Tsuruyama T, Komura S. Pattern formation of skin cancers : Effects of cancer proliferation and hydrodynamic interactions. *Phys Rev E*. 2019 3;99(3-1) :032416.
- [126] Landau LD, Lifshitz EM. *Statistical Physics : Volume 5*. vol. 5. Elsevier; 2013.
- [127] Lima E, Oden J, Almeida R. A hybrid ten-species phase-field model of tumor growth. *Mathematical Models and Methods in Applied Sciences*. 2014;24(13) :2569–2599.
- [128] Frieboes HB, Jin F, Chuang YL, Wise SM, Lowengrub JS, Cristini V. Three-dimensional multispecies nonlinear tumor growth—II : tumor invasion and angiogenesis. *Journal of theoretical biology*. 2010;264(4) :1254–1278.
- [129] Le Maout V, Alessandri K, Gurchenkov B, Bertin H, Nassoy P, Sciumè G. Role of mechanical cues and hypoxia on the growth of tumor cells in strong and weak confinement : A dual in vitro–in silico approach. *Science advances*. 2020;6(13) :eaaz7130.
- [130] Chatelain C, Balois T, Ciarletta P, Amar MB. Emergence of microstructural patterns in skin cancer : a phase separation analysis in a binary mixture. *New Journal of Physics*. 2011;13(11) :115013.
- [131] Rowlinson JS, Widom B. *Molecular theory of capillarity*. Courier Corporation; 2013.
- [132] Chaikin PM, Lubensky TC. *Principles of condensed matter physics*. vol. 10. Cambridge university press Cambridge; 1995.
- [133] Foty RA, Steinberg MS. The differential adhesion hypothesis : a direct evaluation. *Developmental biology*. 2005;278(1) :255–263.
- [134] Steinberg MS. Differential adhesion in morphogenesis : a modern view. *Current opinion in genetics & development*. 2007;17(4) :281–286.
- [135] Brodland GW. The differential interfacial tension hypothesis (DITH) : a comprehensive theory for the self-rearrangement of embryonic cells and tissues. *J Biomech Eng*. 2002;124(2) :188–197.
- [136] Manning ML, Foty RA, Steinberg MS, Schoetz EM. Coaction of intercellular adhesion and cortical tension specifies tissue surface tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(28) :12517–12522.
- [137] Song W, Tung CK, Lu YC, Pardo Y, Wu M, Das M, et al. Dynamic self-organization of microwell-aggregated cellular mixtures. *Soft matter*. 2016;12(26) :5739–5746.
- [138] Ranft J, Basan M, Elgeti J, Joanny JF, Prost J, Jülicher F. Fluidization of tissues by cell division and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(49) :20863–20868.
- [139] Ambrosi D, Preziosi L. On the closure of mass balance models for tumor growth. *Mathematical Models and Methods in Applied Sciences*. 2002;12(05) :737–754.
- [140] Brauns F, Halatek J, Frey E. Phase-space geometry of reaction–diffusion dynamics. *arXiv preprint arXiv :181208684*. 2018;20.
- [141] Echeverría-Alar S, Clerc M. Labyrinthine patterns transitions. *Physical Review Research*. 2020;2(4) :042036.

- [142] Ranft J, Prost J, Jülicher F, Joanny JF. Tissue dynamics with permeation. *The European Physical Journal E*. 2012;35(6) :46.
- [143] Preziosi L, Farina A. On Darcy's law for growing porous media. *International Journal of Non-Linear Mechanics*. 2002;37(3) :485–491.
- [144] Perthame B. Some mathematical models of tumor growth. *Université Pierre et Marie Curie-Paris*. 2016;6.
- [145] Amar MB, Bianca C. Onset of nonlinearity in a stochastic model for auto-chemotactic advancing epithelia. *Scientific reports*. 2016;6 :33849.
- [146] Koay EJ, Lee Y, Cristini V, Lowengrub JS, Kang Y, San Lucas FA, et al. A visually apparent and quantifiable CT imaging feature identifies biophysical subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(23) :5883–5894.
- [147] Doi M, Edwards SF. *The theory of polymer dynamics*. vol. 73. oxford university press; 1988.
- [148] Delarue M, Montel F, Caen O, Elgeti J, Siaugue JM, Vignjevic D, et al. Mechanical control of cell flow in multicellular spheroids. *Physical review letters*. 2013;110(13) :138103.
- [149] Wise SM, Lowengrub JS, Frieboes HB, Cristini V. Three-dimensional multispecies nonlinear tumor growth—I : model and numerical method. *Journal of theoretical biology*. 2008;253(3) :524–543.
- [150] Ellem K, Kay G. The nature of conditioning nutrients for human malignant melanoma cultures. *Journal of cell science*. 1983;62(1) :249–266.
- [151] Vazquez A, Kamphorst JJ, Markert EK, Schug ZT, Tardito S, Gottlieb E. Cancer metabolism at a glance. *Journal of Cell Science*. 2016;129(18) :3367–3373.
- [152] Izuishi K, Kato K, Ogura T, Kinoshita T, Esumi H. Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation : possible new biochemical target for cancer therapy. *Cancer research*. 2000;60(21) :6201–6207.
- [153] Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia*. 2015;3 :83.
- [154] Wenger RH, Kurtcuoglu V, Scholz CC, Marti HH, Hoogewijs D. Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia*. 2015;3 :35.
- [155] Greenspan H. Models for the growth of a solid tumor by diffusion. *Studies in Applied Mathematics*. 1972;51(4) :317–340.
- [156] Maggelakis S, Adam J. Mathematical model of prevascular growth of a spherical carcinoma. *Mathematical and Computer Modelling*. 1990;13(5) :23–38.
- [157] Thomlinson R, Gray L. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *British journal of cancer*. 1955;9(4) :539.
- [158] Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia : definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(4) :266–276.
- [159] Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*. 2007;129(3) :465–472.
- [160] Tang PS. On the rate of oxygen consumption by tissues and lower organisms as a function of oxygen tension. *The Quarterly Review of Biology*. 1933;8(3) :260–274.
- [161] Foy BD, Rotem A, Toner M, Tompkins RG, Yarmush ML. A device to measure the oxygen uptake rate of attached cells : importance in bioartificial organ design. *Cell Transplantation*. 1994;3(6) :515–527.
- [162] Magliaro C, Mattei G, Iacoangeli F, Corti A, Piemonte V, Ahluwalia A. Oxygen consumption characteristics in 3D constructs depend on cell density. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2019;7 :251.

- [163] McElwain D, Ponzio P. A model for the growth of a solid tumor with non-uniform oxygen consumption. *Mathematical Biosciences*. 1977 ;35(3-4) :267–279.
- [164] Pörtner R, Bohmann A, Lüdemann I, Märkl H. Estimation of specific glucose uptake rates in cultures of hybridoma cells. *Journal of biotechnology*. 1994 ;34(3) :237–246.
- [165] Pörtner R, Schäfer T. Modelling hybridoma cell growth and metabolism—a comparison of selected models and data. *Journal of biotechnology*. 1996 ;49(1-3) :119–135.
- [166] Popel AS. Theory of oxygen transport to tissue. *Critical reviews in biomedical engineering*. 1989 ;17(3) :257.
- [167] Van Brakel J, Heertjes P. Analysis of diffusion in macroporous media in terms of a porosity, a tortuosity and a constrictivity factor. *International Journal of Heat and Mass Transfer*. 1974 ;17(9) :1093–1103.
- [168] Longmuir IS, Bourke A. The measurement of the diffusion of oxygen through respiring tissue. *Biochem J*. 1960 8 ;76 :225–229.
- [169] Carlsson J, Acker H. Influence of the oxygen pressure in the culture medium on the oxygenation of different types of multicellular spheroids. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*. 1985 ;11(3) :535–546.
- [170] Joseph WL, Morton DL, Adkins PC. Prognostic significance of tumor doubling time in evaluating operability in pulmonary metastatic disease. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1971 ;61(1) :23–32.
- [171] Foty RA, Pflieger CM, Forgacs G, Steinberg MS. Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior. *Development*. 1996 ;122(5) :1611–1620.
- [172] Huang YL, Shiao C, Wu C, Segall JE, Wu M. The architecture of co-culture spheroids regulates tumor invasion within a 3D extracellular matrix. *Biophysical reviews and letters*. 2020 ;15(03) :131–141.
- [173] Foty RA, Forgacs G, Pflieger CM, Steinberg MS. Liquid properties of embryonic tissues : Measurement of interfacial tensions. *Physical review letters*. 1994 ;72(14) :2298.
- [174] Butler CM, Foty RA. Measurement of aggregate cohesion by tissue surface tensiometry. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2011 ;50 :e2739.
- [175] Alessandri K, Sarangi BR, Gurchenkov VV, Sinha B, Kießling TR, Fetler L, et al. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 ;110(37) :14843–14848.
- [176] Harimoto T, Singer ZS, Velazquez OS, Zhang J, Castro S, Hinchliffe TE, et al. Rapid screening of engineered microbial therapies in a 3D multicellular model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019 ;116(18) :9002–9007.
- [177] Netti PA, Baxter LT, Boucher Y, Skalak R, Jain RK. Macro-and microscopic fluid transport in living tissues : Application to solid tumors. *AIChE journal*. 1997 ;43(3) :818–834.
- [178] Dolega ME, Monnier S, Brunel B, Joanny JF, Recho P, Cappello G. Extracellular matrix in multicellular aggregates acts as a pressure sensor controlling cell proliferation and motility. *Elife*. 2021 ;10 :e63258.
- [179] Hansen J, Yellin W. NMR and Infrared Spectroscopic Studies of Stratum Corneum Hydration. In : *Water structure at the water-polymer interface*. Springer; 1972. p. 19–28.
- [180] Anderson R, Cassidy J, Hansen J, Yellin W. Hydration of stratum corneum. *Biopolymers : Original Research on Biomolecules*. 1973 ;12(12) :2789–2802.
- [181] Wiig H, Reed RK, Tenstad O. Interstitial fluid pressure, composition of interstitium, and interstitial exclusion of albumin in hypothyroid rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2000 ;278(5) :H1627–H1639.

- [182] Van Kemenade P, Huyghe J, Douven L. Triphasic FE modeling of the skin water barrier. *Transport in porous media*. 2003 ;50(1) :93–109.
- [183] Miller SJ. Biology of basal cell carcinoma (Part I). *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1991 ;24(1) :1–13.
- [184] Schötz EM, Burdine RD, Jülicher F, Steinberg MS, Heisenberg CP, Foty RA. Quantitative differences in tissue surface tension influence zebrafish germ layer positioning. *HFSP journal*. 2008 ;2(1) :42–56.
- [185] Hegedüs B, Marga F, Jakab K, Sharpe-Timms KL, Forgacs G. The interplay of cell-cell and cell-matrix interactions in the invasive properties of brain tumors. *Biophysical journal*. 2006 ;91(7) :2708–2716.
- [186] Yu M, Mahtabfar A, Beelen P, Demiryurek Y, Shreiber DI, Zahn JD, et al. Coherent timescales and mechanical structure of multicellular aggregates. *Biophysical journal*. 2018 ;114(11) :2703–2716.
- [187] Mehrara E, Forssell-Aronsson E, Ahlman H, Bernhardt P. Specific growth rate versus doubling time for quantitative characterization of tumor growth rate. *Cancer research*. 2007 ;67(8) :3970–3975.
- [188] Herculano-Houzel S. Scaling of brain metabolism with a fixed energy budget per neuron : implications for neuronal activity, plasticity and evolution. *PloS one*. 2011 ;6(3) :e17514.
- [189] Hystad ME, Rofstad EK. Oxygen consumption rate and mitochondrial density in human melanoma monolayer cultures and multicellular spheroids. *International journal of cancer*. 1994 ;57(4) :532–537.
- [190] Gonzalez-Molina J, Zhang X, Borghesan M, da Silva JM, Awan M, Fuller B, et al. Extracellular fluid viscosity enhances liver cancer cell mechanosensing and migration. *Biomaterials*. 2018 ;177 :113–124.
- [191] Guyon E, Hulin JP, Petit L, Mitescu CD, et al. *Physical hydrodynamics*. Oxford university press ; 2001.
- [192] Kruse K, Joanny J, Jülicher F, Prost J. Contractility and retrograde flow in lamellipodium motion. *Physical biology*. 2006 ;3(2) :130.
- [193] Bearer EL, Lowengrub JS, Frieboes HB, Chuang YL, Jin F, Wise SM, et al. Multiparameter computational modeling of tumor invasion. *Cancer research*. 2009 ;69(10) :4493–4501.
- [194] Cristini V, Frieboes HB, Gatenby R, Caserta S, Ferrari M, Sinek J. Morphologic instability and cancer invasion. *Clinical Cancer Research*. 2005 ;11(19) :6772–6779.
- [195] Cristini V, Li X, Lowengrub JS, Wise SM. Nonlinear simulations of solid tumor growth using a mixture model : invasion and branching. *Journal of mathematical biology*. 2009 ;58(4-5) :723.
- [196] Travasso RD, Poiré EC, Castro M, Rodriguez-Manzaneque JC, Hernández-Machado A. Tumor angiogenesis and vascular patterning : a mathematical model. *PloS one*. 2011 ;6(5) :e19989.
- [197] Vilanova G, Colominas I, Gomez H. Capillary networks in tumor angiogenesis : From discrete endothelial cells to phase-field averaged descriptions via isogeometric analysis. *International journal for numerical methods in biomedical engineering*. 2013 ;29(10) :1015–1037.
- [198] Vilanova G, Colominas I, Gomez H. A mathematical model of tumour angiogenesis : growth, regression and regrowth. *Journal of The Royal Society Interface*. 2017 ;14(126) :20160918.
- [199] Multiphysics C. *Introduction to COMSOL multiphysics®*. COMSOL Multiphysics, Burlington, MA, accessed Feb. 1998 ;9 :2018.
- [200] Dolega M, Zurlo G, Le Goff M, Greda M, Verdier C, Joanny JF, et al. Mechanical behavior of multi-cellular spheroids under osmotic compression. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*. 2020 :104205.
- [201] Lee BH, Kim MH, Lee JH, Seliktar D, Cho NJ, Tan LP. Modulation of Huh7. 5 spheroid formation and functionality using modified PEG-based hydrogels of different stiffness. *PloS one*. 2015 ;10(2) :e0118123.
- [202] Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *Journal of the Royal Society Interface*. 2017 ;14(127) :20160877.

- [203] Douezan S, Guevorkian K, Naouar R, Dufour S, Cuvelier D, Brochard-Wyart F. Spreading dynamics and wetting transition of cellular aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(18) :7315–7320.
- [204] Douezan S, Dumond J, Brochard-Wyart F. Wetting transitions of cellular aggregates induced by substrate rigidity. *Soft Matter*. 2012;8(17) :4578–4583.
- [205] Von Ahrens D, Bhagat TD, Nagrath D, Maitra A, Verma A. The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *Journal of hematology & oncology*. 2017;10(1) :1–8.
- [206] Quan Q, Wang X, Lu C, Ma W, Wang Y, Xia G, et al. Cancer stem-like cells with hybrid epithelial/mesenchymal phenotype leading the collective invasion. *Cancer science*. 2020;111(2) :467.
- [207] La Porta CA, Zapperi S, Sethna JP. Senescent cells in growing tumors : population dynamics and cancer stem cells. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(1) :e1002316.
- [208] Lowengrub JS, Frieboes HB, Jin F, Chuang YL, Li X, Macklin P, et al. Nonlinear modelling of cancer : bridging the gap between cells and tumours. *Nonlinearity*. 2009;23(1) :R1.
- [209] Nikolaev M, Mitrofanova O, Broguiere N, Geraldo S, Dutta D, Tabata Y, et al. Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis. *Nature*. 2020;585(7826) :574–578.
- [210] Nunes AS, Barros AS, Costa EC, Moreira AF, Correia IJ. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnology and bioengineering*. 2019;116(1) :206–226.
- [211] Bassi G, Grimaudo MA, Panseri S, Montesi M. Advanced multi-dimensional cellular models as emerging reality to reproduce In Vitro the human body complexity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(3) :1195.
- [212] Vanherberghen B, Manneberg O, Christakou A, Frisk T, Ohlin M, Hertz HM, et al. Ultrasound-controlled cell aggregation in a multi-well chip. *Lab on a Chip*. 2010;10(20) :2727–2732.
- [213] Alessandri K, Sarangi BR, Gurchenkov VV, Sinha B, Kießling TR, Fetler L, et al. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(37) :14843–14848.
- [214] Sontheimer-Phelps A, Hassell BA, Ingber DE. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nature Reviews Cancer*. 2019;19(2) :65–81.
- [215] Sart S, Tomasi RFX, Amselem G, Baroud CN. Multiscale cytometry and regulation of 3D cell cultures on a chip. *Nature communications*. 2017;8(1) :1–13.
- [216] Carlsson J, Yuhas J. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Spheroids in cancer research*. 1984 :1–23.
- [217] Costa EC, de Melo-Diogo D, Moreira AF, Carvalho MP, Correia IJ. Spheroids formation on non-adhesive surfaces by liquid overlay technique : Considerations and practical approaches. *Biotechnology journal*. 2018;13(1) :1700417.
- [218] Carlsson J, Nilsson K, Westermark B, Ponten J, Sundström C, Larsson E, et al. Formation and growth of multicellular spheroids of human origin. *International journal of cancer*. 1983;31(5) :523–533.
- [219] Folkman J, Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *The Journal of experimental medicine*. 1973;138(4) :745–753.
- [220] Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 1971;46(1) :113–120.
- [221] Delarue M, Montel F, Vignjevic D, Prost J, Joanny JF, Cappello G. Compressive stress inhibits proliferation in tumor spheroids through a volume limitation. *Biophysical journal*. 2014;107(8) :1821–1828.

- [222] Helmlinger G, Netti PA, Lichtenbeld HC, Melder RJ, Jain RK. Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nature biotechnology*. 1997;15(8) :778–783.
- [223] Li CK. The glucose distribution in 9L rat brain multicell tumor spheroids and its effect on cell necrosis. *cancer*. 1982;50(10) :2066–2073.
- [224] Li CK. The role of glucose in the growth of 9L multicell tumor spheroids. *Cancer*. 1982;50(10) :2074–2078.
- [225] Barisam M, Saidi MS, Kashaninejad N, Nguyen NT. Prediction of necrotic core and hypoxic zone of multicellular spheroids in a microbio reactor with a u-shaped barrier. *Micromachines*. 2018;9(3) :94.
- [226] Däster S, Amatruda N, Calabrese D, Ivanek R, Turrini E, Droeser RA, et al. Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. *Oncotarget*. 2017;8(1) :1725.
- [227] Mayneord WV. On a law of growth of Jensen's rat sarcoma. *The American Journal of Cancer*. 1932;16(4) :841–846.
- [228] Looney W, Trefil JS, Schaffner J, Kovacs C, Hopkins H. Solid tumor models for the assessment of different treatment modalities : I. Radiation-induced changes in growth rate characteristics of a solid tumor model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975;72(7) :2662–2666.
- [229] Murray PJ, Edwards CM, Tindall MJ, Maini PK. From a discrete to a continuum model of cell dynamics in one dimension. *Physical Review E*. 2009;80(3) :031912.
- [230] Greenspan H. Models for the growth of a solid tumor by diffusion. *Studies in Applied Mathematics*. 1972;51(4) :317–340.
- [231] Ward JP, King J. Mathematical modelling of avascular-tumour growth. *Mathematical Medicine and Biology : A Journal of the IMA*. 1997;14(1) :39–69.
- [232] Delarue M, Joanny JF, Jülicher F, Prost J. Stress distributions and cell flows in a growing cell aggregate. *Interface focus*. 2014;4(6) :20140033.
- [233] Chaix E, Guillaume C, Guillard V. Oxygen and carbon dioxide solubility and diffusivity in solid food matrices : a review of past and current knowledge. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014;13(3) :261–286.
- [234] Place TL, Domann FE, Case AJ. Limitations of oxygen delivery to cells in culture : An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017;113 :311–322.
- [235] Rhim JS, Arnstein P. Inhibition of Chemically Induced Carcinogenesis of Canine Cells In Vitro by Infection With Mouse Xenotropic Type C Virus. *Journal of the National Cancer Institute*. 1980;64(2) :345–351.
- [236] Otsuji TG, Bin J, Yoshimura A, Tomura M, Tateyama D, Minami I, et al. A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production. *Stem cell reports*. 2014;2(5) :734–745.
- [237] Hookway TA, Butts JC, Lee E, Tang H, McDevitt TC. Aggregate formation and suspension culture of human pluripotent stem cells and differentiated progeny. *Methods*. 2016;101 :11–20.
- [238] Smoluchowski Mv. Drei vortrage uber diffusion, brownsche bewegung und koagulation von kolloidteilchen. *ZPhy*. 1916;17 :557–585.
- [239] Enmon Jr RM, O'Connor KC, Song H, Lacks DJ, Schwartz DK. Aggregation kinetics of well and poorly differentiated human prostate cancer cells. *Biotechnology and bioengineering*. 2002;80(5) :580–588.
- [240] Huang PY, Hellums JD. Aggregation and disaggregation kinetics of human blood platelets : Part I. Development and validation of a population balance method. *Biophysical journal*. 1993;65(1) :334–343.
- [241] Huang PY, Hellums JD. Aggregation and disaggregation kinetics of human blood platelets : Part II. Shear-induced platelet aggregation. *Biophysical journal*. 1993;65(1) :344–353.

- [242] Huang PY, Hellums JD. Aggregation and disaggregation kinetics of human blood platelets : Part III. The disaggregation under shear stress of platelet aggregates. *Biophysical journal*. 1993 ;65(1) :354–361.
- [243] Jadhav S, Konstantopoulos K. Fluid shear-and time-dependent modulation of molecular interactions between PMNs and colon carcinomas. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2002 ;283(4) :C1133–C1143.
- [244] Yin M, Li X, Tan S, Zhou HJ, Ji W, Bellone S, et al. Tumor-associated macrophages drive spheroid formation during early transcoelomic metastasis of ovarian cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2016 ;126(11) :4157–4173.
- [245] Puliafito A, De Simone A, Seano G, Gagliardi PA, Di Blasio L, Chianale F, et al. Three-dimensional chemotaxis-driven aggregation of tumor cells. *Scientific reports*. 2015 ;5(1) :1–12.
- [246] Kumar S, Ramkrishna D. On the solution of population balance equations by discretization—III. Nucleation, growth and aggregation of particles. *Chemical Engineering Science*. 1997 ;52(24) :4659–4679.
- [247] F Family DPL. *Kinetics of Aggregation and Gelation*. Elsevier Science Publishers B.V ; 1984.
- [248] McMurtrey RJ. Analytic models of oxygen and nutrient diffusion, metabolism dynamics, and architecture optimization in three-dimensional tissue constructs with applications and insights in cerebral organoids. *Tissue Engineering Part C : Methods*. 2016 ;22(3) :221–249.
- [249] Freyer J, Sutherland R. A reduction in the in situ rates of oxygen and glucose consumption of cells in EMT6/Ro spheroids during growth. *Journal of cellular physiology*. 1985 ;124(3) :516–524.
- [250] Raghavan S, Mehta P, Horst EN, Ward MR, Rowley KR, Mehta G. Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. *Oncotarget*. 2016 ;7(13) :16948.
- [251] Rizzuti I, Mascheroni P, Arcucci S, Ben-Mériem Z, Prunet A, Barentin C, et al. Mechanical-control of cell proliferation increases resistance to chemotherapeutic agents. *bioRxiv*. 2020.
- [252] Lin RZ, Chou LF, Chien CCM, Chang HY. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation : roles of E-cadherin and  $\beta$ 1-integrin. *Cell and tissue research*. 2006 ;324(3) :411–422.
- [253] Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, et al. In vitro cultivation of human tumors : establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 1973 ;51(5) :1417–1423.
- [254] Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research*. 1998 ;243(2) :359–366.
- [255] Paoluzzi M, Leoni M, Marchetti MC. Fractal aggregation of active particles. *Physical Review E*. 2018 ;98.
- [256] Perez T, Nelson W. Cadherin adhesion : mechanisms and molecular interactions. In : *Cell adhesion*. Springer ; 2004. p. 3–21.
- [257] Paszek MJ, Boettiger D, Weaver VM, Hammer DA. Integrin clustering is driven by mechanical resistance from the glycocalyx and the substrate. *PLoS Comput Biol*. 2009 ;5(12) :e1000604.
- [258] Fuchs vN. Über die stabilität und aufladung der aerosole. *Zeitschrift für Physik*. 1934 ;89(11-12) :736–743.
- [259] Elimelech M, Gregory J, Jia X. *Particle deposition and aggregation : measurement, modelling and simulation*. Butterworth-Heinemann ; 2013.
- [260] Sir MB. Cancer—a biological approach. *Br med J*. 1957 ;1 :779.
- [261] Thomas L, Lawrence H. *Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states*. New York : Hoeber-Harper. 1959 :529–32.
- [262] BURNET M. Immunological factors in the process of carcinogenesis. *British medical bulletin*. 1964 ;20(2) :154–158.

- [263] Burnet F. The concept of immunological surveillance. *Immunological Aspects of Neoplasia*. 1970;13 :1–27.
- [264] Salmon H, Remark R, Gnjatic S, Merad M. Host tissue determinants of tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*. 2019;19(4) :215–227.
- [265] Cabrita R, Lauss M, Sanna A, Donia M, Larsen MS, Mitra S, et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature*. 2020;577(7791) :561–565.
- [266] Petitprez F, de Reyniès A, Keung EZ, Chen TWW, Sun CM, Calderaro J, et al. B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature*. 2020;577(7791) :556–560.
- [267] Helmink BA, Reddy SM, Gao J, Zhang S, Basar R, Thakur R, et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature*. 2020;577(7791) :549–555.
- [268] Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *The Lancet*. 1911;177(4580) :1572–1573.
- [269] Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nature immunology*. 2013;14(10) :986–995.
- [270] Italiani P, Boraschi D. Development and functional differentiation of tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in inflammatory reactions. *Macrophages*. 2017 :23–43.
- [271] Franklin RA, Liao W, Sarkar A, Kim MV, Bivona MR, Liu K, et al. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science*. 2014;344(6186) :921–925.
- [272] Laviron M, Boissonnas A. Ontogeny of tumor-associated macrophages. *Frontiers in immunology*. 2019;10 :1799.
- [273] Gouon-Evans V, Lin EY, Pollard JW. Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development. *Breast Cancer Research*. 2002;4(4) :1–10.
- [274] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization : tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 2002;23(11) :549–555.
- [275] Nucera S, Bizziato D, De Palma M. The interplay between macrophages and angiogenesis in development, tissue injury and regeneration. *The International journal of developmental biology*. 2011;55(ARTICLE) :495–503.
- [276] Comito G, Giannoni E, Segura C, Barcellos-de Souza P, Raspollini M, Baroni G, et al. Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. *Oncogene*. 2014;33(19) :2423–2431.
- [277] Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, Liao D, Zhang N, DeNardo DG, et al. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer research*. 2010;70(19) :7465–7475.
- [278] Kaneda MM, Messer KS, Ralainirina N, Li H, Leem CJ, Gorjestani S, et al. PI3K $\gamma$  is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature*. 2016;539(7629) :437–442.
- [279] DeNardo DG, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2019;19(6) :369–382.
- [280] Strauss L, Mahmoud MA, Weaver JD, Tijaro-Ovalle NM, Christofides A, Wang Q, et al. Targeted deletion of PD-1 in myeloid cells induces antitumor immunity. *Science immunology*. 2020;5(43).
- [281] Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer research*. 2004;64(19) :7022–7029.

- [282] O'Sullivan C, Lewis CE, Harris AL, et al. Secretion of epidermal growth factor by macrophages associated with breast carcinoma. *The Lancet*. 1993;342(8864) :148–149.
- [283] Haque AR, Moriyama M, Kubota K, Ishiguro N, Sakamoto M, Chinju A, et al. CD206+ tumor-associated macrophages promote proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma via EGF production. *Scientific reports*. 2019;9(1) :1–10.
- [284] Casanova-Acebes M, Dalla E, Leader AM, LeBerichel J, Nikolic J, Morales BM, et al. Tissue-resident macrophages provide a pro-tumorigenic niche to early NSCLC cells. *Nature*. 2021 :1–7.
- [285] Yoshioka T, Miyamoto M, Cho Y, Ishikawa K, Tsuchikawa T, Kadoya M, et al. Infiltrating regulatory T cell numbers is not a factor to predict patient's survival in oesophageal squamous cell carcinoma. *British journal of cancer*. 2008;98(7) :1258–1263.
- [286] Johnson KL, Kendall K, Roberts a. Surface energy and the contact of elastic solids. *Proceedings of the royal society of London A mathematical and physical sciences*. 1971;324(1558) :301–313.
- [287] Hertz H. Ueber die Berührung fester elastischer Körper, Ueber die Berührung fester elastischer Körper und über die Härte. *Gesammelte Werke*. 1881 :155–196.
- [288] Hertz H. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. De Gruyter; 2021.
- [289] INSERM. Diabète de type 2 : Un trouble du métabolisme principalement lié au mode de vie;. <https://www.inserm.fr/dossier/diabete-type-2/>.
- [290] EFS. Les produits de thérapie cellulaire et tissulaire. Établissement Français du Sang. Available from : <https://www.efs.sante.fr/activite/les-produits-de-therapie-cellulaire-et-tissulaire>.
- [291] Leclerc T. Quelles cellules souches pour la thérapie cellulaire? *Laennec*. 2011;59(1) :44–56.
- [292] MacDonald A. Cell potency : totipotent vs pluripotent vs multipotent stem cells. *Technol Netw*. 2018.
- [293] University of Nebraska, Medical Center. Importance of Stem Cells. UNMC. Available from : <https://www.unmc.edu/stemcells/educational-resources/importance.html>.
- [294] Ávila-González D, Portillo W, García-López G, Molina-Hernández A, Díaz-Martínez NE, Díaz NF. Unraveling the Spatiotemporal Human Pluripotency in Embryonic Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021 ;9.
- [295] Coad J, Pedley K, Dunstall M. *Anatomy and physiology for midwives e-book*. Elsevier Health Sciences; 2019.
- [296] ThermoFisher SCIENTIFIC. Useful Numbers for Cell Culture. thermofisher. Available from : <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html>.
- [297] Bardy J, Chen AK, Lim YM, Wu S, Wei S, Weiping H, et al. Microcarrier suspension cultures for high-density expansion and differentiation of human pluripotent stem cells to neural progenitor cells. *Tissue Engineering Part C : Methods*. 2013;19(2) :166–180.
- [298] Borys BS, So T, Colter J, Dang T, Roberts EL, Revay T, et al. Optimized serial expansion of human induced pluripotent stem cells using low-density inoculation to generate clinically relevant quantities in vertical-wheel bioreactors. *Stem Cells Translational Medicine*. 2020.
- [299] Lei Y, Schaffer DV. A fully defined and scalable 3D culture system for human pluripotent stem cell expansion and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(52) :E5039–E5048.
- [300] Shao Y, Taniguchi K, Gurdziel K, Townshend RF, Xue X, Yong KMA, et al. Self-organized amniogenesis by human pluripotent stem cells in a biomimetic implantation-like niche. *Nature materials*. 2017;16(4) :419–425.

- [301] Garreta E, Prado P, Tarantino C, Oria R, Fanlo L, Martí E, et al. Fine tuning the extracellular environment accelerates the derivation of kidney organoids from human pluripotent stem cells. *Nature materials*. 2019;18(4) :397–405.
- [302] Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish : modeling development and disease using organoid technologies. *Science*. 2014;345(6194).
- [303] Zheng Y, Xue X, Shao Y, Wang S, Esfahani SN, Li Z, et al. Controlled modelling of human epiblast and amnion development using stem cells. *Nature*. 2019;573(7774) :421–425.
- [304] El Khattabi W, Aichane A, Riah A, Jabri H, Afif H, Bouayad Z. Analyse de la sémiologie radioclinique du kyste hydatique pulmonaire. *Revue de Pneumologie clinique*. 2012;68(6) :329–337.
- [305] Taniguchi K, Shao Y, Townshend RF, Tsai YH, DeLong CJ, Lopez SA, et al. Lumen formation is an intrinsic property of isolated human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2015;5(6) :954–962.
- [306] Taniguchi K, Shao Y, Townshend RF, Cortez CL, Harris CE, Meshinchi S, et al. An apicosome initiates self-organizing morphogenesis of human Pluripotent Stem Cells. *Journal of Cell Biology*. 2017;216(12) :3981–3990.
- [307] Olmer R, Haase A, Merkert S, Cui W, Paleček J, Ran C, et al. Long term expansion of undifferentiated human iPS and ES cells in suspension culture using a defined medium. *Stem cell research*. 2010;5(1) :51–64.
- [308] Alessandri K, Feyeux M, Gurchenkov B, Delgado C, Trushko A, Krause KH, et al. A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC). *Lab on a Chip*. 2016;16(9) :1593–1604.
- [309] Bertalan Z, Zapperi S, La Porta CA. Modeling mechanical control of spindle orientation of intestinal crypt stem cells. *Journal of theoretical biology*. 2017;430 :103–108.
- [310] Llense F, Labouesse M. How Daughters Tell Their Mums to Behave. *Developmental Cell*. 2021;56(2) :161–163.
- [311] Fridley KM, Kinney MA, McDevitt TC. Hydrodynamic modulation of pluripotent stem cells. *Stem cell research & therapy*. 2012;3(6) :1–9.
- [312] Miroshnikova YA, Le HQ, Schneider D, Thalheim T, Rübsam M, Bremicker N, et al. Adhesion forces and cortical tension couple cell proliferation and differentiation to drive epidermal stratification. *Nature cell biology*. 2018;20(1) :69–80.
- [313] Shyer AE, Rodrigues AR, Schroeder GG, Kassianidou E, Kumar S, Harland RM. Emergent cellular self-organization and mechanosensation initiate follicle pattern in the avian skin. *Science*. 2017;357(6353) :811–815.
- [314] Trushko A, Di Meglio I, Merzouki A, Blanch-Mercader C, Abuhattum S, Guck J, et al. Buckling of an epithelium growing under spherical confinement. *Developmental cell*. 2020;54(5) :655–668.
- [315] Cooper JA. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *Journal of Cell Biology*. 1987;105(4) :1473–1478.
- [316] Even-Ram S, Artym V, Yamada KM. Matrix control of stem cell fate. *Cell*. 2006;126(4) :645–647.
- [317] Ben Amar MB, Goriely A. Growth and instability in elastic tissues. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*. 2005;53(10) :2284–2319.
- [318] Wu PH, Aroush DRB, Asnacios A, Chen WC, Dokukin ME, Doss BL, et al. A comparison of methods to assess cell mechanical properties. *Nature methods*. 2018;15 :491–498.
- [319] Monnier S, Delarue M, Brunel B, Dolega ME, Delon A, Cappello G. Effect of an osmotic stress on multicellular aggregates. *Methods*. 2016;94 :114–119.

- [320] Budday S, Nay R, de Rooij R, Steinmann P, Wyrobek T, Ovaert TC, et al. Mechanical properties of gray and white matter brain tissue by indentation. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2015;46 :318–330.
- [321] Ben Amar M, Jia F. Anisotropic growth shapes intestinal tissues during embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 ;110(26) :10525–10530.
- [322] Hannezo E, Prost J, Joanny JF. Mechanical instabilities of biological tubes. *Physical review letters*. 2012;109(1) :018101.
- [323] Serikawa KA, Mandoli DF. An analysis of morphogenesis of the reproductive whorl of *Acetabularia acetabulum*. *Planta*. 1998;207(1) :96–104.
- [324] Alim K, Armon S, Shraiman BI, Boudaoud A. Leaf growth is conformal. *Physical biology*. 2016;13(5) :05LT01.
- [325] Xu F, Fu C, Yang Y. Water affects morphogenesis of growing aquatic plant leaves. *Physical Review Letters*. 2020;124(3) :038003.
- [326] Goriely A. *The mathematics and mechanics of biological growth*. vol. 45. Springer; 2017.
- [327] Gin E, Tanaka EM, Bruschi L. A model for cyst lumen expansion and size regulation via fluid secretion. *Journal of theoretical biology*. 2010;264(3) :1077–1088.
- [328] Duclut C, Sarkar N, Prost J, Jülicher F. Fluid pumping and active flexoelectricity can promote lumen nucleation in cell assemblies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(39) :19264–19273.
- [329] Chan CJ, Hiriagi T. Integration of luminal pressure and signalling in tissue self-organization. *Development*. 2020;147(5) :dev181297.
- [330] Taber LA, Humphrey JD. Stress-modulated growth, residual stress, and vascular heterogeneity. *J Biomech Eng*. 2001 ;123(6) :528–535.
- [331] Humphrey J. Vascular adaptation and mechanical homeostasis at tissue, cellular, and sub-cellular levels. *Cell biochemistry and biophysics*. 2008;50(2) :53–78.
- [332] Mirabet V, Das P, Boudaoud A, Hamant O. The role of mechanical forces in plant morphogenesis. *Annual review of plant biology*. 2011 ;62 :365–385.
- [333] Kiss R, Bock H, Pells S, Canetta E, Adya AK, Moore AJ, et al. Elasticity of human embryonic stem cells as determined by atomic force microscopy. *Journal of biomechanical engineering*. 2011 ;133(10).
- [334] Goriely A, Ben Amar M. On the definition and modeling of incremental, cumulative, and continuous growth laws in morphoelasticity. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*. 2007;6(5) :289–296.
- [335] Goriely A, Ben Amar M. Differential growth and instability in elastic shells. *Physical review letters*. 2005;94(19) :198103.
- [336] Zhang H, Li B, Shao Y, Feng XQ. Morphomechanics of tumors. *Current Opinion in Biomedical Engineering*. 2020;15 :51–58.
- [337] Biot MA. Surface instability of rubber in compression. *Applied Scientific Research, Section A*. 1963;12(2) :168–182.
- [338] Harris AR, Charras G. Experimental validation of atomic force microscopy-based cell elasticity measurements. *Nanotechnology*. 2011 ;22(34) :345102.
- [339] Harris AR, Peter L, Bellis J, Baum B, Kabla AJ, Charras GT. Characterizing the mechanics of cultured cell monolayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(41) :16449–16454.

- [340] Griffith AA. VI. The phenomena of rupture and flow in solids. *Philosophical transactions of the royal society of london Series A, containing papers of a mathematical or physical character*. 1921 ;221(582-593) :163–198.
- [341] Lake G, Thomas A. The strength of highly elastic materials. *Proceedings of the Royal Society of London Series A Mathematical and Physical Sciences*. 1967 ;300(1460) :108–119.
- [342] Tang J, Li J, Vlassak JJ, Suo Z. Fatigue fracture of hydrogels. *Extreme Mechanics Letters*. 2017 ;10 :24–31.
- [343] Sun JY, Zhao X, Illeperuma WR, Chaudhuri O, Oh KH, Mooney DJ, et al. Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature*. 2012 ;489(7414) :133–136.
- [344] Dechristé G, Fehrenbach J, Grisetti E, Lobjois V, Pognard C. Viscoelastic modeling of the fusion of multicellular tumor spheroids in growth phase. *Journal of theoretical biology*. 2018 ;454 :102–109.
- [345] Li B, Cao YP, Feng XQ. Growth and surface folding of esophageal mucosa : a biomechanical model. *Journal of biomechanics*. 2011 ;44(1) :182–188.
- [346] Hannezo E, Prost J, Joanny JF. Instabilities of monolayered epithelia : shape and structure of villi and crypts. *Physical Review Letters*. 2011 ;107(7) :078104.
- [347] Pinheiro D, Bellaiche Y. Mechanical force-driven adherens junction remodeling and epithelial dynamics. *Developmental cell*. 2018 ;47(1) :3–19.
- [348] Khalilgharibi N, Mao Y. To form and function : on the role of basement membrane mechanics in tissue development, homeostasis and disease. *Open Biology*. 2021 ;11(2) :200360.
- [349] Ciarletta P, Ben Amar M. Papillary networks in the dermal–epidermal junction of skin : a biomechanical model. *Mechanics Research Communications*. 2012 ;42 :68–76.
- [350] Bateman J, Reddy RS, Saito H, Van Vactor D. The receptor tyrosine phosphatase Dlar and integrins organize actin filaments in the *Drosophila* follicular epithelium. *Current Biology*. 2001 ;11(17) :1317–1327.
- [351] Delon I, Brown NH. The integrin adhesion complex changes its composition and function during morphogenesis of an epithelium. *Journal of cell science*. 2009 ;122(23) :4363–4374.
- [352] Beira JV, Paro R. The legacy of *Drosophila* imaginal discs. *Chromosoma*. 2016 ;125(4) :573–592.
- [353] LeGoff L, Rouault H, Lecuit T. A global pattern of mechanical stress polarizes cell divisions and cell shape in the growing *Drosophila* wing disc. *Development*. 2013 ;140(19) :4051–4059.
- [354] Mao Y, Tournier AL, Hoppe A, Kester L, Thompson BJ, Tapon N. Differential proliferation rates generate patterns of mechanical tension that orient tissue growth. *The EMBO journal*. 2013 ;32(21) :2790–2803.
- [355] Rauskolb C, Sun S, Sun G, Pan Y, Irvine KD. Cytoskeletal tension inhibits Hippo signaling through an Ajuba-Warts complex. *Cell*. 2014 ;158(1) :143–156.
- [356] Pastor-Pareja JC, Xu T. Shaping cells and organs in *Drosophila* by opposing roles of fat body-secreted Collagen IV and perlecan. *Developmental cell*. 2011 ;21(2) :245–256.
- [357] Sui L, Pflugfelder GO, Shen J. The Dorsocross T-box transcription factors promote tissue morphogenesis in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development*. 2012 ;139(15) :2773–2782.
- [358] Ramos-Lewis W, Page-McCaw A. Basement membrane mechanics shape development : Lessons from the fly. *Matrix Biology*. 2019 ;75 :72–81.
- [359] Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007 ;8(3) :221–233.
- [360] Pompili S, Latella G, Gaudio E, Sferra R, Vetuschi A. The Charming World of the Extracellular Matrix : A Dynamic and Protective Network of the Intestinal Wall. *Frontiers in Medicine*. 2021 ;8 :477.

- [361] Biot MA. Folding of a layered viscoelastic medium derived from an exact stability theory of a continuum under initial stress. *Quarterly of Applied Mathematics*. 1959;17(2) :185–204.
- [362] Kücken M, Newell AC. A model for fingerprint formation. *EPL (Europhysics Letters)*. 2004;68(1) :141.
- [363] Kücken M, Newell AC. Fingerprint formation. *Journal of theoretical biology*. 2005;235(1) :71–83.
- [364] Audoly B, Boudaoud A. Buckling of a stiff film bound to a compliant substrate—Part III : : Herringbone solutions at large buckling parameter. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*. 2008;56(7) :2444–2458.
- [365] Reis PM, Corson F, Boudaoud A, Roman B. Localization through surface folding in solid foams under compression. *Physical review letters*. 2009;103(4) :045501.
- [366] Yin J, Yagüe JL, Eggenspieler D, Gleason KK, Boyce MC. Deterministic order in surface micro-topologies through sequential wrinkling. *Advanced materials*. 2012;24(40) :5441–5446.
- [367] Dervaux J, Ben Amar M. Morphogenesis of growing soft tissues. *Physical review letters*. 2008;101(6) :068101.
- [368] Dervaux J, Ciarletta P, Ben Amar M. Morphogenesis of thin hyperelastic plates : a constitutive theory of biological growth in the Föppl–von Kármán limit. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*. 2009;57(3) :458–471.
- [369] Rodriguez EK, Hoger A, McCulloch AD. Stress-dependent finite growth in soft elastic tissues. *Journal of biomechanics*. 1994;27(4) :455–467.
- [370] Kiran A, Kumar N, Mehandia V. Distinct Modes of Tissue Expansion in Free Versus Earlier-Confined Boundaries for More Physiological Modeling of Wound Healing, Cancer Metastasis, and Tissue Formation. *ACS omega*. 2021;6(17) :11209–11222.
- [371] Inoue Y, Tateo I, Adachi T. Epithelial tissue folding pattern in confined geometry. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*. 2019 :1–8.
- [372] Ruocco E, Fraldi M. An analytical model for the buckling of plates under mixed boundary conditions. *Engineering structures*. 2012;38 :78–88.
- [373] Loeffler C, Grajek J, Stankova K, Pearson A, Muti H, Trautwein C, et al. Classical Mathematical Models for Prediction of Response to Chemotherapy and Immunotherapy. preprint. 2021.
- [374] Santos-Oliveira P, Correia A, Rodrigues T, Ribeiro-Rodrigues TM, Matafome P, Rodríguez-Manzaneque JC, et al. The force at the tip-modelling tension and proliferation in sprouting angiogenesis. *PLoS computational biology*. 2015;11(8) :e1004436.
- [375] Moreira-Soares M, Coimbra R, Rebelo L, Carvalho J, Travasso RD. Angiogenic factors produced by hypoxic cells are a leading driver of anastomoses in sprouting angiogenesis—a computational study. *Scientific reports*. 2018;8(1) :1–12.
- [376] Chaplain M, Anderson A. Mathematical modelling, simulation and prediction of tumour-induced angiogenesis. *Invasion & metastasis*. 1996;16(4-5) :222–234.
- [377] Xu J, Vilanova G, Gomez H. A mathematical model coupling tumor growth and angiogenesis. *PloS one*. 2016;11(2) :e0149422.
- [378] Suzuki T, Minerva D, Nishiyama K, Koshikawa N, Chaplain MAJ. Study on the tumor-induced angiogenesis using mathematical models. *Cancer science*. 2018;109(1) :15–23.